

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

Untersuchungen des Crosstalks  
zwischen IL-6 und dem IL-11R

**Dissertation**

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

vorgelegt von  
Laura Catherine Schultz

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Björn Stork

Diese Arbeit ist in großer Dankbarkeit meinen Eltern und meinen Schwestern gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden zur Veröffentlichung eingereicht:

## **Interleukin-11 receptor is an alternative alpha-receptor for Interleukin-6 and the chimeric cytokine IC7**

Hendrik T. Weitz<sup>1</sup>, Julia Ettich<sup>1</sup>, Puyan Rafii<sup>1</sup>, Christoph Wittich<sup>1</sup>, **Laura Schultz**<sup>1</sup>, Nils C. Frank<sup>1</sup>, Denise Heise<sup>1</sup>, Matthias Krusche<sup>1</sup>, Juliane Lokau<sup>2</sup>, Christoph Garbers<sup>2</sup>, Kristina Behnke<sup>1</sup>, Doreen M. Floss<sup>1</sup>, Harald Kolmar<sup>3,4</sup>, Jens M. Moll<sup>1</sup> and Jürgen Scheller<sup>1, §</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty and University Hospital Düsseldorf, Heinrich Heine University Düsseldorf, 40225 Düsseldorf, Germany.

<sup>2</sup>Institute of Clinical Biochemistry, Hannover Medical School, Hannover, Germany.

<sup>3</sup>Institute for Organic Chemistry and Biochemistry, Technical University of Darmstadt, Alarich-Weiss-Strasse 4, D-64287, Darmstadt, Germany.

<sup>4</sup> Centre of Synthetic Biology, Technical University of Darmstadt.

§Correspondence to:

Jürgen Scheller, Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Universitätsstr. 1, 40225 Düsseldorf, Germany; E-Mail: jscheller@uni-duesseldorf.de

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>5</b>
	<b>TABELLENVERZEICHNIS.....</b>	<b>5</b>
<b>5</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
	5.1 ZYTOKINE DER INTERLEUKINE (IL)-6-FAMILIE, VERGLEICH IL-6 UND IL-11 .....	6
	5.2 DER INTERLEUKIN (IL)-11 REZEPTOR (IL-11R) .....	8
	5.3 ZYTOKIN-REZEPTOR-KOMPLEX.....	9
	5.4 INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION DER ZYTOKINE IL-6 UND IL-11 .....	10
	5.5 HYPER-INTERLEUKIN (IL)-6 .....	12
	5.6 BEGRIFFE PLASTIZITÄT, CROSSTALK, ZELLVIABILITÄT, PROLIFERATION .....	12
	5.7 KLINISCHE RELEVANZ VON CROSSTALK.....	14
	5.8 ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	16
<b>6</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
	<b>VERWENDETE MATERIALIEN.....</b>	<b>17</b>
	6.1 MATERIALIEN FÜR DIE DNA-PRÄPARATION UND SYNTHESE VON REKOMBINANTEN PROTEINEN IN DER ZELLKULTUR .....	17
	6.2 MATERIALIEN FÜR ZELLVIABILITÄTSTESTS UND FÜR ZYTOKINSTIMULATION/ -INHIBITION .....	22
	6.3 MATERIALIEN FÜR DEN PROTEINNACHWEIS (MITTELS SDS-PAGE & WESTERN BLOTTING) .....	23
	6.4 ALLGEMEINE CHEMIKALIEN, GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	25
	<b>METHODEN.....</b>	<b>33</b>
	6.5 METHODEN DER DNA-PRÄPARATION .....	33
	6.6 METHODEN DER ZELLKULTUR .....	36
	6.7 METHODEN DES PROTEINNACHWEISES .....	43
	6.8 METHODEN ZUR INTERAKTIONSANALYSE.....	46
	6.9 STATISTISCHE METHODEN (MITTELWERT, STANDARDABWEICHUNGEN) .....	48

<b>7</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>49</b>
7.1	IL-11R ALS ALTERNATIVER A-REZEPTOR FÜR IL-6 .....	49
7.1.1	<i>hIL-6 aktiviert STAT3- und ERK-Signalwege in IL-6R-defizienten Zellen über den humanen IL-11R.....</i>	50
7.1.2	<i>hIL-6 induziert Proliferation in IL-6R-defizienten Zellen über den humanen IL-11R.....</i>	51
7.1.3	<i>hIL-6 aktiviert STAT3- und ERK-Signalwege in IL-6R-defizienten Zellen über den murinen IL-11R.....</i>	53
7.1.4	<i>hIL-6 induziert Proliferation in IL-6R-defizienten Zellen über den murinen IL-11R.....</i>	54
7.1.5	<i>Keine Signaltransduktion durch murines IL-6 in IL-6R-defizienten Zellen.....</i>	55
7.1.6	<i>Keine Proliferation durch murines IL-6 in IL-6R-defizienten Zellen .....</i>	57
7.2	DIREKTE INHIBIERUNG DES IL-11R UNTERBINDET SIGNALTRANSDUKTION UND PROLIFERATION DURCH IL-6 AUF IL-6R-DEFIZIENTEN ZELLEN.....	59
7.2.1	<i>Inhibierung der STAT3- und der ERK-Phosphorylierung nach Blockierung des mIL-11R.....</i>	59
7.2.2	<i>Inhibierung der Proliferation durch IL-6 nach Blockierung des mIL-11R in IL-6R-defizienten Zellen.....</i>	61
7.3	AFFINITÄT VON IL-6 AN DEN SIL-11R .....	62
7.4	EXPRESSION VON IL-6R-VHH-FC IN STABIL TRANSDUZIERTEN HEK-293-T-ZELLEN.....	63
7.5	ZUSAMMENFASSUNG.....	67
<b>8</b>	<b>DISKUSSION UND FAZIT .....</b>	<b>68</b>
8.1	HUMANES IL-6 LÖST SIGNALTRANSDUKTION UND PROLIFERATION ÜBER DEN HUMANEN SOWIE DEN MURINEN IL-11R AUS .....	68
8.2	FAZIT UND AUSBLICK .....	72
	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>74</b>
	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>83</b>

## 1 Zusammenfassung

Zytokine sind Mediatoren des Immunsystems, die insbesondere als Signalmoleküle der intrazellulären Kommunikation dienen. Mitglieder der IL-6 Zytokinfamilie regulieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen wie etwa die angeborene und erworbene Immunität, Gewebshomöostase und metabolische Prozesse wie den Energie- und Knochenstoffwechsel. Sie sind weiterhin Schlüsselfiguren bei vielen pathologischen Prozessen wie chronischen Entzündungen, Autoimmun-, Infektions- sowie Krebserkrankungen. Aufgrund ihrer vielseitigen Wirkungen zeigt sich eine weitere Erforschung der Interaktionen innerhalb der IL-6-Zytokinfamilie als besonders interessant für die Medizin.

Alle Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie mit Ausnahme von IL-31 nutzen den signaltransduzierenden  $\beta$ -Rezeptor glycoprotein 130 (gp130) oftmals zusammen mit einem Zelltypspezifität vermittelnden  $\alpha$ -Rezeptor und einem zweiten gp130 ähnlichen  $\beta$ -Rezeptor. In der Literatur werden bereits verschiedene Crosstalk-Phänomene beschrieben, welche durch die Nutzung von gp130 ermöglicht werden. In dieser Arbeit wurde ein Crosstalk zwischen IL-6 und dem IL-11R untersucht, wobei sich zeigte, dass der IL-11R als niedrigaffiner  $\alpha$ -Rezeptor dienen kann. Weiterhin war von Interesse, ob sich die durch einen IL-6/ IL-11R Crosstalk aktivierten Signalwege von den durch kanonische Rezeptorkombinationen aktivierten Signalwegen unterscheiden. Dazu wurden nach IL-6 Stimulation von IL-6R defizienten Zellen, die IL-11R exprimieren (Ba/F3-gp130-IL-11R), sowohl mit humanen als auch murinen Zytokinen und Rezeptoren Effekte auf Proliferation und Signaltransduktion untersucht. Hierbei zeigte sich, dass humanes IL-6 in Zellen mit humanem IL-11R sowie in Zellen mit murinem IL-11R Proliferation und Signaltransduktion transduzieren kann. Es wurden bislang keine Unterschiede in den aktivierten Signalwegen gefunden.

Innerhalb der Arbeit wurde zudem untersucht, ob jener Crosstalk auch für murines IL-6 ebenso existiert. Die Ergebnisse konnten den Crosstalk zwischen murinem IL-6 und murinem IL-11R nicht bestätigen.

Auch wurde untersucht, ob eine direkte Interaktion zwischen IL-6 und dem IL-11R besteht. Dazu wurden neutralisierende Antikörper gegen den IL-11R eingesetzt, wodurch eine direkte Interaktion bestätigt werden konnte.

## 2 Abstract

Cytokines are mediators of the immune system, serving in particular as signaling molecules for intracellular communication. Members of the IL-6 cytokine family regulate a variety of physiological processes e. g. the innate and acquired immunity, tissue homeostasis, and metabolic processes such as energy and bone metabolism. They are also key components in many pathological processes, such as cancer, chronic inflammation, autoimmune and infectious diseases. Due to their diverse effects, further research into the interactions within the IL-6 cytokine family is particularly interesting for medicine.

All members of the IL-6 cytokine family, except for IL-31, use the signal-transducing  $\beta$ -receptor glycoprotein 130 (gp130) in conjunction with an  $\alpha$ -receptor mediating cell-type specificity and a second  $\beta$ -receptor similar to gp130. Various crosstalk phenomena that are made possible by the use of gp130 have already been described in the literature. In this work, a crosstalk between IL-6 and the IL-11R was investigated, showing that the IL-11R can serve as a low-affinity  $\alpha$ -receptor. Furthermore, it was of interest whether the signaling pathways activated by an IL-6/ IL-11R crosstalk differ from the signaling pathways activated by canonical receptor combinations. For this purpose, after IL-6 stimulation of IL-6R deficient cells expressing IL-11R (Ba/F3-gp130-IL-11R), both human and murine cytokines and receptors were used to investigate the effects on proliferation and signal transduction. It was shown that human IL-6 can transduce proliferation and signal transduction in cells with human IL-11R and in cells with murine IL-11R. So far, no differences in the activated signaling pathways have been found.

Within the work, it was also examined whether that crosstalk with murine IL-6 also exists. The results could not confirm a crosstalk through murine IL-6 and murine IL-11R.

It was also examined whether there is a direct interaction between IL-6 and the IL-11R. For this purpose, neutralizing antibodies against the IL-11R were used, which confirmed a direct interaction.

## 3 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
BCA	Bicinchonic acid, Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
cm	Zentimeter
COX-2	Cyclooxygenase-2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	<i>Fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
gp130	Glykoprotein 130 kDa
h	Stunde oder human
H-IL-6	Hyper-Interleukin-6
ICD	<i>intracellular domain</i> , intrazelluläre Domäne
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IL-11	Interleukin-11
IL-11R	Interleukin-11-Rezeptor
JAK	Janus-Kinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Lysogeny Broth
Lys	<i>lysate</i> , Zellkulturlysat
m	murin oder Meter
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
PAGE	Polyacrylamid- gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pERK	phosphoryliertes (aktiviertes) ERK
pg	Picogramm
pH	Potential hydrogenii, pH-Wert, Maß für die Protonenkonzentration einer Lösung

pSTAT3	phosphoryliertes (aktiviertes) STAT3	SHP2	<i>SH2 domain-containing tyrosine phosphatase</i> , eine Tyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidenfluorid	sIL-6R	<i>soluble IL-6R</i> , löslicher IL-6R
Ras	<i>Rapidly accelerated sarcoma/ rat sarcoma</i> , ein Proto-Onkogen	sIL-11R	<i>soluble IL-11R</i> , löslicher IL-11R
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma/ rat fibrosarcoma</i> , eine Proteinkinase	STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
RFP	<i>Red Fluorescent Protein</i>	TAE	Tris-Acetat-EDTA
RPM	Rotation pro Minute	TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris- gepufferte Kochsalzlösung
RT	Raumtemperatur	TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween 20</i> , Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit <i>Tween 20</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat	TEMED	Tetraethylmethyldiamin
SDS- PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid- gelelektrophorese	V	Volt
sec	Sekunden	VHH	<i>Variable domain of heavy-chains-only antibodies</i> , Fragment eines nicht- humanen Antikörpers
sgp130	<i>soluble gp130</i> , lösliches gp130		

## 4 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PROTEINSTRUKTUREN VON IL-6 UND IL-11 .....	7
ABBILDUNG 2: IL-6-FAMILIE UND IHRE REZEPTORKOMPLEXE.....	8
ABBILDUNG 3: <i>CLASSIC-SIGNALING</i> UND <i>TRANS-SIGNALING</i> VON IL-6 UND IL-11 .....	11
ABBILDUNG 4: IL-6 INDUZIERT STAT3- UND ERK-PHOSPHORYLIERUNG IN IL-6R DEFIZIENTEN ZELLEN, DIE DEN hIL-11R EXPRIEMIEREN .....	51
ABBILDUNG 5: IL-6 INDUZIERT PROLIFERATION IN IL-6R DEFIZIENTEN ZELLEN, DIE DEN hIL-11R EXPRIEMIEREN .....	52
ABBILDUNG 6: IL-6 INDUZIERT STAT3- UND ERK-PHOSPHORYLIERUNG IN IL-6R DEFIZIENTEN ZELLEN, DIE DEN mIL-11R EXPRIEMIEREN.....	53
ABBILDUNG 7: IL-6 INDUZIERT PROLIFERATION IN IL-6R DEFIZIENTEN ZELLEN, DIE DEN mIL-11R EXPRIEMIEREN .....	55
ABBILDUNG 8: MURINES IL-6 IST NICHT IN DER LAGE STAT3 ODER ERK IN IL-6R DEFIZIENTEN ZELLEN ZU AKTIVIEREN.....	56
ABBILDUNG 9: MURINES IL-6 INDUZIERT KEINE PROLIFERATION IN IL-6R DEFIZIENTEN ZELLEN, DIE DEN mIL-11R EXPRIEMIEREN.....	57
ABBILDUNG 10: ZELLVIABILITÄTSASSAY NACH STIMULATION VON BA/F3-GP130-GFP MIT mIL-6 UND hIL-6 SOWIE OHNE UND MIT ZUGABE VON LÖSLICHEN REZEPTOREN .....	58
ABBILDUNG 11: WESTERN-BLOTTING-ANALYSE VON ZELLYSATEN DER BA/F3-GP130-mIL-11R GEGEN pSTAT3, STAT3, pERK, ERK NACH STIMULATION MIT IL-6, IL-11 UND H-IL6. FÜR DIE INHIBITION WURDE VOR STIMULATION MIT DEM NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPER ANTI-mIL-11R VORINKUBIERT. ....	60
ABBILDUNG 12: ZELLVIABILITÄTSASSAY NACH STIMULATION VON BA/F3-GP130-mIL-11R MIT HUMANEN ZYTOKINEN SOWIE OHNE UND MIT ZUGABE DES ANTI-mIL-11R .....	61
ABBILDUNG 13: SENSORGRAMME DER BINDUNG VON IL-6 AN DEN sIL-11R-SENSORCHIP.....	63
ABBILDUNG 14: EXPRESSIONS-WESTERN-BLOTTING-ANALYSE VON HEK-293-T UND HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc GEGEN ANTI-Fc .....	64
ABBILDUNG 15: EXPRESSIONS-WESTERN-BLOTTING-ANALYSE DER HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc-EINZELKLONE GEGEN ANTI-Fc .....	65
ABBILDUNG 16: EXPRESSIONS-WESTERN-BLOTTING VON ZELLYSATEN DER HEK-293-T-GFP GEGEN pSTAT3, STAT3, pERK, ERK NACH STIMULATION MIT IL-6, IL-11 UND H-IL-6.....	66
ABBILDUNG 17: EXPRESSIONS-WESTERN-BLOTTING VON ZELLYSATEN DER HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc-GFP GEGEN pSTAT3, STAT3, pERK, ERK NACH STIMULATION MIT IL-6, IL-11 UND H-IL-6 .....	67

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: VERWENDETE ANTIBIOTIKA .....	17
TABELLE 2: HERGESTELLTE UND GENUTZTE PLASMIDE .....	18
TABELLE 3: EUKARYOTISCHE ZELLINIEN .....	20
TABELLE 4: VERWENDETE PROTEINE UND INHIBITOREN .....	22
TABELLE 5: LÖSLICHE REZEPTOREN FÜR PROLIFERATIONSASSAYS .....	22
TABELLE 6: PRIMÄRE ANTIKÖRPER.....	23
TABELLE 7: SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER.....	24
TABELLE 8: CHEMIKALIEN .....	25
TABELLE 9: ANGEWANDTE GERÄTE UND IHRE HERSTELLER .....	27
TABELLE 10: KITS .....	28
TABELLE 11: VERWENDETE VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	29
TABELLE 12: VERWENDETE PUFFER BZW. LÖSUNGEN UND IHRE ZUSAMMENSETZUNGEN .....	30
TABELLE 13: VERWENDETE SOFTWARE.....	32

## 5 Einleitung

### 5.1 Zytokine der Interleukine (IL)-6-Familie, Vergleich IL-6 und IL-11

Zytokine sind Bestandteile des Immunsystems, sogenannte Botenstoffe. Sie können in Interleukine (IL), Interferone, Chemokine und Wachstumsfaktoren unterteilt werden. Die in dieser Doktorarbeit vorrangig thematisierten Interleukine IL-6 und IL-11 dienen der körpereigenen Kommunikation zwischen den Zellen und sind über diesen Weg an Immun-, sowie Entzündungsreaktionen beteiligt (Tanaka, Narazaki et al. 2014). IL-6 und IL-11 spielen eine entscheidende Rolle für die Regulation komplexer zellulärer Prozesse wie Genaktivierung, Proliferation und Differenzierung (Heinrich, Behrmann et al. 1998, Garbers and Scheller 2013). Weiterhin sind Zytokine der IL-6-Familie an vielen Funktionen, einschließlich der B-Zell-Stimulation und der Regulation der hepatischen Akute-Phase-Reaktion, sowie an metabolischen Funktionen beteiligt (Rose-John 2018). IL-6 ist z. B. klassischerweise in proinflammatorische und regenerative Prozesse involviert (Scheller, Chalaris et al. 2011).

Mitglieder der IL-6-Familie sind IL-6, IL-11, IL-27, IL-30, IL-31, Onkostatin M (OSM), Leukämie inhibierender Faktor (LIF), Cardiotrophin-1 (CT-1), Cardiotrophin-like Zytokin (CLC), ziliärer neurotropher Faktor (CNTF). Alle diese Mitglieder verbindet eine ähnliche strukturelle Morphologie. IL-6 und IL-11 sind beide tetrahelikale Moleküle, welche 3 Verbindungsloops besitzen (vgl. Abb. 1). Sie besitzen eine *up-up-down-down*-Topologie (vgl. Abb. 1). Das bedeutet, dass die Helix A und B über einen langen *Loop* verbunden sind und somit parallel zueinander vorliegen, während sich zwischen Helix B und C ein kurzer *Loop* befindet und die Helices dadurch antiparallel vorliegen. Helix C und D verbindet wieder ein langer *Loop*, weshalb diese parallel zueinander sind (Heinrich, Behrmann et al. 1998).

Obwohl IL-6 und IL-11 nur eine geringe Sequenzhomologie teilen (Curtis, Hilton et al. 1997), sind sich die Kristallstrukturen der beiden Zytokine sehr ähnlich (vgl. Abb. 1). Beide induzieren über einen Glykoprotein 130 (gp130) -Homodimer Signaltransduktion (vgl. Abb. 2), im Gegensatz zu den anderen Zytokinen der IL-6-Familie (Yin, Taga et al. 1993, Heinrich, Behrmann et al. 1998, Garbers and Scheller 2013). Die Signaltransduktion kann erst durch Rekrutierung eines zweiten gp130-Moleküls stattfinden (Paonessa, Graziani et al. 1995).

Außerdem verfügen die Zytokine IL-6 und IL-11 über gemeinsame Signalwege, führend hierbei ist die *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) Aktivierung (Rose-John 2018).

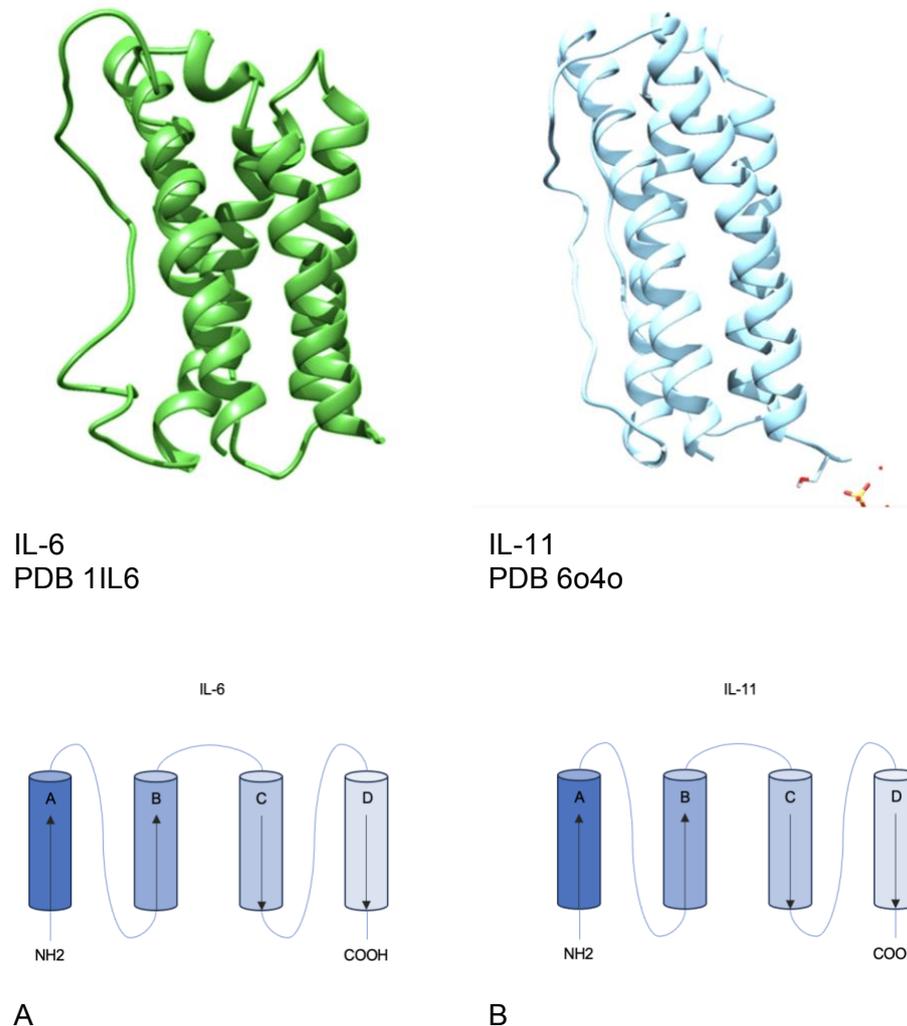


Abbildung 1: **Proteinstrukturen von IL-6 und IL-11**

A oben: *Sites* von IL-6, 3D Struktur von IL-6 (PDB 1IL6)  
 A unten: Helices von IL-6 A-D (up up down down), Topologie  
 B oben: *Sites* von IL-11, 3D Struktur von IL-11 (PDB 6o4o)  
 B unten: Helices von IL-11 A-D (up up down down), Topologie

Im Vergleich zeigen die Zytokine IL-6 und IL-11 im Körper teilweise gegensätzliche Rollen in der Aktivierung verschiedener Signalwege (Garbers and Scheller 2013). IL-6 führt *in vivo* beispielsweise am Herzen zu Hypertrophie und Fibrose (Obana, Maeda et al. 2010, Mir, Chatterjee et al. 2012). IL-11 unterstützt dagegen die Regeneration (Obana, Maeda et al. 2010), neuere Daten zeigen allerdings auch profibrotische Funktionen insbesondere in Herz, Leber und Niere (Schafer, Viswanathan et al. 2017). In der Lunge, etwa bei asthmatischen

Erkrankungen, führt IL-6 zu einem Anstieg von TH2-Zellen, im Gegensatz dazu senkt IL-11 die TH2-Zellanzahl (Wang, Homer et al. 2000, Doganci, Eigenbrod et al. 2005). In Bezug auf die Knochenhämostase führt IL-6 zu einem Anstieg der Osteoklastenbildung, während IL-11 zu einer Steigerung der Osteoblastenbildung führt (Poli, Balena et al. 1994, Takeuchi, Watanabe et al. 2002). Neuere Daten zeigen außerdem auch in der Leber unterschiedliche Effekte der beiden Zytokine (Widjaja, Chothani et al. 2020). Dies führt zu der Frage, wie IL-6 bei Bindung über den IL-11R agiert.

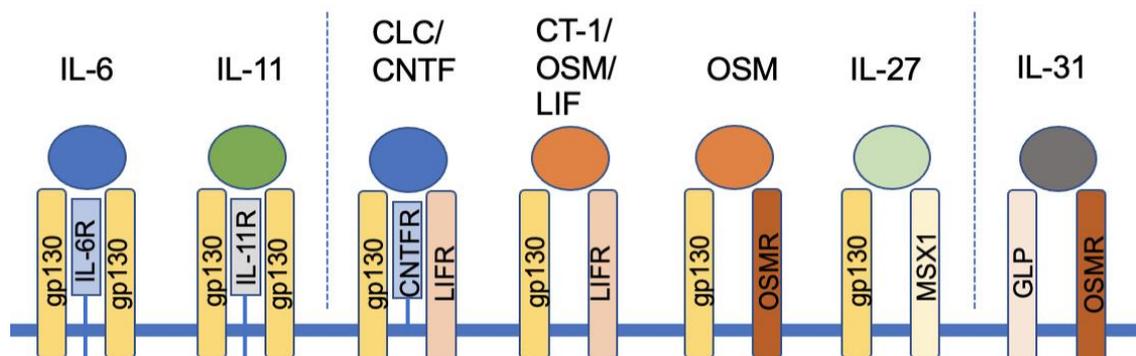


Abbildung 2: **IL-6-Familie und ihre Rezeptorkomplexe**

IL-6 und IL-11 nutzen als  $\beta$ -Rezeptor ein Homodimer aus gp130, während die anderen Zytokine der IL-6 Familie für die Signaltransduktion zusätzlich oder stattdessen andere Rezeptoren wie LIFR, OSMR oder MSX1, sowie als  $\alpha$ -Rezeptor CNTFR benötigen. Abgesehen von IL-31 nutzen alle Zytokine der IL-6-Familie einen Homo- oder Heterodimer vom ubiquitär vorkommenden gp130. Eigene Darstellung in Anlehnung an (Heinrich, Behrmann et al. 2003)

## 5.2 Der Interleukin (IL)-11 Rezeptor (IL-11R)

Der Interleukin (IL)-11 Rezeptor, im Folgenden als IL-11R bezeichnet, wurde auf Lymphozyten, B-Zellen, Makrophagen, Endothelzellen, hämatopoetischen Zellen und Osteoklasten gefunden (Putoczki and Ernst 2010). Wie beim IL-6R ist der strukturelle Aufbau in verschiedene Domänen gegliedert, die Immunglobulin-ähnliche Domäne (D1), zwei Fibronectin Typ III ähnliche Domänen (D2 und D3), die zusammen die Zytokinbindestelle, das sog. Cytokine binding module (CBM) ausbilden und die intrazelluläre Domäne (ICD). Die ICD des IL-11R besteht aus 31 Aminosäuren, die des IL-6R aus 82 Aminosäuren (Heinrich, Behrmann et al. 1998). Im Gegensatz zum  $\beta$ -Rezeptor gp130 spielen beim IL-11R sowie beim IL-6R die ICDs keine aktive Rolle bei der Signalweiterleitung (Martens, Bode et al. 2000).

Zur Signaltransduktion benötigt der IL-11R, ebenso wie der IL-6R, einen gp130-Homodimer (Hilton, Hilton et al. 1994). Analog zu den Zytokinen IL-6 und IL-11 weisen die extrazellulären Domänen des IL-11R und des IL-6R zwar nur eine geringe Sequenzhomologie von ca. 24 % auf, zeigen aber einen ähnlichen strukturellen und funktionellen Aufbau (Hilton, Hilton et al. 1994, Curtis, Hilton et al. 1997). Der humane IL-11R teilt 83 % Sequenzhomologie mit dem murinen IL-11R (Nandurkar, Hilton et al. 1996).

### 5.3 Zytokin-Rezeptor-Komplex

Die Kristallstruktur des Zytokin-Rezeptor-Komplexes IL-6/IL-6R/gp130 wurde identifiziert (Chow, He et al. 2001, Boulanger, Bankovich et al. 2003). Die Zytokin-Rezeptor-Komplexe IL-6/IL-6R und IL-11/IL-11R scheinen sich zu ähneln (Matadeen, Hon et al. 2007, Xu, Kershaw et al. 2010, Lupardus, Skiniotis et al. 2011). Um an gp130 binden zu können, benötigen beide die Anwesenheit der spezifischen  $\alpha$ -Rezeptoren IL-6R oder IL-11R (Rose-John 2012). Durch eine Kombination von Mutagenesestudien, Strukturaufklärung und Molecular Modeling konnten die Bindungsstellen von IL-6 und IL-11 an gp130 und die entsprechenden  $\alpha$ -Rezeptor definiert werden. Diese Daten legen eine sehr ähnliche Architektur von IL-6/IL-6R/gp130- und IL-11/IL-11R/gp130-Komplexen nahe. (Pflanz, Tacke et al. 1999, Barton, Hall et al. 2000, Chow, He et al. 2001, Boulanger, Bankovich et al. 2003, Metcalfe, Aizel et al. 2020)

Sowohl IL-6 als auch IL-11 besitzen 3 Bindungsstellen *site* I, II, III. *Site* I wird durch Teile der Helix B und D gebildet, *site* II besteht aus Teilen der Helix A und C; der terminale Teil des C-D Loops bildet *site* III (Heinrich, Behrmann et al. 1998). Bei beiden Zytokinen stellt *site* I die Bindungsstelle zum IL-6R oder IL-11R dar, wogegen *site* II und III von IL-6 oder IL-11 die Bindungsstellen für gp130 bilden (Garbers and Scheller 2013). *Site* II und *site* III von IL-6, gebunden an den IL-6R, binden jeweils ein gp130 Molekül, können allerdings alleine keine Dimerisierung bewirken (Paonessa, Graziani et al. 1995). Untersuchungen zeigten, dass für die Dimerisierung zwei unabhängige *sites* von IL-6 benötigt werden, womit *site* II und III für die folgend mögliche Signaltransduktion essentiell sind (Paonessa, Graziani et al. 1995).

## 5.4 Intrazelluläre Signaltransduktion der Zytokine IL-6 und IL-11

Nach Bindung des Liganden an den Rezeptorkomplex, bestehend aus dem jeweiligen spezifischen Rezeptor als  $\alpha$ -Rezeptor und gp130 als  $\beta$ -Rezeptor, werden intrazellulär Rezeptor-assoziierte Janus-Kinasen phosphoryliert. Der sogenannte JAK/STAT-Signalweg wird aktiviert. Diese Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung und Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren wie STAT3, welche folglich zum Nukleus translozieren. Diese Signalkaskade führt zur Aktivierung von Transkription (Heinrich, Behrmann et al. 1998, Heinrich, Behrmann et al. 2003). Zellüberleben, Proliferation, allerdings auch mit entzündlichen Erkrankungen assoziierte Immunantworten, sowie Tumorprogression werden durch STAT3-Aktivierung gefördert (Putoczki and Ernst 2010).

Ein weiterer Signalweg, der Ras/Raf/MAPK-Signalweg, führt über die Tyrosinphosphatase SHP2 zur Phosphorylierung von ERK1/2 (Takahashi-Tezuka, Yoshida et al. 1998). In dieser Arbeit ist sowohl der JAK/STAT-Signalweg, als auch der Ras/Raf/MAPK-Signalweg relevant.

Bisher sind verschiedene Wege bekannt, wie durch IL-6 und IL-11 Signaltransduktion ausgelöst werden kann (Scheller and Rose-John 2006). In Abbildung 3 sind *Classic-Signaling* und *Trans-Signaling* dargestellt. Das *Classic-Signaling* wird über einen membrangebundenen Rezeptor aktiviert, das *Trans-Signaling* dagegen kann über eine lösliche Form des Rezeptors aktiviert werden (Mullberg, Schooltink et al. 1992, Scheller and Rose-John 2006, Lokau, Nitz et al. 2016). Zusätzlich wurde das *Cluster-Signaling* beschrieben, welches auftritt, wenn ein Zytokin-Rezeptor-Komplex gebunden an Transmitterzellen an gp130 auf einer Empfängerzelle bindet und Signale induziert (Lamertz, Rummel et al. 2018). Dies verdeutlicht die Komplexität der Signalwege.

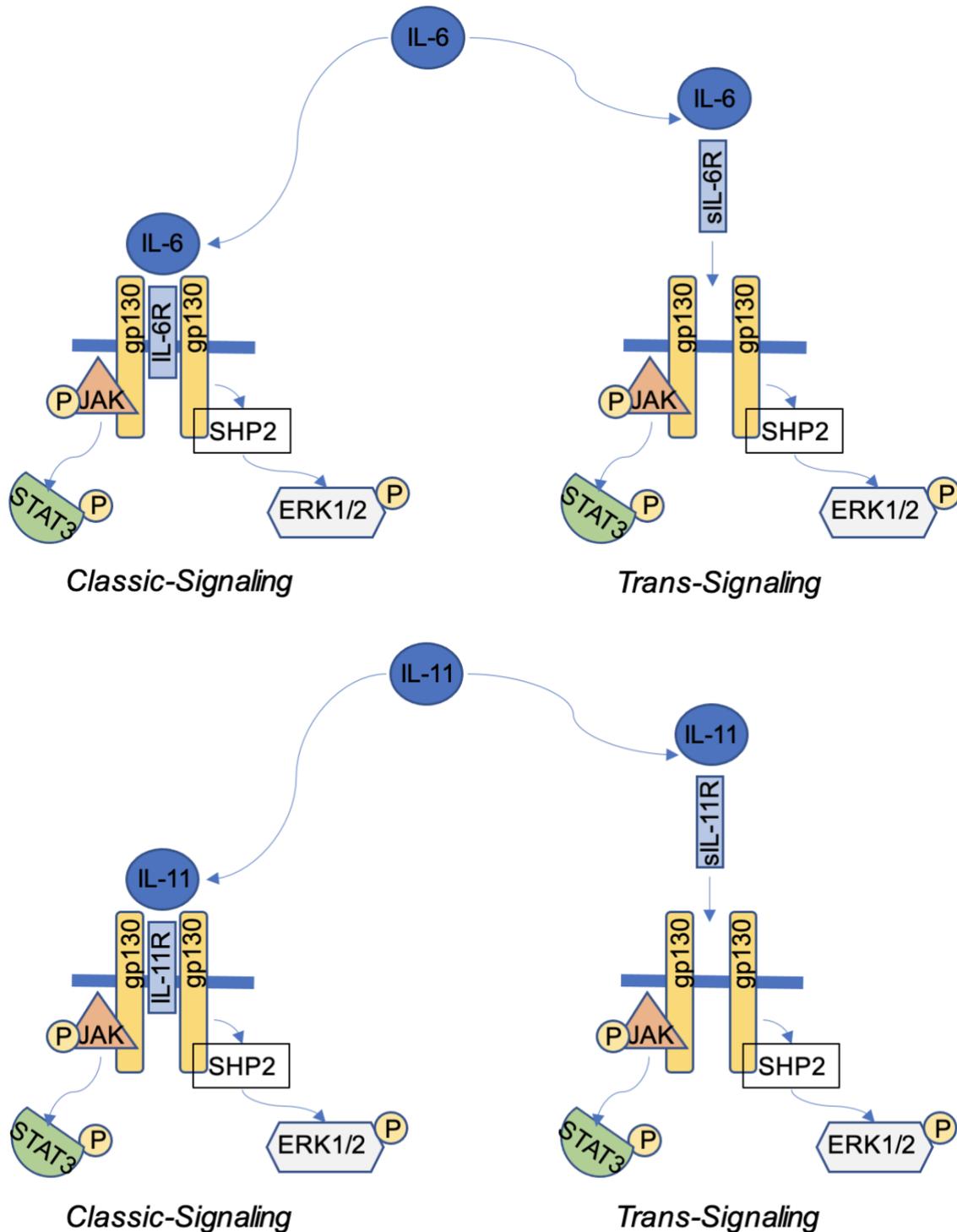


Abbildung 3: *Classic-Signaling* und *Trans-Signaling* von IL-6 und IL-11

IL-6 bindet beim *Classic-Signaling* an den membrangebundenen IL-6R und IL-11 bindet an den membrangebundenen IL-11R. *Trans-Signaling* wird aktiviert bei Bindung von IL-6 an den löslichen IL-6R oder von IL-11 an den löslichen IL-11R. Über beide Signalwege wird ein Komplex mit zwei gp130-Einheiten gebildet. Dieser Komplex aktiviert über ein gp130-Homodimer den JAK/STAT3 Signalweg (auf der linken Seite jeder Grafik dargestellt). Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung von gp130, sowie von STAT3 durch Januskinasen. Durch den Ablauf dieses Signalweges wird nun Signaltransduktion induziert. Die jeweiligen Komplexe des *Classic-* und *Trans-Signaling*s können außerdem den Ras/Raf/MAPK-Signalweg aktivieren (auf der rechten Seite jeder Grafik dargestellt). Hierbei wird die Tyrosinphosphatase SHP2 durch den Komplex aktiviert, folglich wird ERK1/2 phosphoryliert. Eigene Darstellung in Anlehnung an (Rose-John 2012)

## 5.5 Hyper-Interleukin (IL)-6

Das Hyper-Interleukin-6 (H-IL-6) ist ein synthetisch hergestelltes Fusionsprotein, das aus dem Zytokin IL-6 und seinem löslichen Rezeptor sIL-6R besteht und durch eine flexible Peptidkette miteinander verbunden wird (Fischer, Goldschmitt et al. 1997). Das Fusionsprotein ist auf gp130-exprimierenden Zellen bereits bei einer 100- bis 1000-fach niedrigeren Konzentration als die natürliche Kombination aus natürlich vorkommendem IL-6 und sIL-6R vollständig aktiv (Fischer, Goldschmitt et al. 1997). Zudem wirkt das Fusionsprotein länger als IL-6 (Peters, Blinn et al. 1998). Verglichen mit natürlichen IL-6/sIL-6R-Komplexen wird im Fusionsprotein H-IL-6 eine Situation nachgeahmt, in der alle IL-6-Moleküle fest in solchen Komplexen vorliegen (Baran, Hansen et al. 2018). Es wurde gezeigt, dass selbst bei hohen IL-6-Konzentrationen nur maximal 13 % der sIL-6R als natürliche IL-6/sIL-6R-Komplexe nachweisbar waren (Baran, Hansen et al. 2018). Der Vorteil des Fusionsproteins H-IL-6 liegt darin, dass kein membranständiger  $\alpha$ -Rezeptor benötigt wird, die Zelle folglich keinen spezifischen IL-6R exprimieren muss, damit über gp130 Signaltransduktion ablaufen kann (Peters, Blinn et al. 1998).

Auf diesem Wissen basierten die Eignung und folglich die Nutzung von H-IL-6 als Positivkontrolle in den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen.

## 5.6 Begriffe Plastizität, Crosstalk, Zellviabilität, Proliferation

### **Plastizität**

Unter dem Begriff *Plastizität* versteht man die funktionelle sowie die strukturelle Anpassungsfähigkeit der Zellen an unterschiedliche Bedingungen. Zellen können sich an verschiedene Umstände adaptieren. Beispielsweise weisen Nervenzellen eine synaptische Plastizität auf, wodurch die Zellen sich, etwa durch morphologische Umgestaltung von Synapsen, an unterschiedliche Gegebenheiten anpassen und somit verschiedene Funktionen ermöglichen sowie neue Funktionen erlernen können (Feldman 2009). Auch Muskelzellen modifizieren ihre Eigenschaften unter unterschiedlichen Umwelteinflüssen und ermöglichen somit eine Anpassung an neue Bedingungen (Fuentes, Zuloaga et al. 2014).

Auf der Zelloberfläche findet sich Plastizität auch bei Rezeptoren wieder, sodass ein Ligand nicht nur nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip binden kann, sondern sich der Rezeptor

innerhalb einer gewissen Spannbreite an seinen Liganden anpassen kann, wodurch ein Rezeptor mehrere Liganden binden kann (Quintana, Soto et al. 2015).

Innerhalb der IL-6-Zytokinfamilie wurde bereits von IL-6R-Plastizität berichtet; neben IL-6 kann auch CNTF an den IL-6R binden (Rose-John 2018). Alle IL-6 artigen Zytokine können zudem an gp130 binden (Heinrich, Behrmann et al. 2003).

### **Crosstalk**

Im Zusammenhang mit zellulärer Signaltransduktion beschreibt der Begriff Crosstalk die Aktivierung von Rezeptoren durch Liganden, die normalerweise an andere Rezeptoren binden. Neben der Möglichkeit, an ihren spezifischen Hauptrezeptor zu binden, können Rezeptorliganden in einigen Fällen folglich an weitere Rezeptoren binden, ggf. mit geringerer Affinität, und Signalwege auslösen.

Innerhalb der IL-6-Familie konnte schon mehrfach Crosstalk nachgewiesen werden (Schuster, Kovaleva et al. 2003, Garbers, Hermanns et al. 2012, Garbers, Spudy et al. 2013). Das Zytokin CNTF war in der Lage, an den IL-6R zu binden und über gp130 und den LIF-R Signaltransduktion zu induzieren (Schuster, Kovaleva et al. 2003). Auch wurde ein Crosstalk zwischen p28, einer Untereinheit des Zytokins IL-27, und dem IL-6R gezeigt (Garbers, Spudy et al. 2013).

Zytokine und ihre Rezeptoren funktionieren als ein komplexes Netzwerk. Dieses Netzwerk umfasst sowohl homo- als auch heterodimere Formationen. Auch Crosstalk mit anderen Signalkomplexen ist Teil dieses Netzwerkes (Salanga, O'Hayre et al. 2009).

### **Zellviabilität und Proliferation**

Der Begriff Zellviabilität beschreibt die Anzahl der lebenden Zellen in einer Zellpopulation (Stoddart 2011). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Zellviabilität zu messen (Schroterova, Kralova et al. 2009). Sie kann beispielsweise wie in dieser Arbeit über die Zellproliferation gemessen werden.

Der Begriff Proliferation bezeichnet das Wachstum von Zellen. Dieses Wachstum kann mithilfe der Proliferationsassays gemessen werden (vgl. Kapitel 6.6.8).

## 5.7 Klinische Relevanz von Crosstalk

Die Signalwege von IL-6 und IL-11 bieten sowohl durch Inhibition als auch durch Aktivierung viele Möglichkeiten der Intervention. Davon werden bereits erste Beispiele experimentell oder therapeutisch in der Klinik angewendet (Garbers and Scheller 2013).

IL-6 und IL-11 sind in der Körperflüssigkeit gesunder Individuen nur im unteren Pikogramm pro Millimeter-Maßstab vorhanden. Es wurde jedoch beschrieben, dass viele verschiedene Zelltypen auf einen adäquaten Stimulus wie z. B. Verletzungen oder Infektionen mit der verstärkten Produktion dieser beiden Zytokine reagieren (Stanley and Lacy 2010).

Da IL-6 und IL-11 teilweise gegensätzliche Rollen übernehmen, wenn sie über ihren klassischen Weg Signalwege aktivieren (vgl. Kapitel 5.1), könnte dies bedeuten, dass eine IL-6/IL-11R induzierte Wirkung mit einer IL-11/IL-11R induzierten Wirkung vergleichbar ist. Wenn IL-6 beispielsweise so modifiziert werden könnte, dass es nur den IL-11R als  $\alpha$ -Rezeptor nutzt und nicht den IL-6R, wäre es anzunehmen, dass eine selektive Wirkung z. B. an Kardiomyozyten und Fibroblasten erreicht werden kann (Garbers and Scheller 2013).

Die Wundheilung stellt einen weiteren interessanten Bereich für den Crosstalk dar. Wundheilung ist ein komplexer biologischer Prozess (Gurtner, Werner et al. 2008). Vorarbeiten zeigten bereits unterschiedliche Phänotypen hinsichtlich DSS-induzierter Colitis und Wundheilung der Haut von IL-6<sup>-/-</sup> und IL-6R<sup>-/-</sup> Mäusen (McFarland-Mancini, Funk et al. 2010, Sommer, Engelowski et al. 2014). Das Zytokin IL-6 transduziert über den IL-6R und gp130 Signale (Sommer, Engelowski et al. 2014). Aus diesem Grund hätte man einen ähnlichen Phänotyp von IL-6R<sup>-/-</sup> und IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen erwarten können. IL-6R<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten jedoch anders als die IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse keine Verzögerung der Wundheilung und bei der DSS-induzierten Colitis keinen Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen (McFarland-Mancini, Funk et al. 2010, Sommer, Engelowski et al. 2014).

Sowohl IL-6 als auch IL-11 beeinflussen die Wundheilung. Im Gegensatz zu IL-6R<sup>-/-</sup> Mäusen führte ein Mangel des IL-11R bei Mäusen nicht nur zu einer reduzierten Wundheilung, sondern sogar zu einer Verstärkung der vorangegangenen Schädigung (Nishina, Komazawa-Sakon et al. 2012). In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass IL-11 im Falle von akuten Leberschäden Einfluss auf die hepatische Wundheilung nimmt. Hepatozyten sind in der Lage, auf oxidativen Stress mit der Sezernierung von IL-11 zu reagieren; IL-11 kann folglich durch kompensatorische Hepatozytenproliferation den oxidativen Stress abmildern (Nishina, Komazawa-Sakon et al. 2012).

Alle diese Beobachtungen bezüglich der Wundheilung unterstützen das Vorhandensein eines alternativen Rezeptors für IL-6, nicht jedoch für IL-11. Daraus lässt sich folgern, dass ein Crosstalk zwischen IL-6 und dem IL-11R auch für die Wundheilung relevant sein könnte.

Darüber hinaus werden allerdings auch in einer steigenden Anzahl von Studien chronische Entzündungen, an denen IL-6 und IL-11 durch ihre Rolle im Immunsystem beteiligt sind, mit Krebs assoziiert (Grivennikov, Karin et al. 2009, Park, Lee et al. 2010). Da sowohl IL-6 als auch IL-11 mit einer STAT3-Aktivierung assoziiert werden, wodurch das Überleben, die Proliferation und die Angiogenese des Tumors begünstigt werden können, wurde beispielsweise bereits eine Hemmung von STAT3 als neues therapeutisches Ziel diskutiert (Putoczki and Ernst 2010). Immer mehr Fälle zeigen, dass die Unterdrückung der STAT3-Aktivierung zum Untergang von Tumorzellen führt, was wiederum die Involvierung dieses Moleküls in die Tumorgenese belegt (Bromberg 2002).

Bezüglich IL-11 wurde eine Verbindung von Entzündung zu Krebs hergestellt, da eine erhöhte IL-11-Expression mit einer anhaltenden STAT3-Aktivierung bei entzündungsbedingtem Magen-Darm-Krebs beim Menschen beobachtet wurde (Putoczki and Ernst 2010).

Da beide Zytokine bei der Entstehung von Krebs relevant zu sein scheinen, könnte ein Crosstalk von IL-6 und dem IL-11R eine interessante Komponente darstellen, die es weiter zu verfolgen gilt. Auch eröffnen sich möglicherweise neue Angriffstellen für weitere Therapien.

## 5.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel meiner Forschung war es, dass zu den bereits bekannten Crosstalk Interaktionen innerhalb der IL-6-Familie, z. B. zwischen CNTF und dem IL-6R (Schuster, Kovaleva et al. 2003, Salanga, O'Hayre et al. 2009), auch weitere Interaktionen mit diesem Prinzip untersucht werden und der Bereich des Crosstalks ausgeweitet wird. Das Ziel war, die Interaktion zwischen dem Zytokin IL-6 und dem IL-11-Rezeptor zu untersuchen.

Die Annahme, dass IL-6 mit einem weiteren Rezeptor interagiert, wurde aufgrund einiger Studien schlüssig (McFarland-Mancini, Funk et al. 2010, Sommer, Engelowski et al. 2014). Über diesen weiteren Rezeptor induziert IL-6 auch ohne einen IL-6R Signaltransduktion.

In HT-29-Zellen, welche den IL-6R nicht exprimieren, wurde gezeigt, dass diese Zellen IL-6 responsiv sind (Li, Hsieh et al. 2009). Weiterhin wurde in HUVEC-Zellen, welche ebenfalls keinen IL-6R exprimieren, gezeigt, dass IL-6 mit diesen Zellen interagiert und folglich Einfluss auf die Expression verschiedener Moleküle nimmt (Watson, Whittaker et al. 1996). Keine dieser Zelllinien exprimiert den IL-6R, jedoch exprimieren alle den IL-11R (Mahboubi, Biedermann et al. 2000, Chen, Lin et al. 2002, Yoshizaki, Nakayama et al. 2006).

Bei näherer Betrachtung der IL-6-Familie fällt auf, dass IL-6 und IL-11 eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen. Diese beiden Zytokine stellen außerdem die einzigen beiden Mitglieder dar, die über einen gp130-Homodimer Signaltransduktion auslösen (Heinrich, Behrmann et al. 1998). Diese Gemeinsamkeiten bestärken weiter, dass es sich bei dem alternativen Rezeptor um den IL-11R handelt.

Aus diesem Grund wurde sowohl die Signaltransduktion als auch die darauf folgende Proliferation durch IL-6 über den IL-11R untersucht, um indirekt die Interaktion nachzuweisen. Diese Untersuchungen wurden sowohl mit humanen und murinen Zytokinen als auch mit humanen und murinen Rezeptoren durchgeführt. Die direkte Interaktion wurde anschließend mithilfe eines Antikörpers *anti-mIL-11R* untersucht. Um weiterhin das Bindungsverhalten in Bezug auf Affinität und Kinetik zu untersuchen, wurde die Bindung zusätzlich mithilfe der Oberflächenplasmonresonanz analysiert.

Über die Zytokine und insbesondere die IL-6-Familie ist bereits bekannt, dass sie eine große Bedeutung innerhalb des Immunsystems besitzen (Garbers and Scheller 2013). Zukünftig könnte der geschilderte Ansatz zu einer Weiterentwicklung von Therapien und Beeinflussung des Immunsystems über neu entdeckte Angriffspunkte führen.

## 6 Material und Methoden

### Verwendete Materialien

#### 6.1 Materialien für die DNA-Präparation und Synthese von rekombinanten

##### Proteinen in der Zellkultur

###### 6.1.1 Antibiotika

Die im Folgenden aufgelisteten Antibiotika wurden für die DNA-Präparation eingesetzt und dienen der Ausübung eines Selektionsdrucks auf die transfizierte Zellen. Diese Antibiotika kamen aufgrund der in den genutzten Plasmiden exprimierten Resistenzgene zum Einsatz und ermöglichten so eine gewünschte Selektion.

Tabelle 1: verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration	Hersteller
Ampicillin	stock: 100 mg/ ml eingesetzt: 200 µg/ ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Geneticin (G418)	stock: 50 mg/ ml eingesetzt: 500 µg/ ml	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Hygromycin B	stock: 50 mg/ ml eingesetzt: 200 µg/ ml	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot
Puromycin	stock: 10 mg/ ml eingesetzt: 1,5 µg/ ml	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

###### 6.1.2 Nährmedien zur Kultivierung von prokaryotischen Zellen

Zur Kultivierung von Mikroorganismen, wie *Escherichia coli* Bakterien, dienen flüssige und feste *Lysogeny Broth* (LB)-Medien (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) als Nährmedien.

LB-Medium: Trypton 1%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl 1%, pH 7,2

LB-Agar: Trypton 1%, Hefeextrakt 0,5%, NaCl 1%, Agar-Agar 1,5%, pH 7,2

### 6.1.3 Plasmide

Plasmide sind extrachromosomale ringförmige DNA-Moleküle prokaryotischer Zellen. Die in der Biochemie verwendeten Plasmide sind entsprechend der Fragestellung angepasst. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit zur Anwendung gekommenen Plasmide beschrieben.

Tabelle 2: hergestellte und genutzte Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pMOWs-hygroGFP	Retroviraler Expressionsvektor mit Expression von GFP ( <i>green fluorescent protein</i> ), enthält Resistenzgene für Ampicillin, Selektion der transduzierten eukaryotischen Zellen durch Hygromycin B	diese Arbeitsgruppe
pMOWs-hygro-miRFP670	Retroviraler Expressionsvektor mit Expression von miRFP670 ( <i>red fluorescent protein</i> ), enthält Resistenzgene für Ampicillin, Selektion der transduzierten eukaryotischen Zellen durch Hygromycin B	diese Arbeitsgruppe
pMOWs-puro-IL-11R (pMOWs-IL-11R)	Retroviraler Expressionsvektor mit Expression des IL-11R, enthält Resistenzgene für Ampicillin, Selektion der transduzierten eukaryotischen Zellen durch Puromycin	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1(+)	Eukaryotischer Expressionsvektor, dient der transienten und stabilen Proteinexpression, enthält Resistenzgen für Ampicillin	Invitrogen, Carlsbad, USA
pcDNA3.1(+)-hIL-6R	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression von humanem IL-6R	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1(+)-mIL-6R	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression von murinem IL-6R	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1(+)-mIL-11R K3	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression von murinem IL-11R	diese Arbeitsgruppe

pcDNA3.1(+)-mIL-11R K5	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression von murinem IL-11R	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1(+)-hIL-11R	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression von humanem IL-11R	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1(+)-IL-6R- VHH-Fc	Eukaryotischer Expressionsvektor mit Expression des Inhibitors IL-6R-VHH-Fc	diese Arbeitsgruppe

#### 6.1.4 Enzyme

Die im Folgenden genannten Restriktionsendonukleasen wurden für die durchgeführten Plasmid-Spaltungen genutzt. Alle genannten Enzyme stammen von der Firma Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot.

Restriktionsendonukleasen: HincII (HindII), KpnI, HindIII, XbaI, AflIII, PmeI, BamHI.

#### 6.1.5 Nährmedien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Für alle in Kultur gehaltenen eukaryotischen Zellen wurde *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) verwendet.

DMEM<sup>-/-</sup> *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, high Glucose (4,5 g/l)

DMEM<sup>+/+</sup> 450 ml DMEM<sup>-/-</sup>

10% FCS (Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot)

1% Penicillin 6 mg/ ml (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm)/

Streptomycin 10 mg/ ml (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm)

### 6.1.6 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit kamen die folgenden unterschiedlichen bereits etablierten pro- und eukaryotischen Zelllinien zur Anwendung.

#### Prokaryotische Zelllinie

XL-1 blue Competent Cells (Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)]) sind chemisch-kompetente gram-negative *Escherichia coli* Bakterien. Sie wurden für die Durchführung von Transformationen verwendet.

#### Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 3: Eukaryotische Zelllinien

Name der Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Ba/F3	Muriner Prä-B-Lymphocyt, nicht-adhärent	diese Arbeitsgruppe
Ba/F3-gp130	Prä-B-Lymphocyt, nicht-adhärent, stabile Transduktion mit gp130, Stimulation mit H-IL-6	diese Arbeitsgruppe
Ba/F3-gp130-GFP	Prä-B-Lymphocyt, nicht-adhärent, stabile Transduktion mit gp130 und pMOWs-GFP, Stimulation mit H-IL-6	Laura Schultz
Ba/F3-gp130-mIL-11R	Prä-B-Lymphocyt, nicht-adhärent, murin, stabile Transduktion mit gp130 und mIL-11R, Stimulation mit IL-11 oder H-IL-6	Laura Schultz
Ba/F3-gp130-hIL-11R	Prä-B-Lymphocyt, nicht-adhärent, stabile Transduktion mit gp130 und hIL-11R, Stimulation mit IL-11 oder H-IL-6	Laura Schultz

Ba/F3-gp130-hIL-6R	Prä-B-Lymphocyt, nicht-adhären, stabile Transduktion mit gp130 und hIL-6R, Stimulation mit IL-6 oder H-IL-6	Laura Schultz
Ba/F3-gp130-IL-11R-pMOWs-hygro-miRFP670	Prä-B-Lymphocyt, nicht-adhären, stabile Transduktion mit gp130, IL-11R und pMOWs-hygro-miRFP670	Laura Schultz
HEK-293-T	Humane embryonale Nierenzellen, aufgrund der Persistenz einer Mutante des <i>viralen SV40 T-Antigens</i> gut geeignet für transiente (und stabile) Transfektionen, etabliert für transiente Transfektionen, adhären	diese Arbeitsgruppe
HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc	Ädhären, stabile Transduktion mit IL-6R-VHH-Fc	Laura Schultz
Phoenix-Eco	Adhären, Einsatz zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-Zellen	diese Arbeitsgruppe

## 6.2 Materialien für Zellviabilitätstests und für Zytokinstimulation/ -inhibition

### 6.2.1 Proteine und Inhibitoren

Um die oben genannten Zytokin-abhängig wachsenden Ba/F3-Zellen zu kultivieren und um sowohl Proliferationsassays als auch (Phospho-)STAT- und (Phospho-)ERK-Assays durchzuführen, wurden rekombinante, gereinigte Proteine mit folgenden *stock*-Konzentrationen eingesetzt:

Tabelle 4: verwendete Proteine und Inhibitoren

<b>Protein</b>	<b><i>stock</i>-Konzentration</b>	<b>Herkunft</b>
IL-11	100 µg/ ml und 239 µg/ ml	diese Arbeitsgruppe
IL-6	100 µg/ ml und 132 µg/ml	diese Arbeitsgruppe
HIL-6	10 µg/ ml	diese Arbeitsgruppe
WeHi	10 µg/ ml	diese Arbeitsgruppe
mIL-6	100 µg/ ml	diese Arbeitsgruppe
<i>anti-mIL-11R</i> („AF490“)	0,2 mg/ ml	R & D Systems, Wiesbaden

Des Weiteren wurden für Proliferationsassays auch folgende lösliche Rezeptoren genutzt:

Tabelle 5: lösliche Rezeptoren für Proliferationsassays

<b>Protein</b>	<b><i>stock</i>-Konzentration</b>	<b>Herkunft</b>
sIL-11R	100 µg/ ml und 17 µg/ ml	R&D Systems, Wiesbaden
msIL-6R	100 µg/ ml	R&D Systems, Wiesbaden
hsIL-6R	100 µg/ ml	Conaris, Kiel

## 6.3 Materialien für den Proteinnachweis (mittels SDS-PAGE & Western

### Blotting)

#### 6.3.1 Sodiumdodecylsulfatgele und Größenstandards

Mithilfe der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine entsprechend ihrer Größe voneinander getrennt und folgend detektiert werden. Für diese Untersuchung wurden 10%ige SDS-Trenngele und passende Sammelgele gegossen. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele ist in Tabelle 12 aufgelistet.

#### 6.3.2 Antikörper

Tabelle 6: Primäre Antikörper

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Lösungsmittel, Western Blotting- Verdünnung</b>
Phospho-STAT3 („Tyr705“)	Monoklonaler Antikörper Hostspezies: Kaninchen Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	5% BSA in TBS-T, 1:1000
STAT3 („124H6“)	Monoklonaler Antikörper Hostspezies: Maus Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	TBS-T-Milchpulver, 1:1000
Phospho-ERK Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Thr204)	Monoklonar Antikörper Hostspezies: Kaninchen Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	5% BSA in TBS-T, 1:1000
ERK p44/42 MAPK (Erk1/2)	Monoklonar Antikörper Hostspezies: Kaninchen Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	TBS-T-Milchpulver, 1:1000

<i>Anti-mIL-11R</i> „AF490“	Polyklonaler Antikörper, IgG Hostspezies: Ziege Stock: 0,2 mg/ml in sterilem PBS Aliquots: 500 µg/ ml R & D Systems, Wiesbaden	TBS-T-Milchpulver, 1:1000
<i>Anti-Fc</i>	Polyklonaler Antikörper, IgG Hostspezies: Kaninchen Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot	5% BSA in TBS-T, 1:1000
Myc-Tag 71D10	Monoklonaler Antikörper Hostspezies Kaninchen Cell Signaling Technology, Danvers (USA)	1:1000

Tabelle 7: Sekundäre Antikörper

<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Lösungsmittel, WB-Verdünnung</b>
mouse-POD	Polyklonaler Antikörper, IgG (H+L) Hostspezies: Ziege Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot	TBS-T-Milchpulver, 1:5000
rabbit-POD	Polyklonaler Antikörper, IgG (H+L) Hostspezies: Ziege Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot	TBS-T-Milchpulver, 1:5000

## 6.4 Allgemeine Chemikalien, Geräte und Verbrauchsmaterialien

Innerhalb dieser Arbeit wurden für die Durchführung der verschiedenen Untersuchungen eine Vielzahl von Chemikalien, Geräten, Kits, Verbrauchsmaterialien sowie Puffer und Lösungen genutzt. Folgende Tabellen enthalten die Auflistungen:

### 6.4.1 Chemikalien

Tabelle 8: Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid/ Bis-acrylamid 30%ige -Lösung (29:1)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS) (10%)	Merck KGaA, Darmstadt
BCA-WR Reagenz A und B	Thermo Scientific, Waltham, USA
Bovine Serum Albumin (BSA), A7030	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CellTiter-Blue	Promega GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>DNA Loading Dye &amp; SDS Solution (6x)</i>	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
ECL Prime Western Blotting Detektionsreagenz, Solution A und B	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	
Geneticin (G418)	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
<i>Gibco®</i> fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
HD-Green	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
NP-40 (0,5 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>O'Gene Ruler Express</i> (Größenstandard Agarosegelelektrophorese)	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
<i>O'Gene Ruler 1kb</i> (Größenstandard Agarosegelelektrophorese)	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Page Ruler</i> (Größenstandard SDS-PAGE)	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
<i>Penicillin-Streptomycin-Lösung</i>	Genaxxon bioscience, Ulm
Polybrene (f. c. 8 µg/ ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protease Kapsel	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>P20 Surfactant</i>	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
Tris HCl	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Trypan Blue Solution</i> , 0,4%	BioRad Laboratories GmbH, München
Trypsin/ EDTA (1% T/E)	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
<i>Turbofect</i> Transfektionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
<i>Tween-20</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 6.4.2 Geräte

Tabelle 9: Angewandte Geräte und ihre Hersteller

Gerät	Hersteller
Absaugpumpe Sterilbank	HLC BioTech, Göttingen
Agarosegelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH, München
Autoklav Laboklav 25	Hartenstein GmbH, Würzburg
Biacore X100	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Bio Rad Power Pac Basic Spannungsquelle	BioRad Laboratories GmbH, München
CO <sub>2</sub> -Inkubator 150 (E2)	Binder GmbH, Tuttlingen
<i>ECL ChemoCam Imager</i> (Intas)	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Infinite M200 Pro Reader (Tecan Reader)	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
Inkubator 1000 (37 °C)	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Gefrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr GmbH, Rostock
Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH, München
Kühlschrank (4 °C)	Liebherr GmbH, Rostock
Mikropipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krups), Offenbach
Milli-Q Wasserreinigungssystem, Millipore	Merck KGaA, Darmstadt
Multipipette Typ Plus	Eppendorf GmbH, Hamburg
Reagenzschüttler	INFORS AG, Bottmingen, Schweiz
Rotator, Digital Tube Roller SRT9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Schwenkinkubator Multitron Standard	INFORS AG, Bottmingen, Schweiz
SDS-PAGE-Kammern Mini-Protean Tetra Cell System	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Spektrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Sterilbank Mars Safety Class II	Labogene, Lyngø, DK
TC10 Automated Cell Counter	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer Komfort (95°C Heizblock)	Eppendorf GmbH, Hamburg

Ultratiefkühlschrank -80°C, Forma 900 Series	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Vortex Mixer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen
Wasserbad Julabo sw21 (60°C)	Julabo GmbH, Seelbach
Western-Blot Trans-Blot-Turbo semidry Transfer System	Bio Rad Laboratories GmbH, München
Zentrifuge (4°C) 5417 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge 5424	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge (4°C) Typ 5810 R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge (4°C) Labofuge 400 R	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot

### 6.4.3 Kits

Tabelle 10: Kits

Name	Hersteller
ECL Prime Western Blotting Detectionsreagenz	Thermo Fisher Scientific, St. Leon Rot
NucleoBond® Xtra Midi	Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue Cell Viability Assay Gene	Promega GmbH, Mannheim
JET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA

Das Kit NucleoBond® Xtra Midi, genutzt für die Durchführung von Midipräparationen, enthielt folgende Puffer: RES, LYS, EQU, NEU, WASH, ELU.

#### 6.4.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
<i>Biacore Sensor Chip CM5 (Biacore X100 System)</i>	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Erlenmeyerkolben (500 ml und 1000 ml)	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Einmal-Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Eppendorf-Röhrchen (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Cryotubes (2 ml)	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Cryo-Einfrierbox -80°C	Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot
Pasteurpipetten	BRAND GmbH, Wertheim
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Whatman</i> -(Cellulose-)Papier	VWR Internat., Darmstadt
Zählkammer TC10 2-Chamber-Slides	BioRad Laboratories GmbH, München
Zellkulturflasche	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale (10 cm und 15 cm), adhärent	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale (10 cm und 15 cm), nicht-adhärent	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten, 6-Well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturtestplatten, 96-Well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
96-Well CytoOne Platte (96-Well-Platte)	Starlab, Hamburg
6-Well-CytoOne Platte (6-Well-Platte)	Starlab, Hamburg

### 6.4.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 12: verwendete Puffer bzw. Lösungen und ihre Zusammensetzungen

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung
Agarose (1%)	4 g Agarosepulver in 400 ml TAE-Puffer (1 x)
BSA-Lösung (für WB)	10 ml 1x TBS-T 0,5 g BSA
Einfriermedium Cryos	90% FCS 10% DMSO
JAK2- Lysepuffer	TrisHCl ----- 1 M ----- 500 µl - 10 mM NaCl ----- 5 M ----- 1,5 ml - 150 mM EDTA ----- 0,5 M ----- 50 µl - 0,5 mM 0,5% NP-40 ----- 250 µl Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ----- 100 mM ----- 500 µl - 1 mM MgCl <sub>2</sub> ----- 500 µl - 10 mM 1 Protease-Kapsel in 1 ml gelöst ----- 1 ml → Ansatz in 50 ml destilliertem H <sub>2</sub> O
Lämmli (5 x)	10% SDS 50% Glycerol 50 mM Tris-HCl pH 6,8 5% β-Mercaptoethanol 0,5% Bromphenolblau
LB-Amp	1000 ml LB-Medium 1 ml Ampicillin
Milch	2,5 g Magermilchpulver 50 ml TBS-T
Milch Blocking Buffer für Western Blotting	5% Magermilchpulver in TBS-T
Orange-G (6 x)	30% Glycerol 50 mM EDTA
PBS ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> , pH 7,4)	150,0 mM NaCl 8,0 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4 1,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4

PBS-P20-Lösung (Konzentration 0,05%):	100 ml PBS (10 x) 900 ml H <sub>2</sub> O 500 µl <i>P20 Surfactant</i>
SDS-PAGE Running Buffer (10 x)	25 mM Tris pH 8,3 192 mM Glycin 1% SDS
SDS-PAGE Running Buffer (1 x)	100 ml Running Buffer (10 x) In 900 ml dH <sub>2</sub> O
SDS-PAGE Sammelgelpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,2% SDS
SDS-PAGE Trenngelpuffer	750 mM Tris-HCl, pH 8,8 0,2% SDS
SDS-PAGE Transferpuffer (WB)	25,0 mM Tris-HCl, pH 8,3 0,1% SDS 20% Methanol 192,0 mM Glycin
SDS-PAGE Stripping Puffer (1 x)	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 2% SDS 0,1% β-Mercaptoethanol
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer, 1 x)	40 mM Tris-HCl, pH 8,6 20 mM Acetat 1 mM EDTA
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% <i>Tween-20</i> in TBS (1 x)

### 6.4.6 Software

Zur Datenauswertung sind folgende Programme zum Einsatz gekommen:

Tabelle 13: verwendete Software

Software	Herkunft
BIAevaluation Software	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden
Microsoft Excel	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft PowerPoint	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Tecan Reader	Tecan Trading AG, Schweiz
<i>ChemoStar Professional</i> (Western Blot)	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

## Methoden

### 6.5 Methoden der DNA-Präparation

#### 6.5.1 Transformation der Plasmid-DNA in XL-1-blue (chemisch kompetente *E. coli*)

Zuerst wurden die XL-1-blue Zellen, chemisch kompetente *Escherichia coli*, auf Eis aufgetaut und die jeweilige Plasmid-DNA hinzugegeben. Bei Ligation wurden 5 bis 10 µl, bei Retransformation 1 bis 2 µl genutzt. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen für 45 Sekunden mithilfe eines Heizblock auf 42°C erhitzt. Es folgte eine erneute 5-minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und folgend 1 Stunde bei 37°C und 900 rpm auf dem Thermomixer Komfort (Eppendorf GmbH, Hamburg) inkubiert. Nun wurde die Zellsuspension auf eine Agarplatte aufpipetiert. Bei einer Ligation wurde die gesamte Zellsuspension aufgetragen, bei einer Retransformation 15 µl. Mit einem sterilen Spatel wurde die Lösung ausgestrichen und so auf der Agarplatte verteilt. Über Nacht wurde sie bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag waren nun typischerweise mehrere Kolonien auf den Agarplatten gewachsen, die nun zur Durchführung einer Midi-Präparation genutzt werden konnten. Es wurden die in Kapitel 6.1.3, Tabelle 2 aufgelisteten Plasmide genutzt.

#### 6.5.2 Midi-Präparation zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Plasmidpräparation lässt sich in die Anzucht einer Bakterienkultur und der Durchführung der Midi-Präparation untergliedern. Für die Präparation wurde das Kit *NucleoBond Xtra Midi* (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt.

Es wurden 100 ml LB-Amp, also LB-Medium, welches mit Ampicillin versetzt wurde, in einen 1-Liter-Kolben gegeben und pro Kolben eine Kolonie einer Agarplatte hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C bei 120 rpm über Nacht auf einem Schüttler (INFORS AG, Bottmingen, Schweiz). Die Übernachtskultur wurde nun in jeweils zwei 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, welche anschließend 15 Minuten bei 4000 x g, 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde nun zur Zellyse in 8 ml RES und 8 ml LYS für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei diesem Schritt sollte die Zeit besondere Beachtung finden. Während dieser Zeit konnte die Midi-Säule mit Filter aufgebaut werden. Der Filter wurde mit 12 ml EQU benetzt. Nach 5 Minuten wurde 8 ml

Buffer NEU in die Falcon-Röhrchen gegeben und gut geschüttelt. Die entstandene Lösung, welche nun das Lysat enthielt, wurde nun 3-mal invertiert und auf den *NucleoBondXtra Column Filter* geladen. Es folgte der erste Waschgang mit 5 ml Buffer EQU. Der *NucleoBondXtra Column Filter* wurde entfernt. Danach wurde ein zweites Mal gewaschen, diesmal mit 8 ml Buffer Wash. Unter die Säulen wurden nun 15 ml Falcon-Röhrchen platziert. Gleichzeitig wurden fünf 2 ml Eppendorf-Röhrchen pro Probe mit je 700 µl Isopropanol vorbereitet. Nach dem zweiten Waschgang wurde mit 5 ml Buffer ELU eluiert. Das in den 15 ml Falcon-Röhrchen entstandene Produkt konnte nun auf die vorbereiteten Eppendorf-Röhrchen aufgeteilt werden. Es schloss sich eine 15-minütige Zentrifugation bei 15000 x g, 4°C an. Der Überstand wurde abpipettiert und die Pellets in 500 µl reinem 70% Ethanol gelöst. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 15000 x g, 4°C wurde erneut der Überstand abpipettiert und das Pellet in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Nun wurden die Eppendorf-Röhrchen 10 bis 15 Minuten bei 30°C geschüttelt und die 5 Eppendorf-Röhrchen der gleichen Lösung in ein Eppendorf-Röhrchen überführt.

Anschließend wurden die DNA-Konzentrationen in ng/ µl der Midi-Präparationen mithilfe des *NanoDrop2000c* (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Zur Überprüfung der enthaltenen DNA wurde eine Restriktionsspaltung eines kleinen Teils der Midi-Präparationen durchgeführt.

### 6.5.3 Spaltung von Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsspaltung beschreibt die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen. Sie dient als wichtiges Hilfsmittel bei der Analyse von DNA. Welche Restriktionsendonukleasen für die jeweilige Plasmid-DNA genutzt werden können, kann mithilfe einer Restriktionskarte bestimmt werden. Beim Schneiden der DNA durch Restriktionsenzyme entstehen DNA-Fragmente, die sich je nach DNA in ihrer Länge unterscheiden. Diese DNA-Fragmente können anschließend in ihrer Länge bestimmt und mittels der passenden Restriktionskarte genau identifiziert werden. Um das Verfahren durchzuführen und sinnvoll auszuwerten, muss die DNA-Sequenz genau bekannt sein. Jede Restriktionsendonuklease weist andere Erkennungs- und Schnittsequenzen der DNA auf. Aus diesem Grund sollten möglichst diejenigen Enzyme für die Testspaltung zur Anwendung kommen, die aufgrund ihrer Schnittstellen zu einer eindeutigen Aussage führen können. Das bedeutet, zum einen dass die Fragmente in ihrer Größe nicht zu nah beieinander liegen sollten, um sie differenziert detektieren zu können. Zum anderen sollten auch keine

sehr großen oder sehr kleinen Fragmente entstehen, da diese schwer von der ungeschnittenen DNA zu unterscheiden oder möglicherweise nicht mehr darstellbar sind.

Es wurden Restriktionsenzyme und die vom Hersteller Thermo Fisher Scientific empfohlenen dazugehörigen Puffersysteme genutzt. Die Restriktionstestsplaltung wurde in einem 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen angesetzt. Es wurden auf 20 µl Gesamtmenge i. d. R. 5 µg der zu analysierenden DNA mit 0,5 oder 1 µl eines passenden Enzyms, einer Restriktionsendonuklease, und 1 oder 2 µl des laut Herstellerangaben zugehörigen Puffers mindestens 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Um die Ansatzmenge von 20 µl zu erhalten, wurde die entsprechend noch übrige Menge durch destilliertes Wasser ergänzt. Die Auswertung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

#### **6.5.4 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzierung dient der Bestimmung der genauen Nukleotikabfolge der zu analysierenden DNA. Sie kann in der Biochemie im Rahmen von DNA-Klonierungen eingesetzt werden. Im vorliegenden Fall wurde die Sequenzierung der DNA-Probe pMOWs-hygroGFP durch die Microsynth Seqlab GmbH, Göttingen durchgeführt. Dort wurde die DNA-Abfolge mittels Sanger-Sequenzanalyse bestimmt.

#### **6.5.5 Agarose-Gelelektrophorese**

Um eine Plasmid-DNA-Splaltung auszuwerten, kann eine Agarose-Gelelektrophorese genutzt werden. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese können die z. B. durch Splaltung entstandenen unterschiedlich großen Fragmente dargestellt und mit Standardgrößen verglichen werden.

Das verwendete Medium wurde hergestellt, indem 1% Agarose in einer Mikrowelle ca. 6 bis 8 Minuten bei 440 V in TAE (Tris-Acetat-EDTA) -Puffer gekocht wurde. Das Gelgestell wurde vorbereitet und die flüssige TAE-Agarose hinzugegeben, welche nun mit HD-Green versetzt wurde. Die Menge von HD-Green wurde durch die Größe des Gels festgelegt, bei einem kleinen Gel wurde 2,5 µl und für ein großes Gel 10 µl verwendet.

Es wurden jeweils 20 µl der DNA-Proben mit jeweils 4 µl eines 6-fach Ladepuffers Orange G versetzt. Nachdem das Gel abgekühlt und fest geworden war, also ca. 30 Minuten später, konnten jeweils 7 µl der Längenstandards *O'Gene Ruler Express* (kurze Fragmente) und *O'Gene Ruler Express 1 kB* (lange Fragmente) sowie die mit Orange G versetzten DNA-Proben in die Geltaschen geladen werden. Anschließend erfolgte die Gelelektrophorese

ca. 45 Minuten mit einer konstanten Spannung von 80 V. Mithilfe des *INTAS iX Imager* (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) wurden die Bandenmuster detektiert.

### 6.5.6 UV-Spektroskopie zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen

Eine Quantifizierung der DNA ist für die Durchführung weiterer Versuche essenziell. Mithilfe des *NanoDrop 2000c* (VWR International, Erlangen) wurden verschiedene DNA-Konzentrationen in ng/  $\mu$ l bestimmt. Das Absorptionsverhältnis von 260 nm zu 280 nm und von 260 nm zu 230 nm gibt zusätzlich eine klare Aussage zur Reinheit der Probe. 280 nm wurden genutzt, um Proteine zu detektieren, 230 nm dagegen, um organische Substanze zu detektieren. Folgende Werte gelten für eine reine DNA-Probe: A<sub>260</sub>/ A<sub>280</sub> sollte zwischen 1,8 und 2 liegen. A<sub>260</sub>/ A<sub>230</sub> sollte größer als oder gleich 2 sein.

## 6.6 Methoden der Zellkultur

### 6.6.1 Kultivierung nicht-adhärenter und adhärenter Zellen

In dieser Arbeit wurden immortalisierte Zelllinien verwendet, die je nach Zelllinie in passenden Nährmedien in Kultur gehalten wurden. Alle verwendeten Zelllinien wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), dem 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin beigemischt wurden, kultiviert. Es handelt sich bei den genutzten Zelllinien um Ba/F3-gp130/ -GFP/ -mIL11R/ -hIL11R, HEK-293-T/-IL6R-VHH-Fc und Ba/F3 Zellen.

Die Zelllinien wurden auf 10 cm Petrischalen in 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> mit gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert. Um ein zu dichtes Wachstum sowie einen vorzeitigen Zelltod zu vermeiden, wurden die Zellen ca. zweimal wöchentlich *gesplittet*. Das *Splitting* wurde je nach benötigter Zellzahl für die Versuche angepasst. Ein zu dichtes Wachstum kann dazu führen, dass die Zellen beginnen, sich zytokinunabhängig zu vermehren. Da eine unabhängige Vermehrung die Messmethoden verfälschen würde, ist es durch regelmäßiges *Splitting* zu verhindern. Zytokinabhängige Zellen benötigten zusätzlich zur Kultivierung eine regelmäßige Zugabe des passenden Zytokins. Für die verwendeten Ba/F3-Zellen wurden je nach enthaltenen Rezeptoren IL-11, IL-6, H-IL6 oder WeHi, ein IL-3 konditionierter Zellkulturüberstand, verwendet. Weiterhin wurden die in Kultur gehaltenen Schalen zur Sicherstellung guter Qualität regelmäßig mikroskopisch überprüft.

### 6.6.2 Zellzahlbestimmung

Für zahlreiche Versuche ist es notwendig, eine konkrete Zellzahl aussäen zu können. Die Zählungen wurden mithilfe des *TC-10 Automated Cell Counting Systems* (Bio Rad Laboratories GmbH, München) durchgeführt.

Je Zellzählung wurden 10 µl *Trypan Blue* als Färbelösung mit 10 µl der zu bestimmenden Zelllösung vermischt. Anschließend wurde diese auf eine Zählkammer *TC10 2-Chamber-Slides* aufgetragen, welche folgend im *TC-10 Automated Cell Counting Systems* gemessen werden konnte.

### 6.6.3 Transiente Transfektion adhärenter Zellen

Zu Beginn wurden Phoenix-Zellen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bis 10 ml mit *PBS* aufgefüllt. Es folgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 1000 x g und Raumtemperatur. Anschließend wurden der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in  $\text{DMEM}^{+/+}$  resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt, sodass  $8 \times 10^5$  Zellen/ Well einer 6-Well-Platte in je 2 ml  $\text{DMEM}^{+/+}$  ausgesät und folgend für 24 Stunden bei 30°C inkubiert werden konnten. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde 1 µg der gewünschten DNA in 200 µl  $\text{DMEM}^{-/-}$ , also FCS- und antibiotikafreies Medium, gegeben. Als Transfektionsreagenz wurde das Medium mit 2 µl *Turbofect* (Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot) vermischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. *Turbofect* bildet stabile und kompakte Komplexe mit Plasmid-DNA. Dadurch wird die Plasmid-DNA vor dem Abbau geschützt und eine effiziente Plasmidabgabe in eukaryotische Zellen ermöglicht. Anschließend wurde das mit DNA und *Turbofect* versetzte Medium tropfenweise auf die Wells aufgegeben und geschwenkt. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> wurde ein Mediumwechsel mit 2 ml  $\text{DMEM}^{+/+}$  mit 30% FCS und 1% Penicillin/ Streptomycin durchgeführt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wurde der Überstand für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen (vgl. Kapitel 6.6.5) genutzt.

## 6.6.4 Stabile Transfektion adhärenter Zellen und Einzelklonselektion

### Stabile Transfektion adhärenter Zellen

Dieser Vorgang dient der Etablierung einer stabilen Zelllinie. Die stabil transfizierte DNA wird folgend kontinuierlich exprimiert und auch an Tochterzellen weitergegeben.

Im ersten Schritt vor Beginn der stabilen Transfektion mussten die verwendeten Zellen, in dieser Arbeit HEK-293-T-Zellen, ausgesät werden. Das Medium wurde abgesaugt und vorsichtig durch 10 ml PBS ersetzt, um die Zellen zu waschen. Da die adhärenenten Zellen durch das vorsichtige Aufpipettieren noch hafteten, konnte PBS wieder abgesaugt werden. Nun wurden die Zellen in 2 ml DMEM<sup>+/+</sup> von der Petrischale gelöst und in insgesamt 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> in ein Falcon-Röhrchen überführt, zentrifugiert und anschließend gezählt. Es wurden mehrere 10 cm Petrischalen mit je  $2 \times 10^6$  HEK293-T-Zellen in DMEM<sup>+/+</sup> vorbereitet und mindestens 4 h oder über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden 5 µg der gewünschten DNA in 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> in jeweils ein Eppendorf-Röhrchen hinzugegeben. In dieser Arbeit wurde pcDNA3.1.-hIL-11R, pcDNA3.1.-hIL6R sowie pcDNA3.1.-IL6R-VHH-Fc verwendet. Außerdem wurden 10 µl *Turbofect* hinzugefügt, gut vermengt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Ansätze wurden nun jeweils zu den am Vortag vorbereiteten Petrischalen mit den HEK-293-T-Zellen gegeben. Bei der stabilen Transfektion ist kein Mediumswechsel nötig. Je nach Ansatz wurden 24 h nach Transfektion die HEK-293-T-Zellen von der 10 cm Petrischale auf die Wells einer 6-Well-Platte verteilt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert oder insgesamt 48 h auf der 10 cm Petrischale belassen.

48 Stunden nach Transfektion folgte ein Stimulationsassay und anschließend eine Analyse zur Genexpression mittels Western Blotting oder eine weitere Selektion mit Antibiotika, i. d. R. mit 225 µl G418. Gegebenenfalls folgte eine Einzelklonselektion.

### Einzelklonselektion

Um eine Einzelklonselektion einer Zelllinie, in dieser Arbeit z. B. der HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc-Zelllinie, durchzuführen, wurden die Zellen im Anschluss an die Transfektion zuerst zweimal in Anwesenheit von G418 (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm) *gesplittet*. Das Medium wurde abgesaugt. Die Zellen wurden dann vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen, sodass die Zellen an der Petrischale haften blieben. Um die Zellen anschließend zu lösen, wurden 2 ml 1 % T/E (Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot) aufgegeben. Folgend wurden 2 ml DMEM<sup>+/+</sup> hinzugegeben. Die gesamte 4 ml Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden bei 1000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 5 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert. Folgend wurde die Zellsuspension gezählt und auf 5 Zellen pro ml eingestellt. Erneut wurde G418 hinzugegeben. Es wurden jeweils 100 µl Zellsuspension auf ein Well einer 96-Well-Platte gegeben und bei 37 °C inkubiert, bis Einzelklone gepickt werden konnten. Die Einzelklone wurden nun auf Wells einer 6-Well-Platte überführt, mit 30 µl G418 versetzt und weiter inkubiert. Anschließend wurden sie auf eine 10 cm Petrischale überführt und erneut mit 150 µl G418 versetzt, um den Selektionsdruck aufrechtzuerhalten.

### 6.6.5 Retrovirale Transduktion von Ba/F3- und Ba/F3-gp130-Zellen

Für die retrovirale Transduktion von Ba/F3- und Ba/F3-gp130-Zellen wurde der bei der Transfektion von Phoenix-Zellen entstandene Virus-haltige Überstand verwendet. Die in Kultur gehaltenen Ba/F3-Zellen wurden 5 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und einmal in 10 ml *PBS* gewaschen. Nun wurde das Zellpellet mit DMEM<sup>+/+</sup> vermengt und auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. 50 µl dieser Zellsuspension wurden in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Anzahl der vorbereiteten Röhrchen hängt von der Anzahl der Ansätze ab. Auf jeden Ansatz wurden 250 µl des Überstands verteilt. Im Anschluss an die Zugabe von 3 µl *Polybrene* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Konzentration 8 µg/ml) wurden die Zellen 2 Stunden bei 300 x g, Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit weiteren 4 ml DMEM<sup>+/+</sup> auf ein Well einer 6-Well-Platte gegeben. Nach Zugabe des passenden Zytokins, hier 10 ng/ml HIL-6, schloss sich eine Inkubation von 48 Stunden bei 37°C an. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Zugabe von 7,5 µl Puromycin oder 100 µl Hygromycin selektiert.

### 6.6.6 Erstellung von Cryostocks

*Cryostocks* dienen dazu, dass Zellen dauerhaft bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden können. Das ist unter anderem von Vorteil, da die Zellen so nicht dauerhaft in Kultur gehalten werden müssen. Auch können die *Cryostocks* so einer Kontamination einer Zelllinie vorbeugen.

Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei  $1500 \times g$ , Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurde das Einfriermedium, bestehend aus 90% FCS + 10% DMSO, hergestellt. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und je 1 ml auf die beschrifteten *Cryotubes* aufgeteilt. Nun wurden die Zellen in einer mit Isopropanol gefüllten Gefrierbox bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Diese Gefrierbox ermöglicht einen schonenden Einfriervorgang, da die Temperatur durch das Isopropanol nur langsam sinkt.

### 6.6.7 Killing curve

Eine *killing curve* stellt ein Dosis-Antwort-Experiment dar. Mithilfe einer *killing curve* kann diejenige Konzentration gefunden werden, welche bestmöglich für die Selektion stabil transfizierter Zellen genutzt werden kann.

Hierfür wurden unterschiedliche Konditionen angefertigt. Es wurde jeweils  $500 \mu\text{l}$  Zellsuspension auf  $4,5 \text{ ml DMEM}^{+/+}$  verwendet. Nun wurde eine Verdünnungsreihe des jeweiligen Antibiotikums hinzugegeben. Bei *G418* wurden die Konditionen 1:25, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 getestet. Bei 1:50 und 1:100 zeigten sich die stabil transfizierten Zellen noch lebendig und die nicht transfizierten Zellen abgestorben.

## Methoden zur Testung der Proteinfunktion

### 6.6.8 Zellviabilitätsassay (Proliferationsassay)

Für die Durchführung der Proliferationsassays wurden je nach Versuch verschiedene Ba/F3-Zellen genutzt. In dieser Arbeit wurden Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130-mIL11R- und Ba/F3-gp130-hIL11R-Zellen, welche zuvor stabil transduziert wurden, verwendet.

Die Vorbereitung des Proliferationsassays begann mit dem Überführen der jeweiligen Ba/F3-Zellen von der Schale in ein 50 ml Falcon-Röhrchen. Dieses wurde dann für 5 Minuten bei 1200 x g zentrifugiert. Folgend wurde das Medium abgesaugt und 3-mal mit PBS gewaschen. Nun wurde das Pellet in 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert. Folgend wurde die Zellzahl der Ba/F3-Zellsuspension bestimmt und die Zytokin-Konzentration auf 100 µg/ml angepasst. Es wurde eine 96-Well-Platte verwendet. Die Zellen wurden gleichmäßig auf die Wells verteilt und die zu messenden Konzentrationen der Zytokine wurden hinzugegeben. Für die Proliferationsassays wurden Konzentrationsreihen der Zytokine gebildet mit einer Verdünnung von 1:3 zur jeweils nächsten Reihe. In den vorliegenden Fällen wurde als Positivkontrolle das Zytokin H-IL6 und als Negativkontrolle keine Hinzugabe von Zytokin genutzt. Es folgte eine Inkubationszeit im Brutschrank von 72 Stunden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, woraufhin sich die Auswertung des Assays anschloss. Zur Auswertung wurde in jedes Well 20 µl *CellTiter-Blue* (Promega GmbH, Mannheim) pipettiert. *CellTiter-Blue* ist ein fluorometrisches Verfahren und dient als Maß für die Anzahl der lebendigen Zellen in den jeweiligen Wells. Dieser Assay basiert auf der Fähigkeit von Zellen, den Redoxfarbstoff Resazurin in das fluoreszierende Endprodukt Resorufin umzuwandeln. Mit dem *Infinite M200 Pro Reader* (Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz) konnte nun die Fluoreszenz bei 562 nM gemessen werden. Je höher die Anzahl der durch die zugegebene Zytokinkonzentration entstandenen Zellen wurde, desto höher wurde auch die Fluoreszenz. Durch diese Messung konnte folglich also bestimmt werden, ob und in welchem Maß die jeweiligen Zytokine die Proliferation der Zelle zur Folge hatten. Zur Bewertung wurden Zelltriplikate gemittelt.

Des Weiteren wurden Proliferationsinhibitionsassays durchgeführt, indem zusätzlich zum Zytokin ein *anti-mIL-11R*-Antikörper gegeben wurde. Für diese Versuche wurden Ba/F3-gp130-mIL11R-Zellen und humane Zytokine verwendet. Als konstante Antikörperkonzentration wurde 30 µg/ml gewählt. Die Werte der Triplicate wurden gemittelt und die Standardabweichungen berechnet.

### 6.6.9 Zytokinstimulation von Suspensionszellen

Um den Stimulationsassay anzusetzen, wurden die entsprechenden Ba/F3-Zellen bei 300 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert und 5-mal mit PBS gewaschen. Nach Abschluss der Waschgänge wurden die Zellen gezählt sowie die Vitalität der Zellen bestimmt. Die Vitalität sollte größer als 90 % betragen. Die entsprechende Zellzahl wurde nun in DMEM<sup>-/-</sup> aufgenommen und auf 10 cm Kulturschalen für 5 Stunden im Inkubator bei 37°C gehungert (*Starving*). Das *Starving* in Abwesenheit von FCS wurde durchgeführt, um das pSTAT3- und pERK-Signal bis zur erneuten Zytokingabe herunterzuregulieren. 30 Minuten vor Ablauf der 5 Stunden wurden die jeweiligen Zytokinkonzentrationen vorbereitet. Für die Stimulation wurde ein Volumen von 1 ml verwendet.

Nach Ablauf der *Starving*zeit wurde je 1 ml Zellsuspension in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen verteilt und abzentrifugiert (300 x g, 5 Minuten). Der Überstand wurde entfernt, die Zellen wurden in einem entsprechenden 1 ml Zytokinansatz resuspendiert. Diese Ansätze wurden nun erneut 15 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Folgend wurden die Ansätze 5 min bei 300 x g, 4°C abzentrifugiert und die nun in den Eppendorf-Röhrchen entstandenen Pellets bei - 20°C für mindestens 15 Minuten bis zur Durchführung einer sich anschließenden Lyse eingefroren.

### 6.6.10 Zytokininhibition von Suspensionszellen

Der Ablauf entspricht weitestgehend dem für die Zytokinstimulation von Suspensionszellen (Kapitel 6.6.9). Für diese Stimulation und Inhibition wurde jedoch ein Volumen von 500 µl genutzt. In diesem Volumen DMEM<sup>-/-</sup> wurden die Zellen nach Ablauf der *Starvingzeit* resuspendiert und die Inhibitionsansätze zuerst mit 30 µl des Antikörpers *anti-mIL-11R* der Konzentration 500 µg/ml (vgl. Tabelle 4) für 15 min bei 37°C vorinkubiert. Diese Vorinkubation diente dazu, dass der Rezeptor durch den Antikörper blockiert werden kann, bevor das Zytokin an den Rezeptor bindet. Erst im Anschluss an diese Inkubation wurden die Zytokine zu den jeweiligen Ansätzen, auch den Inhibitionsansätzen, hinzugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 min bei 300 x g, 4°C abzentrifugiert und die Pellets bei - 20°C eingefroren.

### 6.6.11 Zytokinstimulation von adhärenenten Zellen (HEK-293-T-Zellen)

Da es sich bei HEK-293-T-Zellen um adhärenente Zellen handelt, ist das Protokoll hierfür im Vergleich zu Suspensionszellen abgeändert.

24 h vor Durchführung der Stimulation wurden die Zellen bereits je nach Ansatz auf die entsprechende Anzahl Wells einer 6-Well-Platte überführt. Nach vorsichtiger Entfernung des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, sodass die Zellen weiter adhärenent blieben. PBS wurde entfernt und die Zellen in je 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> für 3 h bei 37 °C *gestarvt*. Nach Ablauf der 3 h wurden die jeweiligen Zytokine IL-6, IL-11 und H-IL-6 hinzugegeben und für 30 min inkubiert. Als Negativkontrolle gab es einen Ansatz ohne Zytokin. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen in 1 ml PBS vom Well gelöst und in jeweils ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Die Ansätze wurden nun 1 min bei 18000 x g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets, bis zur Lyse und Analyse mittels Western Blotting, mithilfe von Flüssigstickstoff bei -20°C eingefroren.

## 6.7 Methoden des Proteinnachweises

### 6.7.1 Zellyse

Nach dem Auftauen der Pellets wurden diese für 1 bis 2 Stunden bei 4°C unter Rotation lysiert. Die Lyse der Zellen wurde mit einem JAK2-Lysepuffer durchgeführt, indem die Pellets in 150 µl JAK2-Lysepuffer (vgl. Tabelle 12) resuspendiert wurden. Folgend wurden die Lösungen in den Eppendorf Röhrchen für 20 Minuten bei 18000 x g, 4°C zentrifugiert. Der entstandene Überstand, der dem Lysat entspricht, wurde nun in frische Eppendorf-Röhrchen überführt. Diese wurden nun entweder bei -20°C eingefroren oder bis zum nächsten Schritt auf Eis gelagert.

### 6.7.2 Bestimmung des Proteingehalts mithilfe des (Bicinchoninsäure-) BCA-Assays

Ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Test) ist ein Verfahren, das zur Ermittlung des Gesamtproteinbestands einer Probe, in diesem Fall bei Zellysaten, Anwendung findet. Um den Proteingehalt der Zellysate zu bestimmen, wurden 1:10 Verdünnungen der Lysate mit destilliertem H<sub>2</sub>O hergestellt. Je 25 µl der Standardkonzentrationen aus bovinem Serumalbumin (BSA) oder der zu ermittelnden Lysate wurden jeweils in Doppelreihen auf

eine 96-Well-Platte aufgetragen. Der als Vergleich aufgetragene BSA-Standard wurde in 8 unterschiedlichen Konzentrationen (3000 µg/ml, 1500 µg/ml, 750 µg/ml, 375 µg/ml, 187,5 µg/ml, 93,75 µg/ml, 46,875 µg/ml, 0 µg/ml) pipettiert. Folgend wurde der BCA-Puffer des *BCA Protein Assay Kits* (Thermo Scientific, Waltham, USA) im Verhältnis 50:1 des Reagenz A zu Reagenz B angesetzt und vermengt. Je 200 µl des BCA-Puffers wurden nun auf die Standards, auf die Lysate und als Kontrolle auf 2 leere Wells aufpipettiert. Die Platte wurde nun mit einer Folie abgedunkelt und ca. 30 Minuten bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde die Platte bei einer Absorption von 562 nm im *Infinite M200 Pro Reader* (Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz) gemessen. Folgend wurden die Lysate entsprechend i. d. R. auf eine vorgegebene Konzentration von 2 µg/ µl verdünnt.

Es wurden i. d. R. 40 µl der jeweiligen Lysate hergestellt, welche zur Vorbereitung und Denaturierung der Proteine mit 10 µl 5x Lämmli vermengt wurden. Nach 10 Minuten bei 95°C konnten die Lösungen für die sich anschließende SDS-PAGE verwendet werden. Für die SDS-PAGE wurden i. d. R. 40 µg pro Probe pro Kammer geladen.

### 6.7.3 SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die analytische Methode SDS-PAGE ermöglicht die Trennung von Stoffgemischen nach der Molekülmasse. Besonders geeignet ist die Trennung zwischen 5 und 250 Kilodalton (kDa). Bei dieser Version der Elektrophorese dient ein diskontinuierliches Gel auf Polyacrylamidbasis als Trennmedium. In diesem Fall wurden SDS-Gele mit 10% Polyacrylamid genutzt, welche nach Protokoll angemischt wurden (vgl. Tabelle 12). Sobald die Gele fest geworden waren, wurden sie aus dem *Gelrack* gelöst. Sie können anschließend direkt verwendet oder bis zur Nutzung bei 4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Die Gelelektrophorese lief anschließend bei 80 bis 120 V für ca. 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur, bis eine vollständige Trennung der relevanten Größenstandards sichtbar wurde. Die Kammer wurde nun auseinander gebaut und das Gel entnommen. Es folgte der Transfer für das Western Blotting.

#### 6.7.4 Western Blotting

Western Blotting gehört zur Gruppe der Immunblots und dient der Detektion der zuvor elektrophoretisch voneinander getrennten Proteine. Hierbei wurden die Proteine auf eine PVDF-Trägermembran (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) übertragen. Für die Übertragung wurde als Western Blotting Transfersystem das Trans-Blot-Turbo semidry Transfer System (BioRad Laboratories GmbH, München) verwendet.

Die Membran wurde 1 Minute in Methanol aktiviert, anschließend 1 Minute in H<sub>2</sub>O und 1 Minute in Transferpuffer gewaschen. Zeitgleich wurde das *Whatman*-Papier in Transferpuffer gelegt. Nun wurden 3 *Whatman*-Papiere, eine PVDF-Membran, ein SDS-Gel und 3 *Whatman*-Papiere in der Transferkassette übereinander geschichtet. Die Proteine wurden nun im Transfergerät bei 25 V, 1 A innerhalb von 40 Minuten auf die Membran transferiert. Die Membran wurde i. d. R. anschließend an einer spezifischen Bande in 2 Teile getrennt und jeweils in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen mit 10 bis 15 ml *Milch* (vgl. Tabelle 12) gegeben. Für 1 bis 3 Stunden verblieb das Falcon-Röhrchen bei Raumtemperatur auf einem Rotator, wodurch unspezifische Bindungen blockiert wurden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers, je nach Primärantikörper entweder direkt oder nach erforderlichem dreimaligem Waschen mit TBS-T. Die Membranen, auf die als Primärantikörper P-STAT3 oder P-ERK gegeben wurde, mussten jeweils für 5 Minuten gewaschen werden, da diese Antikörper in BSA gelöst wurden. Der Primärantikörper verblieb über Nacht bei 4°C im Rotator in dem Falcon-Röhrchen mit der enthaltenen Membran. Am darauffolgenden Tag konnte nach dreimaligem Waschen mit TBS-T ein Sekundärantikörper aufgetragen werden. Nach 1 Stunde Inkubationszeit des Sekundärantikörpers auf der Membran im Rotator bei Raumtemperatur wurde nun 2-mal mit TBS-T und 1-mal mit TBS gewaschen.

#### 6.7.5 Strippen von Western Blotting-Membranen

Bevor ein weiterer primärer Antikörper verwendet werden kann, muss der Western Blot, um den vorher verwendeten Antikörper zu entfernen, *gestrippt* werden. Das *Strippen* ist ein Verfahren zur Abtrennung von chemischen Stoffen. Diese Methode wird verwendet, um Antikörper von Western Blotting-Membranen zu entfernen, damit diese erneut mit einem weiteren primären Antikörper untersucht werden können.

Die Membran wurde in ein Falcon-Röhrchen mit 50 ml Stripping Puffer (1x) mit 50 µl β-Mercaptoethanol gelegt, welches dann für 20 bis 30 Minuten in ein 60°C Wasserbad gestellt wurde. Anschließend wurde die Membran 3-mal mit *TBS-T* gewaschen und eine Stunde in Milch (vgl. Tabelle 12) geblockt. Nach weiteren 3 Waschgängen mit *TBS-T* wurde nun der zweite primäre Antikörper aufgegeben. Dieser verblieb ebenfalls über Nacht bei 4°C in einem Rotator.

### 6.7.6 Proteindetektion

Die gewaschene Membran wurde nun auf einer sauberen Klarsichtfolie platziert. Auf die Membran wurde ein ECL Prime Western Blotting Detektionsreagenz (Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot) pipettiert, deren 2 Bestandteile, *Solution A und B*, im Verhältnis 1:1 aufgetragen und durch Schwenken vermengt wurden. Die Detektion erfolgte am INTAS Chemo Cam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen). Die anschließende Auswertung wurde mit der Software ChemoStar Professional (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) durchgeführt.

## 6.8 Methoden zur Interaktionsanalyse

### Oberflächenplasmonresonanzexperimente

Dieses analytische Verfahren dient einer quantitativen Schichtdickenbestimmung im Nanometerbereich. Um die Oberflächenplasmonresonanz zu nutzen, wird ein immobilisierter Ligand, der lösliche IL-11R, sIL-11R, verwendet. IL-11 benötigt für die Signaltransduktion nicht nur gp130, sondern auch die IL-11-Rezeptor- $\alpha$ -Untereinheit (Heinrich, Behrmann et al. 1998). Funktionell kann diese durch eine lösliche Form ersetzt werden (Pflanz, Tacke et al. 1999). Dies deutet darauf hin, dass die transmembranen und zytoplasmatischen Teile für die Signalübertragung nicht erforderlich sind, und ermöglicht so die Nutzung der Oberflächenplasmonresonanz für die Untersuchung des Crosstalks.

In der Biochemie wird diese Analyse mithilfe von Chiplabor-Techniken angewendet. Dadurch, dass mithilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance* (SPR)-Spektroskopie) eine Interaktion oder Bindung des Analyten an den immobilisierten Liganden in Echtzeit gemessen wird, kann eine Aussage über die Bindungsaffinität und Kinetik der verschiedenen Bindungspartner getroffen werden.

Die Bindungsaffinität beschreibt die Neigung von Molekülen, mit anderen Molekülen eine Bindung einzugehen. Je höher die Affinität zwischen den Molekülen ist, desto niedriger ist die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) des Komplexes. Durch die Analyse der Kinetik kann eine Aussage zur Konzentrationsabhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit getroffen werden.

Zur Durchführung dieses Verfahrens wurde das Biacore X100 System (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) genutzt. Der immobilisierte lösliche IL-11R wurde vor Durchführung der Interaktionsanalyse bereits an den Biacore Sensor Chip CM5 gekoppelt (durchgeführt von Jens Moll, vgl. Kapitel 6.8). Der integrierte Sensor nutzt die beschriebene Oberflächenplasmonresonanz (SPR, *surface plasmon resonance*) zur Detektion. Die Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie basiert darauf, dass sich oberhalb dieses Sensorchips ein Prisma befindet, auf das Licht einfällt. Die Intensität und der Winkel des reflektierten Lichtes wurden detektiert. Damit die Bindung des jeweiligen Analyten an den Liganden in Echtzeit gemessen werden konnte, wurden die Analyten durch eine Flusszelle am Liganden vorbeigeleitet. Die Bindung an den Liganden führt durch Massenzunahme an der Chipoberfläche zu einer Änderung des Brechungsindex, die ihrerseits folglich den Winkel veränderte und die auch zu einer Änderung der Resonanz führte. Das Verfahren wurde anhand des Handbuchs des Biacore X100 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Schweden) durchgeführt.

Für Oberflächenplasmonenresonanzexperimente wurde ein Biacore X100-Gerät (GE Healthcare Life Sciences) verwendet. Die Analyse erfolgte im Multizyklusmodus. Die Experimente wurden bei 25°C in PBS pH 7,4, bestehend aus 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  und 0,05% (v/v) Tensid P20 (GE Healthcare), durchgeführt. sIL-11R wurde über Amidkopplung auf einem CM5-Chip immobilisiert. Zytokin wurde mit einer Durchflussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  in ansteigenden Konzentrationen injiziert. Die Assoziation von sgp130Fc-Varianten in jeder definierten Konzentration wurde in Zeiträumen von 60 Sekunden überwacht; die Dissoziation wurde in Zeiträumen von 240 Sekunden gemessen. Kinetische Parameter  $k_a$ ,  $k_{off}$  und  $K_D$  wurden anhand eines 1:1-Langmuir Bindungsmodells bestimmt. Die Regeneration zwischen den Zyklen fand mit 1 M  $\text{MgCl}_2$  über 90 Sekunden statt.

## 6.9 Statistische Methoden (Mittelwert, Standardabweichungen)

Die statistische Auswertung der im *Infinite M200 Pro Reader* (Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz) gewonnenen Daten zur Proliferation wurde mittels *Microsoft EXCEL* durchgeführt. Mittelwerte sowie Standardabweichungen der Datentriplets wurden bestimmt. Weiterhin wurden die Daten der Western Blotting Analyse mithilfe von *Microsoft PowerPoint* dargestellt.

## 7 Ergebnisse

### 7.1 IL-11R als alternativer $\alpha$ -Rezeptor für IL-6

Im Rahmen dieser Arbeit wurde im Wesentlichen, wie in der Einleitung bereits beschrieben, der sogenannte *Crosstalk* zwischen dem Zytokin IL-6 und dem IL-11R als Niedrigaffinitätsrezeptor untersucht. Da sowohl IL-6 als auch IL-11 an Prozessen innerhalb des Immunsystems beteiligt sind, ist es von großem Interesse, weitere mögliche Signalwege herauszufinden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten also zeigen, ob neben dem klassischen Weg, bei dem IL-6 an den IL-6R bindet, noch ein weiterer  $\alpha$ -Rezeptor, der sogenannte IL-11R, mit IL-6 interagieren kann. Innerhalb der Familie der IL-6 artigen Zytokine sind Crosstalk Phänomene bereits für einige Mitglieder, wie CNTF und OSM, bekannt (Schuster, Kovaleva et al. 2003, Du, Qian et al. 2021). Zudem weisen Studien über unterschiedliche Phänotypen von IL-6<sup>-/-</sup> und IL-6R<sup>-/-</sup> Mäusen auf einen alternativen Rezeptor für IL-6 hin. In dieser Arbeit sollte ein möglicher Crosstalk von IL-6 mit dem IL-11R, der dem IL-6R strukturell ähnelt, untersucht werden.

In den folgenden Kapiteln werden meine gewonnenen Ergebnisse aus den durchgeführten Untersuchungen in Bezug auf den IL-11R als alternativen Rezeptor für IL-6 dargestellt. In diesem Kapitel werden die indirekten Nachweise veranschaulicht. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurden sowohl die direkte Signaltransduktion als auch die Zellproliferation, als Folge der Signaltransduktion, in unterschiedlichen Zelllinien untersucht.

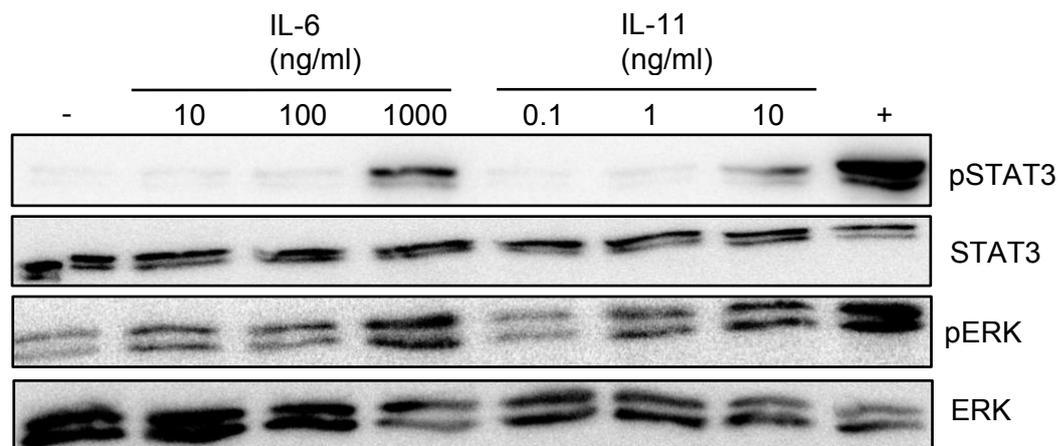
Für alle in diesem Kapitel beschriebenen Versuche wurden Ba/F3-Zellen, nicht adhärente Prä-B-Lymphocyten, genutzt. Lymphocyten sind Zellen des Immunsystem. Die Entscheidung für Ba/F3-Zellen wurde getroffen, da sie kein endogenes gp130 besitzen und die Zellen zytokinabhängig proliferieren. Es wurden entsprechend Ba/F3-Zellen mit stabil transduziertem gp130 und je nach Versuch murinen oder humanen IL-11R verwendet. Die Anwesenheit der spezifischen  $\alpha$ -Rezeptoren, IL-6R oder IL-11R, ist notwendig, damit die Zytokine IL-6 und IL-11 in der Lage sind, an gp130 zu binden.

Die Signaltransduktion durch IL-6 wurde in Ba/F3-gp130-hIL-11R und -mIL-11R untersucht. Es wurden diese beiden Ba/F3-Zelllinien verwendet, da es von Interesse war, ob sich murine und humane Rezeptoren in ihrem Bindungsverhalten sowie in ihren Signalen und Proliferation unterscheiden.

### 7.1.1 hIL-6 aktiviert STAT3- und ERK-Signalwege in IL-6R-defizienten Zellen über den humanen IL-11R

Durch Bindung von humanem IL-6 an den IL-6R wird normalerweise über  $\beta$ -Rezeptor gp130-Homodimere intrazelluläre Signaltransduktion induziert. Bei Bindung von IL-6 an den IL-11R sollte nun also ebenfalls eine Signaltransduktion ausgelöst werden. Die folgend ablaufenden Signalkaskaden führen dazu, dass die Transkriptionsfaktoren STAT3 sowie ERK phosphoryliert werden (vgl. Kapitel 5.4). Aus diesem Grund konnte die Signaltransduktion mithilfe von Phospho-STAT3- sowie Phospho-ERK-Assays untersucht werden. Die verwendeten Suspensionszellen, die den humanen IL-11R, allerdings keinen IL-6R enthielten, wurden für die Untersuchung mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-6 oder im Vergleich von IL-11 stimuliert. Als Konzentrationen für die Zytokinstimulation wurden für IL-6 10, 100 und 1000 ng/ml und für IL-11 0,1, 1 und 10 ng/ml verwendet. Zusätzlich wurde zum einen eine Positivkontrolle mit H-IL-6 (vgl. Kapitel 5.5) und zum anderen eine Negativkontrolle ohne Zytokin eingesetzt. Anschließend wurden die stimulierten Zellen analysiert (vgl. Kapitel 6.7.1). Die Zellen wurden gesammelt, pelletiert und lysiert. Zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts in den Lysaten und anschließenden Einstellung einer bestimmten Proteinkonzentration kamen BCA-Assays der entstandenen Zelllysate zum Einsatz (vgl. Kapitel 6.7.2). Es wurden Verdünnungen der Lysate auf eine vorgegebene Konzentration von 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  hergestellt und diese in *Lämmli*-Puffer erhitzt. Die elektrophoretische Trennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse im Zelllysate wurde mittels SDS-PAGE durchgeführt (vgl. Kapitel 6.7.3). Die Detektion erfolgte schließlich mittels Anti-Phospho-STAT3-, -STAT3-, -Phospho-ERK- und -ERK-Antikörper (vgl. Tabelle 6) durch Western Blotting (vgl. Kapitel 6.7.4). Zur Auswertung wurde der *ECL ChemoCam Imager* (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) verwendet (vgl. Kapitel 6.7.6). Sie ist in Abb. 4 dargestellt.

Die Auswertung konnte bei Aktivierung der genannten Signalkaskaden eine erhöhte Menge an phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3) und phosphoryliertem ERK (pERK) zeigen. Der Nachweis von pERK wurde erstmalig erbracht, der Nachweis von pSTAT3 konnte wie in Vorstudien (Frank 2018) reproduziert werden. IL-6 löste bei einer Konzentration von 1000 ng/ml vergleichbare pSTAT3- und pERK-Signale wie IL-11 bei einer Konzentration von 10 ng/ml aus. In hohen Konzentrationen löste IL-6 also intrazelluläre Signaltransduktion in Ba/F3-Zellen, die neben gp130 den IL-11R aber nicht den IL-6R exprimierten, aus. H-IL-6 als Positivkontrolle zeigte ebenfalls deutliche pSTAT3- und pERK-Signale, wohingegen die Negativkontrolle ohne Zytokin keine Signale auslöste. (vgl. Abb. 4)



**Abbildung 4: IL-6 induziert STAT3- und ERK-Phosphorylierung in IL-6R defizienten Zellen, die den hIL-11R exprimieren**

Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen wurden mit den angegebenen Zytokin Konzentrationen stimuliert. STAT3- und ERK-Phosphorylierung wurde mittels Western Blotting detektiert. Als Positivkontrolle wurde H-IL-6 eingesetzt (+), als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen (-). Das gezeigte Experiment ist eines von  $n = 3$  Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

### 7.1.2 hIL-6 induziert Proliferation in IL-6R-defizienten Zellen über den humanen IL-11R

Weiterhin wurde mithilfe von Proliferationsassays (vgl. Kapitel 6.6.8) die als Folge der Signaltransduktion ablaufende Proliferation der Suspensionszellen mit humanem IL-11R, ohne IL-6R, untersucht. Da Ba/F3-Zellen nur zytokinabhängig proliferieren, sind sie für dieses Verfahren geeignet. Ein *Crosstalk* von IL-6 zum humanen IL-11R würde sich also in einer vermehrten Zellproliferation zeigen.

Die Zellen wurden durch verschiedene Konzentrationen von IL-6 und IL-11 stimuliert (vgl. Kapitel 6.6.8). Es wurden Konzentrationsreihen der Zytokine gebildet und jede Konzentration in Triplets auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Die höchste Konzentration lag bei 1000 ng/ml. Pro Reihe wurden weitere 1:3 Verdünnungen der jeweils vorherigen Reihe hergestellt. Es wurden ebenfalls Triplets einer Positivkontrolle der Ba/F3-gp130-hIL-11R-Zellen mit H-IL-6 und Triplets einer Negativkontrolle ohne Zytokin aufgetragen.

Der Assay wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden mittels Fluoreszenzspektroskopie bei 590 nm ausgewertet (vgl. Kapitel 6.6.8). Jede Probe wurde als Triplet aufgetragen, damit im Anschluss an die Auswertung die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet und grafisch dargestellt werden konnten (vgl. Abb. 5). Das Ergebnis des durchgeführten Proliferationsassays zeigte eindeutig sowohl durch

Stimulation der Ba/F3-gp130-hIL-11R mit IL-11 als auch mit IL-6 eine vermehrte Proliferation nach 72 Stunden. Die vermehrte Proliferation zeigte sich in Abhängigkeit von der Zytokinkonzentration, währenddessen zeigte IL-11 eine ca. 100 x höhere Aktivität als IL-6 (vgl. Abb. 5).

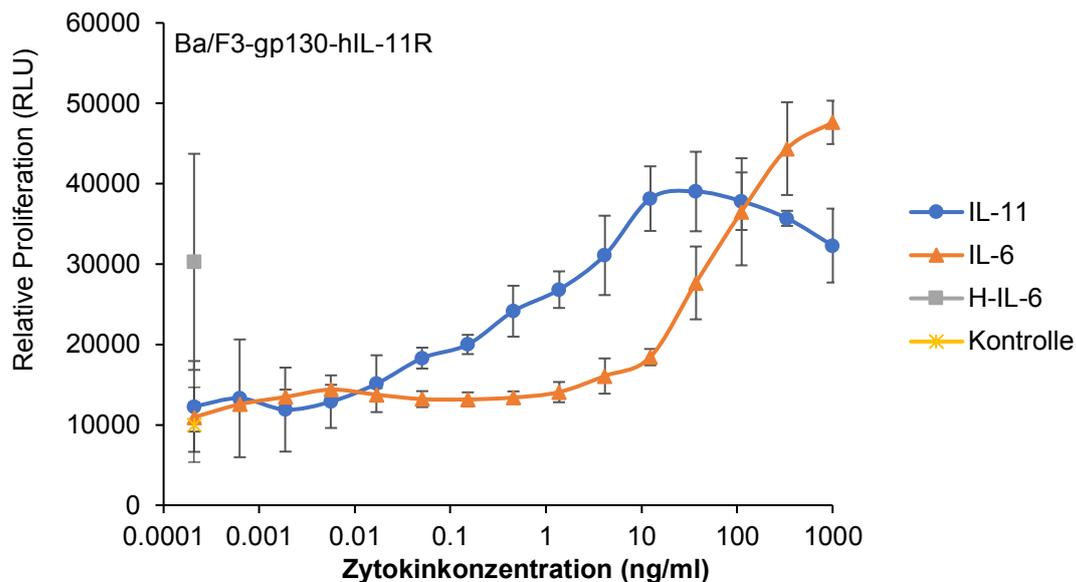


Abbildung 5: **IL-6 induziert Proliferation in IL-6R defizienten Zellen, die den hIL-11R exprimieren**

Die Abbildung zeigt die relative Proliferation in Abhängigkeit zur Zytokinkonzentration in ng/ml. Es wurden Suspensionszellen Ba/F3-gp130-hIL-11R verwendet, die mit den humanen Zytokinen IL-6 (in orange/ als Dreiecke dargestellt) oder IL-11 (in blau/ als Kreise dargestellt) stimuliert wurden. Weiterhin enthält die Abbildung eine Positivkontrolle H-IL-6 (in grau/ als Viereck dargestellt), sowie eine Negativkontrolle (in gelb/ als Sternchen dargestellt). Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden gemessen. Für die Darstellung wurden 3 Werte gemittelt und die Standardabweichung berechnet und grafisch dargestellt. Es wurde ein repräsentativer Assay dargestellt. Insgesamt wurden n= 8 vergleichbare Assays durchgeführt.

### 7.1.3 hIL-6 aktiviert STAT3- und ERK-Signalwege in IL-6R-defizienten Zellen über den murinen IL-11R

Weiterhin wurde die Signaltransduktion durch humanes IL-6 erstmalig in IL-6R defizienten Suspensionszellen mit stabil transduziertem murinem IL-11R untersucht. Diese Versuche dienten der Untersuchung, ob sich die Signaltransduktion über den humanen IL-11R von der über den murinen IL-11R unterscheidet. Der Ablauf der Stimulation der Ba/F3-gp130-mIL-11R entsprach dem der Stimulation mit Ba/F3-gp130-hIL-11R (vgl. Kapitel 7.1.1).

Sowohl die Stimulation mit hIL-11 als auch mit hIL-6 induzierte Signaltransduktion, die sich anhand einer Aktivierung von STAT3 und ERK in Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen nachweisen ließ. Bei einer hIL-6 Konzentration von 1000 ng/ml zeigte sich eine vergleichbare STAT3- sowie ERK-Aktivierung wie bei einer hIL-11 Konzentration von 10 ng/ml (vgl. Abb. 6). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass hIL-6 sowohl über den humanen als auch den murinen IL-11R Signaltransduktion induzieren kann. Analog zur humanen Situation wird eine ca. 100 x höhere IL-6 Konzentration benötigt, um eine vergleichbare Aktivierung wie durch den kanonischen Liganden IL-11 zu erhalten.

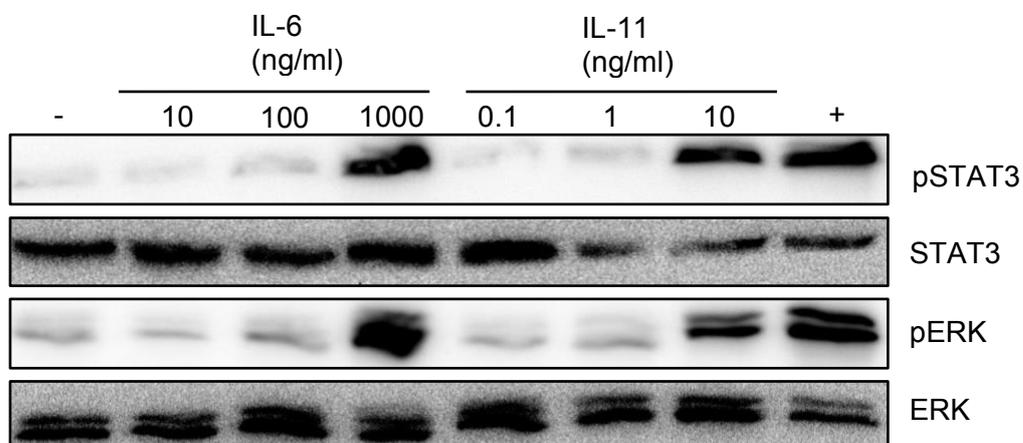


Abbildung 6: IL-6 induziert STAT3- und ERK-Phosphorylierung in IL-6R defizienten Zellen, die den mIL-11R exprimieren

Ba/F3-gp130-mIL-11R wurden mit humanem IL-6 oder IL-11 stimuliert und die STAT3- und ERK-Phosphorylierung via Western Blotting untersucht. Die Detektion erfolgte nach Inkubation mithilfe der primären Antikörper pSTAT3, STAT3, pERK und ERK. Zur Analyse wurden 40 µg Gesamtprotein pro Kammer pro Konzentration aufgetragen. Weiterhin wurden die Positivkontrolle H-IL-6 (+), sowie eine unstimulierte Negativkontrolle (-) aufgetragen. Die Abbildung stellt repräsentativ eine Analyse von n = 3 dar.

#### **7.1.4 hIL-6 induziert Proliferation in IL-6R-defizienten Zellen über den murinen IL-11R**

Weiterhin wurden die Effekte von humanen Zytokinen auf die Proliferation von Suspensionszellen ohne IL-6R, mit murinem IL-11R untersucht. Hierbei war von Interesse, ob auch, wie beim humanen IL-11R gezeigt (vgl. Kapitel 7.1.2), beim murinen IL-11R über IL-6 Proliferation ausgelöst werden kann. Sollte IL-6 ebenfalls einen Crosstalk zum murinen IL-11R aufweisen, würde er sich in einer vermehrten Zellproliferation zeigen.

Um die Proliferation zu messen, wurde ein Proliferationsassay (vgl. Kapitel 6.6.8) mit Ba/F3-gp130-mIL-11R-Zellen durchgeführt. Die Auswertung zeigte eine vermehrte Proliferation in Abhängigkeit zur Zytokinkonzentration (vgl. Abb. 7). Sowohl humanes IL-11 als auch humanes IL-6 lösten jeweils Proliferation in den Ba/F3-gp130-mIL-11R-Zellen aus (vgl. Abb. 7). Diese Ergebnisse sind mit den Ergebnissen in Ba/F3-gp130-hIL-11R-Zellen vergleichbar (vgl. Kapitel 7.1.2). Auch in Zellen mit murinem IL-11R zeigte sich in den dargestellten Ergebnissen, dass sich die benötigte Zytokinkonzentration zwischen IL-11 und IL-6 ca. um den Faktor 1:100 unterschied (vgl. Abb. 7). Durch humanes IL-6 konnte also neben einer Aktivierung von STAT3 und ERK auch eine Induktion von Proliferation in Ba/F3-gp130-mIL-11R-Zellen beobachtet werden.

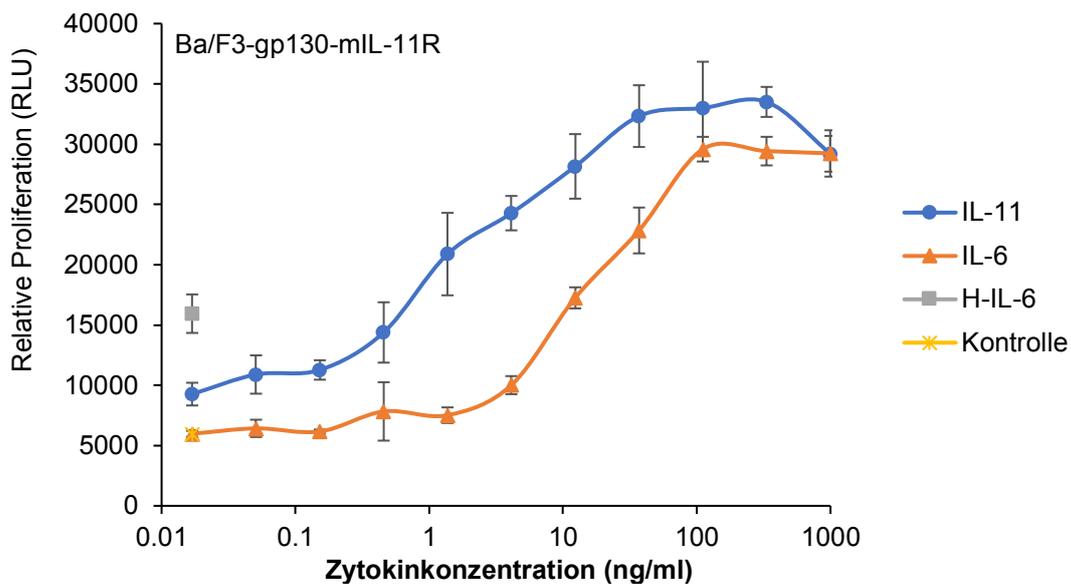


Abbildung 7: **IL-6 induziert Proliferation in IL-6R defizienten Zellen, die den mIL-11R exprimieren**

Die Abbildung zeigt die Relative Proliferation in Abhängigkeit zur Zytokinkonzentration in ng/ml. Für die Versuchsdurchführung wurden Zytokinkonzentrationsreihen erstellt. Es wurden Suspensionszellen Ba/F3-gp130-mIL-11R verwendet, die mit den humanen Zytokinen IL-6 (in orange/ Dreiecken dargestellt) oder IL-11 (in blau/ Kreisen dargestellt) stimuliert wurden. Weiterhin enthält die Abbildung eine Positivkontrolle H-IL-6 (in grau/ als Viereck dargestellt), sowie eine Negativkontrolle (in gelb/ als Sternchen dargestellt). Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden gemessen. Für die Darstellung wurden 3 Werte gemittelt und die Standardabweichung berechnet und grafisch dargestellt. Es wurde ein repräsentativer Assay dargestellt. Insgesamt wurden n= 7 vergleichbare Assays durchgeführt.

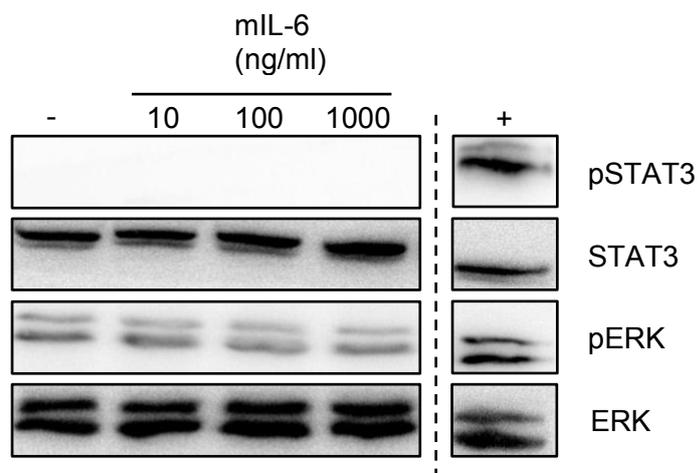
### 7.1.5 Keine Signaltransduktion durch murines IL-6 in IL-6R-defizienten Zellen

Die Signaltransduktion in Suspensionszellen ohne IL-6R, mit murinem IL-11R, also Ba/F3-gp130-mIL-11R, nach Stimulation mit murinen Zytokinen wurde über den Nachweis der STAT3- und ERK-Phosphorylierung untersucht. Der Ablauf der Stimulation wurde wie in Kapitel 6.6.9 beschrieben durchgeführt. Für die Stimulation der Ba/F3-gp130-mIL-11R-Zellen wurden für das murine IL-6 Konzentrationen von 10, 100 und 1000 ng/ml eingesetzt. Des Weiteren wurden eine Positivkontrolle mit H-IL-6 und eine Negativkontrolle ohne Zytokin hinzugegeben.

Es folgte eine Lyse der Zellen. Danach wurde der Gesamtproteinbestand mittels BCA-Assay bestimmt (vgl. Kapitel 6.7.1 und 6.7.2). Die Lysate wurden ebenfalls wie in den vorherigen Versuchen auf eine vorgegebene Konzentration von 2 µg/ µl verdünnt und in *Lämmli*-Puffer erhitzt. Anschließend erfolgte mittels SDS-PAGE eine Trennung nach Molekülmasse und

darauflfolgend eine Detektion durch Western Blotting (vgl. Kapitel 6.7.3 und 6.7.4). Die Western Blotting-Membranen wurden mit den Primärantikörpern pSTAT3, STAT3, pERK und ERK behandelt (vgl. Tabelle 6). Zur Detektion wurde der *INTAS Chemo Cam Imager* (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) verwendet.

Die Ergebnisse zeigten weder Phospho-STAT3- noch Phospho-ERK-Signale bei Stimulation mit dem murinen IL-6 (vgl. Abb. 8).



**Abbildung 8: murines IL-6 ist nicht in der Lage STAT3 oder ERK in IL-6R defizienten Zellen zu aktivieren**

Es wurden Suspensionszellen Ba/F3-gp130-mIL-11R verwendet. Nach 15 min Stimulation mit den genutzten murinem IL-6 erfolgte die Detektion der STAT3- und ERK-Phosphorylierung mithilfe der primären Antikörper pSTAT3, STAT3, pERK und ERK. Für das murine Zytokin IL-6 wurden die Konzentrationen 10, 100 und 1000 ng/ ml verwendet. Weiterhin wurden die Positivkontrolle H-IL-6 (+), sowie die Negativkontrolle (-) aufgetragen. Es wurde jeweils eine Verdünnung des Zelllysats auf 2 µg/ µl hergestellt. Zur Analyse wurden 40 µg Gesamtprotein pro Kammer pro Konzentration aufgetragen. Die Abbildung ist repräsentativ für n = 3 Experimente mit vergleichbaren Resultaten.

### 7.1.6 Keine Proliferation durch murines IL-6 in IL-6R-defizienten Zellen

Auch die Proliferation in Suspensionszellen ohne IL-6R mit murinem IL-11R nach Stimulation mit murinem IL-6 wurde untersucht. Für den Proliferationsassay (vgl. Kapitel 6.6.8) wurde eine Konzentrationsreihe erstellt. Es wurden Konzentrationen im Bereich von 0 bis 1000 ng/ml genutzt. Pro Reihe wurde eine Verdünnung von 1:3 zur jeweils vorherigen Reihe hergestellt. Jede Konzentration wurde in Triplets aufgetragen.

Die Ergebnisse zeigten bei keiner der verwendeten Konzentrationen eine Proliferation der Ba/F3-gp130-mIL-11R-Zellen durch Stimulation mit mIL-6. Durch Stimulation mit H-IL-6 wurde eine Proliferation nachgewiesen. (vgl. Abb. 9)

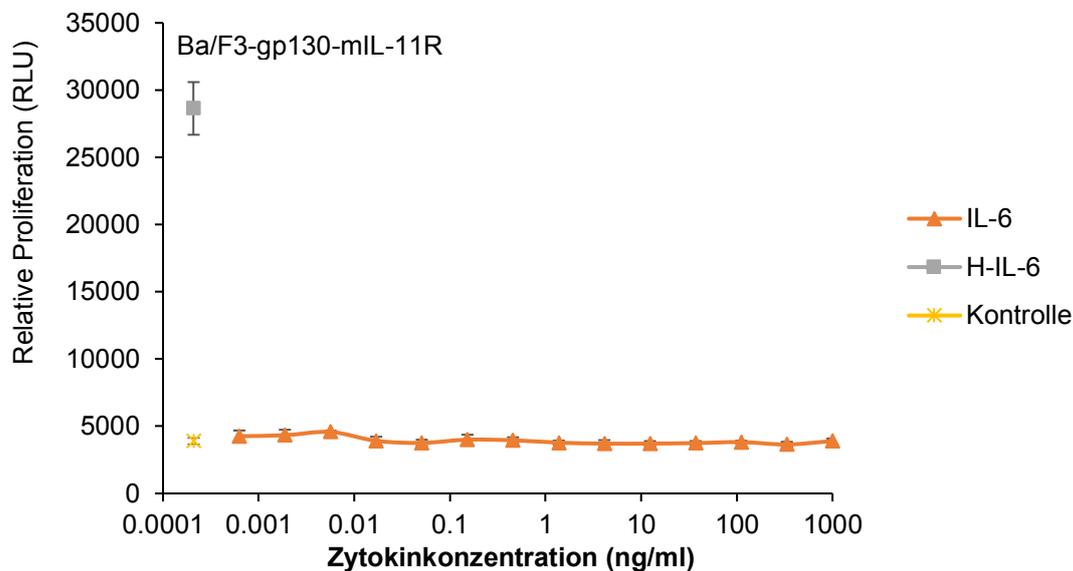


Abbildung 9: murines IL-6 induziert keine Proliferation in IL-6R defizienten Zellen, die den mIL-11R exprimieren

Die Abbildung zeigt die relative Proliferation in Abhängigkeit zur Zytokinkonzentration in ng/ml. Für die Versuchsdurchführung wurden Zytokin-Konzentrationsreihen erstellt. Es wurden Suspensionszellen Ba/F3-gp130-mIL-11R verwendet, die mit murinem IL-6 (in orange/ als Dreiecke dargestellt) oder H-IL-6 (in grau/ als Viereck dargestellt) stimuliert wurden. Eine Negativkontrolle (in gelb/ als Sternchen dargestellt) wurde ebenfalls durchgeführt. Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden gemessen. Für die Darstellung wurden 3 Werte gemittelt und die Standardabweichung berechnet und grafisch dargestellt. Es wurde ein repräsentativer Assay dargestellt. Insgesamt wurden n=8 vergleichbare Assays durchgeführt.

Um zu untersuchen, dass das murine IL-6 aktiv ist, wurde dessen Aktivität mithilfe eines weiteren Proliferationsassays überprüft. Zur Durchführung dieses Versuchs wurden Zellen genutzt, die weder einen IL-6R noch einen IL-11R enthielten, sogenannte Ba/F3-gp130 Zellen (vgl. Tabelle 3). Es wurden unterschiedliche Konstellationen überprüft. Aufgrund der genannten fehlenden IL-6 und IL-11 Rezeptoren in dieser Zelllinie löste die Stimulation durch murines oder humanes IL-6 keine Proliferation aus (Abb. 10, Balken 1 und 2). Die Proliferation konnte allerdings durch Zugabe von murinem löslichen IL-6R bei Stimulation mit mIL-6 und durch Zugabe von humanem löslichen IL-6R bei Stimulation mit hIL-6 nachgewiesen werden (Abb. 10, Balken 3 und 6). Durch Zugabe von humanem löslichen IL-6R bei Stimulation mit mIL-6 konnte keine Proliferation nachgewiesen werden, dagegen zeigten die Zellen durch Zugabe von murinem löslichen IL-6R bei Stimulation mit hIL-6 Proliferation (Abb. 10, Balken 4 und 5). Das jeweilige Proliferationsverhalten ist erklärbar, da das murine IL-6 nicht an den humanen löslichen IL-6R bindet, humanes IL-6 jedoch an den murinen löslichen IL-6R bindet (Jostock, Mullberg et al. 2001).

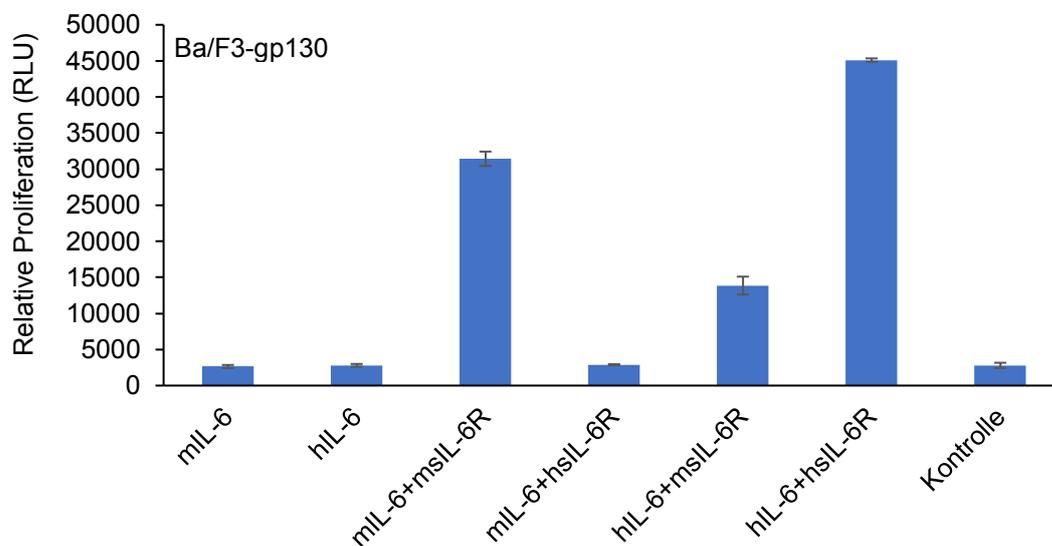


Abbildung 10: Zellviabilitätsassay nach Stimulation von Ba/F3-gp130-GFP mit mIL-6 und hIL-6 sowie ohne und mit Zugabe von löslichen Rezeptoren

Die Abbildung zeigt die relative Proliferation (RLU) der Suspensionszellen Ba/F3-gp130-GFP. Die erste Säule stellt die Stimulation der Zellen mit dem murinen Zytokin IL-6 (500 ng/ml), mIL-6, dar, die zweite Säule stellt die Stimulation mit dem humanen Zytokin IL-6 (500 ng/ml), hIL-6, dar. Bei der dritten Säule wurde zusätzlich zum mIL-6 und bei der fünften Säule zusätzlich zum hIL-6 jeweils der msIL-6R (200 ng/ml) hinzugegeben. Bei der vierten Säule wurde zusätzlich zum mIL-6 und bei der sechsten Säule zusätzlich zum hIL-6 jeweils der hsIL-6R (200 ng/ml) hinzugegeben. Weiterhin ist eine Negativkontrolle dargestellt (siebte Säule). Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden gemessen.

## 7.2 Direkte Inhibierung des IL-11R unterbindet Signaltransduktion und Proliferation durch IL-6 auf IL-6R-defizienten Zellen

Durch die in den vorherigen Kapiteln dargestellten Daten konnte als indirekter Nachweis gezeigt werden, dass durch humanes IL-6 auf IL-6R-defizienten-Zellen, die gp130 und entweder den humanen oder murinen IL-11R exprimieren, Signaltransduktion und Proliferation ausgelöst wurde (vgl. Kapitel 7.1.1 bis 7.1.4). Es war von Interesse direkt zu zeigen, dass Signaltransduktion und Proliferation über den IL-11R geschehen. Für den direkten Nachweis wurde der Antikörper *anti-mIL-11R* (R & D Systems, Wiesbaden) und die Zelllinie Ba/F3-gp130-mIL-11R verwendet. Der Antikörper wurde sowohl zur Inhibition der Signaltransduktion als auch zur Inhibition der Proliferation eingesetzt.

### 7.2.1 Inhibierung der STAT3- und der ERK-Phosphorylierung nach Blockierung des mIL-11R

Die Inhibition durch den *anti-mIL-11R* und die Zugabe der Zytokine wurden in 500 µl Ansätzen durchgeführt. Die Zugabe des neutralisierenden Antikörpers *anti-mIL-11R* in die Zellsuspension erfolgte vor Zugabe des Zytokins im Rahmen einer 15-minütigen Vorinkubation (vgl. Kapitel 6.6.10). Alle Ansätze wurden nach Zugabe des Zytokins für weitere 15 Minuten inkubiert. Es wurden 2 Ansätze mit 30 µl des Antikörpers *anti-mIL-11R* (vgl. Tabelle 4) mit einer Konzentration von 500 µg/ml und 8 Ansätze ohne Antikörper vorbereitet. Die Ansätze ohne Antikörper dienen dem Vergleich. In diesen Ansätzen wurden Phospho-STAT3- und Phospho-ERK-Signale erwartet, welche dann vergleichend in den Ansätzen mit dem Antikörper inhibierbar sein sollten.

Konkret wurden die folgenden Zytokinkonditionen hinzugegeben. Für IL-6 gab es 4 Ansätze, jeweils mit 10, 100 und 2 Ansätze mit 1000 ng/ml. Auch für IL-11 gab es 4 Ansätze jeweils mit 0,1, 1 und 2 Ansätze mit 10 ng/ml. Ein Ansatz mit dem enthaltenen *anti-mIL-11R* enthielt 10 ng/ml des Zytokins IL-11, der andere Ansatz mit *anti-mIL-11R* enthielt 1000 ng/ml des Zytokins IL-6. Auch gab es eine Negativkontrolle ohne Zytokin und eine Positivkontrolle mit H-IL-6 (20 ng/ml).

Nach Durchführung der Zellyse, des BCA-Assays und der SDS-PAGE (vgl. Kapitel 6.7.1, 6.7.2 und 6.7.3) wurde die Detektion mithilfe des Western Blottings durchgeführt (vgl. Kapitel 6.7.4). Es wurde ebenfalls, wie bereits in Kapitel 7.1.1 und 7.1.3, die induzierte

Signaltransduktion durch STAT3- und ERK-Phosphorylierung gezeigt. Zusätzlich wurde direkt die Hemmung der vorher induzierten Signaltransduktion dargestellt (vgl. Abb. 11).

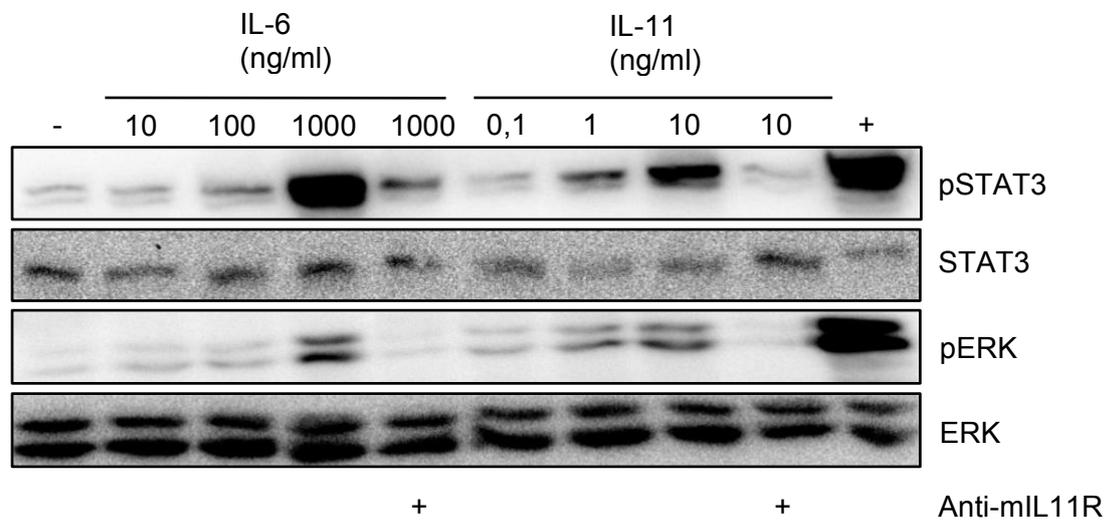


Abbildung 11: **Western-Blotting-Analyse von Zelllysaten der Ba/F3-gp130-mIL-11R gegen pSTAT3, STAT3, pERK, ERK nach Stimulation mit IL-6, IL-11 und H-IL6. Für die Inhibition wurde vor Stimulation mit dem neutralisierenden Antikörper *anti-mIL-11R* vorinkubiert.**

Für dieses Expressions-Western-Blotting wurden Suspensionszellen Ba/F3-gp130-mIL-11R verwendet. Die Detektion erfolgte mithilfe von pSTAT3, STAT3, pERK, ERK. Für das humane Zytokin IL-6 wurden die Konzentrationen 10, 100 und 1000 ng/ml verwendet. Beim humanen Zytokin IL-11 wurden die Konzentrationen 0,1, 1 und 10 ng/ml verwendet. Es wurden 2 Ansätze für 15 min mit 30 µl des Antikörpers *anti-mIL-11R* (Konzentration 500 µg/ml) vorinkubiert und anschließend 15 min mit den jeweiligen Zytokinen IL-6 (1000 ng/ml) oder IL-11 (10 ng/ml) stimuliert. Die anderen Ansätze wurden nicht vorinkubiert und direkt für 15 min mit der jeweiligen Zytokinkonzentration von IL-6 oder IL-11 stimuliert. Weiterhin wurden die Positivkontrolle H-IL-6 (in der zehnten Spalte, mit einem Plus bezeichnet) sowie die Negativkontrolle (in der ersten Spalte, mit einem Minus bezeichnet) aufgetragen. Die Zelllysate wurden jeweils auf 2 µg/µl verdünnt. Zur Analyse wurden 40 µg Gesamtprotein pro Kammer pro Konzentration aufgetragen. Die Abbildung stellt repräsentativ eine Analyse von n=3 dar.

Es war zu erkennen, dass IL-6 bei einer Konzentration von 1000 ng/ml eine STAT3- und ERK-Aktivierung induzierte (vgl. Abb. 11, 4. Spalte). Durch antikörpervermittelte Blockade des IL-11R konnten sowohl eine STAT3 als auch eine ERK-Aktivierung inhibiert werden. Ein ähnliches Bild war nach IL-11 Stimulation zu erkennen. Während IL-11 eine robuste STAT- und ERK-Aktivierung in Ba/F3-gp130-mIL-11R Zellen induzierte, wurde diese Aktivierung der Signaltransduktion durch IL-11 durch den Antikörper *anti-mIL-11R* inhibiert. Eine Negativkontrolle ohne Zytokin löste keine Signaltransduktion aus.

Die dargestellten Ergebnisse zeigten also eine deutliche direkte Inhibition der Signaltransduktion durch Blockierung des IL-11R mithilfe des *anti-mIL-11R*.

### 7.2.2 Inhibierung der Proliferation durch IL-6 nach Blockierung des mIL-11R in IL-6R-defizienten Zellen

Weiterhin wurde zusätzlich auch die direkte Inhibition der zuvor induzierten Zellproliferation durch den Antikörper *anti-mIL-11R* in Ba/F3-gp130-mIL-11R-Zellen untersucht. Im Rahmen dieses Versuchs wurden für die Stimulation Verdünnungsreihen von IL-6 und IL-11 hergestellt ebenso wie in den vorher beschriebenen Proliferationsassays (vgl. Kapitel 7.1.2 und 7.1.4). Für die Inhibitionsansätze mit dem Zytokin IL-6 wurde eine Konzentration von 100 ng/ml und mit dem Zytokin IL-11 eine Konzentration von 0,3 ng/ml verwendet. Als konstante Antikörperkonzentration wurde 30 µg/ml gewählt. Für den Inhibitionsassay wurden das jeweilige Zytokin und der Antikörper in den gleichen Ansatz gegeben. Im Gegensatz zu den Ansätzen, die der Untersuchung der Signaltransduktion dienen, war eine Vorinkubation durch den Antikörper nicht notwendig. Sowohl die Stimulations- als auch die Inhibitionsansätze wurden für 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung, wie in Kapitel 6.6.8 beschrieben, mit dem *Infinite M200 Pro Reader* (Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz).

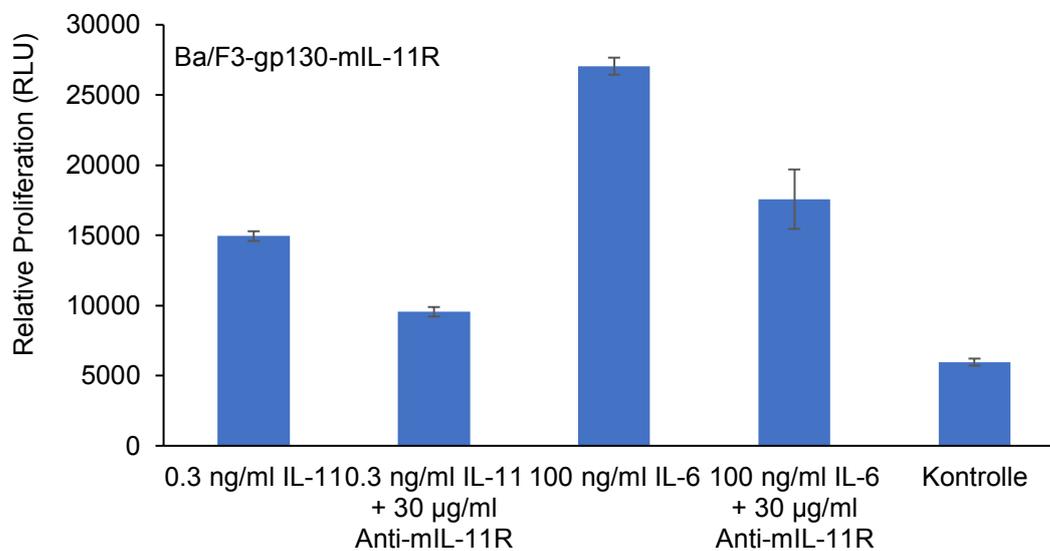


Abbildung 12: **Zellviabilitätsassay nach Stimulation von Ba/F3-gp130-mIL-11R mit humanen Zytokinen sowie ohne und mit Zugabe des *anti-mIL-11R***

Die Abbildung zeigt die relative Proliferation der Suspensionszellen Ba/F3-gp130-mIL-11R. Die erste Säule stellt die Stimulation der Zellen mit dem humanen Zytokin IL-11 (0,3 ng/ml) dar, die dritte Säule stellt die Stimulation mit dem humanen Zytokin IL-6 (100 ng/ml) dar. Bei den Säulen 2 und 4 wurde jeweils zu dem jeweiligen Zytokin zusätzlich der neutralisierende Antikörper *anti-mIL-11R* hinzugegeben. Weiterhin ist eine Negativkontrolle dargestellt (5. Säule). Die Zellproliferation wurde nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden gemessen. n=3.

Analog zu den Ergebnissen, die bei Zellstimulationen beobachtet wurden, konnte IL-6 und IL-11 induzierte Proliferation von IL-6R defizienten Ba/F3-gp130-mIL-11R Zellen durch Zugabe eines *Anti-mIL-11R* Antikörpers blockiert werden (vgl. Abb. 12).

### 7.3 Affinität von IL-6 zum sIL-11R

Ergänzend zu den oben beschriebenen Versuchen wurde zur weiteren Untersuchung des Crosstalks das Bindungsverhalten zwischen IL-6 und dem löslichen IL-11R mithilfe der Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie (vgl. Kapitel 6.8) genauer geprüft. Die Methode diente also dem Nachweis der direkten Interaktion sowie der Bestimmung der Affinität und der Kinetik.

Das Signal, welches bei dieser Messung sichtbar wurde, korrelierte mit der Massenzunahme auf der Oberfläche des Sensorchips. Diese Massenzunahme entstand dann, wenn IL-6 mit dem immobilisierten Bindungspartner, im untersuchten Fall dem löslichen IL-11R, interagierte.

Über die Dissoziationskonstante kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob das Gleichgewicht eher bei der dissoziierten oder doch eher bei der undissoziierten Form liegt. Je größer die Dissoziationskonstante ist, desto eher liegt das Gleichgewicht bei der dissoziierten Form. Das bedeutet außerdem, je höher die Affinität des Zytokins zu seinem Bindungspartner ist, umso niedriger ist die Dissoziationskonstante.

Es ergab sich eine Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 10.3 nM bei IL-6 (vgl. Abb. 13). Damit ist die Affinität von IL-6 zum IL-11R überraschenderweise vergleichbar mit publizierten Werten für die Affinitäten von IL-6 zum IL-6R von 0,5-34 nM (Baran, Hansen et al. 2018) und IL-11 zum IL-11R von 1,5 – 50 nM (Curtis, Hilton et al. 1997).

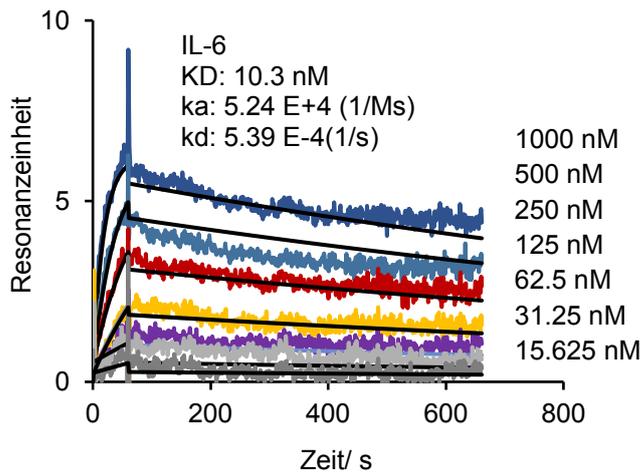


Abbildung 13: Sensorgramme der Bindung von IL-6 an den sIL-11R-Sensorchip

Bindungsreaktionen wurden bei einer Flussrate von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  detektiert. Auf die Oberfläche eines CM5 Sensorchips wurde sIL-11R immobilisiert. Dargestellt ist der Verlauf der Signale nach Zugabe unterschiedlicher Assay-Konzentrationen bei  $t_0$  (von unten nach oben: 15,625 nM, 31,25 nM, 62,5 nM, 125 nM, 250 nM, 500 nM, 1000 nM). Die Abbildung zeigt die Protein-Protein-Interaktion zwischen IL-6 und dem auf dem Sensorchip enthaltenen immobilisierten IL-11R in Echtzeit (Zeit/ s).

#### 7.4 Expression von IL-6R-VHH-Fc in stabil transduzierten HEK-293-T-Zellen

Weiterhin wurde eine adhärenz stabile Zelllinie mit dem Ziel etabliert, sie für weitere Crosstalk-Untersuchungen nutzen zu können. Hintergrund ist, dass eine minimale IL-6R Expression in nahezu allen erhältlichen humanen Zelllinien nachweisbar ist. Durch diese minimale Expression ist eine backgroundfreie Analytik von Crosstalk IL-6 Effekten bei hohen IL-6 Konzentrationen kaum möglich. Um dieses Problem zu lösen, sollte die Aktivität des IL-6R durch die stabile Expression eines IL-6R neutralisierenden Nanobodies unterdrückt werden. Verwendet wurden hierfür HEK-293-T-GFP-Zellen. In diese Zellen wurde folgend erstmals der IL-6R-VHH-Fc stabil transduziert (vgl. Kapitel 6.6.4). Der *IL-6R-VHH-Fc* ist ein modifizierter neutralisierender *VHH* Nanobody. Ein Nanobody ist ein nicht-humanes Antikörperfragment. Nanobodies können mit verschiedenen Domänen fusioniert werden und dadurch unterschiedliche Zieldomänen erhalten (Van Roy, Ververken et al. 2015). Der in dieser Arbeit verwendete Nanobody richtet eine Domäne gegen den IL-6R sowie eine weitere gegen das Fc Fragment, einem humanen Immunglobulin G (IgG). Die fusionierte Form, *VHH-Fc*, ist stabiler und hat eine höhere Aktivität mit einer vielfach höheren und längeren Verfügbarkeit als die nicht-fusionierte Form (Lu, Suscovich et al. 2018, Godakova, Noskov et al. 2019).

Die verwendete HEK-293-T-Zelllinie exprimiert normalerweise den IL-6R. Um den Crosstalk durch IL-6 mit dieser Zelllinie untersuchen zu können, muss der IL-6R also blockiert werden. Für diese Experimente wurden HEK293-T Zellen gewählt, da diese Zellen nur geringe Mengen IL-6R exprimieren und leicht transfizierbar sind.

Um eine neue Zelllinie zu etablieren, wurde eine stabile Transfektion mit adhärenen HEK-293-T-Zellen nach Protokoll durchgeführt (vgl. Kapitel 6.6.4). Für die Transfektion wurden je 5 µg der gewünschten DNA in 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> und 10 µl *Turbofect* nach 15 Minuten Inkubation zu den vorbereiteten HEK-293-T-Zellen gegeben.

Nach Ablauf einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurde zur Überprüfung der IL-6R-VHH-Fc Expression eine Western-Blotting-Analyse durchgeführt (Abb. 14). In der Analyse zeigte sich, dass der *Fc-tag* am stärksten im HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc-Pellet exprimiert wurde, dass er allerdings auch im HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc-Überstand detektiert werden konnte (vgl. Abb. 14). Dagegen gab es im als Negativkontrolle aufgetragenen HEK-293-T-Überstand keine Expression des *Fc-tags* (vgl. Abb. 14). Die Ergebnisse zeigten also, dass der IL-6R-VHH-Fc erfolgreich stabil transduziert wurde.



Abbildung 14: **Expressions-Western-Blotting-Analyse von HEK-293-T und HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc gegen Anti-Fc**

Es wurden 40 µl des Überstands von HEK-293-T (in der ersten Spalte), 40 µl des Überstands von HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc (in der zweiten Spalte), 20 µl des *Pellets* von HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc (in der dritten Spalte) aufgetragen. Für die Detektion wurde der Antikörper *Anti-Fc* verwendet.

Nachdem die Analyse die Expression von IL-6R-VHH-Fc detektieren konnte, folgten eine weitere Selektion mit dem Antibiotikum G418 (Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm) und eine Trennung verschiedener Einzelklone nach Protokoll (vgl. Kapitel 6.6.4). Nach weiteren Behandlungen mit G418 und Inkubation bei 37°C wurden die Klone, in denen die Transduktion erfolgreich war, mittels SDS-PAGE und Western Blotting (vgl. Kapitel 6.7.3 und Kapitel 6.7.4) identifiziert. Anschließend ließen sich die Einzelklone, die den Nanobody IL-6R-VHH-Fc am stärksten exprimierten, selektieren. Von diesen Klonen wurden *Cryostocks* (vgl. Kapitel 6.6.6) erstellt, um Verunreinigungen und Verlust der neu etablierten Zelllinie zu vermeiden.

In Abb. 15 wurden jeweils 40 µl der mit *Lämmli*-vermengten Überstände von HEK-293-T als Negativkontrolle sowie jeweils 40 µl der mit *Lämmli*-vermengten Überstände von den Einzelklonen HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc A4, B3, C4, D3, D4, D5 und D8 aufgetragen. Der Einzelklon D4 zeigte die stärkste Expression des *Fc-tags* (vgl. Abb. 15).

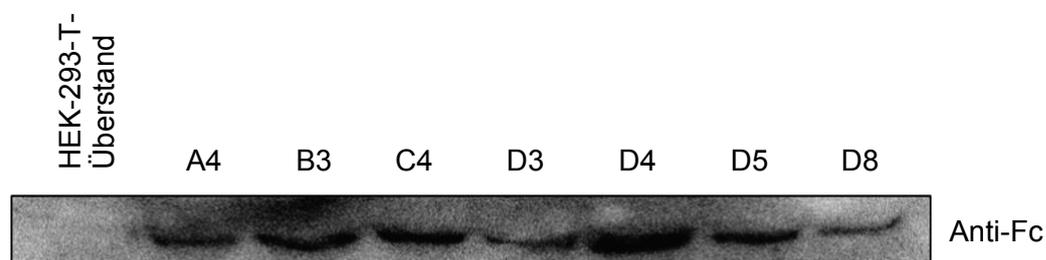
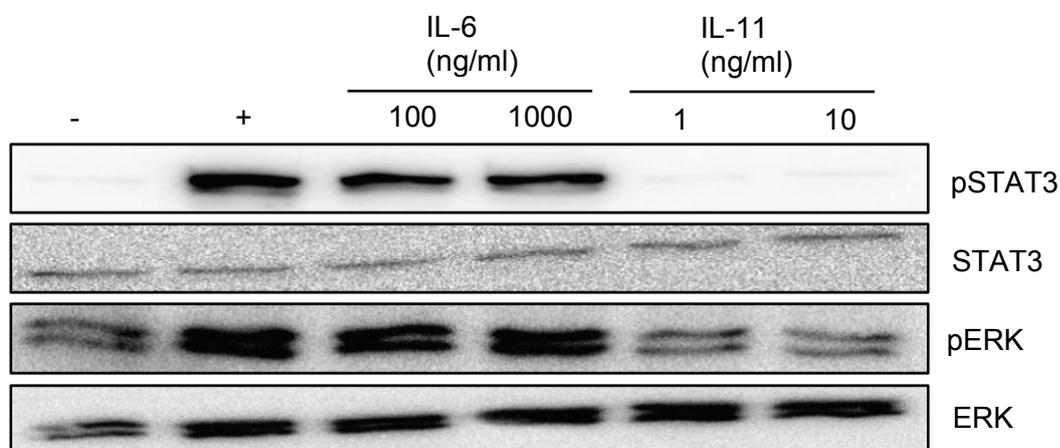


Abbildung 15: Expressions-Western-Blotting-Analyse der HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc-Einzelklone gegen Anti-Fc

Es wurden 40 µl des mit *Lämmli*-vermengten Überstands von HEK-293-T (in der ersten Spalte, als Negativkontrolle) sowie jeweils 40 µl des mit *Lämmli*-vermengten Überstands der HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc Einzelklone A4 (in der zweiten Spalte), B3 (in der dritten Spalte), C4 (in der vierten Spalte), D3 (in der fünften Spalte), D4 (in der sechsten Spalte), D5 (in der siebten Spalte) und D8 (in der achten Spalte) aufgetragen. Für die Detektion wurde der Antikörper *Anti-Fc* verwendet.

Anhand dieser neu generierten Zelllinie sollten IL-6R unabhängige Effekte von IL-6 weiter untersucht werden. Die Expression und die Sekretion des IL-6R-VHH sollten den IL-6R neutralisieren. Demnach sollten die Zellen in Abwesenheit des IL-11R nicht mehr auf IL-6 reagieren. Um diesen Nachweis zu erbringen, wurde eine Stimulation der HEK-293-T-GFP und der HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc-GFP-Zellen mit IL-6 und IL-11 durchgeführt (vgl. Kapitel 6.6.9). Im nächsten Schritt wurden Zelllysate hergestellt (vgl. Kapitel 6.7.1). Eine Western-Blotting-Analyse der Proben zeigte eine deutliche Aktivierung von STAT3 und ERK in HEK-293-T-GFP-Zellen (vgl. Abb. 16) und eine deutlich reduzierte IL-6 vermittelte Aktivierung der HEK293-T-GFP-IL-6R-VHH-Fc Zellen (vgl. Abb. 17).

Die IL-6R-VHH-Fc Expression führte also zu einer starken Reduktion der IL-6R Aktivität in diesen Zellen. Damit können diese Zellen eine Grundlage für weitere Arbeiten bilden, bei denen zusätzlich der IL-11R transfiziert wird. Damit sollten die Zellen IL-11 responsiv werden. Bei erfolgreichem Crosstalk von IL-6 über den IL-11R sollte eine Wiederherstellung der IL-6 Signaltransduktion in Anwesenheit von sIL-11R oder membranständigem IL-11R in HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc-Zellen nachweisbar sein. Diese Nachweise konnten im Zuge dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.



**Abbildung 16: Expressions-Western-Blotting von Zelllysaten der HEK-293-T-GFP gegen pSTAT3, STAT3, pERK, ERK nach Stimulation mit IL-6, IL-11 und H-IL-6**

Für dieses Expressions-Western-Blotting wurden adhärenente HEK-293-T-GFP Zellen verwendet. Die Detektion erfolgte mithilfe der primären Antikörper pSTAT3, STAT3, pERK und ERK. In der ersten Spalte wurde eine Negativkontrolle ohne Zytokin und in der zweiten Spalte eine Positivkontrolle mit H-IL-6 aufgetragen. Für das humane Zytokin IL-6 wurden die Konzentrationen 100 und 1000 ng/ml verwendet. Beim humanen Zytokin IL-11 wurden die Konzentrationen 1 und 10 ng/ml verwendet. Zur Analyse wurden 42 µg Gesamtprotein pro Kammer pro Konzentration aufgetragen. n=1

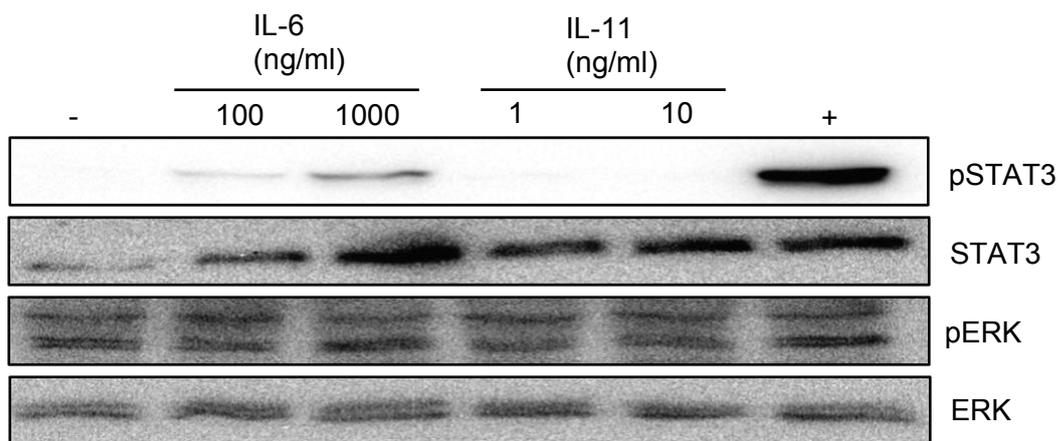


Abbildung 17: **Expressions-Western-Blotting von Zelllysaten der HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc-GFP gegen pSTAT3, STAT3, pERK, ERK nach Stimulation mit IL-6, IL-11 und H-IL-6**

Für dieses Expressions-Western-Blotting wurden adhärenente HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc-GFP Zellen verwendet. Die Detektion erfolgte mithilfe der primären Antikörper pSTAT3, STAT3, pERK und ERK. In der ersten Spalte wurde eine Negativkontrolle ohne Zytokin und in der sechsten Spalte eine Positivkontrolle mit H-IL-6 aufgetragen. Es wurden IL-6 Konzentrationen von 100 und 1000 ng/ ml sowie IL-11 Konzentrationen von 1 und 10 ng/ ml verwendet. Zur Analyse wurden 40 µg Gesamtprotein pro Kammer pro Konzentration aufgetragen. n=1

## 7.5 Zusammenfassung

Es lassen sich folgende Aspekte zum IL-6/ IL-11R-Crosstalk festhalten:

1. Es zeigte sich, dass humanes IL-6 in Zellen mit humanem IL-11R sowie in Zellen mit murinem IL-11R Proliferation und Signaltransduktion auslösen kann.
2. Bislang wurden keine Unterschiede in den aktivierten Signalwegen gefunden.
3. Ein Crosstalk durch murines IL-6 konnte nicht nachgewiesen werden.
4. Eine direkte Interaktion zwischen IL-6 und dem IL-11R konnte gezeigt werden.

## 8 Diskussion und Fazit

### 8.1 Humanes IL-6 löst Signaltransduktion und Proliferation über den humanen sowie den murinen IL-11R aus

Studien zeigen die biologische Relevanz von Crosstalk (Salanga, O'Hayre et al. 2009). Im Rahmen dieser Forschungsarbeit war es das Ziel, den Crosstalk zwischen IL-6 und dem IL-11R nachzuweisen, analog zu bekannten Crosstalks innerhalb der IL-6-Zytokinfamilie (Schuster, Kovaleva et al. 2003, Garbers, Hermanns et al. 2012, Garbers, Spudy et al. 2013). Die Ergebnisse unterstützten klar die aufgestellte Hypothese. Um den Crosstalk zu untersuchen, konnten verschiedene Möglichkeiten genutzt werden. Es wurden sowohl indirekte als auch direkte Nachweismethoden verwendet. Signaltransduktion und Proliferation stellten die zu messenden Kriterien dar. Indirekt wurden die durch humane IL-6-Gabe aktivierten Signalwege in den genutzten Ba/F3-gp130-Zellen nachgewiesen, welche keinen IL-6R, jedoch entweder einen murinen oder humanen stabil transduzierten IL-11R enthielten. Zur Messung der Zellproliferation wurden ebenfalls Ba/F3-gp130-Zellen mit stabil transduzierten murinem oder humanem IL-11R verwendet. Auch hier konnte, ohne dass die Zellen einen IL-6R enthielten, Proliferation nachgewiesen werden. Da der murine IL-11R eine Sequenzhomologie von 84% mit dem humanen IL-11R teilt (Nandurkar, Hilton et al. 1996), lag es nahe, dass der Crosstalk sowohl mit humanem als auch mit murinem Rezeptor nachzuweisen sein würde. Da beide Zytokine, IL-6 und IL-11, eine vergleichbare Komplexarchitektur mit ihren Rezeptoren IL-6R oder IL-11R und gp130 ausbilden und zudem komplett überlappende Bindepositionen auf gp130 erkennen lassen (Kurth, Horsten et al. 1999), war es bereits gut vorstellbar, dass zwischen IL-6 und dem IL-11R ein Crosstalk existieren kann.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigten in allen genutzten Ba/F3-Zellen, also mit stabil transduziertem gp130 und humanem oder murinem IL-11R, durch humanes IL-6 ausgelöste pSTAT3- und pERK-Aktivierung sowie Proliferation. Dies unterstützte eindeutig die Annahme eines existierenden Crosstalks zwischen IL-6 und dem IL-11R.

Vorstudien ließen bereits einen alternativen Rezeptor für IL-6 vermuten. IL-6 moduliert Immunantworten und ist notwendig für Wundheilung (Lin, Kondo et al. 2003, McFarland-Mancini, Funk et al. 2010). Es wurden unterschiedliche Phänotypen hinsichtlich DSS-

induzierter Colitis und Wundheilung der Haut von IL-6<sup>-/-</sup> und IL-6R<sup>-/-</sup> Mäusen festgestellt (McFarland-Mancini, Funk et al. 2010, Sommer, Engelowski et al. 2014). Hierbei wurde gezeigt, dass IL-6, jedoch nicht der IL-6R, eine Erholung oder Wundheilung bewirkt (McFarland-Mancini, Funk et al. 2010, Sommer, Engelowski et al. 2014). Die Ergebnisse dieser Arbeit können auch diese Unterschiede durch Nutzung des IL-11R als Niedrigaffinitätsrezeptor für IL-6 erklären.

In anderen Vorstudien wurde bereits ein weiterer Rezeptor, der Rezeptor CD5, als möglicher alternativer IL-6R identifiziert (Zhang, Xin et al. 2016). Es konnte gezeigt werden, dass es IL-6 über den CD5 als alternativen Rezeptor möglich ist, die gp130-STAT3-Achse zu aktivieren (Zhang, Xin et al. 2016). CD5 ist ein T-Zell-Oberflächenglykoprotein und normalerweise nicht auf B-Zellen exprimiert (Domingues, Lago-Baldaia et al. 2016). CD5 kann sich allerdings auf spezifischen Subpopulationen von B-Zellen befinden, je nach Subpopulation können sich die durch CD5 ausgeübten Funktionen unterscheiden (Youinou, Jamin et al. 1999). Diese erwähnte Subpopulation, die sogenannten B-1-Zellen, von humanen sowie murinen B-Zellen ist für die meisten Fälle chronisch lymphatischer B-Zell-Leukämien verantwortlich (Kantor 1991). Da die in dieser Arbeit verwendeten Ba/F3-mIL-11R- oder hIL-11R-Zellen keinen CD5-Rezeptor exprimieren (Garcia-Hernandez, Castellanos et al. 1997), lässt sich der alternative Signalweg über den CD5-Rezeptor in den in dieser Arbeit genutzten Zellen ausschließen. Der Ausschluss dieses Signalweges zeigt erneut, dass IL-6 einen weiteren alternativen Rezeptor, den IL-11R, nutzen kann.

Weiterhin wurde die Annahme eines Crosstalks durch in der Literatur beschriebene Studien mit IL-6R defizienten, gleichwohl IL-6 responsiven HT-29- oder HUVEC-Zellen unterstützt (Watson, Whittaker et al. 1996, Li, Hsieh et al. 2009). Andere Beobachtungen ergaben, dass auch die erythroleukämische Zelllinie K-562 IL-6 responsiv ist (Nakayama 1998). Es gibt Hinweise darauf, dass diese Zellen keinen oder kaum messbare IL-6R Mengen exprimieren. Alle diese Zelllinien besitzen allerdings den verwandten IL-11R (Mahboubi, Biedermann et al. 2000, Chen, Lin et al. 2002, Yoshizaki, Nakayama et al. 2006). Auch diese IL-6 Responsivität in den genannten Zelllinien kann durch die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse erklärt werden.

Auch wurde bereits in humanen K-562- sowie in HEK-293-hIL-11R-Zellen nach hIL-6 Stimulation phosphoryliertes STAT3 nachgewiesen (Frank 2018). Diese STAT3-Phosphorylierung konnte nicht durch den IL-6R-spezifischen Antikörper Tocilizumab inhibiert werden (Frank 2018). Weiterhin wurde bereits in Ba/F3-gp130-hIL-11R-Zellen

eine konzentrationsabhängige STAT3-Aktivierung sowie Proliferation durch hIL-6 nachgewiesen (Frank 2018). Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten sind auch in Bezug auf diese Vorstudien weiterhin schlüssig. Die konzentrationsabhängige STAT3-Aktivierung sowie die Proliferation konnten, wie in den oben genannten Versuchen beschrieben, mit Ba/F3-gp130-hIL-11R-Zellen und humanen Zytokinen reproduziert werden. Zusätzlich konnte die Proliferation erstmalig in Ba/F3-gp130-mIL-11R-Zellen mit humanen Zytokinen gezeigt werden. Der Crosstalk wurde direkt durch die Gabe des neutralisierenden Antikörpers *anti-mIL-11R* und die Gabe von humanen Zytokinen weiter untersucht. Die Ergebnisse zeigten auch hier, dass durch Blockade des murinen IL-11R durch IL-6 keine pSTAT3- und pERK-Aktivierung und auch keine Proliferation in den Ba/F3-Zellen ohne IL-6R ausgelöst werden konnte. Auch diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass die gemessenen Signale bei Stimulation mit IL-6 über den IL-11R ausgelöst werden, da sie sonst durch den Antikörper *anti-mIL-11R* nicht unterbunden worden wären. Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den vorgestellten Vorstudien (McFarland-Mancini, Funk et al. 2010, Sommer, Engelowski et al. 2014).

Die in den Versuchen dieser Arbeit verwendeten humanen IL-6-Konzentrationen lagen im Bereich von 10 bis 1000 ng/ml, die IL-11-Konzentrationen im Bereich von 0,1 bis 10 ng/ml. Für die Aktivierung der Signalwege über den Crosstalk war eine erhöhte Zytokinkonzentration notwendig (vgl. Abb. 4 und 6), was sich mit anderen Crosstalk-Phänomenen innerhalb der IL-6-Familie deckte, wie z. B. zwischen dem IL-6R und CNTF oder dem IL-6R und p28 (Schuster, Kovaleva et al. 2003, Garbers, Spudy et al. 2013). Ebenso war für die Proliferation der Ba/F3-gp130-hIL-11R sowie der Ba/F3-gp130-mIL-11R eine erhöhte Konzentration von IL-6 notwendig (vgl. Abb. 5 und 7). In der frühen Phase der Wundheilung findet eine starke Induktion der COX-2 Expression in der Haut statt (Futagami, Ishizaki et al. 2002), die für die epidermale und dermale Regeneration einer Verletzung relevant zu sein scheint (Futagami, Ishizaki et al. 2002). COX-2 induziert anschließend einen starken Anstieg der Konzentrationen von IL-6 sowie von IL-11 (Singh, Berry et al. 2006). Dadurch können lokal sehr hohe Konzentrationen im Gewebe vorkommen, sodass für den Crosstalk relevante Konzentrationen erreicht werden können. Durch die lokal hohe IL-6-Konzentration im Wundgewebe könnte also eine IL-11R-Aktivierung induziert werden. Diese Aktivierung würde nachfolgend, wie in meinen Ergebnissen gezeigt, zu einer STAT3- und ERK-Phosphorylierung sowie Proliferation führen (vgl. Kapitel 7.1.1 bis 7.1.4).

Weiterhin wurde mithilfe der Oberflächenplasmonresonanz erstmalig die Affinität und Kinetik von humanem IL-6 zum löslichen IL-11R (sIL-11R) untersucht. Das untersuchte Bindungsverhalten von IL-6 zum sIL-11R zeigte sich mit einer vergleichbaren Affinität wie IL-6 zum IL-6R (Baran, Hansen et al. 2018) und IL-11 zum IL-11R (Curtis, Hilton et al. 1997). Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass eine Interaktion zwischen IL-6 und dem sIL-11R stattfindet (vgl. Kapitel 7.3).

Nicht bestätigt werden konnte ein Crosstalk durch murines IL-6. Die Ergebnisse zeigten hier, dass murines IL-6 im Gegensatz zu humanem IL-6 keine Signaltransduktion über den IL-11R induzieren kann.

Es wurde bereits beschrieben, dass humanes IL-6 sowohl den humanen als auch mit geringerer Affinität den murinen IL-6R aktivieren kann. Dagegen aktivierte das murine IL-6 nur den murinen IL-6R. Diese Daten zeigten eine deutliche Speziespezifität im IL-6 *Signaling* (Jostock, Mullberg et al. 2001). Diese Erkenntnisse könnten auch darauf hindeuten, dass murines IL-6 weniger Plastizität in seiner Bindung eingehen kann, wenn bereits eine Bindung zum humanen IL-6R nicht möglich ist. Da der humane IL-6R zu dem murinen IL-6R mehr Ähnlichkeit aufweist als der murine IL-11R zum murinen IL-6R, liegt es nicht fern, dass in den Ergebnissen dieser Arbeit kein Crosstalk durch murines IL-6 gezeigt werden konnte. Weiterhin sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die hier verwendeten Ba/F3-gp130-Zellen humanes gp130 enthielten. Um den Crosstalk weitergehend zu untersuchen, sollten daher Zellen, welche murines gp130 stabil transduzieren, hergestellt werden.

Weiterhin sollten, um einen Zelllinienartefakt ausschließen zu können, Untersuchungen des Crosstalks in einer weiteren Zelllinie durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurden innerhalb dieser Arbeit erstmals HEK-293-T-IL6R-VHH-Fc-Zellen erstellt. Die Etablierung der HEK-293-T-IL-6R-VHH-Fc-Zelllinie kann für nachfolgende Crosstalk Experimente genutzt werden. Bereits in einer Vorstudie zu dieser Arbeit wurden Crosstalk Untersuchungen in HEK-293-T-Zellen mit stabil transduziertem IL-11R durchgeführt. (Frank 2018). In diesen Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch IL-6 Signaltransduktion ausgelöst wurde, welche nicht durch einen IL-6R-spezifischen Antikörper Tocilizumab inhibiert werden konnte. Durch diese Ergebnisse wurde also bereits in HEK-293-T-Zellen gezeigt, dass diese über einen weiteren Rezeptor Signaltransduktion

induzieren können. Die in dieser Arbeit neu etablierte Zelllinie diene dem Zweck, die Expression des IL-6R stabil zu inhibieren, um direkt Interaktionen mit dem IL-11R in einer adhärenen Zelllinie untersuchen zu können. Um diese Interaktionen im Verlauf anhand von Signaltransduktion und Proliferation durch IL-6 untersuchen zu können, muss weitergehend eine stabile Transduktion des IL-11R erfolgen. Ein Vergleich mit Suspensionszellen wäre anschließend interessant.

## 8.2 Fazit und Ausblick

Da IL-6 und IL-11 für ihren klassischen Signalweg über den IL-6R oder IL-11R beide gp130-Homodimere nutzen und zur Aktivierung des Signalweges benötigen (Heinrich, Behrmann et al. 1998), könnte man einen gleichen oder ähnlichen biologischen Outcome erwarten. Die Funktionen von IL-6 und IL-11 scheinen sich allerdings, wie bereits in der Einleitung erwähnt, nur teilweise zu überschneiden und teilweise sogar gegensätzliche Effekte auszuüben (Garbers and Scheller 2013). Allerdings können IL-6 und IL-11 in Zellen, die beide Rezeptoren besitzen, wie z. B. in Hepatozyten, gleiche Effekte ausüben, zu denen auch die Induktion der Akuten-Phase-Antwort zählt (Benigni, Fantuzzi et al. 1996). Neuere Studien zeigen allerdings, dass der IL-6R überwiegend auf Zellen des Immunsystems exprimiert wird und wahrscheinlich eher indirekt auf hepatische Zellen wirken könnte, dagegen ist der IL-11R hauptsächlich auf hepatischen Zellen zu finden (Widjaja, Chothani et al. 2020).

Bisher blieb die Frage offen, ob die biologischen Unterschiede von IL-6 und IL-11 nur aufgrund von unterschiedlichen IL-6R und IL-11R Expressionsformen vorhanden sind oder ob weitere Unterschiede existieren (Garbers and Scheller 2013). Diese Datenlage legt die Vermutung nahe, dass die Effekte des in dieser Arbeit beschriebenen Crosstalks von IL-6 zum IL-11R den Effekten, die bei einer Bindung von IL-11 an den IL-11R eintreten, gleichen könnten.

Anschließend an meine Arbeit wäre es also weiter von Interesse zu untersuchen, welche Effekte der in dieser Arbeit bestätigte Crosstalk nun in den unterschiedlichen Zellen hat und folglich welche Relevanz er z. B. für das Immunsystem, die Therapie von Autoimmunerkrankungen, die Knochenhämostase sowie für die Unterstützung der Regeneration hat.

IL-6 ist einer der Hauptangriffspunkte in der Behandlung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Hierbei wurden jedoch die regenerativen Eigenschaften von IL-6 nicht berücksichtigt (Garbers and Scheller 2013). Bei Autoimmunerkrankungen beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Blockade der Zytokine der IL-6-Familie förderlich wirkt, es sollten jedoch Nebenwirkungen, wie bakterielle Infektionen, berücksichtigt werden (Rose-John 2018). Auch die Blockade des IL-6R durch einen neutralisierenden monoklonalen Antikörper *Tocilizumab* findet Anwendung in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatischen Arthritis (Tanaka, Narazaki et al. 2014). Bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wurde weiterhin der therapeutische Einsatz von Trans-Signaling-Inhibitoren wie z. B. Olamkicept unterstützt (Baran, Hansen et al. 2018). Welche klinische Relevanz nun *Classic-Signaling*, *Trans-Signaling* sowie *Cluster-Signaling* in Bezug auf den Crosstalk haben, könnten zukünftige Untersuchungen zeigen.

Durch die Beteiligung der Zytokine am Entzündungsgeschehen besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Entzündungen chronifizieren. Chronische Entzündungen können folglich zur Entstehung von Krebs beitragen (Grivennikov, Karin et al. 2009, Putoczki and Ernst 2010). Sie werden mit einer erhöhten Zytokinexpression sowie einer anhaltenden STAT3-Aktivierung assoziiert (Bromberg 2002).

Dementsprechend wäre es von Interesse, welchen Effekt die über den Crosstalk ausgelöste STAT3-Aktivierung zur Folge hat. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten der STAT3-Aktivierung im Zellmodell unterscheiden sich nicht von der STAT3-Aktivierung durch den klassischen Signalweg von IL-11 über den IL-11R (vgl. Kapitel 7.1.1 und 7.1.3), was nahelegt, dass der dadurch ausgelöste Effekt vergleichbar ist.

Folglich könnte das Wissen über den Crosstalk und darüber mögliche weitere Eigenschaften durch IL-6 zur Optimierung bereits bestehender Therapien sowie zur Neuentwicklung von Therapien und Nutzung neu entdeckter Angriffspunkte beitragen.

## Literaturverzeichnis

Baran, P., S. Hansen, G. H. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H. J. Huber, M. R. Ahmadian, J. M. Moll and J. Scheller (2018). "The balance of interleukin (IL)-6, IL-6 soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6.sIL-6R.sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling." *J Biol Chem* **293**(18): 6762-6775.

Barton, V. A., M. A. Hall, K. R. Hudson and J. K. Heath (2000). "Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex." *J Biol Chem* **275**(46): 36197-36203.

Benigni, F., G. Fantuzzi, S. Sacco, M. Sironi, P. Pozzi, C. A. Dinarello, J. D. Sipe, V. Poli, M. Cappelletti, G. Paonessa, D. Pennica, N. Panayotatos and P. Ghezzi (1996). "Six different cytokines that share GP130 as a receptor subunit, induce serum amyloid A and potentiate the induction of interleukin-6 and the activation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis by interleukin-1." *Blood* **87**(5): 1851-1854.

Boulanger, M. J., A. J. Bankovich, T. Kortemme, D. Baker and K. C. Garcia (2003). "Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130." *Mol Cell* **12**(3): 577-589.

Bromberg, J. (2002). "Stat proteins and oncogenesis." *J Clin Invest* **109**(9): 1139-1142.

Chen, H. F., C. Y. Lin, K. H. Chao, M. Y. Wu, Y. S. Yang and H. N. Ho (2002). "Defective production of interleukin-11 by decidua and chorionic villi in human anembryonic pregnancy." *J Clin Endocrinol Metab* **87**(5): 2320-2328.

Chow, D., X. He, A. L. Snow, S. Rose-John and K. C. Garcia (2001). "Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex." *Science* **291**(5511): 2150-2155.

Curtis, D. J., D. J. Hilton, B. Roberts, L. Murray, N. Nicola and C. G. Begley (1997). "Recombinant soluble interleukin-11 (IL-11) receptor alpha-chain can act as an IL-11 antagonist." *Blood* **90**(11): 4403-4412.

Doganci, A., T. Eigenbrod, N. Krug, G. T. De Sanctis, M. Hausding, V. J. Erpenbeck, B. Haddad el, H. A. Lehr, E. Schmitt, T. Bopp, K. J. Kallen, U. Herz, S. Schmitt, C. Luft, O. Hecht, J. M. Hohlfeld, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, S. Rose-John, H. Renz, M. F. Neurath, P. R. Galle and S. Finotto (2005). "The IL-6R alpha chain controls

lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo." J Clin Invest **115**(2): 313-325.

Domingues, R. G., I. Lago-Baldaia, I. Pereira-Castro, J. M. Fachini, L. Oliveira, D. Drpic, N. Lopes, T. Henriques, J. R. Neilson, A. M. Carmo and A. Moreira (2016). "CD5 expression is regulated during human T-cell activation by alternative polyadenylation, PTBP1, and miR-204." Eur J Immunol **46**(6): 1490-1503.

Du, Q., Y. Qian and W. Xue (2021). "Cross-reactivity of two human IL-6 family cytokines OSM and LIF explored by protein-protein docking and molecular dynamics simulation." Biochim Biophys Acta Gen Subj **1865**(7): 129907.

Feldman, D. E. (2009). "Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex." Annu Rev Neurosci **32**: 33-55.

Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger and S. Rose-John (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-145.

Frank, N.-C. (2018). Generierung von biologisch aktivem Hyper-Interleukin 11 durch Intein-vermittelte Proteinligation mit Split-Zytokinen. m/b6105

Fuentes, E. N., R. Zuloaga, J. A. Valdes, A. Molina and M. Alvarez (2014). "Skeletal muscle plasticity induced by seasonal acclimatization involves IGF1 signaling: implications in ribosomal biogenesis and protein synthesis." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol **176**: 48-57.

Futagami, A., M. Ishizaki, Y. Fukuda, S. Kawana and N. Yamanaka (2002). "Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin." Lab Invest **82**(11): 1503-1513.

Garbers, C., H. M. Hermanns, F. Schaper, G. Muller-Newen, J. Grotzinger, S. Rose-John and J. Scheller (2012). "Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines." Cytokine Growth Factor Rev **23**(3): 85-97.

Garbers, C. and J. Scheller (2013). "Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different." Biol Chem **394**(9): 1145-1161.

- Garbers, C., B. Spudy, S. Aparicio-Siegmund, G. H. Waetzig, J. Sommer, C. Holscher, S. Rose-John, J. Grotzinger, I. Lorenzen and J. Scheller (2013). "An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer." J Biol Chem **288**(6): 4346-4354.
- Garcia-Hernandez, B., A. Castellanos, A. Lopez, A. Orfao and I. Sanchez-Garcia (1997). "Murine hematopoietic reconstitution after tagging and selection of retrovirally transduced bone marrow cells." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(24): 13239-13244.
- Godakova, S. A., A. N. Noskov, I. D. Vinogradova, G. A. Ugriumova, A. I. Solovyev, I. B. Esmagambetov, A. I. Tukhvatulin, D. Y. Logunov, B. S. Naroditsky, D. V. Shechblyakov and A. L. Gintsburg (2019). "Camelid VHHs Fused to Human Fc Fragments Provide Long Term Protection Against Botulinum Neurotoxin A in Mice." Toxins (Basel) **11**(8).
- Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann and M. Karin (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." Cancer Cell **15**(2): 103-113.
- Gurtner, G. C., S. Werner, Y. Barrandon and M. T. Longaker (2008). "Wound repair and regeneration." Nature **453**(7193): 314-321.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen and F. Schaper (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J **374**(Pt 1): 1-20.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper and L. Graeve (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem J **334** ( Pt 2): 297-314.
- Hilton, D. J., A. A. Hilton, A. Raicevic, S. Rakar, M. Harrison-Smith, N. M. Gough, C. G. Begley, D. Metcalf, N. A. Nicola and T. A. Willson (1994). "Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction." EMBO J **13**(20): 4765-4775.
- Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." Eur J Biochem **268**(1): 160-167.

- Kantor, A. B. (1991). "The development and repertoire of B-1 cells (CD5 B cells)." Immunol Today **12**(11): 389-391.
- Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, H. Dahmen, A. Kuster, J. Grotzinger, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (1999). "Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes." J Immunol **162**(3): 1480-1487.
- Lamertz, L., F. Rummel, R. Polz, P. Baran, S. Hansen, G. H. Waetzig, J. M. Moll, D. M. Floss and J. Scheller (2018). "Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses." Sci Signal **11**(550).
- Li, Y. Y., L. L. Hsieh, R. P. Tang, S. K. Liao and K. Y. Yeh (2009). "Interleukin-6 (IL-6) released by macrophages induces IL-6 secretion in the human colon cancer HT-29 cell line." Hum Immunol **70**(3): 151-158.
- Lin, Z. Q., T. Kondo, Y. Ishida, T. Takayasu and N. Mukaida (2003). "Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice." J Leukoc Biol **73**(6): 713-721.
- Lokau, J., R. Nitz, M. Agthe, N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, N. Schumacher, J. Wolf, K. Moller-Hackbarth, G. H. Waetzig, J. Grotzinger, G. Muller-Newen, S. Rose-John, J. Scheller and C. Garbers (2016). "Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling." Cell Rep **14**(7): 1761-1773.
- Lu, L. L., T. J. Suscovich, S. M. Fortune and G. Alter (2018). "Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases." Nat Rev Immunol **18**(1): 46-61.
- Lupardus, P. J., G. Skiniotis, A. J. Rice, C. Thomas, S. Fischer, T. Walz and K. C. Garcia (2011). "Structural snapshots of full-length Jak1, a transmembrane gp130/IL-6/IL-6R $\alpha$  cytokine receptor complex, and the receptor-Jak1 holocomplex." Structure **19**(1): 45-55.
- Mahboubi, K., B. C. Biedermann, J. M. Carroll and J. S. Pober (2000). "IL-11 activates human endothelial cells to resist immune-mediated injury." J Immunol **164**(7): 3837-3846.
- Martens, A. S., J. G. Bode, P. C. Heinrich and L. Graeve (2000). "The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells." J Cell Sci **113** ( Pt 20): 3593-3602.

- Matadeen, R., W. C. Hon, J. K. Heath, E. Y. Jones and S. Fuller (2007). "The dynamics of signal triggering in a gp130-receptor complex." Structure **15**(4): 441-448.
- McFarland-Mancini, M. M., H. M. Funk, A. M. Paluch, M. Zhou, P. V. Giridhar, C. A. Mercer, S. C. Kozma and A. F. Drew (2010). "Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor." J Immunol **184**(12): 7219-7228.
- Metcalfe, R. D., K. Aizel, C. O. Zlatic, P. M. Nguyen, C. J. Morton, D. S. Lio, H. C. Cheng, R. C. J. Dobson, M. W. Parker, P. R. Gooley, T. L. Putoczki and M. D. W. Griffin (2020). "The structure of the extracellular domains of human interleukin 11alpha receptor reveals mechanisms of cytokine engagement." J Biol Chem **295**(24): 8285-8301.
- Mir, S. A., A. Chatterjee, A. Mitra, K. Pathak, S. K. Mahata and S. Sarkar (2012). "Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) attenuates interleukin-6 (IL-6)-induced collagen synthesis and resultant hypertrophy in rat heart." J Biol Chem **287**(4): 2666-2677.
- Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1992). "Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor." Biochem Biophys Res Commun **189**(2): 794-800.
- Nakayama, K. (1998). "Expression of IL-6, IL-6 receptor and its signal transducer gp130 mRNAs in megakaryocytic cell lines." Leuk Lymphoma **29**(3-4): 399-405.
- Nandurkar, H. H., D. J. Hilton, P. Nathan, T. Willson, N. Nicola and C. G. Begley (1996). "The human IL-11 receptor requires gp130 for signalling: demonstration by molecular cloning of the receptor." Oncogene **12**(3): 585-593.
- Nishina, T., S. Komazawa-Sakon, S. Yanaka, X. Piao, D. M. Zheng, J. H. Piao, Y. Kojima, S. Yamashina, E. Sano, T. Putoczki, T. Doi, T. Ueno, J. Ezaki, H. Ushio, M. Ernst, K. Tsumoto, K. Okumura and H. Nakano (2012). "Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation." Sci Signal **5**(207): ra5.
- Obana, M., M. Maeda, K. Takeda, A. Hayama, T. Mohri, T. Yamashita, Y. Nakaoka, I. Komuro, K. Takeda, G. Matsumiya, J. Azuma and Y. Fujio (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.

- Paonessa, G., R. Graziani, A. De Serio, R. Savino, L. Ciapponi, A. Lahm, A. L. Salvati, C. Toniatti and G. Ciliberto (1995). "Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp130 dimer formation and signalling." EMBO J **14**(9): 1942-1951.
- Park, E. J., J. H. Lee, G. Y. Yu, G. He, S. R. Ali, R. G. Holzer, C. H. Oesterreicher, H. Takahashi and M. Karin (2010). "Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression." Cell **140**(2): 197-208.
- Peters, M., G. Blinn, F. Solem, M. Fischer, K. H. Meyer zum Buschenfelde and S. Rose-John (1998). "In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6." J Immunol **161**(7): 3575-3581.
- Pflanz, S., I. Tacke, J. Grotzinger, Y. Jacques, S. Minvielle, H. Dahmen, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (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.
- Poli, V., R. Balena, E. Fattori, A. Markatos, M. Yamamoto, H. Tanaka, G. Ciliberto, G. A. Rodan and F. Costantini (1994). "Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion." EMBO J **13**(5): 1189-1196.
- Putoczki, T. and M. Ernst (2010). "More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer." J Leukoc Biol **88**(6): 1109-1117.
- Quintana, P., D. Soto, O. Poirot, M. Zonouzi, S. Kellenberger, D. Muller, R. Chrast and S. G. Cull-Candy (2015). "Acid-sensing ion channel 1a drives AMPA receptor plasticity following ischaemia and acidosis in hippocampal CA1 neurons." J Physiol **593**(19): 4373-4386.
- Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." Int J Biol Sci **8**(9): 1237-1247.
- Rose-John, S. (2018). "Interleukin-6 Family Cytokines." Cold Spring Harb Perspect Biol **10**(2).
- Salanga, C. L., M. O'Hayre and T. Handel (2009). "Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk." Cell Mol Life Sci **66**(8): 1370-1386.

- Schafer, S., S. Viswanathan, A. A. Widjaja, W. W. Lim, A. Moreno-Moral, D. M. DeLaughter, B. Ng, G. Patone, K. Chow, E. Khin, J. Tan, S. P. Chothani, L. Ye, O. J. L. Rackham, N. S. J. Ko, N. E. Sahib, C. J. Pua, N. T. G. Zhen, C. Xie, M. Wang, H. Maatz, S. Lim, K. Saar, S. Blachut, E. Petretto, S. Schmidt, T. Putoczki, N. Guimaraes-Camboa, H. Wakimoto, S. van Heesch, K. Sigmundsson, S. L. Lim, J. L. Soon, V. T. T. Chao, Y. L. Chua, T. E. Tan, S. M. Evans, Y. J. Loh, M. H. Jamal, K. K. Ong, K. C. Chua, B. H. Ong, M. J. Chakaramakkil, J. G. Seidman, C. E. Seidman, N. Hubner, K. Y. K. Sin and S. A. Cook (2017). "IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis." Nature **552**(7683): 110-115.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 878-888.
- Scheller, J. and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." Med Microbiol Immunol **195**(4): 173-183.
- Schroterova, L., V. Kralova, A. Voracova, P. Haskova, E. Rudolf and M. Cervinka (2009). "Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays." Toxicol In Vitro **23**(7): 1406-1411.
- Schuster, B., M. Kovaleva, Y. Sun, P. Regenhard, V. Matthews, J. Grotzinger, S. Rose-John and K. J. Kallen (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.
- Singh, B., J. A. Berry, A. Shoher and A. Lucci (2006). "COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells." J Surg Res **131**(2): 267-275.
- Sommer, J., E. Engelowski, P. Baran, C. Garbers, D. M. Floss and J. Scheller (2014). "Interleukin-6, but not the interleukin-6 receptor plays a role in recovery from dextran sodium sulfate-induced colitis." Int J Mol Med **34**(3): 651-660.
- Stanley, A. C. and P. Lacy (2010). "Pathways for cytokine secretion." Physiology (Bethesda) **25**(4): 218-229.
- Stoddart, M. J. (2011). "Cell viability assays: introduction." Methods Mol Biol **740**: 1-6.

- Takahashi-Tezuka, M., Y. Yoshida, T. Fukada, T. Ohtani, Y. Yamanaka, K. Nishida, K. Nakajima, M. Hibi and T. Hirano (1998). "Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase." Mol Cell Biol **18**(7): 4109-4117.
- Takeuchi, Y., S. Watanabe, G. Ishii, S. Takeda, K. Nakayama, S. Fukumoto, Y. Kaneta, D. Inoue, T. Matsumoto, K. Harigaya and T. Fujita (2002). "Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice." J Biol Chem **277**(50): 49011-49018.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.
- Tanaka, T., M. Narazaki, A. Ogata and T. Kishimoto (2014). "A new era for the treatment of inflammatory autoimmune diseases by interleukin-6 blockade strategy." Semin Immunol **26**(1): 88-96.
- Van Roy, M., C. Ververken, E. Beirnaert, S. Hoefman, J. Kolkman, M. Vierboom, E. Breedveld, B. t Hart, S. Poelmans, L. Bontinck, A. Hemeryck, S. Jacobs, J. Baumeister and H. Ulrichs (2015). "The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **17**: 135.
- Wang, J., R. J. Homer, L. Hong, L. Cohn, C. G. Lee, S. Jung and J. A. Elias (2000). "IL-11 selectively inhibits aeroallergen-induced pulmonary eosinophilia and Th2 cytokine production." J Immunol **165**(4): 2222-2231.
- Watson, C., S. Whittaker, N. Smith, A. J. Vora, D. C. Dumonde and K. A. Brown (1996). "IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes." Clin Exp Immunol **105**(1): 112-119.
- Widjaja, A. A., S. P. Chothani and S. A. Cook (2020). "Different roles of interleukin 6 and interleukin 11 in the liver: implications for therapy." Hum Vaccin Immunother **16**(10): 2357-2362.
- Xu, Y., N. J. Kershaw, C. S. Luo, P. Soo, M. J. Pocock, P. E. Czabotar, D. J. Hilton, N. A. Nicola, T. P. Garrett and J. G. Zhang (2010). "Crystal structure of the entire ectodomain of

gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes." J Biol Chem **285**(28): 21214-21218.

Yin, T., T. Taga, M. L. Tsang, K. Yasukawa, T. Kishimoto and Y. C. Yang (1993). "Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction." J Immunol **151**(5): 2555-2561.

Yoshizaki, A., T. Nakayama, K. Yamazumi, Y. Yakata, M. Taba and I. Sekine (2006). "Expression of interleukin (IL)-11 and IL-11 receptor in human colorectal adenocarcinoma: IL-11 up-regulation of the invasive and proliferative activity of human colorectal carcinoma cells." Int J Oncol **29**(4): 869-876.

Youinou, P., C. Jamin and P. M. Lydyard (1999). "CD5 expression in human B-cell populations." Immunol Today **20**(7): 312-316.

Zhang, C., H. Xin, W. Zhang, P. J. Yazaki, Z. Zhang, K. Le, W. Li, H. Lee, L. Kwak, S. Forman, R. Jove and H. Yu (2016). "CD5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer." Immunity **44**(4): 913-923.

## Danksagung

Mit großer Wertschätzung möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich auf dem Weg begleitet und unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die unermüdlichen Anleitungen bedanken, die er mir während der gesamten Forschungsarbeit zuteilwerden ließ.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jens Moll, der mich tatkräftig unterstützt und mit wertvollen Ratschlägen betreut hat.

Ich möchte ebenfalls allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II meinen Dank aussprechen, die mit mir Ideen ausgetauscht und mir in technischen sowie methodischen Fragen jederzeit weitergeholfen haben.

Ebenso gilt mein Dank meiner Familie und meinen Freunden, die mich durchgehend auf diesem Weg unterstützt und ermutigt haben. Eure aufmunternden Worte haben mir stets neuen Antrieb gegeben.

Letztlich möchte ich mich bei allen Korrekturlesern bedanken, die sich die Zeit genommen haben, diese Arbeit im Detail zu lesen.

Laura Schultz