

Generierung synthetischer Zytokine und Einfluss von IC7Fc auf Myokardinfarkt

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Puyan Rafii

aus Teheran

Düsseldorf, September 2022

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

2. Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2022

„GEH! GEHORCHE MEINEN WINKEN,
NUTZE DEINE JUNGEN TAGE,
LERNE ZEITIG KLÜGER SEIN!
AUF DES GLÜCKES GROßER WÄAGE
STEHT DIE ZUNGE SELTEN EIN.
DU MUßT STEIGEN ODER SINKEN,
DU MUßT HERRSCHEN UND GEWINNEN
ODER DIENEN UND VERLIEREN,
LEIDEN ODER TRIUMPHIEREN,
AMBOß ODER HAMMER SEIN.“

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	1
II.	Abbildungsverzeichnis	2
III.	Tabellenverzeichnis	3
IV.	Formelverzeichnis	3
1	Einleitung	4
1.1	Zytokine	4
1.2	Der JAK/STAT Signaltransduktionsweg	5
1.3	Die Interleukin-6 Familie	8
1.4	Klassische- und Trans-Signaltransduktion	12
1.5	Struktur der Zytokine der Interleukin-6 Familie	17
1.6	Cytokimera IC7	19
1.7	Myokardinfarkt	21
2	Ziel der Arbeit	24
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Antibiotika	25
3.1.2	Antikörper	25
3.1.3	Chemikalien	26
3.1.4	Geräte	27
3.1.5	Kits	28
3.1.6	Kulturmedien	28
3.1.7	Oligonukleotide	28
3.1.8	Plasmide	29
3.1.9	Puffer und Lösungen	29
3.1.10	Verbrauchsmaterialien	31
3.1.11	Zelllinien und Bakterienstämme	32
3.1.12	Zytokine	32
3.2	Methoden	32
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1.1	DNA-Gelelektrophorese	32
3.2.1.2	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	33
3.2.1.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure und Proteinen	33

3.2.1.4	Restriktionsspaltung von DNA	33
3.2.1.5	Dephosphorylierung von DNA	34
3.2.1.6	Phosphorylierung von DNA.....	34
3.2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
3.2.1.8	Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Bakterien	35
3.2.1.9	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	35
3.2.1.10	Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	36
3.2.1.11	RNA-Isolation	36
3.2.1.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.2.1.13	Sequenzierung von Plasmid-DNA	38
3.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	38
3.2.2.1	Lyse der Ba/F3-Zellen.....	38
3.2.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA) ...	39
3.2.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
3.2.2.4	Western Blot	40
3.2.2.5	Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	40
3.2.2.6	Protein-A Affinitätschromatografie	41
3.2.2.7	StrepTactinXT® Affinitätschromatografie	41
3.2.3	Zellbiologische Methoden	42
3.2.3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	42
3.2.3.2	Transfektion von HEK293-Zellen.....	43
3.2.3.3	Retrovirale Transduktion von Ba/F3 gp130-Zellen	43
3.2.3.4	Durchflusszytometrie.....	44
3.2.3.5	Proliferationsassay von Ba/F3-Zellen.....	44
3.2.3.6	Stimulationsassay von Ba/F3-Zellen	45
3.2.3.7	Proteinexpression in Expi293-Zellen.....	46
3.2.4	Tierexperimentelle Methoden	46
3.2.4.1	Tiere und Tierhaltung.....	46
3.2.4.2	Behandlung der Mäuse mit IC7-Fc.....	47
3.2.4.3	Ischämie/Reperfusion	47
3.2.4.4	Echokardiografie	48
3.2.4.5	Gomori-Trichrom-Färbung.....	48

4	Ergebnisse	50
4.1	<i>In-silico</i> Design der Cytokimera	50
4.2	Expression und Reinigung der Cytokimera	53
4.3	Charakterisierung der Cytokimera	58
4.3.1	Cytokimera sind biologisch aktiv und spezifisch	58
4.3.2	Cytokimera aktivieren den Trans-Signaltransduktionsweg kaum	65
4.3.3	IC7-Fc verbessert die Herzfunktionen nach einem Myokardinfarkt	69
5	Diskussion	73
5.1	Cytokimera sind biologisch aktiv und spezifisch	73
5.2	Signaltransduktionswege der Cytokimera	75
5.3	Einfluss des IC7-Fc auf Myokardinfarkt	78
6	Ausblick	85
7	Zusammenfassung	87
8	Summary	88
9	Literaturverzeichnis	89
10	Anhang	107
11	Danksagung	109

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
(v/w)	Volumen/Gewicht	LDH	Laktat-Dehydrogenase
(w/w)	Gewicht/Gewicht	LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
Å	Ångström	LPS	Lipopolysaccharide
ADA	<i>Anti drug antibodies</i>	LV	Linker Ventrikel
ADAM	<i>A disintegrin and Metalloprotease</i>	MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
AMI	akuter Myokardinfarkt	min	Minute
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MRT	Magnetresonanztomographie
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	NC-Membran	Nitrocellulose-Membran
BSF-2	<i>B-cell stimulatory factor 2</i>	NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
bzw.	beziehungsweise	NSTEMI	<i>non-ST-elevation myocardial infarction</i>
ca.	<i>Circa</i>	OPA-1	<i>Optic atrophy 1</i>
CED	Entzündliche Darmerkrankungen	OSM	Oncostatin-M
CHR	<i>Cytokine binding homology region</i>	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
CK	Creatinkinase	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
CLC	<i>Cardiotrophin-like cytokine</i>	PDB	Protein Datenbank
CLF	<i>Cytokine-like factor-1</i>	pDNA	Plasmid-DNA
CNTF	<i>Ciliary neutrophilic factor</i>	PEG	Polyethylenglykol
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i>	PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>	PKCδ	Protein Kinase C delta
DMSO	Dimethylsulfoxid	PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
DNA	Deoxyribonucleic acid	rh	Rekombinant, human
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	rpm	Runden pro Minute
EKG	Elektrodiagramm	RT	Raumtemperatur
eng.	englisch	RV	Rechter Ventrikel
ERK	<i>extracellular-signal-regulated kinase</i>	SAA1	Serum amyloid A1
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
EZD	Extrazelluläre Domäne	sec	<i>second</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	SH2	src-homology 2
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	sIL-6R	<i>soluble Interleukin-6 receptor</i>
Fc	<i>Fragment crystalline</i>	SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
FELASA	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i>	SPR	<i>Surface plasmon resonance; Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie</i>
FERM	<i>4.1-ezrin-radixin-moesin</i>	STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
g	Gravitation	STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
gp130	Glykoprotein 130	TACE	<i>Tumor necrosis factor converting enzyme</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor	Taq	<i>Thermus aquaticus</i>

GV-SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde <i>Society of Laboratory Animal Science</i>	TGF-β	<i>Transforming growth factor-beta</i>
h	<i>hour</i>	TLR	Toll-like Rezeptoren
HHV8	Humaner Herpes Virus 8	TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
I/R	Ischämie/Reperfusion	Treg	Regulatorische T-Zellen
Ig	Immunoglobulin	Ts	TwinStrep®
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>	Tyk	Tyrosinkinase
IL	Interleukin	UCP1	Uncoupling Protein 1
JAK	Januskinase	vIL-6	Virales Interleukin-6
kDa	Kilodalton	YAP	<i>Yes-associated protein</i>
LAD	<i>Left anterior descending</i>	ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben, Düsseldorf
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen	α	Anti/gegen

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismus des JAK/STAT Signalweges.	7
Abbildung 2: Zytokine der Interleukin-6 Familie und ihre Rezeptorkomplexe.....	9
Abbildung 3: Varianten der IL-6 Signaltransduktion.	14
Abbildung 4: Hyper-IL-6 und sgp130Fc	16
Abbildung 5: Schematischer Strukturaufbau der Zytokine der IL-6 Familie.	18
Abbildung 6: Strukturvergleich der α-Helices.....	19
Abbildung 7: Chimäre IC7 aus IL-6 und CNTF.....	21
Abbildung 8: Strukturbasiertes <i>Alignment</i> von IL-6 und LIF.	51
Abbildung 9: Sequenzabgleich der Chimäre.	52
Abbildung 10: Schematische Darstellung der generierten Chimäre IC7, GIO-6, GIL-6 und GIL-11.....	54
Abbildung 11: Expressionsverlauf der Cytokimera in Expi293.....	55
Abbildung 12: Reinigung der Cytokimera.	57
Abbildung 13: Cytokimera sind aktiv und spezifisch (qualitativer Nachweis).	59
Abbildung 14: Cytokimera sind aktiv und spezifisch (quantitativer Nachweis).....	60
Abbildung 15: Cytokimera sind aktiv und spezifisch (Stimulation).....	62
Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Stimulation von Ba/F3 Zellen durch Cytokimera....	64
Abbildung 17: Cytokimera initiieren kaum die Trans-Signalwege.	67
Abbildung 18: GIL-11-Ts Trans-Signaltransduktion lässt sich nicht durch sgp130Fc inhibieren.	68

Abbildung 19: Schematische Darstellung des I/R-Versuchsprotokolls <i>in-vivo</i>	69
Abbildung 20: IC7-Fc verbessert die Herzfunktionen nach einem AMI.	70
Abbildung 21: IC7-Fc vermindert durch I/R induzierte Infarktgröße.	72
Abbildung 22: Vergleich der Signaltransduktionswege der Cytokimera, IL-6 und vIL6.	77
Abbildung 23: Hippo-YAP1/TAZ Signalweg in der molekularen Kardiologie.	79
Abbildung 24: Immunzellinfiltration des Herzen nach einem Myokard Infarkt.	81
Abbildung 25: Ba/F3-Zellen exprimieren den LIFR und OSMR auf der Oberfläche.	107
Abbildung 26: IC7-Fc verbessert die Regeneration nach einem Myokardinfarkt.	108

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antibiotika.	25
Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper.	25
Tabelle 3: Liste der Verwendeten Chemikalien.	26
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Geräte.	27
Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits.	28
Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kultivierungsmedien.	28
Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung und Klonierung der pDNA und Genfragmente.	28
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten und klonierten Plasmide.	29
Tabelle 9: Im Zuge dieser Verwendete Puffer und Lösungen.	29
Tabelle 10: Liste der benutzten Verbrauchsmaterialien.	31
Tabelle 11: Liste der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.	32
Tabelle 12: Verwendete, natürliche, humane Zytokine.	32
Tabelle 13: Reaktionsansatz einer PCR mit der Phusion DNA-Polymerase.	37
Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifikation bestimmter DNA-Regionen mit der Phusion DNA-Polymerase.	37
Tabelle 15: Reaktionsansatz für eine cPCR.	38
Tabelle 16: PCR-Programm für eine cPCR.	38
Tabelle 17: EC50 Werte der Cytokimera und Zytokine.	61

IV. Formelverzeichnis

Formel 1: Lambert-beersches Gesetz.	33
--	----

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Als Zytokine oder Entzündungsmediatoren werden kleine glykosylierte Polypeptidketten mit einer Größe von ~15-25 kDa bezeichnet, die maßgeblich an der Immunregulation beteiligt sind. Sie sind unter anderem am Zellwachstum, der Zelldifferenzierung oder der Regulation der Genexpression beteiligt. Sie sind ebenfalls an der Regulation von Akut-Phase Proteinen wie Serum amyloid A1 (SAA1) involviert, welche hauptsächlich in Hepatozyten, marginal auch in Adipozyten sowie der Speicheldrüse exprimiert werden. Weiterhin liegt eine Beteiligung in der Differenzierung von Stammzellen sowie der Apoptose vor. Zytokine haben einen ausgeprägten pleiotropen Charakter, was in verschiedenen Zelltypen zu unterschiedlichen Zellantworten führen kann. Sie können in pro- und anti-inflammatorische Zytokine unterteilt werden. Pro-inflammatorische Zytokine rufen eine Entzündungsreaktion hervor, während anti-inflammatorische diese Reaktionen vermindern und zur Wundheilung beitragen können. Die Wichtigkeit der Zytokine wird bei einer Dysregulation deutlich. Ein Überschuss pro-inflammatorischer Zytokine kann zur Gewebeschädigung, Ausbildung von Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis oder zu chronischen Entzündungsreaktionen wie Morbus Chron führen. Im Gegensatz dazu kann ein Überschuss anti-inflammatorischer Zytokine die Wahrscheinlichkeit an Krebs oder an viralen sowie bakteriellen Infektionen zu erkranken erhöhen (Tanaka *et al.*, 2014).

Zytokine können von verschiedenen Zellen einschließlich Immunzellen exprimiert und sezerniert werden. Hierbei werden meist autokrin oder parakrin die zytokinsezernierenden Zellen selbst beziehungsweise benachbarte Zellen adressiert. Weiterhin können die sezernierten Zytokine auch endokrin über die Blutbahn an entfernte Zellen und Organe gelangen (Gerharz *et al.*, 2000).

Zytokine können unter verschiedenen Gesichtspunkten klassifiziert werden. Eine Möglichkeit ist die Einteilung auf Basis des Rezeptortyps an dem das entsprechende Zytokin bindet: Typ I (Hematopoetin Familie) und Typ II (Interferon Familie) Zytokinfamilie, Tumor Nekrose Faktor (TNF) Rezeptorfamilie, Interleukin (IL)-1 und die damit verbundenen Toll-like Rezeptoren (TLR), IL-17 Rezeptoren, Rezeptor Tyrosinkinasen und die *transforming growth factor-β* (TGF-β) und den Chemokinen (Floss & Scheller, 2019).

1.2 Der JAK/STAT Signaltransduktionsweg

Interleukine sind als Proteine nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren, daher sind Rezeptoren an der Zelloberfläche notwendig, um die Signaltransduktion zu vermitteln. Die Rezeptoren haben keine intrinsische Kinaseaktivität und sind daher mit intrazellulären Kinasen assoziiert. Interleukine vermitteln die Signalweiterleitung mittels des Janus Kinase/*signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT)-Signalweges, aber auch über den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg, dem phosphoinositide-3-kinase (PI3K)-Signalweg und dem *nuclear factor κ B* (NF- κ B)-Signalweg (Morris *et al.*, 2018). Der JAK/STAT-Signalweg ist maßgeblich an der Immunantwort beteiligt, da er extrazelluläre Signale wie die der Zytokine über STAT zum Nukleus befördert und diese als Transkriptionsfaktoren die Transkription der Gene verändert. Hierbei werden dann Prozesse in Gang gesetzt, die unter anderem die Zellproliferation, Apoptose oder die Expression von Akute-Phase-Proteinen regulieren. In Säugern sind bisher vier Janus Kinasen bekannt, die in den frühen 1990er beschrieben wurden: JAK1, JAK2, JAK3 und die Tyrosin Kinase 2 (Tyk2). JAKs sind intrazellulär verankert und durch ihre zwei Kinasedomänen charakterisiert: Die JAK Homology 1 (JH1) Kinase, welche als funktionelle Gruppe für die Phosphorylierung verantwortlich ist und JAK Homology 2 (JH2), welche auch als Pseudo Kinase bezeichnet wird (Harpur *et al.*, 1992; Krolewski *et al.*, 1990; Min *et al.*, 2015; Takahashi & Shirasawa, 1994). Darüber hinaus wird die JAK Interaktion an den Zytokinrezeptoren durch eine N-terminale 4.1-ezrin-radaxin-moesin (FERM) Domäne erleichtert. Die hoch konservierte Domäne ist die *src-homology 2* (SH2), welche die Bindung zur phosphorylierten Tyrosin Seitengruppe ermöglicht (Ferraro & Lupardus, 2017). Die Bindung eines Zytokins am entsprechenden Rezeptorkomplex, bringt die Rezeptoren in eine räumliche Nähe zueinander. Infolgedessen erfolgt eine Transphosphorylierung der assoziierten Kinasen. Die Phosphatgruppen werden dann auf die Tyrosinreste transferiert, was dann die Bindung der STAT Proteine mit Hilfe ihrer SH2 Domänen ermöglicht. Die darauffolgende STAT Phosphorylierung (pSTAT) führt anschließend zu einer Homo- oder Heterodimerisierung der STAT Proteine. STAT Proteine können zwar über Importin- α -3 auch ohne Tyrosinphosphorylierung den Nukleus passieren aber nur die phosphorylierten STAT-Dimere erkennen die entsprechenden DNA-Motive und können somit als Transkriptionsfaktoren fungieren (Liu *et al.*, 2005). Bislang wurden sieben verschiedene STAT Proteine in Säugern gefunden, die in drei unterschiedlichen Chromosomen liegen:

STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 (Copeland *et al.*, 1995). Der JAK/STAT Signalweg ist exemplarisch für IL-6 gezeigt (Abbildung 1). Die drei Hauptsignalwege (JAK/STAT, MAPK und PI3K) werden nach Aktivierung durch verschiedene negative Rückkopplungsmechanismen reguliert. Zu den Hauptregulatoren wird die Gruppe der *supressor of cytokin signaling* (SOCS) Proteine gezählt. Bei der IL-6 und IL-11 Signaltransduktion fungiert beispielsweise SOCS3 als starker Gegenregulator, indem es am phosphoryliertem Tyr759 des humanen gp130 Rezeptors bindet. Dadurch werden sowohl die Aktivitäten der JAKs, als auch die Signalkaskaden inhibiert (Fischer *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2003). Durch einen Aminosäureaustausch von Tyr759 durch beispielsweise ein Phenylalanin kann daher ein konstitutiv aktives gp130 generiert werden (Atsumi *et al.*, 2002). Des Weiteren, ist der Eingriff in den JAK/STAT Signalweg mit Hilfe von JAK Inhibitoren ein probates Mittel zur therapeutischen Behandlung einer Reihe von Krankheiten, die in Zusammenhang mit einer pathologischen Hyperaktivität des Signalweges stehen. Hierzu zählen unter anderem myeloproliferative Neoplasie, rheumatoide Arthritis oder entzündliche Darmerkrankungen (McLornan *et al.*, 2021).

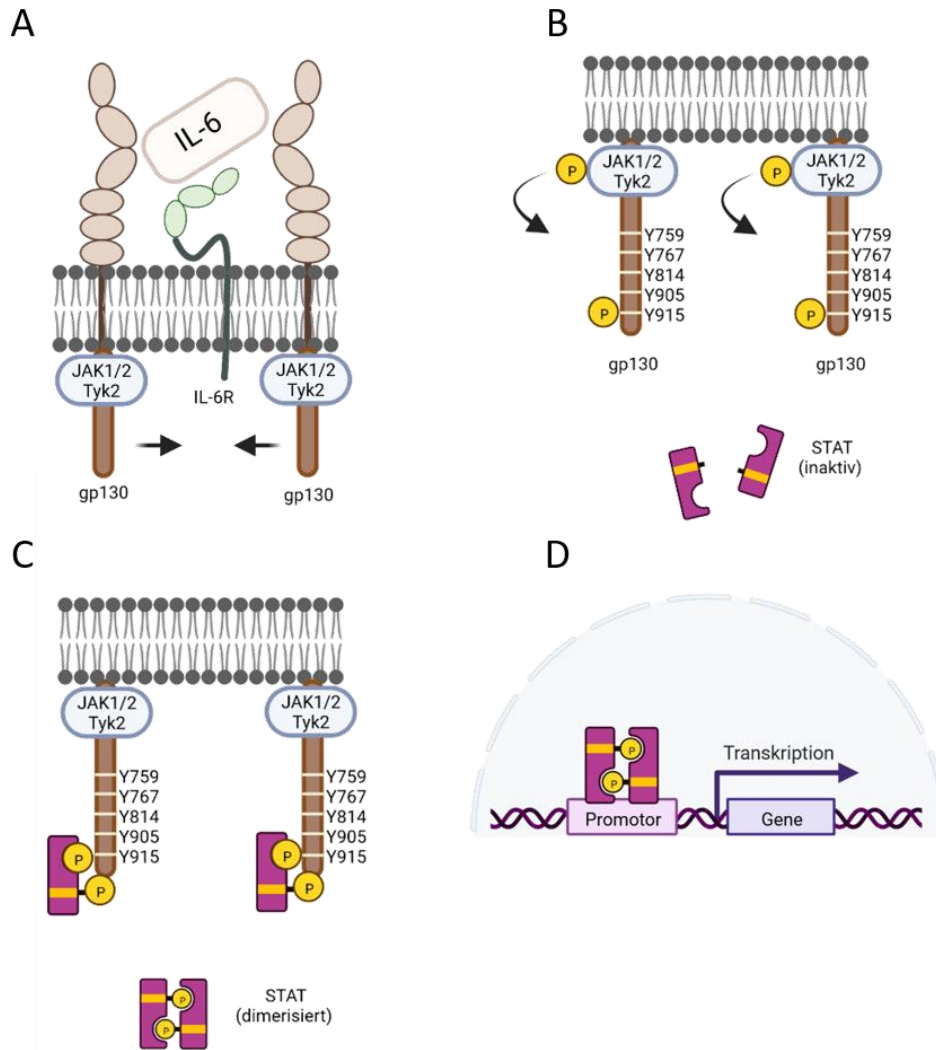


Abbildung 1: Mechanismus des JAK/STAT Signalweges.

A) Noch inaktiver IL-6 Rezeptorkomplex: IL-6 bindet an den IL-6R, welches dann zu einer Homodimerisierung der gp130 Rezeptoren führt. Dies bringt die rezeptorassoziierten JAKs in eine räumliche Nähe zueinander. **B)** Intrazellulärer Teil des Rezeptorkomplexes: JAKs phosphorylieren sich gegenseitig bevor eine Kinase-vermittelte Phosphorylierung der markierten Tyrosinreste stattfindet. Noch sind die STAT Moleküle inaktiv. **C)** Die STAT Proteine werden durch ihre SH2 Domäne rekrutiert und binden an den phosphorylierten Tyrosinresten. Die Aktivierung der STAT Proteine führt zu deren Dimerisierung. **D)** Die aktivierten STAT Dimere passieren den Nukleus, binden an DNA-Bindemotive von wo aus sie als Transkriptionsfaktoren zur Transkription der entsprechenden Gene führen. Abbildung erstellt mit BioRender.

1.3 Die Interleukin-6 Familie

Die Zytokine der Interleukin-6 Familie sind eine Gruppe, bestehend aus IL-6, IL-11, *oncostatin-M* (OSM), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *ciliary neutrophilic factor* (CNTF), *cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), IL-31 und IL-27, wobei IL-27 ein Heterodimer aus p28 und *Epstein-Barr virus-induced gene* (EBI3) besteht. Die Gruppierung der Zytokine in einer Familie basiert darauf, dass alle Rezeptorkomplexe mindestens eine signalweiterleitende gp130 Rezeptoruntereinheit benötigen. Eine schematische Darstellung der humanen Zytokine und Rezeptorkomplexe ist in (Abbildung 2) zu sehen (Aparicio-Siegmund & Garbers, 2015; Rose-John, 2018). Hierbei binden die Zytokine spezifisch an ihre korrespondierenden Rezeptoren. Zudem gibt es aber auch Kreuzreaktivitäten untereinander, auch Promiskuität genannt (Adrian-Segarra, Sreenivasan, *et al.*, 2018; Schuster *et al.*, 2003). Die Ektodomänen der meisten Rezeptoren der IL-6 Familie werden weiter untergliedert in einer N-terminalen *immunoglobulin-like* (Ig-like) Domäne, einer *cytokine binding homology region* (CHR) gefolgt von drei Fibronectin-III (FNIII) Domänen, welche an der Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes beteiligt sind. Der LIFR hat noch zwei CHR Domänen der Ig-like Domäne vorgeschaltet, während der OSMR nur eine CHR Domänen vorgeschaltet hat (Arita *et al.*, 2008; Rousseau *et al.*, 2008). Die erste CHR Domäne beinhaltet vier konservierte Cystein-Seitengruppen, welche Disulfidbrücken ausbilden können. Die zweite membrannähe CHR Domäne beinhaltet ein konserviertes Motiv mit der Aminosäuresequenz Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin (WSXWS), wobei X für jede beliebige, proteinogene Aminosäure steht (Bazan, 1990; Druszczynska *et al.*, 2022; Morris *et al.*, 2018).

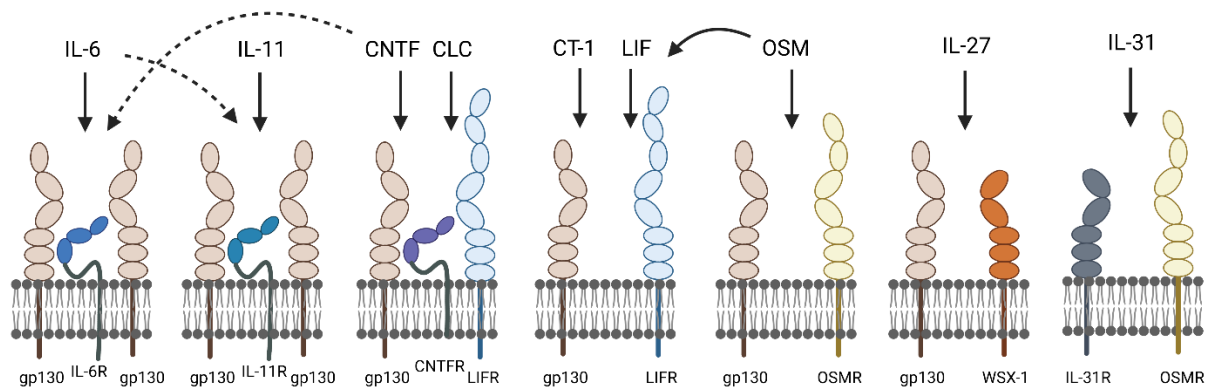


Abbildung 2: Zytokine der Interleukin-6 Familie und ihre Rezeptorkomplexe.

Schematische Darstellung der IL-6 Familie und die korrespondierenden Rezeptorkomplexe. IL-6 bzw. IL-11 bindet am IL-6R α bzw. IL-11R α gefolgt von der Bindung zum gp130, wobei IL-6 auch an den IL-11R binden kann. CLC und CNTF binden an den CNTFR gefolgt von einer Heterodimerisierung von gp130 und LIFR, wobei CNTF auch an den IL-6R binden kann. CT-1 und LIF binden ohne alpha-Rezeptor direkt an gp130 und LIFR. OSM bindet an gp130 und OSMR, bindet aber auch an den LIFR. IL-27 (p28 und EB13) bindet an gp130 und den WSX-1R. IL-31 bindet an den IL31R und den OSMR. Pfeile: starke Interaktion; gestrichelte Pfeile: schwache Interaktion. Bild erstellt mit BioRender.

IL-6: Als die Gruppe um Dr. Kishimoto 1986 die cDNA des *B-cell stimulatory factor 2* (BSF-2) klonierte, wurde deutlich, dass es sich bei dieser cDNA um die gleiche cDNA handelt, die auch für andere Proteine kodiert, welche verschiedene biologische Funktionen aufweisen (Gauldie *et al.*, 1987; Hibi *et al.*, 1990). Im Dezember 1988 einigte sich dann eine Gruppe der führenden 19 Wissenschaftlern auf dem Gebiet auf die Terminologie Interleukin-6.

IL-6 wird unter den Zytokinen der IL-6 Familie eine Schlüsselstellung im Zytokin-Netzwerk zugeschrieben. Die Hauptfunktionen liegen in der Hematopoese, der Regulation von Akute-Phase-Proteinen wie SAA1 und der Differenzierung der lymphoiden Stammzellen zu T- und B-Zellen. Zu den Hauptproduzenten von IL-6 gehören Makrophagen und Monozyten, aber auch T- und B-Zellen, Hepatozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Adipozyten können IL-6 generieren (Jones *et al.*, 2001).

IL-11: Rekombinantes IL-11 ist auch unter dem Handelsnamen Oprelevkin bekannt und ist gegen eine Chemotherapie-bedingte Thrombozytopenie zugelassen (Kurzrock, 2000; Rubenstein & Elting, 1998). IL-11 wurde 1990 erstmalig aus knochenmark-stammenden Fibrozyten-ähnliche Stromazellen isoliert. Hat man anfangs noch angenommen, IL-11 sei ausschließlich anti-inflammatorisch, werden ihm heute auch inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (Wilde & Faulds, 1998). Zu den Hauptaufgaben gehören die Regulation der Adipogenese und Neurogenese sowie die Thrombozytenreifung (Schwertschlag *et al.*, 1999;

Teramura *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2016). Des Weiteren ist IL-11 maßgeblich an der Entstehung der Fibrose beteiligt, wobei der Effekt des IL-11 hierzu kontrovers diskutiert wird und noch nicht ganz verstanden ist. Der IL-11R wird hauptsächlich auf Fibroblasten exprimiert. Die Fibroblasten können eine autokrine, ERK-abhängige, fibrogene Proteinsynthese in Gang setzen. Es gibt Berichte, in denen postuliert wird, dass eine Überexpression oder die Injektion von IL-11 in Mäusen zur Fibrose in Herz, Nieren und Lunge und darüber hinaus zu Organversagen führt (Corden *et al.*, 2020; Schafer *et al.*, 2017; Widjaja *et al.*, 2020). Weiterhin wird postuliert, dass die Inhibierung von IL-11 das Überleben von Hepatozyten bei einer nicht-alkoholischen Fettleber (NASH) fördert (Widjaja *et al.*, 2019). Im Gegensatz dazu wurde jedoch gezeigt, dass, die Injektion von IL-11 in Mäusen die Fibrose nach einem Myokardinfarkt verminderte und die Herzfunktionen verbessert (Obana *et al.*, 2010; Obana *et al.*, 2012).

CNTF: kann neben der Bindung zum CNTFR alternativ auch mit geringerer Affinität an den IL-6R binden (Schuster *et al.*, 2003). Es hat als neuronaler Wachstumsfaktor neuroprotektive Eigenschaften auf beispielsweise die Retina (Wen *et al.*, 2012). CNTF fehlt ein Signalpeptid zur Sekretion, wodurch es intrazellulär im Zytoplasma lokalisiert ist. Da es nur nach einem Gewebeschaden in die extrazelluläre Matrix freigesetzt wird, wird es auch als Läsionsfaktor bezeichnet (Sendtner *et al.*, 1997). Darüber hinaus, weist es auch ein Potenzial als Therapeutikum gegen metabolische Krankheiten auf wie Übergewicht oder Typ-II-Diabetes (Matthews & Febbraio, 2008). Axokine, ist der Handelsname eines, rekombinanten humanen (rh) CNTF, das C-terminal um 15 Aminosäuren verkürzt und zwei weitere substituiert wurden. Es sollte gegen Übergewicht eingesetzt werden, allerdings fiel Axokine in Phase III der klinischen Studie durch, da etwa 70% der Probanden nach etwa drei Monaten *anti-drug antibodies* (ADA) Antikörper gegen Axokine entwickelt hatten (Ettinger *et al.*, 2003; Lambert *et al.*, 2001; Preti, 2003). Kürzlich wurde von einer PEGylierten (S166D/Q167H) Superagonist-Variante des CNTF mit 40-facher Affinität und einer längeren Halbwertszeit gegenüber des Wildtyps berichtet, mit dem Ziel einer geringeren Immunogenität (Battista *et al.*, 2022).

OSM: Humanes OSM wurde 1998 beschrieben und kann alternativ zum hOSMR auch an den hLIFR binden (Malik *et al.*, 1989) (Mosley *et al.*, 1996). Unter den Mitgliedern der IL-6 Familie hat OSM das breiteste Signaltransduktionsprofil. Neben den Hauptsignalwegen mittels JAK/STAT, MAPK, PI3K findet auch eine Protein Kinase C delta (PKC δ) vermittelte Signaltransduktion statt (Hermanns, 2015). OSM wird von einer Reihe Immunzellen exprimiert

und wird durch pro-inflammatorische Mediatoren wie Lipopolysaccharide (LPS) weiter gesteigert (Richards, 2013). Zudem zeigt OSM kardioprotektive Eigenschaften. Die Tatsache, dass der OSMR auf kardialen Endothelzellen stark exprimiert wird, macht es zu einem pharmakologischen Ziel gegen kardiovaskuläre Schäden (Stawski & Trojanowska, 2019). Die im Zuge eines Myokardinfarktes im Herz infiltrierten Makrophagen sezernieren OSM. Das sezernierte OSM führt dabei zur Inhibierung der Fibroblastenaktivierung (Abe *et al.*, 2019). Darüber hinaus, wurde kürzlich gezeigt, dass das sezernierte OSM über den OSMR der Kardiomyozyten mittels des Transkriptionsfaktors (*yes-associated* protein) YAP zur Proliferation der Kardiomyozyten und somit zum kardialen Heilung beiträgt (Li *et al.*, 2020).

LIF: bekannt wurde es 1987, da es die Proliferation einer murinen myeloischen leukemischen Zelllinie inhibierte und die Makrophagendifferenzierung induzierte (Gearing *et al.*, 1987). Der LIFR wird auf verschiedenen Zelltypen exprimiert, einschließlich embryonaler Stammzellen (Majumder *et al.*, 2012), Monozyten (Rose-John, 2012), Hepatozyten (Lutz *et al.*, 2012), sowie der Plazenta (Champion *et al.*, 2012). Weibliche LIF-defiziente Mäuse sind zwar fruchtbar, jedoch zeigte sich hierbei ein Defekt in der Implantation des zu entwickelnden Embryos, sodass sie nicht in der Lage sind, Blastozysten zu entwickeln (Stewart *et al.*, 1992). Beim Menschen führt eine *loss-of-function* des LIFR durch beispielsweise Einzelnukleotid-Polymorphismen (*engl. single nucleotide polymorphism* (SNP)) zum Stüve-Wiedemann-Syndrom (Dagoneau *et al.*, 2004; Romeo Bertola *et al.*, 2016). Die LIF/LIFR-Achse ist ebenfalls in der Herzregeneration beteiligt. LIF fungiert als Überlebens- und Wachstumsfaktor von neonatalen ventrikulären Myozyten im Mausmodell (Sheng *et al.*, 1996) und induziert die Regeneration des Myokardiums nach einem Myokardinfarkt (Zou *et al.*, 2003). Des Weiteren reduzierte die prophylaktische Administration von LIF den Ischämie/Reperfusion (I/R)-induzierten Verlust von Kardiomyozyten im Kaninchen (Nelson *et al.*, 1995). In beiden Fällen wurde gezeigt, dass LIF einen Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies wie der Superoxid Dismutase bot und Überlebenssignalwege wie PI3K/Akt aktivierte.

CT-1: wurde 1995, also im Vergleich zu den anderen Mitgliedern der IL-6 Familie relativ spät entdeckt. Bekannt wurde es als Zytokin, dass eine Hypertrophie von Kardiomyozyten induzierte (Pennica *et al.*, 1995). Etwas später wurde ebenfalls bekannt, dass CT-1 das erwachsene Rattenherz vor Schaden schützte und zwar, sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch nach einer Ischämie/Reperfusion (Liao *et al.*, 2002). Es fungiert so wie auch LIF

als Überlebens- und Wachstumsfaktor von neonatalen ventrikulären Myozyten im Mausmodell (Sheng *et al.*, 1996).

CLC: Da CNTF- und CNTFR-defiziente Mäuse verschiedene Phänotypen zeigten, war das ein Indiz dafür, dass es einen anderen, kompensatorischen Liganden für den Rezeptorkomplex geben muss. Der Ligand wurde schließlich als ein stabil sekretierten Komplex aus CLC und dem löslichen Rezeptor *cytokine-like factor-1* (CLF) identifiziert (Elson *et al.*, 2000).

IL-27: Alle Zytokine der IL-6 Familie vermitteln die Signalweiterleitung hauptsächlich über STAT3. Die einzige Ausnahme ist IL-27, welches hauptsächlich über STAT1 weitergeleitet wird, da WSX-1 überwiegend durch STAT1 Aktivierung charakterisiert ist (Rose-John, 2018). Kürzlich wurde gezeigt, dass IL-27 die Thermogenese und den Energieverbrauch in Adipozyten fördert, indem es die Produktion des *uncoupling protein 1* (UCP1) in braunem Fettgewebe stimuliert. In diesem Zusammenhang schützt es vor Übergewicht und einer Insulinresistenz, was es für die Behandlung gegen Diabetes-Typ-II interessant macht (Wang *et al.*, 2021).

IL-31: ist ein inflammatorisches Zytokin, welches durch aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten produziert wird. Die Rezeptoren, die zur Signalweiterleitung des IL-31 erforderlich sind, werden konstitutiv in verschiedenen Organen exprimiert, darunter in der Haut, der Lunge, der Plazenta und dem Skelettmuskel (Zhang *et al.*, 2008). IL-31 wurde mit Erkrankungen wie atopischer Dermatitis in Verbindung gebracht und kann Juckreiz verursachen (Dubin *et al.*, 2021). Der monoklonale Antikörper Nemolizumab hingegen führt zur antagonistischen Blockade des IL-31R und wird daher zur Behandlung gegen den Juckreiz bei atopischer Dermatitis eingesetzt (Nakashima *et al.*, 2018).

1.4 Klassische- und Trans-Signaltransduktion

IL-6 wie auch IL-11 besitzen zunächst keine Affinität zum gp130. Erst nach der Bindung zum nicht-signalweiterleitenden alpha-Rezeptor folgt die Bindung zum gp130. Die daraus resultierende Homodimerisierung führt zu einer Signalweiterleitung durch die JAK/STAT und anderer Signalkaskaden (Hibi *et al.*, 1990; Jostock *et al.*, 2001; Taga *et al.*, 1989).

In der klassischen Signaltransduktion von IL-6 bindet es zunächst einen membranständigen IL-6R. Während gp130 ubiquitär auf alle Zelltypen exprimiert wird, ist die Oberflächenpräsentation des IL-6R hauptsächlich auf Hepatozyten, Megakaryozyten sowie

einigen Leukozyten- und Epithelzell-Subpopulationen limitiert, was folglich auch die Zelltypen auf denen klassische Signaltransduktion stimuliert werden können, stark limitiert (Jones *et al.*, 2001; Rose-John, 2012; Wolf *et al.*, 2014).

Die Trans-Signaltransduktion wird hauptsächlich durch Sheddasen ermöglicht. Sheddasen sind membranständige Proteasen, die extrazellulär die Ektodomänen der Transmembranproteine hydrolysieren. A *Disintegrin and Metalloprotease* (ADAM) 17 war die erste Sheddase, die molekularbiologisch charakterisiert wurde. Dabei stellte sich heraus, dass sie aus einer N-terminalen Signalsequenz, gefolgt von einer Pro-Domäne, der katalytischen Domäne (Metalloprotease), einer Disintegrin Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, einer einzelnen Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne bestehen (Moss *et al.*, 1997). Des Weiteren, ist ADAM17 auch in diversen pathophysiologische Prozessen beteiligt. Darunter bei der Entwicklung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED) wie Colitis ulcerosa sowie bei der Entstehung von Tumoren, kardiovaskulären Krankheiten, Diabetes, RA oder Alzheimer (Blaydon *et al.*, 2011; Dusterhoft *et al.*, 2019; Gooz, 2010). Nicht zuletzt spielt die Sheddase-Aktivität des ADAM17 und auch andere ADAMs eine große Rolle in der Signaltransduktion mancher Zytokine der IL-6 Familie (Rose-John, 2018; Schumacher & Rose-John, 2019). Die Stalk-Region des IL-6R besitzt eine Erkennungssequenz (Pro355 und Val356) für die proteolytische Spaltung der Ektodomäne zwischen den beiden Aminosäuren durch ADAM17, wobei die Stalk-Region auch durch ADAM10 hydrolysiert werden kann. Dadurch wird der IL-6R in löslicher Form (eng. *soluble IL-6R* (sIL-6R)) freigesetzt. Eine ortsgerichtete Mutagenese an Val356 ist hierbei für die gänzliche Aufhebung der Spaltung durch ADAM17 ausreichend (Riethmueller *et al.*, 2017; Rose-John & Heinrich, 1994). Darüber hinaus, kann der sIL-6R auch durch alternatives Spleißen der mRNA generiert werden, was sich in einer typischen C-terminalen Sequenz von zehn Aminosäuren manifestiert (Horiuchi *et al.*, 1994). Allerdings sind nur 1-20% des gesamten sIL-6R auf alternatives Spleißen zurückzuführen (Riethmueller *et al.*, 2017). Bei der Trans-Signaltransduktion kann nun zirkulierendes IL-6 zuerst an den löslichen IL-6R und dann als Komplex an gp130 binden, sodass die Signalkaskade in Gang gesetzt werden kann.

Darüber hinaus, gibt es eine dritte Art der IL-6 Signaltransduktion. Bei der Trans-Präsentation wird der membranständige IL-6R einer Zelle, einer anderen Zelle zur Verfügung gestellt. An diesen Rezeptor kann nun freies IL-6 binden und als IL6/mIL6R-Komplex an den gp130

Rezeptoren der benachbarten Zelle die Signalkaskaden induzieren. Die Trans-Präsentation kann unter anderem von dendritischen Zellen eingeleitet werden (Heink *et al.*, 2017).

In Abbildung 3 sind die verschiedenen Signaltransduktionswege am Beispiel des IL6/IL-6R-Komplex dargestellt.

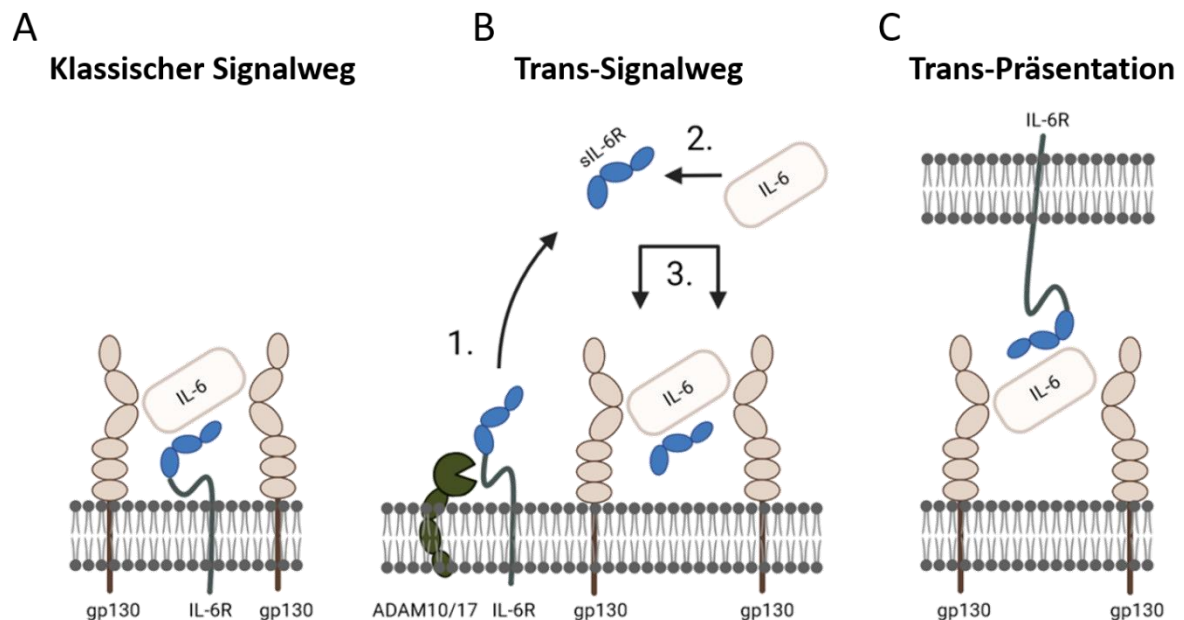


Abbildung 3: Varianten der IL-6 Signaltransduktion.

Tetramere Darstellung der Rezeptorkomplexe. **A)** Bei der klassischen Signaltransduktion bindet IL-6 an den membranständigen IL-6R. Der Komplex aus IL-6/IL-6R bindet dann an gp130, gefolgt von einer Homodimerisierung und den Signalkaskaden. **B)** Beim Trans-Signalweg bindet freies IL-6 den löslichen IL-6R, das seinen Ursprung entweder aus alternativem Spleißen oder aus der proteolytischen Spaltung des membranständigen IL-6R an der Stalk-Region mittels ADAM10 oder ADAM17 hat. Der Komplex aus IL-6/sIL-6R kann nun mit gp130 exprimierenden Zellen interagieren. **C)** Bei der Trans-Präsentation wird ein membrangebundener IL-6R (IL-6R) von einer anderen Zelle zur Verfügung gestellt, an dem freies IL-6 binden kann. Der Komplex aus IL-6/IL-6R kann folglich an gp130 Rezeptoren einer benachbarten Zelle binden und die Signalkaskade initiieren. Bild erstellt mit BioRender.

Während dem klassischen Signalweg eher protektive, regenerative und anti-inflammatorische Prozesse zugeschrieben werden, werden dem Trans-Signalweg eher Immunsystemaktivierende und somit pro-inflammatorische Prozesse zugeschrieben (Reeh *et al.*, 2019). In diesem Zusammenhang wurde auch beschrieben, dass der Trans-Signalweg deutlich stärker ist als der klassische Signalweg (Reeh *et al.*, 2019). Eigenschaften, die in Verbindung mit dem klassischen Signalweg stehen, sind intestinale Epithelzellproliferation, anti-apoptotische Effekte auf Epithelzellen, IL-6 vermittelte Regeneration der Leber und der Pankreas, hepatische Akut-Phase-Reaktion und Steigerung der bakteriellen Abwehr. In Kontrast dazu stehen pro-inflammatorische Prozesse des Trans-Signalweges wie die

Rekrutierung mononuklearer Zellen, Stimulation der weichen Muskelzellen, Inhibition der T-Zell-Apoptose sowie die Inhibition der T_{reg} Differenzierung (zusammengefasst in (Rose-John, 2018)). Da ADAM17 hierbei eine entscheidende regulatorische Funktion zukommt, ist der therapeutische Eingriff in die ADAM17-Aktivität naheliegend.

Das erste Werkzeug, dass generiert wurde, um den Trans-Signalweg zu erzwingen war Hyper-IL-6 (HIL-6), eine Fusion aus IL-6 und sIL-6R durch einen flexiblen Peptidlinker (Abbildung 4). Das künstlich entwickelte Zytokin zeigte eine 100-1000-fach stärkere Aktivität als der nicht-kovalent verknüpfte Komplex aus IL-6/sIL-6 (Fischer *et al.*, 1997). Durch dieses Werkzeug konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine effiziente Leberregeneration über den Trans-Signalweg verläuft (Adrian-Segarra, Sreenivasan, *et al.*, 2018; Galun *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2000).

Da der Trans-Signalweg nun aber viele pro-inflammatorische Eigenschaften hat und vielen Erkrankungen zugrunde liegt, war die Inhibierung dieses Signalweges eine logische Konsequenz.

Das zweite Werkzeug, welches generiert wurde, bestand aus der Ektodomäne des gp130, dimerisiert durch die Fusion an den Fc-Teil des humanen Immunglobulin G (IgG)1 Antikörpers, resultierend in dem Protein sgp130Fc (Abbildung 4). Da IL-6 alleine keine Affinität zum IL-6R hat, zeigte sgp130Fc keinerlei Effekt auf den klassischen Signalweg, blockte aber effektiv den Trans-Signalweg (Jostock *et al.*, 2001). Mit der Zeit zeigten sich zunehmend mehr präklinisch potentielle, therapeutische Anwendungen durch sgp130Fc zur Inhibierung des Trans-Signalweges (zusammengefasst in (Rose-John, 2018)).

Aktuell hat sgp130Fc unter dem Markennamen Olamkicept Phase II der klinischen Studie gegen CED abgeschlossen (Schreiber *et al.*, 2021). Auch im perfundiertem Herz in Folge eines Myokardinfarkts zeigt eine aktuelle Studie eine Überlegenheit der Inhibition des Trans-Signalweges, gegenüber einer totalen Inhibition (George *et al.*, 2021).

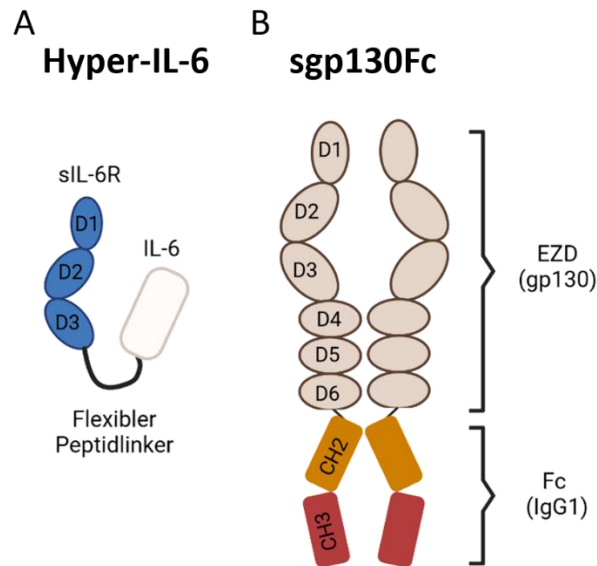


Abbildung 4: Hyper-IL-6 und sgp130Fc

A) Hyper-IL-6: Kovalent verbundene Fusion aus dem löslichen IL-6R und IL-6 durch einen flexiblen Peptidlinker an der C-terminalen D3 Domäne. **B)** sgp130Fc: Fusion aus der extrazellulären Domäne (EZD) des gp130 (D1-D6) an den konstanten schweren Ketten (CH2-CH3) eines IgG1 Antikörpers (Fc-Teil), dimerisiert über Disulfidbrücken in der Hinge-Region. Bild erstellt mit BioRender.

Weiterhin, kann nicht nur IL-6 den Trans-Signalweg initiieren, sondern auch IL-11. Hierbei wird der lösliche IL-11R jedoch nicht von ADAM10 und ADAM17, sondern nur von ADAM10 generiert. Analog zu IL-6, kann IL-11 an den sIL-11R binden, da es zunächst keine messbare Affinität zum gp130 aufweist. Der daraus resultierende Komplex IL-11/sIL-11R kann dann alle gp130-exprimierenden Zellen über den Trans-Signalweg stimulieren. Im Gegensatz zum IL-6 Trans-Signalweg, welcher recht gut untersucht ist, ist die biologische Rolle des IL-11 Trans-Signalweges noch nicht verstanden (Metcalf *et al.*, 2020). Dennoch kann auch hier sgp130Fc den Trans-Signalweg durch IL-11 vollständig inhibieren (Lokau *et al.*, 2016). Infolgedessen, wurde analog zu Hyper-IL-6, durch die Fusion des sIL-11R an IL-11 mittels Peptidlinkers ein Hyper-IL-11 generiert, das alle gp130-exprimierenden Zellen stimulieren kann (Pflanz *et al.*, 1999). Analog zu den beiden vorherigen Fusionsproteinen, wurde auch ein Hyper-CNTF generiert aus CNTF und sCNTFR, das alle gp130-exprimierenden Zellen aktiviert (Marz *et al.*, 2002).

Eine Sonderstellung bei den Signalwegen nimmt das virale IL-6 (vIL-6) ein, das seinen Ursprung in dem humanen Herpes Virus 8 (HHV8) hat. Trotz einer Sequenzidentität von nur 25%, gibt es eine hohe strukturelle Homologie zum humanen IL-6 (Chow *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum humanen IL-6 ist vIL-6 jedoch in der Lage, auch in Abwesenheit eines IL-6R an gp130 zu binden und die Signalkaskaden zu aktivieren, wodurch es den Trans-Signalweg imitiert. Folglich, ist auch hier sgp130Fc in der Lage die biologische Aktivität des vIL-6 zu inhibieren (Molden *et al.*, 1997; Mullberg *et al.*, 2000; Parravicini *et al.*, 1997).

Es wird postuliert, dass das Zusammenspiel aus IL-6, sIL-6R und sgp130 im Organismus eine Art Puffersystem darstellt. Der IL-6 Serumspiegel eines gesunden Menschen liegt zwischen 1-5 pg/ml. Dieser Spiegel kann bei einer Inflammation um einige tausendfach und bei einer letalen Sepsis sogar um das millionenfache ansteigen. Der Serumspiegel des IL-6R liegt bei 40-75 ng/ml und der des natürlichen sgp130 liegt bei 250-400 ng/ml (Padberg *et al.*, 1999; Rose-John, 2015). Durch Zellen sekretiertes IL-6 bindet an den sIL-6R im Blut mit einer Affinität von 1 nM, der Komplex IL-6/sIL-6R hingegen mit einer Affinität von nur 10 pM, was zu einer Neutralisation der IL-6 Aktivität führen sollte. Daher könnte dieser puffernde Mechanismus vor einer Überreaktion schützen

1.5 Struktur der Zytokine der Interleukin-6 Familie

Zytokine der IL-6 Familie, mit Ausnahme von IL-27 haben eine vier- α -Helix-Bündel Topologie mit einer hoch-hoch-runter-runter Ausrichtung der α -Helices. Die allgemeine Anordnung besteht aus jeweils zwei Paaren von antiparallelen Helices, wobei die Helices A-D ein Paar und B-C das andere Paar bilden (Metcalf *et al.*, 2020). Die Helices A-B werden über die A-B-Schleife verbunden. Die Helices B-C sind über die B-C-Schleife und die Helices C-D sind über die C-D-Schleife verbunden. Die Regionen innerhalb der Schleifen, die sich in der Nähe der Bindestelle III befinden, werden IIIA, IIIB und IIIC genannt (Abbildung 5A, B).

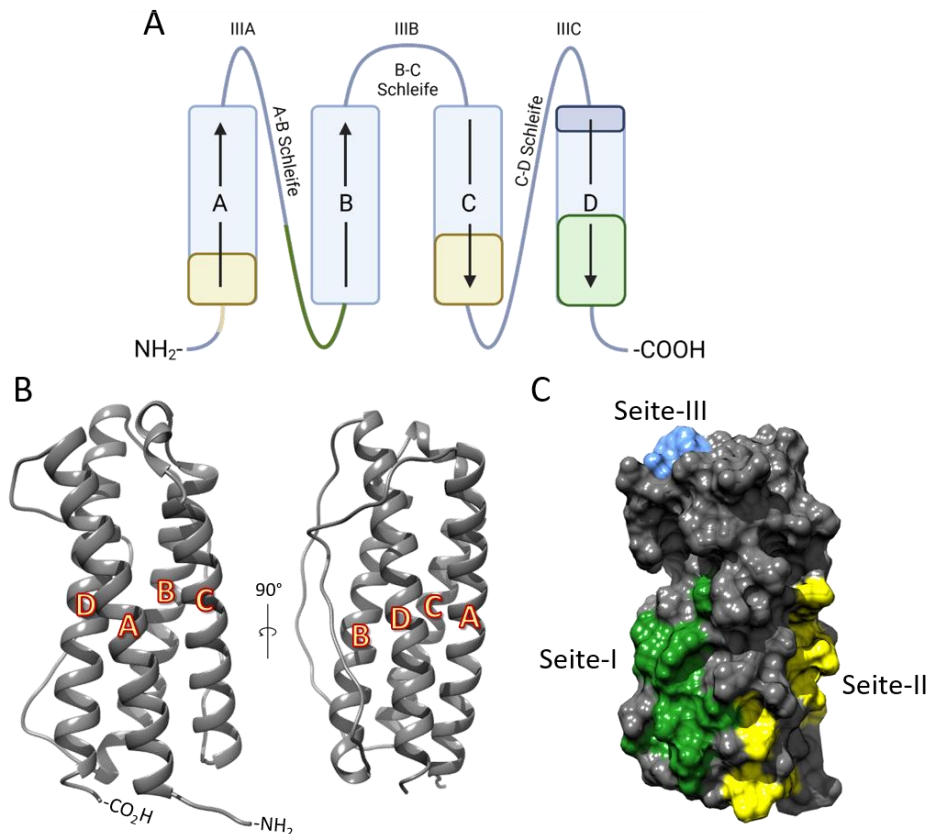


Abbildung 5: Schematischer Strukturaufbau der Zytokine der IL-6 Familie.

A) Schematische Zeichnung des 4- α -Helix-Bündels: N-terminale A- α -Helix, gefolgt von der A-B Schleife zum B- α -Helix, der B-C Schleife, der C- α -Helix, der C-D Schleife und der D- α -Helix am Carboxyl-Ende. Die Bindestelle I (grün), Bindestelle II (gelb) und Bindestelle III (blau) sind farblich hervorgehoben. Bild erstellt mit BioRender. **B)** Struktur des 4- α -Helix-Bündels exemplarisch für IL-11 (PDB: 6O4O). Gezeigt ist die N-terminale A- α -Helix bis zur C-terminalen D- α -Helix. **C)** Rezeptorbindeseiten des IL-11 (PDB: 6O4O), welche durch Mutagenese Studien an humanem und murinem IL-11 identifiziert wurden (Hishitani *et al.*, 2013; Metcalfe *et al.*, 2020; Putoczki *et al.*, 2014).

Zytokine der IL-6 Familie, die keinen α -Rezeptor benötigen haben zwei Bindestellen und die, die zuvor an einen α -Rezeptor binden, haben entsprechend drei Bindestellen. Hierbei geht die Bindestelle-I die Bindung zum α -Rezeptor ein, die Bindestelle-II zum gp130 und die Bindestelle-III entsprechend des Zytokins an gp130, LIFR, OSMR. IL-27 bildet die Ausnahme, da die Bindestelle-I die Bindestelle zwischen der p28-Untereinheit und der Ebi3-Untereinheit beschreibt, Bindestelle-II die Bindung des gesamten IL-27 Komplexes am WSX-1 und Bindestelle-III an gp130 (Caveney *et al.*, 2022; Jin *et al.*, 2022; Petes *et al.*, 2018). Die Bindeseiten-I bis -III sind exemplarisch für IL-11 in Abbildung 5C hervorgehoben, die durch Mutagenese-Studien am humanen sowie murinem IL-11 gefunden wurden (Barton *et al.*, 1999; Metcalfe *et al.*, 2020; Putoczki *et al.*, 2014; Tacke *et al.*, 1999).

Grundsätzlich gibt es Zytokine der IL-6 Familie, die einen deutlichen Knick in der A- α Helix haben und solche, die keinen besitzen. Im Gegensatz zu IL-6 und IL-11, die keinen Knick haben, weisen LIF und OSM einen ausgeprägten Knick in der A- α Helix. Bei OSM wird dieser Knick durch eine Unterbrechung der α -helikalen Struktur in der A-Helix zwischen Gln112 und Pro116 verursacht. Bei CNTF ist der Knick etwas C-terminaler (Abbildung 6). (Deller *et al.*, 2000).

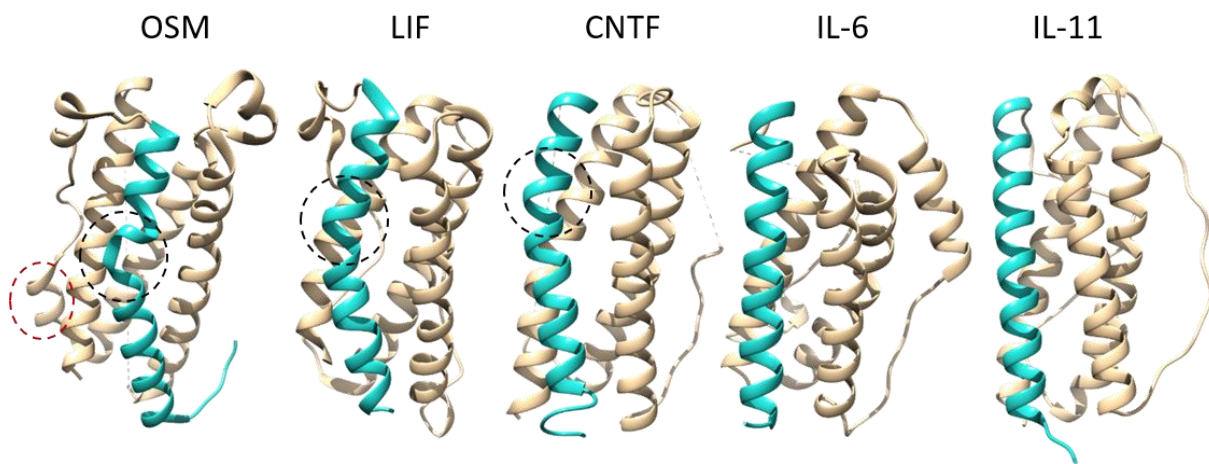


Abbildung 6: Strukturvergleich der α -Helices.

Exemplarischer Strukturvergleich der α -Helices (türkis) von OSM (PDB: 1EVS), LIF (PDB: 1EMR), CNTF (PDB: 1CNT), IL-6 (PDB: 1ALU) und IL-11 (PDB: 6O4O). Knick in der A- α Helices von OSM, LIF und CNTF (schwarz umkreist). Zusätzliche α -helikale Struktur in der B-C-Schleife des OSM (rot umkreist).

OSM besitzt noch eine weitere α -helikale Struktur in der B-C-Schleife und IL-6 in der C-D-Schleife (Abbildung 6). An der Bindestelle IIC befindet sich eine hochkonservierte aromatische Aminosäure bei allen Zytokinen der IL-6-Familie. Trotz einer niedrigen Sequenzhomologie der Zytokine aus der IL-6 Familie (6% zwischen IL-6 und CNTF) liegt eine hohe Strukturhomologie vor (Kallen *et al.*, 1999).

1.6 Cytokimera IC7

Zu den Designerzytokinen gehören Zytokinanaloga wie Synthekine (Moraga *et al.*, 2017), Neoleukine (Silva *et al.*, 2019), Fusokine (Ng & Galipeau, 2015), chimäre Zytokine (Cytokimera) (Kallen *et al.*, 1999) aber auch voll synthetische Zytokinsysteme wie synthetische Zytokin Rezeptoren (SyCyRs) (Engelowski *et al.*, 2018). Synthekine sind Fusionsproteine aus zwei verschiedenen Zytokinen, die jeweils einen Rezeptor binden und dadurch Heterodimere

erzwingen. Fusokine sind Fusionsproteine zwischen dem *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und einem Zytokin, welche eine Heterotetramerisierung der entsprechenden Rezeptoren induzieren. Neoleukine sind computergestützte synthetische *de-novo* Proteine, die neue Rezeptorkonstellationen aktivieren. SyCyRs sind synthetische Rezeptoren deren extrazelluläre Domänen durch Nanobodies ausgetauscht wurden. Bei einem Nanobody handelt es sich um die variable Domäne eines Antikörpers, welches ausschließlich aus schweren Ketten besteht (Hamers-Casterman *et al.*, 1993). Diese binden polymere Fusionsmoleküle wie beispielsweise ein dimeres grün fluoreszierendes Protein, woraufhin die synthetischen Rezeptoren in räumliche Nähe zueinander gebracht werden und eine Signaltransduktion erfolgt.

Cytokimeras sind Zytokine, die aus verschiedene Regionen mehrerer Zytokine zu einem Zytokin zusammengesetzt sind. Basierend auf der hohen Strukturhomologie und der Tatsache, dass die Bindestellen der Zytokine der IL-6 Familie räumlich nahe beieinander liegen, konnten Kallen *et al.* 1999 IL-6 als Grundgerüst verwenden und gegen die Bindestelle-III von CNTF austauschen. Dabei wurde eine neue, aktive künstliche IL-6 Variante generiert, die an der Bindestelle-III an den LIFR statt an die D1 des gp130 bindet. Diese Chimäre aus IL-6 und CNTF (IC7 genannt) benötigt gp130, IL-6R und den LIFR, um eine Signaltransduktion auszulösen und ist dadurch interessant, da sie einen nicht natürlichen Rezeptorkomplex rekrutiert (Abbildung 7) (Kallen *et al.*, 1999). Zwei Dekaden später wurde anhand von Mausmodellen gezeigt, dass dieses Molekül als Fc-Fusion zur Behandlung gegen Diabetes-Typ-II eingesetzt werden könnte (Findeisen *et al.*, 2019). Es vereint die gewünschten Eigenschaften beider Zytokine, zeigte aber ein günstigeres Nebenwirkungsprofil. In der Maus führt IC7 zu einer Erhöhung der Knochenstabilität durch eine verbesserte Knochendichte. Weiterhin führt es zu einer Verminderung des Blutzuckers durch die Ausschüttung von Insulin, zu einer Muskelhypertrophie trotz einer appetitzügelnden, fett- und gewichtsreduzierenden Wirkung sowie zu einem erhöhten Energiegrundumsatz ohne die inflammatorische Eigenschaft des IL-6. Darüber hinaus erhöht es die Fettsäureoxidation, was sich protektiv gegen die Ausbildung einer nicht-alkoholischen Fettleber auswirkt; (eng.: *non-alkoholic steatosis hepatitis* (NASH)). IC7 ist nicht nur spezifischer, als die einzelnen Zytokine für sich, da es für eine Stimulation mehrere verschiedene Rezeptoren auf der Zelloberfläche benötigt, es wurde auch gezeigt, dass eine einzelne Injektion für den nicht humanen Primaten *Macaca fascicularis*

(Cynomolgus-Affe) als sicher gilt. Hierbei das Blut der Affen auf Indikatoren untersucht, die auf eine Entzündung oder eine Immunreaktion hindeuten könnten. Darunter wurden typische Laborparameter wie C-reaktives Protein, Creatin Kinase (CK), Alanine Aminotransferase (ALT), Aspartat Aminotransferase (AST), IL-6-Spiegel oder der Lymphozytenspiegel analysiert. Die Arbeiten demonstrierten somit das therapeutische Potenzial dieser Cytokimera aber auch die Dringlichkeit weiterer Erforschung auf dem Gebiet der synthetischen Zytokine (Donath, 2019; Findeisen *et al.*, 2019; Perugini *et al.*, 2022).

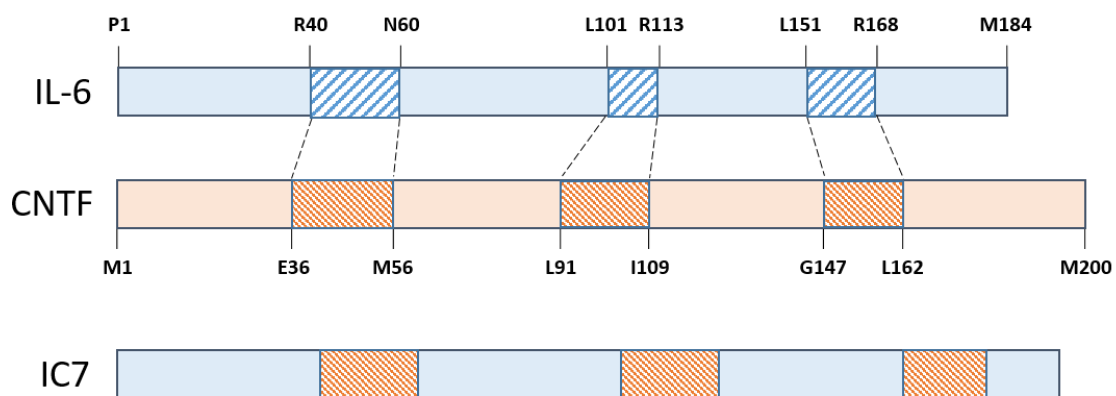


Abbildung 7: Chimäre IC7 aus IL-6 und CNTF.

Schematische Darstellung zeigt die ausgetauschten Regionen zwischen R40-N60, L101-R113 und L161-R168 von IL-6 mit den Regionen E36-M56, L91-L100 und G147-L162. Die ausgetauschten Regionen sind an der Bindestelle-III an der gp130 Bindung (IL-6) und an der LIFR Bindung (CNTF) involviert. Die neue Chimäre IC7 ist in der Lage, gp130 IL-6R und LIFR zu binden.

1.7 Myokardinfarkt

Kardiovaskuläre Krankheiten sind aktuell die häufigsten Todesursachen in der westlichen Welt (Ahmad & Anderson, 2021; Brugada-Terradellas *et al.*, 2021; Kumar *et al.*, 2021). Im Jahr 2010 gab es durch kardiovaskuläre Krankheiten mehr als 1,1 Millionen Hospitalisierungen in den Vereinigten Staaten mit geschätzten Kosten von über 450 Milliarden US\$ (Weintraub *et al.*, 2011). 2015 starben weltweit etwa 17,9 Millionen Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen. (Roth *et al.*, 2017). Im Jahr 2020 verstarben in den Vereinigten Staaten mehr als doppelt so viele Menschen durch Herzerkrankungen als durch COVID-19 (690.882 gegen 345.323) (Ahmad & Anderson, 2021). Folgende Faktoren erhöhen das Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung: Genetische Prädisposition, Übergewicht, Bluthochdruck, Rauchen, altersbedingte Schwäche, Arteriosklerose, chronische Nierenerkrankungen oder

Diabetes-Typ-II (Fuchs & Whelton, 2020; Henning, 2018; Kondo *et al.*, 2019; Latic & Erben, 2020; Romagnani *et al.*, 2017; van der Harst & Verweij, 2018).

Ein akuter Myokardinfarkt (AMI) entsteht häufig bei bestehender Arteriosklerose in den Koronargefäßen durch Verengung oder Verschluss des Lumens eines Koronargefäßes. Dies führt zu einer ischämischen Myokardnekrose, da die Kardiomyozyten nicht mit ausreichend Sauerstoff versorgt werden (Hypoxie) (Thygesen *et al.*, 2007). Dies setzt eine Kaskade an Ereignissen in Gang, die letztendlich zum Umbau des geschädigten Myokards zu einer fibrotischen Infarktnarbe führt. Die fibrotische Narbe hat keine kontraktile Funktion, führt zu Wandbewegungsstörungen und schränkt die Herzfunktion daher stark ein (Talman & Ruskoaho, 2016). Trotz Kompensationsmechanismen wie die Erhöhung der Herzfrequenz oder einer Hypertrophie des Herzens der nicht betroffenen Areale kann der Funktionsverlust nicht ausgeglichen werden, sodass eine rasche Diagnostik und Therapie anzustreben ist (Rumberger, 1994; Witzenburg & Holmes, 2019).

Um einem irreversiblen Schaden entgegenzuwirken, ist eine möglichst frühe Reperfusion des ischämischen Herzens wichtig. Dies kann medikamentös durch blutgefäßerweiternde Medikamente (Vasodilanzien) wie Nitroglycerin oder Antikoagulanzen wie Acetylsalicylsäure oder Heparin geschehen (Ferreira & Mochly-Rosen, 2012; Gershlick & More, 1998). Daneben gibt es den chirurgischen Eingriff, bei dem durch perkutane Koronarintervention die Koronargefäße mittels Ballondilatation gedehnt und durch eine Stent-Einlage dauerhaft offengehalten wird (Levine *et al.*, 2016). Der Myokardinfarkt kann unter anderem mittels Magnetresonanztomografie (MRT), Echokardiografie, laborchemischen Parametern, einer Koronarangiografie oder einer Elektrokardiografie (EKG), diagnostiziert werden (Califf & Ohman, 1992). Ein AMI kann sich durch Veränderungen in den EKG-Wellen bemerkbar machen. Dabei können Veränderungen der Q-Zacke im QRS-Komplex, der ST-Strecke oder der T-Welle beobachtet werden. Grundsätzlich wird ein AMI unterteilt in einem ST-Hebungsinfarkt eng.: *ST elevation myocardial infarction* (STEMI) und Nicht-ST-Hebungsinfarkt eng.: *Non-ST elevation myocardial infarction* (NSTEMI). Hierbei ist die ST-Hebung ein typischer Indikator eines Myokardinfarkts und frühes Kennzeichen einer Myokardischämie, während NSTEMI primär durch laborchemischen Parametern nachgewiesen wird (Harrington *et al.*, 2019). Der Goldstandard ist hierbei die Bestimmung der Troponine T und I. Sie werden aus toten Kardiomyozyten freigesetzt und haben die

höchste Spezifität. Weitere Biomarker sind Myoglobin, Creatin Kinase und Laktat-Dehydrogenase (LDH) (Thygesen *et al.*, 2007). Die Echokardiografie ist eine nichtinvasive Ultraschalluntersuchung. Die MRT ist ebenfalls ein bildgebendes Verfahren, das im Vergleich zur Echokardiografie eine höhere räumliche Auflösung erlaubt. Die Reperfusion des ischämischen Herzens induziert weiteren Schaden am Myokardgewebe, was zur weiteren Nekrose führt (Braunwald & Kloner, 1985). Hierfür gibt es verschiedene Gründe. Einer davon ist auf oxidativen Stress zurückzuführen. Beim Übergang von der Hypoxie zur Normoxie werden freie Sauerstoffradikale gebildet, die äußerst zellschädigend sind (Zweier, 1988). Das Absterben des Myokardgewebes löst eine Inflammation aus bei der das Herz in verschiedenen Phasen von verschiedenen Immunzellen infiltriert wird. Zuerst wird das Herz von Neutrophilen Granulozyten infiltriert, wobei die Anzahl nach 24 Stunden ihr Maximum erreicht. Die neutrophilen Granulozyten induzieren hierbei einen großen Schaden durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), Matrix-degradierender Enzyme oder von *neutrophil extracellular traps* (NET) (Heinen *et al.*, 2019). Zwischen Tag drei und fünf ist die Anzahl entzündlicher Ly-6C^{high} Monozyten am höchsten, die dann zu reperativen und anti-inflammatorische M2 Makrophagen differenzieren (Swirski, 2015; Yan *et al.*, 2012).

Zytokine der Interleukin-6 Familie spielen eine große Rolle bei kardiovaskuläre Krankheiten wie beim AMI. So wurde gezeigt, dass die Inhibierung des IL-6 Signalweges durch eine einzige Administration von Tocilizumab die überreagierte Inflammation bei NSTEMI Patienten mildert (Kleveland *et al.*, 2016). In der Maus wurde gezeigt, dass eine selektive Inhibierung des Trans-Signalweg durch Olamkicept noch effektiver ist als ein Panantagonismus (George *et al.*, 2021). Des Weiteren stimuliert IL-6 in der Maus die Polarisation zu M2 Makrophagen, was sich positiv auf die Entwicklung des AMI auswirkt (Chen *et al.*, 2018; Fu *et al.*, 2017; Heinen *et al.*, 2019; Sanmarco *et al.*, 2017).

2 Ziel der Arbeit

Ischämische Herzerkrankungen sind aktuell die häufigste Todesursache weltweit. Die Entwicklung neuer Therapeutika sowie ein besseres Verständnis der Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt (MI) sind daher dringend erforderlich. *Cytokine Chimera* (Cytokimera) bieten hier neue Möglichkeiten, da sie mehr Rezeptoren zur Signaltransduktion benötigen und dadurch selektiver und wahrscheinlich weniger pleiotrop sind als die natürlichen Zytokine.

Ziel dieser Arbeit ist es daher, auf Basis der Arbeiten von Kallen *et. al*, 1999, weitere synthetische Cytokimera *in-silico* zu generieren. Diese sollen dann exprimiert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend charakterisiert werden. Hierzu soll mittels Proliferations- als auch Stimulationsassay die biologische Aktivität sowie die Spezifität der Cytokimera untersucht werden. Weiterhin soll die Signaltransduktion im Hinblick auf eine mögliche JAK/STAT sowie MAPK/ERK Phosphorylierung in Abhängigkeit der Cytokimerakonzentration analysiert werden. Zusätzlich soll die Signaltransduktion, die durch die Cytokimera hervorgerufen wird, in Kombination mit den löslichen alpha-Rezeptoren evaluiert werden, um Aufschluss über den klassischen- sowie den Trans-Signaltransduktionsweg zu geben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von IC7 auf einen MI im Mausmodell zu analysiert. Hierbei sollen die Herzfunktionen mittels Echokardiogram untersucht werden. Des Weiteren, sollen histologische Färbungen der infarzierten Herzen Aufschluss über Infarktgröße und Narbenbildung geben.

Zusammenfassend sollen nicht nur neue synthetische Cytokimera entwickelt und charakterisiert werden, sondern der Einfluss von IC7 auf einen MI untersucht werden, um einem besseren Verständnis von Heilungsprozessen zu erlangen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antibiotika

In Tabelle 1 sind alle in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika aufgeführt.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antibiotika.

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicilin	100 mg/ml	Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	100 mg/ml	1 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Penicilin	10.000 U/ml	60 mg/L	Genaxxon, Ulm
Puromycin	1 mg/ml	1,5 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Streptomycin	10 mg/ml	100 mg/l	Genaxxon, Ulm

3.1.2 Antikörper

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

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
α-ERK1/2	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9102
α-Goat NL493	Esel	1:200	R&D Systems, USA	NL003
α-Goat IgG IRDye 800CW	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences GmbH	926-32214
α-hFc	Ziege	1:1.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot	31423
α-hLIFR	Ziege	1:20	R&D Sytems, USA	BAF249
α-hOSMR	Ziege	1:50	R&D Sytems, USA	BAF4389
α-Mouse IgG IRDye 680RD	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences GmbH	926-68072
α-Mouse IgG IRDye 800CW	Ziuege	1:10.000	LI-COR Biosciences GmbH	926-32210
α-myc	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	2278
α-Phospho-ERK1/2	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	4370
α-Phospho-STAT3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9145
α-Rabbit IgG IRDye 800CW	Ziege	1:10.000	LI-COR Biosciences GmbH	926-32213
α-STAT3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	4904
α-STAT3	Maus	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9139

3.1.3 Chemikalien

In der folgenden Tabelle 3 sind alle während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 3: Liste der Verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamind	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
BSA	Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
Express DNA Ladder 100-5000 bp	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
TriTrack DNA-Ladefarbstoff 6x	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, München
Turbofect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Severin, Schweiz
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
HD-Green	INTAS, Göttingen, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
NP-40	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phusion	

Isofluran	Piramal Critical Care GmbH, Halbergmoos, Deutschland
Weigerts-Hämatoxylin-Lösung A	Carl Roth, Karlsruhe
Weigerts-Hämatoxylin-Lösung B	Carl Roth, Karlsruhe

3.1.4 Geräte

Alle Geräte, die während dieser Arbeit benutzt wurden, sind in Tabelle 4 gelistet.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Geräte.

Geräte	Hersteller
Analysewaage Precisia 100M-300C	Precisia, Hartenstein
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
Automatischer Zellzähler TC10	Bio-Rad, München
BD FACSCanto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg
CO ₂ -Inkubator HERAccl® 150	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Digitalmikroskop BZ-9000	Keyence, Osaka
Fluorometer Infinite® M200 PRO	Tecan, Männedorf
Gefrierschrank Forma® 900	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
ÄKTA Start	GE Healthcare, Chicago
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instr. GmbH, Schwabach
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt
Mikropipetten Research®	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krupps), Offenbach
Minizentrifuge	Axon, Kaiserslautern
NanoDrop ND-1000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
PCR Thermozykler peqStar	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	Sartorius, Ratingen
Pipetus®-Akku	Hirschmann, Eberstadt
SDS-Geldokumentation Galaxy S10	Samsung, Seoul
Sterilbank	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Bovenden
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® TurboTM	Bio-Rad, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Vortexer	Neolab, Heidelberg
RT-PCR Cyclyer QuantStudio 3	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Dual LED Blue/White Light Transilluminator	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Kulturschüttler Multitron HT	INFORS GmbH, Einsbach

3.1.5 Kits

In Tabelle 5 sind alle Kits aufgeführt, die während dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
iTaq™ Universal SYBR green One-Step Kit	BioRad, Hercules, USA
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.6 Kulturmedien

In Tabelle 6 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Medien zur Kultivierung von Bakterien und eukaryotischen Zellen aufgelistet.

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Kultivierungsmedien.

Kulturmedium	Zusammensetzung
DMEM ^{-/-}	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Glukose (4,5 g/L) mit stabilem Glutamin
DMEM ^{+/+}	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Glukose (4,5 g/L) mit stabilem Glutamin FBS (10%), 1% (Penicillin/Streptomycin)
LB-Agar	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton, 1,5% Agar-Agar
LB-Medium	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton
Expi293 Medium	Thermo Scientific, Waltham, USA

3.1.7 Oligonukleotide

Zur Klonierung oder Sequenzierung von Plasmid-DNA (pDNA) und Genfragmenten wurden Oligonukleotide extern von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung und Klonierung der pDNA und Genfragmente.

Name	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
PR7	p409 fw seq primer	GAGCGAGTCCGCATCGACCG
PR8	p409 rev seq primer	CACTATAGGGTGCGCCTAGCT
PR16	PmeI OSMR-fw	CAGGTTTAAACACCATGGCTCTATTTGCAGTCTTT

PR17	PmeI OSMR-rev	CAGGTTTAAACCACTATAGGGTGC GCCTAGCT
PR34	StrepTag fw	TGGAGCCATCCG CAGTTTGAAAAA
PR35	PmeI LIFR-fw	CAGGTTTAAACACCATGATGGATATTTACGTATGTTTG
PR36	PmeI LIFR-rev	CAGGTTTAAACACCTTAATCGTTTGGTTTGTTTC
PR37	OSMR PmeI rev -UTR	CAGGTTTAAACTTAGCAGTAGTGTTTCACCTGG
PR92	pMOWS fw	TTTATCCAGCCCTCACTCCTT
DF85	5' pMOWS	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
DF85	3' pMOWS	AGCAATAGCATGATACAAAGG
DF16	pcDNA3.1 fwd	AAATTAATACGACTCACTATAGG
DF17	pcDNA3.1 rev	AGGCACAGTCGAGGCTG

3.1.8 Plasmide

Nachfolgend sind die während dieser Arbeit verwendeten Plasmide in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten und klonierten Plasmide.

Name	Referenz	Resistenz
pcDNA3.1	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	Ampicilin
pMOWS-puro-GFP	Ketteler <i>et al.</i> , 2002 (Ketteler <i>et al.</i> , 2002)	Puromycin
pMOWS-hygro-GFP	Suthaus <i>et al.</i> , 2010 (Suthaus <i>et al.</i> , 2010)	Hygromycin
pEGFP	AG Scheller	Kanamycin
pcDNA3.1-myc-IC7-TEV-Fc	Findeisen <i>et al.</i> , 2019 (Findeisen <i>et al.</i> , 2019)	Ampicilin
pcDNA3.1-myc-IL-6/LIF-III-TEV-Fc	In dieser Arbeit generiert	Ampicilin
pcDNA3.1-myc-IL-6/OSM-III-TEV-Fc	In dieser Arbeit generiert	Ampicilin
pcDNA3.1-myc-IL-11/LIF-III-TwinStrep	In dieser Arbeit generiert	Ampicilin
pMOWS-hygro-hLIFR	In dieser Arbeit generiert	Hygromycin
pMOWS-hygro-hOSMR	In dieser Arbeit generiert	Hygromycin

3.1.9 Puffer und Lösungen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer sind aus Tabelle 9 zu entnehmen.

Tabelle 9: Im Zuge dieser Verwendete Puffer und Lösungen.

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
10x Standard Restriktionspuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
10x T4 DNA Ligasepuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% (w/v) APS
Blockierlösung Intercept TBS	LI-COR Biosciences GmbH
Ethanol (70%, 96% 99,9%) (v/v)	Sigma-Aldrich, München
FACS-Puffer	1% BSA in PBS

Gibco® fötales bovines Serum (FCS)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
JAK-Lysis Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,5% (v/v) NP40 1 mM NaCO ₃ 10 mM MgCl ₂ 1 Complete Protease Inhibitor Tablette auf 50 ml
Phosphat buffered saline (PBS)	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl pH 7,4
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
SDS-PAGE Laufpuffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (6x)	375 mM Tris-HCl pH 6,8 9% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 9% β-Mercaptoethanol 0,03% (w/v) Bromphenol Blau
Lösung 1 (S1) für DNA-Minipräparation	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 1:1.000 RNase
Lösung 2 (S2) für DNA-Minipräparation	200 mM NaOH 1% SDS
Lösung 3 (S3) für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat 11,5% (v/v) Essigsäure
TAE-Puffer	400 mM Tris-HCl pH 8,8 10 mM EDTA 200 mM Essigsäure
TBS-T	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1% (v/v) Tween20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
Tris buffered saline (TBS)	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
Trypsin/EDTA-Lösung	1:10 Trypsin/EDTA (10x) in PBS
Citratpuffer pH 3,2	7,1 mM Natriumcitrat Dihydrat 42,9 mM Zitronensäure
Citratpuffer pH 5,5	35,2 mM Natriumcitrat Dihydrat

	14,8 mM Zitronensäure
Puffer W	100 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer BXT	100 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Biotin
Puffer XT-R	3 M MgCl ₂
Coomassie-Färbelösung	35% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Eisessig 0,3% Coomassie G250
Coomassie-Entfärbelösung	35% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Eisessig
Gomoris-Lösung	0,6% Chromotrop 2R 0,3% Anilinblau (Methylenblau) 0,8% Phosphorwolframsäure 1% (v/v) Essigsäure
Weigerts-Eisen-Hämatoxylin-Lösung	50% Weigerts-Hämatoxylin-Lösung A 50% Weigerts-Hämatoxylin-Lösung B

3.1.10 Verbrauchsmaterialien

Eine Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Liste der benutzten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Falcon Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Greiner bio-one, Solingen
Kyoröhrchen	VWR, Randor, USA
Microtubes (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Nitrilhandschuhe	Ansell, München
PCR Kappen Gr. 125	StarLab, Ahrensburg
PCR Tubes 0,2 mL	StarLab, Ahrensburg
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg
Nitrocellulosemembran	Cytiva, USA
Whatman-Papier	VWR, Randor
Zellkulturschale 10 cm ²	Greiner bio-one, Solingen
Zellkulturschale 6-Well	TPP, Trasadingen, Schweiz
T75 Flaschen	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
T150 Flaschen	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
Strep-TactinXT 4Flow	IBA Lifesciences GmbH, Deutschland
HiTrap MabSelect Prisma	Cytiva, USA
Einmal-Zählkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Spritzenfilter PVDF, Porengröße 450 nm	Carl Roth, Karlsruhe
Kanüle 20 G	B. Braun, Melsungen, Deutschland

3.1.11 Zelllinien und Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von pDNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (E. coli) XL1-Blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [: TN10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)) verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Weiterhin wurden folgende eukaryotische Zelllinien verwendet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Liste der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Zellart	Hersteller
Ba/F3/gp130	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen	Immunex, Seattle, USA (Palacios <i>et al.</i> , 1984)
Phönix-Eco	Humane embryonale Nierenzelle	Adhärente Zellen	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland (Pear <i>et al.</i> , 1993)
Expi293F	Humane embryonale Nierenzelle	Suspensionszellen	Thermo Scientific, Waltham, USA (Jain <i>et al.</i> , 2017)

3.1.12 Zytokine

Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Zytokine sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Verwendete, natürliche, humane Zytokine.

Humane Zytokine	Stammkonzentration (µg/ml)	Herkunft
Hyper-IL-11-Ts	100	AG Scheller
IL-11	100	AG Scheller
LIF	10	R&D Systems; 7734-LF
OSM	10	R&D Systems; 295-OM

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Zur Ermittlung der DNA-Fragmentlänge wurden Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese in einem Molekularsieb aus 1% (w/v) Agarosegel durch ein elektrisches Feld voneinander getrennt. Dabei zieht die Anode die negativ geladene DNA an. Infolgedessen wandern kleinere DNA-Fragmente schneller zur Anode als große DNA-Fragmente. Durch HD Green wird die nach Fragmentlängen getrennte DNA sichtbar gemacht. Das HD Green interkaliert hierbei in die

DNA, wodurch es nach Anregung mit UV-Licht fluoresziert und diese somit sichtbar macht. Hierfür wurde die Agaroselösung mit 0,0002% HD Green versetzt. Das größenspezifische DNA-Bandenmuster wurde mit Hilfe eines Geldokumentationssystems der Firma INTAS (Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

3.2.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die zuvor mittels DNA-Gelelektrophorese voneinander getrennt wurden, wurden bei 470 nm auf einem Transilluminator angeregt und durch eine Filterscheibe visualisiert. Das entsprechende Fragment wurde mit einem Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt bevor die Nukleinsäure gemäß Herstellerangaben mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit extrahiert wurde.

3.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure und Proteinen

Die Konzentration von Nukleinsäuren und gereinigten Proteinen wurde mittels NanoDrop 2000 spektroskopisch bestimmt. Die Konzentration von DNA- oder RNA-Proben wurde bei 260 nm gemessen und die Reinheit über das Absorptionsverhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ bestimmt. Der Quotient sollte hier stets über 1,8 liegen. Die Proteinkonzentration erfolgte über einer Absorptionsmessung bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Die Konzentration wurde nach dem Lambert-beerschem Gesetz berechnet (Formel 1).

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

Formel 1: Lambert-beersches Gesetz.

3.2.1.4 Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltung wurde zum Herausschneiden eines Inserts aus der Plasmid-DNA (pDNA) zwecks anschließender Klonierung durchgeführt. Darüber hinaus wurde die DNA auch mittels Restriktionsenzyme (Thermo Fisher Scientific, Waltham) hydrolysiert, um die korrekte Ligation der neu generierten Plasmide zu verifizieren. Hierbei wird die DNA-Sequenz von den Restriktionsenzymen spezifisch erkannt und an der Phosphodiesterbindung hydrolysiert.

Dabei können, je nach verwendetem Restriktionsenzym, DNA-Doppelstränge mit Überhang (*sticky ends*) oder ohne Überhang (*blunt ends*) entstehen. Die Restriktion von je 10 µg Plasmid-DNA erfolgte mit 10 U des gewünschten Restriktionsenzym und mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl für 2 h oder über Nacht bei 37°C. Zwecks Kontrolle der korrekten Klonierung wurden hierbei 4 µg pDNA verwendet, während für die Klonierung mindestens 30 µg verwendet wurden. Anschließend wurden je 50 µl Reaktionsansatz 10 µl TriTrack DNA-Ladefarbstoff zugegeben und eine analytische oder präparative Gelelektrophorese durchgeführt.

3.2.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Um eine Religation des linearisierten Vektors ohne Insert nach einer Restriktionsspaltung zu verhindern, wurde das 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde der hydrolysierte Restriktionsansatz mittels NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit gereinigt, um die Restriktionsenzyme und den entsprechenden Puffer zu entfernen. Anschließend wurde die gereinigte DNA mit 1 U FastAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham) für 1 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend nochmals gereinigt. Die Dephosphorylierung wurde nur bei *blunt end* hydrolysierten Vektoren durchgeführt.

3.2.1.6 Phosphorylierung von DNA

Falls das Insert nicht aus einem Restriktionsansatz stamm sondern mittels PCR amplifiziert wurde, wurde dieses für die anschließende Ligation phosphoryliert. Amplifikate aus einer PCR besitzen keine für eine Ligation benötigte 5'-Phosphatgruppe. Hierzu wurde eine T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet, welche den Transfer einer Phosphatgruppe eines Adenosintriphosphats auf eine 5'-Hydroxygruppe der Nukleinsäure katalysiert. Die Reaktion wurde nach folgender Zusammensetzung angesetzt:

PCR-Produkt (gesamtes Volumen)
5 µl Ligase-Puffer
1 µl PNK
Ad 50 µl ddH₂O

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, die PNK 5 min bei 75°C inaktiviert und anschließend ligiert.

3.2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Insert und Vektor wurden durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxyende eines Fragments und dem 5'-Phosphatende eines anderen Fragments miteinander ligiert. Das eingesetzte Insert und die Vektor-DNA wurden dafür zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Für die Ligation wurden 100 ng Vektor und Insert in einem molaren Überschuss im Verhältnis 1:5 oder 1:7 eingesetzt. Zum Ligationsansatz wurden neben Insert und Vektor noch 2 µl T4-Ligase-Puffer, 2 µl PEG4000 und 2 µl T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham) in einem Gesamtvolumen von 20 µl zugegeben und für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

3.2.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetenten *E. coli* Bakterien

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli* XL-1 Blue Bakterien verwendet, welche in 30 µl Aliquots bei -80°C gelagert wurden. Für die Transformation wurden die Zellen 5 min auf Eis aufgetaut und 0,5 µl pDNA oder 10 µl Ligationsansatz hinzugegeben. Der Transformationsansatz wurde für 5 weitere min auf Eis inkubiert bevor der Hitzeschock bei 42°C für 50 sec folgte. Die Bakteriensuspension wurde für 5 min auf Eis inkubiert bevor 500 µl antibiotikafreies LB-Medium zugegeben wurde. Anschließend wurden die Zellen 30-60 min bei 37°C und 1.000 rpm regeneriert. Die gesamte Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.1.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zwecks Analyse der pDNA mit der die *E. coli* transformiert wurden, wurde die pDNA isoliert. Hierzu wurde jeweils eine *E. coli* Kolonie in 1,8 ml LB_{amp}- oder LB_{kan}-Medium über Nacht bei 37°C und 1.000 rpm inkubiert. Die pDNA wurde dann mittels Mini-Präparation nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert. Hierfür wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (15.000 g, 1 min, RT) und das Zellpellet in 100 µl kaltem S1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl S2-Puffer zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 200 µl kaltem

S3-Puffer, welches die Lyse durch das im S3-Puffer enthaltene Kaliumacetat neutralisierte. Nach anschließender Zentrifugation (17.000 g, 10 min, 4°C), wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 500 µl kaltes Isopropanol zugegeben und wieder zentrifugiert (17.000 g, 15 min, 4°C). Die präzipitierte pDNA wurde mit 500 µl Ethanol 70% (v/v) gewaschen und wieder zentrifugiert (17.000 g, 5 min, 4°C) und das DNA-Präzipitat nach leichtem antrocknen in 50 µl ddH₂O wieder gelöst.

3.2.1.10 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Eine Midi-Präparation wurde durchgeführt, um größere Mengen pDNA zu isolieren. Hierfür wurden 100 ml LB_{amp}- oder LB_{kan}-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (4.000 g, 30 min, 4°C) und die pDNA aus dem Zellpellet mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die isolierte pDNA wurde in 200 µl ddH₂O gelöst und die Konzentration wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben gemessen.

3.2.1.11 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation erfolgte mit dem NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren). Hierzu wurden Ba/F3-Zellen verwendet, die zuvor stimuliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Isolation erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Elution fand in 40 µl ddH₂O statt und die RNA-Konzentration wurde wie in Abschnitt 3.2.1.3 beschrieben gemessen. Die RNA wurde dann bis zur Verwendung für eine quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) oder einer Transkriptomanalyse bei -80°C gelagert.

3.2.1.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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

PCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten:

Zur Amplifikation bestimmter DNA-Fragmente, zwecks anschließender Klonierung wurde die Phusion High-Fidelity Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet, da diese eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität (*proof reading*) besitzt und falsch eingebaute Nukleotide aus der amplifizierten DNA entfernt.

In Tabelle 13 ist ein Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aufgelistet:

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

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Template DNA	1 µl	<250 ng
5x Phusion HF- oder GC-Puffer	10 µl	1x
dNTPs	1 µl	200 µM
Forward Primer	2,5 µl	0,5 µM
Reverse Primer	2,5 µl	0,5 µM
DMSO (optional)	1 µl	2%
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	1 U/50 µl Ansatz
ddH ₂ O	Ad 50 µl	-

Die Reaktion wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt und kann aus Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 14: PCR-Programm zur Amplifikation bestimmter DNA-Regionen mit der Phusion DNA-Polymerase.

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

Die erfolgreiche Amplifikation wurde mittels Agarosegel (3.2.1.1) analysiert. Bei erfolgreicher Amplifikation wurden die PCR-Produkte mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up gereinigt, phosphoryliert (3.2.1.6) und in die entsprechenden Vektoren ligiert (3.2.1.7).

Colony PCR (cPCR):

Zur Verifikation der korrekten Klonierung wurde eine cPCR durchgeführt. Hierbei wurde die PCR ohne vorherige Isolation der pDNA durchgeführt. Dabei fungierte die pDNA in der Bakteriensuspension als *template*. Die zu analysierende Bakterienkolonie wurde dazu in 20 µl ddH₂O suspendiert und anschließend für die PCR verwendet. Für die Analyse wurde die

DreamTaq Green PCR Master Mix 2x verwendet, da hierzu kein *proof reading* notwendig war. Weiterhin wurden *forward und reverse* Primer verwendet, bei dem ein Primer spezifisch am Vektor und der andere am Insert hybridisierten. Der Reaktionsansatz und das PCR-Programm für die cPCR sind aus Tabelle 15 beziehungsweise Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 15: Reaktionsansatz für eine cPCR.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DreamTaq Green PCR Master Mix 2x	10 µl	-
Forward Primer	1 µl	0,2 µM
Reverse Primer	1 µl	0,2 µM
pDNA in <i>E. coli</i> -Suspension	5 µl	-
ddH ₂ O	Ad 20 µl	-

Tabelle 16: PCR-Programm für eine cPCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	~55°C	30 sec	30 Zyklen
Elongation	72°C	1 min/kBp	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Kühlung	4°C	∞	

Zur Analyse der korrekten Klonierung, wurde das PCR-Produkt direkt mittels Agarosegel analysiert (3.2.1.1).

3.2.1.13 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der Sequenzen, wurde die pDNA extern durch die Firma Microsynth SeqLab (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Hierzu wurden die Proben einschließlich der gewünschten Oligonukleotide eingeschickt.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 Lyse der Ba/F3-Zellen

Zur Lyse der Ba/F3-Zellen wurden diese zentrifugiert (450 g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und entweder direkt lysiert oder bis zur Lyse bei -20°C gelagert. Je nach Größe der Zellpellets wurden diese in einem

Volumen von 60-200 µl JAK-Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 4°C unter Rotation lysiert bevor sie nochmals zentrifugiert wurden (17.000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand, wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels BCA-Assay bestimmt.

3.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde nach Herstellerangaben mittels BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Zunächst wird im alkalischen Milieu in Anwesenheit von Proteinen Cu^{2+} zu Cu^{+} reduziert. Infolgedessen, reagiert die Bicinchoninsäure mit Cu^{+} und bildet einen violett gefärbten Komplex. Dieser BCA/Cu-Komplex bildet sich innerhalb des linearen Bereichs proportional zur Proteinkonzentration. Die Absorption wurde im Fluorometer bei 562 nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate, wurde eine Standardgerade mit BSA in definierten Konzentrationen erstellt und ebenfalls gemessen. Für diesen Assay wurden die Lysate 1:10 in H_2O verdünnt und je 25 µL im Duplikat gemessen.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zwecks Analyse fand die Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht durch eine *sodium dodecyl sulphate* (SDS)-PAGE statt. Die Denaturierung und Reduktion der Disulfidbrücken erfolgte im Proteinauftragspuffer bei 95°C für 10 min. Die Proteine sind durch das SDS negativ geladen und bewegen sich im polymerisiertem Polyacrylamid-Gel in Richtung Anode. Dabei bewegen sich kleinere Proteine im Molekularsieb schneller voran als große. Die Elektrophorese erfolgte durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 100 Volt bis die Proteine das Trenngel erreichten. Dann wurde die Spannung auf 130 Volt erhöht. Hierbei wurden je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins 10 oder 15%ige SDS-Polyacrylamidgele in einer Stärke von 1,5 mm verwendet. Beladen wurden die Gele entweder mit 50 µg Gesamtprotein bei Zelllysaten oder mit einem konstanten Volumen von 33 µl bei Zellkulturüberständen.

3.2.2.4 Western Blot

Für eine spezifische Detektion der Proteine wurden die zuvor in der SDS-PAGE voneinander getrennten Proteine auf eine Nitrocellulose(NC)-Membran transferiert. Dazu wurde das Trans-Blot-Turbo *semi-dry* Transfer-System von BioRad (München- Deutschland) verwendet. Dies erfolgte durch das Anlegen einer Spannung, in der die negativ geladenen Proteine auf die Membran übertragen wurden. Die NC-Membran wurde zusammen mit Whatmann-Papier und dem SDS-Polyacrylamidgel für 1 min in Transferpuffer äquilibriert. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde auf die NC-Membran gelegt und von beiden Seiten mit jeweils zwei weiteren Whatmann-Papieren bedeckt. Anschließend folgte der Proteintransfer auf die NC-Membran für 30 min bei einer konstanten Spannung von 25 V und konstanten Stromstärke von 1 A. Die Membran wurde mindestens 1 h in einer mit TBS (1:3) verdünnten Intercept Blockierlösung (LI-COR Biosciences GmbH) bei RT inkubiert. Die NC-Membran wurde mit dem primären Antikörper entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde 3 x für 3 min mit TBS-T gewaschen bevor die NC-Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei RT inkubiert wurde. Sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper wurden in der 1:3 verdünnten Blockierlösung angesetzt und zusätzlich Tween20 (0,1%) zugefügt. Zum Schluss wurde der sekundäre Antikörper durch 2 x für 3 min mit TBS-T und 1 x 3 min mit TBS gewaschen bevor die Proteine detektiert wurden. Die Detektion erfolgte am Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager (LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln, USA).

3.2.2.5 Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur Beurteilung der Reinheit der gereinigten Cytokimera, wurden diese mittels SDS-PAGE elektrophoretisch nach der Größe getrennt und anschließend mittels einer Coomassie-Färbelösung visualisiert. Das hierbei verwendete Coomassie G250 bindet an basische Aminosäuren der Proteine und macht diese sichtbar. Dazu wurde das Polyacrylamidgel in die Coomassie-Färbelösung gelegt, 30 sec in der Mikrowelle bei 600 W erwärmt und dann für 15 min bei RT schüttelnd inkubiert. Um nicht am Protein gebundenes Coomassie wieder zu entfernen, wurde die Färbelösung entfernt, Coomassie-Entfärbelösung zugegeben, in der Mikrowelle für 30 sec erwärmt und für etwa 30-60 min schüttelnd bei RT inkubiert. Dieser

Vorgang wurde so lange wiederholt, bis der gewünschte Kontrast erkenntlich war. Die SDS-Geldokumentationssystem fand mit einer Kamera (Galaxy S10, Samsung, Seoul) statt.

3.2.2.6 Protein-A Affinitätschromatografie

Fc-getaggte, rekombinante Proteine in Expi293-Zellkulturüberstände, wurden mittels Protein-A Affinitätschromatografie gereinigt. Protein-A, das ursprünglich aus der Zellwand des *Staphylococcus aureus* stammt bindet hierbei spezifisch und pH-responsiv an IgG-Fc. Hierfür wurde die HiTrap MabSelect Prisma (Cytiva, USA) verwendet. Nach Äquilibration der Säule und des Systems (Äkta Start, GE Healthcare, Chicago, USA) mit PBS wurden 30-150 ml Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen, um die gewünschten Proteine mit einem Fc-tag an die Säulenmatrix zu binden. Anschließend wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen PBS gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die zweistufige Elution erfolgte dann durch die Senkung des pH-Wertes auf zunächst 5,5 und dann auf 3,2 durch die entsprechenden Citratpuffer. Infolgedessen, dissoziierte die Fc:Protein-A-Interaktion und das Fc-getaggte Protein wurde als Eluat im Fraktionssammler gesammelt. Die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen wurde wie in Abschnitt 3.2.1.3 bestimmt und alle Elutionsfraktionen vereint, die Protein enthielten. Im Anschluss fand eine Konzentration des Proteingehaltes mittels einer Amicon Ultra Membran (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von ca. 1,5 ml statt. Nachfolgend wurde das Protein mittels einer NAP-25 Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) umgepuffert. Schließlich wurde nochmals die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2.2) und weitere Analyse mittels SDS-PAGE (3.2.2.3), Coomassie-Färbung (3.2.2.5) und Western Blot (3.2.2.4) durchgeführt. Die Säule wurde mit 30 Säulenvolumen 0,5 M NaOH regeneriert und die gereinigten Proteine wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.2.7 StrepTactinXT® Affinitätschromatografie

Die StrepTactin Affinitätschromatografie basierte ursprünglich auf der Interaktion zwischen Streptavidin und Biotin, welche zu den Interaktionen mit den höchsten, natürlichen Affinitäten gehört. In der nächsten Generation dieser Chromatografie wurde das Biotin durch eine kurze Peptidsequenz WSH PQFEK (Strep-tag®) und das Streptavidin durch eine StrepTactin® Säulenmatrix ersetzt. In der neusten Generation wurde die Affinität des tags durch die

in Serie geschaltete Peptidsequenzen SA-WSHPQFEK-(GGGS)₂-GGSA-WSHPQFEK (TwinStrep-tag®) weiter erhöht und die reversible Elution des Proteins von der StrepTactin®XT-Säulenmatrix mit Biotin ermöglicht.

TwinStrep-getaggte, rekombinante Proteine in Expi293-Zellkulturüberstände, wurden daher über die StrepTactinXT Affinitätschromatografie gereinigt. Nach Äquilibration der Säule und des Systems (Äkta Start, GE Healthcare, Chicago, USA) mit Puffer W wurden 30-150 ml Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen, um die gewünschten Proteine mit einem TwinStrep-tag an die Säulenmatrix zu binden. Anschließend wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen Puffer W gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die Elution fand mit einem 50 mM Biotin-haltigem Puffer BXT statt. Infolgedessen, dissoziierte die TwinStrep:StrepTactinXT-Interaktion und wurde als Eluat im Fraktionssammler gesammelt. Die Proteinkonzentrationen der Elutionsfraktionen wurde wie in Abschnitt 3.2.1.3 bestimmt und alle Elutionsfraktionen vereint, die Protein enthielten. Im Anschluss fand eine Konzentration des Proteingehaltes mittels einer Amicon Ultra Membran (Merck, Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von ca. 1,5 ml statt. Nachfolgend wurde das Protein mittels einer NAP-25 Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) umgepuffert. Schließlich wurde nochmals die Proteinkonzentration bestimmt (3.2.2.2) und weitere Analyse mittels SDS-PAGE (3.2.2.3), Coomassie-Färbung (3.2.2.5) und Western Blot (3.2.2.4) durchgeführt. Die Säule wurde mit 30 Säulenvolumen 0,5 M NaOH regeneriert und die gereinigten Proteine wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Zellbiologische Methoden

3.2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Ba/F3 Suspensionszellen wurden in 10 cm Petrischalen in 10 ml DMEM^{+/+} mit HIL-6 (10 ng/ml) kultiviert. Alle sieben Tage wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10.000 passagiert. Adhärenente HEK293 oder Phoenix-Eco Zellen wurden alle 3-4 Tage in 10 cm Zellkulturschalen in 10 ml DMEM^{+/+} passagiert. Zum Passagieren wurde der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert, wovon 60 µl für die Passage in die nächste Zellkulturschale überführt wurde. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Die Expi293-Zellen wurde in Kolben mit 30 ml Expi293-

Medium kultiviert und alle 3-4 Tage passagiert. Hierzu wurde die Zelldichte mittels eines automatischen Zellzählers bestimmt und in einer Konzentration von 300.000 Zellen/ml ausgesät. Die Expi293-Zellen wurden bei 37°C und 8% CO₂ in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre auf einem Orbitalschüttler (120 rpm) kultiviert.

3.2.3.2 Transfektion von HEK293-Zellen

Um die Expression der neu generierten Cytokimera quantitativ abschätzen zu können, wurden zunächst HEK293 Zellen an Tag -1 mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. An Tag 0 wurden 7,5 µg pDNA mit 15 µl Turbofect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in 1 mL DMEM^{-/-} gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Hierbei bildete sich ein Komplex aus der DNA und dem Transfektionsreagent, welcher die Zellmembran passiert. Der Komplex wurde tropfenweise auf die HEK293-Zellen gegeben und für 48 h bei 37°C inkubiert bevor die Zellen dann zur weiteren Analyse lysiert (3.2.2.1) wurden. Bei der Transfektion der HEK293-Zellen wurde als Kontrolle der erfolgten Transfektion eine Kulturschale mit pEGFP transfiziert. Da dieses Plasmid für EGFP codiert, emittierte das in den Zellen exprimierte GFP nach 48 h unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von $\lambda_{480 \text{ nm}}$.

3.2.3.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3 gp130-Zellen

Da für die Analyse der Cytokimera unter anderem Ba/F3-Zellen benötigt wurden, die den OSMR oder den LIFR exprimierten, wurden die cDNAs zur Expression der Rezeptoren durch eine retrovirale Transduktion stabil in das Genom der Ba/F3-Zellen integriert.

Für eine retrovirale Transduktion wurden an Tag -2 zunächst Phoenix-Eco Zellen mit einer Zellkonzentration von 5×10^5 Zellen in einer 6-Well Zellkulturschale ausgesät. Zur Transfektion der Phoenix-Eco-Zellen wurden an Tag -1 jeweils 2 µg pDNA und 4 µl Turbofect in 200 µl DMEM^{-/-} für 15 min inkubiert und tropfenweise den Zellen zugegeben. Nach 6 h wurde das Medium durch DMEM^{+/+} 30% FCS ausgetauscht und über Nacht im Inkubator kultiviert. An Tag 0 wurde der Zellkulturüberstand der Phoenix-Eco-Zellen entnommen, der die Viren enthielten entnommen und zentrifugiert (350 g, 5 min, RT), um die restliche Phoenix-Eco-Zellen zu entfernen. Zur Transduktion der Ba/F3-Zielzellen wurden diese zunächst zentrifugiert (450 g, 5 min, RT), der Überstand abgenommen und mit 10 ml PBS gewaschen. Anschließend

wurden 250 µl des Phönix-Eco Zellkulturüberstandes zusammen mit 1×10^5 Ba/F3-Zielzellen in 50 µl und 30 µg Polybren (Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland) gemischt und zentrifugiert (2 h, 300 g, RT). Das Zellpellet wurde in 5 ml DMEM ^{+/+} resuspendiert und HIL-6 (10 ng/ml) zugegeben. Die transduzierten Zellen wurden durch die Zugabe von Antibiotika über 2-3 Wochen selektiert. Hierbei wurde entweder Hygromycin B in einer Konzentration von 1 mg/ml (24 h nach der Transduktion) oder Puromycin in einer Konzentration von 1,5 µg/ml (48 h nach der Transduktion) zugegeben. Die erfolgreiche Transduktion wurde nach der Selektion mittels Durchflusszytometrie (3.2.3.4) und Western Blot überprüft.

3.2.3.4 Durchflusszytometrie

Zur Kontrolle der Oberflächenexpression der Rezeptoren nach einer retroviralen Transduktion wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Interaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Die Bindung der Antikörper und die daraus resultierende Fluoreszenz ist hierbei proportional zur Oberflächenexpression der Rezeptoren.

Zur Analyse wurden 5×10^5 Ba/F3-Zellen zentrifugiert (350 g, 5 min, RT), das Zellpellet in 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 50 µl FACS-Puffer mit entsprechenden Primärantikörper resuspendiert. Die Zellen wurden 1 h bei RT inkubiert, wieder mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen bevor das Zellpellet in 50 µl FACS-Puffer mit entsprechenden Sekundärantikörper resuspendiert wurde. Die Inkubation erfolgte 50 min bei RT im Dunkeln. Es folgte ein letzter Waschschrift, bevor die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und am FACS Canto II analysiert wurden. Die Auswertung fand mit Hilfe der FlowJo_V10 Software statt.

3.2.3.5 Proliferationsassay von Ba/F3-Zellen

Zur Charakterisierung der Cytokimera aber auch zur Kontrolle der Rezeptoren wurde ein Zellviabilitätsassay von Ba/F3-Zellen mit rekombinanten Proteinen durchgeführt und die Proliferation analysiert. Die Methode beruht auf die irreversible Umsetzung des im CellTiter-Blue enthaltenen Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin. Da die Umsetzung nur durch Dehydrogenaseenzyme in metabolisch aktiven Zellen stattfinden kann, ist die Fluoreszenzintensität proportional zur Zellproliferation.

Hierzu wurden die Ba/F3-Zellen 3 x mit PBS gewaschen und anschließend eine Zelldichte von 5×10^4 Zellen/ml DMEM^{+/+} verdünnt. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Zytokinen in der gewünschten Konzentration versetzt und als Triplikat in einem Volumen von 100 μ l in jeweils einer Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte für 72 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Schließlich wurden 20 μ l CellTiter-Blue Lösung je Kavität zugegeben und unmittelbar danach die Fluoreszenz des Resorufin bei 560 nm am Fluorometer Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf) gemessen (Zeitpunkt 0). Die nächste Messung fand nach 40 min statt und dann wurde alle 20 min für maximal 120 min gemessen. Die Messung mit den höchsten Werten wurde von den Werten Zeitpunkt 0 subtrahiert.

Konzentrationsabhängige Proliferation

Um die effektive oder inhibitorische, halbmaximale Konzentration zu ermitteln (EC50 beziehungsweise IC50), wurde eine konzentrationsabhängige Proliferation durchgeführt. Hierzu wurde die Proliferation der Ba/F3-Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren in Abhängigkeit von der Zytokinkonzentration. Hierzu wurde eine möglichst hohe Zytokinkonzentration gewählt und eine serielle 1:2 Verdünnung durchgeführt. Wie bereits beschrieben, fand dann die Inkubation und Messung statt. Die Proliferationskurve wurde dann durch eine nichtlineare Regression mittels der Software GraphPad Prism 8 ermittelt und daraus der EC50- beziehungsweise IC50-Wert abgeleitet.

3.2.3.6 Stimationsassay von Ba/F3-Zellen

Die Signaltransduktion der Ba/F3-Zellen und die damit verbundene Phosphorylierung von STAT3 oder Erk1/2 wurde mittels Stimationsassay ermittelt. Hierzu wurden die Ba/F3-Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren 3 x mit PBS gewaschen und in DMEM^{-/-} resuspendiert. In diesem serumfreien Medium wurden die Zellen 3-4 h inkubiert, um die Signaltransduktion, die durch das Serum hervorgerufen werden könnte, zu minimieren. Anschließend wurden die Zellen in Reaktionsgefäße verteilt, zentrifugiert (450 g, 5 min, RT) und das Zellpellet in 1 ml DMEM^{-/-} mit den entsprechenden Zytokinen resuspendiert. Die Stimulation verlief 15 min bei 37°C. Schließlich wurden die Zellen nochmals zentrifugiert (450 g, 5 min, RT) und die biochemische Reaktion durch schockgefrieren der Zellpellets in flüssigem Stickstoff abgebrochen. Die anschließende Lyse erfolgte wie in 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.3.7 Proteinexpression in Expi293-Zellen

Die Kultivierung der Expi293-Zellen erfolgte wie in 3.2.3.1 beschrieben. Zwei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen auf eine Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml Expi293 Medium verdünnt. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen nochmals auf eine Zelldichte von 3×10^6 Zellen/ml verdünnt. Die Expi293-Zellen wurden gemäß den Herstellerangaben transfiziert und für 5 Tage für die Expression von Proteinen mit TwinStrep-tag bei 37°C, 120 rpm, 8% CO₂ inkubiert. Für die Expression von Proteinen mit Fc-tag wurden die transfizierten Zellen 6 Tage inkubiert. Es folgte die Ernte des Zellkulturüberstandes durch Zentrifugation der Zellsuspension bei 450 g, 5 min und 4°C, gefolgt von einer weiteren Zentrifugation des Überstands bei 3220 g, 20 min und 4°C. Der Zellkulturüberstand wurde durch Spritzenfilter mit einer Porengröße von 450 nm filtriert und bis zur Affinitätschromatografie (3.2.2.6 oder 3.2.2.7) bei -80°C gelagert.

3.2.4 Tierexperimentelle Methoden

3.2.4.1 Tiere und Tierhaltung

Alle Experimente und Tierversuche, die während dieser Dissertation durchgeführt wurden, wurden gemäß den Vorschriften des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV), Recklinghausen, Deutschland entsprechend §8 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das Aktenzeichen des Projektes G460/21 lautet 81-02.04.2021.A460.

Die Mäuse (C57BL/6N) wurden von Janvier, Frankreich gekauft. Die Tierhaltung fand in der zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT), Düsseldorf, Deutschland statt. Hier wurden die Tiere gemäß der *Federation of European Laboratory Animal Science Association* (FELASA) und der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) gehalten und auch die Versuche dieser Arbeit verliefen gemäß dieser FELASA und GV-SOLAS. Den Tieren wurde *ad libitum* Nahrung und mit Ozon behandeltes, saures Wasser pH 2,8 zur Verfügung gestellt. Die Räume wurden klimatisiert 22°C $\pm$ 2°C mit einer relativen

Luftfeuchtigkeit von 55% $\pm$ 10% und eine Photoperiode von 12 h wurde gehalten. Zur Akklimatisierung der bei Janvier bestellten Mäuse wurden diese mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn im Versuchsraum der ZETT gehalten.

3.2.4.2 Behandlung der Mäuse mit IC7-Fc

Um den Einfluss von IC7-Fc auf Protektion und Regeneration des Myokards zu untersuchen, wurden je Tier 100 μ l IC7-Fc in einer Konzentration von 200 μ g/ml *intraperitoneal* (*i.p.*) injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils nur 100 μ l PBS. Die Injektionen erfolgten jeweils präemptiv unmittelbar vor dem operativen Eingriff und postoperativ nach 24 h Reperfusion.

3.2.4.3 Ischämie/Reperfusion

Die Ischämie/Reperfusion ist eine etablierte Methode zur Induktion eines AMI am Mausmodell (Borst *et al.*, 2011). Hierbei werden die Mäuse unter Narkose und Analgesie für 50 min einer Ischämie des Herzen ausgesetzt.

Alle Operationen wurden von einem Veterinärmediziner durchgeführt. 20-30 min vor der Operation wurden den Tieren das Analgetikum Buprenorphin (300 mg/Kg Körpergewicht) *subkutan* (*s.c.*) injiziert. Für die Induktion des Myokardinfarktes wurden die Tiere intubiert und narkotisiert (1,5% Isofluran) in medizinischer Umgebungsluft (80% N₂, 20% O₂). Die Augen wurden durch Anwendung einer Augen- und Nasensalbe (5% Dexpanthenol) vor dem Austrocknen geschützt, das Tier auf eine Wärmeplatte gelegt und ein Temperatursensor rektal positioniert. Ein permanentes EKG wurde mittels einer 2er Elektrode (Ableitung II nach Eindhoven entsprechend) abgeleitet. Das Fell wurde im Operationsgebiet rasiert (etwa 1 cm der lateralen Thoraxwand) und mit einer Schere eine 0,5 cm große Hautinzision durchgeführt. Die Thoraxmuskulatur wurde stumpf präpariert und mittels Haltefaden armiert. Die Zwischenrippenmuskulatur wurde unter Schonung der *Arteria thoracica interna* stumpf auf präpariert und der Zwischenrippenraum gespreizt (Thorakotomie ohne die Rippen zu entfernen oder zu verletzen). Anschließend wurde das Perikard stumpf eröffnet und mittels 7/0 Prolene-Fadens den Zweig der linken Koronararterie *Ramus interventricularis anterior* (RIVA, eng.: *left anterior descending*, LAD), für 50 min ligiert. Hiernach erfolgte die Reperfusion durch Lösen der Ligatur. Es folgte der schichtweise Wundverschluss. Die Hautnaht erfolgte mit Vicryl-Nähten, gefolgt von Desinfektion mittels Betaisodona. Postoperativ fand eine weitere

passive Analgesie durch Aufnahme des Buprenorphins über das Trinkwasser (9 µg/ml) für mindestens 3 Tage statt (Jirkof *et al.*, 2019).

3.2.4.4 Echokardiografie

Zur Ermittlung der Herzfunktionen wurden eine Echokardiografie des Herzen als bildgebendes Verfahren durchgeführt.

Die Mäuse wurden zunächst in einer Inhalationskammer narkotisiert (3,5% Isofluran). Bei ausreichender Narkose und Relaxation wurden die Mäuse auf einer 41°C vorgewärmten Ableitungsplatte positioniert und die Extremitäten sanft an den EKG-Kontaktstellen fixiert. Zusätzlich wurde die Körpertemperatur mittels einer Analsonde kontinuierlich gemessen und mittels einer Wärmelampe bei 37±0,5°C gehalten. Die Mäuse wurden auf der Ableitungsplatte intubiert und narkotisiert (1,5% Isofluran) in medizinischer Umgebungsluft (80% N₂, 20% O₂). Die Augen wurden durch Anwendung einer Augen- und Nasensalbe (5% Dexpanthenol) vor dem Austrocknen geschützt und die Fellhaare am Thorax mittels eines elektrischen Haartrimmers schonend gekürzt. Die restlichen Haare wurden mit einer hautfreundlichen Enthaarungscreme entfernt. Anschließend wurde auf 37°C vorgewärmtes Ultraschallgel auf den enthaarten Thorax aufgetragen. Es folgte die Durchführung der standardisierten Echokardiografie. Das Herz wurde sowohl in der parasternalen Längsachse (PSLA) als auch in der Kurzachse (SAX) jeweils in B- und M-Mode. Hierbei wurde die maximale Aufnahmedauer von 1 h nicht überschritten. Die Auswertung wurde extern durchgeführt.

3.2.4.5 Gomori-Trichrom-Färbung

Die Gomori-Trichrom-Färbung ist eine Trichrom-Färbungsmethode aus dem Jahr 1950 (Gomori, 1950). Hierbei werden Muskelfasern und Erythrozyten rot gefärbt, Nuklei dunkelblau und Kollagen blau.

Nach Ablauf der 5 Wochen Reperfusion wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Herzen entnommen und für 18-24 h in einer 4%igen Formaldehydlösung (Roti-Histofix, Carl Roth, Karlsruhe) inkubiert. Anschließend fand die Dehydratisierung der Organe in einer aufsteigenden Alkoholreihe statt. Dazu wurden die Organe für jeweils 1 h in folgende Lösungen getaucht: 20% Isopropanol, 40% Isopropanol, 60% Isopropanol, 80% Isopropanol,

90% Isopropanol, 100% Isopropanol und anschließend über Nacht in Xylol. Am darauf folgenden Tag wurden die Organe für mindestens 1 h in Paraffin bei 60°C inkubiert, bevor sie dann in Blöcken eingebettet und gekühlt wurden. Die Herzen wurden mittels Mikrotom in jeweils 6 µm dünne Scheiben geschnitten. Dabei wurden vom Apex aus alle 1000 µm Gewebeproben geschnitten, welche auf Objektträger gelegt und bis zur weiteren Analyse bei RT gelagert wurden. Zur Vorbereitung der in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden diese zunächst für 1 h bei 62°C inkubiert. Es folgte die Entparaffinierung in Roticlear (Carl Roth, Karlsruhe) für 10 min gefolgt von der Rehydratisierung: 2 min in 100% Ethanol, 2 min in 96% Ethanol, 2 min in 70% Ethanol und für 2 min in ddH_2O . Zur Färbung der Gewebeproben wurden diese nun in eine Bouin-Lösung getaucht und für 15 min bei 58°C inkubiert, bevor sie 5 min unter fließendem Leitungswasser gespült wurden. Es folgte eine Inkubation in Weigerts-Eisen-Hämatoxylin Lösung für 5 min und eine weitere Spülung unter fließendem Leitungswasser für 5 min. Anschließend wurden die Gewebeproben für 25 min in Gomori-Lösung inkubiert bevor sie unter Leitungswasser kurz abgespült wurden. Nachfolgend fand eine Inkubation von 2 x ~2min in einer 0,5% (v/v) Essigsäure statt bis der gewünschte Kontrast erreicht wurde. Schließlich fand eine erneute Dehydratisierung statt, durch Eintauchen der Gewebeproben in 70% Ethanol für 30 sec, 96% Ethanol für 30 sec, 100% Ethanol für 2 min und schließlich in Roticlear für 10 min. Zum Schutz wurden einige Tropfen Enthellan (Merck, Darmstadt) sowie ein Deckglas auf die Gewebeproben gelegt und über Nacht trocknen gelassen. Die Objektträger wurden bis zur Mikroskopie bei RT gelagert. Hierbei wurde Kollagen blau, die Nuklei blau/schwarz, die Muskelfasern und Erythrozyten rot gefärbt.

4 Ergebnisse

Basierend auf den Arbeiten von Kallen *et al.*, 1999 (Kallen *et al.*, 1999) sollten weitere Cytokimera generiert, exprimiert und charakterisiert werden, die unterschiedliche Rezeptorkonstellationen benötigen, um eine Signaltransduktion zu initiieren. Hierbei sollte analog zu IC7, IL-6 als Gerüst dienen aber im Gegensatz zu IC7 sollte die Bindestelle-III des OSM bzw. LIF ausgetauscht werden, sodass diese Chimäre in der Lage sind gp130, IL-6R und OSMR bzw. LIFR zu binden. Im Folgenden werden diese Chimäre als GIO-6 bzw. GIL-6 bezeichnet. Bei einer weiteren Chimäre sollte IL-11 als Basis dienen und die Bindestelle-III von LIF ausgetauscht werden, sodass diese gp130, IL-11R und LIFR bindet, im Folgenden GIL-11 genannt. Schließlich sollte das bereits bekannte IC7 exprimiert und weiter charakterisiert werden

4.1 *In-silico* Design der Cytokimera

Analog zu den Arbeiten von Kallen *et al.*, 1999 und aus der Tatsache heraus, dass Zytokine der IL-6 Familie eine hohe Strukturhomologie aufweisen, wurde die auszutauschenden Regionen strukturbasiert ermittelt.

Durch beispielsweise Röntgenstrukturanalyse oder Kryo-Elektronenmikroskopie gewonnene Strukturdaten der Proteine weisen oft Lücken auf, insbesondere in den Loop-Regionen, da diese besonders beweglich sind. Für das Struktur-*Alignment* sind vollständige Proteinstrukturen ohne Unterbrechungen besser geeignet als solche mit Lücken. Daher wurden die Strukturen der Zytokine, deren Bindestelle-III untereinander ausgetauscht werden sollte, mittels einem Proteinstrukturhomologie Server vorhergesagt. Hierzu wurde der webbasierte *protein homology analogy recognition engine* (PHYRE2) (Kelley & Sternberg, 2009) verwendet. Anschließend wurden die vollständig vorhergesagten Strukturen mittels der Software UCSF Chimera 1.14 visualisiert und ein strukturbasiertes *Alignment* erstellt. Für das *Alignment* wurde ein Algorithmus nach Needleman-Wunsch und eine BLOSUM-62 Matrix gewählt. Hierbei überlagerten sich die Strukturen teilweise räumlich ().

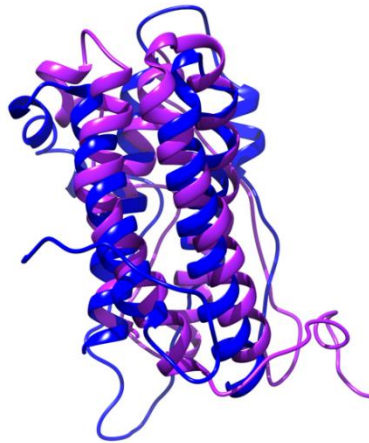


Abbildung 8: Strukturbasiertes *Alignment* von IL-6 und LIF.

Beispiel einer teilweise räumlichen Überlagerung der durch Phyre2 vorhergesagten Strukturen von IL-6 (blau) und LIF (lila). Überlagerung durch UCSF Chimera 1.14.

Anschließend wurden die sich überlagernden Aminosäuren ermittelt. Hierzu wurde eine Ausschlussgrenze von 6 Å gewählt. Anschließend wurden die Regionen des IL-6 markiert, die für die Generierung des IC7 ausgetauscht wurde (Abbildung 7). Hieraus ergaben sich die Regionen, die den Regionen des IL-6 räumlich am nächsten waren (Abbildung 9). Im Fall von IL-11 als Gerüst, wurde die vorhergesagte Struktur dessen zusätzlich als dritte Struktur in die Software geladen. Die schließlich erhaltenen Sequenzen wurden dann extern bei BioCat GmbH, Heidelberg synthetisiert.

4.2 Expression und Reinigung der Cytokimera

Die cDNA der entsprechenden Sequenzen wurden extern bei BioCat GmbH synthetisiert, bevor sie dann in die Expresssionsvektoren kloniert wurden. Zwecks Sezernierung und Reinigung wurde N-terminal ein Signalpeptid und C-terminal ein Fc-tag (IC7, GIL-6 und GIO-6) bzw. ein TwinStrep-(Ts)-tag (GIL-11-Ts) fusioniert, da sich diese tags bei der Expression und Reinigung der entsprechenden Cytokimera bewährt hatten. Eine schematische Darstellung der Chimäre und deren korrespondierenden Rezeptoren sind aus Abbildung 10 zu entnehmen.

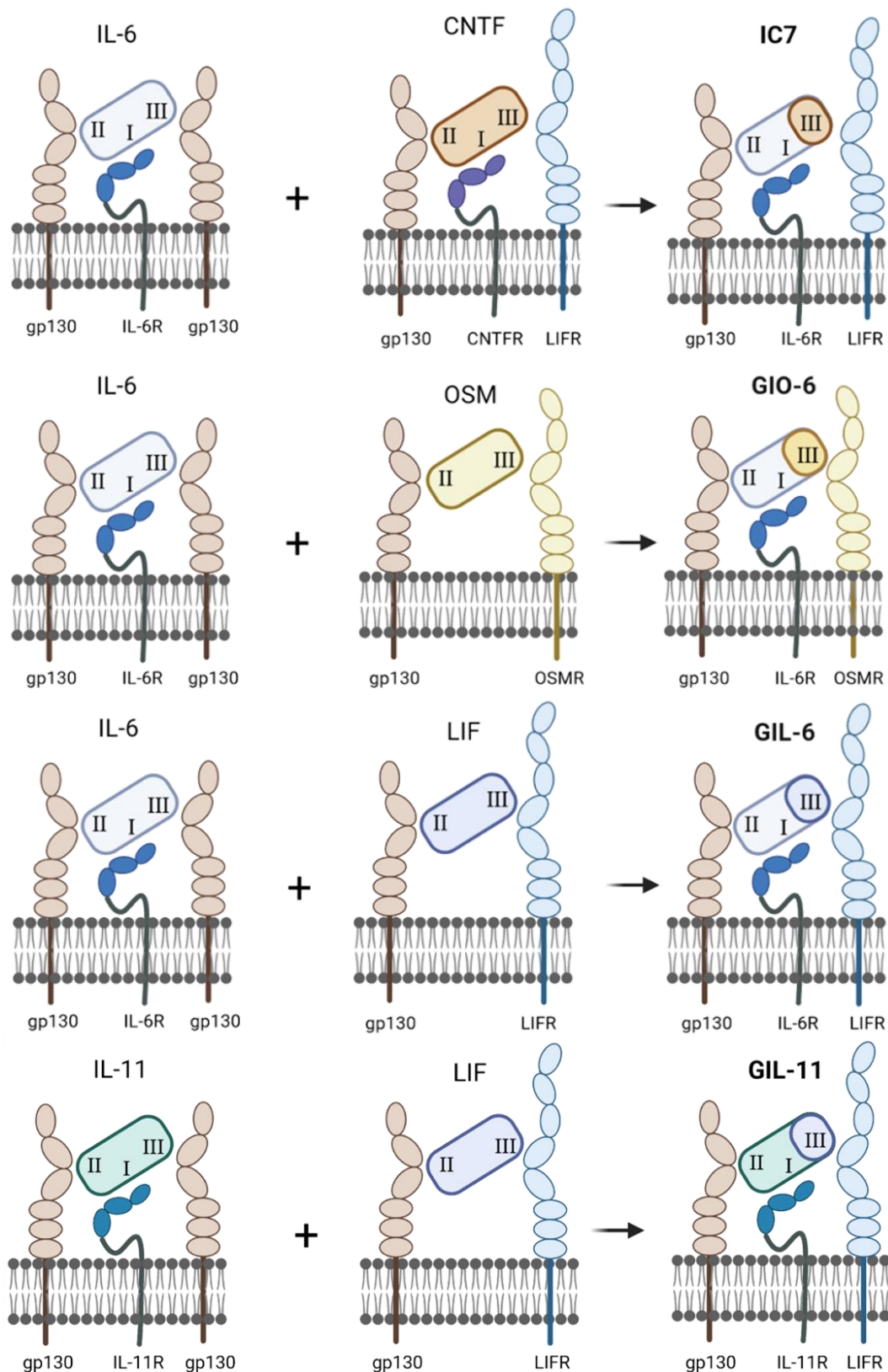


Abbildung 10: Schematische Darstellung der generierten Chimäre IC7, GIO-6, GIL-6 und GIL-11.

Schematische Darstellung der Chimäre und die korrespondierende Rezeptorkonstellation. Zu sehen sind die für die Erzeugung der Chimäre verwendeten Gerüste IL-6 und IL-11. Die Bindestelle-III wurde jeweils mit der Bindestelle-III des CNTF, OSM oder LIF ausgetauscht.

Die Expression der Chimäre erfolgte in Expi293 Zellen, da rekombinante Proteine generell ein hohes Expressionsniveau aufwiesen. Die Expi293 Zellen wurden transient mit der Plasmid-DNA transfiziert, welche für die entsprechenden synthetischen Zytokine kodiert. Die erhaltenen Überstände wurden für die spätere Proteinreinigung entweder direkt verwendet oder bei -80°C gelagert. Zuvor wurde die erfolgreiche Expression der Cytokimera mittels Western Blot verifiziert (Abbildung 11).

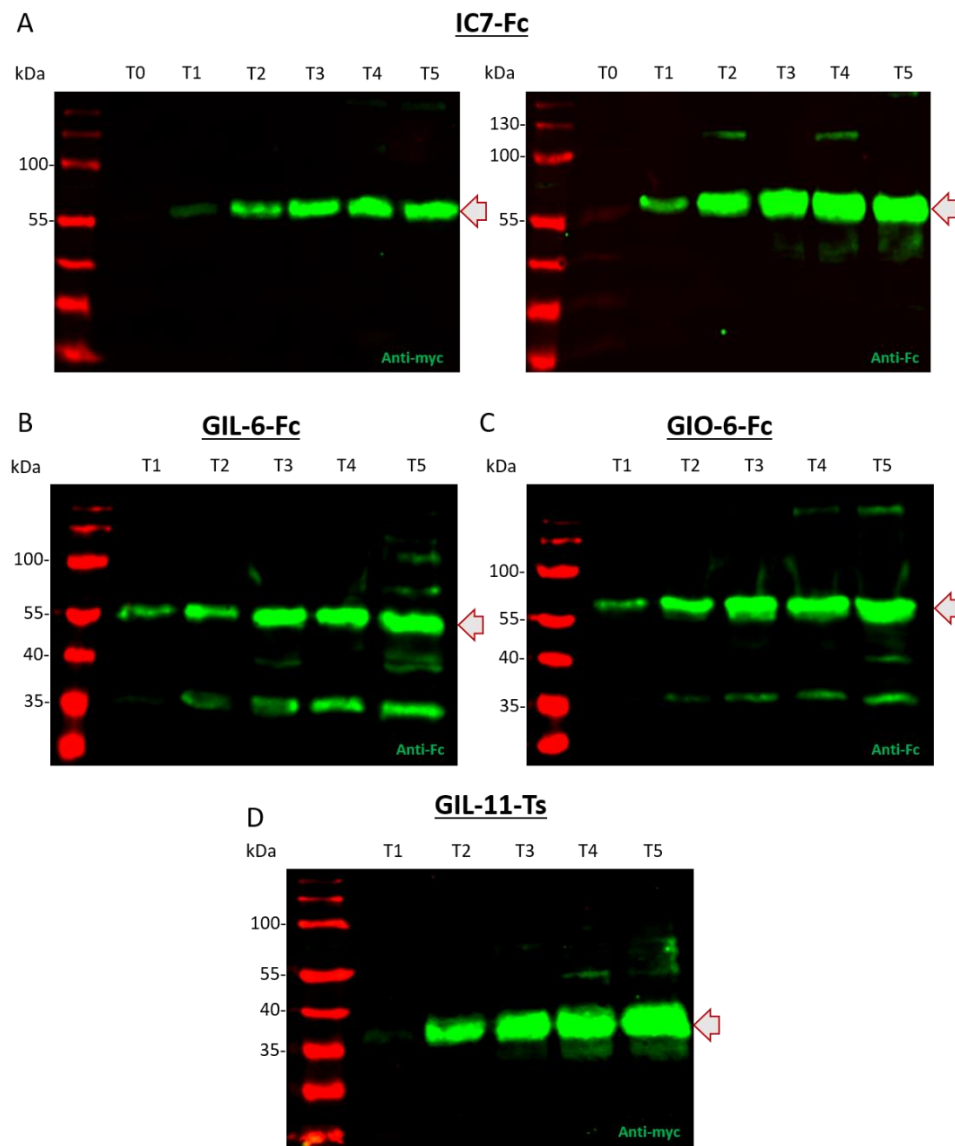


Abbildung 11: Expressionsverlauf der Cytokimera in Expi293.

In jeder Spur wurden 33 µl Zellkulturüberstand aus der Expi293 Expression nach verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Die Cytokimera sind durch Pfeile markiert. **A)** Überstände aus der IC7Fc Expression. Western Blot gegen myc (links) und gegen Fc (rechts) nach Tag 0-5. **B)** Überstände aus der GIL-6-Fc Expression nach Tag 1-5. Western Blot gegen Fc. **C)** Überstände aus der GIO-6-Fc Expression nach Tag 1-5. Western Blot gegen Fc. **D)** Überstände aus der GIL-11-Ts Expression nach Tag 1-5. Western Blot gegen myc.

Da es sich hierbei um synthetische Zytokine handelt und die Stabilität und Exprimierbarkeit der Proteine nicht immer gegeben sein muss, war eine Analyse der Expressionsverläufe nötig. Bei der Analyse zeigte sich meist ein Plateau an Tag 5, weshalb der Überstand an Tag 5 geerntet wurde. Auffällig war, dass GIL-6-Fc und GIO-6-Fc, die eine erwartete Größe von 52,2 kDa bzw. 53,3 kDa haben, noch Nebenprodukte bei ~35 kDa aufweisen, was auf eine Instabilität und Degradation der Proteine hindeutet. IC7-Fc und GIL-11-Ts befinden sich bei den erwarteten Größen von ~51,8 kDa bzw. 28,9 kDa.

Die verschiedenen Fraktionen der Eluate wurden vereint, konzentriert und in PBS Puffer umgepuffert. Die Ausbeute betrug für GIL-6-Fc 2,38 mg/L, für GIO-6-Fc 2,84 mg/L, für IC7-Fc 11,11 mg/L und für GIL-11-Ts 25,5 mg/L. Wobei GIL-11-Ts erhebliche Mengen an Verunreinigungen aufwies. Zudem zeigte sich im Durchlauf, dass nicht das gesamte GIL-11-Ts an der Säule gebunden hatte. Bei GIL-6-Fc und GIO-6-Fc haben sich die Nebenprodukte bei etwa 35 kDa angereichert, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass es sich hierbei um Proteinfragmente mit dem C-terminalen Fc-Teil ohne die Chimäre handelt (Abbildung 12).

Im Anschluss wurden die gereinigten und umgepufferten Cytokimera bis zur Charakterisierung bei -80°C gelagert.

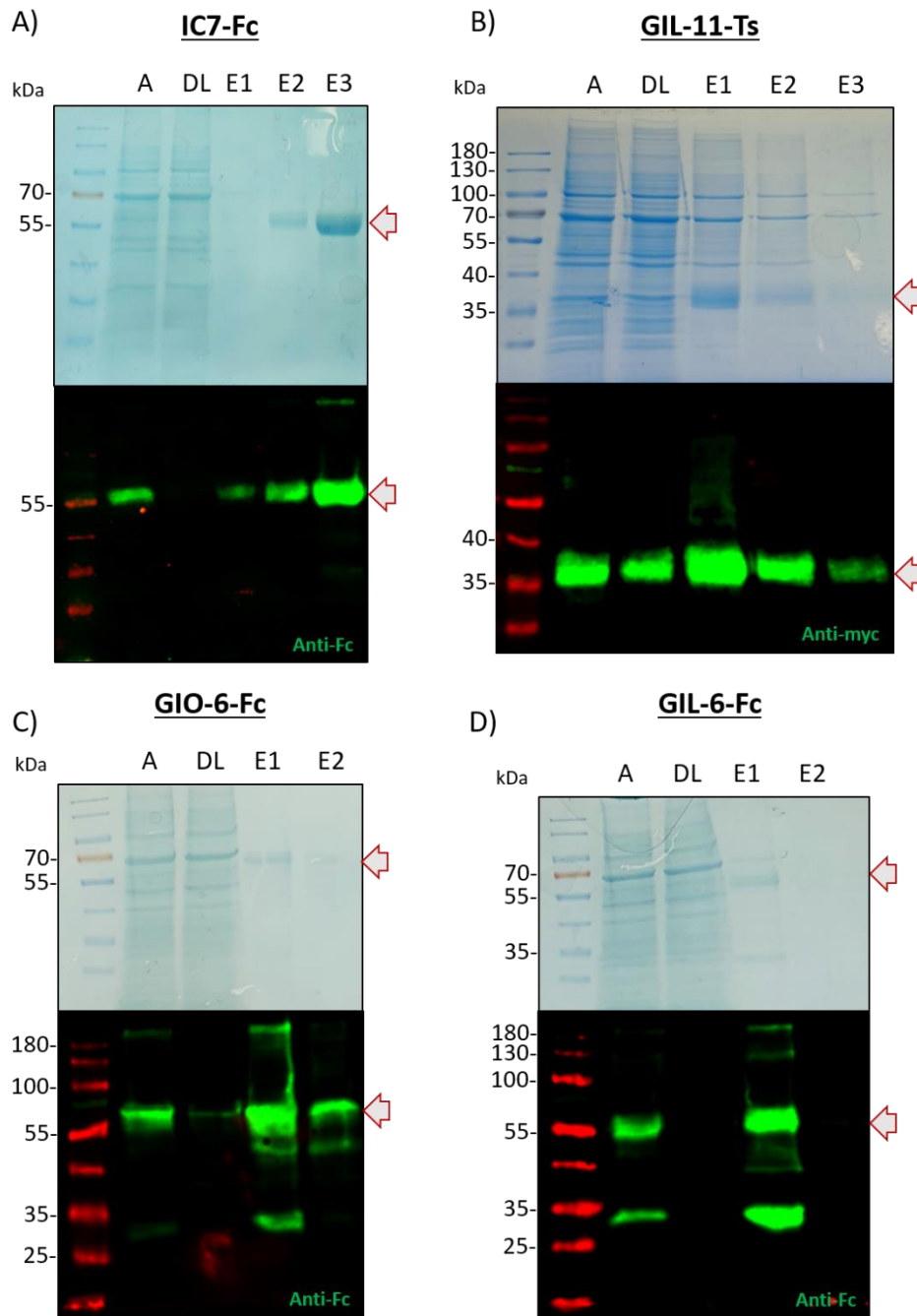


Abbildung 12: Reinigung der Cytokimera.

Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie. A= Auftrag, DL= Durchlauf, E= Elutionsfraktion. Es wurden jeweils 33 µl in jede Spur aufgetragen. Die Cytokimera sind durch Pfeile markiert. **A)** IC7-Fc Protein-A Reinigung. Coomassie (oben) und Western Blot gegen Fc (unten). **B)** GIL-11-Ts TwinStrep Reinigung. Coomassie (oben) und Western Blot gegen myc (unten). **C)** GIO-6-Fc Protein-A Reinigung. Coomassie (oben) und Western Blot gegen Fc (unten). **D)** GIL-6-Fc Protein-A Reinigung. Coomassie (oben) und Western Blot gegen Fc (unten).

4.3 Charakterisierung der Cytokimera

4.3.1 Cytokimera sind biologisch aktiv und spezifisch

Zur Untersuchung der Aktivität und Spezifität wurden Ba/F3-Zellen verwendet. Dies sind murine Prä-B-Zellen, welche Zytokin-abhängig mit IL-3 proliferieren. Die hier verwendeten Zellen exprimieren stabil zusätzlich mindestens noch humanes gp130. Dadurch können die Zellen mit Hyper-IL-11 durch den IL-11 Trans-Signalweg und anschließender JAK/STAT-Signalkaskade proliferieren. Somit diente HIL-11 als Positivkontrolle, da alle hier verwendeten Zellen dadurch proliferieren. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Weiterhin wurden die cDNAs, codierend für die benötigten Rezeptoren mittels retroviraler Transduktion stabil in die entsprechenden Zellen eingebracht und die Expression der Rezeptoren durch Durchflusszytometrie auf Oberflächenpräsentation überprüft (Anhang Abbildung 25). Um zu beurteilen, ob die Cytokimera aktiv und spezifisch sind, wurden diese und Kontrollzytokine verwendet, um Ba/F3-Zellen mit verschiedenen Rezeptorkonstellationen zu stimulieren. Während die unbehandelten Ba/F3 Zellen ohne Zytokin nicht proliferieren, führt die Stimulation mit HIL-11-Ts bei allen Zellen zur Proliferation. IL-11 führt bei Ba/F3 gp130 IL-11R und bei Ba/F3 gp130 IL-11R LIFR Zellen zur Proliferation. Ba/F3 gp130 LIFR und Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR Zellen proliferieren durch LIF. Sowohl alle LIFR als auch alle OSMR exprimierenden Zellen proliferieren durch OSM (Abbildung 13A, B). GIL-11-Ts zeigte eine deutliche Aktivität bei gp130, IL-11R und LIFR exprimierenden Ba/F3-Zellen, während alle anderen Zellen nicht mit GIL-11-Ts proliferierten (Abbildung 13A). Erwartungsgemäß proliferierten Ba/F3 Zellen, die gp130, IL-6R und LIFR exprimieren mit GIL-6-Fc, GIO-6-Fc als auch IC7-Fc. Erwartungsgemäß proliferierten ebenfalls Ba/F3 gp130 IL-6R OSMR mit GIO-6-Fc, während GIL-6-Fc keinen Effekt aufwies. Interessanter Weise zeigte auch IC7-Fc auf diesen Zellen eine deutliche Aktivität (Abbildung 13B).

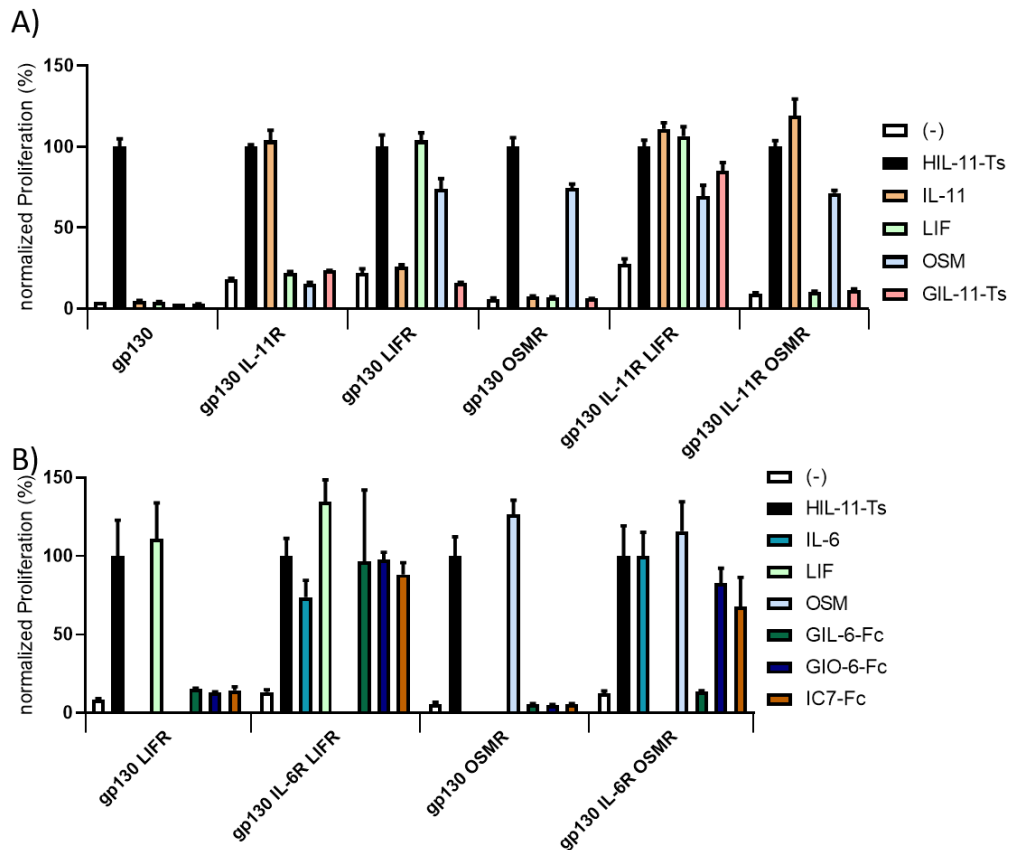


Abbildung 13: Cytokimera sind aktiv und spezifisch (qualitativer Nachweis).

Auf die Positivkontrolle normalisierte Proliferation der verschiedenen Cytokimera und Kontroll-Zytokine auf Ba/F3 Zellen mit verschiedenen Rezeptoren. **A)** Proliferation von Ba/F3 Zellen mit den angegebenen Rezeptoren ohne Zytokin (-), mit HIL-11-Ts (50 ng/ml), IL-11 (10 ng/ml), LIF (10 ng/ml), OSM (10 ng/ml), GIL-11-Ts (500 ng/ml). **B)** Proliferation von Ba/F3 Zellen mit den angegebenen Rezeptoren ohne Zytokin (-), mit HIL-11-Ts (50 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml), LIF (20 ng/ml), OSM 20 ng/ml), GIL-6-Fc (20 ng/ml), GIO-6-Fc (20 ng/ml) und IC7-Fc (20ng/ml). Angegeben sind jeweils der Mittelwert und der Standardfehler. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Um nun die Aktivität der Cytokimera genau quantifizieren zu können, wurde die Proliferation der Ba/F3-Zellen mit diversen Rezeptoren in Konzentrationsreihen gemessen und die EC50-Werte mittels einer nichtlinearen Regression bestimmt (Abbildung 14, Tabelle 17).

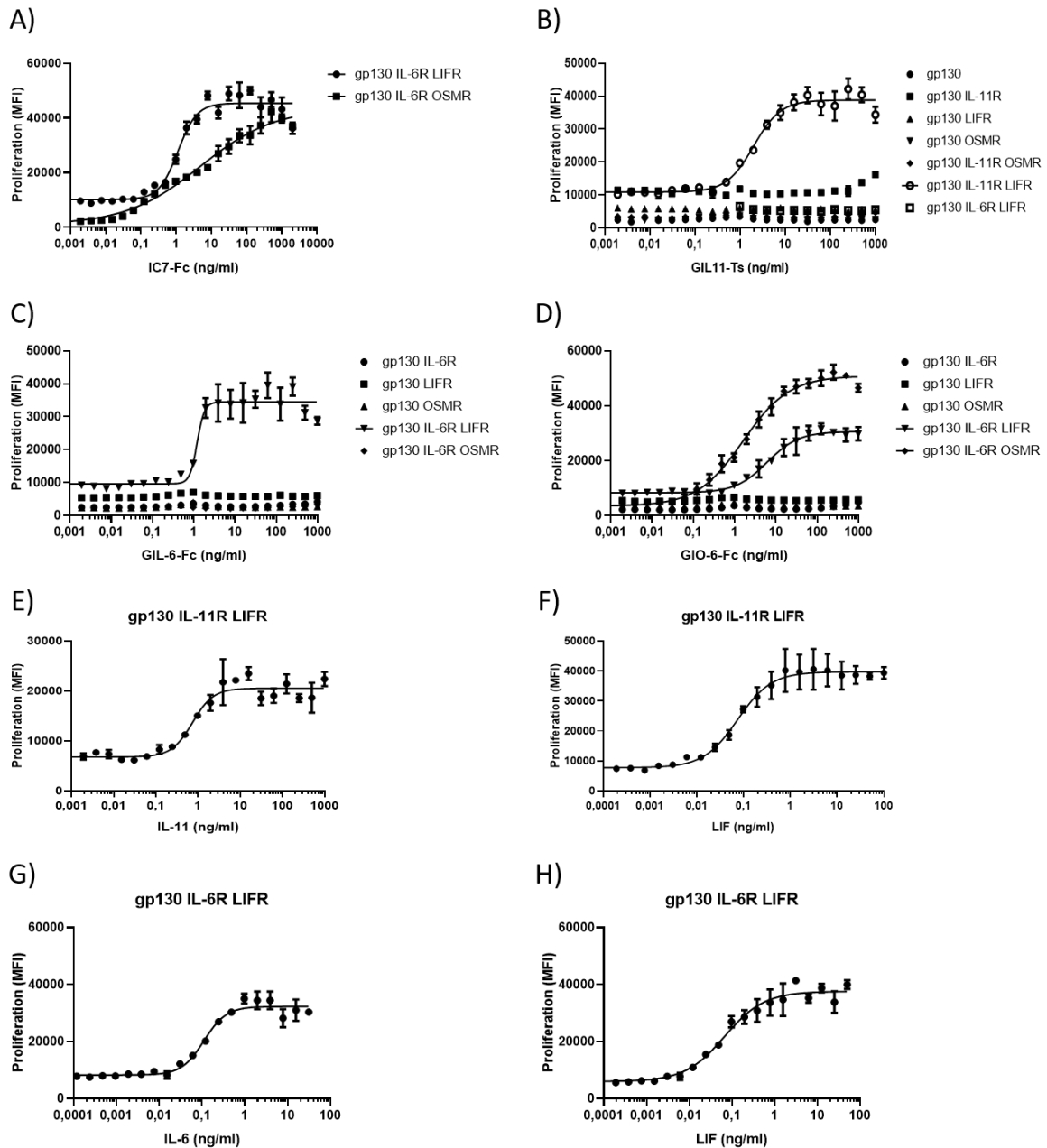


Abbildung 14: Cytokimera sind aktiv und spezifisch (quantitativer Nachweis).

Proliferation der Ba/F3-Zellen mit diversen Rezeptoren nach Zugabe der Zytokimera und Kontroll-Zytokine in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI). Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler wider. Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression gefittet. **A)** Proliferation von Ba/F3-Zellen mit den angegebenen Rezeptoren mit ansteigenden Konzentrationen IC7-Fc (0,001 – 2000 ng/ml). **B)** Proliferation von Ba/F3-Zellen mit den angegebenen Rezeptoren mit ansteigenden Konzentrationen GIL-11-Ts (0,001 – 1000 ng/ml). **C)** Proliferation von Ba/F3-Zellen mit den angegebenen Rezeptoren mit ansteigenden Konzentrationen GIL-6-Fc (0,001 – 1000 ng/ml). **D)** Proliferation von Ba/F3-Zellen mit den angegebenen Rezeptoren mit ansteigenden Konzentrationen GIO-6-Fc (0,001 – 1000 ng/ml). **E)** Proliferation von Ba/F3 gp130 IL-11R LIFR mit ansteigenden Konzentrationen IL-11 (0,001 – 1000 ng/ml). **F)** Proliferation von Ba/F3 gp130 IL-11R LIFR mit ansteigenden Konzentrationen LIF (0,0001 – 100 ng/ml). **G)** Proliferation von Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR mit ansteigenden Konzentrationen IL-6 (0,0001 – 30 ng/ml). **H)** Proliferation von Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR mit ansteigenden Konzentrationen LIF (0,0001 – 100 ng/ml). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Tabelle 17: EC50 Werte der Cytokimera und Zytokine.

Die EC50 Werte wurden durch nichtlineare Regression einer konzentrationsabhängigen Proliferationskurve ermittelt.

Zytokin/ Cytokimera	Ba/F3 Rezeptoren	EC50 (ng/ml)	EC50 (pM)
IC7-Fc	gp130 IL-6R LIFR	1,12	10,8
	gp130 IL-6R OSMR	4,80	46,3
GIL-11-Ts	gp130 IL-11R LIFR	1,44	49,8
GIL-6-Fc	gp130 IL-6R LIFR	1,21	11,6
GIO-6-Fc	gp130 IL-6R LIFR	6,16	57,8
	gp130 IL-6R OSMR	1,60	15,0
IL-11	gp130 IL-11R LIFR	0,72	33,6
LIF	gp130 IL-11R LIFR	0,07	3,18
IL-6	gp130 IL-6R LIFR	0,11	4,64
LIF	gp130 IL-6R LIFR	0,08	3,64

Auf Grund der unterschiedlichen Molekulargewichte der Proteine, ist eine Angabe der EC50 in der Stoffmengenkonzentration zur Vergleichbarkeit besser geeignet. IC7-Fc zeigte mit 10,8 pM eine niedrigere EC50 mit Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR Zellen als mit gp130 IL-6R OSMR exprimierenden Ba/F3-Zellen (46,3 pM). GIL-11-Ts hatte trotz Berücksichtigung der geringen Reinheit in der konzentrationsabhängigen Proliferation noch eine EC50 von 49,8 pM mit Ba/F3-Zellen, die gp130 IL-11R LIFR exprimieren. Zum Vergleich wurden die EC50 Werte von LIF und IL-11 (3,18 pM bzw. 33,6 pM) mit Ba/F3 gp130 IL-11R LIFR Zellen bestimmt. GIL-6-Fc zeigte mit 11,6 pM einen vergleichbaren EC50 Wert wie IC7-Fc. Zum Vergleich wurden die EC50 Werte von LIF und IL-6 (3,64 pM bzw. 4,64 pM) mit Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR exprimierenden Zellen bestimmt. GIO-6-Fc zeigte mit 15 pM ebenfalls einen vergleichbaren EC50 Wert mit Ba/F3 gp130 IL-6R OSMR Zellen wie IC7-Fc. Allerdings wurde mit Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR Zellen ein EC50 Wert von 57,8 pM ermittelt, vergleichbar wie IC7-Fc auf Ba/F3 gp130 IL-6R OSMR. Zusammengefasst, kann gesagt werden, dass die EC50-Werte der Cytokimera vergleichbar gut sind mit dem rekombinanten IL-11, welches zuvor in früheren Arbeiten in dieser Arbeitsgruppe exprimiert und gereinigt wurde aber etwa um den Faktor 10 weniger als die kommerziell erworbenen Zytokine LIF und IL-6 (Tabelle 17).

Die Proliferation, die durch den Cytokimera/Rezeptor-Komplex hervorgerufen wird, wird hauptsächlich über den JAK/STAT Signaltransduktionsweg induziert. Daher wurde nachfolgend die STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-Zellen nach Stimulation mit den

Cytokimera und den Zytokinen analysiert, um die Aktivität und Spezifität zu verifizieren. Hierbei diente HIL-11 wieder als Positivkontrolle (Abbildung 15).

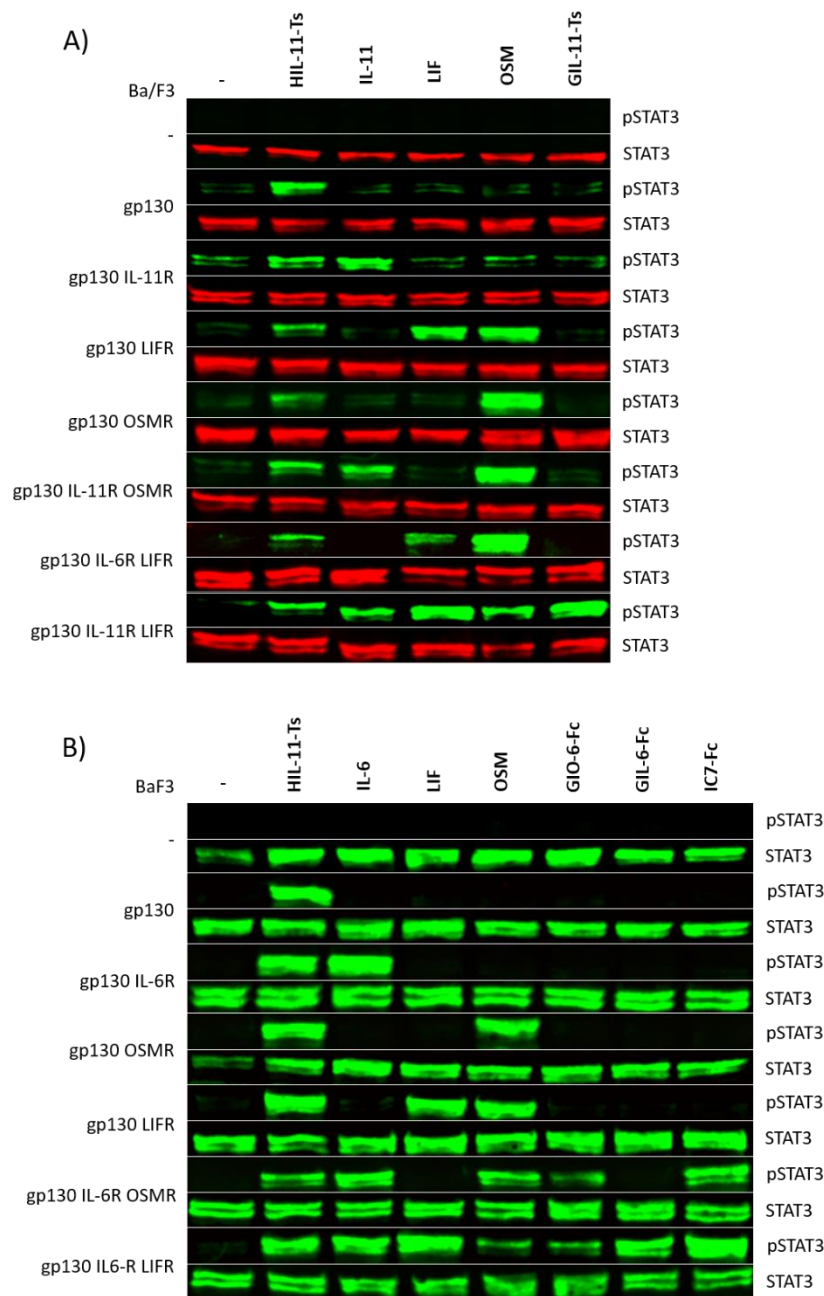


Abbildung 15: Cytokimera sind aktiv und spezifisch (Stimulation).

Fluoreszenzbasierter Western Blot gegen STAT3 und Phospho-STAT3. STAT3-Aktivierung in Ba/F3-Zellen durch Zytokine und Cytokimera für 15 min. In jeder Spur wurden gleiche Mengen Gesamtprotein (50 µg/Spur) aufgetragen und mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 und Phospho-STAT3 analysiert. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives Experiment von drei dar. **A)** STAT3-Aktivierung in Ba/F3-Zellen mit den angegebenen Rezeptoren ohne Zytokin (-) und nach Stimulation mit HIL-11-Ts (50 ng/ml), IL-11 (50 ng/ml), LIF (10 ng/ml), OSM (10 ng/ml) und GIL-11-Ts (500 ng/ml). **B)** STAT3-Aktivierung in Ba/F3-Zellen mit den angegebenen Rezeptoren ohne Zytokin (-) und nach Stimulation mit HIL-11-Ts (100 ng/ml), IL-6 (100 ng/ml), LIF (10 ng/ml), OSM, (10 ng/ml), GIO-6-Fc (100 ng/ml), GIL-6-Fc (100 ng/ml) und IC7-Fc (100 ng/ml). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Während bei den unbehandelten Ba/F3 Zellen keine STAT3-Phosphorylierung erkennbar war, führte die Stimulation mit HIL-11-Ts bei allen gp130 exprimierenden Ba/F3 Zellen zur STAT3-Phosphorylierung. IL-11 führte bei allen IL-11R exprimierenden Ba/F3 Zellen zur STAT3-Phosphorylierung. LIF führte bei allen LIFR exprimierenden Ba/F3 Zellen zur STAT3-Phosphorylierung, während OSM bei allen LIFR und OSMR exprimierenden Ba/F3 Zellen zur STAT3-Phosphorylierung führte. IL-6 induzierte bei allen IL-6R exprimierenden Ba/F3 Zellen zur STAT3-Phosphorylierung (Abbildung 15A, B). GIL-11-Ts zeigte konsistent zur Proliferationsanalyse eine spezifische STAT3-Phosphorylierung nur auf Ba/F3 gp130 IL-11R LIFR exprimierenden Zellen, während es auf Zellen mit anderen Rezeptorkonstellationen keine Aktivität zeigte (Abbildung 15A). GIO-6-Fc sowie IC7-Fc zeigten analog zur Proliferationsanalyse eine STAT3-Aktivierung in Ba/F3 gp130 IL-6R OSMR aber auch in gp130 IL-6R LIFR exprimierenden Ba/F3 Zellen. Zudem erfolgte durch GIO-6-Fc und IC7-Fc eine STAT3-Aktivierung in gp130 IL-6R LIFR exprimierenden Zellen. GIL-6-Fc führte ausschließlich bei Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR exprimierenden Ba/F3 Zellen zur STAT3-Phosphorylierung (Abbildung 15B).

Um eine Konzentrationsabhängigkeit in der Signaltransduktion zu beurteilen, wurden Ba/F3-Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren mit den Cytokimera stimuliert. Hierbei wurden GIL-11-Ts, GIL-6-Fc, GIO-6-Fc und die entsprechenden Kontrollen in verschiedenen Konzentrationen zur Stimulation verwendet und im Western Blot die STAT3- und ERK-Phosphorylierung untersucht.

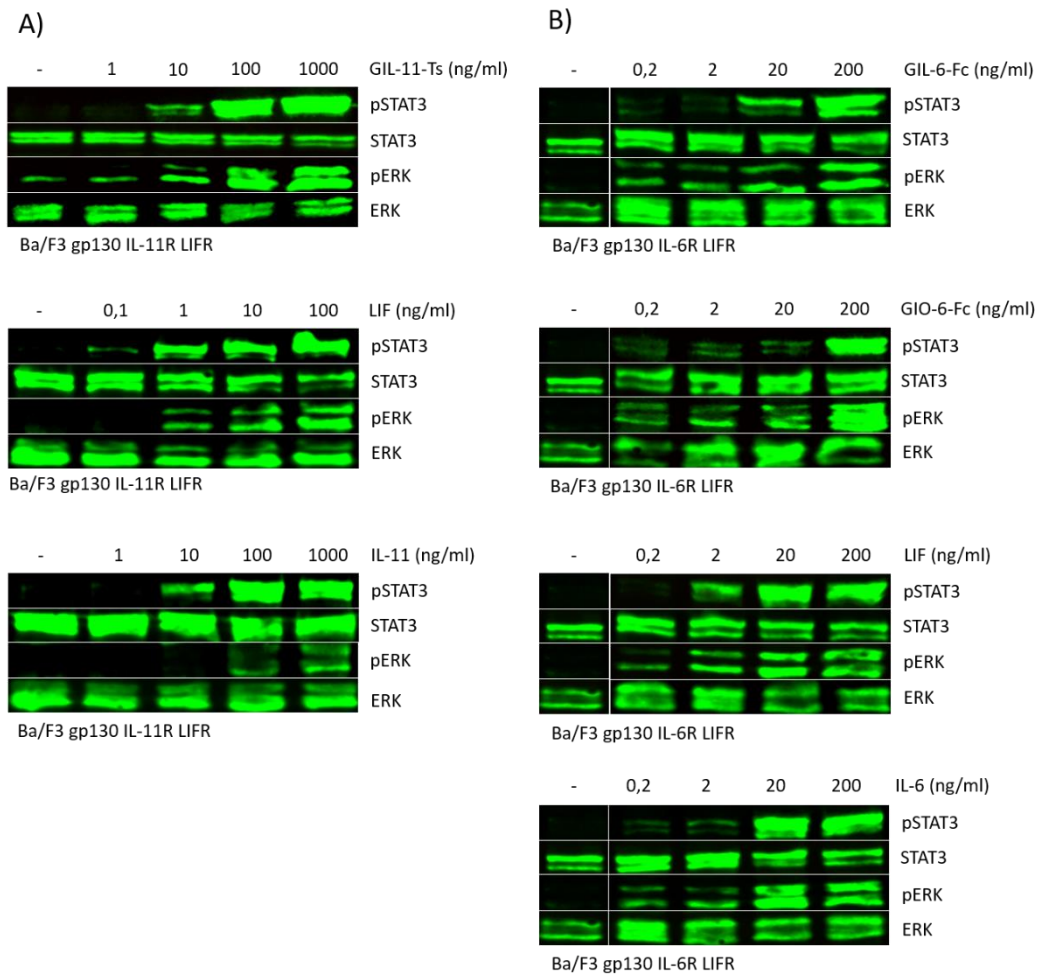


Abbildung 16: Konzentrationsabhängige Stimulation von Ba/F3 Zellen durch Cytokimera.

Fluoreszenzbasierter Western Blot gegen STAT3, Phospho-STAT3, ERK und Phospho-ERK. Stimulation der Ba/F3-Zellen durch Cytokimera und Kontroll-Zytokine für 15 min. In jeder Spur wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein (50 µg/Spur) aufgetragen und mit spezifischen Antikörpern analysiert. Die Western Blots zeigen jeweils ein repräsentatives Experiment von drei. **A)** STAT3- und ERK-Aktivierung durch GIL-11-Ts, LIF und IL-11 ohne Zytokin (-) und von 1-1000 ng/ml bei Ba/F3 gp130 IL-11R LIFR **B)** STAT3- und ERK-Aktivierung durch GIL-6-Fc, GIO-6-Fc, LIF und IL-6 unbehandelt (-) und von 0,2-200 ng/ml bei Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Dargestellt sind die konzentrationsabhängige STAT3- und ERK-Aktivierungen durch GIL-11-Ts, GIL-6-Fc, GIO-6-Fc und Kontrollzytokine. Hierbei waren 10 ng/ml GIL-11-Ts ausreichend für eine STAT3- und ERK-Phosphorylierung. Somit war die Aktivität des GIL-11-Ts im Hinblick auf die Signaltransduktion vergleichbar mit IL-11 bei Ba/F3 gp130 IL-11R LIFR Zellen jedoch nicht so aktiv wie LIF, da LIF bereits bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml zu einer geringen STAT3-Phosphorylierung führte (Abbildung 16A). GIL-6-Fc zeigte bei 20 ng/ml gerade noch eine deutliche STAT3-Phosphorylierung und war somit aktiver als GIO-6-Fc, welches bei 200 ng/ml noch eine solide STAT3-Aktivierung und bei 20 ng/ml eine ERK-Aktivierung bei Ba/F3 gp130 IL-

6R LIFR Zellen zeigte. Die Kontrollzytokine IL-6 und LIF induzierten die Signaltransduktion der Ba/F3 gp130 IL-6R LIFR Zellen ab einer Konzentration von 2 ng/ml (Abbildung 16B).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Cytokimera spezifisch, aber im Vergleich zu den rekombinanten Zytokinen aus denen die Chimäre bestehen etwas weniger aktiv sind. Weiterhin kann gesagt werden, dass die Intensität der Signaltransduktion mindestens über den JAK/STAT- und den MAPK/ERK-Signalweg verläuft und diese in den Ba/F3-Zellen konzentrationsabhängig ist.

4.3.2 Cytokimera aktivieren den Trans-Signaltransduktionsweg kaum

Während dem klassischen IL-6 Signalweg eher protektive, regenerative und anti-inflammatorische Prozesse zugeschrieben werden, werden dem IL-6 Trans-Signalweg eher Immunsystemaktivierende und somit pro-inflammatorische Prozesse zugeschrieben (Abschnitt 1.4) (Reeh *et al.*, 2019). Aus diesem Grund sollte das Verhalten der Cytokimera im Hinblick auf die verschiedenen Signaltransduktionswege charakterisiert werden. Da GIL-11-Ts auf einem IL-11 Gerüst basiert, in dem die Bindestelle-III ausgetauscht wurde, war es naheliegend, dass es weiterhin in der Lage sein sollte, über die Bindestelle-I ein Komplex mit sIL-11R zu bilden, um so Ba/F3 gp130 LIFR exprimierende Zellen zu stimulieren. Analog dazu war die Hypothese, dass auch die auf IL-6 basierenden Cytokimera IC7-Fc, GIL-6-Fc und GIO-6-Fc, bei denen die Bindestelle-III ausgetauscht wurde, mit sIL-6R Komplexe bilden und anschließend an den membranständigen gp130 und LIFR binden und folglich zur Trans-Signaltransduktion führen.

Im Folgenden wurden die Proliferationen von Ba/F3 gp130 LIFR Zellen nach Zugabe einer konstanten Konzentration sIL-6R bzw. sIL-11R in Abhängigkeit der Cytokimera-Konzentration gemessen (Abbildung 17).

Obwohl IL-11 zusammen mit 100 ng/ml sIL-11R ein Komplex bildet und mit einer EC50 von 71.6 ng/ml über den Trans-Signalweg zur Proliferation führt, ist GIL-11-Ts kaum in der Lage dazu. In früheren Experimenten hatte sich gezeigt, dass eine Konzentration von 100 ng/ml sIL-11R zur Induktion des Trans-Signalweges geeignet ist (Garbers *et al.*, 2011). Die Proliferation beginnt erst ab einer Konzentrationen von 250 ng/ml GIL-11-Ts, sodass keine Sättigung erreicht werden kann und der EC50 Wert nicht ermittelbar war (Abbildung 17A, B).

Analog dazu zeigte IL-6 zusammen mit 200 ng/ml sIL-6R eine solide Trans-Aktivierung mit einer EC50 von nur 1,04 ng/ml, während die Cytokimera IC7-Fc und GIL-6-Fc mindestens 250 ng/ml benötigten, um eine schwache Proliferation zu induzieren (Abbildung 17C, D, E) . In früheren Experimenten hatte sich gezeigt, dass eine Konzentration von 200 ng/ml sIL-6R zur Induktion des Trans-Signalweges geeignet ist (Garbers *et al.*, 2011). GIO-6-Fc war unter den hier verwendeten Konzentrationen nicht in der Lage den Trans-Signaltransduktionsweg zu vermitteln (Abbildung 17E).

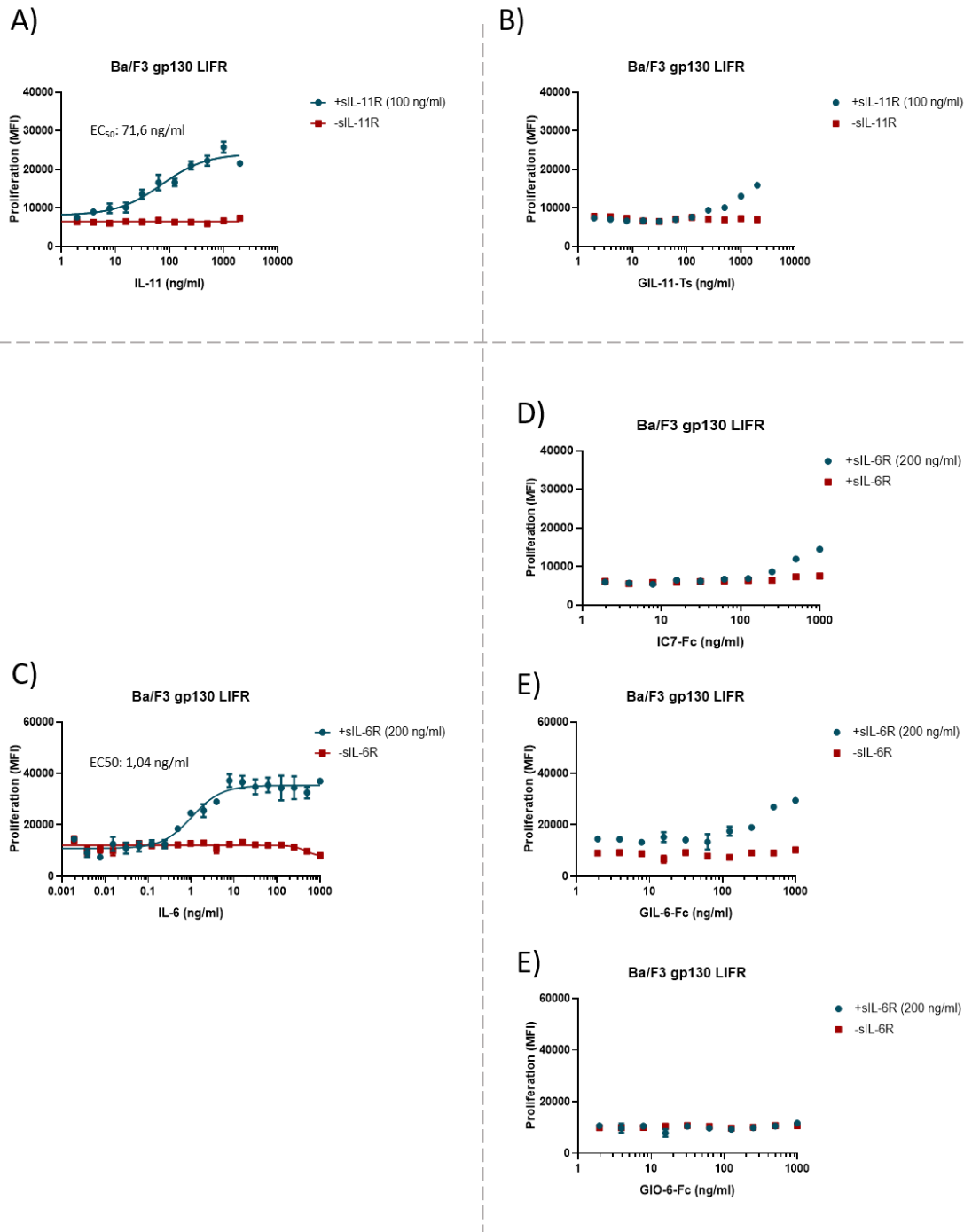


Abbildung 17: Cytokimera initiieren kaum die Trans-Signalwege.

Proliferation der Ba/F3 gp130 LIFR Zellen nach Zugabe einer konstanten Konzentration des löslichen α -Rezeptors in Abhängigkeit der Cytokimera und Kontroll-Zytokinen in mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI). Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler wider. Kurven und die EC₅₀ wurden mittels nichtlinearer Regression gefittet. **A)** Proliferation der Ba/F3 gp130 LIFR Zellen mit (blau) und ohne (rot) 100 ng/ml sIL-11R mit ansteigenden Konzentrationen IL-11 (2 – 2000 ng/ml). **B)** Proliferation der Ba/F3 gp130 LIFR Zellen mit (blau) und ohne (rot) 100 ng/ml sIL-11R mit ansteigenden Konzentrationen GIL-11-Ts (2 – 2000 ng/ml). **C)** Proliferation der Ba/F3 gp130 LIFR Zellen mit (blau) und ohne (rot) 200 ng/ml sIL-6R mit ansteigenden Konzentrationen IL-6 (0,002 – 2000 ng/ml). **D)** Proliferation der Ba/F3 gp130 LIFR Zellen mit (blau) und ohne (rot) 200 ng/ml sIL-6R mit ansteigenden Konzentrationen IC7-Fc (2 – 1000 ng/ml). **E)** Proliferation der Ba/F3 gp130 LIFR Zellen mit (blau) und ohne (rot) 200 ng/ml sIL-6R mit ansteigenden Konzentrationen GIL-6-Fc (2 – 1000 ng/ml). **F)** Proliferation der Ba/F3 gp130 LIFR Zellen mit (blau) und ohne (rot) 200 ng/ml sIL-6R mit ansteigenden Konzentrationen GIO-6-Fc (2 – 1000 ng/ml). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Die fehlende Eigenschaft der Cytokimera zur Aktivierung des Trans-vermittelten Signalweges wurde exemplarisch für GIL-11-Ts untersucht. Olamkicept (sgp130Fc) inhibiert den Komplex aus IL-6/sIL-6R oder IL-11/sIL-11R (Garbers *et al.*, 2011). Daher sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob sich die Trans-Signaltransduktion, die von GIL-11-Ts/sIL-11R ausgeht, inhibieren lässt. Hierzu wurden ausreichend hohe Konzentrationen gewählt, um die Trans-Signaltransduktion zu forcieren (Abbildung 18).

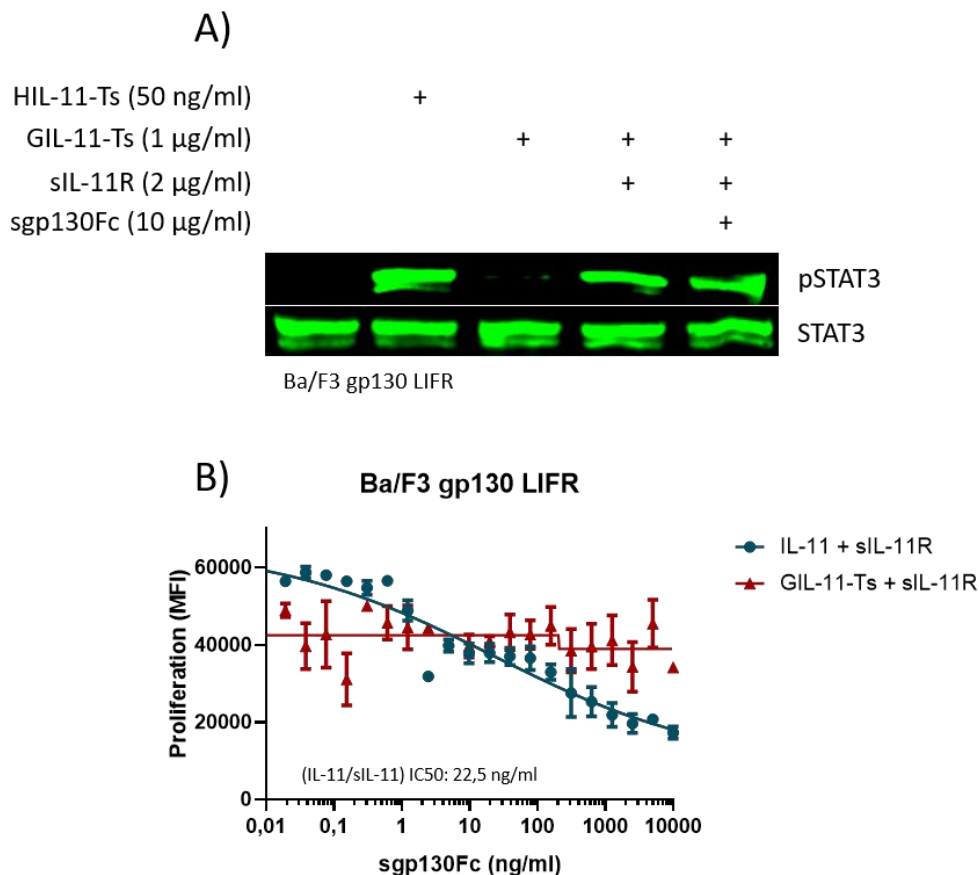


Abbildung 18: GIL-11-Ts Trans-Signaltransduktion lässt sich nicht durch sgp130Fc inhibieren.

Inhibierung des GIL-11-Ts/sIL-11R Komplexes durch sgp130Fc. **A)** STAT3-Aktivierung in Ba/F3 gp130 LIFR Zellen ohne und mit HIL-11-Ts (50 ng/ml), GIL-11-Ts (1 µg/ml), GIL-11-Ts (1 µg/ml):sIL-11R (2 µg/ml), GIL-11-Ts (1 µg/ml), GIL-11-Ts (1 µg/ml):sIL-11R (2 µg/ml):sgp130Fc (10 µg/ml) nach 15 min Stimulation. Gleiche Mengen an Protein wurden beladen (50 µg/Spur). **B)** Proliferation von Ba/F3 gp130 LIFR Zellen durch die Zugabe von konstanten Konzentrationen IL-11 (0,5 µg/ml):sIL-11R (1 µg/ml) oder GIL-11-Ts (0,5 µg/ml):sIL-11R (1 µg/ml) und zunehmende Konzentrationen sgp130-Fc (0,01-10.000 ng/ml). Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler wider. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus n=2 unabhängigen Experimenten.

Durch ausreichend hohe Konzentrationen von GIL-11-Ts:sIL-11R wurde sowohl im Stimulations- als auch im Proliferationsassay der Trans-Signaltransduktionsweg erzwungen. In beiden Experimenten war jedoch eine Inhibierung der Stimulation oder Proliferation mittels

sgp130Fc nicht möglich (Abbildung 18A, B). In Kontrast dazu inhibierte sgp130-Fc den IL-11:IL-11-Komplex zuverlässig mit einer IC50 von 22,5 ng/ml (Abbildung 18B).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Cytokimera durch den Austausch der Bindestelle-III im Vergleich zu den natürlichen Zytokinen (IL-6 bzw. IL11) nur noch sehr begrenzt die Signaltransduktion über den Trans-Signalweg initiieren. Darüber hinaus, lässt sich diese Trans-Signaltransduktion von GIL-11-Ts nicht durch sgp130Fc inhibieren. Es wird angenommen, dass auch die Trans-Signaltransduktion der anderen Cytokimera kaum durch sgp130Fc inhibiert werden kann.

4.3.3 IC7-Fc verbessert die Herzfunktionen nach einem Myokardinfarkt

IC7-Fc besitzt therapeutische Eigenschaften, die auch mit dem kardiovaskulären System assoziiert sind, daher sollte eine kardioprotektive oder kardioregenerative Wirkung des IC7-Fc auf einen Myokardinfarkt untersucht werden. Um einen AMI zu simulieren, wurden C57BL/6N Mäuse durch ein etabliertes I/R-Modell infarziert und die Herzfunktionen der mit IC7-Fc behandelten Gruppe mit der unbehandelten Gruppe verglichen.

Zu diesem Zweck wurden die linksventrikulären Funktionen der Versuchsmäuse eine Woche vor der Operation mittels Echokardiografie gemessen. Am Tag der I/R wurde IC7-Fc präoperativ *i.p.* injiziert. Einen Tag nach der I/R wurden die Tiere nochmals injiziert und eine Echokardiografie durchgeführt. Weitere Echokardiografien fanden eine und fünf Wochen nach der Operation statt (Abbildung 19).

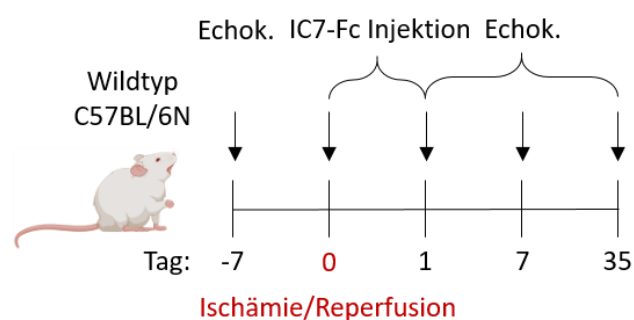


Abbildung 19: Schematische Darstellung des I/R-Versuchsprotokolls *in-vivo*.

Echokardiografie der linksventrikulären Funktionen an jeweils sechs C57BL/6N Mäusen. Jeweils 20 µg IC7-Fc oder PBS *i.p.* injiziert. Die Ischämie erfolgte 50 min unter geschlossenem Thorax.

Im Folgenden sind die Herzfunktionen vor und nach der Infarzierung für die mit IC7-Fc behandelte sowie unbehandelte Gruppe aufgeführt (Abbildung 20; Anhang Abbildung 26).

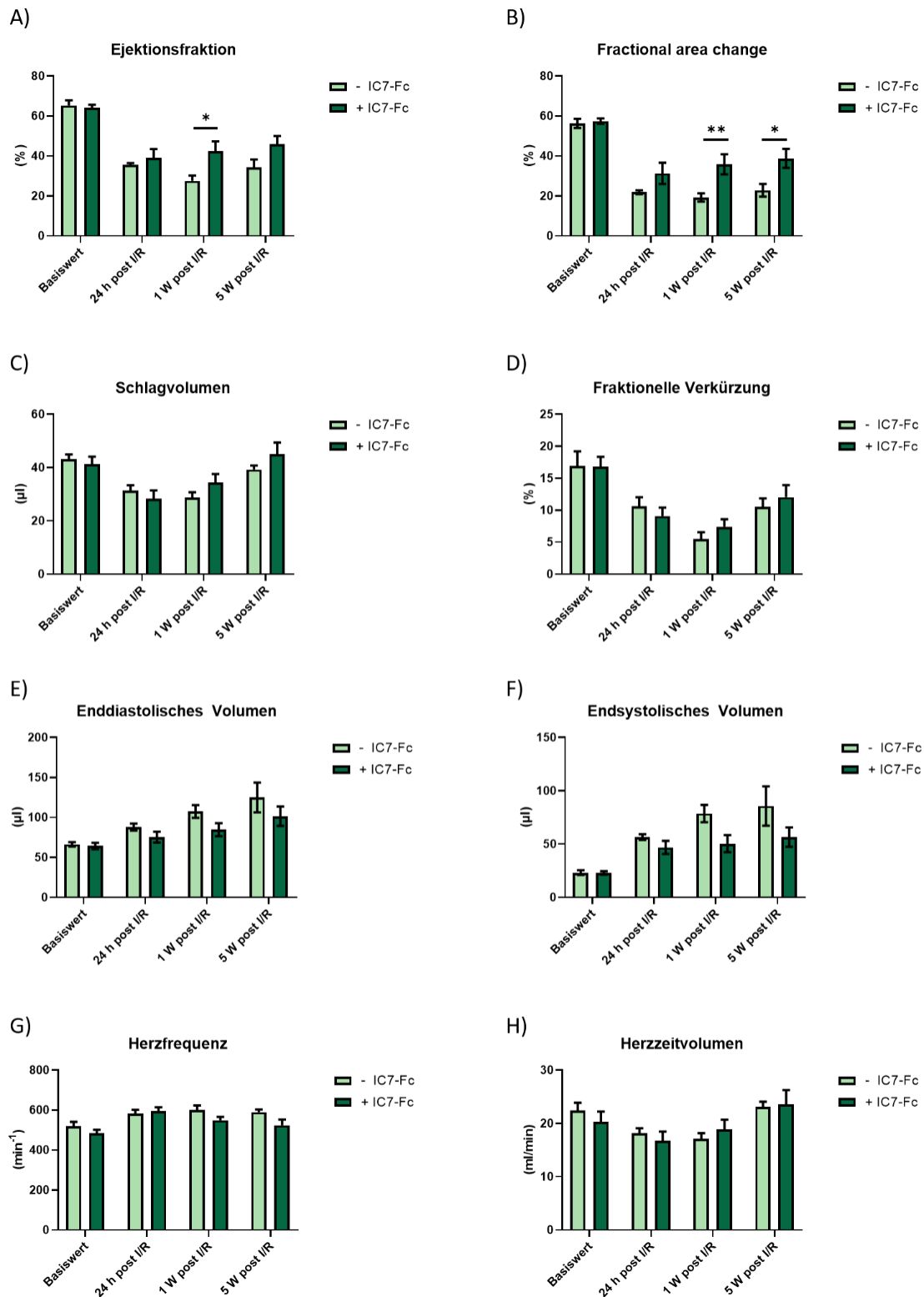


Abbildung 20: IC7-Fc verbessert die Herzfunktionen nach einem AMI.

Ischämie/Reperfusion erfolgte durch eine 50-minütige LAD Ligatur, gefolgt von der Reperfusion. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler wider. Statistische Auswertung durch *two-way ANOVA*, und einer Sidak *pos-hoc* Korrektur. Es wurden n=6 Tieren pro Gruppe im Alter von 8-12 Wochen infarziert. Ergebnisse der Echokardiografie vor eine Woche vor der I/R, 24 h, 1 W und 5 W post I/R von **A)** der Ejektionsfraktion (%); **B)** *Fractional area change* (%); **C)** Schlagvolumen (μl); **D)** Fraktionelle Verkürzung (%); **E)** Enddiastolisches Volumen (μl); **F)** Endsystolisches Volumen (μl); **G)** Herzfrequenz (min⁻¹); und **H)** Herzzeitvolumen (ml/min).

Nach der Infarzierung nahmen die Herzfunktionen generell deutlich ab. Die Ejektionsfraktion der behandelten Gruppe (42,3%) lag eine Woche nach der Infarzierung jedoch signifikant höher als die der unbehandelten Gruppe (27,5%). Zudem lag die *fractional are change* (FAC) eine Woche nach der I/R signifikant höher als die unbehandelte (35,8% im Vergleich zu 19,2%). Nach drei Wochen war der Unterschied ähnlich mit 38,8% im Vergleich zu 22,8% (Abbildung 20A,B). Im Hinblick auf das Schlagvolumen und die fraktionelle Verkürzung waren leichte Tendenzen einer Verbesserung nach einer und fünf Wochen zu erkennen (Abbildung 20C,D). Die enddiastolischen sowie endsystolischen Volumina waren nach der I/R erhöht. Die behandelte Gruppe zeigte hier jedoch eine tendenziell geringere Vergrößerung der Volumina (Abbildung 20E, F). Das Herzzeitvolumen schien unverändert (Abbildung 20H) und die Herzfrequenz der behandelten Gruppe war im Vergleich zur unbehandelten Gruppe tendenziell leicht erhöht nach einer und fünf Wochen (Abbildung 20G).

Um den Effekt des IC7-Fc auf Gewebeveränderungen und Kollagenbildung nach der I/R zu beurteilen wurden Paraffinschnitte fünf Wochen post-I/R entnommen und mittels Trichrom-Färbung gefärbt. Zu sehen ist eine enorme Vergrößerung des unbehandelten linken Ventrikels (LV) nach I/R. Im Kontrast dazu ist der LV des behandelten Myokardgewebes in dieser Ebene (1500 µm vom Apex aus) gerade noch erkennbar. Fibrotisches Areal ist beim unbehandelten Gewebe durchgängig um den LV herum erkennbar, aber auch das behandelte Gewebe ist deutlich vernarbt (Abbildung 21).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die IC7-Fc Administration unmittelbar vor und 24 h nach der I/R zu einer Verbesserung der Herzleistung führte und sich etwa eine Woche nach I/R bemerkbar machte. Die Verbesserung der Herzleistung zeigte sich in der Ejektionsfraktion sowie der FAC aber auch eine Verringerung der Infarktgröße wurde beobachtet (Abbildung 20; Abbildung 21; Anhang Abbildung 26).

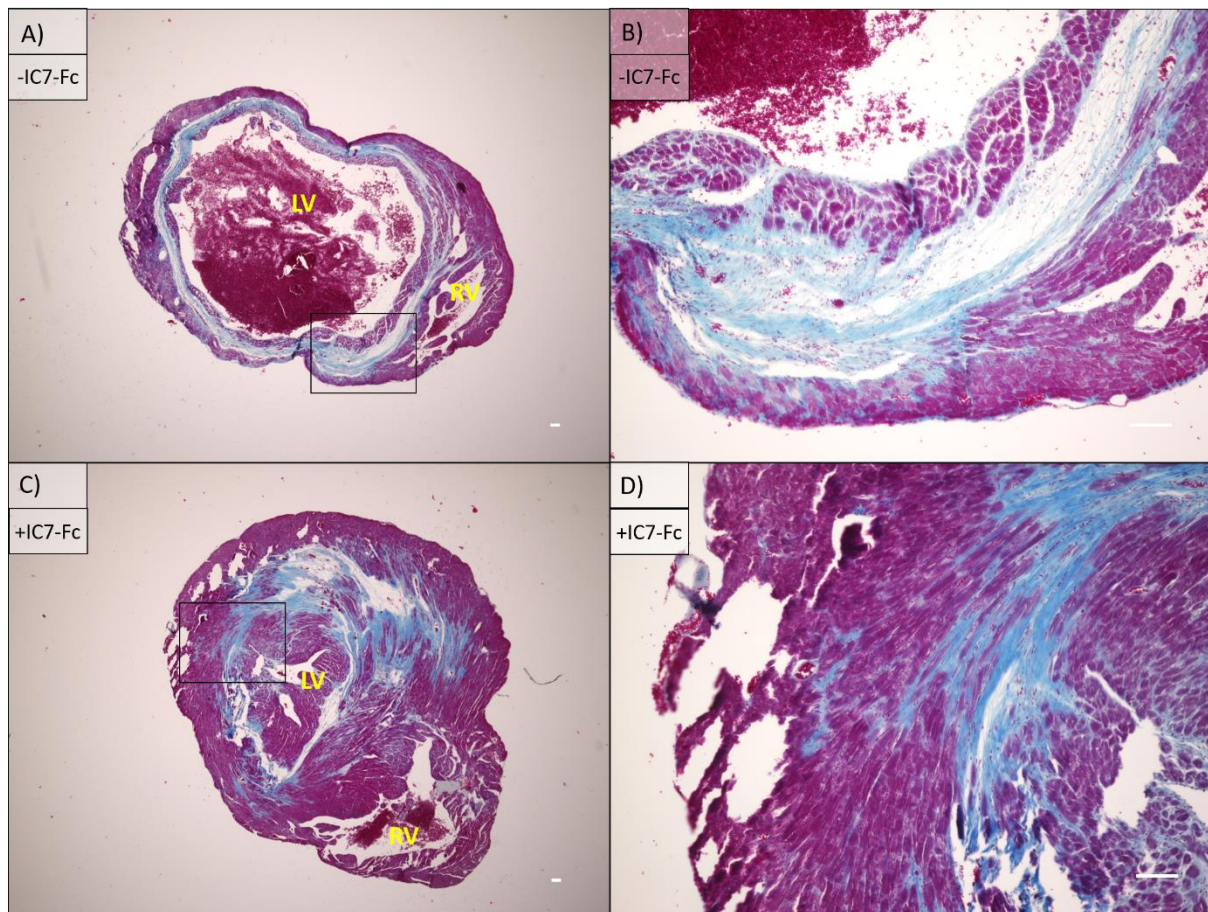


Abbildung 21: IC7-Fc vermindert durch I/R induzierte Infarktgröße.

Repräsentative, Trichrom-gefärbte Myokardgewebe fünf Wochen nach I/R im Längsschnitt. LR= linker Ventrikel; RV= rechter Ventrikel. Die Schnitte sind 7 μm dick und 1500 μm vom Apex aus entfernt. Die weiße Maßstableiste entspricht jeweils 100 μm **A)** Aufnahme eines unbehandelten Myokards in 2-facher Vergrößerung. **B)** Aufnahme eines unbehandelten Myokards in 10-facher Vergrößerung. **C)** Aufnahme eines mit IC7-Fc behandelten Myokards in 2-facher Vergrößerung. **D)** Aufnahme eines mit IC7-Fc behandelten Myokards in 10-facher Vergrößerung. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von n=3 infarzierten Herzen aus jede Gruppe.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden neuartige, synthetische, chimäre Zytokine generiert und Cytokimera genannt. Die Cytokimera benötigen Rezeptorkonstellationen zur Signalweiterleitung, die es in der Natur nach aktuellem Kenntnisstand nicht gibt. Zytokine sind nicht nur maßgeblich an der Regulation des Immunsystems beteiligt, sondern auch bei Verletzung und Regeneration, in der Hematopoese, embryonalen Entwicklung und der Fertilität involviert. Dysregulationen können unter anderem zu chronischen Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis oder chronische Darmerkrankungen führen (Heinrich *et al.*, 2003). Die Zytokine der IL-6 Familie besitzen, ähnliche Strukturen (Bravo & Heath, 2000; Deller *et al.*, 2000; Metcalfe *et al.*, 2020; Putoczki *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 1994; Somers *et al.*, 1997). Zusätzlich teilen alle Zytokine der IL-6 Familie die Verwendung von gp130, JAK und STAT, welches zu einer funktionellen Redundanz führt (Murakami *et al.*, 2019). Darüber hinaus binden nicht alle Zytokine der IL-6 Familie spezifisch an ihren Rezeptorkomplex, manche binden promiskuitiv an andere Rezeptorkomplexe der IL-6 Familie (Malik *et al.*, 1989; Mosley *et al.*, 1996; Schuster *et al.*, 2003). All diese Aspekte tragen zur Pleiotropie bei, was die zielgerichtete Verwendung der Zytokine als Therapeutikum erschwert. Trotz zahlreicher rekombinanter Zytokine wie beispielsweise IFN- β -1b oder IL-2, die als Therapeutikum zugelassen sind (zusammengefasst in (Tayal & Kalra, 2008)), sind erhebliche inflammatorische Nebenwirkungen wie Fieber und Grippe-ähnlichen Symptome nicht selten. Daher ist eine gezielte und spezifische Adressierung der Zielzellen von enormer Bedeutung.

5.1 Cytokimera sind biologisch aktiv und spezifisch

Die im Zuge dieser Arbeit generierten Cytokimera konnten wie im Abschnitt 4.2 beschrieben, in Expi293-Zellen exprimiert und mittels Affinitätschromatografie gereinigt werden. Die Fc-Domäne als Fusionsprotein zu verwenden ist in der Biotechnologie ein probates Mittel zur Reinigung mittels einer Protein-A Sepharose Matrix (Hober *et al.*, 2007). Zudem kann die daraus resultierende Dimerisierung Aviditätseffekte hervorrufen (Nagashima & Masuho, 2010) und die thermale Stabilität des Fusionsprotein erhöhen (Chen *et al.*, 2016). Im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung kann die Fc-Domäne eine bedeutende Steigerung der Serum-Halbwertszeit bewirken. Dies ist zum einen auf die Bindung zum neonatalen Fc-

Rezeptor (FcRn) in der Leber zurückzuführen, was vor Degradierung schützt, zum anderen kann die Steigerung des Molekulargewichtes eine renale Ausscheidung verhindern. Die Bindung der Fc-Domäne am FcRn wird auch als „*Recycling*“ bezeichnet. Hierbei werden IgG Antikörper initial über nicht spezifische Pinozytose in Endothelzellen aufgenommen, da der pH des Blutes keine Bindung des Fc an den FcRn erlaubt. Die durch Pinozytose aufgenommenen IgG Antikörper binden dann im sauren pH des Endosoms am FcRn. Nicht gebundene IgG Antikörper werden hierbei degradiert und am FcRn gebundene IgG Antikörper werden wieder in die Blutlaufbahn freigesetzt. Dieser Vorgang schützt vor Degradation der IgG in der Blutlaufbahn vor Proteasen und verlängert die Serumhalbwertszeit (Ghetie & Ward, 2000; Li *et al.*, 2017; Saxena & Wu, 2016). Eine Steigerung der Serumhalbwertszeit des Cytokimeras IC7 durch die Fusion einer Fc-Domäne wurde bereits im Mausmodell gezeigt (Findeisen *et al.*, 2019). Daher wurden auch die hier generierten Cytokimera als Fc-Fusionsproteine exprimiert. Allerdings war eine Expression des GIL-11 als Fc-Fusionsprotein nicht erfolgreich, da es sehr wahrscheinlich zu einer spontanen proteolytischen Spaltung in der Region zwischen GIL-11 und der Fc-Domäne kam. Auch bei GIL-6 und GIO-6 waren in geringerem Ausmaß bei ca. 35 kDa Nebenprodukte zu sehen, bei denen es sich vermutlich um Fc-Domänen handelt. Dies könnte auf eine im Vergleich zum IC7 geringere Stabilität des GIL-6-Fc und GIO-6-Fc zurückzuführen sein, wofür auch der Vergleich der Ausbeuten spricht. Hier sollte in Zukunft Sequenzvarianten optimiert werden. Hier sollte in Zukunft durch verschiedene Sequenzvarianten optimiert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Cytokimera biologisch aktiv und spezifisch sind. Die Tatsache, dass GIL-11-Ts trotz der niedrigen Reinheit nur geringfügig weniger aktiv war als die anderen Cytokimera, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass im Zuge der StrepTactinXT Affinitätschromatografie keine starke Fluktuation im pH-Wert stattfand. Bei der Protein-A Reinigung verschiebt sich der pH-Wert von neutral (Zellkulturüberstand) zu pH 3,25 (Elution), bis hin zu pH 11,0 (Tris-HCl), um dann wieder neutralisiert zu werden. Diese temporäre aber extreme chemische Bedingung können zur Denaturierung (Talley & Alexov, 2010), Veränderung der Faltung (Tanford & Roxby, 1972), sowie der Proteinstabilität (Onufriev *et al.*, 2001; Yang & Honig, 1993) und dem damit einhergehendem Aktivitätsverlust führen. Somit ist die Reinigung mit einer StrepTactinXT Affinitätschromatografie die schonendere Reinigungsart in Bezug auf die Aktivität.

Weiterhin konnte unter Berücksichtigung der hier limitierten, verwendeten Rezeptoren eine höhere Spezifität der Cytokimera gezeigt werden, da diese für die Signaltransduktion einen Rezeptor mehr benötigten als die ursprünglichen Zytokine. Es konnte auch eine Promiskuität bei IC7-Fc (gp130 IL-6R OSMR) und GIO-6-Fc (gp130 IL-6R LIFR) gezeigt werden. Bei GIO-6-Fc entspricht diese Kreuzreaktivität der Erwartung, da die Bindestelle-III des substituierten humanen OSM auch am humanen LIFR binden kann (Adrian-Segarra, Schindler, *et al.*, 2018). Bei IC7-Fc war diese Kreuzreaktivität eine neue Erkenntnis, da dies zuvor nicht in der Literatur beschrieben wurde. Die Tatsache, dass IC7-Fc jedoch nicht GIL-6-Fc Zellen aktiviert, die gp130 IL-6R OSMR exprimieren, deutet darauf hin, dass die Bindestelle-III des CNTF neben dem LIFR auch am OSMR bindet. Um dies nachzuweisen werden in Zukunft Ba/F3-Zellen, die gp130 CNTFR OSMR exprimieren, benötigt und auf eine Aktivierung über CNTF hin untersucht.

5.2 Signaltransduktionswege der Cytokimera

Es konnte gezeigt werden, dass die Cytokimera nicht nur biologisch aktiv sind, sondern auch, dass die biochemische Signaltransduktion wie erwartet über den JAK/STAT Signalweg und den MAPK/ERK Signalweg verläuft. Ob und in welcher Intensität noch weitere Signalwege wie PI3K/AKT oder NF- κ B-Signalweg involviert sind, muss untersucht werden. Auch in wie weit andere Transkriptionsfaktoren, insbesondere STAT1 und STAT5 durch die Cytokimera aktiviert werden, sollte untersucht und mit den natürlichen Zytokinen verglichen werden.

Alle hier untersuchten Cytokimera sind mit Ausnahme von GIO-6-Fc kaum in der Lage den Trans-Signaltransduktionsweg zu initiieren. GIO-6-Fc ist darüber hinaus auch bei höheren Konzentrationen nicht in der Lage die Signalweiterleitung über den Trans-Weg zu vermitteln. Allerdings muss erwähnt werden, dass GIO-6-Fc zusammen mit sIL-6R nur auf Ba/F3 gp130 LIFR Zellen untersucht wurde, wobei der LIFR nicht der primär bevorzugte Rezeptor des GIO-6-Fc ist. Eine Analyse des GIO-6-Fc:sIL-6R Komplex mit gp130 OSMR exprimierenden Ba/F3-Zellen sollte folgen. Die fehlende Fähigkeit der Cytokimera, die Signalweiterleitung potent über den Trans-Weg zu vermitteln ist insofern verwunderlich, da sich der Austausch der Regionen auf den Bereich der Bindestelle-III beschränkt und nicht in räumlicher Nähe zur Bindestelle-I liegt. Die Eigenschaft der Moleküle zwischen den membrangebundenen und dem löslichen alpha-Rezeptor zu unterscheiden, könnte also durch die Veränderung im Bereich der

Bindestelle-III beeinflusst werden. Dieser Zusammenhang wurde in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Ein Erklärungsansatz für die neu generierten Cytokimera, könnte sein, dass Regionen von Zytokinen substituiert wurden, die keinen alpha-Rezeptor benötigen (OSM, LIF), und somit keine Trans-Signaltransduktion vermitteln. Allerdings trifft das im Fall des IC7-Fc nicht zu, da hier CNTF in IL-6 substituiert wurde und beide ihren alpha-Rezeptor benötigen. Es scheint also wahrscheinlicher, dass die Veränderung der Raumstruktur im Bereich der Bindestelle-III eine Konformationsänderung verursacht, die sich über den ausgetauschten Bereich hinweg erstreckt. Um dies genauer zu erforschen, sollte die tatsächliche Struktur der Cytokimera gelöst werden, die sich von der durch Phyre2 vorhergesagten Struktur unterscheiden kann. Infolgedessen, wäre ein Vergleich mit vIL-6 interessant, da vIL-6 eine ähnliche Struktur aufweist wie die natürlichen Zytokine aber in Kontrast zu den Cytokimera keinen alpha-Rezeptor zur Signaltransduktion benötigt. vIL-6 kann zwar ohne den alpha-Rezeptor an gp130 binden, allerdings mit einer 1000-fach niedrigeren Affinität im Vergleich zum humanen IL-6:sIL-6R-Komplex gegenüber gp130 (Suthaus *et al.*, 2011). Auch die Cytokimera scheinen im Komplex mit dem löslichen alpha-Rezeptor eine Affinität zum gp130 zu entwickeln, allerdings viel geringer als der natürliche IL-6:sIL-6R-Komplex gegenüber gp130. Eine schematische Zusammenfassung der Signaltransduktionswege ist in Abbildung 22 dargestellt.

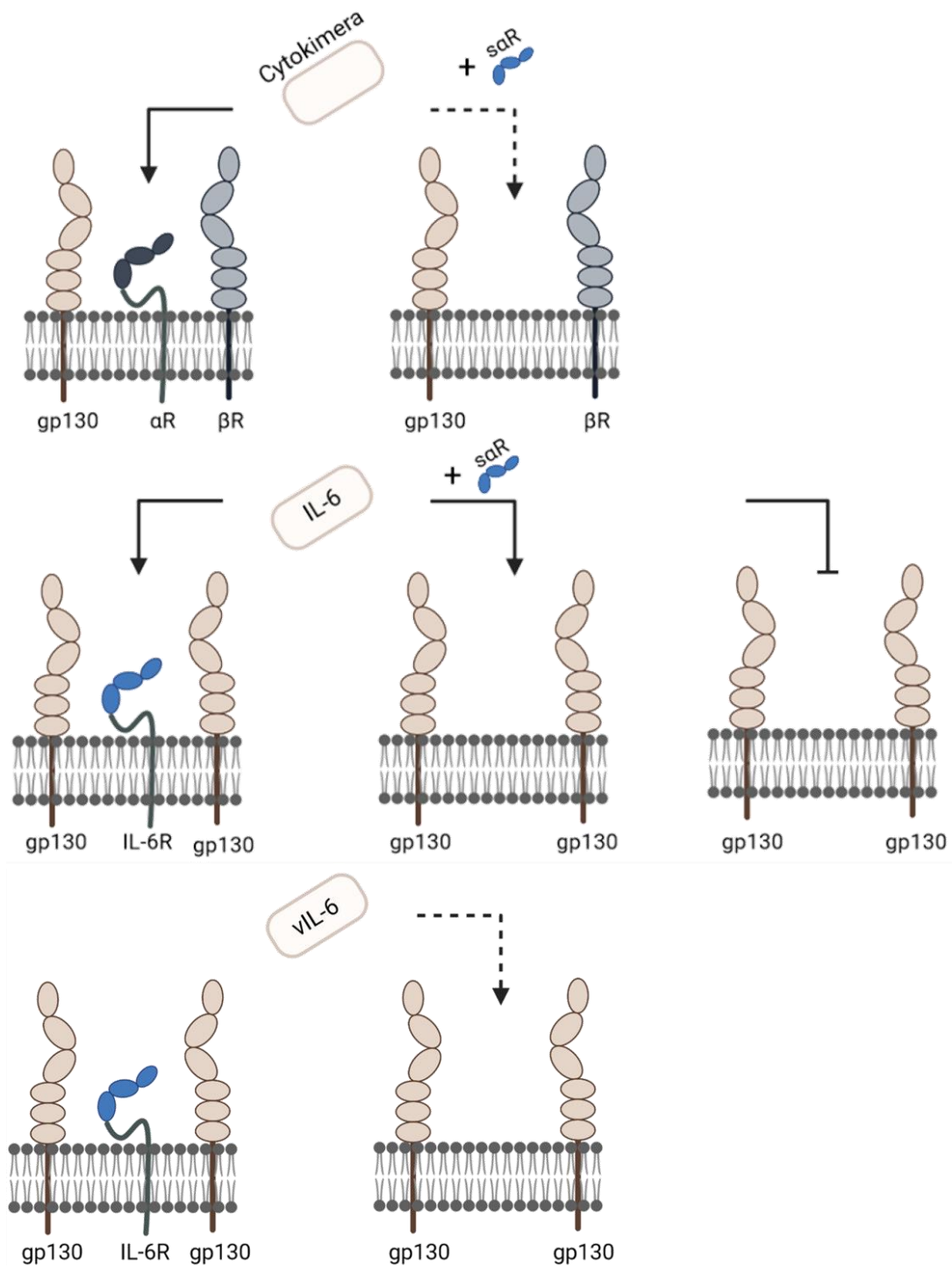


Abbildung 22: Vergleich der Signaltransduktionswege der Cytokimera, IL-6 und vIL6.

Cytokimera vermitteln die klassische Signaltransduktion und nur schwach über den Trans-Weg. αR steht für IL-6R oder IL-11R. αR steht für den löslichen IL-6R bzw IL-11R. βR steht für OSMR oder LIFR. IL-6 kann sowohl die klassische als auch die Trans-Signaltransduktion, kann aber kein Signal ohne den alpha-Rezeptor weiterleiten. Virales IL-6 kann alle Zellen aktivieren, die gp130 haben aber mit einer geringeren Affinität im Vergleich zu IL-6:sIL-6R. Bild erstellt mit BioRender.

Um die Signalwege und die daraus resultierenden Effekte der Cytokimera genauer zu charakterisieren, sollte eine Transkriptomanalyse folgen. Hierbei könnten zunächst Ba/F3 Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren dienen. Sowohl die Cytokimera, als auch LIF und OSM initiieren eine Hetero-Dimerisierung der Signal-transduzierenden Rezeptoren (LIFR und gp130 bzw. OSMR und gp130), während IL-6 und IL-11 jeweils eine Homo-Dimerisierung der gp130 Rezeptoren hervorrufen. Es ist daher zu erwarten, dass die Cytokimera hierbei eine ähnliche Signatur wie LIF oder OSM aufweisen, da sowohl der IL-6R als auch der IL-11R nicht an der Signaltransduktion der intrazellulären Domänen beteiligt ist (Kishimoto *et al.*, 1992).

5.3 Einfluss des IC7-Fc auf Myokardinfarkt

Es konnte gezeigt werden, dass IC7-Fc die Herzfunktionen nach etwa einer Woche verbessert und die Infarktgröße verringert. Der genaue Wirkmechanismus muss jedoch noch aufgeklärt werden. Hierbei gibt es verschiedene Ansätze, die zu verfolgen sind.

Regeneration über den Hippo-YAP-Signalweg:

Der Hippo-YAP-Signalweg ist unter anderem zuständig für die Modulation der Organgröße und -Regeneration (Moya & Halder, 2019). In den vergangenen Jahren häufen sich die Hinweise, dass der Hippo-YAP-Signalweg im kausalem Zusammenhang mit I/R-bedingtem Schäden des Myokards steht (Abbildung 23) (Chen *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2019). YAP1 kann eine *optic atrophy 1* (OPA-1) vermittelte Fusion der Mitochondrien induzieren was zu einer Homöostase der Mitochondrien führt und eine erhöhte Widerstandskraft gegen hypoxischen Stress zur Folge hat (Ma & Dong, 2019). Mitochondrien Fusion kann I/R-induzierten oxidativen Stress entgegenwirken, welcher besonders nach der Reperfusion stattfindet (Anzell *et al.*, 2018). Ein heterozygoter Kardiomyozyten-spezifischer *Knockout* des YAP1 verstärkt die Apoptose der Kardiomyozyten, vergrößert die Infarktgröße und verschlechtert die Herzfunktionen nach einer I/R, während eine YAP1 Überexpression den Schaden im Mausmodell verringert (Lin *et al.*, 2014).

Es ist bekannt, dass gp130 beispielsweise über LIF den Hippo-YAP-Signalweg aktiviert (Halder *et al.*, 2022). Darüber hinaus wurde ebenfalls gezeigt, dass IC7-Fc nach Injektion im Mausmodell die YAP1 mRNA im *Musculus gastrocnemius* ansteigen lässt (Findeisen *et al.*, 2019). Somit scheint eine Hippo-YAP-vermittelte Regeneration des I/R-bedingten Schadens

nach Verabreichung von IC7-Fc wahrscheinlich. Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass von Makrophagen sezerniertes OSM über den OSMR der Kardiomyozyten mittels des Transkriptionsfaktors (*yes-associated protein*) YAP zur Proliferation der Kardiomyozyten und somit zum kardialen Heilung beiträgt (Li *et al.*, 2020). Die Tatsache, dass in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass IC7-Fc das Signal auch über den OSMR weiterleiten kann, deutet ebenfalls auf eine Hippo-YAP-vermittelte Regeneration des I/R-bedingten Schadens hin. Daher sollten weiterführende Untersuchungen über einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Hippo-YAP-Signalweg, der Administration von IC7-Fc und einem AMI stattfinden.

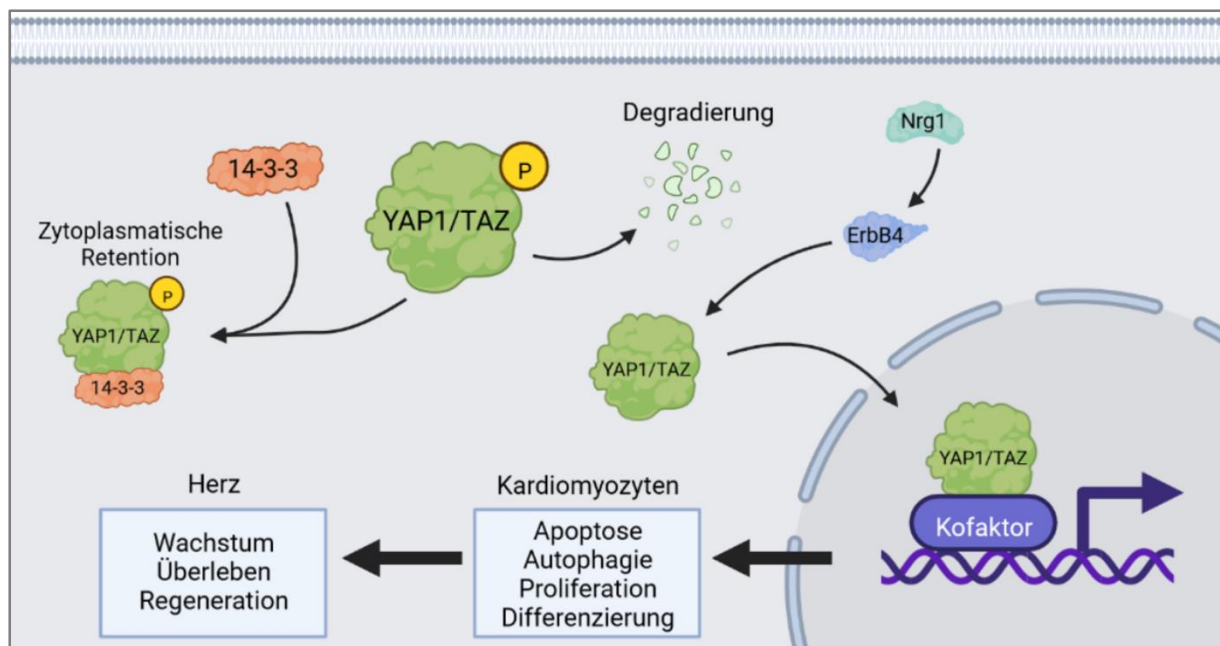


Abbildung 23: Hippo-YAP1/TAZ Signalweg in der molekularen Kardiologie.

Phosphorylierter YAP1/TAZ-Komplex wird intrazellulär degradiert. Die Bindung des Komplexes an 14-3-3 führt zur zytoplasmatischen Retention. Neuregulin 1 (Nrg1) aktiviertes ErbB4 interagiert mit YAP und induziert den Hippo Signalweg. Infolgedessen, findet eine Translokation des dephosphorylierten Komplexes in den Nukleus statt, wo es als Transkriptionsfaktor schließlich zur Regeneration des Myokardiums führt (Chen *et al.*, 2020; Haskins *et al.*, 2014).

Makrophagen Polarisation M1/M2:

Monozyten und Makrophagen sind ein wesentlicher Bestandteil der inflammatorischen Antwort auf eine Verletzung aber auch der darauf folgenden Wundheilung einiger Organe, einschließlich des Herzens (Peet *et al.*, 2020). Zelltod in Folge eines AMI führt zur Freisetzung von endogenen *damage-associated molecular patterns* (DAMPs), welche dann vom angeborenen Immunsystem erkannt werden können. Das wiederum löst eine Kaskade aus die zunächst zur Freisetzung von Chemokinen sowie proinflammatorischer Zytokine und

folglich zur Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen führt (Peet *et al.*, 2020; Prabhu & Frangogiannis, 2016). Zuerst infiltrieren Neutrophile das Herz, gefolgt von proinflammatorischen Monozyten und Makrophagen (M1), die dort akkumulieren und zu einer überzogenen Inflammation führen einhergehend mit einer Phagozytose der Zelltrümmer. Die Inflammation wird schließlich durch anti-inflammatorische Monozyten und Makrophagen (M2) aufgelöst, welche für die Remodellierung des Herzens und der kollagenreichen Vernarbung zuständig sind (Montecucco *et al.*, 2017; Nahrendorf *et al.*, 2007) (Abbildung 24). Eine Strategie die Herzleistung nach einem AMI zu verbessern, kann also darin bestehen, die Population der im Herzen infiltrierten M1 Makrophage in Richtung M2 zu verschieben.

Kürzlich wurde gezeigt, dass genau diese Verschiebung beziehungsweise die Polarisierung der naiven M0 zu anti-inflammatorische M2 Makrophagen durch IGF-1 in eine massiven Verbesserung der Herzleistung nach einem AMI resultierte (Heinen *et al.*, 2019). Weiterhin ist bekannt, dass IL-6 ebenfalls zu einer M2 Polarisierung der Makrophagen führt (Chen *et al.*, 2018). Darüber hinaus wird ebenfalls der LIFR auf Makrophagen exprimiert (Hamelin-Morrisette *et al.*, 2020). Da gp130 auf allen Zellen exprimiert wird, erfüllen Makrophagen die Voraussetzungen, durch IC7-Fc stimuliert und infolgedessen polarisiert zu werden. Darüber hinaus spricht auch die Tatsache, dass die Verbesserungen der Herzfunktionen erst nach einer Woche und fünf Wochen zu erkennen sind, für eine Beteiligung der M2 Makrophagen. Diese sind erst drei Tage post I/R im Herz zu detektieren, wobei der Maximalwert nach fünf Tagen erreicht ist (Montecucco *et al.*, 2017). Daher sollten weiterführende Analysen in Hinblick auf eine mögliche, IC7-Fc induzierte M2 Makrophagen Polarisation stattfinden.

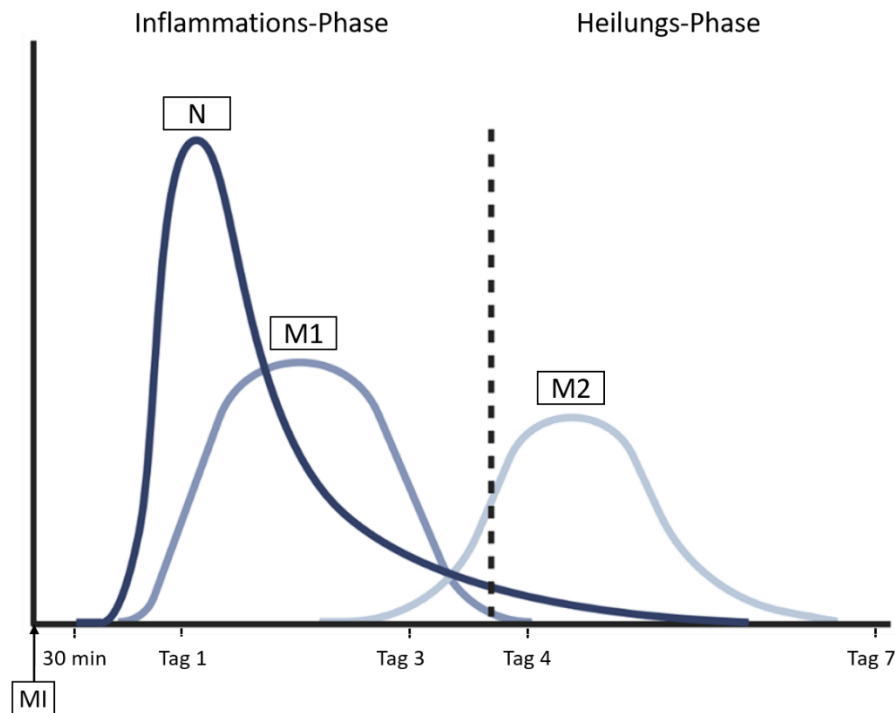


Abbildung 24: Immunzellinfiltration des Herzen nach einem Myokard Infarkt.

Zwei Phasen der Immunantwort nach einem Myokard Infarkt (MI). Nach 30 min beginnen Neutrophile (N) das Herz zu infiltrieren, gefolgt von proinflammatorischen Makrophagen (M1) in der Inflammationsphase. Schließlich sind antiinflammatorische Makrophagen (M2) dominant präsentiert in der Heilungsphase (Montecucco *et al.*, 2017). Die Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

Systematischer IL6R-Knockout und alternative Wege:

Da IC7-Fc zwangsläufig den IL-6R zur Signalweiterleitung benötigt und globale IL-6R^{-/-} überlebensfähig sind, könnten Mauslinien, die zelltypspezifisch IL-6R^{-/-} sind, dazu beitragen, die genauen Zielzellen des IC7 zu ermitteln und somit zur Auflösung des Wirkmechanismus beitragen (McFarland-Mancini *et al.*, 2010). So könnten beispielsweise mit Hilfe der Cre-Lox-Technologie Mauslinien generiert werden, die Hepatozyten-spezifisch homozygot IL-6R defizient sind (IL-6R^{-/-} x Alb-cre) (Postic *et al.*, 1999). Sollte die kardioregenerative Wirkung des IC7 in dieser Mauslinie verloren gehen, wäre davon auszugehen, dass die Hepatozyten zumindest eine dominante Rolle im Wirkmechanismus spielen. Da eine Involvierung von Immunzellen wahrscheinlicher als eine Beteiligung der Hepatozyten scheint, wäre der erste Schritt die Generierung einer Mauslinie mit IL-6R^{-/-} für myeloische Zellen (IL-6R^{-/-} x LysM-cre) (Clausen *et al.*, 1999). Da hier Monozyten, Makrophagen und Granulozyten eingeschlossen sind, könnte eine anschließende weitere Eingrenzung erfolgen bis die Zielzellen ermittelt sind.

Untersuchungen von Wirkmechanismen anhand von *knockouts* bestimmter Gene in Mäusen sind der Goldstandard aktueller Forschung. Der Nachteil dieser Methode ist allerdings die lange Dauer bis zur Generierung und vollendeter Zucht dieser Tiere.

Ein alternativer Weg zur Ermittlung der Zielzellen wäre mit Hilfe von *Magnetic beads* bestimmte Zelltypen aus der Maus zu isolieren, diese mit IC7 zu stimulieren und die erfolgte Signaltransduktion über beispielsweise den JAK/STAT Signaltransduktionsweg zu analysieren. Des Weiteren, könnten Organe aus Tieren isoliert werden, die zuvor mit IC7 behandelt wurden und diese mittels der Durchflusszytometrie durch intrazelluläre Phospho-STAT3-Färbung mit zelltypspezifischen Markern nach erfolgter Signaltransduktion analysiert werden. Die letzten beiden Methoden wären im Vergleich zur Generierung der zelltypspezifischen IL-6R KO Mäuse schnell umsetzbar. Allerdings bilden diese Methoden nicht die gesamte Komplexität, die *in-vivo* beispielsweise durch Zell-Zell-Interaktionen stattfindet, ab. Dennoch könnten sie einen ersten Anhaltspunkt liefern, welcher den Aufwand minimiert, der durch die Cre-Lox-Technologie folgen könnte.

Immunzellinfiltration:

Das Herz wird nach einer I/R hauptsächlich zunächst von Neutrophilen infiltriert, gefolgt von M1 Makrophagen und schließlich von M2 Makrophagen (Montecucco *et al.*, 2017; Thackeray & Bengel, 2018) (Abbildung 24). Da viele Immunzellen den IL-6R exprimieren, ist es wahrscheinlich, dass mindestens eines dieser Zelltypen durch IC7-Fc stimuliert wird und infolgedessen stärker reagiert. Auch die Infiltration der Immunzellen in das Herz könnte durch IC7-Fc beeinflusst werden. Um eine mögliche Immunzellinfiltration zu untersuchen, könnte das Herz nach der I/R und nach IC7-Fc Injektion mittels Durchflusszytometrie untersucht und mit der unbehandelten Gruppe verglichen werden (Kitano *et al.*, 2014). Zudem bieten histologische Schnitte zusätzliche Information über die genaue Lokalität der möglichen Infiltration. In einer kürzlich durchgeführten klinischen Studie, wurde gezeigt dass die Inhibition des IL-6 Signals durch Tocilizumab die Anzahl der Neutrophilen im Blut, die Infarktgröße und den Troponin-T Spiegel bei STEMI-Patienten verringerte (Huse *et al.*, 2022).

Wenn davon ausgegangen wird, dass die Inhibition des IL-6 Signales durch Tocilizumab zu einer geringeren Anzahl von Neutrophilen in der Blutzirkulation führt, könnte IC7-Fc, welches

den klassischen IL-6 Signalweg aktiviert, den gegenteiligen Weg initiieren. Eine Messung der Immunzellen allgemein aber insbesondere der Neutrophile in der Blutzirkulation aber auch als Infiltrat im Herzen nach IC7-Fc Behandlung sollte daher dringend erfolgen.

Effekt durch OSMR:

Wie bereits erwähnt, zeigt OSM kardioprotektive Eigenschaften. Die Tatsache, dass der OSMR auf kardialen Endothelzellen stark exprimiert wird, macht es zu einem Ziel gegen kardiovaskulären Schaden (Stawski & Trojanowska, 2019). Die im Zuge eines Myokardinfarktes im Herz infiltrierten Makrophagen sezernieren OSM. Das sezernierte OSM führt dabei zur Inhibierung einer Fibroblasten Aktivierung (Abe *et al.*, 2019). Darüber hinaus, wurde kürzlich gezeigt, dass das sezernierte OSM über den OSMR der Kardiomyozyten mittels des Transkriptionsfaktors (*yes-associated protein*) YAP zur Proliferation der Kardiomyozyten und somit zum kardialen Heilung beiträgt (Li *et al.*, 2020).

Da im Zuge dieser Arbeit gezeigt wurde, dass IC7-Fc eine Signaltransduktion über die Rezeptorkonstellation gp130 IL-6R OSMR vermitteln kann, ist ein Effekt über den OSMR statt LIFR nicht auszuschließen. Eine Möglichkeit dies zu überprüfen, könnte darin bestehen IC7-Fc in OSMR defiziente Mauslinien zu überprüfen. Einfacher wäre es jedoch die kardioregenerative Eigenschaft des IC7-Fc mit GIL-6 zu vergleichen, da GIL-6 nach aktuellem Kenntnisstand gp130 IL-6R LIFR zur Aktivierung benötigt, nicht jedoch gp130 IL-6R OSMR. Eine Untersuchung der anderen hier generierten Cytokimera im Hinblick auf einen möglichen Einfluss auf eine I/R sollte daher folgen.

Optimierung der Behandlung:

Ein weiterer Aspekt ist die Optimierung der Effektstärke, welcher durch die Behandlung hervorgerufen wird. In Anbetracht der Tatsache, dass das ischämische Herz für 50 min einer starken Hypoxie ausgesetzt wird, ist die Reduktion des Sauerstoffbedarfs anzustreben, um Ischämie-induzierten und Hypoxie-bedingten Schaden zu minimieren. In klinischen Studien wurde gezeigt, dass die Administration von Trimetazidine (TMZ) während eines AMI die Herzfunktionen verbessert. TMZ ist ein metabolischer Wirkstoff, der ischämisch bedingten

Schaden reduziert, indem es den Sauerstoffbedarf der Zellen reduziert. Der Wirkmechanismus beruht darauf, dass der Metabolismus die stark sauerstoffabhängige Fettsäureoxidation in Richtung der weniger stark sauerstoffabhängigen Glykolyse verschoben wird (Shu *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2018). Die IC7-Fc Injektionen wurden in dieser Arbeit jeweils präemptiv und postoperativ verabreicht. IC7-Fc regt den Metabolismus an und erhöht dadurch den Sauerstoffverbrauch deutlich (Findeisen *et al.*, 2019). In Anbetracht dieser Tatsache, sollte eine ausschließlich postoperative aber repetitive Administration des IC7-Fc nach Reoxygenierung des Herzens vorteilhafter sein als eine prä- und postoperative Administration und möglicher Weise die Effektstärke der Behandlung weiter erhöhen.

Eine weitere Möglichkeit die Effektstärke der IC7-Fc Behandlung weiter zu erhöhen, könnte darin bestehen, simultan IC7-Fc und sgp130Fc zu verabreichen. Wie bereits erwähnt, werden dem klassischen Signaltransduktionsweg eher anti-inflammatorische und dem Trans-Signaltransduktionsweg eher proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Eine selektive Inhibierung des Trans-Signaltransduktionswegs in der Ratte durch sgp130Fc hat sich kürzlich gegenüber einem Pan-Antagonismus mittels Tocilizumab bei einem AMI als überlegen erwiesen (George *et al.*, 2021). In Anbetracht der Tatsache, dass IC7-Fc nun kaum in der Lage ist, den Trans-Signaltransduktionsweg zu vermitteln, könnte dies nicht nur ein Bestandteil des kardioregenerativen Wirkmechanismus sein, sondern könnte eine neue Möglichkeit bieten die Behandlung synergistisch zu optimieren. Die Verabreichung von sgp130-Fc könnte eine übersteuerte Inflammation durch die Inhibition des Trans-Signalweg reduzieren, welches durch den endogenen Anstieg des IL-6:sIL-6R ausgeht. Gleichzeitig könnte IC7-Fc, welches fast ausschließlich über den klassischen Signaltransduktionsweg agiert, die regenerative Wirkung des IL-6-Signalwegs spezifisch entfalten. Insofern sollte nach Aufklärung des IC7-Fc Wirkmechanismus eine simultane Behandlung mit sgp130-Fc in Erwägung gezogen werden.

Das Designer-Protein sgp130-Fc inhibiert den IL-6:sIL6R-Komplex ebenso wie den IL-11:sIL11R-Komplex. Eine Variante des sgp130Fc Q113F ist in der Lage, selektiv nur den IL-6 Trans-Signalweg zu inhibieren (Lokau *et al.*, 2021). Zudem gibt es auch eine weitere Variante, cs-130Fc genannt. Dies ist ein Fusionsprotein, bestehend aus den ersten drei extrazellulären Domänen des gp130, VHH6 und eines Fc-Teils (Jin *et al.*, 2022). Während IL-6 sowohl positive als auch negative Eigenschaften auf einen AMI zeigt, scheint sich IL-11 ausschließlich positiv auszuwirken, indem es einer AMI-induzierten Fibrose entgegenwirkt (Obana *et al.*, 2010). Vor

diesem Hintergrund, könnte eine spezifische Inhibierung des IL-6 Trans-Signalweges mit modifizierten Varianten des sgp130-Fc gegenüber der ursprünglichen Variante als Überlegen darstellen. Allerdings sind hier Speziespezifitäten zwischen Maus und Mensch zu beachten.

6 Ausblick

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurden neue Cytokimera generiert und charakterisiert, die neuartige, nicht natürliche Rezeptorkonstellationen aktivieren. Die Signaltransduktion der Cytokimera über den JAK/STAT aber auch über den MAP/ERK Signalweg wurde untersucht. Weitergehende Untersuchungen anderer Signalwege wie der PI3K/AKT- oder NF- κ B-Signalweg sollten fortgeführt werden. Ebenso die Aktivierung der anderen STAT Transkriptionsfaktoren. Auch sollte GIL-11-Ts auch als Fc-Fusionsprotein exprimiert werden.

Da sich während dieser Arbeit herausgestellt hat, dass die Bindestelle-III des IC7 auch an den OSMR bindet, ist es naheliegend, dass auch die Bindestelle-III des CNTF an den OSMR bindet. Daher sollte diese Hypothese durch die Verwendung von gp130 CNTFR OSMR exprimierenden Zellen nachfolgend analysiert werden.

Da sich während dieser Arbeit gezeigt hat, dass die Cytokimera kaum den Trans-Signalweg vermitteln können, sollten weiterführende biophysikalische Studien beispielsweise mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) folgen, um den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuklären. Auch sollte in diesem Kontext die Fähigkeit des GIO-6, den Trans-Signalweg einzuleiten, im Komplex mit sIL-6R und mit Ba/F3-Zellen folgen, die gp130 OSMR exprimieren. Dies wurde bisher lediglich mit Ba/F3 gp130 LIFR exprimierenden Zellen untersucht.

Um die Bindestellen der Cytokimera genauer lokalisieren zu können, könnten die IIIA-, IIIB- und IIIC-Schleifen einzeln ausgetauscht und anschließend Mutagenese-Studien durchgeführt werden, um die exakten Aminosäuren zu identifizieren. Biophysikalische Bindungsstudien der Cytokimera zu den jeweiligen Rezeptoren sollten erfolgen. Langfristig sollte auch die Strukturauflösung der Cytokimera erfolgen.

Um die Effekte der Cytokimera genauer zu charakterisieren, sollte eine Transkriptomanalyse folgen. Hierbei könnten zunächst Ba/F3 Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren dienen,

die mit den Cytokimera stimuliert wurden. Anschließend könnten die Signaturen mit denen der ursprünglichen Zytokine verglichen werden.

Da sich während dieser Studie gezeigt hat, dass eine IC7-Fc Behandlung die Herzfunktionen nach der I/R verbessert und die Infarktgröße verkleinert, sollte der genaue Mechanismus aufgeklärt werden. Im Fokus dieser Aufklärung steht die Untersuchung einer möglichen Beteiligung des YAP-Hippo Signalwegs an der Verbesserung der Herzfunktionen. Ebenfalls ist eine mögliche IC7 induzierte Polarisation der Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2 zu analysieren. Des Weiteren, sollten alle potentiellen Zelltypen identifiziert werden, die durch IC7-Fc stimuliert werden und die Auswirkung des IC7 auf die Immunzellpopulation in der Blutzirkulation aber auch eine Immuninfiltration des Myokards sollte erfolgen.

Die Verbesserung der Herzfunktionen sollte weiter optimiert werden. Daher ist eine simultane Administration des IC7-Fc mit der selektiven Inhibition des Trans-Signalwegs durch sgp130-Fc anzustreben. Ebenfalls sollten weitere sgp130 Varianten in Kombination mit IC7-Fc auf eine mögliche Synergie untersucht und charakterisiert werden. Die Optimierung könnte darin bestehen, IC7-Fc ausschließlich postoperativ und repetitiv zu verabreichen.

Die in dieser Arbeit generierten Cytokimera sollten zum einen auf eine mögliche Verbesserung der Herzfunktionen nach einem I/R untersucht werden. Zum anderen sollten diese Cytokimera, einschließlich IC7-Fc auch auf andere Krankheitsmodelle getestet und evaluiert werden, da sie unter anderem auf Grund ihrer Spezifität großes Potential in einer Vielzahl therapeutischer Anwendungen haben. Da beispielsweise Hepatozyten sowohl den IL-6R, als auch den LIFR exprimieren, könnten diese durch IC7-Fc bzw. GIL-6-Fc stimuliert werden. Da die Cytokimera den JAK/STAT Signalweg aktivieren und dadurch zur Zellproliferation führen, wäre ein regenerativer Effekt auf die Leber denkbar. GIL-6-Fc und auch die anderen Cytokimera sind vielversprechende Kandidaten zur Behandlung von Diabetes-Typ-II oder Übergewicht, da IC7-Fc bereits vielversprechende Effekte auf Patienten mit diesen Krankheitsbildern gezeigt hat (Findeisen *et al.*, 2019).

7 Zusammenfassung

Ischämische Herzerkrankungen sind aktuell die häufigste Todesursache weltweit. Die Entwicklung neuer Therapeutika sowie ein besseres Verständnis der Heilungsprozesse nach einem Myokardinfarkt (MI) sind daher dringend erforderlich. *Cytokine Chimera* (Cytokimera) bieten hier neue Möglichkeiten, da sie mehr Rezeptoren zur Signaltransduktion benötigen und dadurch selektiver und wahrscheinlich weniger pleiotrop sind als die natürlichen Zytokine.

Im Zuge dieser Arbeit wurden drei neue Cytokimera (GIL-6, GIO-6 und GIL-11) entwickelt, die Rezeptorkonstellationen zur Signaltransduktion benötigen, welche so in der Natur nicht vorkommen. Hierzu wurden jeweils die Bindestelle-III von Zytokine der IL-6 Familie strukturbasiert untereinander ausgetauscht. Die neuen Cytokimera und die bereits bekannte Chimäre IC7 wurden exprimiert, gereinigt und charakterisiert. Alle Chimären mit Ausnahme von GIL-11-Ts wurden als Fc-Fusionsproteine exprimiert und über eine Protein-A Affinitätschromatographie gereinigt. GIL-11-Ts, wurde als TwinStrep-Fusion über eine StrepTactinXT Affinitätschromatographie gereinigt. Es konnte durch Proliferations- als auch Stimulationsassay gezeigt werden, dass die Cytokimera biologisch aktiv sind (EC50 zwischen 10-50 pM). Darüber hinaus, sind sie selektiver als die ursprünglichen Zytokine, da sie zur Signalweiterleitung mindestens einen weiteren Rezeptor benötigen. Ferner, konnte gezeigt werden, dass diese den Signalweg konzentrationsabhängig über den JAK/STAT sowie den MAPK/ERK weiterleiten. Die neu generierten Cytokimera und das bekannte IC7 vermitteln kaum den Trans-Signaltransduktionsweg, was neue Möglichkeiten eröffnet. Darüber hinaus, bindet die Bindestelle-III des IC7 auch den OSMR, welches ein starkes Indiz für eine Interaktion des CNTF mittels der Bindestelle-III zum OSMR ist.

Schließlich wurde der Einfluss des IC7 auf einen MI analysiert. Hierbei konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass eine präemptive und postoperative Injektion die Herzfunktionen nach einer Ischämie/Reperfusion (I/R) verbesserte. Die behandelte Gruppe zeigte bessere Leistungen im Bereich der Ejektionfraktion sowie der *fractional area change* nach einigen Wochen Reperfusion im Vergleich zur PBS Gruppe. Des Weiteren, wurde eine Verringerung der Infarktgröße durch die Behandlung mit IC7 nachgewiesen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass IC7 nicht nur als potentiell Therapeutikum nach einem MI ermittelt wurde und somit zum besseren Verständnis von Heilungsprozessen beigetragen hat, sondern dass auch andere Cytokimera generiert wurden, die großes therapeutisches Potential haben könnten.

8 Summary

Ischemic heart diseases are the most common cause of death worldwide. The development of new therapeutics as well as a better understanding of healing procedure followed a myocardial infarction (MI) are urgently needed. Cytokine chimera (cytokimera) offer new possibilities, due to a higher specificity and lower pleiotropy compared to their origin cytokines.

During this work, three new cytokimera (GIL-6, GIO-6 and GIL-11) were designed by the structure based exchange of binding site-III, requiring receptor constellations for signal transduction that do not occur in nature. The newly generated cytokimera including the known IC7 were expressed, purified and characterized. All chimera except GIL-11 were expressed as Fc-fusion and purified by Protein-A purification. Only GIL-11 was expressed with a TwinStrep-tag and purified by StrepTactinXT purification. It has been shown by proliferation- and stimulation assay, that the cytokimera are biological active (EC₅₀ between ~10-50 pM) and more specific than their derived natural cytokines, since they need at least one further receptor for the signal transduction. Apart from that, it has been shown that the cytokimera's signalling is mediated concentration depended by JAK/STAT and MAPK/ERK pathway. This study also shows, that the cytokimera including IC7 are poor transducer of trans-signalling, which opens new approaches. Moreover, it could be shown that the binding site-III of IC7 binds also to the OSMR, indicating that site-III of CNTF binds to OSMR.

Finally, the influence of IC7 was analysed on MI. In this context it could be shown, that a pre-emptive and an injection post-surgery improved the heart functions after ischemia/reperfusion (I/R) in a mouse model. The treated group has shown better performance in ejection fraction as well as in fractional area change after several weeks of reperfusion compared to the PBS control group. Furthermore, IC7 leads to a decrease of the infarct size. Ultimately, it was not only found IC7 as a potential therapeutic for the treatment of MI, which contributed to the understanding of healing procedures, but also other novel cytokimera were generated with a great therapeutic potential.

9 Literaturverzeichnis

- Abe, H., Takeda, N., Isagawa, T., Semba, H., Nishimura, S., Morioka, M. S., Nakagama, Y., Sato, T., Soma, K., Koyama, K., Wake, M., Katoh, M., Asagiri, M., Neugent, M. L., Kim, J. W., Stockmann, C., Yonezawa, T., Inuzuka, R., Hirota, Y., Maemura, K., Yamashita, T., Otsu, K., Manabe, I., Nagai, R., & Komuro, I. (2019). Macrophage hypoxia signaling regulates cardiac fibrosis via Oncostatin M. *Nat Commun*, 10(1), 2824. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10859-w>
- Adrian-Segarra, J. M., Schindler, N., Gajawada, P., Lorchner, H., Braun, T., & Poling, J. (2018). The AB loop and D-helix in binding site III of human Oncostatin M (OSM) are required for OSM receptor activation. *J Biol Chem*, 293(18), 7017-7029. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001920>
- Adrian-Segarra, J. M., Sreenivasan, K., Gajawada, P., Lorchner, H., Braun, T., & Poling, J. (2018). The AB loop of oncostatin M (OSM) determines species-specific signaling in humans and mice. *J Biol Chem*, 293(52), 20181-20199. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.004375>
- Ahmad, F. B., & Anderson, R. N. (2021). The Leading Causes of Death in the US for 2020. *JAMA*, 325(18), 1829-1830. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.5469>
- Anzell, A. R., Maizy, R., Przyklenk, K., & Sanderson, T. H. (2018). Mitochondrial Quality Control and Disease: Insights into Ischemia-Reperfusion Injury. *Mol Neurobiol*, 55(3), 2547-2564. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0503-9>
- Aparicio-Siegmund, S., & Garbers, C. (2015). The biology of interleukin-27 reveals unique pro- and anti-inflammatory functions in immunity. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 579-586. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.008>
- Arita, K., South, A. P., Hans-Filho, G., Sakuma, T. H., Lai-Cheong, J., Clements, S., Odashiro, M., Odashiro, D. N., Hans-Neto, G., Hans, N. R., Holder, M. V., Bhogal, B. S., Hartshorne, S. T., Akiyama, M., Shimizu, H., & McGrath, J. A. (2008). Oncostatin M receptor-beta mutations underlie familial primary localized cutaneous amyloidosis. *Am J Hum Genet*, 82(1), 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.002>
- Atsumi, T., Ishihara, K., Kamimura, D., Ikushima, H., Ohtani, T., Hirota, S., Kobayashi, H., Park, S. J., Saeki, Y., Kitamura, Y., & Hirano, T. (2002). A point mutation of Tyr-759 in interleukin 6 family cytokine receptor subunit gp130 causes autoimmune arthritis. *J Exp Med*, 196(7), 979-990. <https://doi.org/10.1084/jem.20020619>
- Barton, V. A., Hudson, K. R., & Heath, J. K. (1999). Identification of three distinct receptor binding sites of murine interleukin-11. *J Biol Chem*, 274(9), 5755-5761. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5755>
- Battista, M. R., Grigoletto, A., Tedeschini, T., Cellucci, A., Colaceci, F., Laufer, R., Pasut, G., & Di Marco, A. (2022). Efficacy of PEGylated ciliary neurotrophic factor superagonist variant in diet-induced obesity mice. *PLoS One*, 17(3), e0265749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0265749>
- Bazan, J. F. (1990). Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell*, 61(5), 753-754. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90182-e](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90182-e)

- Blaydon, D. C., Biancheri, P., Di, W. L., Plagnol, V., Cabral, R. M., Brooke, M. A., van Heel, D. A., Ruschendorf, F., Toynbee, M., Walne, A., O'Toole, E. A., Martin, J. E., Lindley, K., Vulliamy, T., Abrams, D. J., MacDonald, T. T., Harper, J. I., & Kelsell, D. P. (2011). Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med*, 365(16), 1502-1508. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1100721>
- Borst, O., Ochmann, C., Schonberger, T., Jacoby, C., Stellos, K., Seizer, P., Flogel, U., Lang, F., & Gawaz, M. (2011). Methods employed for induction and analysis of experimental myocardial infarction in mice. *Cell Physiol Biochem*, 28(1), 1-12. <https://doi.org/10.1159/000331708>
- Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest*, 76(5), 1713-1719. <https://doi.org/10.1172/JCI112160>
- Bravo, J., & Heath, J. K. (2000). Receptor recognition by gp130 cytokines. *EMBO J*, 19(11), 2399-2411. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.11.2399>
- Brugada-Terradellas, C., Hellemans, A., Brugada, P., & Smets, P. (2021). Sudden cardiac death: A comparative review of humans, dogs and cats. *Vet J*, 274, 105696. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2021.105696>
- Califf, R. M., & Ohman, E. M. (1992). The diagnosis of acute myocardial infarction. *Chest*, 101(4 Suppl), 106S-115S. https://doi.org/10.1378/chest.101.4_supplement.106s
- Caveney, N. A., Glassman, C. R., Jude, K. M., Tsutsumi, N., & Garcia, K. C. (2022). Structure of the IL-27 quaternary receptor signaling complex. *Elife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.78463>
- Champion, H., Innes, B. A., Robson, S. C., Lash, G. E., & Bulmer, J. N. (2012). Effects of interleukin-6 on extravillous trophoblast invasion in early human pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 18(8), 391-400. <https://doi.org/10.1093/molehr/gas010>
- Chen, L., Wang, S., Wang, Y., Zhang, W., Ma, K., Hu, C., Zhu, H., Liang, S., Liu, M., & Xu, N. (2018). IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget*, 9(25), 17443-17454. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24734>
- Chen, X., Li, Y., Luo, J., & Hou, N. (2020). Molecular Mechanism of Hippo-YAP1/TAZ Pathway in Heart Development, Disease, and Regeneration. *Front Physiol*, 11, 389. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00389>
- Chen, X., Zeng, F., Huang, T., Cheng, L., Liu, H., & Gong, R. (2016). Optimization on Fc for Improvement of Stability and Aggregation Resistance. *Curr Pharm Biotechnol*, 17(15), 1353-1359. <https://doi.org/10.2174/1389201017666161117145312>
- Chow, D., He, X., Snow, A. L., Rose-John, S., & Garcia, K. C. (2001). Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science*, 291(5511), 2150-2155. <https://doi.org/10.1126/science.1058308>
- Clausen, B. E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., & Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res*, 8(4), 265-277. <https://doi.org/10.1023/a:1008942828960>
- Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J. E., Jr., Mui, A. L., Miyajima, A., Quelle, F. W., Ihle, J. N., & et al. (1995). Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes. *Genomics*, 29(1), 225-228. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1235>

- Corden, B., Adami, E., Sweeney, M., Schafer, S., & Cook, S. A. (2020). IL-11 in cardiac and renal fibrosis: Late to the party but a central player. *Br J Pharmacol*, 177(8), 1695-1708. <https://doi.org/10.1111/bph.15013>
- Dagoneau, N., Scheffer, D., Huber, C., Al-Gazali, L. I., Di Rocco, M., Godard, A., Martinovic, J., Raas-Rothschild, A., Sigaudy, S., Unger, S., Nicole, S., Fontaine, B., Taupin, J. L., Moreau, J. F., Superti-Furga, A., Le Merrer, M., Bonaventure, J., Munnich, A., Legeai-Mallet, L., & Cormier-Daire, V. (2004). Null leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) mutations in Stuve-Wiedemann/Schwartz-Jampel type 2 syndrome. *Am J Hum Genet*, 74(2), 298-305. <https://doi.org/10.1086/381715>
- Deller, M. C., Hudson, K. R., Ikemizu, S., Bravo, J., Jones, E. Y., & Heath, J. K. (2000). Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure*, 8(8), 863-874. [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(00\)00176-3](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(00)00176-3)
- Donath, M. Y. (2019). Designer cytokine for the treatment of diabetes. *Nat Metab*, 1(10), 933-934. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0130-z>
- Druszczyńska, M., Godkowicz, M., Kulesza, J., Wawrocki, S., & Fol, M. (2022). Cytokine Receptors-Regulators of Antimycobacterial Immune Response. *Int J Mol Sci*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031112>
- Dubin, C., Del Duca, E., & Guttman-Yassky, E. (2021). The IL-4, IL-13 and IL-31 pathways in atopic dermatitis. *Expert Rev Clin Immunol*, 17(8), 835-852. <https://doi.org/10.1080/1744666X.2021.1940962>
- Dusterhoft, S., Lokau, J., & Garbers, C. (2019). The metalloprotease ADAM17 in inflammation and cancer. *Pathol Res Pract*, 215(6), 152410. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.04.002>
- Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F., & Gascan, H. (2000). CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*, 3(9), 867-872. <https://doi.org/10.1038/78765>
- Engelowski, E., Schneider, A., Franke, M., Xu, H., Clemen, R., Lang, A., Baran, P., Binsch, C., Knebel, B., Al-Hasani, H., Moll, J. M., Floss, D. M., Lang, P. A., & Scheller, J. (2018). Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands. *Nat Commun*, 9(1), 2034. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04454-8>
- Ettinger, M. P., Littlejohn, T. W., Schwartz, S. L., Weiss, S. R., McIlwain, H. H., Heymsfield, S. B., Bray, G. A., Roberts, W. G., Heyman, E. R., Stambler, N., Heshka, S., Vicary, C., & Guler, H. P. (2003). Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study. *JAMA*, 289(14), 1826-1832. <https://doi.org/10.1001/jama.289.14.1826>
- Ferrao, R., & Lupardus, P. J. (2017). The Janus Kinase (JAK) FERM and SH2 Domains: Bringing Specificity to JAK-Receptor Interactions. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 8, 71. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00071>
- Ferreira, J. C., & Mochly-Rosen, D. (2012). Nitroglycerin use in myocardial infarction patients. *Circ J*, 76(1), 15-21. <https://doi.org/10.1253/circj.cj-11-1133>
- Findeisen, M., Allen, T. L., Henstridge, D. C., Kammoun, H., Brandon, A. E., Baggio, L. L., Watt, K. I., Pal, M., Cron, L., Estevez, E., Yang, C., Kowalski, G. M., O'Reilly, L., Egan, C., Sun, E., Thai, L. M., Krippner, G., Adams, T. E., Lee, R. S., Grotzinger, J.,

- Garbers, C., Risis, S., Kraakman, M. J., Mellet, N. A., Sligar, J., Kimber, E. T., Young, R. L., Cowley, M. A., Bruce, C. R., Meikle, P. J., Baldock, P. A., Gregorevic, P., Biden, T. J., Cooney, G. J., Keating, D. J., Drucker, D. J., Rose-John, S., & Febbraio, M. A. (2019). Treatment of type 2 diabetes with the designer cytokine IC7Fc. *Nature*, 574(7776), 63-68. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1601-9>
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J., & Rose-John, S. (1997). I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol*, 15(2), 142-145. <https://doi.org/10.1038/nbt0297-142>
- Fischer, P., Lehmann, U., Sobota, R. M., Schmitz, J., Niemand, C., Linnemann, S., Haan, S., Behrmann, I., Yoshimura, A., Johnston, J. A., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (2004). The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling. *Biochem J*, 378(Pt 2), 449-460. <https://doi.org/10.1042/BJ20030893>
- Floss, D. M., & Scheller, J. (2019). Naturally occurring and synthetic constitutive-active cytokine receptors in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*, 47, 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2019.05.007>
- Fu, X. L., Duan, W., Su, C. Y., Mao, F. Y., Lv, Y. P., Teng, Y. S., Yu, P. W., Zhuang, Y., & Zhao, Y. L. (2017). Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression. *Cancer Immunol Immunother*, 66(12), 1597-1608. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2052-5>
- Fuchs, F. D., & Whelton, P. K. (2020). High Blood Pressure and Cardiovascular Disease. *Hypertension*, 75(2), 285-292. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14240>
- Galun, E., Zeira, E., Pappo, O., Peters, M., & Rose-John, S. (2000). Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J*, 14(13), 1979-1987. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0913com>
- 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., & 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. *J Biol Chem*, 286(50), 42959-42970. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.295758>
- Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P., & Baumann, H. (1987). Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(20), 7251-7255. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.20.7251>
- Gearing, D. P., Gough, N. M., King, J. A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Simpson, R. J., Nice, E. C., Kelso, A., & Metcalf, D. (1987). Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J*, 6(13), 3995-4002. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02742.x>
- George, M. J., Jasmin, N. H., Cummings, V. T., Richard-Loendt, A., Launchbury, F., Woollard, K., Turner-Stokes, T., Garcia Diaz, A. I., Lythgoe, M., Stuckey, D. J., Hingorani, A. D., & Gilroy, D. W. (2021). Selective Interleukin-6 Trans-Signaling Blockade Is More Effective Than Panantagonism in Reperfused Myocardial Infarction. *JACC Basic Transl Sci*, 6(5), 431-443. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2021.01.013>

- Gerharz, C. D., Ramp, U., Reinecke, P., Schardt, C., Friebe, U., Dejosez, M., Nitsch, T., & Gabbert, H. E. (2000). Analysis of growth factor-dependent signalling in human epithelioid sarcoma cell lines. clues To the role of autocrine, juxtacrine and paracrine interactions in epithelioid sarcoma. *Eur J Cancer*, 36(9), 1171-1179. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(00\)00053-8](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(00)00053-8)
- Gershlick, A. H., & More, R. S. (1998). Treatment of myocardial infarction. *BMJ*, 316(7127), 280-284. <https://doi.org/10.1136/bmj.316.7127.280>
- Ghetie, V., & Ward, E. S. (2000). Multiple roles for the major histocompatibility complex class I-related receptor FcRn. *Annu Rev Immunol*, 18, 739-766. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.739>
- Gomori, G. (1950). A rapid one-step trichrome stain. *Am J Clin Pathol*, 20(7), 661-664. https://doi.org/10.1093/ajcp/20.7_ts.661
- Gooz, M. (2010). ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45(2), 146-169. <https://doi.org/10.3109/10409231003628015>
- Halder, S., Parte, S., Kshirsagar, P., Muniyan, S., Nair, H. B., Batra, S. K., & Seshacharyulu, P. (2022). The Pleiotropic role, functions and targeted therapies of LIF/LIFR axis in cancer: Old spectacles with new insights. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 1877(4), 188737. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2022.188737>
- Hamelin-Morrisette, J., Dallagi, A., Girouard, J., Ravelojaona, M., Oufqir, Y., Vaillancourt, C., Van Themsche, C., Carrier, C., & Reyes-Moreno, C. (2020). Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells. *Mol Immunol*, 120, 32-42. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.021>
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N., & Hamers, R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 363(6428), 446-448. <https://doi.org/10.1038/363446a0>
- Harpur, A. G., Andres, A. C., Ziemiecki, A., Aston, R. R., & Wilks, A. F. (1992). JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene*, 7(7), 1347-1353. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1620548>
- Harrington, D. H., Stueben, F., & Lenahan, C. M. (2019). ST-Elevation Myocardial Infarction and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction: Medical and Surgical Interventions. *Crit Care Nurs Clin North Am*, 31(1), 49-64. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2018.10.002>
- Haskins, J. W., Nguyen, D. X., & Stern, D. F. (2014). Neuregulin 1-activated ERBB4 interacts with YAP to induce Hippo pathway target genes and promote cell migration. *Sci Signal*, 7(355), ra116. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005770>
- Heinen, A., Nederlof, R., Panjwani, P., Spyckala, A., Tschaidse, T., Reffelt, H., Boy, J., Raupach, A., Godecke, S., Petzsch, P., Kohrer, K., Grandoch, M., Petz, A., Fischer, J. W., Alter, C., Vasilevska, J., Lang, P., & Godecke, A. (2019). IGF1 Treatment Improves Cardiac Remodeling after Infarction by Targeting Myeloid Cells. *Mol Ther*, 27(1), 46-58. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.10.020>
- Heink, S., Yagev, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., Husterer, V., Croxford, A. L., Moller-Hackbarth, K., Bartsch, H. S., Sotlar, K., Krebs, S., Regen, T., Blum, H., Hemmer, B., Misgeld, T., Wunderlich, T. F., Hidalgo, J., Oukka, M., Rose-John, S., Schmidt-Supprian, M., Waisman, A., & Korn, T. (2017). Trans-presentation of IL-6 by

- dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nat Immunol*, 18(1), 74-85. <https://doi.org/10.1038/ni.3632>
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., & Schaper, F. (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 374(Pt 1), 1-20. <https://doi.org/10.1042/BJ20030407>
- Henning, R. J. (2018). Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol*, 14(6), 491-509. <https://doi.org/10.2217/fca-2018-0045>
- Hermanns, H. M. (2015). Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(5), 545-558. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.07.006>
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63(6), 1149-1157. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90411-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90411-7)
- Hishitani, Y., Ogata, A., Shima, Y., Hirano, T., Ebina, K., Kunugiza, Y., Shi, K., Narazaki, M., Hagihara, K., Tomita, T., Yoshikawa, H., Tanaka, T., & Kumanogoh, A. (2013). Retention of tocilizumab and anti-tumour necrosis factor drugs in the treatment of rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 42(4), 253-259. <https://doi.org/10.3109/03009742.2012.762037>
- Hober, S., Nord, K., & Linhult, M. (2007). Protein A chromatography for antibody purification. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 848(1), 40-47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.030>
- Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M., & Yamamoto, N. (1994). Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol*, 24(8), 1945-1948. <https://doi.org/10.1002/eji.1830240837>
- Huse, C., Anstensrud, A. K., Michelsen, A. E., Ueland, T., Broch, K., Woxholt, S., Yang, K., Sharma, K., Tollefsen, I. M., Bendz, B., Amundsen, B. H., Damas, J. K., Berg, E. S., Bjorkelund, E., Quiles-Jimenez, A., Bjerkeli, V., Bendz, C., Kleveland, O., Stensaeth, K. H., Opdahl, A., Klow, N. E., Andersen, G. O., Wiseth, R., Halvorsen, B., Gullestad, L., Seljeflot, I., Aukrust, P., Osnes, L., & Dahl, T. B. (2022). Interleukin-6 inhibition in ST-elevation myocardial infarction: Immune cell profile in the randomised ASSAIL-MI trial. *EBioMedicine*, 80, 104013. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104013>
- Jain, N. K., Barkowski-Clark, S., Altman, R., Johnson, K., Sun, F., Zmuda, J., Liu, C. Y., Kita, A., Schulz, R., Neill, A., Ballinger, R., Patel, R., Liu, J., Mpanda, A., Huta, B., Chiou, H., Voegtli, W., & Panavas, T. (2017). A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. *Protein Expr Purif*, 134, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.03.018>
- Jin, Y., Fyfe, P. K., Gardner, S., Wilmes, S., Bubeck, D., & Moraga, I. (2022). Structural insights into the assembly and activation of the IL-27 signaling complex. *EMBO Rep*, e55450. <https://doi.org/10.15252/embr.202255450>
- Jirkof, P., Durst, M., Klopffleisch, R., Palme, R., Thone-Reineke, C., Buttgereit, F., Schmidt-Bleek, K., & Lang, A. (2019). Administration of Tramadol or Buprenorphine via the drinking water for post-operative analgesia in a mouse-osteotomy model. *Sci Rep*, 9(1), 10749. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47186-5>

- Jones, S. A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N., & Fuller, G. M. (2001). The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *FASEB J*, 15(1), 43-58. <https://doi.org/10.1096/fj.99-1003rev>
- Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. F., & Rose-John, S. (2001). Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem*, 268(1), 160-167. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x>
- Kallen, K. J., Grotzinger, J., Lelievre, E., Vollmer, P., Aasland, D., Renne, C., Mullberg, J., Myer zum Buschenfelde, K. H., Gascan, H., & Rose-John, S. (1999). Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules. Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6. *J Biol Chem*, 274(17), 11859-11867. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.17.11859>
- Kelley, L. A., & Sternberg, M. J. (2009). Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc*, 4(3), 363-371. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.2>
- Ketteler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U. M., & Klingmuller, U. (2002). Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther*, 9(8), 477-487. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301653>
- Khan, K., Makhoul, G., Yu, B., Schwertani, A., & Cecere, R. (2019). The cytoprotective impact of yes-associated protein 1 after ischemia-reperfusion injury in AC16 human cardiomyocytes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 244(10), 802-812. <https://doi.org/10.1177/1535370219851243>
- Kishimoto, T., Akira, S., & Taga, T. (1992). IL-6 receptor and mechanism of signal transduction. *Int J Immunopharmacol*, 14(3), 431-438. [https://doi.org/10.1016/0192-0561\(92\)90173-i](https://doi.org/10.1016/0192-0561(92)90173-i)
- Kitano, K., Usui, S., Ootsuji, H., Takashima, S., Kobayashi, D., Murai, H., Furusho, H., Nomura, A., Kaneko, S., & Takamura, M. (2014). Rho-kinase activation in leukocytes plays a pivotal role in myocardial ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*, 9(3), e92242. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092242>
- Kleveland, O., Kunszt, G., Bratlie, M., Ueland, T., Broch, K., Holte, E., Michelsen, A. E., Bendz, B., Amundsen, B. H., Espevik, T., Aakhus, S., Damas, J. K., Aukrust, P., Wiseth, R., & Gullestad, L. (2016). Effect of a single dose of the interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab on inflammation and troponin T release in patients with non-ST-elevation myocardial infarction: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial. *Eur Heart J*, 37(30), 2406-2413. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehw171>
- Kondo, T., Nakano, Y., Adachi, S., & Murohara, T. (2019). Effects of Tobacco Smoking on Cardiovascular Disease. *Circ J*, 83(10), 1980-1985. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-19-0323>
- Krolewski, J. J., Lee, R., Eddy, R., Shows, T. B., & Dalla-Favera, R. (1990). Identification and chromosomal mapping of new human tyrosine kinase genes. *Oncogene*, 5(3), 277-282. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2156206>
- Kumar, A., Avishay, D. M., Jones, C. R., Shaikh, J. D., Kaur, R., Aljadah, M., Kichloo, A., Shiwalkar, N., & Keshavamurthy, S. (2021). Sudden cardiac death: epidemiology,

- pathogenesis and management. *Rev Cardiovasc Med*, 22(1), 147-158. <https://doi.org/10.31083/j.rcm.2021.01.207>
- Kurzrock, R. (2000). rhIL-11 for the prevention of dose-limiting chemotherapy-induced thrombocytopenia. *Oncology (Williston Park)*, 14(9 Suppl 8), 9-11. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033833>
- Lambert, P. D., Anderson, K. D., Sleeman, M. W., Wong, V., Tan, J., Hjarunguru, A., Corcoran, T. L., Murray, J. D., Thabet, K. E., Yancopoulos, G. D., & Wiegand, S. J. (2001). Ciliary neurotrophic factor activates leptin-like pathways and reduces body fat, without cachexia or rebound weight gain, even in leptin-resistant obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4652-4657. <https://doi.org/10.1073/pnas.061034298>
- Latic, N., & Erben, R. G. (2020). Vitamin D and Cardiovascular Disease, with Emphasis on Hypertension, Atherosclerosis, and Heart Failure. *Int J Mol Sci*, 21(18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186483>
- Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R. M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B. G., Heinrich, P. C., & Schaper, F. (2003). SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J Biol Chem*, 278(1), 661-671. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210552200>
- Levine, G. N., Bates, E. R., Blankenship, J. C., Bailey, S. R., Bittl, J. A., Cercek, B., Chambers, C. E., Ellis, S. G., Guyton, R. A., Hollenberg, S. M., Khot, U. N., Lange, R. A., Mauri, L., Mehran, R., Moussa, I. D., Mukherjee, D., Ting, H. H., O'Gara, P. T., Kushner, F. G., Ascheim, D. D., Brindis, R. G., Casey, D. E., Jr., Chung, M. K., de Lemos, J. A., Diercks, D. B., Fang, J. C., Franklin, B. A., Granger, C. B., Krumholz, H. M., Linderbaum, J. A., Morrow, D. A., Newby, L. K., Ornato, J. P., Ou, N., Radford, M. J., Tamis-Holland, J. E., Tommaso, C. L., Tracy, C. M., Woo, Y. J., & Zhao, D. X. (2016). 2015 ACC/AHA/SCAI Focused Update on Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction: An Update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*, 67(10), 1235-1250. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2015.10.005>
- Li, Y., Feng, J., Song, S., Li, H., Yang, H., Zhou, B., Li, Y., Yue, Z., Lian, H., Liu, L., Hu, S., & Nie, Y. (2020). gp130 Controls Cardiomyocyte Proliferation and Heart Regeneration. *Circulation*, 142(10), 967-982. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044484>
- Li, Z., Krippendorff, B. F., & Shah, D. K. (2017). Influence of Molecular size on the clearance of antibody fragments. *Pharm Res*, 34(10), 2131-2141. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2219-y>
- Liao, Z., Brar, B. K., Cai, Q., Stephanou, A., O'Leary, R. M., Pennica, D., Yellon, D. M., & Latchman, D. S. (2002). Cardiotrophin-1 (CT-1) can protect the adult heart from injury when added both prior to ischaemia and at reperfusion. *Cardiovasc Res*, 53(4), 902-910. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(01\)00531-4](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(01)00531-4)
- Lin, Z., von Gise, A., Zhou, P., Gu, F., Ma, Q., Jiang, J., Yau, A. L., Buck, J. N., Gouin, K. A., van Gorp, P. R., Zhou, B., Chen, J., Seidman, J. G., Wang, D. Z., & Pu, W. T. (2014). Cardiac-specific YAP activation improves cardiac function and survival in an

- experimental murine MI model. *Circ Res*, 115(3), 354-363. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303632>
- Liu, L., McBride, K. M., & Reich, N. C. (2005). STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(23), 8150-8155. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501643102>
- Lokau, J., Garbers, Y., Grotzinger, J., & Garbers, C. (2021). A single aromatic residue in sgp130Fc/olamkicept allows the discrimination between interleukin-6 and interleukin-11 trans-signaling. *iScience*, 24(11), 103309. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103309>
- Lokau, J., Nitz, R., Agthe, M., Monhasery, N., Aparicio-Siegmund, S., Schumacher, N., Wolf, J., Moller-Hackbarth, K., Waetzig, G. H., Grotzinger, J., Muller-Newen, G., Rose-John, S., Scheller, J., & Garbers, C. (2016). Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. *Cell Rep*, 14(7), 1761-1773. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.01.053>
- Lutz, H. H., Sackett, S. D., Kroy, D. C., Gassler, N., & Trautwein, C. (2012). Deletion of gp130 in myeloid cells modulates IL-6-release and is associated with more severe liver injury of Con A hepatitis. *Eur J Cell Biol*, 91(6-7), 576-581. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.09.006>
- Ma, S., & Dong, Z. (2019). Melatonin Attenuates Cardiac Reperfusion Stress by Improving OPA1-Related Mitochondrial Fusion in a Yap-Hippo Pathway-Dependent Manner. *J Cardiovasc Pharmacol*, 73(1), 27-39. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000626>
- Majumder, A., Banerjee, S., Harrill, J. A., Machacek, D. W., Mohamad, O., Bacanamwo, M., Mundy, W. R., Wei, L., Dhara, S. K., & Stice, S. L. (2012). Neurotrophic effects of leukemia inhibitory factor on neural cells derived from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 30(11), 2387-2399. <https://doi.org/10.1002/stem.1201>
- Malik, N., Kallestad, J. C., Gunderson, N. L., Austin, S. D., Neubauer, M. G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J. M., Shoyab, M., Wei, C. M., & et al. (1989). Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Mol Cell Biol*, 9(7), 2847-2853. <https://doi.org/10.1128/mcb.9.7.2847-2853.1989>
- Marz, P., Ozbek, S., Fischer, M., Voltz, N., Otten, U., & Rose-John, S. (2002). Differential response of neuronal cells to a fusion protein of ciliary neurotrophic factor/soluble CNTF-receptor and leukemia inhibitory factor. *Eur J Biochem*, 269(12), 3023-3031. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02977.x>
- Matthews, V. B., & Febbraio, M. A. (2008). CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease? *J Mol Med (Berl)*, 86(4), 353-361. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0286-y>
- McFarland-Mancini, M. M., Funk, H. M., Paluch, A. M., Zhou, M., Giridhar, P. V., Mercer, C. A., Kozma, S. C., & Drew, A. F. (2010). Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J Immunol*, 184(12), 7219-7228. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901929>
- McLornan, D. P., Pope, J. E., Gotlib, J., & Harrison, C. N. (2021). Current and future status of JAK inhibitors. *Lancet*, 398(10302), 803-816. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00438-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00438-4)

- Metcalf, R. D., Putoczki, T. L., & Griffin, M. D. W. (2020). Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11. *Front Immunol*, 11, 1424. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01424>
- Min, X., Ungureanu, D., Maxwell, S., Hammaren, H., Thibault, S., Hillert, E. K., Ayres, M., Greenfield, B., Eksterowicz, J., Gabel, C., Walker, N., Silvennoinen, O., & Wang, Z. (2015). Structural and Functional Characterization of the JH2 Pseudokinase Domain of JAK Family Tyrosine Kinase 2 (TYK2). *J Biol Chem*, 290(45), 27261-27270. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.672048>
- Molden, J., Chang, Y., You, Y., Moore, P. S., & Goldsmith, M. A. (1997). A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J Biol Chem*, 272(31), 19625-19631. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19625>
- Montecucco, F., Liberale, L., Bonaventura, A., Vecchie, A., Dallegri, F., & Carbone, F. (2017). The Role of Inflammation in Cardiovascular Outcome. *Curr Atheroscler Rep*, 19(3), 11. <https://doi.org/10.1007/s11883-017-0646-1>
- Moraga, I., Spangler, J. B., Mendoza, J. L., Gakovic, M., Wehrman, T. S., Krutzik, P., & Garcia, K. C. (2017). Synthesins are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers. *Elife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.22882>
- Morris, R., Kershaw, N. J., & Babon, J. J. (2018). The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway. *Protein Sci*, 27(12), 1984-2009. <https://doi.org/10.1002/pro.3519>
- Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S., & Cosman, D. (1996). Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem*, 271(51), 32635-32643. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.32635>
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L. K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J. L., Becherer, J. D., & et al. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- α . *Nature*, 385(6618), 733-736. <https://doi.org/10.1038/385733a0>
- Moya, I. M., & Halder, G. (2019). Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 20(4), 211-226. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0086-y>
- Mullberg, J., Geib, T., Jostock, T., Hoischen, S. H., Vollmer, P., Voltz, N., Heinz, D., Galle, P. R., Klouche, M., & Rose-John, S. (2000). IL-6 receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6. *J Immunol*, 164(9), 4672-4677. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.164.9.4672>
- Murakami, M., Kamimura, D., & Hirano, T. (2019). Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. *Immunity*, 50(4), 812-831. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.027>
- Nagashima, H., & Masuho, Y. (2010). [Enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity by tandem Fc multimerization]. *Yakugaku Zasshi*, 130(1), 49-54. <https://doi.org/10.1248/yakushi.130.49>

- Nahrendorf, M., Swirski, F. K., Aikawa, E., Stangenberg, L., Wurdinger, T., Figueiredo, J. L., Libby, P., Weissleder, R., & Pittet, M. J. (2007). The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, 204(12), 3037-3047. <https://doi.org/10.1084/jem.20070885>
- Nakashima, C., Otsuka, A., & Kabashima, K. (2018). Interleukin-31 and interleukin-31 receptor: New therapeutic targets for atopic dermatitis. *Exp Dermatol*, 27(4), 327-331. <https://doi.org/10.1111/exd.13533>
- Nelson, S. K., Wong, G. H., & McCord, J. M. (1995). Leukemia inhibitory factor and tumor necrosis factor induce manganese superoxide dismutase and protect rabbit hearts from reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 27(1), 223-229. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(08\)80021-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(08)80021-1)
- Ng, S., & Galipeau, J. (2015). Concise review: engineering the fusion of cytokines for the modulation of immune cellular responses in cancer and autoimmune disorders. *Stem Cells Transl Med*, 4(1), 66-73. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0145>
- Obana, M., Maeda, M., Takeda, K., Hayama, A., Mohri, T., Yamashita, T., Nakaoka, Y., Komuro, I., Takeda, K., Matsumiya, G., Azuma, J., & Fujio, Y. (2010). Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*, 121(5), 684-691. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.893677>
- Obana, M., Miyamoto, K., Murasawa, S., Iwakura, T., Hayama, A., Yamashita, T., Shiragaki, M., Kumagai, S., Miyawaki, A., Takewaki, K., Matsumiya, G., Maeda, M., Yoshiyama, M., Nakayama, H., & Fujio, Y. (2012). Therapeutic administration of IL-11 exhibits the postconditioning effects against ischemia-reperfusion injury via STAT3 in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 303(5), H569-577. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00060.2012>
- Onufriev, A., Case, D. A., & Ullmann, G. M. (2001). A novel view of pH titration in biomolecules. *Biochemistry*, 40(12), 3413-3419. <https://doi.org/10.1021/bi002740q>
- Padberg, F., Feneberg, W., Schmidt, S., Schwarz, M. J., Korschenhausen, D., Greenberg, B. D., Nolde, T., Muller, N., Trapmann, H., Konig, N., Moller, H. J., & Hampel, H. (1999). CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 99(2), 218-223. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(99\)00120-4](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(99)00120-4)
- Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M., & McKearn, J. P. (1984). Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature*, 309(5964), 126-131. <https://doi.org/10.1038/309126a0>
- Parravicini, C., Corbellino, M., Paulli, M., Magrini, U., Lazzarino, M., Moore, P. S., & Chang, Y. (1997). Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am J Pathol*, 151(6), 1517-1522. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9403701>
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L., & Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(18), 8392-8396. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.18.8392>
- Peet, C., Ivetic, A., Bromage, D. I., & Shah, A. M. (2020). Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction. *Cardiovasc Res*, 116(6), 1101-1112. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz336>

- Pennica, D., King, K. L., Shaw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S. M., Darbonne, W. C., Knutson, D. S., Yen, R., Chien, K. R., & et al. (1995). Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(4), 1142-1146. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1142>
- Perugini, J., Di Mercurio, E., Giuliani, A., Sabbatinelli, J., Bonfigli, A. R., Tortato, E., Severi, I., Cinti, S., Olivieri, F., le Roux, C. W., Gesuita, R., & Giordano, A. (2022). Ciliary neurotrophic factor is increased in the plasma of patients with obesity and its levels correlate with diabetes and inflammation indices. *Sci Rep*, 12(1), 8331. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11942-x>
- Peters, M., Blinn, G., Jostock, T., Schirmacher, P., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Galle, P. R., & Rose-John, S. (2000). Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology*, 119(6), 1663-1671. <https://doi.org/10.1053/gast.2000.20236>
- Petes, C., Mariani, M. K., Yang, Y., Grandvaux, N., & Gee, K. (2018). Interleukin (IL)-6 Inhibits IL-27- and IL-30-Mediated Inflammatory Responses in Human Monocytes. *Front Immunol*, 9, 256. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00256>
- Pflanz, S., Tacke, I., Grotzinger, J., Jacques, Y., Minvielle, S., Dahmen, H., Heinrich, P. C., & Muller-Newen, G. (1999). A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130. *FEBS Lett*, 450(1-2), 117-122. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00477-9](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00477-9)
- Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., Moates, J. M., Shelton, K. D., Lindner, J., Cherrington, A. D., & Magnuson, M. A. (1999). Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem*, 274(1), 305-315. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.305>
- Prabhu, S. D., & Frangogiannis, N. G. (2016). The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis. *Circ Res*, 119(1), 91-112. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303577>
- Preti, A. (2003). Axokine (Regeneron). *IDrugs*, 6(7), 696-701. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12861475>
- Putoczki, T. L., Dobson, R. C., & Griffin, M. D. (2014). The structure of human interleukin-11 reveals receptor-binding site features and structural differences from interleukin-6. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 70(Pt 9), 2277-2285. <https://doi.org/10.1107/S1399004714012267>
- Reeh, H., Rudolph, N., Billing, U., Christen, H., Streif, S., Bullinger, E., Schliemann-Bullinger, M., Findeisen, R., Schaper, F., Huber, H. J., & Dittrich, A. (2019). Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor alpha to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling. *Cell Commun Signal*, 17(1), 46. <https://doi.org/10.1186/s12964-019-0356-0>
- Richards, C. D. (2013). The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease. *ISRN Inflamm*, 2013, 512103. <https://doi.org/10.1155/2013/512103>
- Riethmueller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J. C., Hung, C. W., Flynn, C. M., Lokau, J., Agthe, M., Dusterhoft, S., Zhu, Y., Grotzinger, J., Lorenzen, I., Koudelka, T., Yamamoto, K., Pickhinke, U., Wichert, R., Becker-Pauly, C., Radisch, M., Albrecht, A., Hessefort, M., Stahnke, D., Unverzagt, C., Rose-John, S., Tholey, A., & Garbers, C. (2017). Proteolytic

Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation. *PLoS Biol*, 15(1), e2000080. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2000080>

- Robinson, R. C., Grey, L. M., Staunton, D., Vankelecom, H., Vernallis, A. B., Moreau, J. F., Stuart, D. I., Heath, J. K., & Jones, E. Y. (1994). The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell*, 77(7), 1101-1116. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90449-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90449-9)
- Romagnani, P., Remuzzi, G., Glasscock, R., Levin, A., Jager, K. J., Tonelli, M., Massy, Z., Wanner, C., & Anders, H. J. (2017). Chronic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17088. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.88>
- Romeo Bertola, D., Honjo, R. S., & Baratela, W. A. (2016). Stuve-Wiedemann Syndrome: Update on Clinical and Genetic Aspects. *Mol Syndromol*, 7(1), 12-18. <https://doi.org/10.1159/000444729>
- Rose-John, S. (2012). IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*, 8(9), 1237-1247. <https://doi.org/10.7150/ijbs.4989>
- Rose-John, S. (2015). The soluble interleukin-6 receptor and related proteins. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 29(5), 787-797. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2015.07.001>
- Rose-John, S. (2018). Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028415>
- Rose-John, S., & Heinrich, P. C. (1994). Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*, 300 (Pt 2), 281-290. <https://doi.org/10.1042/bj3000281>
- Roth, G. A., Johnson, C., Abajobir, A., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abyu, G., Ahmed, M., Aksut, B., Alam, T., Alam, K., Alla, F., Alvis-Guzman, N., Amrock, S., Ansari, H., Arnlov, J., Asayesh, H., Atey, T. M., Avila-Burgos, L., Awasthi, A., Banerjee, A., Barac, A., Barnighausen, T., Barregard, L., Bedi, N., Belay Ketema, E., Bennett, D., Berhe, G., Bhutta, Z., Bitew, S., Carapetis, J., Carrero, J. J., Malta, D. C., Castaneda-Orjuela, C. A., Castillo-Rivas, J., Catala-Lopez, F., Choi, J. Y., Christensen, H., Cirillo, M., Cooper, L., Jr., Criqui, M., Cundiff, D., Damasceno, A., Dandona, L., Dandona, R., Davletov, K., Dharmaratne, S., Dorairaj, P., Dubey, M., Ehrenkranz, R., El Sayed Zaki, M., Faraon, E. J. A., Esteghamati, A., Farid, T., Farvid, M., Feigin, V., Ding, E. L., Fowkes, G., Gebrehiwot, T., Gillum, R., Gold, A., Gona, P., Gupta, R., Habtewold, T. D., Hafezi-Nejad, N., Hailu, T., Hailu, G. B., Hankey, G., Hassen, H. Y., Abate, K. H., Havmoeller, R., Hay, S. I., Horino, M., Hotez, P. J., Jacobsen, K., James, S., Javanbakht, M., Jeemon, P., John, D., Jonas, J., Kalkonde, Y., Karimkhani, C., Kasaeian, A., Khader, Y., Khan, A., Khang, Y. H., Khera, S., Khoja, A. T., Khubchandani, J., Kim, D., Kolte, D., Kosen, S., Krohn, K. J., Kumar, G. A., Kwan, G. F., Lal, D. K., Larsson, A., Linn, S., Lopez, A., Lotufo, P. A., El Razek, H. M. A., Malekzadeh, R., Mazidi, M., Meier, T., Meles, K. G., Mensah, G., Meretoja, A., Mezgebe, H., Miller, T., Mirrakhimov, E., Mohammed, S., Moran, A. E., Musa, K. I., Narula, J., Neal, B., Ngalesoni, F., Nguyen, G., Obermeyer, C. M., Owolabi, M., Patton, G., Pedro, J., Qato, D., Qorbani, M., Rahimi, K., Rai, R. K., Rawaf, S., Ribeiro, A., Safiri, S., Salomon, J. A., Santos, I., Santric Milicevic, M., Sartorius, B., Schutte, A., Sepanlou, S., Shaikh, M. A., Shin, M. J., Shishehbor, M., Shore, H., Silva, D. A. S., Sobngwi, E., Stranges, S., Swaminathan, S., Tabares-Seisdedos, R., Tadele Atnafu, N., Tesfay, F., Thakur, J. S., Thrift, A., Topor-Madry, R., Truelsen, T., Tyrovolas, S., Ukwaja, K. N., Uthman, O., Vasankari,

- T., Vlassov, V., Vollset, S. E., Wakayo, T., Watkins, D., Weintraub, R., Werdecker, A., Westerman, R., Wiysonge, C. S., Wolfe, C., Workicho, A., Xu, G., Yano, Y., Yip, P., Yonemoto, N., Younis, M., Yu, C., Vos, T., Naghavi, M., & Murray, C. (2017). Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*, 70(1), 1-25. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.04.052>
- Rousseau, F., Chevalier, S., Guillet, C., Ravon, E., Diveu, C., Froger, J., Barbier, F., Grimaud, L., & Gascan, H. (2008). Ciliary neurotrophic factor, cardiotrophin-like cytokine, and neuropoietin share a conserved binding site on the ciliary neurotrophic factor receptor alpha chain. *J Biol Chem*, 283(44), 30341-30350. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803239200>
- Rubenstein, E. B., & Elting, L. (1998). Incorporating new modalities into practice guidelines: platelet growth factors. *Oncology (Williston Park)*, 12(11A), 381-386. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10028521>
- Rumberger, J. A. (1994). Ventricular dilatation and remodeling after myocardial infarction. *Mayo Clin Proc*, 69(7), 664-674. [https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(12\)61345-7](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)61345-7)
- Sanmarco, L. M., Ponce, N. E., Visconti, L. M., Eberhardt, N., Theumer, M. G., Minguez, A. R., & Aoki, M. P. (2017). IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during Trypanosoma cruzi infection. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863(4), 857-869. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.01.006>
- Saxena, A., & Wu, D. (2016). Advances in Therapeutic Fc Engineering - Modulation of IgG-Associated Effector Functions and Serum Half-life. *Front Immunol*, 7, 580. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00580>
- Schafer, S., Viswanathan, S., Widjaja, A. A., Lim, W. W., Moreno-Moral, A., DeLaughter, D. M., Ng, B., Patone, G., Chow, K., Khin, E., Tan, J., Chothani, S. P., Ye, L., Rackham, O. J. L., Ko, N. S. J., Sahib, N. E., Pua, C. J., Zhen, N. T. G., Xie, C., Wang, M., Maatz, H., Lim, S., Saar, K., Blachut, S., Petretto, E., Schmidt, S., Putoczki, T., Guimaraes-Camboa, N., Wakimoto, H., van Heesch, S., Sigmundsson, K., Lim, S. L., Soon, J. L., Chao, V. T. T., Chua, Y. L., Tan, T. E., Evans, S. M., Loh, Y. J., Jamal, M. H., Ong, K. K., Chua, K. C., Ong, B. H., Chakaramakkil, M. J., Seidman, J. G., Seidman, C. E., Hubner, N., Sin, K. Y. K., & Cook, S. A. (2017). IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature*, 552(7683), 110-115. <https://doi.org/10.1038/nature24676>
- Schreiber, S., Aden, K., Bernardes, J. P., Conrad, C., Tran, F., Hoper, H., Volk, V., Mishra, N., Blase, J. I., Nikolaus, S., Bethge, J., Kuhbacher, T., Rocken, C., Chen, M., Cottingham, I., Petri, N., Rasmussen, B. B., Lokau, J., Lenk, L., Garbers, C., Feuerhake, F., Rose-John, S., Waetzig, G. H., & Rosenstiel, P. (2021). Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 160(7), 2354-2366 e2311. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.02.062>
- Schumacher, N., & Rose-John, S. (2019). ADAM17 Activity and IL-6 Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. *Cancers (Basel)*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/cancers11111736>
- Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grotzinger, J., Rose-John, S., & Kallen, K. J. (2003). Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF)

- revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem*, 278(11), 9528-9535. <https://doi.org/10.1074/jbc.m210044200>
- Schwertschlag, U. S., Trepicchio, W. L., Dykstra, K. H., Keith, J. C., Turner, K. J., & Dorner, A. J. (1999). Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11. *Leukemia*, 13(9), 1307-1315. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401514>
- Sendtner, M., Gotz, R., Holtmann, B., & Thoenen, H. (1997). Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci*, 17(18), 6999-7006. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278535>
- Sheng, Z., Pennica, D., Wood, W. I., & Chien, K. R. (1996). Cardiotrophin-1 displays early expression in the murine heart tube and promotes cardiac myocyte survival. *Development*, 122(2), 419-428. <https://doi.org/10.1242/dev.122.2.419>
- Shu, H. Y., Peng, Y. Z., Hang, W. J., Zhang, M., Shen, L., Wang, D. W., & Zhou, N. (2022). Trimetazidine enhances myocardial angiogenesis in pressure overload-induced cardiac hypertrophy mice through directly activating Akt and promoting the binding of HSF1 to VEGF-A promoter. *Acta Pharmacol Sin*. <https://doi.org/10.1038/s41401-022-00877-8>
- Silva, D. A., Yu, S., Ulge, U. Y., Spangler, J. B., Jude, K. M., Labao-Almeida, C., Ali, L. R., Quijano-Rubio, A., Ruterbusch, M., Leung, I., Biary, T., Crowley, S. J., Marcos, E., Walkey, C. D., Weitzner, B. D., Pardo-Avila, F., Castellanos, J., Carter, L., Stewart, L., Riddell, S. R., Pepper, M., Bernardes, G. J. L., Dougan, M., Garcia, K. C., & Baker, D. (2019). De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15. *Nature*, 565(7738), 186-191. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0830-7>
- Somers, W., Stahl, M., & Seehra, J. S. (1997). 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J*, 16(5), 989-997. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.5.989>
- Stawski, L., & Trojanowska, M. (2019). Oncostatin M and its role in fibrosis. *Connect Tissue Res*, 60(1), 40-49. <https://doi.org/10.1080/03008207.2018.1500558>
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, 359(6390), 76-79. <https://doi.org/10.1038/359076a0>
- Suthaus, J., Adam, N., Grotzinger, J., Scheller, J., & Rose-John, S. (2011). Viral Interleukin-6: Structure, pathophysiology and strategies of neutralization. *Eur J Cell Biol*, 90(6-7), 495-504. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.10.016>
- Suthaus, J., Tillmann, A., Lorenzen, I., Bulanova, E., Rose-John, S., & Scheller, J. (2010). Forced homo- and heterodimerization of all gp130-type receptor complexes leads to constitutive ligand-independent signaling and cytokine-independent growth. *Mol Biol Cell*, 21(15), 2797-2807. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0240>
- Swirski, F. K. (2015). Inflammation and repair in the ischaemic myocardium. *Hamostaseologie*, 35(1), 34-36. <https://doi.org/10.5482/HAMO-14-09-0045>
- Tacke, I., Dahmen, H., Boisteau, O., Minvielle, S., Jacques, Y., Grotzinger, J., Kuster, A., Horsten, U., Blanc, C., Montero-Julian, F. A., Heinrich, P. C., & Muller-Newen, G. (1999). Definition of receptor binding sites on human interleukin-11 by molecular modeling-guided mutagenesis. *Eur J Biochem*, 265(2), 645-655. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00755.x>

- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., & Kishimoto, T. (1989). Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, 58(3), 573-581. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90438-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90438-8)
- Takahashi, T., & Shirasawa, T. (1994). Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *FEBS Lett*, 342(2), 124-128. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)80485-0](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)80485-0)
- Talley, K., & Alexov, E. (2010). On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins*, 78(12), 2699-2706. <https://doi.org/10.1002/prot.22786>
- Talman, V., & Ruskoaho, H. (2016). Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration. *Cell Tissue Res*, 365(3), 563-581. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2431-9>
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6(10), a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
- Tanford, C., & Roxby, R. (1972). Interpretation of protein titration curves. Application to lysozyme. *Biochemistry*, 11(11), 2192-2198. <https://doi.org/10.1021/bi00761a029>
- Tayal, V., & Kalra, B. S. (2008). Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update. *Eur J Pharmacol*, 579(1-3), 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2007.10.049>
- Teramura, M., Kobayashi, S., Yoshinaga, K., Iwabe, K., & Mizoguchi, H. (1996). Effect of interleukin 11 on normal and pathological thrombopoiesis. *Cancer Chemother Pharmacol*, 38 Suppl, S99-102. <https://doi.org/10.1007/s002800051048>
- Thackeray, J. T., & Bengel, F. M. (2018). Molecular Imaging of Myocardial Inflammation With Positron Emission Tomography Post-Ischemia: A Determinant of Subsequent Remodeling or Recovery. *JACC Cardiovasc Imaging*, 11(9), 1340-1355. <https://doi.org/10.1016/j.jcmg.2018.05.026>
- Thygesen, K., Alpert, J. S., & White, H. D. (2007). Universal definition of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 50(22), 2173-2195. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2007.09.011>
- van der Harst, P., & Verweij, N. (2018). Identification of 64 Novel Genetic Loci Provides an Expanded View on the Genetic Architecture of Coronary Artery Disease. *Circ Res*, 122(3), 433-443. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.312086>
- Wang, Q., Li, D., Cao, G., Shi, Q., Zhu, J., Zhang, M., Cheng, H., Wen, Q., Xu, H., Zhu, L., Zhang, H., Perry, R. J., Spadaro, O., Yang, Y., He, S., Chen, Y., Wang, B., Li, G., Liu, Z., Yang, C., Wu, X., Zhou, L., Zhou, Q., Ju, Z., Lu, H., Xin, Y., Yang, X., Wang, C., Liu, Y., Shulman, G. I., Dixit, V. D., Lu, L., Yang, H., Flavell, R. A., & Yin, Z. (2021). IL-27 signalling promotes adipocyte thermogenesis and energy expenditure. *Nature*, 600(7888), 314-318. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04127-5>
- Weintraub, W. S., Daniels, S. R., Burke, L. E., Franklin, B. A., Goff, D. C., Jr., Hayman, L. L., Lloyd-Jones, D., Pandey, D. K., Sanchez, E. J., Schram, A. P., Whitsel, L. P., American Heart Association Advocacy Coordinating, C., Council on Cardiovascular Disease in the, Y., Council on the Kidney in Cardiovascular, D., Council on, E., Prevention, Council on Cardiovascular, N., Council on, A., Thrombosis, Vascular, B., Council on Clinical, C., & Stroke, C. (2011). Value of primordial and primary prevention for

- cardiovascular disease: a policy statement from the American Heart Association. *Circulation*, 124(8), 967-990. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e3182285a81>
- Wen, R., Tao, W., Li, Y., & Sieving, P. A. (2012). CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res*, 31(2), 136-151. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.005>
- Widjaja, A. A., Chothani, S. P., & Cook, S. A. (2020). Different roles of interleukin 6 and interleukin 11 in the liver: implications for therapy. *Hum Vaccin Immunother*, 16(10), 2357-2362. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1761203>
- Widjaja, A. A., Singh, B. K., Adami, E., Viswanathan, S., Dong, J., D'Agostino, G. A., Ng, B., Lim, W. W., Tan, J., Paleja, B. S., Tripathi, M., Lim, S. Y., Shekeran, S. G., Chothani, S. P., Rabes, A., Sombetzki, M., Bruinstroop, E., Min, L. P., Sinha, R. A., Albani, S., Yen, P. M., Schafer, S., & Cook, S. A. (2019). Inhibiting Interleukin 11 Signaling Reduces Hepatocyte Death and Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis in Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 157(3), 777-792 e714. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.05.002>
- Wilde, M. I., & Faulds, D. (1998). Oprelvekin: a review of its pharmacology and therapeutic potential in chemotherapy-induced thrombocytopenia. *BioDrugs*, 10(2), 159-171. <https://doi.org/10.2165/00063030-199810020-00006>
- Witzenburg, C., & Holmes, J. W. (2019). The Impact of Hemodynamic Reflex Compensation Following Myocardial Infarction on Subsequent Ventricular Remodeling. *J Biomech Eng*. <https://doi.org/10.1115/1.4043867>
- Wolf, J., Rose-John, S., & Garbers, C. (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, 70(1), 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.05.024>
- Wu, S., Chang, G., Gao, L., Jiang, D., Wang, L., Li, G., Luo, X., Qin, S., Guo, X., & Zhang, D. (2018). Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy. *J Mol Med (Berl)*, 96(8), 791-806. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1664-3>
- Xu, D. H., Zhu, Z., Wakefield, M. R., Xiao, H., Bai, Q., & Fang, Y. (2016). The role of IL-11 in immunity and cancer. *Cancer Lett*, 373(2), 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.004>
- Yan, X., Shichita, T., Katsumata, Y., Matsushashi, T., Ito, H., Ito, K., Anzai, A., Endo, J., Tamura, Y., Kimura, K., Fujita, J., Shinmura, K., Shen, W., Yoshimura, A., Fukuda, K., & Sano, M. (2012). Deleterious effect of the IL-23/IL-17A axis and gammadeltaT cells on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*, 1(5), e004408. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.004408>
- Yang, A. S., & Honig, B. (1993). On the pH dependence of protein stability. *J Mol Biol*, 231(2), 459-474. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1294>
- Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q., & Gao, W. (2008). Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(5-6), 347-356. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.08.003>
- Zou, Y., Takano, H., Mizukami, M., Akazawa, H., Qin, Y., Toko, H., Sakamoto, M., Minamino, T., Nagai, T., & Komuro, I. (2003). Leukemia inhibitory factor enhances survival of cardiomyocytes and induces regeneration of myocardium after myocardial infarction. *Circulation*, 108(6), 748-753. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000081773.76337.44>

Zweier, J. L. (1988). Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*, 263(3), 1353-1357. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2826476>

10 Anhang

Im Folgenden ist die Oberflächenpräsentation der Ba/F3-Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren nach der retroviralen Transduktion gezeigt, die mittels Durchflusszytometrie (Abbildung 25).

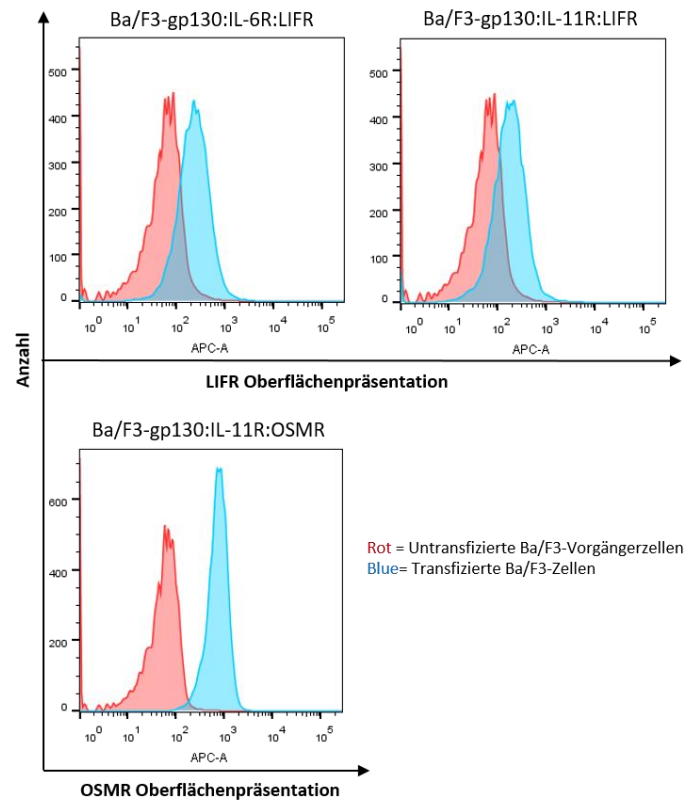


Abbildung 25: Ba/F3-Zellen exprimieren den LIFR und OSMR auf der Oberfläche.

Oberflächenpräsentation des LIFR bzw. OSMR auf den entsprechenden Ba/F3-Zellen (blaue Kurve) und die Vorgängerzellen (rote Kurve). Die Detektion erfolgte durch spezifische Antikörper gegen den LIFR bzw. OSMR.

Im Folgenden sind exemplarische Aufnahmen der Echokardiografie mit und ohne IC7-Fc Behandlung vor und nach I/R verlinkt.

A)



B)



c)



Abbildung 26: IC7-Fc verbessert die Regeneration nach einem Myokardinfarkt.

Exemplarische Videomaterialien der Echokardiografie der C57BL/6N Mäuse im B-Mode. **A)** Echokardiografie eines unbehandelten Myokardiums vor der I/R. **B)** Echokardiografie eines unbehandelten Myokardiums eine Woche nach der I/R. **C)** Echokardiografie des Myokards eines mit IC7-Fc behandelten Myokardiums nach einer Woche Reperfusion.

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Jürgen Scheller** herzlich bedanken. Zum einen für die Überlassung des überaus interessanten Themas und zum anderen für die mir gebotene Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II anfertigen zu dürfen sowie die hervorragende Betreuung. Weiterhin möchte ich ausdrücklich dafür meine Wertschätzung zum Ausdruck bringen, dass mir viel freie Hand gelassen wurde, um auch meine eigenen Ideen zu verwirklichen. Ebenfalls möchte ich mich für das Angebot bedanken, meine Tätigkeit nach Abschluss der Dissertation in seinem Institut fortführen zu können. Danke auch für die ganzen Tischfußballspiele zwischendurch.

Herrn **Prof. Dr. Ulrich Flögel** gilt mein Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein großes Dankeschön geht an **Dr. Doreen M. Floss**, die mir zu jeder Zeit geholfen hat. Sowohl fachlich, als auch in anderen Belangen. Deine Kompetenz war Vorbild, dein Charakter Motivation für mich.

Ein großes Dankeschön geht zudem an **Dr. Jens Moll**. Bei Dir möchte ich mich für die fachliche Unterstützung in der Strukturbiologie bedanken aber auch für die ganzen Flachwitze und die Gespräche über das Training zwischendurch.

Bei **Petra Opreé-Jeremic** bedanke ich für Ihre schier grenzenlose Hilfsbereitschaft und die Unterhaltungen zwischendurch.

Bei meiner wundervollen Freundin **Christiane Seibel** möchte ich mich für jegliche Unterstützung beim Verfassen der Dissertation aber auch für alles andere bedanken. Ich bin unglaublich froh, dass Du an meiner Seite bist.

Bei meinen Freunden **Sean Noran, Nikolas Baleynaud, Marius Jonas, Robin Polz** und **Farhad Bazgir** bedanke ich mich für die ganzen Jahre der Freundschaft und der Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern **Fariba Arvahi** und **Thomas Waldeck** bedanken. Eure stets bedingungslose Unterstützung hat einen erheblichen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. **Danke.**

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlichen Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 06.09.2022

Puyan Rafii