

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Der Interleukin-11 Rezeptor ist ein alternativer α -Rezeptor für Interleukin-6 und IC7 sowie Untersuchungen zum Designerzytokin Hyper-IL-11 bei akutem Leberschaden

Inaugural-Dissertation

Hendrik Weitz

Zur Erlangung des Doktorgrades

an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Ort: Düsseldorf

Monat: Juli

Jahr: 2024

Institut für Molekularbiologie und Biochemie II

Der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

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

Referent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Tag der mündlichen Prüfung: 21.11.2024

When the world says 'give up', hope whispers 'try one more time'. – T. Bergling

I. Erklärung/ Eidesstattliche Versicherung

Diese Inaugural Dissertation ist meine wissenschaftliche Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, zur Erlangung des Doktorgrades.

Hiermit versichere ich, dass sie von mir selbstständig angefertigt und verfasst wurde. Es sind keine anderen, als die in dieser Arbeit angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt worden.

Die Zeichnungen oder Abbildungen in dieser Arbeit wurden von mir selbst erstellt oder sind mit einem Quellennachweis versehen worden.

Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde eingereicht worden.

Diese Arbeit wurde betreut von:

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Institut für Biochemie und molekular Biologie II

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

und

Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Universitätsklinikum Düsseldorf

Grevenbroich, Juli 2024 _____

II. Danksagung

In meinen Augen ist keine wissenschaftliche Arbeit die Leistung eines einzelnen. Mein Dank richtet sich deshalb an alle, die mich auf diesem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller, der es mir, als Leiter des Instituts für Biochemie und molekular Biologie II, überhaupt erst ermöglicht hat diese Dissertation zu schreiben inklusive der ganzen dazugehörigen Laborarbeit. Danke dass du mich auf dem gesamten Weg mit konstruktiven Meetings und Projektideen unterstützt hast und für all die Freiheiten, die du uns gibst.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pfeffer für die Übernahme des Zweitgutachtens und seiner Offenheit mich zu unterstützen bedanken.

Ein besonderer Dank gilt den erfahrenen Post-Docs in unserem Institut. Dr. Jens Moll der mir den Weg für dieses *crostalk* Projekt bereitet hat, für seine Bereitstellung und Hilfe. Dr. Doreen Floss, ebenfalls für ihr ganzes *in vitro know-how* des Instituts und die sich immer Zeit genommen hat. Und bei Dr. Kristina Vogel für die Einführung in die Welt der *in vivo* Arbeiten, vor allem mit den interessanten mikrochirurgischen Eingriffen, der PHx. Danke für eure ständige Bereitschaft mir etwas beizubringen und das ihr immer für Fragen und Unterstützungen erreichbar wart, bei den Labmeetings konstruktive Kritik gegeben habt und für das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein Dankeschön richtet sich an das Institut allgemein, den Post-Docs, allen nat.-wiss. Doktoranden und med. Doktoranden, die im Laufe der Zeit bei uns waren, sowie den Sekretärinnen Petra und Carmen, sowie unserer TA Yvonne. Ihr habt den Laboralltag bunter gemacht, wart nie verlegen mitzudiskutieren, und habt für ein angenehmeres Arbeitsklima gesorgt, sodass man sich nie allein gefühlt hat. An dieser Stelle auch ein Dank an Annika G. die durch ihr scoring zu den Histologie-Proben auch an dieser Arbeit mitbeteiligt war. Einen großen Dank auch an Puyan, Christoph und Julia die mich auch für das *crostalk* Projekt wie zum Beispiel mit den Strukturmodellen, den SPR-Messungen und in den Labmeetings unterstützt haben.

Besonders hervorgehoben möchte ich mich hier bei Julia E. bedanken. Meine Wegbegleiterin und Unterstützerin seit dem ersten Tag in diesem Institut. Wie oft haben wir die Köpfe zusammengesteckt; Sachen geschleppt, auch wenn die Aufzüge regelmäßig ausfielen; wie oft standen wir viele Stunden bis spät in den Abend zusammen im Labor, oder kamen sogar am Wochenende rein, wenn einer von uns nicht konnte oder wir wieder einen Notfall mit dem -80er hatten? Wir haben uns gegenseitig zugearbeitet und du hast mich oft gepusht. Oft war ich verwirrt und auch am Verzweifeln, doch ich wusste am Ende war es immer gut gemeint und im Zweifelsfall finden wir zusammen eine Lösung meiner Probleme. Am Ende bist du jedenfalls einer der Gründe, weshalb ich doch durchgezogen habe und wir heute hier stehen. Hoffentlich konnte ich dich auch manchmal besänftigen und dafür sorgen, dass wir beide nicht ganz den Kopf verlieren, so wie du gerade, just in diesem Moment, mir gegenüber sitzt und am fluchen bist (hachja die Technik...). Auch neben der Arbeit sind viele großartige Erinnerungen entstanden. Danke für diese Freundschaft!

Meinen Eltern und meiner Familie danke ich für Alles, von Erziehung bis Wertevermittlung und mich in meiner Bildung stets anzutreiben und mir doch den Freiraum zu geben, das machen zu können, worauf ich Lust habe. Und natürlich für die finanzielle Unterstützung während des Studiums. Auch wenn ich die letzten drei Jahre nicht immer am Wochenende da war, um hier und da mit anpacken zu können, werde ich immer aushelfen sobald ich kann. Danke dass ihr während meiner Zeit als Student und Doktorand immer Rücksicht darauf genommen habt.

Ein großen Dank richte ich an meine Freunde. Auch wenn ihr im Einzelnen vielleicht nicht genau wisst wofür. Es gab hier und da Momente in dieser Zeit in denen ihr mir unglaublich wichtig wart und immer noch seid. Dass ihr einfach da seid und ich mich immer von euch unterstützt fühle. Das wir auch am Wochenende auch mal Abstand vom Alltag fanden. Die Sports-/ und GV-Freunde sowie Kollegen: Fabian, Alex, Tobias, Marcel, Swen, Chris, Sarah, Anika, Denise, Max, Holger, Lukas, Angelina, Miriam, Moni, Christiane. Danke auch die Freunde, mit denen ich durch die Musik verbunden bin, die oft ein willkommener Ausgleich war, ohne alle Namen nennen zu können, ich denke da ans Bootshaus, PV, POA und Snake in Paris.

Zuletzt: Einen außerordentlichen Dank an den engsten Freundeskreis: Justin, Sherina, Thomas, Markus, und Jonas. Ihr wisst schon wofür alles, wir verstehen uns wortlos.

III. Inhaltsverzeichnis

I. Erklärung/ Eidesstattliche Versicherung.....	3
II. Danksagung	4
III. Inhaltsverzeichnis.....	6
IV. Abbildungsverzeichnis.....	10
V. Tabellenverzeichnis.....	13
VI. Abkürzungsverzeichnis.....	15
VII. Zusammenfassung	1
VIII. Abstract	2
1. Einleitung.....	3
Interleukin-6	3
Interleukin-11	5
Interleukin-6 und Interleukin-11 im Vergleich	6
Signaltransduktion von IL-6 und IL-11 mittels alpha-Rezeptoren und dem Signaltransduzierer gp130.....	10
1.1.1 Rezeptoren.....	10
1.1.2 gp130.....	11
1.1.3 Die Rezeptorkomplexe von IL-6 und IL-11.....	12
1.1.4 Signaltransduktion von IL-6 und IL-11 via <i>classic</i> , <i>trans</i> - und <i>cluster signaling</i> 13	
1.1.5 Intrazelluläre Signalwege.....	15
Inhibitoren der IL-6 und IL-11 Signaltransduktion.....	16
Hyperzytokine: Designerzytokine der IL-6 Familie.....	16
Crosstalk, die Kreuzaktivität der Zytokine.....	17
Die Zytokinchimäre IC7.....	18
Aufbau der Leber und ihre Funktionen	19

Leberschädigungen und -erkrankungen.....	22
Partielle Hepatektomie (PHx).....	23
2. Ziele dieser Arbeit.....	25
3. Material	26
3.1 Verbrauchsmaterial, Einwegwaren, Kleingeräte	26
3.2 Chemikalien.....	28
3.3 Antibiotika	29
3.4 Zellkultur	29
3.5 Zelllinien und Bakterienstämme.....	30
3.6 Plasmide.....	31
3.7 Primersequenzen.....	32
3.8 Zytokine und Rezeptoren.....	32
3.8 Antikörper.....	34
3.9 Puffer und Lösungen	35
3.10 Kits.....	38
3.11 Geräte.....	39
3.12 Software.....	40
4. Methoden.....	41
4.1 Zellkultur	41
4.1.1 Kultivierung von Zelllinien.....	41
4.1.2 Zellen waschen.....	41
4.1.3 Zellzahlbestimmung.....	41
4.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	42
4.2 Biochemische und molekular biologische Methoden.....	42
4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen mittels NanoDrop .	42
4.2.2 Spaltung von Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzymen.....	43

4.2.3 DNA-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion aus Agarosegelen	43
4.2.4 Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid DNA	44
4.2.5 Ligation von linearen DNA-Fragmenten	44
4.2.6 Transformation von Plasmid DNA in chemisch kompetente <i>Escherichia coli</i> Bakterien	44
4.2.7 Mini-Präparation (Isolation) von Plasmid DNA	45
4.2.8 Midi-Präparation (Isolation) von Plasmid DNA	46
4.2.9 Sequenzierung von Plasmid DNA	46
4.2.10 Proteinexpression in Expressionszelllinien.....	46
4.2.11 Affinitätschromatographie zur Proteinreinigung	47
4.3 Zellbiologische Methoden und Experimente zur Proteinanalyse	49
4.3.1 Proliferationsassay	49
4.3.2 Stimulationsassay	50
4.3.3 Western Blot	53
4.3.3. Coomassie Färbung von Proteinen	55
4.3.4 <i>Surface plasmon resonance</i> (SPR)	56
4.4 Tierexperimente zur Leberregeneration	57
4.4.1 Tierhaltung	57
4.4.2 Primäre Hepatozytenisolation	57
4.4.3. Partielle Hepatektomie und nachträgliche Versorgung der Tiere.....	58
4.4.4. Serumanalysen	60
4.4.5 Western Blot (Mausorgane)	60
4.4.6 Histologieuntersuchungen Leber	61
5. Ergebnisse	63
IL-6:IL-11R <i>crossstalk</i>	63
5.1 Humanes IL-6 induziert auch über den IL-11R ein nicht-kanonisches gp130 Signal....	63

5.2 Nicht-kanonische gp130 Komplexbildung durch humanes IL-6 über den murinen IL-11R lässt sich durch einen neutralisierenden IL-11R monoklonalen Antikörper inhibieren	69
5.3 Ein synthetisches Fusionsprotein aus IL-6:sIL-11R kann trans-signaling induzieren ...	72
5.4 Das chimäre Zytokin IC7 kann auch über den IL-11R einen nicht-kanonischen gp130 Rezeptorkomplex bilden.....	77
5.5 Elongation von IL-6 um die Aminosäuren KTRL führt nicht zu einem gesteigertem Crosstalk.....	79
5.6 Generierung und Charakterisierung von den Mutationsvarianten Super-IL-6 und Super-IC7.....	82
5.7 Einzelne Aminosäuresubstitutionen sowie eine Kombination dieser Mutationen im IL-6 zeigten keine Reduzierung des IL-6:IL-11R Crosstalk Potentials.....	90
IL-11 trans-signaling in der Leberregeneration nach PHx.....	96
5.8 Generierung und in vitro Charakterisierung von HIL-11Fc.....	96
5.9 Biologische Aktivität von HIL-11Fc ex vivo auf primären Hepatozyten.....	97
5.10 Partielle Hepatektomie: HIL-11Fc steigert das Überleben von IL-6R ^{-/-} Mäusen.....	99
5.11 Serumparameter für Leberschäden sind reduziert bei PHx mit Behandlung mit HIL-11Fc.....	99
5.12 Aktivierte STAT3 Signale durch HIL-11Fc in der Leber nach PHx.....	102
5.13 Histologische Untersuchungen zu Leberbiopsien nach PHx.....	102
6. Diskussion.....	111
IL-6:IL-11R Crosstalk.....	111
Verbesserte Leberregeneration nach PHx durch HIL-11Fc Applikation in IL-6R ^{-/-} Mäusen:.....	120
8. Outlook.....	124
IL-6:IL-11R Crosstalk.....	124
HIL-11Fc Applikation in IL-6R ^{-/-} Mäusen und PHx:.....	126
9. Referenzen.....	129
10. Anhang.....	147

IV. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Darstellung welche Zelltypen hauptsächlich von IL-6 und IL-11 aktiviert werden.	7
Abbildung 2 Sequenz und Strukturvergleich von IL-6 und IL-11.	9
Abbildung 3 Rezeptorbindestellen für IL-6 und IL-11.	13
Abbildung 4 Schematische Darstellung der Signalkomplexe von IL-6 und IL-11.	15
Abbildung 5 Schematische Darstellung der Designerzytokine hIL-6, hIL-11 und IC7.	19
Abbildung 6 Mikroarchitektur der Leber und ihre verschiedenen Zellpopulationen. ...	21
Abbildung 7 Nicht kanonische Signaltransduktion von IL-6 über Komplexbildung mit dem IL-11R:gp130.	64
Abbildung 8 Inhibition des hIL-6:hIL-11R Crosstalks durch IL-6-Rezeptorfusionsprotein (IL-6RFP).	65
Abbildung 9 Proliferationsassays zur Validierung von gereinigtem rekombinanten hIL-6 auf biologische Aktivität und Spezifität.	66
Abbildung 10 Proliferationsassay ohne Inhibition des IL-6:IL-11R Crosstalks durch Tocilizumab.	66
Abbildung 11 SPR Messungen von IL-6 und IL-11 zum IL-6:IL-11R Crosstalk.	68
Abbildung 12 Proliferationsassay zur Überprüfung eines IL-11:IL-6R crosstalks.	69
Abbildung 13 Wirksamkeit von humanen Zytokinen auf murinen Rezeptoren im IL-6:IL-11R crosstalk.	70
Abbildung 14 Blockierung des IL-11R durch Antikörper verhindert einen IL-6:IL-11R crosstalk.	71
Abbildung 15 Murines IL-6 funktioniert nicht in Kombination mit dem murinen IL-11 Rezeptor im IL-6:IL-11R crosstalk.	71
Abbildung 16 Ein IL-6:IL-11R crosstalk lässt sich nicht im Signalweg des Trans-Signalings beobachten.	72
Abbildung 17 Das neuartige Hyperzytokin cHIL-6.	73

Abbildung 18 Proteinreinigungen HIL-6-ts und HIL-11-ts.	74
Abbildung 19 cHIL-6 ist biologisch aktiv und induziert Trans-signaling.	74
Abbildung 20 Inhibition von cHIL-6 vermitteltem Signal durch den trans-signaling Inhibitor sgp130Fc.	75
Abbildung 21 Coomassie der Hyperzytokine und sgp130Fc und SPR Messungen der Hyperzytokine auf sgp130Fc.	76
Abbildung 22 IC7Fc vermittelt einen crosstalk im classic signaling auf die Rezeptorkombination IL-11R:LIFR:gp130.	77
Abbildung 23 Aktivierung der Signalwege in Ba/F3 Zelllinien durch IC7Fc bei hgp130-hIL-6R-hLIFR und hgp130-hIL-11R-hLIFR Komplexen.	78
Abbildung 24 SPR-Messungen zu den Bindungsaffinitäten von IC7 an den sIL-6R und sIL-11R.	79
Abbildung 25 Generierung des IL-6-KTRL.	80
Abbildung 26 IL-6KTRL-ts zeigt eine ähnliche IL-6:IL-11R crosstalk Aktivität wie wildtyp IL-6-ts.	81
Abbildung 27 Crosstalk Stimulation durch IL-6-KTRL.	81
Abbildung 28 Schaubild zu den mutierten Aminosäuren im IL-6 für die Generierung des SIL-6.	83
Abbildung 29 Rekombinante Proteine IL-6, IC7, SIL-6 und SIC7.	84
Abbildung 30 SIL-6 zeigt eine verstärkte Induktion einer Proliferation im IL-6:IL-11R Model.	85
Abbildung 31 Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs durch SIL-6.	86
Abbildung 32 SIL-6 vermittelt einen IL-6:IL-11R crosstalk im trans-signaling invitro Modell.	87
Abbildung 33 SIL-6 induzierte Phosphorylierung von STAT3 und ERK in Kombination mit dem sIL-11R auf Ba/F3-hgp130 Zellen.	87
Abbildung 34 Erhöhtes crosstalk Potential von SIC7 gegenüber IC7	88
Abbildung 35 SPR zur Messung der Affinitäten von SIL-6 und SIC7 auf den IL-6R bzw. IL-11R.	89

Abbildung 36 In silico Modell zum IL-6:IL-11R crosstalk Zytokin-Rezeptorkomplex. .	91
Abbildung 37 Proteinreinigungen von IL-6 Einzelmutationsvarianten zur Untersuchung auf verminderten IL-6:IL-11R crosstalk.	92
Abbildung 38 Einzelmutationen im IL-6 zeigen kein verändertes IL-6:IL-11R crosstalk Potenzial.	93
Abbildung 39 Proteinreinigung von MIL-6-ts.....	94
Abbildung 40 MIL-6-ts zeigt kein verändertes IL-6:IL-11R crosstalk Potenzial im Proliferationsassay.	95
Abbildung 41 Reinigung von HIL-11Fc und Aktivitätstest in der Zellkultur.....	97
Abbildung 42 Primäre Hepatozyten Isolation als zum ex vivo Aktivitätsnachweis von HIL-11Fc.....	98
Abbildung 43 Gesteigertes Überleben von IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx durch Injektion von HIL-11Fc.....	99
Abbildung 44 Geringere Serumparameter für Leberschädigungen 6 Stunden nach PHx in HIL-11Fc behandelten Tieren.	101
Abbildung 45 Western Blot aus Leberlysaten zeigt STAT3 Aktivierung in IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx mit HIL-11Fc Behandlung.....	102
Abbildung 46 Beispielbild einer H&E Färbung von einem Leberschnitt.....	103
Abbildung 47 HIL-11Fc Konditionen zeigen in H&E Färbungen weniger Nekrosen in Leberbiopsien.	104
Abbildung 48 Verbesserte Leberarchitektur nach PHx durch HIL-11Fc Injektionen... 	104
Abbildung 49 Beispielbild einer TUNEL Färbung von einem Leberschnitt.....	106
Abbildung 50 Mehr apoptotische Hepatozyten in PBS behandelten IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx gegenüber HIL-11Fc behandelten Mäusen.	106
Abbildung 51 Auswertung der TUNEL Färbung zeigt weniger DNA Schäden in HIL-11Fc behandelten IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx. Gezählt wurden alle TUNEL Signale aus je drei Aufnahmen aus drei Replikaten. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistik wurde erstellt in GraphPad Prism mit einem unpaired multiple t test. *= p≤ 0,05, n=3.....	107
Abbildung 52 Beispielbild einer pH3+ Färbung von einem Leberschnitt.	108

Abbildung 53 Gesteigerte Proliferation in HIL-11Fc behandelten IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx.	109
Abbildung 54 Auswertung der pH3 Färbung zeigt mehr Proliferation in Leberproben von IL-6R^{-/-} Mäusen 48 Stunden nach PHx wenn diese mit HIL-11Fc statt mit PBS behandelt wurden.	109
Abbildung 55 Übersicht zum IL-6:IL-11R crosstalk und IL-11:IL-6R crosstalk.	115
Abbildung 56 Klonierung des cHIL-6-ts.	147
Abbildung 57 Klonierung des SIL-6Fc.	148
Abbildung 58 Klonierung des SIC-7Fc.	148
Abbildung 59 Klonierung des SIL-6-ts.	149
Abbildung 60 Klonierung des SIC7-ts.	149
Abbildung 61 Generierung des IL-6-K53D-ts.	150
Abbildung 62 Generierung des IL-6-E68V-ts.	150
Abbildung 63 Generierung des IL-6-E171-ts.	151
Abbildung 64 Generierung des IL-6-S175A-ts.	151
Abbildung 65 Klonierung des MIL-6-ts.	152

V. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Verbrauchsmaterial	26
Tabelle 2 Chemikalien	28
Tabelle 3 Antibiotika.....	29
Tabelle 4 Material für die Zellkultur	29
Tabelle 5 Verwendete Zelllinien und Bakterien.....	30
Tabelle 6 Übersicht verwendeter Plasmide	31
Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide.....	32
Tabelle 8 Verwendete Zytokine der IL-6 Familie.....	32

Tabelle 9 Verwendete Antikörper	34
Tabelle 10 Puffer und Lösungen	35
Tabelle 11 Verwendete Labor-Kits	38
Tabelle 12 Labor-Geräte und -Maschinen.....	39
Tabelle 13 Software und Programme.....	40
Tabelle 14 Übersicht von IL-6 und IC7 beim kanonischen Signalweg verglichen mit dem crosstalk über den IL-11R.	118

VI. Abkürzungsverzeichnis

ADAM <i>A Disintegrin and Metalloprotease</i>	HCC <i>Hepatocellular carcinoma</i>
ALP <i>Alkalische Phosphatasen</i>	HGF <i>Hepatocyte growth factor</i>
BSA <i>Bovine serum albumin</i>	HIL-6 <i>Hyper-IL-6</i>
CAR-T <i>chimerig antigen receptor T-cells</i>	HIL-11 <i>Hyper-IL-11</i>
CLCF <i>Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1</i>	cHIL-6 <i>Hyper-IL-6:sIL-11R Fusionsprotein</i>
CNTF <i>Ciliary neurotrophic factor</i>	HSF <i>Hepatocyte Stimulating Factor</i>
CRS <i>Cytokine release syndrome</i>	IBD <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
CT-1 <i>Cardiotrophin 1</i>	IC50 <i>Mittlere inhibitorische Konzentration</i>
DMEM <i>Dulbeccos's Modified Eagel Medium</i>	IL <i>Interleukin</i>
DMSO <i>Dimethylsulfoxid</i>	IL-6R <i>Interleukin-6 Rezeptor</i>
DNA <i>Desoxyribonukleinsäure</i>	<i>i.p.</i> <i>Intraperitoneal</i>
<i>E. coli</i> <i>Escherichia coli</i>	Jak <i>Januskinase</i>
EBI3 <i>Epstein-Barr Virus Induced Gene 3</i>	kDa <i>Kilodalton</i>
ECM <i>Extra cellular matrix</i>	LIF <i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
EC50 <i>Mittlere effektive Dosis</i>	M <i>Murin</i>
(p)ERK <i>(Phosphorylated) extracellular activated kinase</i>	mAB <i>Monoclonal Antibody/ Monoklonaler Antikörper</i>
Fc <i>Fc-tag</i>	MAPK <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
FCS <i>Fetales Kälberserum</i>	mg <i>Milligramm</i>
FnIII <i>Fibronectin Type III</i>	µg <i>Mikrogramm</i>
GOT <i>Glutamat-Oxalacetat-Transaminase</i>	min <i>Minuten</i>
GPT <i>Glutamat-Pyruvat-Transaminase</i>	ml <i>Milliliter</i>
gp130 <i>Glykoprotein 130</i>	µl <i>Mikroliter</i>
h <i>Human</i>	mol <i>Molar</i>
	mRNA <i>Messenger RNA</i>

NAFLD <i>Non-alcoholic fatty liver disease</i>	SDS-PAGE <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
NASH <i>Non-alcoholic steatohepatitis</i>	<i>Polacrylamide Gel Electrophoresis</i>
ng Nanogramm	sek Sekunden
nm Nanometer	sgp130 <i>Soluble gp130</i>
OSM Oncostatin M	SHP2 <i>Src Homology region 2 domain-containing Phosphatase 2</i>
PBS <i>Phosphate buffered saline</i>	sIL-6R <i>soluble IL-6 receptor/ lösliches gp130</i>
PCR <i>Polymerase chain reaction</i>	sIL-11R <i>soluble IL-11 Receptor</i>
pg Pikogramm	SPR <i>Surface plasmon resonance</i>
pHH3 Phospho Histon H3	(p)STAT <i>(Phosphorylated) signal transducer and activator of transcription</i>
PHx Partielle Hepatektomie	TNF α <i>Tumor necrosis factor alpha</i>
PI3K Phosphoinositid-3-Kinase	Ts Twin-Strep-Tag [®]
RA Rheumatoide Arthritis	TUNEL <i>Terminal transferase mediated dUTP nick end labeling</i>
RFP Rezeptorfusionsprotein	WT Wildtyp
RNA Ribonukleinsäure	
rpm <i>Rounds per minute</i>	
RT Raumtemperatur	
<i>s.c.</i> subkutan	

VII. Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Zytokin mit Funktionen in diversen Prozessen des menschlichen Organismus wie z.B. bei der Akute-Phase-Reaktion, der Differenzierung von T- und B-Zellen sowie in der Leberregeneration. IL-6 induziert ein Signal über den IL-6 α -Rezeptor (IL-6R) und einem Homodimer des β -Rezeptors Glykoprotein 130 (gp130). Der klassische Signalweg wird über den membranständigen IL-6R ausgelöst und ist aufgrund der zelltypspezifischen Expression auf Hepatozyten und einigen Immunzellen beschränkt. Interleukin-11 (IL-11), ein weiteres IL-6 Familienmitglied, induziert ebenfalls über einen α -Rezeptor (Interleukin-11 α -Rezeptor, IL-11R) die signaltransduzierende Homodimerisierung von gp130. Durch alternatives *splicing* oder enzymatische Abspaltung (*shedding*) können die α -Rezeptoren (*soluble* IL-6R, sIL-6R bzw. *soluble* IL-11R, sIL-11R) als lösliche Variante über den Trans-Signalweg alle gp130 exprimierenden Zellen ansteuern.

In dieser Arbeit wurde eine bislang unbeschriebene Kreuzreaktivität des IL-6 an einen anderen α -Rezeptor beschrieben. IL-6 bindet alternativ den IL-11R und löst eine Signaltransduktion über ein gp130 Dimer auslösen. Umgekehrt gibt es keine Kreuzaktivität von IL-11 zum IL-6R. Antagonistische Antikörper gerichtet gegen den IL-11R inhibieren IL-6 Signale über den IL-11R:gp130 Rezeptorkomplex. Die CNTF/IL-6 basierende Zytokinchimäre IC7 zeigt, neben dem bislang bekannten IL-6R:LIFR:gp130 Rezeptorkomplex, ebenfalls eine Signaltransduktion über den IL-11R:LIFR:gp130 Rezeptorkomplex. Dieses erweiterte Grundwissen zum IL-6, liefert neue Sichtweisen für zukünftige therapeutische Interventionen für das IL-6 *signaling*.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Rolle des IL-11 Trans-Signalwegs mit Hilfe des Hyper-IL-11, ein Fusionsprotein aus IL-11 und dem löslichen IL-11R (sIL-11R), in der Leberregeneration untersucht. Bisweilen ist die Funktion des IL-11 Trans-Signalweges wenig beschrieben. Dahingegen haben der klassische und der IL-6 Trans-Signalweg eine regenerative Kapazität, da bei IL-6R^{-/-} Tieren eine erhöhte Mortalität nach einer partiellen Hepatektomie beobachtet wurde. Um den Einfluss des IL-11 Trans-Signalweg im akuten Leberschaden zu untersuchen, wurden IL-6R^{-/-} Mäuse einer partiellen Hepatektomie unterzogen. HIL-11 kompensierte eine defekte Leberregeneration, was sich durch eine erhöhte Überlebensrate zeigte. Dazu passend wurden, zu definierten Zeitpunkten nach der Operation, verbesserte Serumparameter, aktivierte Signaltransduktion in Hepatozyten und eine intaktere Struktur des Leberparenchyms beobachtet.

VIII. Abstract

Interleukin-6 (IL-6), the most prominent representative of the IL-6 cytokine-like family, has a broad spectrum of biological effects and functions in the organism. These including the acute phase, response, differentiation of T- and B-cells, and a beneficial role in liver regeneration. IL-6 signals via the Interleukin-6 α -receptor (IL-6R) and a subsequent receptor complex dimerization of the β -receptor glycoprotein 130 (gp130). The IL-6 classic signaling is mediated by the membrane-bound form of the IL-6R, of which hepatocytes and specific immune cells harbor restricted expression. Interleukin-11 (IL-11), another cytokine family member, also signals via an α -receptor with the following homodimerization of two gp130. By alternative splicing or enzymatic shedding, the α -receptors may also be produced as soluble proteins (soluble IL-6R, sIL-6R, and soluble IL-11R, sIL-11R). Thus, every gp130-expressing cell type is responsive to IL-6- or IL-11-mediated trans-signaling, respectively.

This work describes a so far undescribed cross-reactivity of IL-6 to the IL-11R. Evidence has shown the possible complex formation and signal transduction of IL-6 via IL-11R:gp130 complexes. In turn, IL-11 cannot induce signaling via IL-6R:gp130 complexes. This crosstalk was underlined by applying antagonistic antibodies directed against the IL-11R or trapping of IL-6, which blocks IL-6:IL-11R:gp130 signaling. The CNTF/IL-6-based cytokimera IC7 was also applied to this crosstalk and has proven functionality via the IL-11:LIFR:gp130 complex. This evidence provides new fundamental knowledge of our understanding of IL-6 signaling and offers a new evaluation of therapeutic interventions with monoclonal antibodies targeting IL-6 or IL-6R.

In the second section of this work, IL-11 trans-signaling was explored with its potential in liver regeneration simulated by Hyper-IL-11, a synthetic IL-11:sIL-11R fusion protein. Until now, IL-11 trans-signaling has barely been described in physiological processes. On the other hand, the classic and trans-signaling of IL-6 mediate a regenerative capacity since we have observed impaired liver regeneration with higher mortality in IL-6R deficient mice. Here, partially hepatectomized IL-6R^{-/-} mice have been used to investigate the role of IL-11 trans-signaling. HIL-11 compensated for deficient liver regeneration by increasing survival. In line with this, at defined time points after the operation, improved serum parameters, activated signal transduction of hepatocytes, and an improved tissue organization of the liver parenchyma were found.

1. Einleitung

Eine große Bandbreite von schweren Krankheiten wie chronische Entzündungen, Autoimmunerkrankungen, oder Krebs können durch das Zytokin, ein regulatorisches Protein, Interleukin-6 hervorgerufen werden, obwohl es für zahlreiche physiologische Funktionen im menschlichen Körper dient. Auch wenn nicht jede Zellpopulation in den unterschiedlichen Gewebearten des Körpers den passenden Rezeptor für dieses Zytokin trägt, so sind doch nahezu alle Zellen im menschlichen Körper responsiv zu IL-6. Daraus ergibt sich eine systemische Wirkweise im gesamten Körper, was unser Verständnis über IL-6 und mögliche Strategien, wie Interventionen aussehen können, sehr komplex macht. Aus diesem Grund ist ein weitgehendes Grundverständnis über die zahlreichen Funktionen des IL-6 wichtig. Vor allem in Bezug auf die Entwicklung möglicher Behandlungsstrategien, unter der Berücksichtigung die Effekte des IL-6 im richtigen Maße und nicht universell zu reduzieren [1].

Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein 26 kDa großes Protein, welches vor seiner Namensdefinition unter verschiedenen Namen beschrieben wurde [2]. Es gehört zur Molekülgruppe, der Zytokine. Zytokine sind lösliche Proteine mit einer Größe von ca. 15-20 kDa, welche in diversen biologischen Prozessen als signalvermittelnde Mediatoren wirken [3]. Ein Meilenstein in der IL-6 Forschung war die Klonierung der cDNA von IL-6 durch T. Kishimoto *et al.* in 1986 [4]. Mit dem Aufkommen der Sequenzierungstechnologie, stellte sich heraus, dass eine Gruppe von mehreren bereits beschriebenen Proteinen (*B-cell stimulatory factor 2 BSF-2*, *Hybridoma growth factor*, *Interferon beta-2 IFN-beta-2*), sich als ein und dasselbe Protein definieren ließen, welches daraufhin universal als Interleukin-6 bezeichnet wurde. Diese vorhergegangenen unterschiedlichen Entdeckungen deuteten bereits auf ein vielfältiges Vorkommen und einer pleiotropen Funktionsweise des IL-6 hin [3, 5].

IL-6 wird von unterschiedlichen Zellpopulationen wie T- und B-Zellen, Makrophagen und Monozyten aber auch von nicht lymphoiden Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Hepatozyten, Keratinozyten und Mesangiumzellen produziert [6, 7]. Es besitzt eine regulierende Rolle in zahlreichen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Hämatopoese, wo es als Cofaktor zusammen mit dem Interleukin-3 (IL-3) an der Formierung von Blasten (unreife Vorläuferzellen) beteiligt ist [8] oder zur Differenzierung von T- und B-Zellen beiträgt [7], sowie im Metabolismus bei der Regulierung des Glukosestoffwechsels, der Glukoseaufnahme und der Fettsäureoxidation in der Skelettmuskulatur [9]. Auch für das angeborene sowie für das

erworbene Immunsystem spielt IL-6 eine tragende Rolle bei der Bekämpfung von viralen oder bakteriellen Infektionen [10-12]. IL-6 aktiviert die Akute-Phase-Reaktion der Leber und reguliert die Expression mehrerer Chemokine und Adhensionsmoleküle, wodurch Zellen rekrutiert werden was z.B. zu einer Akkumulation von Neutrophile Granulozyten am Infektionsherd sorgt [13, 14]. Auch für das erworbene Immunsystem spielt IL-6 eine tragende Rolle, wie z.B. einer der ersten Namen für das IL-6, „*B cell stimulating factor*“ vermuten lässt, induziert IL-6 eine Aktivierung von B-Zellen. Es regt die Antikörper-Produktion an und trägt zum Erhalt von langlebigen (Gedächtnis-) B-Zellen bei [13].

Neben seinen physiologischen Funktionen können durch die Effektorfunktionen des IL-6 aber auch negative Konditionen wie Autoimmunerkrankungen, chronische Entzündungen, Zytokinstürme oder Krebs hervorgerufen werden [1]. Diese Kontroverse, zwischen positiven und negativen pro-inflammatorischen Effekten, ausgelöst durch IL-6, lässt sich häufig auf unterschiedliche Arten der Signaltransduktion, zurückführen.

Bei der rheumatoiden Arthritis (RA) handelt es sich um eine Autoimmunerkrankung, in der Bindegewebe und Gelenkknorpel durch Autoantikörper und Phagozyten erkannt und angegriffen werden. Durch diesen Zustand kommt es zu einem chronischen und progredienten Verlauf. IL-6 trägt hier mit seiner Aktivierung von T- und B-Zellen, der Produktion von Autoantikörpern und Akute-Phase-Proteinen zu einem Fortschritt der Gewebeschädigung bei. Klinisch behandelt wird die rheumatoiden Arthritis u.a. durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern, wie z.B. Tocilizumab oder Sarilumab, die zum Ziel haben die Signalwege des IL-6 einzuschränken [15-20].

Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (engl. *inflammatory bowel diseases, IBD*) *Morbus Chron* und *Colitis ulcerosa* spielt IL-6 eine tragende Rolle. Erhöhte IL-6 Serumkonzentrationen korrelieren hierbei ebenfalls mit dem Schweregrad der IBD. Die IL-6 assoziierten Mechanismen sind unter anderem die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, die Regulierung und Rekrutierung von Immunzellen in den Darm, eine Regulation der Apoptose von intestinalen Epithelzellen und eine veränderte Homöostase des Darmmikrobioms. Neben gängigen Therapien durch Inhibierung von Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) oder Interleukin 12/23 (IL-12/23), werden stetig weitere Behandlungsmöglichkeiten evaluiert. Auch hier führt eine Inhibierung des IL-6 Signalweges zu einer Reduzierung des Schweregrades [21-27] jedoch wurden diese Therapien wegen ihrer Nebenwirkungen bislang nicht zugelassen.

Neben den physiologischen IL-6 sezernierenden Zellen, können auch einige Krebszellen selbst IL-6 freisetzen. In den meisten Fällen deutet eine erhöhte IL-6 Serumkonzentration auf eine schlechte Prognose hin und wird mit dem Schweregrad der Krankheit assoziiert. In vielen Tumoren wirkt die IL-6 Sekretion als autokriner Überlebensmechanismus der Tumorzellen, was durch die Selbststimulation des STAT3 Signalweges bedingt ist. Dadurch bewirkt IL-6 im Tumorgewebe Zellproliferation, Überleben und Differenzierung bis hin zur Zellmigration und Verankerung, was begünstigend für Metastasierungen wirkt. Auch eine Immunsystem modulierende Rolle kann dem IL-6, aus Tumorzellen stammend, zugeordnet werden, wodurch der Tumor einer Bekämpfung durch das Immunsystem entkommen kann (*tumour escape*) [6, 14, 28, 29].

In den letzten Jahren als vielversprechendes und brisantes Thema in der Tumorummunologie gelten die CAR-T Zellen (*chimerig antigen receptor T-cells*). Diese Form der Krebstherapie wurde bereits zugelassen z.B. gegen einige lymphatische Tumore [30-32]. Als Herausforderung bei den Therapien mit CAR-T Zellen gilt allerdings eine Überreaktion der CAR-T Zellen und einem damit assoziiertem Zytokinsturm (*engl. cytokine release syndrom, CRS*). Auch im Fall von Covid-19, der Krankheit ausgelöst durch den SARS-Corona Virus 2, ist es bei schweren Krankheitsverläufen zu einem CRS und damit einer Überreaktion des Immunsystem gekommen. Auch hier wurde Tocilizumab, als Inhibitor des IL-6 Signalweges, als eine mögliche Therapie eingesetzt [33-37].

Die Konzentration von IL-6 im Serum ist unter physiologischen Bedingungen relativ niedrig in einem Bereich von 1-5 pg/ml. Allerdings kann die Konzentration in diversen Krankheitsbildern schnell ansteigen und um den Faktor 1000 erhöht sein. Unter extremen Bedingungen kann die IL-6 Konzentration gar Mengen im µg/ml Bereich erreichen, wie z.B. im Falle eines septischen Schocks, ausgelöst beispielsweise durch eine Infektion mit Meningokokken [38]. Auch die lokalen Konzentrationen am Entzündungsherd, sprich im Mikromileu einer Infektion oder chronischen Inflammation, können ähnliche, oder zumindest über den, im Serum-messbaren, physiologischen Konzentrationsbereich liegen [19].

Interleukin-11

Das nächstverwandte Zytokin, Interleukin 11 (IL-11), hat ebenfalls Effektorfunktionen auf diversen Zellarten im menschlichen Organismus. Neben der anfänglich beschriebenen blut- und lymphozytenbildenden Funktion (hämatopoetische und lymphopoetische Funktion) induziert

es unter anderem auch die Akute-Phase-Reaktion in Hepatozyten [39], kontrolliert die Knochenhomöostase [40] sowie die Formation der Schädelknochen [41]. Des Weiteren wird IL-11 mit der weiblichen Fertilität assoziiert, da in IL-11 Rezeptor *knock-out* Mäusen eine Unfruchtbarkeit mit einem Defekt in der Dezidualisierung beim Implantieren der Blastozyste beschrieben wurde [42]. Darüber hinaus wird IL-11 ebenfalls in Zusammenhang mit Fibrose gebracht [43]. Klinische Anwendung fand IL-11 zunächst bei Krebspatienten, die nach einer Chemotherapie eine Thrombozytopenie entwickelten. Durch Gabe von rekombinantem IL-11 werden Megakaryozyten aktiviert und folglich verstärkt Thrombozyten produziert [39]. Etwas kontrovers ist laut aktuellem Stand der Wissenschaft die Zuordnung von IL-11 zu pro-fibrotischen Prozessen oder anti-fibrotischen und dafür pro-regenerativen Prozessen [44, 45]. IL-11 spielt ebenfalls in diversen Krankheitsbildern wie z.B. Krebs, Rheumatoide Arthritis oder *Colitis* eine Rolle [46-48].

Interleukin-6 und Interleukin-11 im Vergleich

IL-6 und IL-11 sind beides Vertreter der Familie der IL-6 ähnlichen Interleukine (*IL-6 family*). Warum einige Interleukine zu dieser Familie zusammengefasst werden, soll anhand der folgenden Abschnitte erläutert werden, wobei hierbei der Fokus auf IL-6 und IL-11 gelegt wird. Verallgemeinert lässt sich sagen, dass seit 1991 deutlich mehr Studien zu IL-6 gegenüber IL-11 publiziert wurden. Während unter dem Schlagwort „IL-6“ in der online Datenbank der „National Library of Medicine“ (NIH) oder auch „PubMed®“ ca. 193.900 Einträge erscheinen, ergibt die Suche nach „IL-11“ hingegen lediglich 2800 Ergebnisse, sprich ungefähr um den Faktor 70 geringer (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>, Stand Juni 2024). Zunächst einmal lassen sich diverse differenzierte Zellarten sowohl von IL-6 als auch von IL-11 aktivieren, schematisch dargestellt in **Abbildung 1**

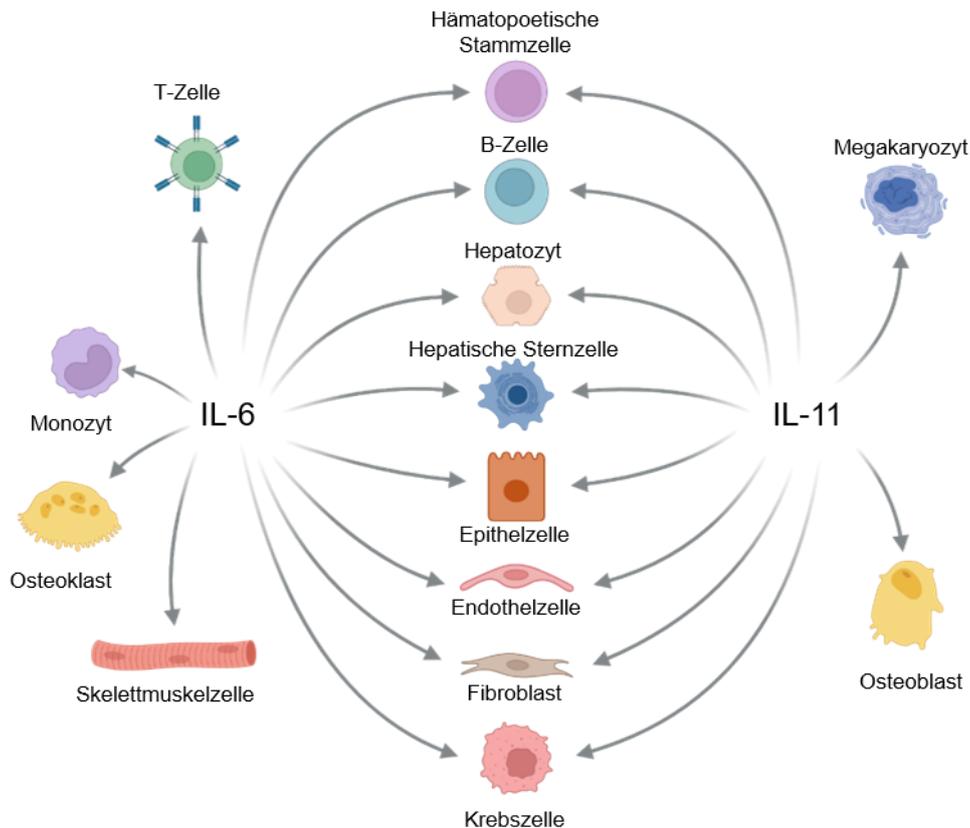


Abbildung 1 Darstellung welche Zelltypen hauptsächlich von IL-6 und IL-11 aktiviert werden.

Die Pfeile deuten auf eine beschriebene Effektorfunktion des jeweiligen Zytokins auf die Zellarten. Abbildung basierend auf: T. W. Mak, 2006; Y. Tie, 2023; E. H. Choy, 2020; R.D. Metcalfe, 2020; R.D. Metcalfe, 2023. Abbildung erstellt mit biorender.com.

IL-6 wird zunächst bestehend aus 212 Aminosäuren produziert und ist nach Abspaltung des 29 Aminosäuren langen Signalpeptids noch 183 Aminosäuren groß, und hat damit ein theoretisches Molekulargewicht von 20,8 kDa, hinzu kommt allerdings noch die posttranslationale Modifizierung der Glykosylierung (<https://www.uniprot.org/entry:p05231> und ExPasy ProtParam <https://web.expasy.org/translate/>). Im IL-6 befinden sich zwei Disulfidbrücken an den Stellen 72 ↔ 78 und 101 ↔ 111. Die Struktur von IL-6 wird durch vier α -Helices (A-D) in einer *up-up-down-down* Topologie gebildet. Die Helices sind vom N-terminus zum C-Terminus hin von A-D bezeichnet und bestehen aus je 20-25 AS. Die Abschnitte zwischen den Helices werden als Schleifen (engl. *loop*) bezeichnet [49, 50].

Ähnlich zum IL-6 wird IL-11 zunächst mit 199 Aminosäuren gebildet und nach Abspaltung des 21 Aminosäuren langen Signalpeptids ist es noch 178 Aminosäuren groß, was zu einem theoretischen Molekulargewicht von 19,1 kDa führt. (<https://www.uniprot.org/entry:P20809>

und ExPasy ProtParam <https://web.expasy.org/translate/>). Anders als beim IL-6, besitzt IL-11 weder Cystein-Seitenketten noch ist es N-glykosyliert [51, 52].

IL-11 gehört aufgrund seiner ähnlichen Struktur und der Art und Weise wie der Signalweg auf den Empfängerzellen ausgelöst wird, sprich durch den Zytokinrezeptorkomplex, zur Interleukin-6 Familie. **Abbildung 2** zeigt einen Sequenz- und Strukturvergleich (engl. *alignment*) von IL-6 und IL-11 sowie die typische 4-Helix Bündelstruktur mit der *up-up-down-down* Topologie der IL-6-artigen Zytokine. Für den Sequenzvergleich (**Abbildung 2 A**) wurde die Sequenzen aus den zuvor erwähnten UniProt Einträgen jeweils ohne Signalpeptid verwendet, da diese im Laufe der Proteinexpression und Sezernierung abgespalten werden. Die Homologie beider Sequenzen beträgt ~20% [53]. **Abbildung 2 B** und **C** zeigen schematisch die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur von IL-6 mit den Bindestellen *site I*, *site II* und *site III*. Diese Bindestellen und die Assemblierung der Zytokinrezeptorkomplexe werden im folgenden Abschnitt 1.1.4 erläutert.

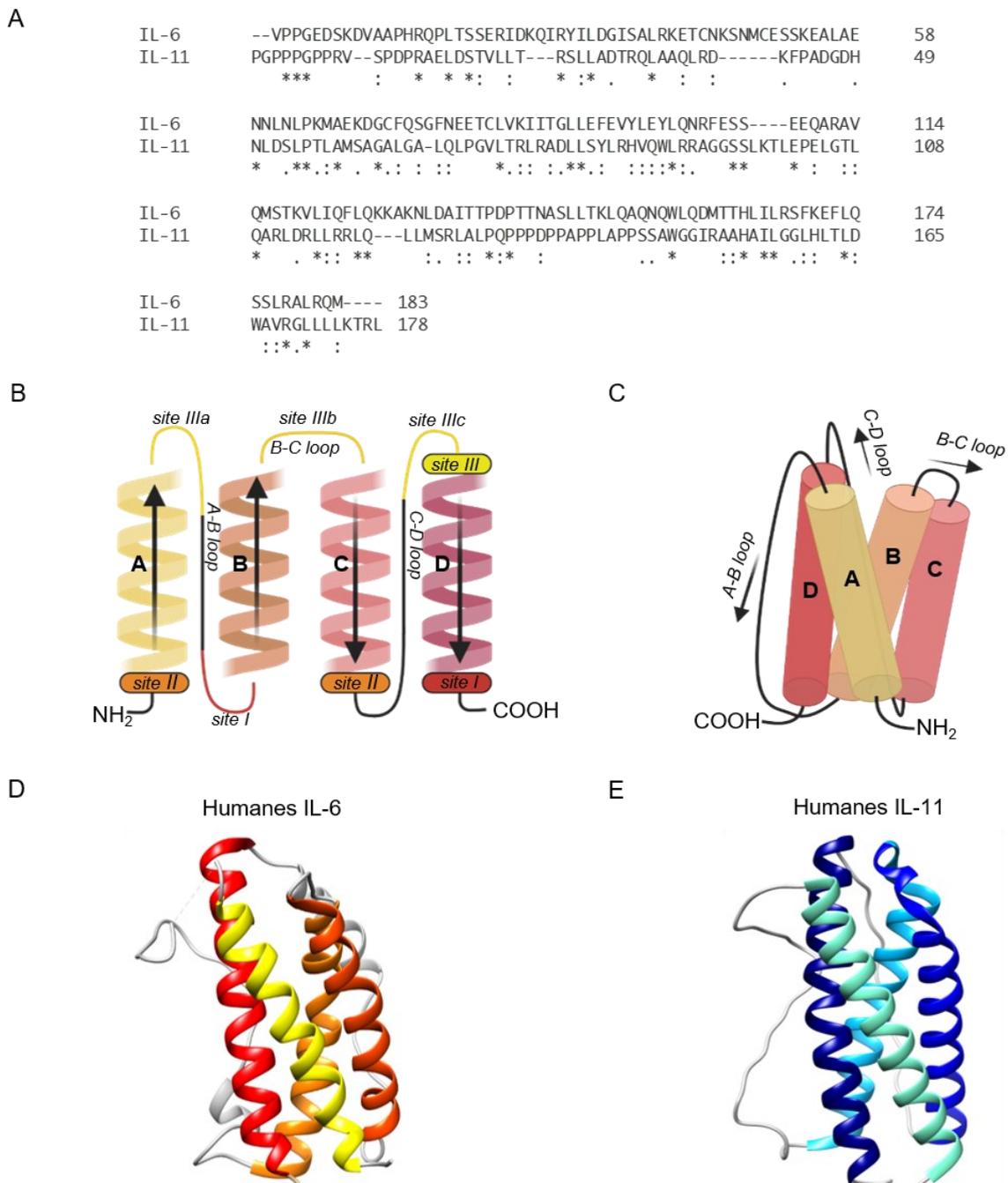


Abbildung 2 Sequenz und Strukturvergleich von IL-6 und IL-11.

(A) Aminosäuresequenz-Alignment zwischen dem humanem IL-6 und dem humanem IL-11, die jeweiligen Signalpeptide wurden exkludiert (~20% Sequenzhomologie [53]). Alignment mittels Clustal O (1.2.4) <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>, basierend auf [54]. (B) Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von IL-6 zur Visualisierung der up-up-down-down Topologie (Pfeile) der vier Helices (A-D) und der Bindestellen (site I in rot, site II in orange und site III in gelb) (basierend auf M. J. Boulanger, 2003). (C) Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von IL-6 zur Visualisierung des 4-Helixbündels (nach Vorlage S. Rose-John 2020). (D) Kristallstruktur von humanem IL-6 (PDB: 1P9M) dargestellt in Chimera 1.15 (E) Kristallstruktur von humanem IL-11 (PDB: 8DTP) dargestellt in Chimera 1.15.

Signaltransduktion von IL-6 und IL-11 mittels alpha-Rezeptoren und dem Signaltransduzierer gp130

Aufgrund der Ähnlichkeit und der Gemeinsamkeiten zwischen IL-6 und IL-11 werden sie zu einer Zytokinfamilie als Gruppe zugeordnet. Als weitere Familienmitglieder dieser Gruppe gehören zudem: *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) [55], *cardiotrophin-like cytokine factor 1* (CLCF) [56], *cardiotrophin 1* (CT-1) [57], *leukaemia inhibitory factor* (LIF) [58], *oncostatin M* (OSM) [59], Interleukin-27 (IL-27) [57], Interleukin-31 [60], Interleukin-35 (IL-35) [61] und Interleukin-39 (IL-39) [62]. Diese Zytokine der IL-6-Familie haben gemein, dass sie über das transmembran Protein gp130 ihr Signal an die Empfängerzelle vermitteln. Für die Signalaktivierung durch IL-6 und IL-11 bedarf es hierbei ein gp130 Rezeptorhomodimer und für alle anderen Familienmitglieder ein gp130 heterodimer. Während IL-6 und IL-11 einen zusätzlichen nicht-signaltransduzierenden Rezeptor in Kombination mit dem gp130 Homodimer benötigen, verwenden die anderen Zytokine neben gp130 einen weiteren signaltransduzierenden Transmembranrezeptor (z.B. LIFR, OSMR) [2, 49, 63, 64].

1.1.1 Rezeptoren

Im Fokus dieser Arbeit stehen neben IL-6 und IL-11 der IL-6 Rezeptor (IL-6R) und der IL-11 Rezeptor (IL-11R). Der humane IL-6R wurde ebenfalls als erstes in der Arbeitsgruppe von T. Kishimoto kloniert (1988). Die cDNA kodiert für ein 468 Aminosäuren großes Protein. Die theoretische Größe des IL-6R ist 50 kDa, doch das reife Protein ist durch seine Glykosylierung ca. 80 kDa groß. Der Rezeptor wird unterteilt in ein Signalpeptid aus 19 Aminosäuren, einer extrazellulären-, einer transmembranen- und einer kurzen zytoplasmatischen Region, welche aus 339 bzw. 28 und 82 Aminosäuren bestehen [65, 66]. Die extrazelluläre Region besteht aus 3 Domänen zu je ~100 AS (D1-D3). Die Domäne D1 befindet sich am N-terminus und lässt sich zur Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) zuordnen und D2 und D3 sind Fibronectin Typ III (FnIII) Domänen und zählen als Zytokinbindedomänen [67-69]. Die anderen beiden Regionen des Rezeptors, die transmembran- und die zytoplasmatische Region, werden nicht für die Bindung von IL-6 oder für die Signaltransduktion benötigt, sondern dienen eher zur Verankerung in der Zellmembran [69]. Der IL-6R kommt allerdings nicht nur membrangebunden/membranständig vor, sondern auch als löslicher Rezeptor, frei verfügbar im extrazellulären Raum (löslicher IL-6R, engl. *soluble IL-6R*, *sIL-6R*) und wird von Hepatozyten und einigen Immunzellpopulationen sezerniert (Monozyten, Neutrophile und T-Zellen) [70]. Dies ermöglicht es, dass das *IL-6 signaling* nicht nur auf Empfängerzellen mit

membranständigem Rezeptor limitiert ist, sondern auch fast alle anderen Zellen aus unterschiedlichen Gewebearten im Organismus stimulieren kann, worauf in dieser Arbeit später noch einmal eingegangen wird (Kapitel 1.1.3). Es gibt zwei Arten wie es zur Bildung des sIL-6R kommt. Durch alternatives *splicing* der mRNA wird die Membrandomäne nicht translatiert, sodass der Rezeptor nur aus dem extrazellulären Teil besteht und nicht mehr in der Membran inseriert werden kann [71-73]. Darüber hinaus kann der IL-6R in seiner löslichen Form auch über enzymatische Abspaltung der *stalk*-Region, die sich zwischen den Domänen D1-D3 und der Transmembranregion befindet, entstehen [74]. Dieser zweite Prozess wodurch der sIL-6R gebildet wird, nennt sich *shedding*. Die proteolytische Spaltung an der *stalk region* kann durch zwei Enzyme, *A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) 17* und ADAM10 geschehen. ADAM17 spaltet an den Aminosäuren Q357-D358, während ADAM10 an S353-F367 den membranständigen Teil abschneidet [75-78]. Die Konzentration von sIL-6R im menschlichen Serum beträgt unter homöostatischen Konditionen 40-75 ng/ml. Ähnlich wie beim IL-6 kann die Konzentration des sIL-6R unter inflammatorischen Bedingungen auch erhöht sein, allerdings nur um einen 2-10fachen Faktor [1].

Im Grunde ist der IL-11R ähnlich aufgebaut wie der IL-6R. Er besitzt ebenfalls drei extrazelluläre Domänen und eine *stalk* Region für den extrazellulären Teil, und die beiden Regionen, welche weniger für die Signaltransduktion, sondern eher zur Verankerung in der Zellmembran zuständig sind, die transmembrane und die zytoplasmatische Region. Auch hier dient die 55 AS lange *stalk* Region als Schnittstelle zur proteolytischen Spaltung durch ADAM10, aber anders als beim IL-6R wird der IL-11R nicht durch ADAM17 gespalten. Dadurch entsteht ein löslicher IL-11R (*soluble IL-11R*, sIL-11R). Andernfalls dient die *stalk* Region auch als nötiger Abstandhalter für eine mögliche Aktivierung der Signalkaskade über den membranständigen IL-11R [79, 80]. Der IL-11 Rezeptor wird von Kardiomyozyten [81], Fibroblasten [45], Epithelzellen [82] und Monozyten [83] exprimiert.

Verglichen mit dem sIL-6R, kommt der sIL-11R im Serum von gesunden Probanden in geringerer Konzentration zwischen 20 pg/ml und 4 ng/ml vor [80].

1.1.2 gp130

Wie zuvor erwähnt übertragen die IL-6 artigen Zytokine ihr Signal an die Empfängerzellen über den Signalvermittelnden β -Rezeptor Glykoprotein 130 kDa (gp130) [64]. Auch bei diesem Protein legte T. Kishimoto *et al.* 1990 den Grundstein mit seiner Entdeckung als

signaltransduzierenden Rezeptor von IL-6. Er zählt zu den Typ-1 Zytokinrezeptoren und besteht aus 918 Aminosäuren mit sechs extrazellulären Domänen, der IgSF (D1) und den fünf FnIII Domänen D2-D6, wobei D1, D2 und D3 als Bindestellen für Liganden dienen [47, 84, 85]. Der zytoplasmatische Teil von gp130 besteht aus 277 Aminosäuren und enthält nicht-kovalent gebundene aber konstitutiv assoziierte Janus Kinasen (JAKs), diese sind für eine Weiterleitung des Signals in der Zelle verantwortlich [86]. Diese JAKs binden an zwei JAK Bindestellen Box1, eine Pro-Xaa-Pro Sequenz mit vorangehenden hydrophoben Aminosäuren, und an das Box2 Motiv bestehend aus hydrophoben Aminosäuren und endend mit positiv geladenen Aminosäuren [87]. Weiterhin sind fünf Tyrosine (Y759, Y767, Y814, Y905 und Y915) im intrazellulären Teil von Bedeutung, da sie für die weitere Signaltransduktion der STATs (*signal transducers and activators of transcription*) verantwortlich sind [88]. Entgegen dem IL-6R und IL-11R wird gp130 ubiquitär exprimiert [34]. Auch der Rezeptor gp130 kann über *shedding* durch die Protease BACE als lösliche Variante (*soluble gp130*, sgp130) prozessiert werden [1, 89]. Für die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 gilt gp130 eher als schwaches Substrat [90]. Im Serum findet sich eine sgp130 Konzentration von 200-400 ng/ml, welche als natürlicher Puffer für die IL-6 und IL-11 trans-Signalwege dient [91].

1.1.3 Die Rezeptorkomplexe von IL-6 und IL-11

Für IL-6 sind drei Bindestellen, bezeichnet als *site I*, *II* und *III*, beschrieben, mit denen das IL-6 die Komplexbildung mit dem IL-6R und gp130 eingeht. Die *site I* ist das Bindeepitop zum IL-6R und ist lokalisiert in den α -Helices A und D. Dabei dient die Domäne D3 vom IL-6R als Interaktionsfläche. Die Interaktion die der *site II* zugeschrieben wird lässt sich sodann in 2 Unterteile gliedern, welche vom primären IL-6:IL-6R Gebilde ausgehen. Einmal in die *site IIa*, bei der die IL-6 Oberfläche zwischen den α -Helices A und C an die Domänen D2 und D3 von gp130 bindet, und der *site IIb* die nun vom IL-6R ausgehend an die Domäne D3 des gp130 bindet. Auch für die *site III* lassen sich zwei Interaktionen differenzieren. Hierbei bildet die *site IIIa* eine Fläche zwischen der Spitze des Helixbündels (A/B loop und dem N-terminus der D Helix im IL-6) und der D1 Domäne von einem zweiten gp130 aus und die *site IIIb* eine Fläche ebenfalls von der D1 Domäne vom gp130 an die D2 Domäne vom IL-6R. Boulanger *et al.* beschrieben, dass der gesamte Rezeptorkomplex mit einer Stöchiometrie von einem 2:2:2 Modell, also einem Hexamer, gebildet wird [50, 92]. Jedoch ist bis heute nicht ausgeschlossen,

ob nicht auch ein Tetramer aus einem IL-6, einem IL-6R und zwei gp130 den Funktionalen Zytokinrezeptorkomplex für IL-6 darstellt.

Ähnlich zum IL-6 bildet auch IL-11 über drei Bindestellen (*site I*, *II* und *III*) einen Komplex mit zwei IL-11R und zwei gp130 Rezeptoren. Auch bei der Formierung des IL-11 Komplexes bildet sich zunächst ein 1:1 Komplex aus IL-11 und dem IL-11R über die *site I* des IL-11. Mit der *site II* und der *site III* wird dann der hexamere Signalkomplex gebildet. Auch hier geht *site II* wieder eine Bindung mit einem gp130 an D2 und D3 ein (genauer, *site IIa* vom IL-11 und *site IIb* vom IL-11R aus), während *site III* mit der D1 von einem zweiten gp130 interagiert (genauer, *site IIIa* vom IL-11 und *site IIIb* vom IL-11R aus) [47, 63, 93].

Abbildung 3 zeigt den Rezeptorkomplex für IL-6 und IL-11. Zur vereinfachten Darstellung wurde hier der Zytokinrezeptorkomplex als Tetramer visualisiert.

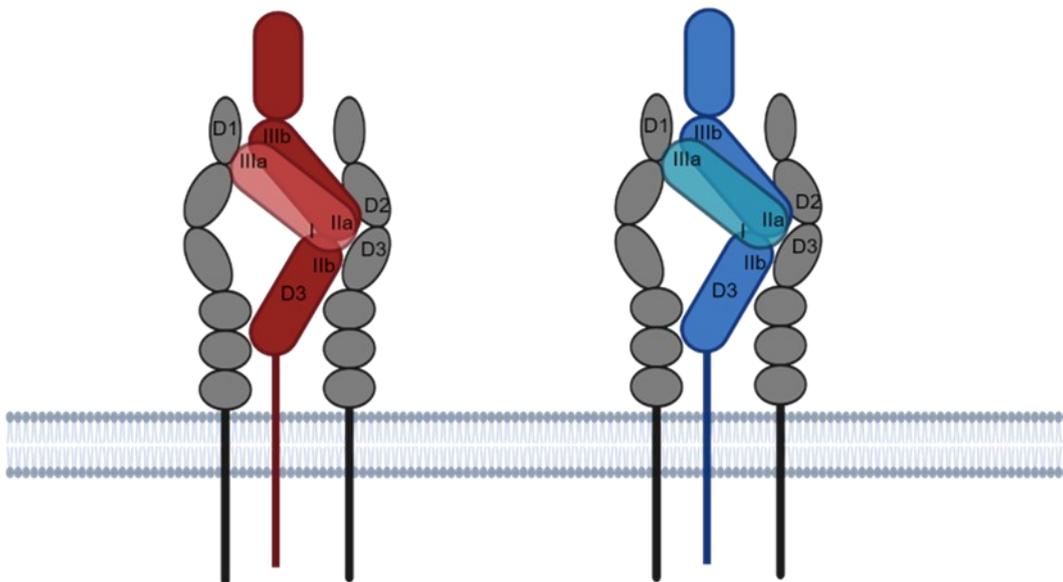


Abbildung 3 Rezeptorbindestellen für IL-6 und IL-11.

Rezeptorkomplex für IL-6 (links) und IL-11 (rechts). Gp130 Moleküle sind in grau dargestellt. IL-6 (hellrot) und IL-6R (dunkelrot) sind mit den binding sites in römischen Ziffern dargestellt. IL-11 (hellblau) und IL-11R (dunkelblau) sind mit den binding sites in römischen Ziffern dargestellt. In Anlehnung an Boulanger et al. 2003 und Metcalfe et al. 2023. Schemata erstellt mit biorender.com.

1.1.4 Signaltransduktion von IL-6 und IL-11 via *classic*, *trans*- und *cluster signaling*

Da die α -Rezeptoren, IL-6R und IL-11R nicht nur membrangebunden, sondern auch in löslicher Form vorkommen, ergeben sich grundsätzlich zwei Arten über die IL-6 bzw. IL-11 ihr Signal an eine Zielzelle übertragen können.

Der klassische Signalweg (engl. *classic signaling*) bedient sich der membrangebundenen Rezeptoren. Hierbei dockt ein IL-6 als erstes an den membrangebundenen IL-6R an, und fortführend kommt es zur Komplexbildung wie in 1.1.3 beschrieben [90]. Gleiches gilt für IL-11 mit dem IL-11R [79]. Bei diesem Signalweg können folglich nur Zellen stimuliert werden, welche auch den IL-6R (bzw. IL-11R) exprimieren und auf der Oberfläche präsentieren. Anders sieht es beim zweiten möglichen Signalweg für IL-6 bzw. IL-11 aus. Dieser wird als Trans-Signalweg (engl. *trans-signaling*) bezeichnet und bedient sich der löslichen α -Rezeptoren (sIL-6R, sIL-11R), wodurch alle gp130 exprimierenden Zellen angeregt werden können. Neben dem klassischen- und dem Transsignalweg gibt es allerdings noch einen dritten Signalweg. Dieser wird als Transpräsentation bezeichnet (oder *cluster signaling*) da hier eine Zelle mit präformierten IL-6:IL-6R Komplex eine benachbarte Zelle mit gp130 aktiviert [2]. Das *cluster signaling*, von IL-6 findet z.B. zwischen Dendritischen Zellen und T Zellen statt wodurch eine Reaktion von Th17 Zellen initiiert wird [94]. IL-11 kann auch ein Signal über den Weg der Trans-präsentation weiterleiten, allerdings wurde das IL-11 *cluster signaling* bislang nur *in vitro* beschrieben [95].

Die unterschiedlichen Formen der Signalwege sind mit differenten Effekten assoziiert, wodurch die gegensätzlichen Eigenschaften dem IL-6 bzw. IL-11 zugeordnet werden können. Während der klassische IL-6 Signalweg mit Eigenschaften, wie der Immunabwehr oder Regeneration in Verbindung gebracht wird, steht der Trans-Signalweg eher in Assoziation mit Entzündungen und Autoimmunität oder Krebs [1, 9, 96, 97].

Die **Abbildung 4** zeigt schematisch die drei möglichen Signalwege: *classic*-, *trans*- und *cluster-signaling* für IL-6 und IL-11.

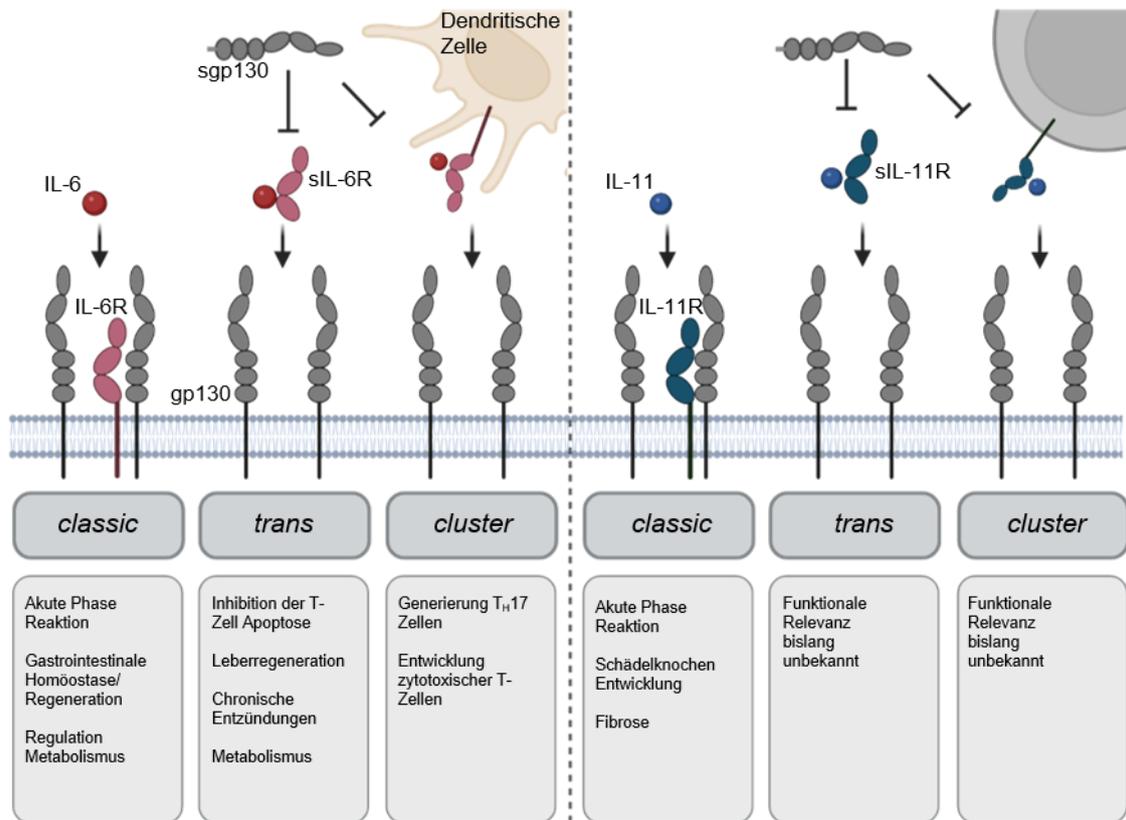


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Signalkomplexe von IL-6 und IL-11.

Links: Mögliche IL-6 Zytokinrezeptorkomplexe. **Rechts:** Mögliche IL-11 Zytokinrezeptorkomplexe. Die Zytokine sind als einfache Sphären dargestellt (IL-6 in rot, IL-11 in blau). Die entsprechenden α -Rezeptoren sind in entsprechend ähnlichen Farben dargestellt (IL-6R dunkelrot, IL 11R dunkelblau). Die α -Rezeptoren sind sowohl mit Transmembrandomänen als auch ohne dieser dargestellt (d.h. als membranständige bzw. lösliche Form). Die signaltransduzierenden Rezeptoren gp130 sowie der trans-signaling Inhibitor sgp130 sind in grau abgebildet. Grafik in Anlehnung an M. Giraldez 2021. Erstellt mit biorender.com

1.1.5 Intrazelluläre Signalwege

Wie zuvor erwähnt sorgen die JAKs am gp130 bei Rezeptordimerisierung durch gegenseitige Aktivierung, auch Transphosphorylierung genannt, für eine Signalweiterleitung innerhalb der Zelle, hauptsächlich über die Aktivierung von *signal transducer and activator of transcription* (STAT) Transkriptionsfaktoren [98-100]. Am gp130 werden die C-Terminal liegenden Tyrosine von den JAKs phosphoryliert, wodurch die STATs ebenfalls am gp130 gebunden und phosphoryliert werden (pSTAT). Die pSTATs dimerisieren und translozieren in den Zellkern, wo sie an STAT-spezifischen Bindestellen nahe von Promotorsequenzen für STAT-Zielgene binden und eine Transkription ermöglichen [101, 102]. Neben dem JAK-STAT Signalweg werden intrazellulär auch andere Signalkaskaden („downstream pathways“) durch IL-6 artige Zytokine aktiviert. So wird der Mitogen aktivierte Protein Kinase Signalweg (engl. *mitogen activated protein kinase*, MAPK) durch Vorhandensein an SHP2 am gp130 aktiviert und es

kommt folglich zur Aktivierung der Extrazellulär regulierten Kinase (engl. *extracellular activated kinase*, ERK). Aber auch die Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase (engl. *phosphatidylinositol-3-kinase*, PI3K) Signalkaskade kann durch SHP2 am gp130 aktiviert werden [34, 103].

Inhibitoren der IL-6 und IL-11 Signaltransduktion

Antikörper und *small molecules* gegen IL-6, IL-6R, IL-11, IL-11R, gp130 und intrazelluläre Ziele in den Signalkaskaden (z.B. JAKs) werden genutzt, um IL-6 und IL-11 Signalwege zu inhibieren. „*Small molecules*“ sind kleine Moleküle, welche Proteine an ihren Interaktionsflächen inhibieren, und aufgrund ihrer Größe können sie auch Gewebe und Zellmembranen penetrieren, was sie auch intrazellulär wirksam macht [1, 47, 104].

Eine universelle Inhibition aller Signalwege, die von diesen Komponenten betroffen sind, bspw. bei Anwendung von JAK- oder STAT-Inhibitoren, birgt allerdings auch die Nebenwirkung des *off-targets effects*, da auch Signalkaskaden ausgelöst durch andere Zytokine mit inhibiert werden können [103]. Obwohl es verschiedene monoklonale Antikörper gibt, die je nach Bindeepitop spezifisch IL-6 oder IL-11 Signalwege inhibieren können, werden bei diesen immer noch sowohl das *classic*- als auch das *trans-signaling* inhibiert [105]. Dies gilt auch für die zuvor erläuterten monoklonalen Antikörper wie Tocilizumab oder Sarilumab, die sich gegen den IL-6R richten und damit sämtliche IL-6R vermittelte Signale inhibieren (sowohl *classic* als auch *trans-signaling*).

In den letzten 20 Jahren (in etwa seit dem Jahr 2000) wird auch an einem IL-6 *trans-signaling* spezifischen Inhibitor namens sgp130Fc geforscht [106-108]. Während parallel an fortführenden Modifizierungen von sgp130Fc geforscht wird [27, 37, 109, 110] befindet sich das sgp130Fc unter dem Namen „Olamkicept“ aktuell in der Vorbereitung der klinischen Phase III zur Zulassung für die Behandlung von IBD (chronische Darmerkrankungen s.o.) [1].

Hyperzytokine: Designerzytokine der IL-6 Familie

Das Designer-Zytokin Hyper-IL-6 (HIL-6) wurde entwickelt, um das IL-6 *trans-signaling* besser untersuchen zu können. HIL-6 ist ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem sIL-6R, welche über einen flexiblen Peptidlinker kovalent miteinander verbunden sind [111]. Mit diesem Designerzytokin ließen sich nicht nur Zellarten stimulieren, die keinen IL-6R auf der Oberfläche tragen (*trans-signaling*), sondern auch Zellen mit einer membranständigen IL-6R

Expression zeigten sich um ein Vielfaches verstärkt responsiv (~100-1000x [112]) gegenüber einer Stimulation mit IL-6 [113, 114]. Dies lässt sich auf die Verfügbarkeit der IL-6 Rezeptoren beim *classic-signaling* zurückführen, da mehr gp130 Rezeptoren auf einer Zelloberfläche vorhanden sind als membranständige IL-6R. Aufgrund dessen können unter Zugabe von HIL-6 mehr gp130 Rezeptoren einer Zelle aktiviert werden als unter alleiniger IL-6 Stimulation [1, 115].

Analog zum HIL-6 wurde auch ein *trans-signaling* Fusionsprotein für IL-11 entwickelt und entsprechend Hyper-IL-11 (HIL-11) genannt. Auch dieses Fusionsprotein, bestehend aus IL-11 und dem sIL-11R verknüpft über einen Peptidlinker, erwies sich als um ein Vielfaches potenter (~50x [116]) im Vergleich zu den Einzelkomponenten [116-118].

Crosstalk, die Kreuzaktivität der Zytokine

Forschungen zu den Signalwegen von Zytokinen wurden und werden oft in simplifizierten Experimentalmethoden durchgeführt. Zusammengenommen können im Organismus allerdings mehrere Stimuli, wie Zytokine und Hormone, sowie unterschiedliche Zellarten aufeinandertreffen, viel mehr als es z.B. in der Zellkultur abgebildet wird/werden kann. Demnach wird von einer Kreuzaktivität (engl. *crosstalk*) gesprochen, wenn diese Stimuli sich ergänzen, additive, synergistische oder antagonistische Effekte auslösen. Nicht nur unter der Kommunikation von verschiedenen Zellpopulationen oder bei Signalkaskaden die miteinander verzweigt sind spricht man dabei vom *crosstalk*, sondern auch dann, wenn z.B. die Zytokin und Rezeptorkombinationen variieren können. Durch solche *crosstalks* kann die Bandbreite mit der ein Zytokin auf diverse Zellpopulationen einwirken kann, basierend auf dem Vorkommen von Rezeptoren, auch vergrößert werden [64]. Innerhalb der IL-6-Familie ist bereits der IL-6R als alternativer Rezeptor für das CNTF, anstelle des CNTF-Rezeptors (CNTFR) beschrieben worden [119]. Als ein anderes Beispiel aus dieser Familie gilt die Kombination der IL-27 Untereinheit p28, die statt an seinem Rezeptor EB13 auch über den IL-6R und gp130 Dimerisierung eine Signaltransduktion initiieren kann [120, 121]. Ein weiteres Beispiel stellt OSM dar, denn es kann ebenfalls über zwei Rezeptorkombinationen ein Signal auf Zellen auslösen, nicht nur über den OSM-Rezeptor (OSMR) und gp130 sondern auch über die Kombination vom LIF-Rezeptor (LIFR) und gp130 [122].

Die Zytokinchimäre IC7

Chimäre Zytokine können synthetisch aus Grundgerüsten natürlich vorkommender Zytokine gebildet werden, indem Teile ihrer Strukturen substituiert werden wie z.B. einzelne Rezeptorbindedomänen [123-125]. 1999 entwickelten Kallen *et al.* eine Chimäre aus IL-6 und CNTF. Hierbei wurde die *site IIIa* vom IL-6, welche normalerweise als Bindestelle für ein zweites gp130 dient, gegen die *site IIIa* von CNTF, die Bindestelle von CNTF für den LIFR, substituiert [123, 126]. Das daraus resultierende Zytokin wurde als „IC7“ bezeichnet und löst kein Signal mehr auf Zellen ohne den LIFR aus, sondern über ein LIFR:gp130 heterodimer nachdem es zunächst an den IL-6R gebunden hat [123]. Daraus abgeleitet wurde postuliert, dass das IC7 geringere Nebeneffekte auslösen könnte als das IL-6, da bei einer IL-6 Applikation, durch die pro-inflammatorischen Effekte, eine therapeutische Anwendung limitiert ist. Als dimere Zytokinchimäre (IC7Fc) wurde zuletzt eine verbesserte Glukosetoleranz und Hyperglykämie beschrieben, wodurch eine Gewichtszunahme und Leberverfettung in Mäusen reduziert wurde. Zudem konnte dem IC7 in nicht-humanen Primaten eine „sichere Injektion“ zuordnet werden, da die Indikatoren für eine Inflammation, wenn auch nur bei einmaliger Injektion untersucht, nicht auf eine massive Entzündung hindeuteten [127].

Auf Grund dieser Idee, wurde auch in unserer Arbeitsgruppe bereits an anderen Zytokinchimären gearbeitet [124, 128]. Ob IC7 möglicherweise auch über einen *crosstalk* vermag, sprich über weitere Rezeptorkombinationen ein Signalweg induzieren kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit initial untersucht.

In **Abbildung 5** wird das Prinzip der Designerzytokine HIL-6 und HIL-11 sowie die Zytokinchimäre IC7 schematisch dargestellt.

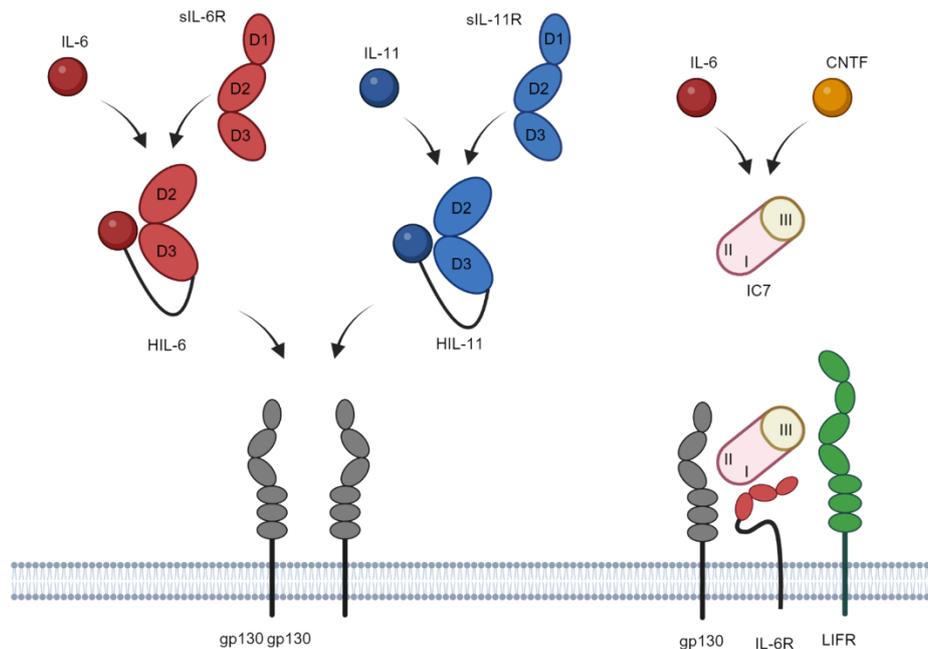


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Designerzytokine HIL-6, HIL-11 und IC7.

Links: Das HIL-6 ist ein Fusionsprotein aus IL-6 (dunkelrote Späre) und den Domänen D2 und D3 des sIL-6R (rot). Mitte: Das HIL-11 ist ein Fusionsprotein aus IL-11 (dunkelblaue Späre) und den Domänen D2 und D3 des sIL-11R (blau). Rechts: Das IC7 ist eine Zytokinchimäre basierend auf dem IL-6 (rote Späre), bei dem die site III gegen die LIFR-Bindedomäne des CNTF (braun) substituiert wurde. Während sowohl HIL-6 als auch HIL-11 über ein gp130 Dimer den Trans-signalweg des jeweiligen Zytokins repräsentieren, bindet IC7 über die Rezeptorkombination aus gp130:IL-6R:LIFR und induziert so eine Signaltransduktion.

Aufbau der Leber und ihre Funktionen

Wie bereits in Abbildung 1 zu erkennen war, besitzen sowohl IL-6 als auch IL-11 eine Funktionsweise auf Hepatozyten, Hepatischen Sternzellen, Makrophagen, B- und T-Zellen welche alles Teil der Zellpopulationen der Leber darstellen. Neben Stoffwechselaktivitäten und der Akuten-Phase-Reaktion sind IL-6 und IL-11 an der Leberregeneration bei Leberschädigungen beteiligt.

Die Leber ist mit 1,2-1,5 kg das größte Stoffwechselorgan im menschlichen Körper, dies entspricht in etwa 3-5% des Gesamtkörpergewichts [129]. Sie befindet sich im oberen rechten Quadranten der Abdominalen Körperhöhle (Bauchhöhle), direkt unter dem Diaphragma (Zwerchfell) [130]. Beim Menschen ist sie in zwei Leberlappen unterteilt, dem rechten und dem linken Leberlappen, differenziert durch das *Ligamentum falciforme* [130]. Die murine Leber hingegen lässt sich hauptsächlich in vier Lappen unterteilen, den linken sowie rechten Leberlappen, den kaudalen Leberlappen, und dem Medianen-, oder auch Mittellappen genannten, Leberlappen [131]. Die Leber gilt als stark durchblutet, da sie bis zu 25% des

Herzzeitvolumens (*cardiac output*) erhält. Sie wird über zwei Hauptressourcen mit Blut versorgt. Ein Drittel des Blutvolumens erhält sie dabei über die Leberarterie (*Arteria hepatica propria*) welche sauerstoffreiches und nährstoffarmes Blut, ausgehend von der Lunge und dem Herzen zur Leber transportiert. Die anderen zwei Drittel des Blutvolumens erreichen die Leber über die Pfortader (*Vena portae*), welche nährstoffreiches und sauerstoffarmes Blut von den umliegenden Organen wie dem Darm, der Milz und dem Pankreas mit sich bringt [130, 132, 133]. Die Mikrostruktur der Leber wird durch hexagonale Untereinheiten, den sogenannten *Lobuli hepatici* abgebildet. Diese sind gekennzeichnet durch Glisson'sche Dreiecke (auch: *Glisson-Trias*) in den Eckpunkten an denen je drei *Lobuli* aufeinandertreffen. Das Glisson'sche Dreieck wird gebildet durch interlobuläre Kapillare der Venen, Arterien und Gallengänge: *V. interlobulares*, *A. interlobulares*, *D. interlobulares*. Diese drei Kanäle leiten ihren Volumenstrom über die Kapillarräume des Lebergewebes (der Sinusoide) zur Zentralvene eines jeden *Lobulus* [134]. Die Leber besteht zu 80% aus Hepatozyten, welche die grundsätzlichen Funktionen der Leber ausüben [133, 135, 136]. Neben den Hepatozyten gibt es also noch andere Zellpopulationen wie die sinusoidalen Endothelzellen [137, 138], Kupferzellen (Makrophagen der Leber) [139, 140], hepatische Sternzellen/Stammzellen [141, 142] und den Cholangiozyten (Epithelzellen des Gallengangs) [143].

Abbildung 6 zeigt schematisch den Aufbau eines Ausschnitts aus einem Lobulus.

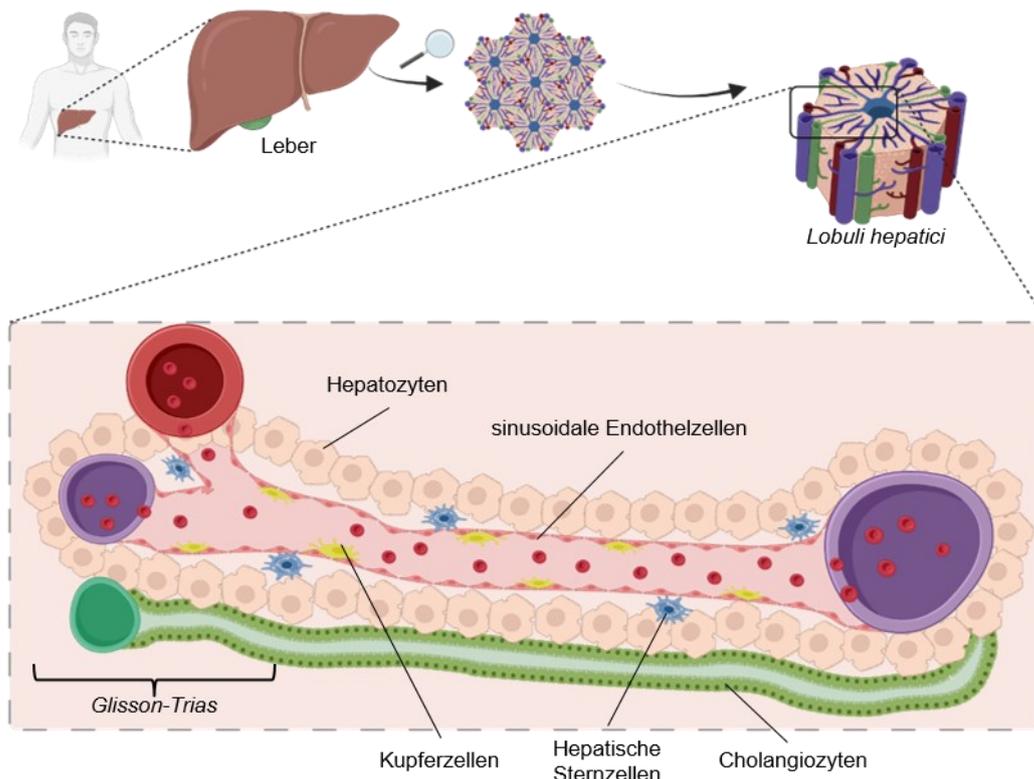


Abbildung 6 Mikroarchitektur der Leber und ihre verschiedenen Zellpopulationen.

Oben: Position der Leber im oberen rechten Quadranten der menschlichen Bauchhöhle und genauere Unterteilung der funktionellen Leberuntereinheiten der Lobuli hepatici. **Unten:** Querschnitt-Darstellung eines Kapliarraums, dem Sinusoid innerhalb eines Lobulus hepatis. Links, das Glisson-Trias bestehend aus: A. interlobulares (rot), V. interlobulares (lila) und des D. interlobulares (grün). Rechts, Zentralvene. In Anlehnung an P. Ramachandran 2020. Abbildung erstellt mit biorender.com.

Die Leber ist ein Organ mit diversen Stoffwechselfunktionen. Sie ist z.B. an der Verarbeitung von Kohlenhydraten in Form der Glykogensynthese und Glukoneogenese beteiligt. Aber auch in anderen Stoffwechselprozessen spielt sie eine tragende Rolle: Bei der Lipogenese und dem Abbau von Fettsäuren (der β -Oxidation); im Metabolismus von Aminosäuren; in der Sekretion der Gallensäure; der Synthese von Cholesterin und Harnstoff und im Stoffabbau von exogenen Komponenten wie Toxinen und Pharmazeutika [144-148]. Wie zuvor erwähnt, übernimmt die Leber auch eine Aufgabe des Immunsystems mit der Produktion und Sekretion von Akute-Phase Proteinen (APP) [149, 150]. Die Produktion dieser wird induziert durch die IL-6 Signaltransduktion in der Leber [149, 151]. IL-6 spielt aber auch in anderen Kontexten wie der Pathophysiologie eine Rolle. Die IL-6 Expression korreliert mit akutem Leberversagen und in chronischen Leberschäden sowie in der Progression von Lebertumoren [152]. Nichtsdestotrotz wird dem IL-6 aber auch eine protektive Funktion Leberschädigungen zugeschrieben, sowohl bei chemisch induzierten und chronischen Leberschädigungen [153, 154], als auch bei dem akuten Leberschadensmodell der PHx [155]. So konnte Blindenbacher *et al.* in IL-6 defizienten

Mäusen eine erhöhte Mortalität nach einer PHX beobachten, welche wiederum durch s.c. Injektion von IL-6 kompensiert werden konnte.

IL-11 wird in Zusammenhang mit fibrotischen Leberprogression wie dem Übergang von nicht-alkoholischer Fettlebererkrankung (*non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD*) zu nicht-alkoholischer Steatohepatitis (*non-alcoholic steatohepatitis, NASH*) gebracht [53, 156]. In Krebspatienten mit Leberzellkarzinom (engl. *hepatocellular carcinoma, HCC*) vermag eine durch IL-11 induzierte STAT3 Signaltransduktion in ein postoperatives Wiederauftreten des Karzinoms involviert zu sein [157]. Andererseits wurde im Model der Leberischämie für IL-11 eine protektive Funktion beschrieben [158]. Auch wenn IL-11 bislang nicht im Rahmen einer partiellen Hepatektomie untersucht wurde, so zeigte die Zytokinchimäre (engl. *cytochimera*) GIL-11 eine verbesserte Leberregeneration nach partieller Hepatektomie. GIL-11 ist ähnlich zum IC7 eine Zytokinchimäre, welche aus zwei Familienmitgliedern der IL-6-artigen Zytokine fusioniert wurde. Bei GIL-11 wurde ein neuartiges Zytokin konstruiert indem IL-11 als Grundgerüst diente und die gp130-Bindestelle *site III* aus IL-11 gegen die LIFR Bindestelle *site III* aus dem LIF substituiert wurde [124].

Leberschädigungen und -erkrankungen

Grundsätzlich lassen sich zwei pathophysiologische Ursachen unterscheiden, welche zu einer gestörten Leberhomöostase oder einem Leberversagen führen. Der akute und der chronische Leberschaden, ausgelöst durch unterschiedliche Ursachen wie: Traumata, Teilresektionen, Alkoholkonsum, Toxifizierung, virale Infektionen, genetische Dispositionen oder eine autoimmune Hepatitis [159, 160]. Bei Leberschädigungen werden die hepatischen Sternzellen (HSCs) aktiviert, woraufhin sie unter anderem auch Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) produzieren, was zu einer fibrotischen Leber führt [161]. In frühen Stadien der fibrotischen Leber führen lokale Entzündungen zur Bildung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche die Regenerierung der Leber induzieren und eine natürliche Leberfunktion wieder hergestellt werden kann [162, 163]. In fortgeschrittenen Stadien hingegen, entwickelt sich die Fibrose hin zu einer Leberzirrhose bei der das Gewebe zunehmend zerstört wird und die Funktion der Leber verloren geht, was lebensbedrohlich werden kann und 2019 fast 1,5 Millionen Tote zur Folge hatte [164, 165]. Es gibt zwei Stadien der Leberzirrhose die kompensierte und dekomensierte Zirrhose. Wie der Name bereits andeutet, ist die dekomensierte Zirrhose gegenüber der kompensierten als gefährlicher einzustufen, da die Lebenserwartung nur noch bis zu 2 Jahren beträgt und Patienten schnellstmöglich einer Lebertransplantation unterzogen werden sollten [165]. Unter dem Zustand der Zirrhose kann im weiteren Verlauf auch ein Leberzellkarzinom

entstehen [166]. Zur Behandlung eines primären Leberkrebs, dem Leberzellkarzinom (*Hepatocellular carcinoma, HCC*), werden durch Resektionen Teile der Leber entfernt. Nach einem solchen Entfernen der Lebermasse, wie auch bei Lebertransplantationen ist es essentiell, dass der verbliebene Teil der Leber regeneriert und den Anforderungen des Metabolismus wieder gerecht werden kann [167-169]. Ein Problem bei Leberresektionen und Transplantationen stellt das *small for size syndrom (SFSS)* dar. Es ist gekennzeichnet durch eine unzureichende Genesung des verbleibenden Lebervolumens nach einer umfangreichen Hepatektomie [155]. Hierbei ist die regenerative Kapazität der Leber von tragender Rolle. Ein umfassendes Grundlagenwissen ist umso wichtiger, um Behandlungsmöglichkeiten und Therapien stetig zu revidieren und zu verbessern.

Während einige Leberschadensmodelle durch eine bestimmte Ernährung von Versuchstieren oder chemisch induziert werden, wie beispielsweise durch eine *high fat diet* für eine NAFDL (*non-alcoholic fatty liver disease*), oder Tetrachlormethan (CCl_4) induzierte Leber Fibrose, handelt es sich bei der partiellen Hepatektomie um eine Methode um einen akuten Leberschaden hervorzurufen.

Partielle Hepatektomie (PHx)

Anders als andere Organe besitzt die Leber enorme regenerative Fähigkeiten, welche nach Funktionsverlusten bei Leberschäden initiiert werden, so kann die Leber selbst nach operativen Entfernen von 2/3 des Lebervolumens, auf 100% ihrer ursprünglichen Größe nachwachsen [169, 170]. Um diese Mechanismen besser zu verstehen, werden aufgrund der Ähnlichkeit zwischen Menschen und Nagern, oft Nagetier-Modelle für *in vivo* Studien verwendet, da die Leberregeneration ein systemischer Prozess ist, welcher sich aufgrund seiner Komplexität bislang nicht ausreichend in der Zellkultur, also *in vitro*, nachahmen lässt [171, 172].

Als Modell für einen akuten Leberschaden wird die partielle Hepatektomie (PHx) herangezogen, welche durch operativer Eingriff vorgenommen wird. Sie kennzeichnet sich durch zwei Vorteile gegenüber anderer Leberschadensmodellen aus: 1.) Durch Entfernen des resezierten Gewebes liegt keine Assoziation mit massiv nekrotischem Gewebe vor, und 2.) stellt sie eine punktgenaue Initiierung der Regeneration, ohne vorangegangene Inflammation dar, was eine präzise Referenzzeit (Zeitpunkt 0) angibt [173]. Die PHx wurde 1931 erstmals von Higgins und Anderson in der Ratte beschrieben [174] und ca. 20 Jahre später wurde die erste PHx beim Menschen durchgeführt [175].

Diverse Zellpopulationen, Zytokine und Wachstumsfaktoren regulieren die Proliferation von Hepatozyten, sodass die Leber nach 70%iger Resektion bereits nach 7-8 Tagen in ihrer ursprünglichen Größe und Funktion wiederhergestellt ist [170]. Die Kompensation geschieht hauptsächlich durch die Proliferation von Hepatozyten, wobei auch wenn Hepatozyten und Cholangiozyten ihres Phänotypen sehr rigide sind, auch Cholangiozyten als fakultative Stammzellen agieren können und durch Transdifferenzierung die Wiederherstellung unterstützen, sollten die Hepatozyten in ihrer Regeneration gehindert sein, und anders herum [170]. In der Homöostase proliferieren die Hepatozyten für gewöhnlich nicht und verharren in der G0-Phase des Zellzyklus. Reguliert durch diverse Faktoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren können die Hepatozyten allerdings für 2-3 Zellzyklen proliferieren und kehren zum Ende der Leberregeneration in der Terminationsphase, wieder in ihren Ruhezustand (G0) zurück [176, 177].

In Folge einer partiellen Hepatektomie steigen die Serumkonzentrationen sowohl von IL-6 als auch vom sIL-6R [178, 179]. IL-6 ist einer der Faktoren, die die Hepatozyten über die gp130 und STAT3 Signaltransduktion zur Proliferation aktivieren [179-181]. So zeigen IL-6-defiziente Mäuse, eine reduzierte DNA-Synthese in Hepatozyten was mit einem geringeren Überleben nach PHx einhergeht, was durch Injektion von rekombinantem IL-6 wiederum kompensiert werden kann [182]. Mit einer PHx und Injektion von HIL-6 konnte durch Peters *et al.* eine protektive Rolle dem *trans-signaling* von IL-6 zugeschrieben werden, was sich durch eine beschleunigte Leberregeneration auszeichnete [183]. Erst kürzlich konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass IL-6 *trans-signaling* eine ausschlaggebende Rolle in der Leberregeneration nach PHx spielt, da zunächst Kupferzellen IL-6 sezernieren, welches dann Hepatozyten und HSCs stimuliert. Dadurch wird auf Hepatozyten einerseits der JAK-STAT Signalweg direkt durch das IL-6 *trans-signaling* aktiviert und zeitgleich werden die Hepatozyten zusätzlich durch HGF, welches durch IL-6-aktivierte HSCs sezerniert wird, stimuliert. Sowohl die Zugabe von sgp130Fc und einem gegen IL-6 gerichteten monoklonalen Antikörper reduzierten die Regeneration durch Abblocken des *trans-signaling* bzw. *classic-* und *trans-signaling* von IL-6. Außerdem zeigten sIL-6R^{+/+} Mäuse, welche den IL-6R ausschließlich in Form des sIL-6R produzieren, ein 80%iges Überleben nach PHx was vergleichbar mit dem wildtyp Phänotypen ist und somit die essenzielle Rolle des IL-6 *trans-signaling* in der Leberregeneration untermauert [179].

2. Ziele dieser Arbeit

Übergeordnetes Thema: Generelles Grundwissen über die Biochemie unseres Körpers kann scheinbar nie vollständig erforscht sein. Seit Jahrhunderten erweitert sich das Wissen über die Funktionen und Wirkungsweisen der lebenden Natur, in diesem Fall der humanen Medizin, sowohl im gesunden als auch im kranken Zustand. Auch im Forschungsgebiet der Zytokine und damit auch im Zusammenhang der Interleukin-6-Familie erweitert sich stetig unser Grundwissen und auch die klinische Relevanz und Anwendung. Dennoch ergeben sich stetig neue Fragen und unerwartete Ergebnisse weisen die Richtung für neue Untersuchungen.

In dieser Arbeit liegt der Fokus vor Allem auf dem Zytokin IL-6, dass nicht nur an seinen eigens benannten Rezeptor zu binden vermag, sondern auch an den IL-11R. Die daraus gewonnenen Kenntnisse werden ebenfalls auf eine Zytokin-chimäre IC7 übertragen, welche zu 2/3teln aus IL-6 besteht. Modifikationen im IL-6 wurden auf eine Verstärkung bzw. Abschwächung des *crosstalks* hin untersucht. Zuletzt wurde basierend auf Vorarbeiten aus dieser Arbeitsgruppe die Leberregeneration weiter untersucht mit Blick auf ein, in diesem Kontext bislang unbeschriebenes Hyperzytokin, dem Hyper-IL-11Fc (HIL-11Fc), was nach einer partiellen Hepatektomie in IL-6R defizienten Mäusen appliziert wurde. Dies könnte ebenfalls Aufschlüsse über die Rolle des IL-11 induziertem *trans-signaling* geben, welches bislang relativ unbekannt ist.

Spezielle Zielsetzung 1: Erkundung des IL-6:IL-11R *crosstalk in-vitro*.

Spezielle Zielsetzung 2: Etablierung des IL-6:IL-11R *crosstalk* im *trans-signaling* mittels dem neuen Designerzytokin cHIL-6.

Spezielle Zielsetzung 3: Erkundung von Modifikationen im IL-6 zur Beeinflussung des IL-6:IL-11R *crosstalk* Potentials.

Spezielle Zielsetzung 4: Überprüfung der Zytokinchimäre IC7 auf einen IL-11R:LIFR *crosstalk* entgegen des bislang beschriebenen IL-6R:LIFR Rezeptorkomplexes für IC7.

Spezielle Zielsetzung 5: Untersuchung des IL-11 *trans-signaling* mittels HIL-11Fc in der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie in IL-6R defizienten Mäusen.

3. Material

3.1 Verbrauchsmaterial, Einwegwaren, Kleingeräte

Tabelle 1 Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Reaktionsgefäß 15 ml	Greiner Bio-one, Solingen
Reaktionsgefäß 50 ml	Greiner Bio-one, Solingen
Reaktionsgefäß (SafeSeal tube) 1,5 ml	Sarstedt AG & Co.KG, Nürnberg
Reaktionsgefäß (SafeSeal tube) 2 ml	Sarstedt AG & Co.KG, Nürnberg
Sterile Petrischalen (10 cm)	Greiner bio-one, Solingen
T75-Zellkulturflasche (Filter)	Sarstedt AG & Co.KG, Nürnberg
T175-Zellkulturflasche (Filter)	Sarstedt AG & Co.KG, Nürnberg
Countess cell counting chamber slide	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Kryoröhrchen 1,5 ml	VWR, Randor, USA
Mr. Frosty™ Gefrierkontainer	Thermo Scientific™, St. Leon Rot
6-well Platte CytoOne®	Starlab, Hamburg
Microtest Plate 96-well	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell, München
Eppendorf Pipette research plus grau (2,5 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Pipette research plus grau (10 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Pipette research plus gelb (20 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Pipette research plus gelb (200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Eppendorf Pipette blau research plus (1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Serologische Stripetten	Hirschmann, Eberstadt
Rotilabo® Spritzenfilter, PVDF, steril 0,22 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Rotilabo® Spritzenfilter, PVDF, steril 0,45 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
20 ml Spritze Omnifix®	Braun, Meldungen
Amicon Ultra-15 Zentrifugeneinheit	Merck, Darmstadt
NAP™-25 Columns Sephadex™	Cytiva, USA
Strep-Tactin® XT 4 Flow®	IBA Lifesciences GmbH, Göttingen
HiTrap MabSelect Prisma	Cytiva, USA
Whatman-Papier	VWR, Randor
Nitrocellulosemembran	Cytiva, USA
Sensor Chip NTA	Cytiva, USA
Sensor Chip Protein A	Cytiva, USA
Zellscharber 28 cm, steril	Greiner, Bio-one, Solingen
Spritzen 1ml Omnifix® 100 Solo	B. Braun, Melsungen
Nadeln Sterican® 0,40x20 mm 27G (für i.p. Injektionen)	B. Braun, Melsungen
Nadeln BD Eclipse™ 0,8x40 mm 21G (für Blutentnahmen)	BD GmbH, Heidelberg
OP Besteck:	F.S.T., Foster, USA
OP Material: NaCl, Betaisodona, sterile OP- Handschuhe, OP- Wattestäbchen, Mulbinden und OP-Tücher	Zur Verfügung gestellt vom OP Bereich der ZETT, Heinrich-Heine-Universität
Serumröhrchen Micovette® 500-LH-Gel	Sarsted AG & Co.KG, Nürnberg
Spotchem II Liver-1 (Teststreifen)	Arkray, Amstelveen, Niederlande
Spotchem II ALP (Teststreifen)	Arkray, Amstelveen, Niederlande
Objektträger HistoBond®	Marienburg, Lauda-Königshofen

3.2 Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien

Name	Company
Mili-Q® dest. H ₂ O	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (BSA)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Ethanol (70%, 99%) (v/v)	Sigma-Aldrich, München
2-Propanol (Isopropanol)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
RNase A (17,500 U) 100 mg/ml)	Qiagen, Hilden
GeneRuler Express (DNA Ladder 100-5000 bp)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merk, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Turbofect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon Rot
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Severin, Schweiz
HD-Green	INTAS, Göttingen, Deutschland
Kaliumacetat	Merk, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merk, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Merk, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München
NP-40	Sigma-Aldrich, München
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Kollagen Typ I (Ratte)	Sigma-Aldrich, München
Dexamethason	Sigma-Aldrich, München
Tissue-Tek® O.C.T	Sakura Finetek, Umkirch
Hämatoxylin Lösung Gill No.2	Sigma-Aldrich, München
Eosin Y Lösung	Sigma-Aldrich, München
Roticlear®	Roth, Karlsruhe
Roti®-Mount	Roth, Karlsruhe
ProLong™ Gold antifade reagent	Invitrogen AG, Carlsbad

3.3 Antibiotika

Tabelle 3 Antibiotika

Name und Stammkonzentration	Company
Ampicilin 100 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin B 100 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin 10.000 U	Genaxxon, Ulm
Puromycin 1 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe

3.4 Zellkultur

Tabelle 4 Material für die Zellkultur

Name	Firma
DMEM	Life Technologies, Darmstadt
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco, Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Penicilin/Streptomycin	Genaxxon Bioscience, Ulm
Expi293F Medium	Thermo Scientific, Waltham, USA
ExpiCHO-S Medium	Thermo Scientific, Waltham, USA
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Sigma Aldrich

Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, München
Trypsin	
Williams Medium E	Gibco, Thermo Scientific, St. Leon-Rot

3.5 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 5 Verwendete Zelllinien und Bakterien

Name	Zellart/ Kurzbeschreibung	Herkunft
Ba/F3	Eukaryotisch, murine pro B-Zelllinie, suspension	Immunex, Seattle, USA (Gearing <i>et al.</i> , 1994)
Ba/F3-gp130 (und diverse stabil transduzierten Zelllinien mit verschiedenen Rezeptoren der IL-6-Familie, basierend auf Ba/F3-gp130)	Eukaryotisch, modifizierte murine pro B-Zelllinie, suspension	AG Scheller, Institut für Biochemie und molekular Biologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Expi293F™	Eukaryotisch, modifizierte HEK293 Zellen zur erhöhten Proteinexpression, suspension	Gibco, ThermoFisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad
Expi CHO-S™	Eukaryotisch, modifizierte CHO Zellen zur erhöhten Proteinexpression, suspension	Gibco, ThermoFisher Scientific, Life Technologies Corporation, Carlsbad
Bakterienstamm <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue (endA1 gyrA96(naIR) thi-1 recA1 lac glnV44 F' [: TN10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+))	Prokaryotisch, Laborsicherheitsstamm von <i>E. coli</i> , geeignet zur Amplifikation und Klonierung von Plasmid-DNA	Agilent Technologies, Waldbronn

3.6 Plasmide

Tabelle 6 Übersicht verwendeter Plasmide

Name		Herkunft
pcDNA3.1	Invitrogen, Darmstadt	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IL-6-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IL-6-RFPFc	AG Müller-Newen, RWTH Aachen	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-HIL-6-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-HIL-11-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-cHIL-6-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IL-6-KTRL-ts	Biocat/AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IC-7Fc	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IC-7-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-SIL-6Fc	Biocat/AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-SIC-7Fc	Biocat/AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-SIL-6-ts	Biocat/AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-SIC-7-ts	Biocat/AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IL-6-K53D-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IL-6-E68A-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IL-6-E68V-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-IL-6-E171A-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin

pcDNA3.1-IL-6-S175A-ts	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-MIL-6 -ts	Biocat/AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1-HIL-11Fc	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin

3.7 Primersequenzen

Tabelle 7 Verwendete Oligonukleotide

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')
IL-6-K53D fw	CGAGAGCAGCGACGAGGCCCTGG
IL-6 K53D rev	CACATGTTGCTCTTGTTGCAG
IL-6-E68V fw	AAGATGGCCGTGAAGGACGGCT
IL-6-E68V rev	CACATGTTGCTCTTGTTGCAG
IL-6-E171A fw	AGCTTCAAGGCGTTTCTGCAGAGC
IL-6-E171A rev	CCGCAGGATCAGGTGGGTGG
IL-6-S175A fw	GTTTCTGCAGGCCAGCCTGAGGGCC
IL-6-S175A rev	TCCTTGAAGCTCCGCAGG

3.8 Zytokine und Rezeptoren

Tabelle 8 Verwendete Zytokine der IL-6 Familie

Zytokin	Herkunft
Human IL-6Fc und IL-6-ts	AG Scheller
Human IL-11-ts	AG Scheller

IL-6-RFPFc	AG Scheller/AG Müller Newen (RWTH Aachen)
Humaner löslicher IL-11R-his	R&D, #8895-MR
Humaner löslicher IL-6R-his	R&D, #10537-SR
IC7Fc und IC7-ts	AG Scheller
Murines IL-6-ts	AG Scheller
Murines IL-11-ts	AG Scheller
Hyper IL-6-ts (HIL-6-ts) und HIL-6Fc	AG Scheller
Hyper IL-11-ts (HIL-11-ts) und HIL-11Fc	AG Scheller
Hyper chimäres IL-6-ts (HIL-6:IL-11R-ts, cHIL-6-ts)	AG Scheller
sgp130Fc	AG Scheller
Human IL-6-KTRL-ts	AG Scheller
Human IL-6-IRA-KDFc (SIL-6Fc) und SIL-6-ts	AG Scheller
IC7-IRA-KDFc (SIC7Fc) und SIC7-ts	AG Scheller
Human IL-6-K53D-ts	AG Scheller
Human IL-6-E68V-ts	AG Scheller
Human IL-6-E171A-ts	AG Scheller
Human IL-6-S175A-ts	AG Scheller
Human MIL-6-ts	AG Scheller

3.8 Antikörper

Tabelle 9 Verwendete Antikörper

Antikörper	Cat. #	Firma
Tocilizumab (monoklonaler IL-6R Antikörper) (ACTEMRA/RoACTEMRA®)	10219525	Roche, Basel, Schweiz
Anti muriner IL-11R Antikörper	#AF490	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Anti STAT3 (Klon 124H6)	9139S	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti phosphoryliertes STAT3 (Tyr705) (Klon D3A7)	9145S	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti ERK1/2 (Klon L34F12)	4696S	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti phosphoryliertes ERK1/2 (Thr202/Tyr204) (Klon D13.14.4E)	9106S	Cell Signaling Technology, Frankfurt
Anti-human-FcPOD	31423	Invitrogen AG, Carlsbad
StrepMAB-Classic HRP	2-1509-001	IBA Lifesciences GmbH, Göttingen
Anti γ -tubulin (Klon GTU-88)	T5326	Merck, Darmstadt
Anti-Phospho Histone H3 (PH3) (Ser10)	06-570	Merck, Darmstadt
Anti-Kaninchen AlexaFluor™488	A21206	Invitrogen AG, Carlsbad

3.9 Puffer und Lösungen

Tabelle 10 Puffer und Lösungen

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
PBS (10x), Phosphate buffered saline	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl pH 7,4
10x Standard Restriktionspuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
10x T4 DNA Ligasepuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% (w/v) APS
TAE Puffer (Tris-Acetat-EDTA)	0,4 M Tris-HCl (pH 8,8) 0,01 M EDTA 0,2 M Essigsäure
Agarose (1%)	4 g Agarose auf 400 mL TAE
Trypsin/EDTA Lösung	1:10 Trypsin/EDTA (10x) in PBS
Lösung 1 (S1) für DNA-Minipräparation	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) 1:1.000 RNase in H ₂ O
Lösung 2 (S2) für DNA-Minipräparation	200 mM NaOH 1% SDS
Lösung 3 (S3) für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat 11,5% (v/v) Essigsäure
SDS-PAGE Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, (pH 8,8)

SDS-PAGE Laufpuffer	0,4 M Tris-HCl, (pH 8,25) 0,1 M Glycin 0,1% SDS
Lämmli-Puffer (SDS-PAGE Probenpuffer) (6x)	375 mM Tris-HCl (pH 6,8) 9% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 9% β -Mercaptoethanol 0,03% (w/v) Bromphenol Blau
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, (pH 8,0) 2 M Glycerin 0,01% (w/v) SDS 5% (v/v) Methanol
TBS (10x), tris buffered saline	5 M NaCl 200 mM Tris-HCL, (pH 7,5)
TBS-T	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, (pH 7,5) 0,05% (v/v) Tween20
Western Blot blocking Puffer Milch-TBST (M-TBST)	5% Milchpulver in TBS-T
Western Blot blocking Puffer BSA-TBST (B-TBST)	5% BSA in TBS-T
Wester Blot blocking Puffer Licor, Blockierlösung Intercept TBS	Li-Cor Biosciences GmbH
Coomassie-Färbelösung	35% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Eisessig 0,3% (w/v) Coomassie G250
Coomassie-Entfärbelösung	35% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Eisessig

Citratpuffer pH 3,2	7,1 mM Natriumcitratdihydrat 42,9 mM Zitronensäure
Citratpuffer pH 5,5	35,2 mM Natriumcitratdihydrat 14,8 mM Zitronensäure
Puffer W	100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer BXT	100 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Biotin
Puffer XT-R	3 M MgCl ₂
PBS p20	PBS 0.05% (v/v) surfactant P20
PBS p20 EDTA	PBS 0.05% (v/v) surfactant P20 50 µM EDTA
NTA Regenerationspuffer	dH ₂ O 350 mM EDTA
NTA Waschpuffer	dH ₂ O 3 mM EDTA
NTA Nickelpuffer	dH ₂ O 0,5 mM NiCl ₂
JAK2 Lyse Puffer (Zellkulturlysate)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 10 mM MgCl ₂ 1 mM Na ₃ VO ₄

	0,5% NP-40 1 Tablette Proteaseinhibitor (Roche) pro 50 ml Puffer
pSTAT3 Lyse Puffer (für Organlysate)	50 mM Tris HCl (pH7,5) 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1% NP-40 1% Triton X100 1mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1 Tablette Proteaseinhibitor (Roche) pro 50 ml Puffer
PH1 Medium (Primäre Hepatozytenisolation)	Williams Medium E 10% FCS 100 nM Dexamethason 2 mM L-Glutamin 1% Penicilin/Streptomycin
PH2 Medium (Primäre Hepatozytenisolation)	Williams Medium E 100 nM Dexamethason 2 mM L-Glutamin 1% Penicilin/Streptomycin
PH3 (Primäre Hepatozytenisolation)	Williams Medium E 2 mM L-Glutamin 1% Penicilin/Streptomycin

3.10 Kits

Tabelle 11 Verwendete Labor-Kits

Name	Firma/Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Celltiter Blue	Promega GmbH, Mannheim
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NuceloBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren Deutschland
Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit	New England Biolabs®
In situ cell death detection Kit (TUNEL)	Roche, Grenzach-Wyhlen

3.11 Geräte

Tabelle 12 Labor-Geräte und -Maschinen

Name	Firma/Hersteller
Analysewaage Precisia 100M-300C	Precisia, Hartenstein
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
Automatischer Zellzähler TC10	Bio-Rad, München
ÄKTA Start	GE Healthcare, Chicago
CO ₂ -Inkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Gefrierschrank Forma 900	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Kulturschüttler Multiron HT	INFORS GmbH, Einsbach
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrüher mit Heizung	Heidolph Instr. GmbH, Schwabach
Mikropipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop (Floureszenz), BZ-9000	Keyence, Neu-Isenburg
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krupps), Offenbach
Minizentrifuge	Axon, Kaiserslautern
NanoDrop ND-1.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
PCR Thermocycler peqStar	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	Sartorius, Ratingen

Akku-Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann, Eberstadt
Schwingmühle MM 400 (Organ Homogenisator)	Retsch, Haan
Spotchem EZ SP-4430	Arkray, Amstelveen
Sterilbank	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Bovenden
Tischzenrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot TurboTM	Bio-Rad, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld

3.12 Software

Tabelle 13 Software und Programme

Name	Firma/Hersteller
Microsoft Office 2016	Microsoft
SnapGene® 3.2.1	Dotmatics
Chimera 1.15	Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics (RBVI) at the University of California, San Francisco
Äkta Start / Unicorn™ Start 1.0	Cytiva
Tecan i-Control™ Version 3.9.1.0	Tecan
Image Studio Lite V. 5.2	LI-COR Biosciences
Biacore X100 Control Software	Cytiva
Biacore X100 Evaluation Software	Cytiva
GraphPad Prism 8.0.2	Dotmatics
bioRender	bioRender

4. Methoden

4.1 Zellkultur

4.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die allgemeine Zellkultur (diverse modifizierte Ba/F3 Zelllinien) wurden unter konstanten 37°C mit 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in 10 cm Petrischalen mit 10 ml DMEM^{+/+} (DMEM Medium mit 10% FCS und 1% Penicilin/Streptomycin) durchgeführt. Ba/F3 und Ba/F3-gp130 basierende Zelllinien (inkl. diverser Rezeptorkombinationen) wurden zudem mit 0,2% konditioniertem IL-3 Überstand bzw. 0,2% konditioniertem HIL-6 kultiviert. Beim Erreichen einer Konfluenz in der Kulturschale wurde ein Teil der Zellsuspension in eine neue Petrischale überführt und mit frischem Kulturmedium DMEM^{+/+} sowie entsprechenden Zytokinen und Antibiotika supplementiert.

Die Expressionszelllinien Expi293FTM und ExpiCHO-STM von Thermo Fisher Scientific wurden bei 37°C, mit 8% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in Expi293TM Expressionsmedium bzw. ExpiCHOTM Expressionsmedium und konstantem Schütteln (125 rpm, 19 mm Schütteldurchmesser) in 125 ml Einweggerlenmeyerkolben kultiviert. Die Subkultivierung, Kryokonservierung sowie transiente Transfektionen zur Expression von Proteinen erfolgten nach Angabe des Herstellers.

4.1.2 Zellen waschen

Zur Versuchsvorbereitung und beim Auftauen von kryokonservierten Zellen wurden die diversen Ba/F3 Zelllinien mit PBS (*phosphate buffered saline*) oder mit DMEM^{+/+} Medium verdünnt und mit 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert (häufig bezeichnet, als „waschen“ von Zellen), um mögliche Zelltrümmer und das Einfriermedium von den Zellen zu trennen. Je nach Anforderung wurden diese Waschschrte mehrfach wiederholt.

4.1.3 Zellzahlbestimmung

Nach dem Waschen von Zellen durch Zentrifugation (s. 4.1.2) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in PBS oder Medium resuspendiert. 10 µl wurden als Stichprobe in einer 1:1 Verdünnung mit *Trypan Blue dye* 0.4% gemischt und 10 µl daraus wurde in ein *cell counting slide* pipettiert. Mittels des Zellzählers TC10 wurde so die totale Zellzahl, sowie die lebenden Zellen und die Viabilität der Zellen ermittelt.

4.1.4 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für eine mögliche Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff (-196°C) wurden Zellen zunächst einmal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde sodann in FBS + 10% DMSO resuspendiert und in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt. Langsames Abkühlen der Zellen erfolgte zunächst im MrFrosty mit Isopropanol im -80°C Gefrierschrank (-1°C/min). Nach frühestens 24 Stunden wurden die Zellen dann in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt und aufbewahrt.

Zum Auftauen von Zellen, wurde ein Wasserbad und Kultur-Medium auf 37°C vorgewärmt. Die Kryoröhrchen wurden dann so lange im Wasserbad aufgewärmt und sobald die Probe aufgetaut war, wurde sie schnellstmöglich mit Medium verdünnt. Die Zellen wurden sofort durch Zentrifugieren einmal gewaschen, um die Zellen vom DMSO-haltigen Medium zu trennen. Das Zellpellet wurde anschließend in Medium gelöst und in einer 10 cm Petrischale ausgesät.

4.2 Biochemische und molekular biologische Methoden

4.2.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen mittels NanoDrop

Die Konzentration von Nukleinsäuren sowie Proteinen wurde mit einem NanoDrop 2000 bestimmt. DNA Lösungen wurden bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Aus dem Quotienten der Absorptionen bei A260/A280 kann die Reinheit der Probe bestimmt werden, diese sollte dabei über 1,8 liegen. Für Proteine wird bei der Konzentrationsbestimmung die Absorptionsmessung bei 280 nm Wellenlänge verwendet. Bei dieser Wellenlänge absorbieren die aromatischen Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Die Konzentration wurde mit dem Absorptionwert A280 mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet:

$$\text{Konzentraion} \frac{mg}{ml} = \frac{A280}{\epsilon(M - 1cm - 1)} \times 1(cm) \times \text{Molekulargewicht (Da)}$$

Alternativ kann die Konzentration unter Angabe von Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten auch direkt am Gerät abgelesen werden. Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten wurden anhand der Plasmidkarte/ Aminosäuresequenz und unter Verwendung des online-tools ExPasy ProtParam tool bestimmt (<https://web.expasy.org/protparam/>, basierend auf E. Gasteiger *et al.*, Protein Identification and Analysis Tools on the Expasy Server, 2005).

4.2.2 Spaltung von Plasmid-DNA mittels Restriktionsenzymen

Um Plasmid-DNA zu schneiden, um etwaige Fragmente isolieren oder auszutauschen zu können zwecks Klonierungsarbeiten, wurden Restriktionen mittels Restriktionsenzymen durchgeführt. Restriktionsenzyme haben spezifische Erkennungssequenzen (meist 4-6 Basenpaare) innerhalb eines DNA-Doppelstrangs. Bei der Spaltung hydrolysieren sie Phosphodiesterbindungen, wodurch je nach Restriktionsenzym entweder DNA-Doppelstränge ohne Überhang (*blunt end*) oder mit Überhang (*sticky end*). Die Restriktion erfolgt mit 10 U des benötigten Enzyms sowie mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Der Restriktionsansatz wurde für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. In Abhängigkeit des Vorhabens wurden unterschiedliche Mengen von DNA geschnitten und auf ein Agarosegel zur Gelelektrophorese aufgetragen. Zur Schnittstellenüberprüfung einer bereits durchgeführten Klonierung, wurde eine DNA-Menge von 3-5 µg verwendet. Für eine Klonierung bei der die DNA-Fragmente noch verwendet werden müssen, sprich aus dem Gel isoliert und aufgereinigt werden müssen, wurde ein Ansatz von 30-50 µg gewählt. Für eine Gelelektrophorese wurden die Restriktionsansätze mit 6x loading dye vermengt.

4.2.3 DNA-Gelelektrophorese und DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Für eine Gelelektrophorese zur Größentrennung von DNA wurden Agarosegele (meist 1% Agarose in TAE-Puffer) verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde HD Green der noch flüssigen Agarose zugemischt. Der Farbstoff interkaliert in die DNA und macht sie so unter Einstrahlung von UV-Licht sichtbar. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurden die Proben in die Geltaschen geladen und die DNA-Fragmente durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Länge an Basenpaaren nach voneinander getrennt. Da die negativ geladene DNA zur Anode wandert, wirkt das Agarosegel wie ein molekulares Sieb. Dadurch wandern kleinere DNA-Fragmente schneller zur Anode als größere. Zur ungefähren Größenzuordnung der DNA-Fragmente wurde ein DNA-Marker mit definiertem Bandenmuster als Referenz mit aufgetragen (GeneRule Express DNA Ladder, ThermoFischer). Die fertige Größentrennung wurde mittels Geldokumentationssystem INTAS (Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

4.2.4 Dephosphorylierung von geschnittener Plasmid DNA

Da linearisierte Plasmid-DNA auch re-ligieren kann wurde zur Vermeidung dessen nach der Restriktionsspaltung das 5'-Ende der linearisierten DNA dephosphoryliert. Dazu wurde der fertige Restriktionsansatz nach dem NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit gereinigt, um die Restriktionsenzyme mit dem entsprechenden Puffer zu entfernen. Im Anschluss wurde die DNA mit 1 U FastAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham) für 1 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss nochmals gereinigt. Die Dephosphorylierung wurde nur bei *blunt end* geschnittenen Vektoren durchgeführt.

4.2.5 Ligation von linearen DNA-Fragmenten

Wenn zwei isolierte DNA Fragmente, ein Plasmid/ Vektor-DNA „*backbone*“ mit einem zusätzlichen Gen „*gene of interest*“ wieder miteinander verbunden werden sollten (Ligierung einer linearisierten DNA zu einem ringförmigen Plasmid), wurden diese miteinander ligiert. Dazu wurde das Enzym Ligase verwendet, welches kompatible DNA Überhänge, also *blunt ends* oder komplementär passende *sticky ends* durch Bildung einer Phosphodiesterbindung miteinander verbindet. 100 ng Vektor-DNA wurden mit dem *insert* in einem molaren Überschuss (1:7 Verhältnis) in einem Ansatz mit T4-Ligasepuffer, PEG4000 und der T4-Ligase (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) für 2 Stunden bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

4.2.6 Transformation von Plasmid DNA in chemisch kompetente *Escherichia coli* Bakterien

Zur Amplifikation, also zur Gewinnung von größeren Mengen von Plasmid-DNA, wurden chemisch kompetente *E. coli* (XL-1 blue) verwendet. Diese wurden nach Ihrer Präparation bei -80°C gelagert. Zur Transformation der kompetenten Zellen, wurden diese 5 Minuten auf Eis aufgetaut, dann wurde die DNA die zu amplifizieren gilt, hinzu pipettiert und weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Für eine Retransformation von bestehenden Plasmiden wurden nur 0,5 µl der Plasmid-DNA den *E. coli* zugegeben, für einen neuen Ligationsansatz hingegen wurden 10 µl verwendet. Anschließend wurden die *E. coli* für einen Hitzeschock für eine Minute bei 42°C gehalten. Darauffolgend wurden die *E. coli* erneut für 5 Minuten auf Eis inkubiert, und anschließend mit 500 µl antibiotika-freiem LB-Medium versetzt. Zur Regeneration wurden die *E. coli* für eine Stunde bei 37°C und 1000 rpm inkubiert. Bei den Transformationen in dieser

Arbeit wurde zur Selektion nur eine Ampicilin-Resistenz genutzt. Diese Resistenz wurde nur dann ausgebildet, wenn die *E. coli* auch die Plasmid-DNA bei der Transformation aufgenommen haben, da das Resistenzgen für Ampicilin auf den eingebrachten pcDNA3.1 Vektoren liegt. Nach der Regeneration wurde die Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten mit Ampicilin ausplattiert und über Nacht bei 37°C in Kultur gehalten. Aus den angewachsenen Kolonien wurden einzelne Klone (genauer: *colony forming units*, CFU) gepickt, um eine Kultur in 1,8 ml LB-Medium mit Antibiotika anzuimpfen. Für die Kultivierung einer solchen Kultur wurde ein Loch in den Deckel eines 2 ml Reaktionsgefäßes gestanzt und die Kultur bei 1000 rpm bei 37°C geschüttelt, um einen relativen Sauerstoffeintrag für die Kultur bei Inkubation über Nacht zu gewährleisten. Diese Kultur wurde dann am darauf folgenden Tag für eine Plasmidpräparation verwendet, um das gewünschte Plasmid durch PCR, Restriktionsenzym basierten Bandenmuster oder Sequenzierung zu charakterisieren. Um mit der richtigen CFU direkt eine größere Kultur animpfen zu können, wurden vor der Plasmidpräparation ca. 100 µl der Bakteriensuspension zurückgehalten und vorübergehend bei 4°C gelagert.

4.2.7 Mini-Präparation (Isolation) von Plasmid DNA

Für die Plasmid-Präparation im Mini-Maßstab einer 2 ml Kultur, wurde die Bakteriensuspension zunächst bei 15.000 x g für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend mit 100 µl kaltem S1-Puffer resuspendiert. Hierbei wurde durch eine alkalische Lyse die Plasmid-DNA aus den Bakterien gelöst. Anschließend wurden 200 µl S2-Puffer hinzugefügt und das Reaktionsgefäß invertiert. Zuletzt wurde 150 µl kalter S3-Puffer hinzugefügt und erneut invertiert. Durch letzteren Puffer wurde die Lyse der Bakterien neutralisiert. Durch Zentrifugation bei 17.000 x g für 10 Minuten bei 4°C wurden dann Zelltrümmer, denaturierte Proteine sowie chromosomale DNA vom restlichen Lysat mit der Plasmid-DNA getrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl eiskaltem 100%igen Ethanol gemischt. Eine 5-minütige Inkubation auf Eis wurde eingehalten, um die Präzipitation der DNA zu verbessern. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation bei 17.000 x g für 15 Minuten bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet erneut mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Dazu wurde die Probe erneut mit 17.000 x g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der ethanolhaltige Überstand wurde entfernt und das Pellet für 5 bis 10 Minuten luftgetrocknet. Zuletzt wurde das

Pellet der Plasmid-DNA in dest. H₂O gelöst. Mittels NanoDrop wurde dann die Plasmidkonzentration bestimmt (siehe 4.2.1).

4.2.8 Midi-Präparation (Isolation) von Plasmid DNA

Für eine größere Ausbeute an Plasmid-DNA durch DNA-Präparation wurden Midi-Kulturen mit 100 bis 150 ml LB-Medium inklusive Antibiotikum (hier: Ampicilin) angeimpft und über Nacht bei 37°C und mit 150 rpm schüttelnd in Kultur gehalten. Die *E. coli* Kultur wurde dann durch mehrmaliges Zentrifugieren bei 4.000 x g, 10 Minuten, 4°C in einem 50 ml Reaktionsgefäß geerntet. Unter Verwendung des *NucleoBond Xtra Midi Kit* wurde sodann die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert und nach Herstellerangaben gereinigt. Zuletzt wurde das Pellet der Plasmid-DNA in dest. H₂O gelöst. Mittels NanoDrop wurde dann die Plasmidkonzentration bestimmt (siehe 4.2.1).

4.2.9 Sequenzierung von Plasmid DNA

Zur Überprüfung von Klonierungen wurde die Plasmid-DNA eingeschickt und extern von der Firma Microsynth Seqlab (Göttingen, Deutschland) sequenziert. Die Proben wurden hierfür mit den dafür vorgesehenen Oligonukleotiden versetzt, oder mit dem Angebot seitens des Anbieters die passenden Primer aus dem angebotenen Repertoire zu verwenden, beauftragt.

4.2.10 Proteinexpression in Expressionszelllinien

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die Expressionszelllinien Expi293F™ und ExpiCHO-S™ (ThermoFisher Scientific) verwendet. Diese Zelllinien sind vom Hersteller modifizierte HEK293 bzw. CHO Zelllinien. Anders als die herkömmlichen HEK293 und CHO Zellen, sind sie nicht adhärent, sondern befinden sich innerhalb des Mediums in Suspension und können dadurch in einem Schüttelkolben zu einer hohen Zelldichte kultiviert werden. Diese beiden Zelllinien haben darüber hinaus die Eigenschaft zur erhöhten Proteinexpression bei transienter Expression. Hierbei wurde für die entsprechenden Expi-Zelllinien angepasstes Medium, Expi293™ Expressionmedium und ExpiCHO™ Expressionmedium verwendet. Für die Transfektionen wurden das *ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit* und *ExpiFectamine™ CHO Transfection Kit* sowie *OptiPRO™ SFM Complexation Medium* verwendet. Für die Kultivierung und Transfektion mit Plasmid-DNA wurden die Zellen nach dem Protokoll des

Herstellers behandelt. Die Expression von Proteinen wurde nach 7-10 Tagen nach Transfektion beendet. Hierbei wurde das exprimierte und sezernierte Protein im Zellkulturmedium durch Zentrifugation mit zunächst mit 450 x g für 5 Minuten geerntet, anschließend wurde der Überstand erneut mit 4000 x g für 20 Minuten zentrifugiert, um möglichst alle Zellen von Medium zu trennen. Zuletzt wurde die Probe direkt weiterverwendet oder bei -80°C gelagert. Vor der weiteren Prozessierung wurde der Überstand noch durch einen Spritzenfilter mit einer Filterporengröße von 0,45 µm filtriert, um eine zusätzliche Abtrennung von Zellen und Zelltrümmer zu gewährleisten. Anschließend konnte der Überstand zur Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie verwendet werden.

4.2.11 Affinitätschromatographie zur Proteinreinigung

Die Überstände aus den abzentrifugierten Expi-Kulturen enthielten neben dem exprimierten rekombinanten Proteinen auch zahlreiche andere Proteine. Um das gewünschte, zur Expression gebrachte Protein, in einer weitestgehend reinen Form zu erhalten, wurden diese mit einem Proteintag zur Reinigung versehen. Hierbei wurden ein Fc- oder Twin-Strep-Tag[®] verwendet. Die Sequenzen für diese *tags* wurden in der Plasmid-DNA an die Sequenz für das gewünschte Protein gekoppelt und somit wird der *tag* mit exprimiert. Nach der Expressionskultur können die rekombinanten Proteine dann mittels Affinitätschromatographie mit einer entsprechenden Säule für den jeweiligen *tag* gereinigt werden. Hierzu wurde das System Äkta Start (GE Healthcare, Chiago, USA) verwendet.

4.2.11.1 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie mittels Protein A

Für Proteine mit einem Fc-tag wurde eine HiTrap MabSelect Prisma (Cytivia, USA) verwendet. Die Säule ist mit einem Säulenbett versehen indem sich Protein A befindet. Protein A stammt aus *Staphylococcus aureus* und stellt im eigentlichen Sinne einen Pathogenitätsfaktor dar. Protein A bindet spezifisch und pH-abhängig IgG-Fc. Nach äquilibrieren der Säule mit PBS bei 1 ml/min wurde die Probe, sprich der zentrifugierte Kulturüberstand, über die Säule laufen gelassen mit einer Flussrate von 1 ml/min. Proteine mit Fc-tag verweilten im Säulenbett da sie an das Protein A in der Säulenmatrix binden, alle anderen Proteine in der Probe flossen hindurch. Anschließend wurde die Säule mit 20fachem Säulenvolumen mit PBS gewaschen damit auch unspezifisch verbliebene Protein in der Säule ausgewaschen werden. Die Elution des gewünschten Proteins erfolgte dann in einem

zweistufigem Verfahren. Hierbei wurde der Laufpuffer im System umgestellt, zuerst auf einen Citratpuffer mit pH 5,5 und anschließend mit pH 3,2. Durch Absenkung des pH-Werts löste sich das Protein mit dem Fc-tag wieder vom Protein A in der Säule und das Protein wurde freigegeben, sodass es in einem Reaktionsgefäß aufgefangen werden konnte. Um das Protein nicht zulange in einem negativen pH zu belassen, wurde das Eluat mit Tris Puffer (pH 10,5) auf einen neutralen pH-Wert (ca. pH 7) gebracht. Die verwendete Säule wurde mit dest. H₂O gewaschen und anschließen mit 15fachem Säulenvolumen mit 0,5 M NaOH regeneriert, um sämtliche übrigen Proteine von der Säule zu lösen. Anschließend wurde die Säule wieder neutral äquilibriert mit dest. H₂O und PBS bevor sie mit 20% Ethanol konserviert wurde und aus dem Chromatographiesystem ausgebaut und bei 4°C gelagert werden konnte. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde mittels NanoDrop bestimmt. Im weiten Verlauf wurden die Elutionsfraktionen, die das Protein enthalten, in einer Zentrifugenterröhreneinheit (Amicon Ultra Membran, Merk, Darmstadt, Deutschland) konzentriert. Hierbei wurde ein Filter verwendet dessen Porengröße (in Dalton) kleiner ist als das gewünschte Protein. Der Citratpuffer konnte so durch Zentrifugation bei 4000 rpm bei 4°C durch den Filter entweichen und die Probe wurde in ihrem Volumen reduziert. Je nach Ausgangsvolumen wurde hierbei unterschiedlich lang zentrifugiert, bis die Probe ein Volumen von 2,5 ml erreicht hat. Die darauffolgende Pufferung wurde mittels einer NAP-25 Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) durchgeführt. Dabei wurde die Probe in PBS gepuffert und in einem Volumen von 3,5 ml aus der NAP-25 Säule eluiert. Nach erneuter Konzentrationsbestimmung wurde das gereinigte Protein aliquotiert und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff anschließend bei -80°C aufbewahrt, oder für weitere Analysen und Experimente eingesetzt.

4.2.11.2 Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie mittels StrepTactinXT

Die Proteinreinigung mittels Twin-Strep-Tag[®] wies einen ähnlichen Ablauf zur in 4.2.11.1 beschriebenen Methode zur Proteinreinigung auf. Hierbei wurde allerdings die Interaktion von Streptavidin und Biotin als Funktionsprinzip für die Affinitätschromatographie genutzt. Die Peptidsequenz des Twin-Strep-Tags[®] SA-WSHPQFEK-(GGGS)₂-GGSA-WSHPQFEK geht dabei eine Bindung mit der Strep-Tactin Säulenmatrix der StrepTactin[®] XP Flow[®]- Säule (IBA-Lifesciences, Göttingen) ein, was der Interaktion von Biotin zu Steptavidin ähnelt. Nach dem Einbau der Säule wurde diese mit dem Laufpuffer Puffer W äquilibriert. Nach dem Beladen der Säule mit dem Kulturüberstand wurde die Säule erneut mit Puffer W gewaschen um den Anteil an unspezifisch gebundenen Proteine zu reduzieren. Mittels Biotin im

Elutionspuffer BXT wurde das Twin-Strep-Tag® Protein von der Säule abgelöst, da Biotin eine noch höhere Affinität zur Strep-Tactin Säulenmatrix aufweist als der Twin-Strep-Tag®. Im Gegensatz zur Protein A Reinigung wurde hier kein saurer pH benötigt und somit musste das Eluat auch nicht mit Tris-Puffer neutralisiert werden. Nach der Benutzung wurde die Säule mit dem Regenerationspuffer XTR regeneriert, anschließend wieder mit Puffer W gewaschen und dann mit 20% Ethanol konserviert zur Lagerung bei 4°C. Die Proteinkonzentration wurde dann am NanoDrop bestimmt, bevor das Protein wie in 4.2.11.1 auch konzentriert und in PBS gepuffert wurde. Anschließend wurde das gereinigte und gepufferte Protein wieder aliquotiert, schockgefroren in flüssigem Stickstoff und bei -80°C aufbewahrt oder weiterverwendet für andere Verfahren.

4.3 Zellbiologische Methoden und Experimente zur Proteinanalyse

4.3.1 Proliferationsassay

Zum Testen von gereinigten rekombinanten Proteinen auf ihre biologische Aktivität oder ob ein bestimmtes Zytokin auf einer gewählten Zelllinie eine Reaktion hervorruft, wurde im Rahmen dieser Arbeit die induzierte Proliferation analysiert. Aufgrund des Vorhandenseins diverser Rezeptorkombinationen der IL-6-Familie wird unter passender Signaltransduktion eine Proliferation der Ba/F3 Zelllinien ausgelöst. Die Auswertung des Proliferationsassays in dieser Arbeit beruhte auf der enzymatischen Umsetzung des im CellTiter-Blue enthaltenden Resazurins zum fluoreszierenden Resorufin. Die Reaktion wurde durch metabolisch aktive Zellen hervorgerufen und dadurch korrelierte die resultierende Fluoreszenzintensität mit der Anzahl der Zellen. Zu Beginn des Assays wurde eine Kulturschale von der gewählten Zelllinie drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend gezählt. Beim Anlegen dieser Kulturschale in den Tagen vor dem Assay, wurde ebenfalls ein Kontrollkulturschale mitangesetzt, welche ohne dem Zytokin angesetzt wurde, mit dem die Zelllinie in Kultur gehalten werden würde. Dies diente zur Überprüfung, ob die Zellen nicht entartet sind und bereits ohne Stimulus wachsen. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese auf eine Zelldichte von 50.000 Zellen/ml in DMEM^{+/+} Medium verdünnt. Anschließend wurden die Zellen für die gewünschten Konditionen mit den entsprechenden Konzentrationen an Zytokinen und/oder Inhibitoren versetzt. Hierbei wurden wahlweise entweder einzeln festgelegte Konditionen angesetzt oder eine Verdünnungsreihe in 1:2 oder 1:3 Verdünnungsschritten angelegt. Durch Letzteres kann im Anschluss des Assays ein EC50 Wert ermittelt werden, welcher die mittlere effektive

(Wirk-) Konzentration (50%) beschreibt. Dieser Wert kann als Maß für die Effektivität oder wie responsiv die Zellen auf verschiedene Zytokine reagieren in Betracht gezogen werden. Für Proliferationsassays mit einem Inhibitor kann so entsprechend für diesen auch eine mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) ermittelt werden. Der Proliferationsassay wurde stets mit technischen Triplikaten mit 100 µl Volumen je Kondition in einer 96-well Platte angesetzt. Für das Wachstum der Proben wurde eine Inkubation von 72 Stunden im Zellkulturinkubator eingehalten. Am dritten Tag erfolgte dann die Messung. Hierbei wurden je 20 µl der CellTiter-Blue Lösung pipettiert. Die Platte wurde sodann zum Zeitpunkt 0 Minuten am Fluorometer Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf) mit 560 nm gemessen. Anschließend wurde die Platte alle 20 Minuten erneut gemessen über einen Gesamtzeitraum von 120 Minuten. Zur Auswertung wurden von den Werten der Messung zum letzten Zeitpunkt die Werte aus der Messung zum Zeitpunkt 0 subtrahiert.

4.3.2 Stimulationsassay

4.3.2.1 Stimulation der Zellen

Als weitere Methode, um die biologische Aktivität von rekombinanten Proteinen zu testen bzw. die Aktivierung von Zellen oder ob bestimmte Zelllinien überhaupt responsiv auf diese Proteine reagieren, wurde ein Stimulationsassay zur Untersuchung der Signaltransduktion durchgeführt. Als Analyseverfahren der Signaltransduktion wurde hier der Western Blot verwendet. Vor Beginn der Stimulation wurde die gewünschte Zelllinie in höherem Maßstab kultiviert um genügend Ausgangsmaterial, also der Menge an Zellen, zu erhalten. Eine voll gewachsene 10 cm Petrischale wurde hier pro Kondition, mit der später stimuliert werden sollte, benötigt. Die entsprechende Menge wurde bei mehreren Konditionen auch in T175 Zellkulturflaschen angelegt. Zu Beginn des Experiments wurden die Zellen fünf Mal mit PBS gewaschen, um jegliche Wachstumsfaktoren oder beeinflussende Bestandteile im Medium (z.B. FCS und Zytokine zur Kultivierung) von den Zellen zu trennen. Damit die Zellen ihre restliche Aktivität aus der angelegten Kultur auch weitestgehend reduzieren, wurden die Zellen zunächst in serumfreien DMEM Medium gelöst und für mind. vier Stunden im Inkubator inkubiert (*starving* der Zellen). Gegen Ende des *starvings* wurden die Konditionen zur Stimulation vorbereitet. Vorbereitet wurden diese mit DMEM Medium und der Zugabe der entsprechend vorgesehenen Konzentrationen an Zytokinen/Inhibitoren in einem Volumen von 500-1000 µl in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Für die Stimulation wurden die Zellen dann gleichmäßig auf

1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, mit 450 x g für 5 Minuten zentrifugiert und anschließend mit dem entsprechend vorbereitetem Medium zur Stimulation gelöst. Für die Stimulation wurden die Zellen für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 450 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren, für ein direktes Abstoppen der Zellaktivität. Anschließend wurden die Zellen bei -20°C gelagert bis sie zur Weiterverarbeitung lysiert wurden.

4.3.2.2. Lyse der Zellen, Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Lyse (Aufschluss der Zellmembran) der eingefrorenen Zellpellets aus der vorherigen Stimulation erfolgte mittels JAK-Lysepuffer. In Abhängigkeit von der Größe der Zellpellets wurden 100-200 µL Lysepuffer pro Zellpellet verwendet. Das Pellet wurde resuspendiert und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Zum Trennen des Lysats von Zelltrümmern wurden die Lysate für 15 min bei 17.000 x g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Ein Teil davon wurde für eine 1:10 bzw. 1:20 Verdünnung entnommen, für eine Konzentrationsbestimmung des Proteingehalts im Lysat mittels BCA-Assays. Der Rest des Lysats wurde gekühlt aufbewahrt um entsprechend für eine SDS-PAGE die Lämmli-Proben vorzubereiten. Andernfalls wurden die Lysate für eine längere Lagerung bei -20°C eingefroren.

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in den Lysaten wurde, wie zuvor erwähnt, mittels Bicinchoninsäure (BCA) –Assay durchgeführt. Hierbei richtete sich die Durchführung an die Herstellerangaben des BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Die Proben wurden in 1:10 bzw. 1:20 Verdünnungen in Duplikaten gemessen. Als *blank* wurde der gemessene Wert des Lysepuffers (ebenfalls in der entsprechenden Verdünnung) abgezogen. Für die Konzentrationsbestimmung wurde eine Standardreihe aus definierten BSA Verdünnungen angelegt. Volumen der Proben und Standards waren je 25 µl, welche mit 200 µl BCA-Reagenz in einer 96-well Platte angesetzt wurden. Die Platte wurde für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend wurde die Absorption im Fluorometer bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen.

4.3.2.3 Normierung der Lysate und Lämmli-Probenvorbereitung

Damit bei einem Stimulationsassay und anschließender Auswertung mittels Western Blot Vergleiche unter den verschiedenen Konditionen gezogen werden können, müssen beim Western Blot gleichmäßige Proteinkonzentrationen von jeder Probe verwendet werden. Mit der im BCA-Assay bestimmten Proteinkonzentration im Lysat konnten diese unter den verschiedenen Proben normiert werden. Für den Western Blot wurden die Proben auf eine Proteinkonzentration von 2,5 µg/ml eingestellt, wovon 25 µl aufgetragen wurden. Somit wurden insgesamt 50 µg Protein zur Analyse verwendet. Dafür wurden die Lysate mit 6x Lämmli-Puffer versetzt und mit dest. H₂O verdünnt, sodass der Lämmli-Puffer in den Proben final einer 1-fach Konzentration entsprach. Diese Ansätze wurden dann für 95°C für 10 Minuten inkubiert. Dabei wurden die Proteine in der Probe denaturiert, und aufgrund des enthaltenen β-Mercaptoethanols lösten sich enthaltenen Disulfidbrücken durch ihre Reduktion auf. Aufgrund dessen verlierten die Proteine ihre Tertiärstruktur und liegen als lineare Polypeptide vor. Sodiumdodecylsulfat (SDS) lagerte sich an der Peptidkette an und sorgte für eine negative Ladung der Proteine. Glycerol im Lämmli-Puffer erhöhte die Dichte der Probe, sodass sie bei der anschließenden Gelelektrophorese in die Ladetaschen absankte und nicht verschwamm. Bromphenolblau bewirkte ein Anfärben der Probe und markierte bei der folgenden Gelelektrophorese die Lauffront, sodass erkennbar wurde, wann die Probe im Gel ausreichend aufgetrennt war.

4.3.2.4 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Verfahren der SDS-PAGE diente der Vorbereitung für einen Western Blot oder Coomassiefärbungen. Hierbei wurden Proteine beruhend auf dem Prinzip einer Gelelektrophorese nach ihrer molekularen Größe voneinander getrennt. Wie in 4.3.2.3 beschrieben, sind die Proteine im Lämmli-Puffer negativ geladen und wandern deshalb bei der SDS-PAGE zur Anode. Das Polyacrylamidgel funktioniert hierbei wie ein molekulares Sieb wodurch kleinere Proteine schneller zur Anode angezogen werden. In dieser Arbeit wurden SDS-Gele mit 10-15% Acrylamid verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in zwei Phasen, zuerst wurde die Probe mit einer konstanten Spannung von 80 Volt im Sammelgel für 15 Minuten laufen gelassen, wodurch die Proben aus den Ladetaschen sich zu einer Lauffront bündelten. Anschließend erfolgte im Trenngel die Trennung der Größe nach, bei einer konstanten Spannung von 120 Volt, bis die angefärbte Lauffront des Lämmli-Puffers aus der Unterkante

des Gels austrat. Zur Weiteren Verwendung konnte des Gel anschließend für eine Coomassie Färbungen oder für einen Western Blot verwendet werden.

4.3.3 Western Blot

Beim Western Blot handelt es sich um eine Art der Proteomanalyse, welche es erlaubt mit spezifischen Antikörpern ein Protein in einer Probe zu detektieren. Neben Antikörpern, die ein natives Protein detektieren können (z.B. STAT3) gibt es auch solche, die den phosphorylierten Zustand des Proteins erkennen können (z.B. pSTAT3). Dies hängt davon ab, gegen welches Epitop der verwendete Antikörper gerichtet ist. Dadurch kann nicht nur das Vorhandensein von Proteinen nachgewiesen werden, sondern auch die Aktivierung von Signalkaskaden im Zellinneren in Abhängigkeit von der Kondition, mit der die Probe zuvor behandelt wurde. Zur Detektion eines Signals wird z.B. eine Chemilumineszenz, ausgelöst durch eine Peroxidase und Substratlösung, oder ein Fluoreszenzsignal durch Fluorophore, welche an den Antikörper gekoppelt sind, gemessen. Ist der verwendete Antikörper nicht direkt mit diesen gekoppelten, so wird ein zweiter Antikörper, welche diese Eigenschaften besitzt und der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörpers gerichtet ist, verwendet. Man spricht dann von primären und sekundären Antikörpern.

4.3.3.1 Western Blot Transfer, Blocken und Verwendung von Antikörpern

Für einen Western Blot müssen die Proteine nach der SDS-PAGE zunächst aus dem Gel auf eine Membran transferiert werden. Dazu wurde das Trans-Blot-Turbo semi-dry Transfer System von BioRad (München, Deutschland) und eine Nitrocellulosemembran (NC-Membran) verwendet. Dieser Transfer erfolgte erneut über das Anlegen einer elektrischen Spannung, wobei nun die negativ geladenen Proteine orthogonal zur vorherigen Laufrichtung aus dem Gel auf die Membran übertragen wurden. Für das semi-dry Verfahren wurde die NC-Membran sowie einige Lagen *Watman*-Papier in Transferpuffer gelegt und dann in der Kassette vom Transfersystem geschichtet. Zwischen je vier Lagen vom *Watman*-Papier wurde das SDS-Polyacrylamidgel auf die NC-Membran gelegt. Für den Transfer wurde eine konstante Spannung von 25 Volt für 30 Minuten angelegt.

Für die Detektion von zellulären Signalkaskaden wurde nach dem Transfer die NC-Membran für mindestens eine Stunde in einer 1:3 Verdünnung von Intercept Blockierlösung in TBS bei RT rollend in einem 50 ml Reaktionsgefäß inkubiert. Dadurch wurden die freien Bindungsstellen auf der NC-Membran blockiert, wodurch ein unspezifisches Binden von

Antikörpern verhindert werden soll. Für die Inkubation mit primären und sekundären Antikörper wird jeweils in die 1:3 Blockierlösung 0,1% Tween20 hinzugegeben. Folgend wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C rollend inkubiert. Für die Untersuchung des (phospho-)STAT3 und (phospho-)ERK-Signals wurde hier die Detektion der Fluoreszenz gewählt. Dies ermöglichte es, mehrere Antikörper auf einer Membran binden zu lassen, da die Signale der Proteinbanden nicht nur auf Grund des Molekulargewichts zu unterscheiden waren, sondern auch durch das Verwenden von sekundären Antikörpern, die mit zwei unterschiedlichen Fluorophoren und gegen die unterschiedliche Spezies der primären Antikörper (z.B. Maus bzw. Kaninchen ect.) gerichtet sind. Als nächstes wurde die Membran drei Mal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Sodann wurde der Western Blot mit den sekundären Antikörpern für eine Stunde bei RT inkubiert und zuletzt erneut drei Mal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen. Bis zur Detektion und zur Aufbewahrung wurde der Western Blot in TBS in einem 50 ml Reaktionsgefäß gelagert.

Für die Detektion von Western Blots zu Proteinreinigungen mit Fc- oder Twin-Strep-Tag[®] wurden direkt gekoppelte Antikörper verwendet (Anti-human-Fc bzw. StrepMABclassicHRP). Die am Antikörper kovalent gebundenen Peroxidasen sorgen für eine chemische Reaktion unter Zugabe der ECL Lösung. Die hierbei entstandene Chemilumineszenz kann vom Western Blot Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager (LI-Cor Biosciences GmbH, USA) aufgezeichnet werden. Hierfür wurden die unterschiedlichen Stichproben, die während der Proteinreinigung entnommen wurden, aufgetragen. Nur in den Fraktionen in denen sich auch rekombinante Proteine mit Fc- bzw. Twin-Strep-Tag[®] befanden, ergaben ein Signal auf Höhe des entsprechenden Proteins im Gel bzw. auf der NC-Membran. Entgegen des zuvor beschriebenen Blockens der NC-Membran wurden hier die Membranen für mindestens eine Stunde mit 5% (w/v) Milchlösung in TBS-T bei RT rollend inkubiert. Der human-FcPOD Antikörper wurde in der Milchlösung hinzugegeben und der Blot für eine Stunde bei RT inkubiert. Für den anti-StrepMABclassicHRP Antikörper wurde die Milchlösung gegen BSA-TBST ausgetauscht und der Antikörper hinzugegeben. Auch dieser Antikörper wurde für eine Stunde rollend bei RT mit der NC-Membran inkubiert. Nach der Inkubation mit den Antikörperlösungen wurde die NC-Membran drei Mal für 5 Minuten mit TBS-T gewaschen und am Ende in TBS gelagert.

4.3.3.3 Detektion von Western Blots

Die Detektion von Western Blots erfolgte am Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager (LI-Cor Biosciences GmbH, USA). Für die Western Blots bei denen die Fluorophor-gekoppelten Antikörper verwendet wurden, wurde der Blot für 30 Sekunden mit dem Kanal für Licht mit einer Wellenlänge von 700 nm und für 90 Sekunden mit dem Kanal für 800 nm Wellenlänge beleuchtet. Für die Western Blots zu den Proteinreinigungen wurden die NC-Membranen mit dem Kanal für Licht mit einer Wellenlänge von 700 nm und mit dem Kanal für Chemilumineszenz für 90-120 Sekunden aufgenommen. Die fertigen Gelbilder wurden mit dem Programm Image Studio Lite bearbeitet und dokumentiert.

4.3.3. Coomassie Färbung von Proteinen

Während Western Blots zum Nachweis von wenigen aber spezifischen Proteine dienen, lassen sich mit einer Coomassie Färbung alle Proteine ab einer bestimmten Menge in einem SDS-Polyacrylamidgel sichtbar machen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit benutzt, um nach Proteinreinigungen die unterschiedlichen Fraktionen zu untersuchen und vor allem das Eluat sowie das gereinigte Protein auf seine Reinheit zu überprüfen. Nach abgeschlossener SDS-PAGE wurde das Gel in eine Coomassie-Färbelösung gelegt und für 1 Minute bei 600 W in einer Mikrowelle erhitzt, und anschließend für mindestens eine Stunde auf einer Taumelplatte platziert. Der Farbstoff Coomassie Brilliant blue (250R) in der Färbelösung bindet an die basischen Aminosäuren in den Polypeptiden und macht somit diese mit einer bläulichen Färbung sichtbar. Da der Farbstoff zunächst in das komplette Gel eindrang, musste im Anschluss an die Färbung eine Entfärbung, des nicht gebundenen Farbstoffs vorgenommen werden. Hierzu diente eine Entfärbelösung in welcher das Gel über einige Zyklen mit frischer Entfärbelösung solange entfärbt wurde, bis es für eine Fotoaufnahme ausreichend behandelt wurde. Ein möglichst reines Produkt aus einer Proteinreinigung zeichnete sich dadurch aus, dass in den Fraktionen der Eluate und der fertig prozessierten Probe eine Bande auf Höhe des theoretischen Molekulargewichts des rekombinanten Proteins zu sehen war und möglichst wenig, bis gar keine anderen Banden erkenntlich waren. Einige Banden könnten auf eine mögliche Fragmentierung von Proteinen hindeuten (z.B. auf Höhe eines einzelnen Fc-tags), auch wenn dies meist zu vernachlässigen war oder hier nicht genauer untersucht wurde. War die aufgetragene Proteinmenge aufgrund geringer Proteinkonzentration gering ($< 5 \mu\text{g}$ aufgetragenes Protein) so war lediglich eine leicht blaugefärbte Bande erkenntlich.

4.3.4 *Surface plasmon resonance (SPR)*

Um die Interaktion zwischen rekombinanten IL-6, IL-11 oder IC7 und dem löslichen IL-6R bzw. löslichen IL-11R zu bestimmen, wurde die Methode der *surface plasmon resonance (SPR)* verwendet. Hierzu wurden mit dem Biacore X100 Plus Instrument (Cytiva Life Sciences) der zu untersuchende Rezeptor (Ligand) auf einem NTA Chip (Cytiva Life Sciences) über einen his-tag in einer *single flow cell* mit einer *response* von 100-250 *units* immobilisiert. Das Experiment wurde bei 25°C in PBS p20 EDTA Puffer durchgeführt. Drei Zyklen, welche nur den Laufpuffer (PBS p20 EDTA) enthielten wurden injiziert. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen des zu untersuchenden Zytokins (Analyt) in einer 1:3 seriellen Verdünnung (0,185-133,33 nM) mit einer Flussrate von 30 µl/min für 180 Sekunden injiziert. Die Konzentration 4,938 nM wurde dabei als Replikat am Ende der Konzentrationsreihe zur Qualitätsüberprüfung ein zweites Mal gemessen. Dabei wurde die Assoziation des Zytokins an den Rezeptor aufgenommen und anschließend wurde die Dissoziation über 800 Sekunden gemessen. Ein Mehrfachzyklus (*multi cycle mode*) wurde verwendet, um die kinetischen Parameter der Interaktion mit unterschiedlichen Konzentrationen an Zytokin zu bestimmen. Nach jedem Zyklus wurde der gebundene Rezeptor mit EDTA-haltigem NTA-Regenerationspuffer abgelöst und für die nächste Messung neu gebunden. Für die gemessenen Kinetikdaten wurde ein *fit* mit einem *two-step reaction* Bindungsmodell unter Verwendung der Biacore X100 Evaluation Software Version 2.0.1, angelegt und berechnet.

Für die SPR Messungen der Hyperzytokine an sgp130Fc, wurde das sgp130Fc über seinen Fc-tag an einen Protein A Sensor Chip (Cytiva) in einer *single flow cell* mit einem *response level* von 200-300 *units* pro Zyklus immobilisiert. Als Laufpuffer wurde hierbei PBS p20 verwendet. Das entsprechende Hyperzytokin wurde mit einer Flussrate von 30 µl/min für 120 Sekunden injiziert. Dabei wurde die Assoziation vom Hyperzytokin (Analyt) an sgp130Fc (Analyt) aufgenommen und anschließend wurde die Dissoziation über 300 Sekunden gemessen. Für die gemessenen Kinetikdaten wurde ein *fit* mit einem *1:1* Bindungsmodell unter Verwendung der Biacore X100 Evaluation Software Version 2.0.1, angelegt und berechnet.

4.4 Tierexperimente zur Leberregeneration

4.4.1 Tierhaltung

IL-6R^{-/-} Mäuse entstammen aus Vorarbeiten des Instituts und der Tierhaltung, der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Wildtyp Mäuse (WT; C57BL/6N) wurden über die ZETT von Janvier bestellt. Die Tierexperimente wurden unter Beachtung und Einhaltung der Vorgaben vom LANUV unter der Genehmigungsnummer 81-02.04.2019.A303 durchgeführt. Die Tiere wurden unter spezifisch pathogen-freien Konditionen (*special pathogen free*, SPF) und den Regularien der FELASA und GV-SOLAS (www.gv-solas.de) gehalten. Die Mäuse wurden mit einer *standart laboratory diet* und autoklaviertem Leitungswasser *ad libitum* ernährt. Gehalten wurden sie zudem in einem klimatisierten Raum mit konstanter Temperatur zwischen 20-24°C, Luftfeuchtigkeit von 45-65% und einem Tag- und Nachtzyklus von je zwölf Stunden Belichtung bzw. Dunkelheit. Für die beschriebenen mikrochirurgischen Eingriffe, die partielle Hepatektomie, wurden 10-14 Wochen alte, männliche Mäuse verwendet.

4.4.2 Primäre Hepatozytenisolation

Primäre Hepatozyten wurden aus C57BL/6N (Wildtyp) und IL-6R^{-/-} Mäusen mittels einer Kollagenaseperfusionstechnik gewonnen. Die primäre Hepatozytenisolation wurde in Kooperation mit der AG Levkau, Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Injektion mit einer 27G Kanüle mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (10 mg/kg Körpergewicht) in Narkose versetzt. Anschließend wurde der Bauchraum mit einer Schere eröffnet und die Pfortader der Leber (*V. portae*) mit einer 24G Kanüle versehen. Über diese wurde dann die Leber mit einer physiologischen Salzlösung (*Hanks' balanced salt solution*, HBSS Puffer mit 1% Glukose and 2,5 mM EGTA) gespült. Nach Anlegen der Perfusion wurde die *Aorta descendens* mit einer Schere durchtrennt. Die Tiere verstarben hierbei durch Blutverlust während sie sich in der Narkose befanden. Nachdem die Leber aufgeheilt war, d.h. weitestgehend blutleer, wurde eine Enzymlösung (0,03 mg/mL Kollagenase in HBSS Puffer mit 1% Glukose und 5 mM CaCl₂) durch die Leber gespült. Die Leber wurde dann im Ganzen entnommen und in einer Petrischale in 10 ml PH1 Medium mit einer Pinzette angestochen/zerkleinert. Die Zellsuspension wurde dann mit einer Pipette durch ein Zellsieb in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, sodass die Suspension keine groben Gewebstücke mehr enthielt und anschließend mit 50 x g für 3 min (möglichst langsames

Abbremsen) zentrifugiert werden kann. Dieser Waschschrift wurde 2-mal wiederholt. Anschließend wurden die isolierten und gewaschenen Hepatozyten auf eine Zelldichte von 250.000 Zellen/ml eingestellt und in einer mit Kollagen vorbehandelten 6-well Platte zu je 2 ml/well ausgesät, sodass die Zellen im Zellkulturinkubator bei 37°C adhären konnten. Nach drei Stunden, wurden die Zellen mikroskopisch begutachtet. Sofern die Zellen vital und adhären waren wurde das Medium auf das PH2 Medium gewechselt, sodass die Zellen über Nacht vorkonditioniert wurden (*pre-starving*). Am nächsten Tag wurde das Medium dann vorsichtig abgesaugt und die Zellen wurden weiter vorkonditioniert für 3 Stunden in PH3 Medium (*starving*). Die Hepatozyten wurden dann für 20 Minuten oder 24 Stunden mit entsprechend zu untersuchenden Zytokinen mit 50 ng/ml, in den wells mit dem PH3 Medium versehen. Die Zellernte erfolgte durch Absaugen des Stimulationsmediums, der Zugabe von JAK2-Lysepuffer/well und abschaben der Zellen mit einem Zellschaber auf Eis. Das Lysat wurde dann in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und weiterprozessiert oder bei -20°C gelagert. BCA und Western Blot Analyse erfolgte dann wie bereits zuvor beschrieben.

4.4.3. Partielle Hepatektomie und nachträgliche Versorgung der Tiere

Pre-operative Maßnahmen: Die Injektionen von PBS oder dem Designerzytokin (HIL-11Fc) erfolgten ins *Peritoneum* der Maus (intraperitoneal, *i.p.*). Pro Injektion wurden 200 µl PBS, als Kontrolle, oder 20 µg HIL-11Fc in 200 µl PBS gegeben. Die erste Injektion erfolgte 24 Stunden vor dem operativen Eingriff, damit zum Zeitpunkt der Leberresektion die möglichen Wirkstoffe direkt einen Effekt hervorbringen können. Die zweite Injektion erfolgte direkt nach der Operation.

Analgetische Versorgung: Bereits vor der Operation erhielten die Tiere eine subkutane (*s.c.*) Injektion mit Rimadyl® (Dosierung von 5 mg/kg Körpergewicht (5 mg/ml) *s.c.* in einem Volumen von 1 µl/g Körpergewicht). Zwei weitere Injektionen erhielten die Tiere zur Nachsorge nach der Operation, sprich nach 24 und 48 Stunden.

Partielle Hepatektomie: Die partielle Hepatektomie (PHx) erfolgte nach dem Prinzip einer 70%igen (2/3) Leberresektion, unter semi-sterilen Bedingungen [172]. Die Anästhesie der Maus wurde während der Operation mittels Isofluran über Masken-Inhalation durchgeführt. Nach Einleiten der Narkose wurde die Maus mit ihrem Rücken auf eine beheizte Schieferplatte mit 37°C gelegt, um ein Auskühlen zu reduzieren. Vorder- und Hinterläufe der Maus wurden mit Gewebepband fixiert. Das Abdomen wurde mit einer Rasierklinge von Fell entfernt und mit

Desinfektionsmittel gründlich besprüht. Die Maus wurde weitestgehend mit Mullbinden und sterilen OP-Tüchern abgedeckt. Mit einer chirurgischen Schere wurde zunächst eine Mittellinieninzision von ca. 1,5 cm (Längsschnitt unterhalb des Sternums) entlang der *Linea alba* zur Eröffnung des Peritoneums gesetzt. Die Bauchhöhle wurde mittels Retraktor aufgespannt und das *Xiphoid*, ein knöchern-knorpeliger Fortsatz des Sternums wurde mittels Klemme nach oben gestülpt und fixiert, um den Zugang zur Leber zu erleichtern. Zusätzlich wurde das *Ligamentum falciforme* angeschnitten, sodass die Leber nicht mehr am Zwerchfell fixiert ist. Mit angefeuchteten OP-Wattestäbchen (steriles NaCl 0,9%) wurden die rechten und linken Leberlappen angehoben, sodass ein OP-Faden (DS 19 Dragofil 5-0) möglichst proximal am Hilus der inneren Leberlappen platziert werden konnte. Dieser Faden wurde mit chirurgischen Knoten (Doppelschlag, gefolgt von zwei gegenläufigen Einzelschlägen) zugeschnürt, sodass mit nur einer Ligatur der rechte obere, linke obere und der linke niedrigere Leberlappen inklusive Gallenblase reseziert werden konnte. Dies entspricht ~70% der gesamten Lebermasse. Anschließend wurde die Bauchhöhle mit sterilem 0,9%igem NaCl gespült und die Wunde wurde zugenäht. Zunächst wurde das *Peritoneum* mit fortlaufender Naht und einem 5-0 PDS Faden (Ethicon, Somerville) zugenäht. Anschließend wurde die Haut mit einem 4-0 Nylonfaden (Ethicon, Somerville, NJ) mittels Einzelknoten zugenäht und mit Betaisodona anschließend desinfiziert. Zusätzlich wurde zum Schutz der Wunde ein Aluminium-Spray auf die Wunde gesprüht. Zum Ausgleich des Flüssigkeitsverlustes wurden vorsorglich 2 ml steriles 0,9%igem NaCl *s.c.* appliziert.

Nachsorge der Tiere: Wie zuvor erwähnt erhielten die Tiere nach der PHx zwei weitere Rimadyl® Injektion zur analgetischen Versorgung. Zusätzlich wurden die Tiere auf ihren Allgemeinzustand untersucht und beurteilt. Ein zuvor festgelegtes und genehmigtes Punktesystem (*scoring*) diente zur Beurteilung, wie weit ein Tier im Versuch gelassen werden darf. Die Leber regeneriert innerhalb der nächsten 7-10 Tage [184], solange wurden die Tiere in Überlebensexperimenten (*survival*) gehalten. Waren die Punkte im *scoring*-System zu hoch wurde das Tier euthanasiert.

Ende des Versuch Zeitraums: Im Überlebensexperiment wurden die Tiere jeden Tag begutachtet und wie zuvor beschrieben durch das Punktesystem beurteilt. Sofern eine Maus 10 Tage überlebt hat, wurde der Versuch beendet, indem das Tier durch zervikale Dislokation getötet und als „überlebt“ eingestuft wurde. Wurden die Tiere für ein Kinetikexperiment bis zu einem definierten Zeitpunkt (0, 6, 12, 24, 48 Stunden) nach der PHx gehalten so wurden sie nach Gewichtsbestimmung unter einer *i.p.* injizierten Narkose aus Ketamin/Xylazin

Injektionsvolumen nach GV-Solas von 50 µl/Maus (100 mg/kg Körpergewicht (KGW) Ketamin, 10 mg/kg KGW Xylazin) aus dem Versuch genommen. Hierbei wurde mit einer 20G Kanüle maximal viel Blut aus der *V. cava inferior* entnommen (300-1000 µl) und das Tier anschließend durch zervikale Dislokation sicherheitshalber getötet.

Probengewinnung: Für die Analysen zum Kinetikexperiment wurde Vollblut in Serumröhrchen überführt und nach Gerinnung 5 Minuten bei 12.000 x g zentrifugiert. Danach wurden Proben/Biopsien aus den regenerierenden Leberlappen geschnitten. Für Protein- und RNA-Analysen wurden die Stücke in ein 2 ml Reaktionsgefäß gelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Für histologische Untersuchungen wurden die Organstücke der Leber in flüssigem Tissue-Tek® O.C.T.^(TM) Compound eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

4.4.4. Serumanalysen

Serumparameter konnten mittels photometrischer Teststreifen, *Multi Stripe Liver-1* oder *Spotchem EZ Reagent Single Stripes* (z.B. für alkalische Phosphatasen, ALP), im Spotchem EZ SP-4430 (Arkray) gemessen werden. Hierbei wurden 100 µl Serum in das zugehörige Probenröhrchen vorgelegt. Die Teststreifen mit Testfeldern wurden automatisch beträufelt, sodass konzentrationsabhängige Farbumschläge, basierend auf enzymatischen Farbreaktionen, vom Gerät gemessen werden können. Hierbei wurden unter anderem die Aspartat-Aminotransferase (AST), die Alanin-Aminotransferase (ALT) und die alkalischen Phosphatasen (ALP) als Indikatoren für eine Leberschädigung gemessen. Lagen mehrere messwerte einer Probe zu unterschiedlichen Verdünnungen oder wiederholten Messungen vor, so wurden die jeweiligen Verdünnungsfaktoren zurück gerechnet und mittelwerte der multiplen Messungen gebildet.

4.4.5 Western Blot (Mausorgane)

Zur Western Blot Analyse von Mausorganen wurden die Leberproben in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit STAT3 Lysepuffer und einer Schwingmühle (Retsch) als Organhomogenisator lysiert (3min, 3 Hz). Anschließend wurde das Lysat mit 17.000 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde eine Stichprobe zur Bestimmung der Proteinkonzentration durch einen BCA-Assay entnommen (hierbei allerdings höhere

Verdünnungen 1:40 bis 1:60). Der Rest vom Lysatüberstand wurde bei -20°C gelagert oder 50 µg Gesamtprotein wurden mit frischem Lämmli-puffer verdünnt (Endkonzentration Lämmli-puffer 2x für Leberproben) zur weiteren SDS-PAGE und Western Blot Analyse (in Anlehnung wie zuvor für Zellkulturexperimente beschrieben).

4.4.6 Histologieuntersuchungen Leber

Die in Tissue-Tek® eingebetteten Organe wurden für histopathologische Untersuchungen in einem Kryostaten CM3050 S (Leica) geschnitten. Hierbei wurden die Leberschnitte mit 7 µm Schnittdicke geschnitten und auf Objektträger aufgebracht.

Hämatoxylin&Eosin (H&E) Färbung: Mit der H&E Färbung wurde das Gewebe im Allgemeinen zur Untersuchung der Morphologie angefärbt. Hierbei wurden die Zellkerne blau und das Zytoplasma rot/rosa gefärbt. Zunächst wurden die Objektträger mit den Schnitten in einem 50/50% Gemisch aus Aceton und Methanol fixiert (5 min), anschließend wurden die Proben an der Luft getrocknet (3 min) bevor sie in dest. Wasser (2 min) und in Hämatoxylin (3 min) inkubiert wurden. Überflüssiges Hämatoxylin wurde durch Spülen mit Leitungswasser (5-7 min) entfernt, mit 1% HCl in 70%igem Ethanol wurde überschüssiges Hämatoxylin entfernt, sodass nur die Zellkerne als blau gefärbt verblieben (~ 30 sek). Damit die Proben nicht zu stark entfärbt wurden, wurden die Schnitte erneut unter Leitungswasser gespült (5-7 min). Sodann erfolgte die Färbung des Cytosols mit Eosin (~30 sek). Mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurde die Färbung fixiert (70% Ethanol für wenige Sekunden, 96% Ethanol für 30-60 Sekunden und 100% Ethanol für 2 min). Anschließend wurde die Färbung mit 10-minütiger Inkubation in RotiClear beendet und der gefärbte Schnitt mit einem Deckgläschen und einem Tropfen RotiMount versiegelt.

TUNEL Färbung: Die TUNEL-Färbung (*terminal transferase mediated dUTP nick end labeling*) wurde zur Visualisierung von apoptotischen Zellen durchgeführt. Bei dieser Methode werden DNA-Strangbrüche visualisiert, indem freie 3'OH-Enden markiert und mittels POD gekoppelter Antikörper mit einem Farbsubstrat (Diaminobenzidin, DAB) sichtbar gemacht werden. Hierbei wurde das In Situ Cell Death Detection Kit (ROCHE) verwendet und nach Angaben des Herstellers verwendet. Zusätzlich wurden die Schnitte mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) für 5 min gefärbt, wodurch die Zellkerne aller Zellen blau gefärbt werden. Die Schnitte wurden mit Deckgläschen und ein Tropfen von ProLong™ Gold antifade reagent versiegelt. Die Aufnahme erfolgte im Fluoreszenzmikroskop BZ-9000 (Keyence).

pHH3 Färbung: Geschnittene Leberproben wurden ebenfalls mit einer Phospho-Histon H3 Färbung als Proliferations-Marker gefärbt. Hierbei wurden die Gewebe fixiert durch Inkubation in gekühltem Aceton/Methanol Gemisch 50/50% für 10 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten mit PBS gewaschen ehe sie mit 0,1% Triton X-100 in PBS permeabilisiert wurden. Mögliche freie Bindestellen für die folgende Antikörperfärbung wurden zunächst durch einstündiges Blocken mit 2% BSA + 5% Eselserum und 0,2% Triton X-100 in PBS blockiert. Die Färbung erfolgte durch einen primären Antikörper gegen phospho-Histon H3 (1:50) (aus Kaninchen) für 1 Stunde bei RT. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Der Gewebeschnitt wurde dann mit einem sekundären Antikörper gegen Kaninchen-Alexa488 (aus Esel) in einer 1:500 Verdünnung für 45 Minuten bei RT inkubiert. Der Objektträger wurde dann erneut dreimal mit PBS gewaschen und zusätzlich für 5 Minuten mit DAPI 1:1000 verdünnt inkubiert. Zuletzt wurde der Schnitt nochmals 3-mal mit PBS gewaschen und dann mit ProLong™ Gold antifade reagent und einem Deckgläschen versiegelt. Die Schnitte wurden im Fluoreszenzmikroskop BZ 9000 (Keyence) aufgenommen.

Scoring von histologischen Präparaten: Zum weiteren Vergleich der zuvor genannten histologischen Färbungen wurden die jeweiligen Leberschnitte auf gewisse Merkmale gezählt. Dadurch lassen sich nicht nur die Bilder der Färbungen gegenüberstellen, sondern ermöglicht zudem eine graphische Auswertung. Für die H&E Färbungen wurden die gesamten Leberschnitte auf Infiltrate (d.h. erkennbare Anhäufungen von Zellkernen vermutlicher Immunzellpopulationen) sowie Störungen im Parenchym der Leber gezählt (Zählungen hier von einem Experimentator: Hendrik Weitz). Zur Relativierung wurden diese Zählungen durch die Bildausschnitte geteilt in denen diese gezählt wurden. Somit ergaben sich eine „relative Infiltrate“ und eine „relative Gewebestörung“ Wertung. Für die TUNEL sowie die pH3⁺ gefärbten Schnitte wurden die Lichtsignale von je drei mikroskopischen Aufnahmen pro Probe gezählt (Zählungen hier von einem Experimentator: Annika Gesiorowski).

5. Ergebnisse

IL-6:IL-11R *crosstalk*

5.1 Humanes IL-6 induziert auch über den IL-11R ein nicht-kanonisches gp130 Signal

Um zu testen, ob IL-6 aufgrund seiner hohen Ähnlichkeit zum IL-11 möglicherweise auch an den IL-11 Rezeptor bindet und einen funktionalen Rezeptorkomplex bildet, wurden Ba/F3 Zellen, welche durch retrovirale Transduktion humanes gp130 (hgp130) und den humanen IL-11R (hIL-11R) stabil exprimieren (Ba/F3-hgp130-hIL-11R) mit humanem IL-11-ts (hIL-11-ts) bzw. humanem IL-6-ts (hIL-6-ts) kultiviert. Die Zellen wurden bereits in vorherigen Projekten innerhalb des Instituts generiert und dass sie auf hIL-11 responsiv sind und wachsen wurde bereits in Vorarbeiten erwiesen [80]. Für einen Proliferationsassay wurden hierbei hohe Zytokinkonzentrationen, ab 40 nM eingesetzt und seriell 1:3 verdünnt. Nach drei Tagen wurde das relative Zellwachstum in technischen Triplikaten gemessen (siehe 4.3.1). Insgesamt wurde der Assay drei Mal durchgeführt für verschiedene biologische Replikate, aus denen dann Mittelwerte und Standardabweichung der mittleren effektiven Konzentration (EC50) ermittelt wurden. Durch den Vergleich der EC50 beider Wachstumskurven lässt sich deuten, dass IL-6 das Wachstum der hier verwendeten Zellen auslöst, wenn auch mit einer geringeren Effizienz als IL-11. Die EC50 von hIL-6-ts betrug $1,97 \pm 0,42$ nM im Vergleich zum hIL-11-ts mit $21,58 \pm 4,31$ pM. Dies bedeutet es bedarf mehr IL-6 als IL-11 um auf eine vergleichbare Proliferationsintensität zu kommen (~ Faktor 100) (**Abbildung 7 A**). Im Western Blot war ebenfalls erkennbar, dass eine höhere Konzentration von

hIL-6-ts nötig ist, um eine Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs einzuleiten, erkennbar am phosphoryliertem-STAT3 (pSTAT3) Signal (**Abbildung 7 B**).

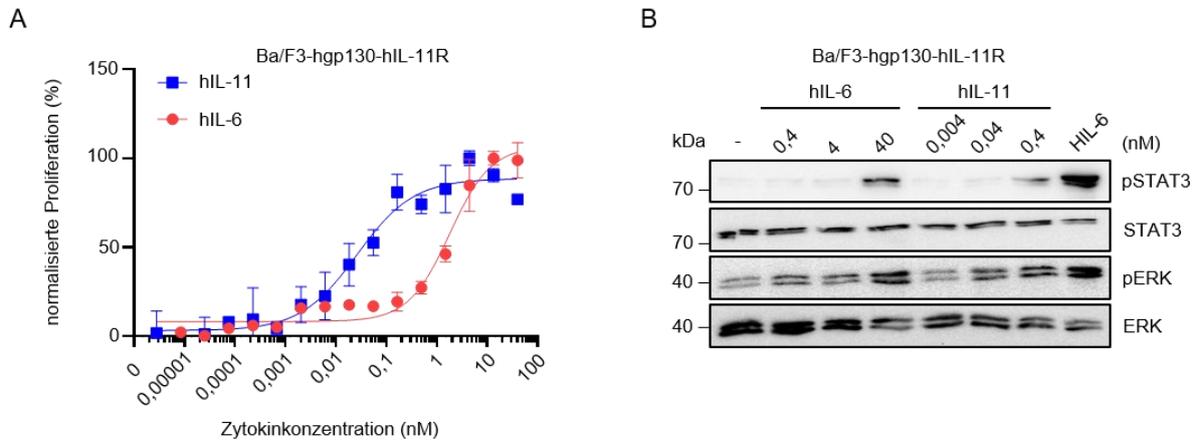


Abbildung 7 Nicht kanonische Signaltransduktion von IL-6 über Komplexbildung mit dem IL-11R:gp130.

(A) Proliferationsassay von Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten humanen gp130 (hgp130) und humanen IL-11R (Ba/F3-hgp130-hIL-11R) inkubiert für 72 h mit humanem IL-11-ts (hIL-11-ts) und humanem IL-6-ts (hIL-6-ts) in den angezeigten Konzentrationen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen mit hIL-6-ts, hIL-11-ts und Hyper-IL-6Fc (HIL-6Fc) (10 ng/ml) in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Zu A und B: Gezeigte Replikate ausgewertet basierend auf Rohdaten von Laura Schulz.

Das Designerprotein IL-6-Rezeptorfusionsprotein (IL-6RFP; genauer murines IL-6RFPFc, mIL-6RFPFc) wurde 2009 durch M. Wiesinger *et al.* entwickelt und beschrieben. Es handelt sich hierbei um die extrazellulären Domänen D1-D3 von murinem gp130 (m_{gp}130) über einen 41 Aminosäuren langen flexiblen Peptidlinker (Ala-Gly-Ser-reicher Linker, Ancy *et al.*, 2003) gekoppelt an die Domänen D1-D3 von murinem IL-6R (mIL-6R) [185, 186]. Das resultierende Molekül kann als „Zytokinfalle“ für frei verfügbares IL-6 gesehen werden. Bei einer Anwendung kommt es zur Komplexbildung von IL-6 und dem IL-6RFP, wodurch das IL-6 abgefangen wird und vermindert für die Induktion einer Signaltransduktion zur Verfügung steht [185]. Hierbei ist zu erwähnen, dass humanes IL-6 kreuzreaktiv zum mIL-6R ist [187].

Aufgrund dieser Eigenschaften war dieses Protein von großem Interesse für diese Arbeit als möglicher Inhibitor für den zuvor entdeckten IL-6:IL-11R *crossstalk*. Die Arbeitsgruppe um Prof. G. Müller-Newen stellte das pcDNA3.1-mIL-6RFPFc Plasmid zur Verfügung wodurch eine Expression in Expi-CHO-STM Zellen (s. 4.2.10) mit anschließender Reinigung durch Affinitätschromatographie (s. 4.2.11) ermöglicht wurde. Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen angeregt durch hIL-11-ts ließen sich nicht durch Zugabe von IL-6RFPFc in Ihrer Proliferation einschränken, im Gegensatz zu einer Zugabe von hIL-6-ts und IL-6-RFPFc (**Abbildung 8 A**). Für ein Zellwachstum wurden hIL-6-ts Konzentrationen von 0,4 oder 4 nM verwendet und bei

einem 5:1-fachen Verhältnis von IL-6-RFPFc wurde das Wachstum über 72 h signifikant reduziert. Passend dazu wurde im Western Blot unter Zugabe von hIL-6 in Kombination mit IL-6-RFPFc weniger pSTAT3 detektiert, verglichen zu den Konditionen nur mit Zytokin und ohne Inhibitor (**Abbildung 8 B**).

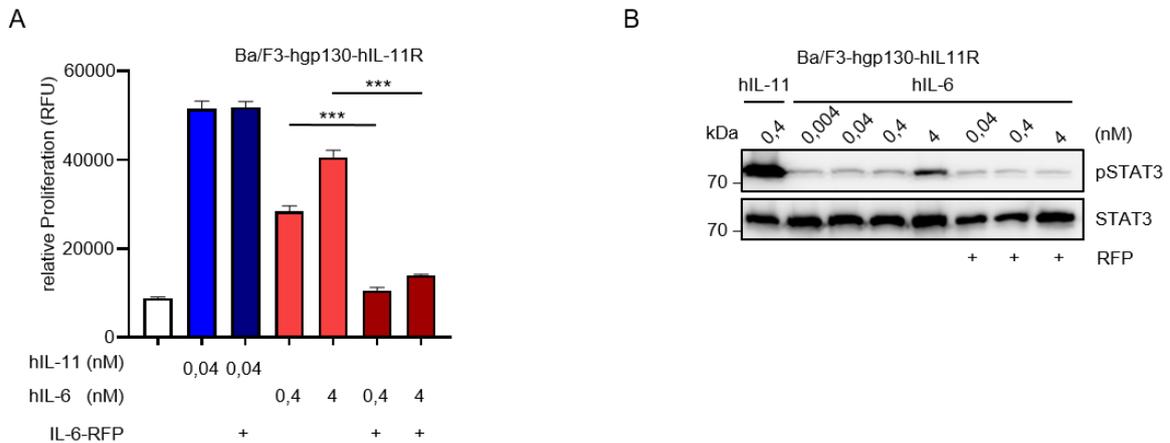


Abbildung 8 Inhibition des hIL-6:hIL-11R Crosstalks durch IL-6-Rezeptorfusionsprotein (IL-6RFP).

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen inkubiert für 72 h mit hIL-11-ts oder hIL-6-ts in den angezeigten Konzentrationen und mit IL-6-RFPFc (in 5:1 molarem Verhältnis). Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen mit hIL-6-ts, hIL-11-ts und in den angezeigten Konzentrationen und IL-6RFPFc (in 5:1 molarem Verhältnis) für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus zwei Replikaten ist gezeigt. Zu B: Gezeigte Replikate ausgewertet basierend auf Rohdaten von Laura Schulz. Für die Statistik wurde ein ungepaarter t test verwendet (***) = $p \leq 0.001$).

Zur Verifizierung, dass für die Proliferation auf diesen Zellen eine Interaktion mit dem IL-11R verantwortlich ist, wurden zur Kontrolle Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen (**Abbildung 9 A**) und Ba/F3-hgp130 (**Abbildung 9 B**) mit hIL-6-ts stimuliert. Während die Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen als Positivkontrolle für das verwendete hIL-6-ts dienten und eine deutliche Aktivität zeigten ($EC_{50} = 3,30 \pm 0,40$ pM), demonstrierte der Proliferationsassay mit den Ba/F3-hgp130 Zellen, also jene ohne α -Rezeptor, dass das hIL-6-ts kein unspezifisches Wachstum der Zellen induziert.

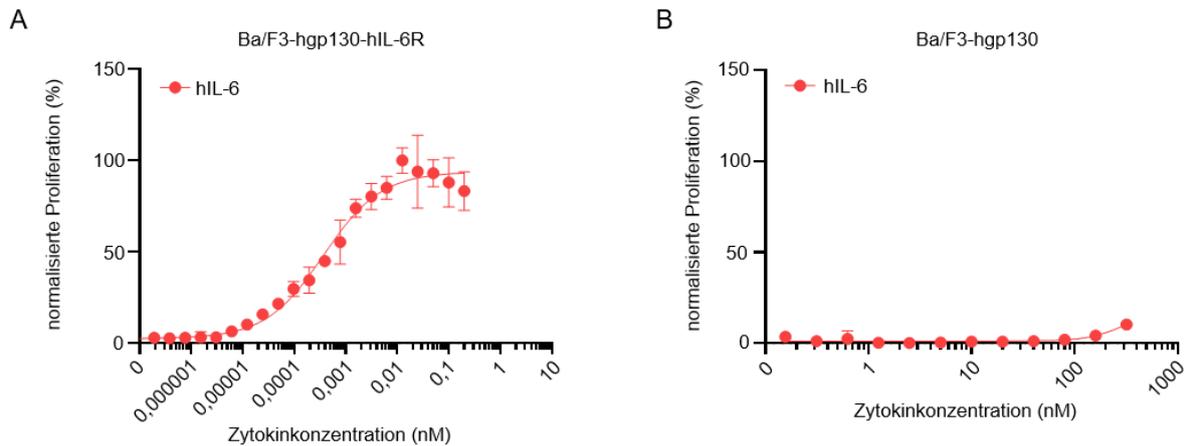


Abbildung 9 Proliferationsassays zur Validierung von gereinigtem rekombinanten hIL-6 auf biologische Aktivität und Spezifität.

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten hgp130 und hIL-6R (Ba/F3-hgp130-hIL-6R) inkubiert für 72 h mit hIL-6-ts. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert. (B) Proliferationsassay mit Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten hgp130 (Ba/F3-hgp130) inkubiert für 72 h mit hIL-6-ts in den angezeigten Konzentrationen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Zur weiteren Kontrolle wurde ein Proliferationsassay auf den gleichen Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen durchgeführt, bei dem eine Induktion durch hIL-11-ts oder hIL-6-ts auf Inhibition durch Tocilizumab, einem antagonistischen IL-6R monoklonalen Antikörper getestet wurde. Wie erwartet, da kein IL-6R vorhanden ist, wurde die Proliferation durch Tocilizumab nicht inhibiert, dadurch kann der Signalweg über den IL-6R ausgeschlossen werden (Abbildung 10).

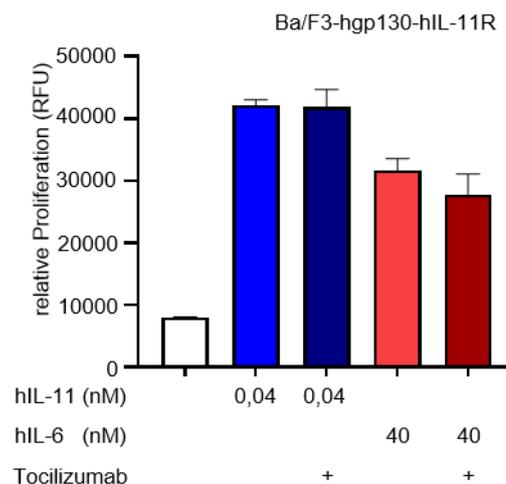


Abbildung 10 Proliferationsassay ohne Inhibition des IL-6:IL-11R Crosstalks durch Tocilizumab.

Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen inkubiert für 72 h mit hIL-11 oder hIL-6 in den angezeigten Konzentrationen und mit Tocilizumab (0,6 µM). Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Für eine genauere Untersuchung des *Crosstalks* wurden die Affinitäten der Bindekinetik mittels *surface plasmon resonance* (SPR) getestet. Hierfür wurden die Rezeptoren sIL-6R-his und sIL-11R-his als rekombinante Proteine, welche mit einem *his-tag* versehen sind, kommerziell erworben. Die SPR-Experimente wurden mit einem NTA-*chip* durchgeführt, wobei die Rezeptoren über ihren *his-tag* an den mit Nickel konditionierten NTA-*chip* immobilisiert wurden und für die Messung den Liganden repräsentierten. Die Zytokine wurden dann als Analyt in verschiedenen absteigenden Konzentrationen verwendet. Zur Untersuchung des IL-6:IL-11R *Crosstalks* wurde die Kinetik von hIL-6-ts an immobilisiertem sIL-11R-his gemessen und eine Bindungsaffinität über die Gleichgewichtsdissoziationskonstante (K_D) von 22,26 nM konnte bestimmt werden (**Abbildung 11 A**). Als Kontrolle wurde hIL-6-ts zusammen mit dem hIL-6R-his verwendet wobei eine K_D von 2,29 nM gemessen wurde (**Abbildung 11 B**). In früheren Arbeiten wurde eine K_D von 1 nM für IL-6 und dem membranständigem IL-6R gemessen [65] worauf sich auch heute noch aktuelle Artikel in der Literatur beziehen [1]. Dies stimmt überein mit der gemessenen K_D in dieser Arbeit, was für eine Validierung der Kontrolle spricht. Zum weiteren Vergleich des IL-6:IL-11R *Crosstalks* wurde ebenfalls eine K_D von hIL-11-ts an den sIL-11R-his mit 0,53 nM bestimmt (**Abbildung 11 C**). Die hier nachgestellten Bindungen von IL-6 an den IL-6R bzw. von IL-11 an den IL-11R sind in ihrer K_D gemessen um Faktor 10 bzw. 40 geringer als die K_D des IL-6:IL-11R *Crosstalks*. Dies passt zur Tatsache, dass IL-6 über den IL-11R ein Signal übermitteln kann (Daten Proliferations- und Stimulationsexperimente zuvor gezeigt) und das eine Bindung von IL-6 an den IL-11R prinzipiell möglich ist, wenn auch nicht so effizient wie im jeweiligen kanonischen Zytokin-Rezeptorkomplex, da mehr Zytokin benötigt wird bzw. die Bindungsaffinität geringer ist. Interessanterweise konnte auch eine K_D für das Modell von hIL-11-ts an den sIL-6R-his von 58,37 nM bestimmt werden (**Abbildung 11 D**).

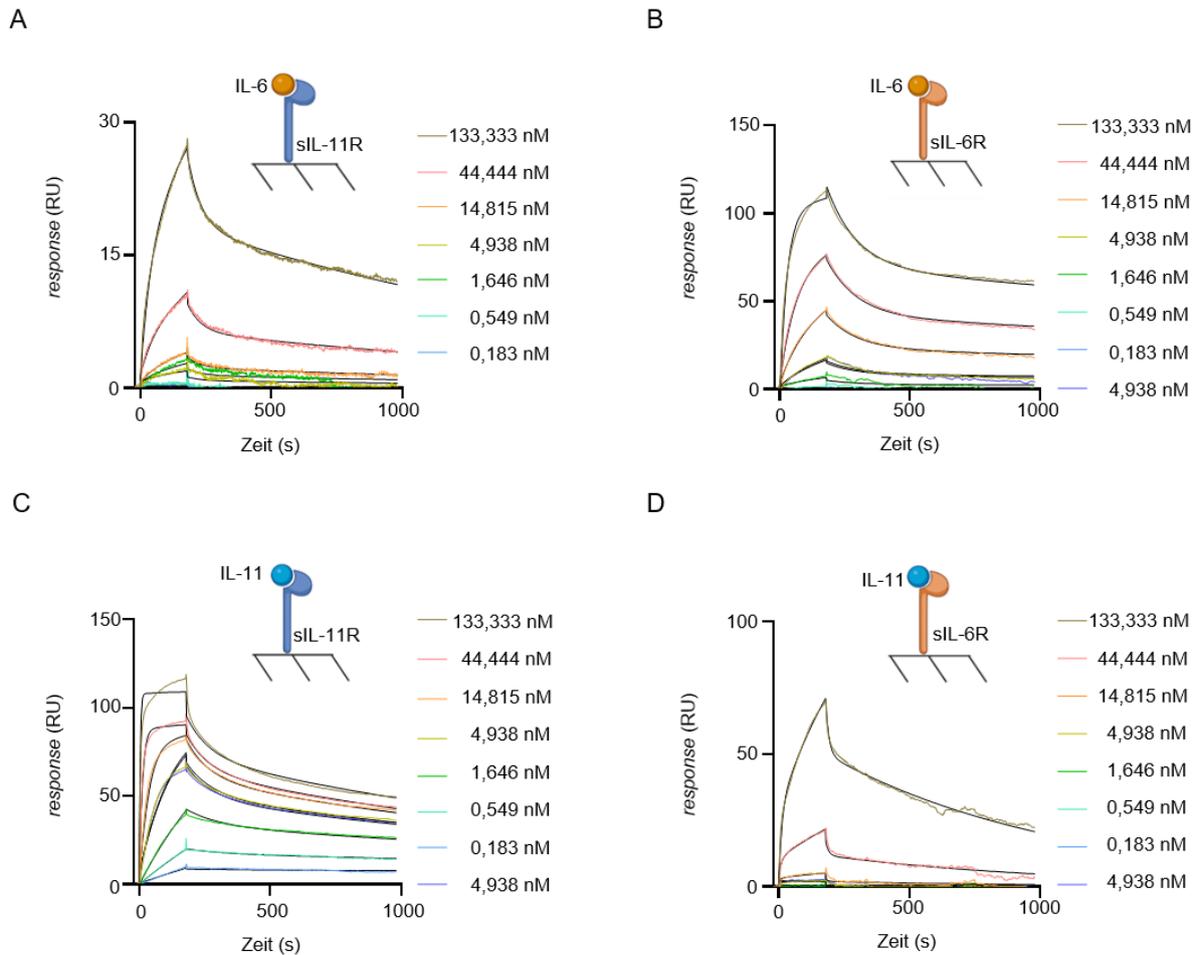


Abbildung 11 SPR Messungen von *IL-6* und *IL-11* zum *IL-6:IL-11R* Crosstalk.

(A) hIL-6-ts Bindung zum immobilisierten sIL-11R-his. (B) hIL-6-ts Bindung zum immobilisierten sIL-6R-his. (C) hIL-11-ts Bindung zum immobilisierten sIL-11R-his. (D) hIL-11-ts Bindung zum immobilisierten sIL-6R-his. Alle Kinetiken wurden in den angezeigten Konzentrationen gemessen. Während die löslichen Rezeptoren über ihren His-tag als Liganden immobilisiert wurden, wurden die jeweiligen Zytokine als Analyten hinzugegeben. Die Sensorgramme in relativer response gegenüber der Zeit sind als farbliche Linien gezeigt und in einem two-state reaction Modell mit lokalem Kurvenfit als schwarze Linien dargestellt. Die schematischen Darstellungen vom Versuchsaufbau wurden mit biorender.com erstellt.

Zur Überprüfung eines komplementären *Crosstalks*, induziert durch *IL-11* über den *IL-6R* (*IL-11:IL-6R*), wurden Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten hgp130 und hIL-6R (Ba/F3-hgp130-hIL-6R) verwendet und mit hIL-11-ts inkubiert. Interessanterweise wurde selbst bei sehr hohen Zytokinkonzentrationen von bis zu 360 nM kein effizientes Wachstum ausgelöst (EC50 n.d.) (**Abbildung 12**), was darauf hindeutet, dass kein funktionaler Komplex zur Signaltransduktion über *IL-11* mit dem *IL-6R* und gp130 gebildet wird.

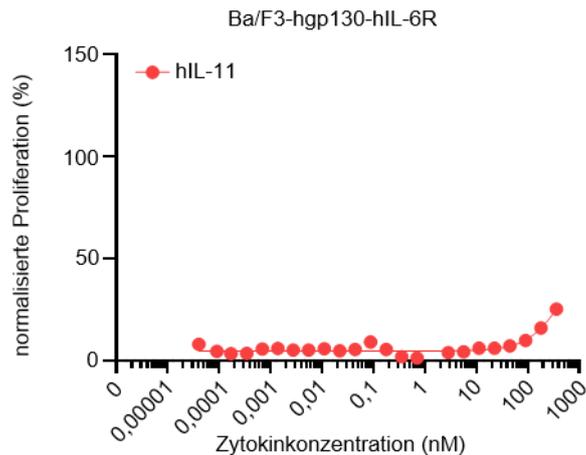


Abbildung 12 Proliferationsassay zur Überprüfung eines IL-11:IL-6R crosstalks.

Proliferationsassay auf Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten hgp130 und hIL-6R (Ba/F3-hgp130-hIL-6R) kultiviert für 72 h mit gereinigtem rekombinanten hIL-11-ts in den angezeigten Konzentrationen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Diese Ergebnisse untermauern die Ähnlichkeit von IL-6 und IL-11 innerhalb der Familie der IL-6 artigen Zytokine. IL-6 scheint strukturell ähnlich genug zu sein, um als alternativer Ligand mit dem IL-11R zusammen interagieren zu können, wenn auch nur in deutlich höheren Konzentrationen eine vergleichbare Reaktion ausgelöst wird. Hierbei wurde nur das *classic-signaling* adressiert, da die Zellen den IL-11R membranständig exprimieren. Dies ermöglicht die einzelne Zugabe vom Zytokin, ohne zusätzlichen löslichen Rezeptor. So konnten die Variablen im *in vitro* Experiment durch Anzahl möglicher Supplementierungen zum Konditionsmedium geringgehalten werden. Stattdessen konnte durch Anwendung eines IL-6 Inhibitors in den IL-6:IL-11R *crosstalk* interveniert werden und durch Verwendung von Tocilizumab eine Kontamination/Verfälschung durch ungewollte Präsenz von IL-6R ausgeschlossen werden. Interessanterweise konnte für IL-11 auch eine Bindung an den IL-6R gemessen werden, jedoch hat das IL-11 kein Wachstum auf Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen induziert.

5.2 Nicht-kanonische gp130 Komplexbildung durch humanes IL-6 über den murinen IL-11R lässt sich durch einen neutralisierenden IL-11R monoklonalen Antikörper inhibieren

Zur Überprüfung, ob der IL-6:IL-11R *crosstalk* prinzipiell auch im Mausmodell zu beobachten ist, wurden Ba/F3 Zellen, welche durch retrovirale Transduktion hgp130 und den murinen IL-11R (mIL-11R) exprimieren (Ba/F3-hgp130-mIL-11R) mit humanen IL-6 und IL-11 kultiviert. Im Proliferationsassay zeichnete sich ein ähnliches Bild ab wie in **Abbildung 7**,

(Abschnitt 5.1). Während hIL-11-ts auf den Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen eine EC50 von $0,22 \pm 0,13$ nM besaß, benötigten diese Zellen, auch hier, eine höhere Konzentration von hIL-6-ts um auf ein vergleichbares Wachstum zu kommen, sprich die EC50 lag um Faktor 10 höher bei $2,16 \pm 1,07$ nM (**Abbildung 13 A**). Auch im Stimulationsassay dieser Zellen wurde mehr hIL-6-ts benötigt, um ein deutliches pSTAT3 Signal auszulösen, was die Ergebnisse des Proliferationsassays unterstützt (**Abbildung 13 B**).

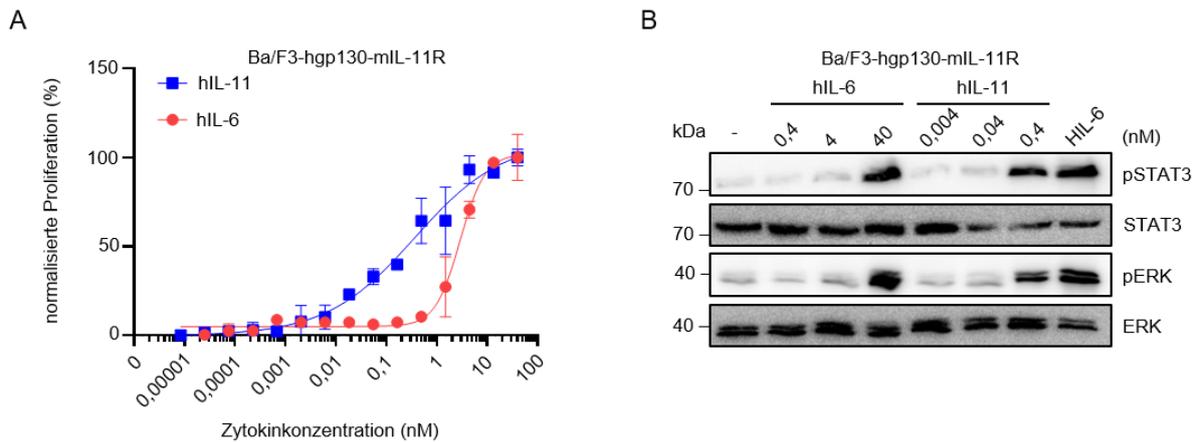


Abbildung 13 Wirksamkeit von humanen Zytokinen auf murinen Rezeptoren im IL-6:IL-11R crosstalk.

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten humanem gp130 (hgp130) und murinen IL-11R (Ba/F3-hgp130-mIL-11R) inkubiert für 72 h mit hIL-11-ts und hIL-6-ts in den angezeigten Konzentrationen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen mit hIL-6-ts, hIL-11-ts und HIL-6Fc (10 ng/ml) in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Zu A: Gezeigtes Replikat von Hendrik Weitz, nicht gezeigte Replikate basierend auf Rohdaten von Laura Schulz und Jens Moll. B: Gezeigtes Replikat ausgewertet basierend auf Rohdaten von Laura Schulz und Jens Moll.

Als Nachweis, dass für diese Signaltransduktion der mIL-11R verantwortlich und essenziell ist, wurde ein monoklonaler Antikörper der gegen den mIL-11R gerichtet ist (mIL-11R mAb) verwendet. Als Positivkontrolle galt die Kultivierung mit mIL-11-ts, während in einer Cokultivierung von mIL-11-ts und dem mIL-11R mAb die Proliferation signifikant reduziert wurde. Dies spricht für eine funktionale Inhibierung des Rezeptors durch diesen Antikörper. Die Proliferation durch hIL-6-ts (in höheren Konzentrationen) konnte ebenfalls durch Verwendung des mIL-11R mAb signifikant inhibiert werden, was zeigt, dass das hIL-6 über den mIL-11R eine Proliferation dieser Zellen bedingt (**Abbildung 14 A**). STAT3 und Erk

wurden durch hIL-11-ts und hIL-6-ts phosphoryliert, und dies konnte ebenfalls durch eine Addition von mIL-11R mAb inhibiert werden (**Abbildung 14 B**).

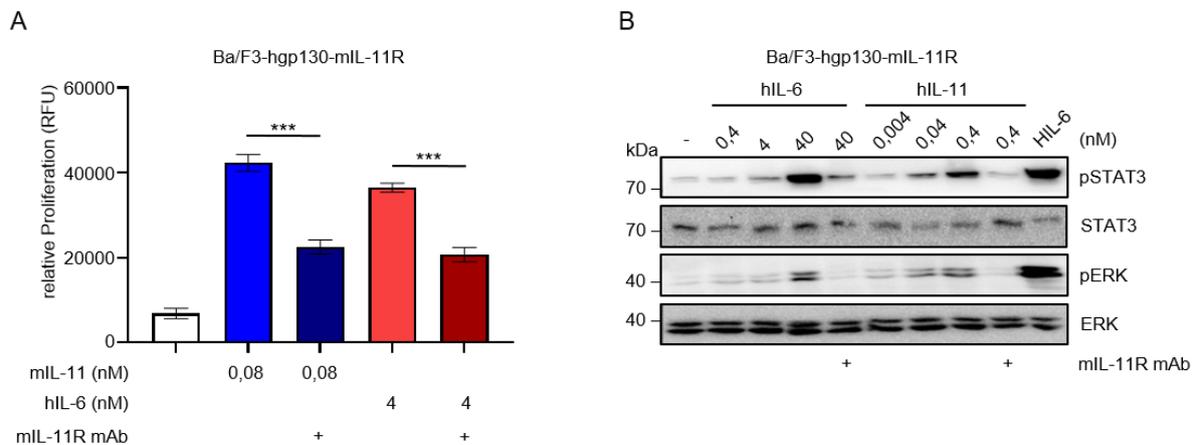


Abbildung 14 Blockierung des IL-11R durch Antikörper verhindert einen IL-6:IL-11R Crosstalk.

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen inkubiert für 72 h mit hIL-11-ts oder hIL-6-ts in den angezeigten Konzentrationen und mit einem monoklonalen Antikörper gegen den mIL-11R (0,2 μ M). Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen mit hIL-6-ts, hIL-11-ts in den angezeigten Konzentrationen und einem monoklonalen Antikörper gegen den mIL-11R (0,2 μ M) für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus zwei Replikaten ist gezeigt. Zu B: Gezeigte Replikate ausgewertet basierend auf Rohdaten von Laura Schulz. Für die Statistik wurde ein ungepaarter t test verwendet (***) = $p \leq 0.001$).

Bei diesem Experiment wurden die humanen Versionen der Zytokine verwendet, denn entgegen des murinen IL-11-ts (mIL-11-ts) konnte die murine Version von IL-6-ts (mIL-6-ts) die Zellen nicht zum Wachstum anregen (EC50 mIL-11-ts: $132,20 \pm 85,74$ pM, EC50 mIL-6-ts: n.d.) bzw. STAT3 und ERK Phosphorylierungen auslösen. (**Abbildung 15 A+B**).

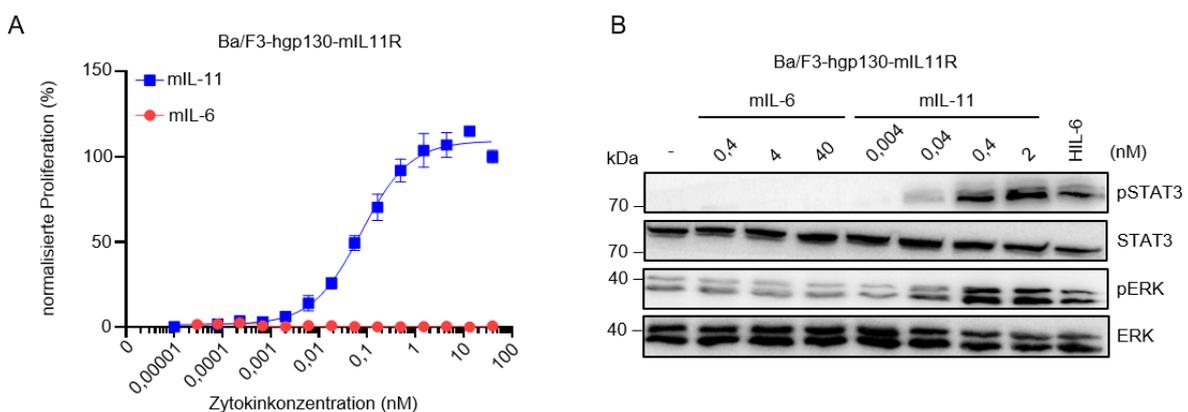


Abbildung 15 Murines IL-6 funktioniert nicht in Kombination mit dem murinen IL-11 Rezeptor im IL-6:IL-11R Crosstalk.

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten humanem gp130 (hgp130) und murinen IL-11R (Ba/F3-hgp130-mIL-11R) inkubiert für 72 h mit murinen IL-11-ts (mIL-11-ts) und murinen IL-6-ts (mIL-6-ts) in den angezeigten Konzentrationen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen mit mIL-6-ts, mIL-11-ts und HIL-6Fc (10 ng/ml) in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Zu A und B: Gezeigte Replikate ausgewertet basierend auf Rohdaten von Laura Schulz.

(A) Proliferationsassay auf Ba/F3-hgp130 Zellen mit kokultivierung von hIL-6-ts, hIL-11-ts in den angezeigten Konzentrationen und in Kombination mit dem löslichen humanen IL-6R-his (shIL-6R) (4,4 nM) bzw. löslichen humanen IL-11R-his (shIL-11R) (4,4nM). Als Positivkontrolle wurde HIL-6Fc (10 ng/ml) verwendet. (B) Western Blot von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK Signalen von Ba/F3-hgp130 Zellen co-kultiviert mit hIL-11-ts oder hIL-6-ts in den angezeigten Konditionen zusammen mit sIL-6R-his oder sIL-11R-his (+ = 4,4 nM oder ++ = 22,2 nM). Zu A und B: Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten gezeigt.

Da sich die Hyperzytokine HIL-6 und HIL-11 für die Signaltransduktion im Model für das *trans-signaling* als potenter zeigten als die Einzelstimulation mit dem jeweiligen Zytokin, wurde ein ähnlicher Ansatz zur Untersuchung des IL-6:IL-11R *Crosstalks* verfolgt. Ein neuartiges Designerzytokin, ein chimäres HIL-6-ts (cHIL-6-ts), wurde generiert und getestet. Bestehend aus dem N-terminalen Teil des shIL-11R und verbunden über einen flexiblen Peptidlinker (GGGS₂) mit hIL-6 und einem C-terminalen Twin-Strep-Tag[®] für eine mögliche Reinigung via Affinitätschromatographie (**Abbildung 17 A+ B**). Basierend auf einem in der Arbeitsgruppe vorhandenem pcDNA3.1-sIL-11R:IL-6Fc wurde das Zielgen mittels der Restriktionsenzyme AflIII und NotI in einen bereits vorhandenen pcDNA3.1-Vektor der einen Twin-Strep-Tag[®] enthält, kloniert.

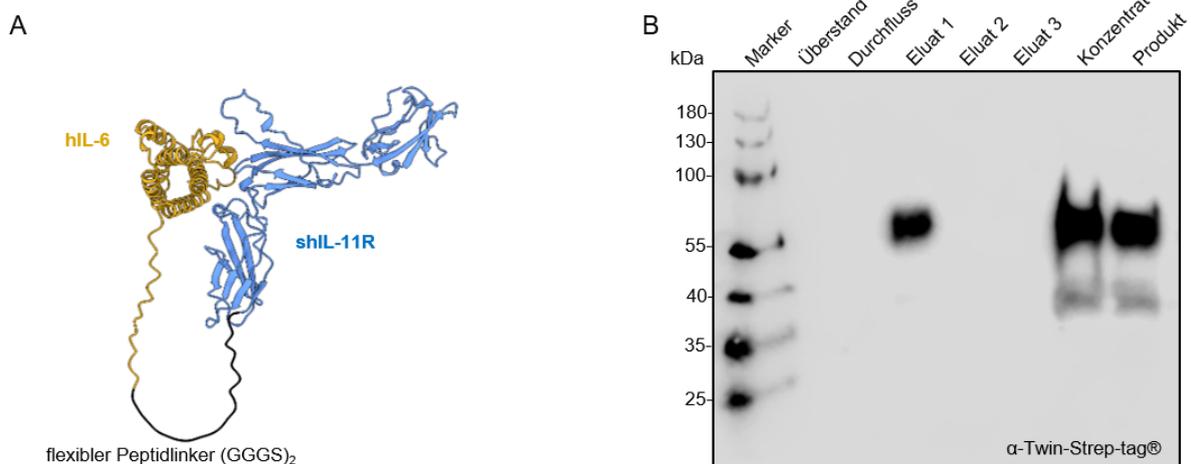


Abbildung 17 Das neuartige Hyperzytokin cHIL-6.

(A) 3D-Modell zur Struktur vom chimären Hyper-IL-6 (cHIL-6) und schematische Darstellung. Das 3D Modell wurde generiert durch eine Vorhersage von AlphaFold2 und visuell dargestellt mittels Chimera. (B) Western Blot zur Proteinreinigung von cHIL-6-ts aus Expi-293F™ Kulturüberstand, aufgetragene Reinigungsfraktionen wie angezeigt und detektiert mittels StrepMABclassicHRP Antikörper.

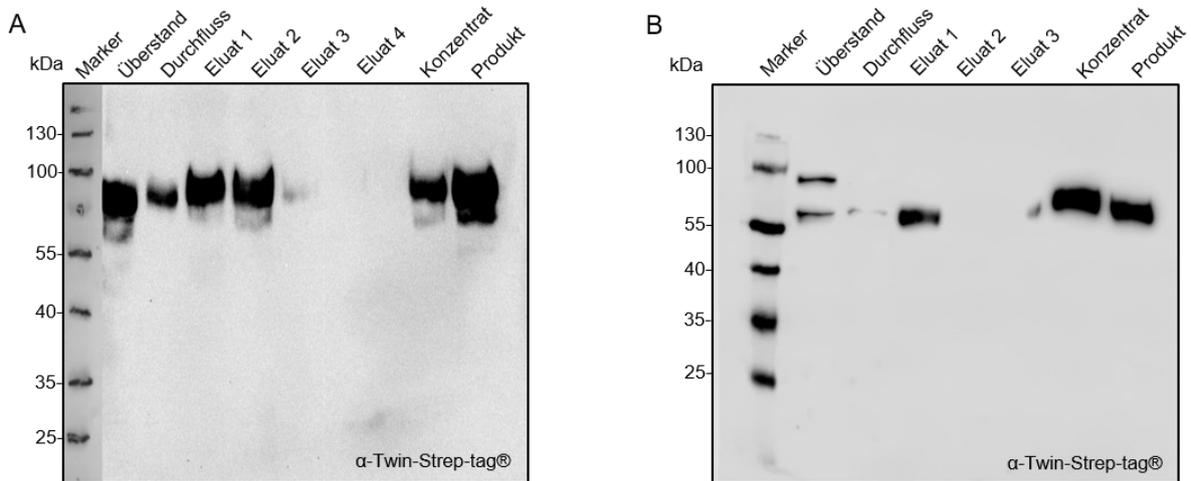


Abbildung 18 Proteinreinigungen HIL-6-ts und HIL-11-ts.

(A) Western Blot zur Proteinreinigung von HIL-6-ts (B) Western Blot zur Proteinreinigung von HIL-11-ts. Aufgetragene Reinigungsfraktionen wie angezeigt und detektiert mittels StrepMABclassiCHRP Antikörper.

Zur Charakterisierung der biologischen Aktivität des neuen cHIL-6-ts wurden Ba/F3-hgp130 Zellen mit cHIL-6-ts und mit HIL-6-ts sowie HIL-11-ts als Kontrollen (**Abbildung 18 A+B**) für 72 Stunden im Proliferationsassay inkubiert. Daraus ergaben sich für die jeweiligen Proteine die EC50 Werte von: $194,03 \pm 53,52$ pM für cHIL-6-ts, $46,61 \pm 8,13$ pM für HIL-6-ts und $57,76 \pm 7,14$ pM für HIL-11-ts, was auf eine deutliche biologische Aktivität aller drei Proteine hinweist. Während sich für HIL-6-ts und HIL-11-ts sehr ähnliche EC50 ergaben, zeigte sich die Chimäre als geringfügig weniger aktiv (**Abbildung 19 A**). Auch in der Stimulation von Ba/F3-hgp130 Zellen mit diesen drei Hyperzytokinen zeigte die Chimäre eine Aktivierung des JAK-STAT und des MAPK Signalwegs, wenn auch etwas schwächer im Vergleich zum HIL-6-ts und HIL-11-ts bei gleichen Konzentrationen (**Abbildung 19 B**).

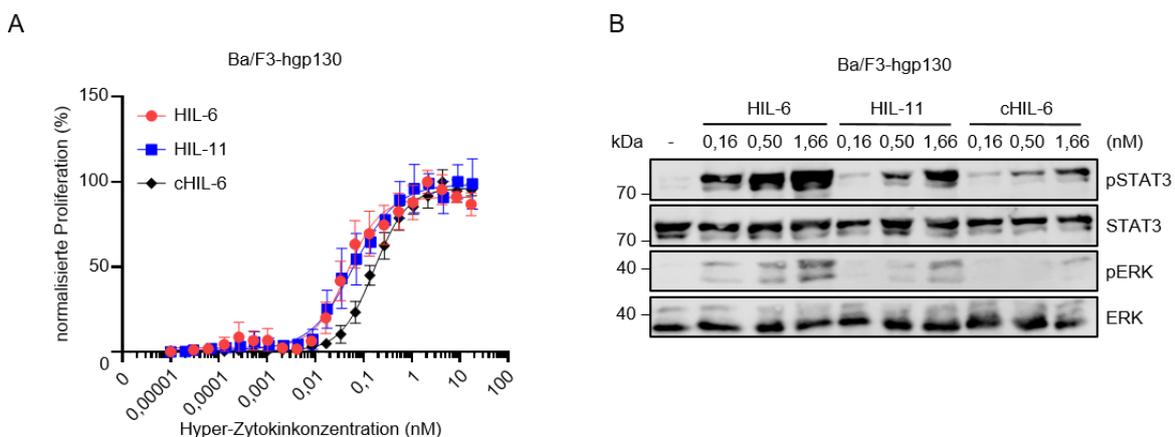


Abbildung 19 cHIL-6 ist biologisch aktiv und induziert Trans-signaling.

(A) Proliferationsassay von Ba/F3-hgp130 Zellen mit den Hyperzytokinen HIL-6-ts, HIL-11-ts und cHIL-6-ts in seriellen Verdünnungen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130 Zellen mit HIL-6-ts, HIL-11-ts und cHIL-6-

ts in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Das Fusionsprotein sgp130Fc ist ein Inhibitor für IL-6 und IL-11 vermitteltes *trans-signaling* [1]. Deshalb besteht Grund zur Annahme, dass sgp130Fc auch ein potentieller Inhibitor für das cHIL-6 sein könnte. Deshalb wurden Ba/F3-hgp130 Zellen jeweils mit einer konstanten Konzentration von 1,7 nM mit den Hyperzytokinen HIL-6-ts, HIL-11-ts oder cHIL-6-ts mit einer zusätzlichen seriellen Verdünnung von sgp130Fc für drei Tage kultiviert. Wie erwartet wuchsen die Zellen mit den Hyperzytokinen und geringen Konzentrationen von sgp130Fc, doch mit zunehmender Konzentration wurde das Wachstum der Zellen inhibiert. Dabei wurden für sgp130Fc gegen die jeweiligen Hyperzytokine folgende IC₅₀-Werte bestimmt: Für HIL-6-ts 428 ± 88 pM, für HIL-11-ts 213 ± 53 pM und für cHIL-6-ts 324 ± 205 pM (**Abbildung 20 A**). Zudem lies sich auch im Western Blot nachweisen, dass sich das pSTAT3 Signal, induziert durch die jeweiligen Hyperzytokine, durch Anwendung von sgp130Fc inhibieren ließ (**Abbildung 20 B**).

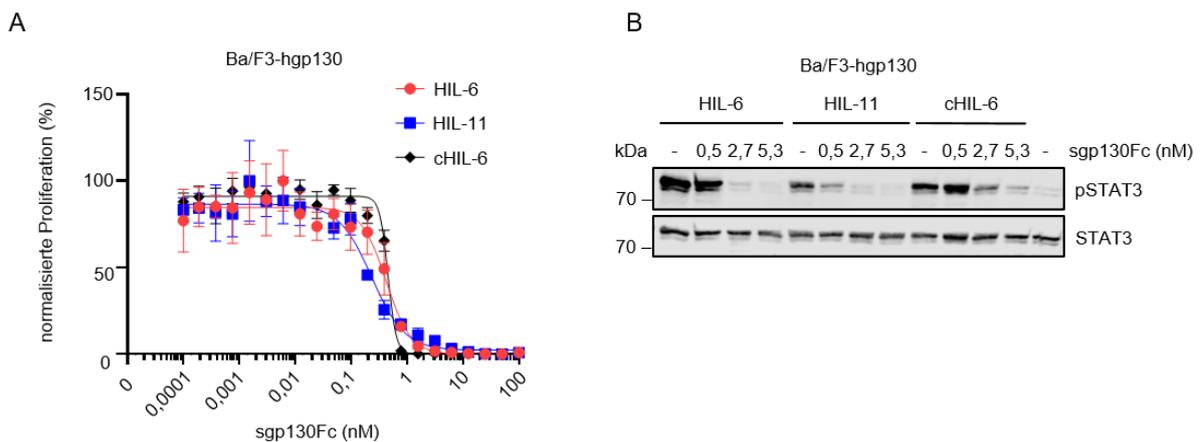


Abbildung 20 Inhibition von cHIL-6 vermitteltem Signal durch den trans-signaling Inhibitor sgp130Fc.

(A) Proliferationsassay von Ba/F3-hgp130 Zellen mit den Hyperzytokinen HIL-6-ts, HIL-11-ts und cHIL-6-ts in konstante Konzentrationen von 1,7 nM und Inhibition durch sgp130Fc in einer seriellen Verdünnung. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die IC₅₀ wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130 Zellen mit HIL-6-ts, HIL-11-ts und cHIL-6-ts (1,7 nM) und sgp130Fc in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Um die Bindung von den Hyperzytokinen an das sgp130Fc genauer zu untersuchen, wurde gereinigtes sgp130Fc (**Abbildung 21 A**) als Ligand auf einem ProteinA Chip im Biacore X100 immobilisiert und unterschiedliche Konzentrationen von den drei Hyperzytokinen HIL-6-ts, HIL-11-ts und cHIL-6-ts als Analyt eingesetzt. Dabei ließ sich für cHIL-6-ts eine K_D von 1,24 nM, für HIL-11-ts eine K_D von 396,5 pM und für HIL-6-ts eine K_D von 243,7 pM bestimmen (**Abbildung 21 B-D**). Die Tatsache, dass von diesen drei Zytokinen das cHIL-6-ts

die schlechteste K_D zeigte, passt zu den vorherigen Resultaten aus den Proliferations- und Stimulationsassays, bei denen von allen drei Varianten das cHIL-6-ts die geringste Aktivität zeigte.

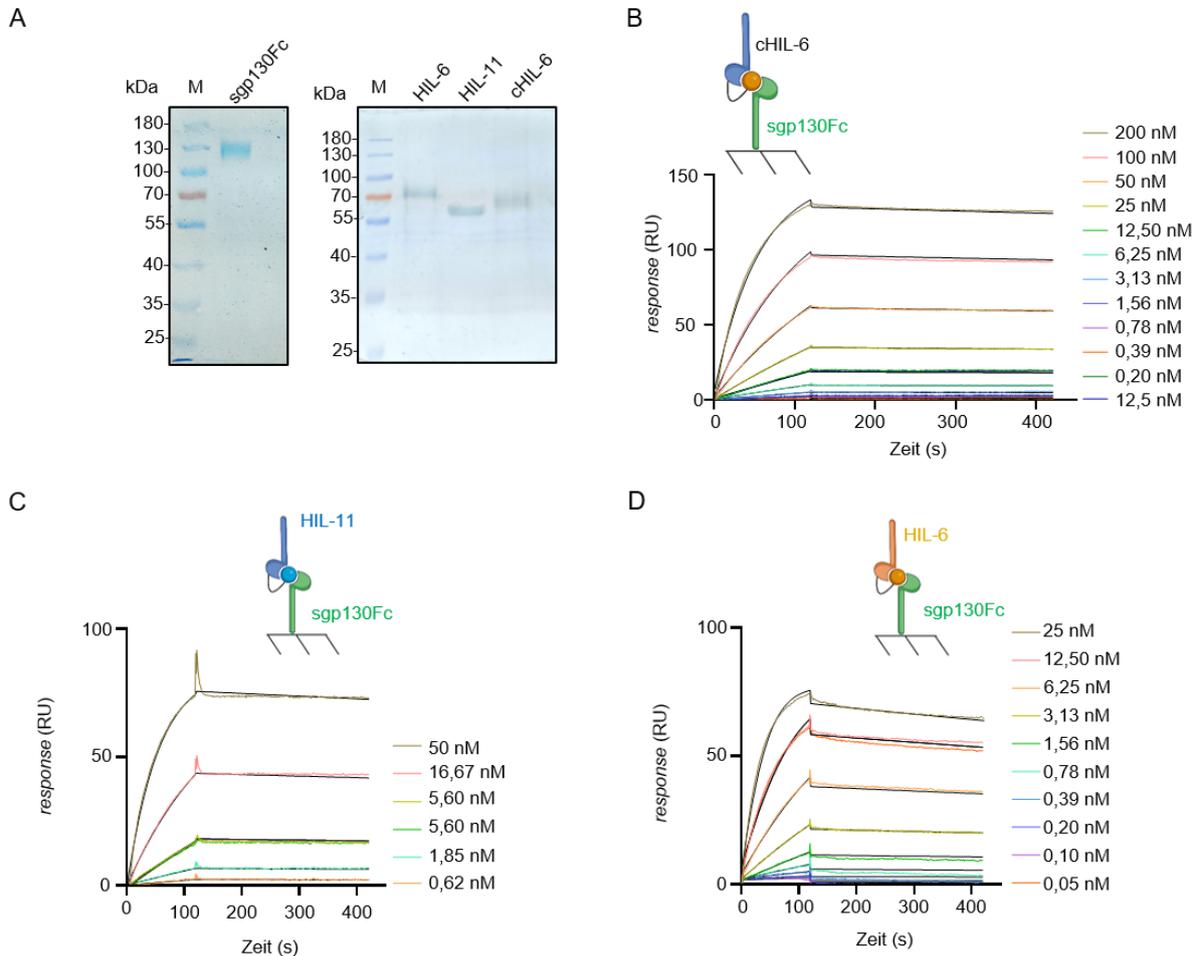


Abbildung 21 Coomassie der Hyperzytokine und sgp130Fc und SPR Messungen der Hyperzytokine auf sgp130Fc.

(A) Coomassie-Gelbild von gereinigtem sgp130Fc (links) und der Hyperzytokine mit Twin-Strep-Tag® (rechts). (B) Bindung von cHIL-6-ts zu sgp130Fc (C) Bindung von HIL-11-ts zu sgp130Fc (D) Bindung von cHIL-6-ts zu sgp130Fc. (B-C) Kinetiken wurden mit den jeweils angezeigten Konzentrationen der einzelnen Hyperzytokine als Analyten gemessen. sgp130Fc wurde als Ligand über den Fc-tag an den ProteinA chip immobilisiert. Die Sensorgramme in relativer response gegenüber der Zeit sind als farbliche Linien gezeigt und in einem 1:1 Bindungs Modell mit globalem Kurvenfit als schwarze Linien dargestellt. Die schematischen Darstellungen vom Versuchsaufbau wurden mit biorender.com erstellt.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass das neue Fusionsprotein aus IL-6 und dem sIL-11R eine Art *trans-signaling* und Signaltransduktion nachahmen kann, auch wenn die Einzelkomponenten dies in einer Co-stimulation scheinbar nicht vermitteln können.

5.4 Das chimäre Zytokin IC7 kann auch über den IL-11R einen nicht-kanonischen gp130 Rezeptorkomplex bilden

Das Zytokin IC7 stellt eine Chimäre aus den Zytokinen IL-6 und CNTF dar und vermittelt eine Signaltransduktion über den Rezeptorkomplex bestehend aus dem IL-6R, LIFR und gp130 (siehe Kapitel 1, IC7). Da die *site I* aus IL-6 für die Bindung an den IL-6R maßgeblich beteiligt ist, und nach wie vor im IC7 vorzufinden ist, stellte sich die Frage, ob IC7 ebenfalls an den IL-11R zu binden vermag und somit ebenfalls ein potentieller *crossstalk* für IC7 existiert.

Aus den Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe zu IC7 stammen die beiden Zelllinien: Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten hgp130, hIL-6R und hLIFR (Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR) sowie Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten hgp130, hIL-11R und hLIFR (Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR). Ebenso stammte das Expressionsplasmid von IC7Fc aus Vorarbeiten von P. Rafii und wurde hier nochmals mittels ExpiCHO-S™ Kultur produziert und in einer Affinitätschromatographie gereinigt (**Abbildung 22 A**). Das IC7Fc induzierte bei beiden Zelllinien eine konzentrationsabhängige Proliferation. Dabei lag der EC50 Wert von IC7Fc auf den Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR Zellen mit $38,42 \pm 19,78$ pM niedriger als auf den Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR Zellen mit einer EC50 von $7,87 \pm 1,70$ nM und zwar in etwa um den Faktor 200 (**Abbildung 22 B**).

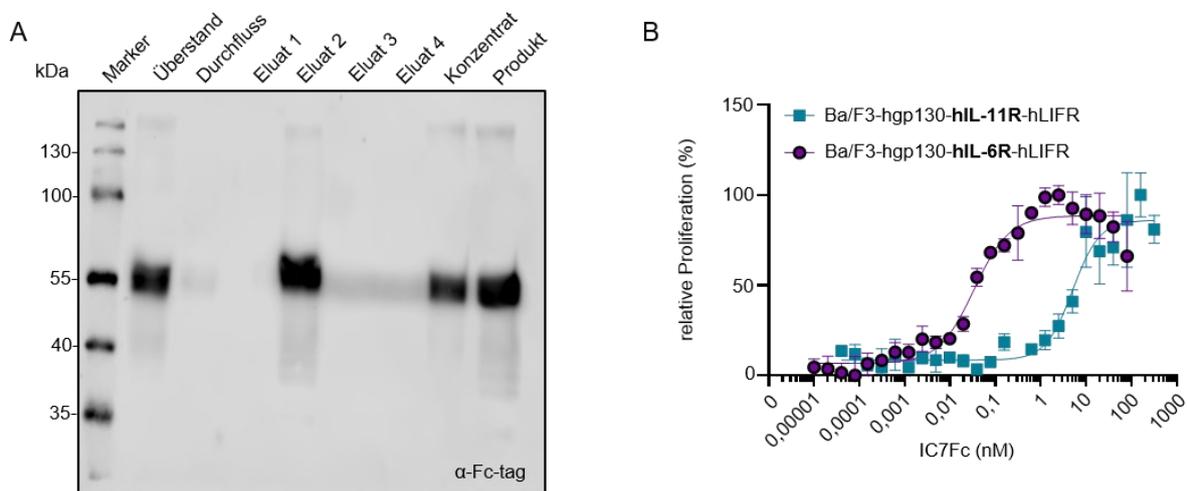


Abbildung 22 IC7Fc vermittelt einen crossstalk im classic signaling auf die Rezeptorkombination IL-11R:LIFR:gp130.

(A) Western Blot zur Proteinreinigung von hIL-11-ts. Aufgetragene Reinigungsfraktionen wie angezeigt und detektiert mittels Fc-POD Antikörper. (B) Proliferationsassay mit den Zelllinien Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR und Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR angeregt durch IC7Fc in den angezeigten Konzentrationen einer Verdünnungsreihe. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert.

Diese beiden Zelllinien wurden anschließend im Stimulationsassay auch auf eine IC7 induzierte STAT3 und ERK Aktivierung untersucht. Auf den Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR Zellen konnte das pSTAT3 und pERK Signal bei geringeren Konzentrationen von IC7Fc induziert werden, im Vergleich zu den Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR Zellen (**Abbildung 23**). Analog zum IL-6:IL-11R *crossstalk* waren auch hierbei IC7Fc-Konzentrationen in etwa um Faktor 100 höher für eine vergleichbare Stimulation notwendig.

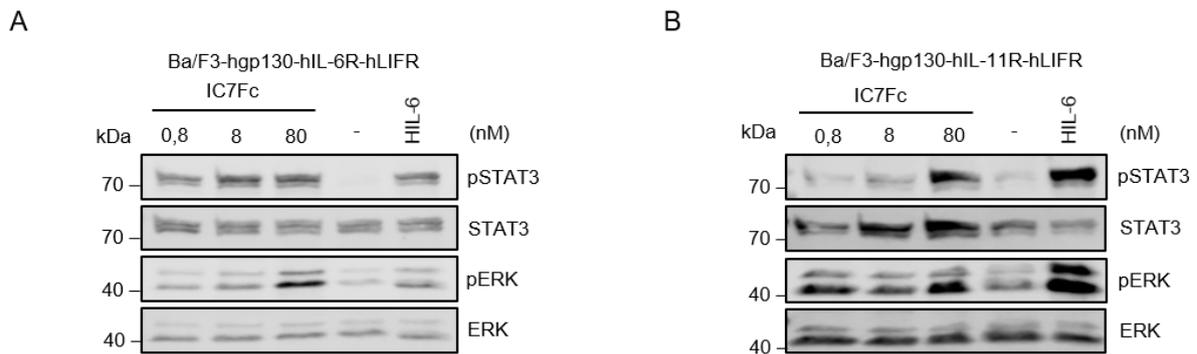


Abbildung 23 Aktivierung der Signalwege in Ba/F3 Zelllinien durch IC7Fc bei hgp130-hIL-6R-hLIFR und hgp130-hIL-11R-hLIFR Komplexen.

(A) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR Zellen durch IC7Fc in den angezeigten Konzentrationen und HIL-6Fc (10ng/ml). Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR Zellen durch IC7Fc in den angezeigten Konzentrationen und HIL-6Fc (10ng/ml). Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten gezeigt.

Weiterhin konnte auch die Bindung von IC7-ts an den immobilisierten sIL-11R-his mittels SPR gemessen werden. Damit die Bindung von IC7 an den IL-11R mit den vorherigen Messungen vergleichbar ist, wurde hierfür IC7-ts verwendet. Auch dieses Expressionsplasmid stammte aus Vorarbeiten von P. Rafii. Im Vergleich zur Bindung von IC7-ts an den sIL-6R-his mit einer K_D von 6,38 nM zeigte IC7-ts eine schlechtere Bindung an den sIL-11R, nämlich mit einer K_D von 48,14 nM (**Abbildung 24**).

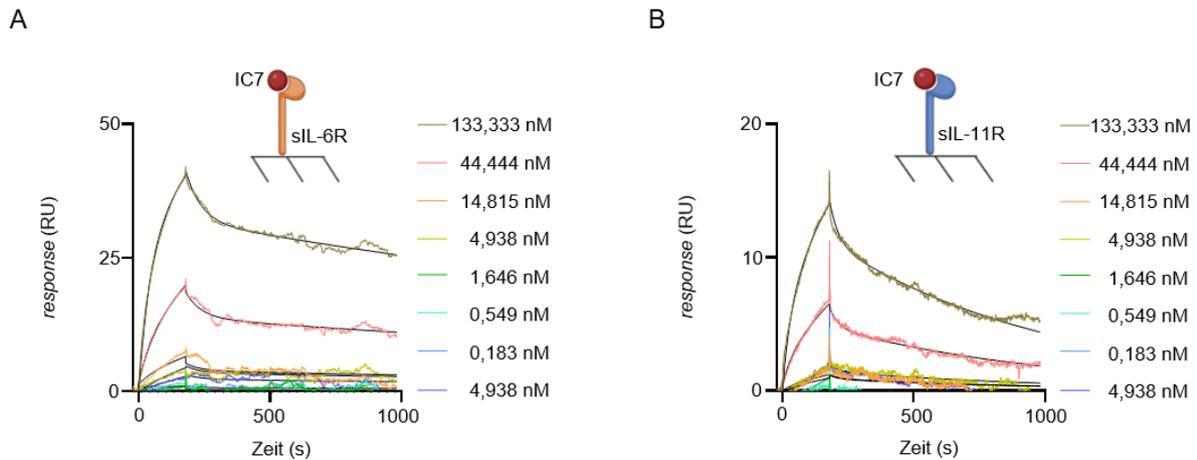


Abbildung 24 SPR-Messungen zu den Bindungsaffinitäten von IC7 an den sIL-6R und sIL-11R

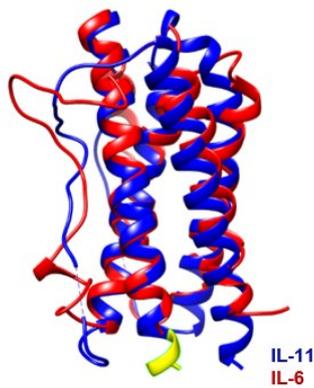
(A) IC7-ts Bindung zum sIL-6R-his (B) IC7-ts Bindung zum sIL-11R-his. Alle Kinetiken wurden in den angezeigten Konzentrationen gemessen. Während die löslichen Rezeptoren über ihren his-tag als Liganden immobilisiert wurden, wurden die jeweiligen Zytokine als Analyten hinzugegeben. Die Sensorgramme in relativer response gegenüber der Zeit sind als farbliche Linien gezeigt und in einem two-state reaction Modell mit lokalem Kurvenfit als schwarze Linien dargestellt. Die schematischen Darstellungen vom Versuchsaufbau wurden mit biorender.com erstellt.

Aus diesen Daten deutet sich an, dass das IC7 auch über das IL-6:IL-11R *crossstalk* Potential besitzt, wenn gleich es in diesem Fall genauer als ein IC7:IL-11R:LIFR *crossstalk* bezeichnet werden sollte. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bislang nur das *classic signaling* von IC7 bzgl. dieser Rezeptorkombination adressiert. Ob IC7 auch im *trans-signaling* oder als Fusionsprotein mit dem sIL-11R (sozusagen eine Art Hyperzytokin von IC7) einen *crossstalk* besitzt bleibt bislang offen.

5.5 Elongation von IL-6 um die Aminosäuren KTRL führt nicht zu einem gesteigertem *crossstalk*.

Da im Vergleich zum IL-11 ein Vielfaches an der Konzentration von IL-6 benötigt wird, um eine gleichwertige Signaltransduktion über den IL-11R auszulösen, stellte sich die generelle Frage, ob sich durch gentechnische Modifizierungen eine IL-6 Variante mit einem größeren IL-6:IL-11R *crossstalk* Potential generieren lässt. Im Strukturvergleich der beiden Zytokine (Abbildung 25 A) wurde erkennbar, dass die Aminosäuren KTRL im IL-11 einen *loop* am Ende der Rezeptor zugewandten α -Helix bildet. Diese Aminosäuren, bzw. der daraus resultierende *loop* in jener Helix ist im IL-6 nicht vorhanden, d.h. die Struktur von IL-6 endet am N-terminus und ist damit kürzer als IL-11.

A



B

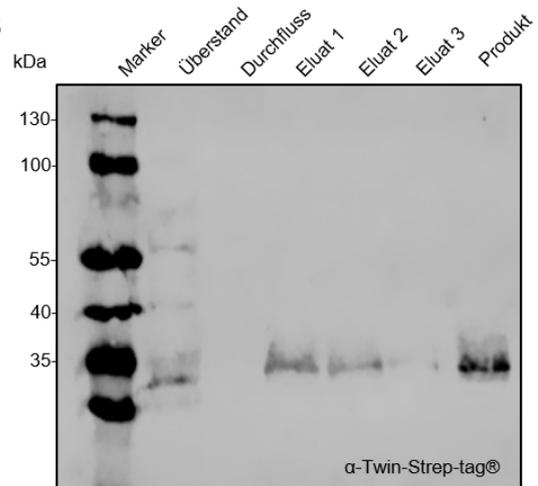


Abbildung 25 Generierung des IL-6-KTRL.

(A) Strukturvergleich von hIL-6 (rot) und hIL-11 (blau). Die Aminosäuren KTRL des IL-11 am N-Terminus sind gelb hervorgehoben. (B) Proteinreinigung von IL-6-KTRL-ts. Aufgetragene Reinigungsfractionen wie angezeigt und detektiert mittels StrepMABclassicHRP Antikörper.

Die Sequenz für das IL-6-KTRL-ts wurde direkt in einem pcDNA3.1 Vektor als Expressionsvektor pcDNA3.1-IL-6-KTRL-ts bei der Firma BioCat GmbH bestellt und per Transformation in kompetente *E.coli* eingebracht, für eine anschließende Anreicherung der Plasmid DNA. Sodann wurde das Protein mittels Transfektion im Expi293F™ Expressionssystem generiert und aus dem Kulturüberstand gereinigt (**Abbildung 25 B**).

Um zu überprüfen, ob das IL-6-KTRL-ts einen gesteigerten IL-6:IL-11R *crossstalk* besitzt, wurde es in einem Proliferationsassay auf Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen gegenüber dem wildtyp IL-6-ts getestet. Das IL-6-KTRL-ts zeigte sich hierbei mit einer EC50 von $1,05 \pm 0,60$ nM zwar als biologisch aktiv, war darüber hinaus aber nicht aktiver als das wildtyp IL-6-ts mit einer EC50 von $1,47 \pm 0,23$ nM. (**Abbildung 26**).

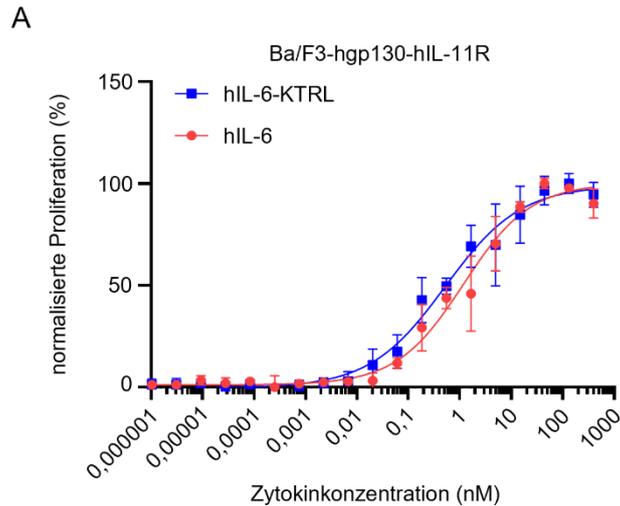


Abbildung 26 IL-6KTRL-ts zeigt eine ähnliche IL-6:IL-11R Crosstalk Aktivität wie wildtyp IL-6-ts. Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen inkubiert für 72 h mit hIL-6-ts und humanem IL-6-KTRL-ts (hIL-6-KTRL-ts) in den angezeigten Konzentrationen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert.

Zur weiteren Untersuchung wurde die Signaltransduktion mittels Western Blot untersucht. Auch hierbei zeigte die IL-6-KTRL Variante eine Aktivität auf den Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen (**Abbildung 27 A**). Auf den Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen hingegen bewirkte auch hier die IL-6-KTRL Variante, verglichen mit dem wildtyp IL-6, kein stärkeres Signal der Aktivierung in Form von pSTAT3 oder pERK (**Abbildung 27 B**).

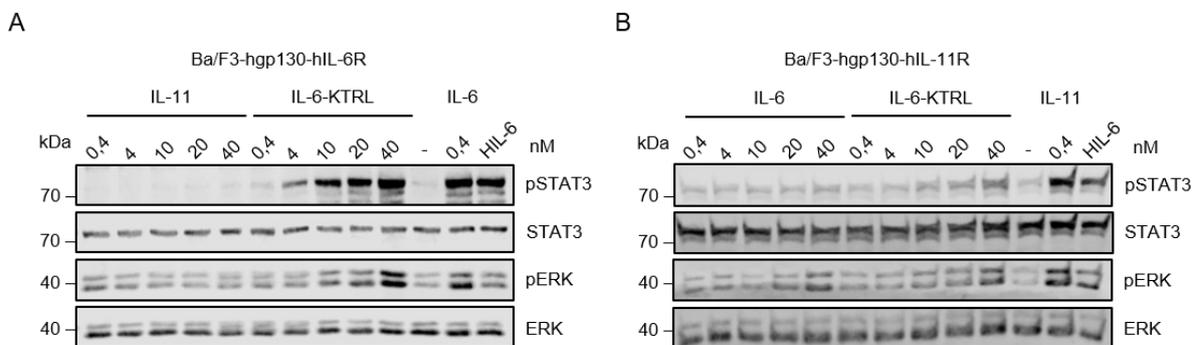


Abbildung 27 Crosstalk Stimulation durch IL-6-KTRL.

(A) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen mit hIL-11-ts, hIL-6-KTRL-ts und Hyper-IL-6-ts (HIL-6ts) (10 ng/ml) in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen mit hIL-6-ts, hIL-6-KTRL-ts und Hyper-IL-6-ts (HIL-6ts) (10 ng/ml) in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus zwei Replikaten ist gezeigt.

Auf Grund dieser initialen Ergebnisse zum IL-6-KTRL, auf dessen Potential zum IL-6:IL-11R *crosstalk*, im Vergleich zum herkömmlichen IL-6, ließ sich zunächst zwar eine ähnliche Aktivität beider Zytokinvarianten über den IL-6R erkennen, jedoch keine erhöhte *crosstalk* Signaltransduktion über den IL-11R. Obwohl hier initial nur das *classic signaling* adressiert

wurde, wurde das IL-6-KTRL nicht weiter untersucht. Stattdessen wurde fortführend eine weitere IL-6 Variation auf ein möglicherweise stärkeren *crossstalk* hin untersucht.

5.6 Generierung und Charakterisierung von den Mutationsvarianten Super-IL-6 und Super-IC7

Im Jahr 1996 publizierte C. Toniatti *et al.* eine Studie zu Mutationsvarianten von IL-6. Dabei ergaben sich Kandidaten, die über eine höhere Affinität zum sIL-6R verfügen sollten als das wildtyp IL-6. Da das *binding interface*, also die *site I* von IL-6, als den C-terminalen Teil der D-Helix und dem AB *loop* definiert wurde, hat die Arbeitsgruppe zunächst in der D-Helix über *Phage display* eine IL-6 Variante mit Substitutionen von drei Aminosäuren beschrieben Q175I, S176R und Q183A und in Kurzform als „IL-6 IRA“ betitelt. Darüber hinaus wurden im AB *loop* 16 Aminosäuren, unterteilt in vier Gruppen, als Ziele einer randomisierten Mutagenese ausgewählt. Am Ende stellte sich eine Kombination aus Mutationen in der D-Helix und im AB *loop* als kompetenteste Variante heraus, welche als „IL-6-IRA-KD“ betitelt wurde. [188]

Da Toniatti *et al.* nur die Bindung zum IL-6R untersucht haben, und die Mutante IL-6-IRA-KD eine scheinbar gesteigerte Affinität zum IL-6R besitzt, stellte sich hier nun die Frage, ob durch dieselben Mutationen auch der IL-6:IL-11R *crossstalk* affektiert ist. Zur Vereinfachung wurde das IL-6-IRA-KD fortführend als „Super IL-6“, kurz SIL-6 betitelt. In **Abbildung 28** wird die Struktur von IL-6 dargestellt und farblich hervorgehoben, sind die Aminosäuren im IL-6 die dann für die IRA-KD Mutationen ausgetauscht werden.

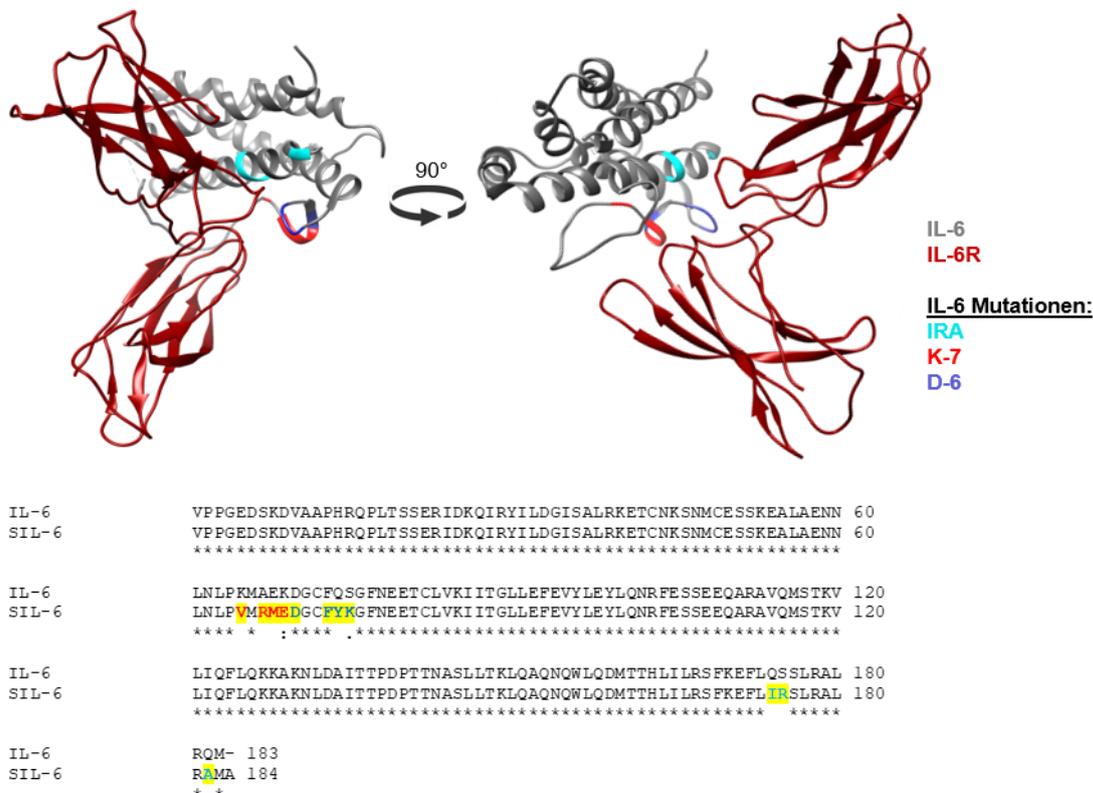


Abbildung 28 Schaubild zu den mutierten Aminosäuren im IL-6 für die Generierung des SIL-6.

Oben: Darstellung des wildtyp IL-6 (1P9M) in Chimera. In grau ist die Struktur von IL-6 dargestellt, und die des IL-6R in dunkelrot. Farblich hervorgehoben sind die Aminosäuren in der D-Helix und im AB-loop, welche für die Generierung des SIL-6 mutiert wurden. In rot die mutierten Aminosäuren aus dem Klon K-7 in der ursprünglichen KAEK library. In blau die mutierten Aminosäuren aus dem Klon D-6 in der ursprünglichen DFQS library aus. In türkis die mutierten Aminosäuren aus der IRA-Variante. In Kombination ergeben diese Mutationen die von Toniatti et al. beschriebene „IL-6-IRA-KD“ Variante, hier als „Super-IL-6“ bezeichnet. Darstellung mit Chimera 1.15 **Unten:** Aminosäuresequenz-Alignment zwischen dem wildtyp IL-6 und dem SIL-6, farblich hervorgehoben die mutierten Aminosäuren. Alignment mittels Clustal O (1.2.4) <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>, basierend auf [54].

Die cDNA für SIL-6 wurde über die Firma BioCat GmbH bestellt und mittels der Restriktionsenzyme HindIII und NotI enzymatisch geschnitten und sodann in einen geöffneten pcDNA3.1 Fc-Expressionsvektor (pcDNA3.1-HIL-11Fc ebenfalls mittels HindIII und NotI geschnitten) ligiert. Der resultierende Expressionsvektor pcDNA3.1-SIL-6Fc wurde dann in kompetente *E.coli* transformiert und vervielfältigt. Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann zusätzlich nochmal mit den Restriktionsenzymen NheI und NotI restringiert und in einen ebenfalls derartig geschnittenen HIL-6-ts-Vektor ligiert zu einer SIL-6-Twin-Strep-tag® Version umkloniert. Im Übrigen wurde der gleiche Ansatz zusätzlich im IC7 verfolgt, um auch hier untersuchen zu können, ob durch das Einbringen jener Mutationen sich der IC7:IL-11R:LIFR *crossstalk* modifizieren lässt. Dies ist möglich, da diese Mutationen sich auch

im IL-6 stämmigen Teil von IC7 abbilden ließen. Da die Plasmide pcDNA3.1-IC7Fc und pcDNA3.1-IC7-ts aufgrund der Arbeit von Puyan Rafii bereits im Institut vorlagen, wurde hier nur das IC7-IRA-KD (folgend auch Super-IC7, kurz: SIC7) über BioCat GmbH bestellt. Die bestellte Sequenz wurde auch, wie zuvor beschrieben, umklontiert in einen Expressionsvektor mit Fc-tag und in einen Expressionsvektor mit Twin-Strep-Tag®. Sowohl IL-6Fc, IC7Fc, SIL-6Fc und SIC7Fc (**Abbildung 29 A**) sowie IL-6-ts, IC7-ts, SIL-6-ts und SIC7-ts (**Abbildung 29 B**) wurden in Expi293-F™ Zellen durch transiente Expression produziert und aus deren Kulturüberständen mittels Affinitätschromatographie isoliert und gereinigt.

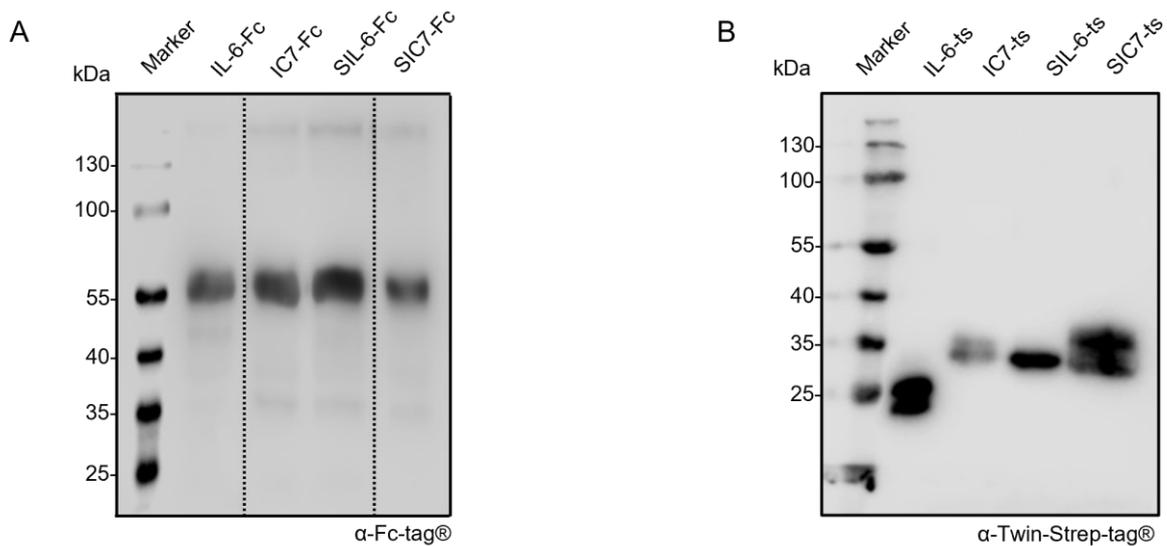


Abbildung 29 Rekombinante Proteine IL-6, IC7, SIL-6 und SIC7.

(A) Western Blot von gereinigten rekombinanten Proteinen IL-6, IC7, SIL-6 und SIC7 als Proteinvarianten mit Fc-tag. Aufgetragen wurden jeweils 100 ng gereinigtes Protein. Detektiert mittels human-Fc-POD Antikörper. Theoretische Proteingrößen: IL-6Fc 48,7 kDa, IC7Fc 49,6 kDa, SIL-6Fc 48,8 kDa, SIC7Fc 49,7 kDa. (B) Western Blot von gereinigten rekombinanten Proteinen IL-6, IC7, SIL-6 und SIC7 als Proteinvarianten mit Twin-Strep-tag®. Aufgetragen wurden jeweils 100 ng gereinigtes Protein. Detektiert mittels StrepMABclassicHRP Antikörper. Theoretische Proteingrößen: IL-6ts 23,9 kDa, IC7ts 26,4 kDa, SIL-6Fc 25,6 kDa, SIC7ts 26,5 kDa.

Die biologische Aktivität und ob ein verstärktes IL-6:IL-11R *crossstalk* Potential vorliegt wurde initial mittels Proliferationsassay untersucht. Hierbei zeigten hIL-6-ts und hSIL-6-ts mit $1,64 \pm 0,25$ pM bzw. $1,33 \pm 0,03$ pM eine robuste und vergleichsweise ähnliche Induktion der Proliferation von Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR (**Abbildung 30 A**). In diesem Versuchsteil wurden Zellen inklusive LIFR verwendet, da neben IL-6 und SIL-6 hier auch IC7 und SIC7 von Interesse waren. Aufgrund der Arbeiten von Puyan Rafii zu IC7 lagen diese Zellen bereits im Institut vor (wie auch zuvor beschrieben und verwendet, siehe oben, *crossstalk* von IC7). Auf Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR ergaben sich allerdings unterschiedliche Werte für die halbmaximale Effektorkonzentration mit $755,20 \pm 265,79$ pM für das hIL-6-ts bzw.

36,29 ± 6,61 pM für das hSIL-6-ts (**Abbildung 30 B**). Auch diese Zellen sind in Vorarbeiten entstanden und wurden hier verwendet.

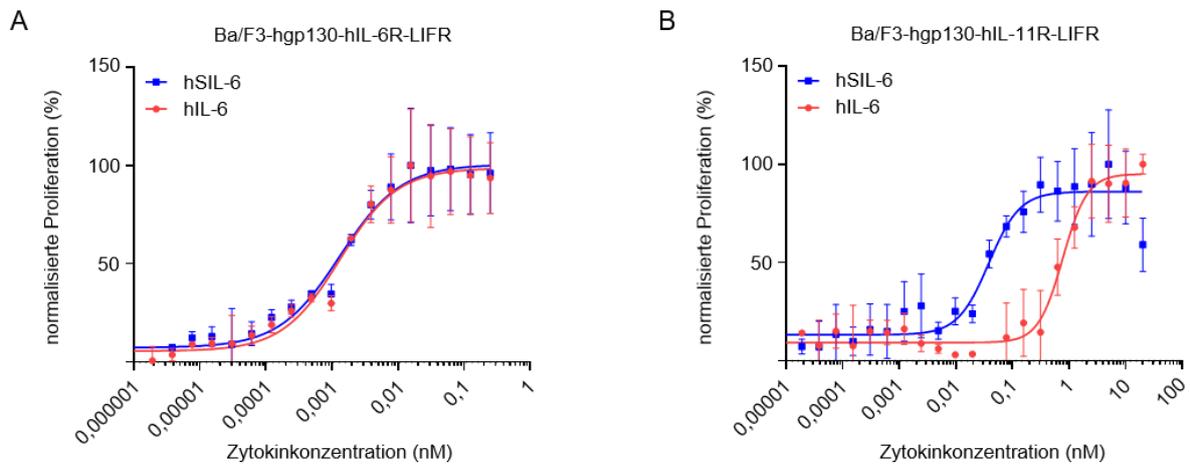


Abbildung 30 SIL-6 zeigt eine verstärkte Induktion einer Proliferation im IL-6:IL-11R Model.

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten humanen gp130 (hgp130), humanen IL-6R und humanen LIFR (Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR) inkubiert für 72 h mit hIL-6-ts und humanem Super-IL-6-ts (hSIL-6-ts) in den angezeigten Konzentrationen. (B) Proliferationsassay mit Ba/F3 Zellen mit stabil transduzierten humanen gp130 (hgp130), humanen IL-11R und humanen LIFR (Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR) inkubiert für 72 h mit hIL-6-ts und humanem Super-IL-6-ts (hSIL-6-ts) in den angezeigten Konzentrationen. Zu A und B: Je ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert.

Hieraus ließ sich ableiten, dass zum einem das SIL-6-ts zumindest genauso aktiv aber nicht unbedingt potenter auf den Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR Zellen ist, wohingegen auf den Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR Zellen das SIL-6-ts gegenüber dem IL-6-ts als wirksamer erscheint.

Im Stimulationsassay wurde initial nur das IL-6Fc versus dem SIL-6Fc auf Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen sowie auf Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen getestet und auf die Phosphorylierung von STAT3 hin untersucht. Während auch hier auf den Ba/F3-hgp130-hIL-6 Zellen beide Varianten eine Aktivierung des pSTAT3 ab 4 nM auslösten (**Abbildung 31 A**),

zeigte das SIL-6Fc auf den Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen ein pSTAT3 Signal ab einer Konzentration von 20 nM (**Abbildung 31 B**).

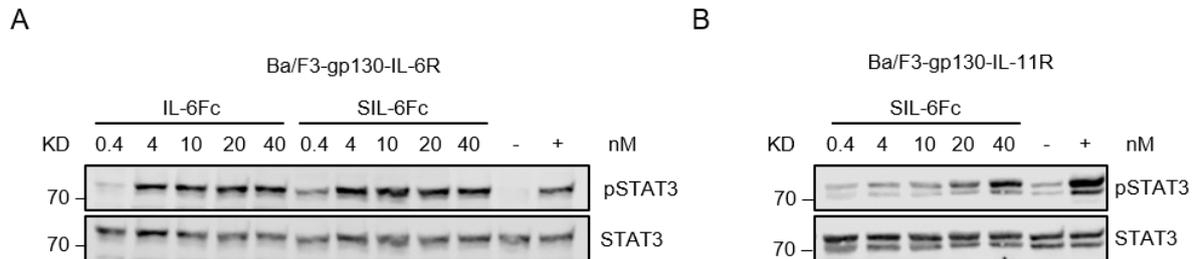


Abbildung 31 Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs durch SIL-6.

(A) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen mit hIL-6Fc, hSIL-6Fc und HIL-6-ts (10 ng/ml) in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus zwei Replikaten ist gezeigt. (B) Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen mit hSIL-6Fc und HIL-6ts (10 ng/ml) in den angezeigten Konzentrationen für 20 min. Western Blot zur Detektion von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK. Ein repräsentatives Beispiel aus zwei Replikaten ist gezeigt.

Dies entspricht einer ähnlichen Konzentration an Zytokin zur Induktion eines pSTAT3 Signals wie es auch schon in **Abbildung 7 B** zu sehen war, wo 40 nM IL-6 pSTAT3 in Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen aktivierte. Im Bezug zur Publikation von Toniatti *et al.* konnte hier in den Modellen zum IL-6 *classic signaling* kein Unterschied in der *crossstalk* Potenz von IL-6 zu SIL-6 festgestellt werden, da beide IL-6 Varianten in ihrer Aktivität sich sehr ähnlich. Erwähnenswert ist hierbei allerdings, dass Toniatti *et al.* eine stärkere Aktivität dem SIL-6 in einem *trans-signaling* Modell zugeschrieben haben, da sie Proliferationsassays mit Ba/F3-hgp130 Zellen mit sIL-6R und den diversen IL-6 Varianten getestet haben.

Um dies genauer zu untersuchen, wurde im Folgendem auch das *trans-signaling* von SIL-6 in der Zellkultur mit Ba/F3-hgp130 Zellen simuliert und untersucht. Die humanen Zytokine hIL-6-ts und hIL-11-ts und hSIL-6-ts wurden zusammen mit den shIL-6R und shIL-11R kombiniert und auf Ba/F3-hgp130 Zellen auf deren Proliferation hin untersucht. Während beide wildtyp (wt) Zytokine in Kombination mit ihrem kanonischen Rezeptor eine robuste Proliferation auslösten, zeigte sich, dass das wt hIL-6-ts in jeglicher getesteten Konzentration mit dem shIL-11R als inaktiv. Das hSIL-6-ts jedoch löste in Kombination mit dem shIL-11R eine konzentrationsabhängige Proliferation aus und das signifikant gegenüber dem wt hIL-6-ts bei jeder der getesteten Konzentration von hSIL-6-ts. (**Abbildung 32**).

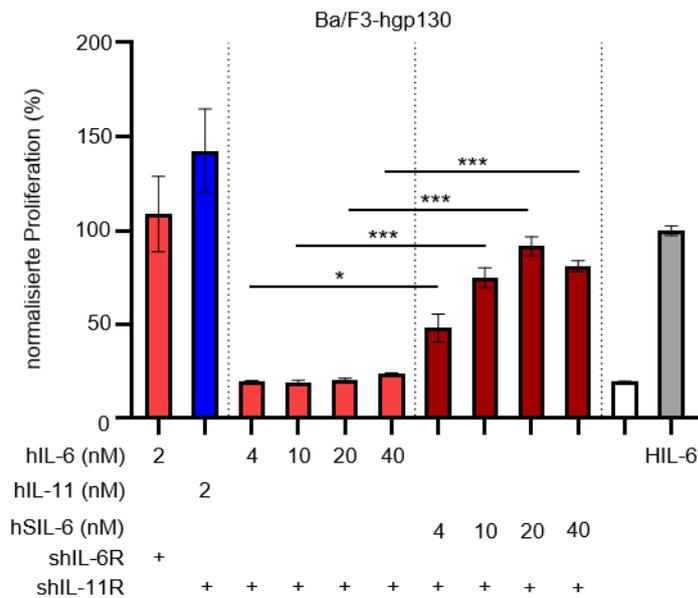


Abbildung 32 *SIL-6 vermittelt einen IL-6:IL-11R Crosstalk im trans-signaling in vitro Modell.*

Proliferationsassay auf Ba/F3-hgp130 mit co-kultivierung von hIL-6-ts, hIL-11-ts oder SIL-6-ts in den angezeigten Konzentrationen und in Kombination mit dem shIL-6R (4,4 nM) bzw. shIL-11R (4,4 nM). Als Positivkontrolle wurde HIL-6Fc (10 ng/ml) verwendet. Für die Statistik wurde eine one-way ANOVA Analyse durchgeführt. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Zudem wurde auch dieses Experiment auf einen Stimulationsassay übertragen, indem Ba/F3-hgp130 Zellen mit den gleichen Zytokinen und Rezeptoren wie zuvor kombiniert und für 20 Minuten stimuliert wurden. Die phosphorylierten STAT3 und ERK Signale wurden im Western Blot untersucht. Bei hohen Konzentrationen (20 nM) von hSIL-6-ts und shIL-11R konnte eine leichte pSTAT3 Aktivierung detektiert werden. Dies war bei gleichen Kombinationen mit wt hIL-6-ts gegenüber dem hSIL-6-ts nicht der Fall. (**Abbildung 33**).

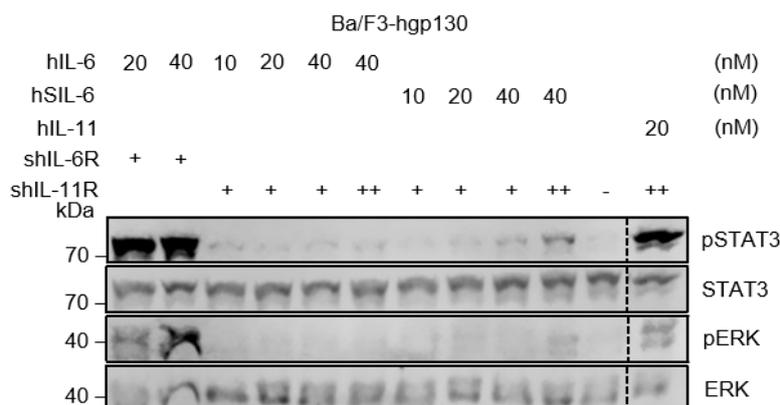


Abbildung 33 *SIL-6 induzierte Phosphorylierung von STAT3 und ERK in Kombination mit dem sIL-11R auf Ba/F3-hgp130 Zellen.*

Western Blot von (phosphoryliertem) STAT3 und ERK Signalen von Ba/F3-hgp130 Zellen co-kultiviert mit hIL-11-ts, hIL-6-ts oder hSIL-6-ts in den angezeigten Konditionen zusammen mit sIL-6R oder sIL-11R (+ = 4,4 nM, ++ = 22,2 nM). Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Diese beiden Experimente lieferten erste Hinweise, dass die Mutationsvariante SIL-6 aktiver gegenüber der wildtyp Version von IL-6 ist. Wenn auch im *classic signaling* über den IL-6R kein Unterschied erkennbar war, zeigte sich das SIL-6 im *trans-signaling* als aktiver. Eingangs stellte sich zudem die Frage, ob durch die eingebrachten Mutationen gleichzeitig auch die *crossstalk* Affinität zum IL-11R beeinflusst wird. Interessanterweise zeigte sich hierbei das SIL-6 ebenfalls mit einem gesteigerten Potenzial der Signaltransduktion im IL-6:IL-11R *crossstalk*. Wie zuvor erwähnt ließen sich die Mutationen auch im IC7 einbauen, da die entsprechenden Stellen im IC7 analog zum IL-6 sind.

Im Proliferationsassay auf Ba/F3-hgp130-hIL-6R-LIFR war das SIC7-ts mit einer EC50 von $2,34 \pm 0,43$ nM etwas aktiver als das IC7-ts mit $12,18 \pm 3,60$ nM (**Abbildung 34 A**). Ein deutlicherer Unterschied war allerdings auf den Ba/F3-hgp130-hIL-11R-LIFR Zellen bezüglich dem IL-11R:LIFR *crossstalk* von SIC7 und IC7 beobachtbar. Mit einer EC50 von $0,06 \pm 0,04$ nM für SIL-6-ts gegenüber $1,43 \pm 1,26$ nM für IC7-ts (**Abbildung 34 B**).

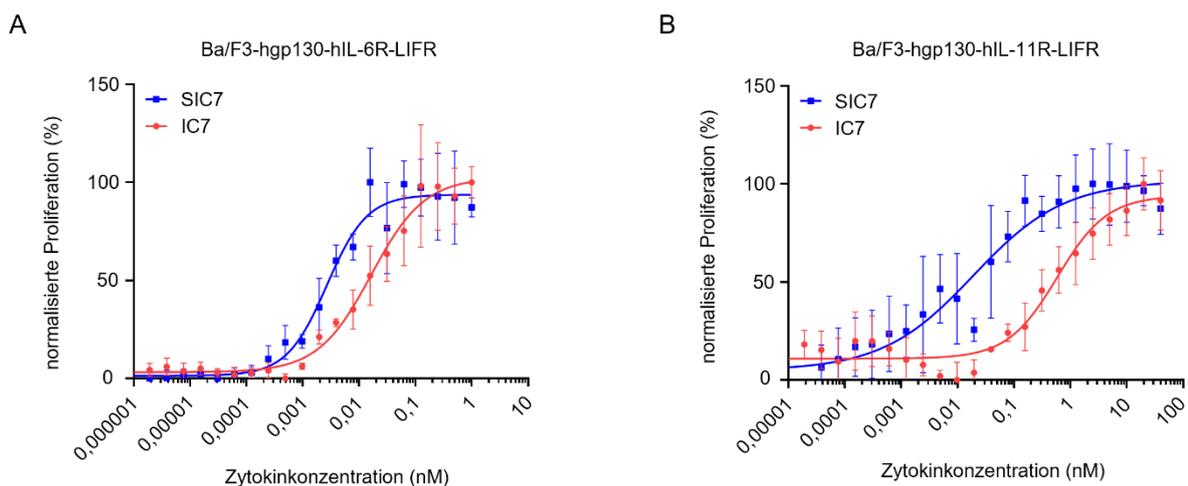


Abbildung 34 Erhöhtes *crossstalk* Potential von SIC7 gegenüber IC7

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR Zellen inkubiert für 72 h mit IC7-ts und Super-IC7-ts (SIC7-ts) in den angezeigten Konzentrationen. (B) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-11R-hLIFR Zellen inkubiert für 72 h mit IC7-ts und SIC7-ts in den angezeigten Konzentrationen. Zu A und B: Je ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert.

Auch für SIL-6-ts und SIC7-ts wurden Messungen der Affinität an die α -Rezeptoren sIL-6R-his bzw. sIL-11R-his mittels SPR durchgeführt. Zur Einordnung der gemessenen Bindungsaffinitäten wird im Folgenden jeweils auf die Messungen aus Kapitel 5.1, und 5.4 Bezug genommen, in denen die wildtyp Varianten von IL-6-ts und IC7-ts bereits beschrieben wurden. Für SIL-6-ts ergab sich eine Bindungsaffinität der K_D von 1,47 nM zum sIL-6R-his (**Abbildung 35 A**), was verglichen zum IL-6-ts mit 2,29 nM keinen deutbaren Unterschied darstellt. Interessanterweise zeigt auch das SIL-6-ts zum sIL-11R-his mit einer K_D von

25,58 nM keine erhöhte Bindungsaffinität gegenüber dem IL-6-ts mit 22,61 nM (**Abbildung 35 B**). Beim SIC7-ts zum sIL-6R-his wurde eine K_D von 0,73 nM gemessen, was verglichen mit dem IC7-ts ($K_D = 6,38$ nM) eine erhöhte Bindungsaffinität darstellt (**Abbildung 35 C**). Für SIC7-ts zum sIL-11R-his hingegen wurde eine geringere K_D von 256,4 nM gemessen was eine schlechtere Bindungsaffinität als das IC7-ts mit einer K_D von 48,14 nM aufweisen würde (**Abbildung 35 D**).

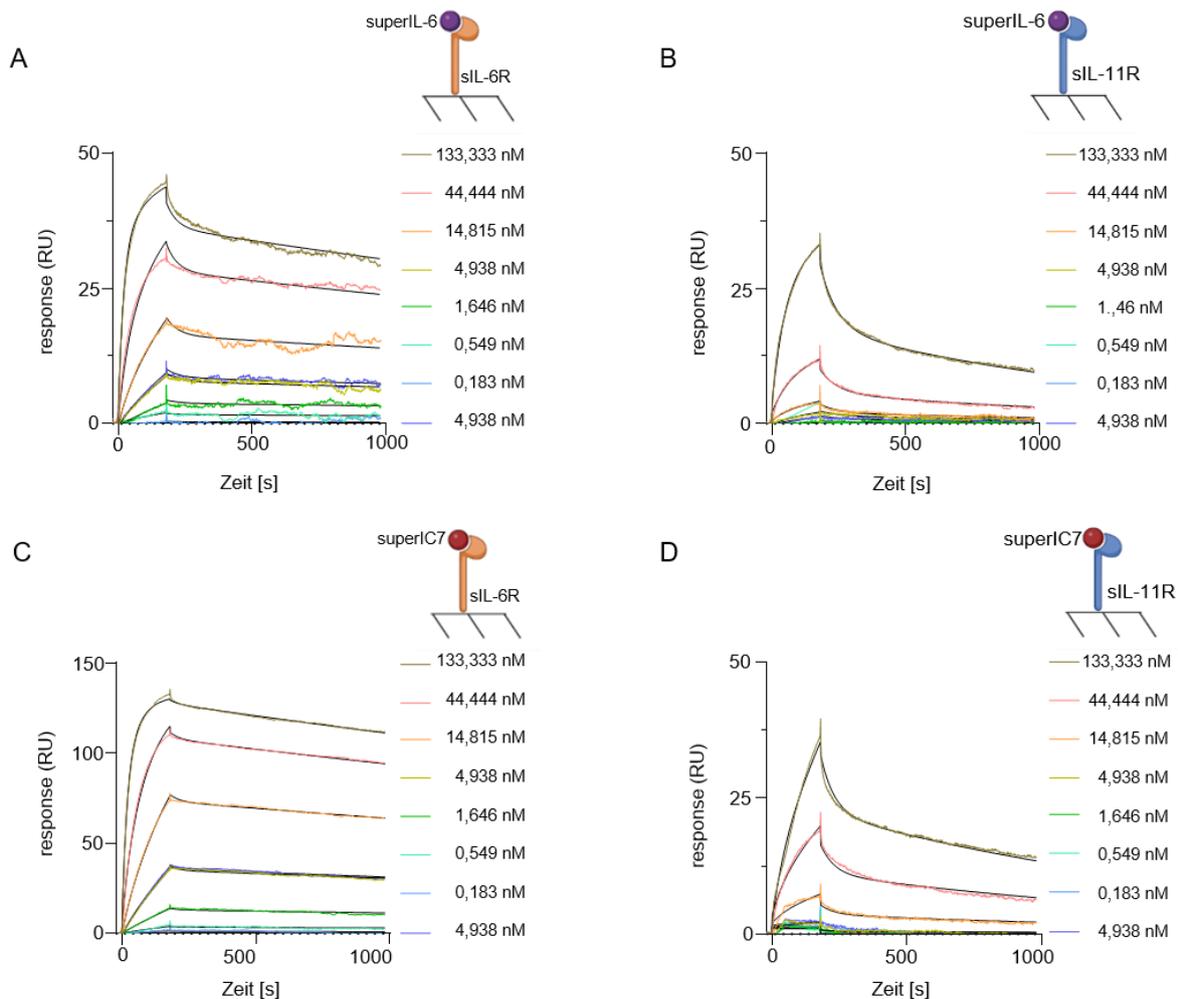


Abbildung 35 SPR zur Messung der Affinitäten von SIL-6 und SIC7 auf den IL-6R bzw. IL-11R. (A) SIL-6-ts Bindung zum immobilisierten sIL-6R-his (B) SIL-6-ts Bindung zum immobilisierten sIL-11R-his (C) SIC7-ts Bindung zum immobilisierten sIL-6R-his (D) SIC7-ts Bindung zum immobilisierten sIL-11R-his (A-D). Alle Kinetiken wurden in den angezeigten Konzentrationen gemessen. Während die löslichen Rezeptoren über ihren His-tag als Liganden immobilisiert wurden, wurden die jeweiligen Zytokine als Analyten hinzugegeben. Die Sensorgramme in relativer response gegenüber der Zeit sind als farbliche Linien gezeigt und in einem two-state reaction Modell mit lokalem Kurvenfit als schwarze Linien dargestellt. Die schematischen Darstellungen vom Versuchsaufbau wurden mit biorender.com erstellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Daten zum SIL-6-ts eine nicht eindeutige Interpretation bezüglich des IL-6:IL-11R *crossstalks* zulassen. Denn auch wenn im Modell zum *classic signaling* kein Unterschied zum wildtyp IL-6 erkennbar war, wohl aber im *trans-signaling* Modell, zeigten die SPR-Messungen keine Unterschiede in den

Bindungsaffinitäten zwischen dem IL-6-ts und dem sIL-6-ts weder zum IL-6R noch zum IL-11R. Möglicherweise ist hierbei die weitere Interaktion mit dem gp130 in den biologischen Assays zu beachten, welche im verwendeten SPR-Model nicht mit abgebildet wurde.

Für das SIC7 schienen die Daten aus dem Proliferationsassay ebenfalls auf einen verstärkten *crossstalk* hinzudeuten, da es sich aber nur um initiale Untersuchungen handelte, fehlen hierzu Verifizierungen, beispielweise durch einen Stimulationsassay. Bezüglich der SPR-Messungen widersprach vor allem die Messung von SIC7-ts mit dem sIL-11R-his der zuvor beobachteten geringeren EC50 von SIC7-ts. Auch hierbei müsse man gegebenenfalls die weiteren Interaktionen von gp130 mit in Betracht ziehen.

5.7 Einzelne Aminosäuresubstitutionen sowie eine Kombination dieser Mutationen im IL-6 zeigten keine Reduzierung des IL-6:IL-11R crossstalk Potenzials

Beim Vergleich der beiden Strukturen von IL-6 an den IL-6R und der möglichen Kombination von IL-6 an den IL-11R wurden mögliche Aminosäuren in der *site I* des IL-6 gesucht um den IL-6:IL-11R *crossstalk* durch Substitution dieser Aminosäuren zu verringern. Hierzu wurden zwei Ansätze verfolgt: Für den ersten Ansatz wurden Aminosäuren im IL-6 gewählt, die mit beiden α -Rezeptoren interagieren könnten, und durch deren Austausch möglichst die Interaktion mit dem IL-6R erhalten bleibt, die Affinität zum IL-11R allerdings reduziert wird. Zusätzlich wurden jene Aminosäuren versucht ausfindig zu machen, die ausschließlich an den IL-11R binden könnten, und durch deren Austausch ein möglicher IL-6:IL-11R *crossstalk* geschwächt wird. Daraus folgend ergaben sich vier Mutationen die hier vom theoretischen Modell *in silico*, versucht wurden, in *in vitro* Untersuchungen zu übertragen. Die Mutationen, um die es sich dabei handelt sind K53D, E68V, E171A und S175A (**Abbildung 36**).

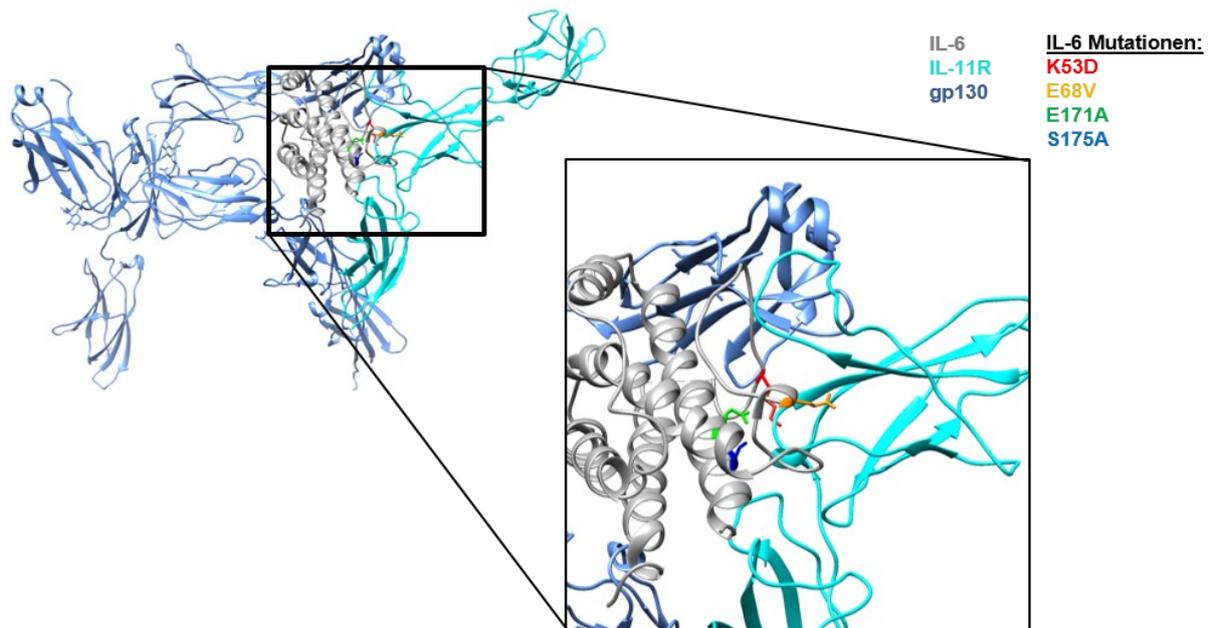


Abbildung 36 In silico Modell zum IL-6:IL-11R crosstalk Zytokin-Rezeptorkomplex.

Alignment der Strukturen von IL-6 in grau (PDB: 1P9M) und dem IL-11 Komplex in türkis (IL-11R) und dunkelblau (gp130) (PDB: 8DTP). In den Farben rot, gelb, grün und blau sind die Aminosäuren des IL-6 hervorgehoben, welche substituiert wurden. Model erstellt in Chimera.

Die Mutationen K53D, E68V, E171A, S175A wurden zunächst einzeln im IL-6 integriert und versucht zu exprimieren. Für die Generierung dieser Einzelmutationen, sprich den Austausch von je einer Aminosäure im IL-6 wurde eine PCR durchgeführt. Als Vorlage diente hier der pcDNA3.1 Vektor des humanen IL-6 mit einem Twin-Strep-Tag® (pcDNA3.1-hIL-6-ts). Hierfür wurden auf der Internetseite <https://nebasechangerv1.neb.com/> Oligonukleotide erstellt. Mit Hilfe dieser (siehe Tabelle 7), und des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs®), wurde die Plasmid-DNA nach einer mit der Phusion Polymerase durchgeführten PCR, mit DpnI geschnitten und in chemisch kompetente *E. coli XL-1 blue* Zellen transformiert. Von den gewachsenen Bakterienkolonien auf den Agarplatten wurde eine Mini-Präparation durchgeführt (siehe 4.2.7). Im Anschluss wurden je cDNA, aus drei verschiedenen Klonen, die Plasmide zur Sequenzierung eingeschickt. Nachdem die Aminosäuresequenzen der pcDNA3.1 Plasmide durch eine Sequenzierung bestätigt wurden, wurde eine Midi-Präparation zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA durchgeführt und anschließend in ExpiCHO™ Zellen transfiziert und exprimiert. Aus den Kulturüberständen wurden die IL-6 Mutationsvarianten mittels Affinitätschromatographie über einen Twin-Strep-Tag® gereinigt. Alle vier Mutationsvarianten ließen sich hierbei zunächst erfolgreich exprimieren und reinigen (**Abbildung 37**).

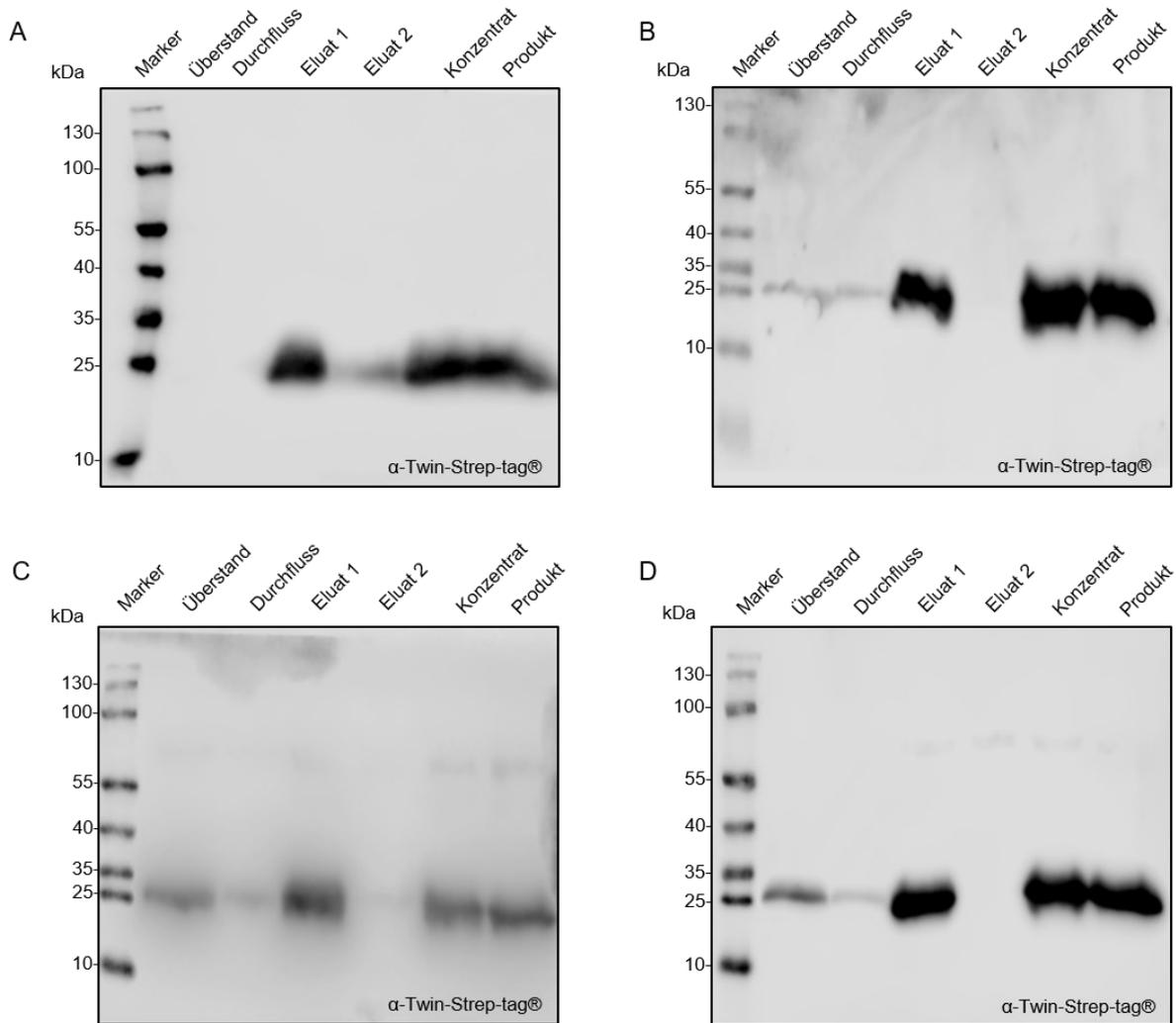


Abbildung 37 Proteinreinigungen von IL-6 Einzelmutationsvarianten zur Untersuchung auf verminderten IL-6:IL-11R Crosstalk.

Reinigung von Kulturüberständen von transfizierten ExpiCHO™ Kulturen. Reinigung mittels Affinitätschromatographie über einen Twin-Strep-Tag®. (A) IL-6-K53D-ts, theoretische Größe 23,9 kDa (B) IL-6-E68V-ts, theoretische Größe 23,9 kDa (C) IL-6-E171A-ts, theoretische Größe 23,8 kDa und (D) IL-6-S175A-ts, theoretische Größe 23,9 kDa. Aufgetragene Reinigungsfraktionen wie angezeigt und detektiert mittels StrepMABclassiHRP Antikörper.

Die Mutationsvarianten wurden zunächst gemeinsam und zum Vergleich mit dem wt IL-6 auf ihren kanonischen Rezeptor, den IL-6R, getestet, um zu überprüfen, ob sie Ihre eigentliche Funktionalität erhalten blieb. Hierfür wurden alle vier Varianten sowie das wt IL-6 auf Ba/F3-hgp30-hIL-6R im Proliferationsassay untersucht. Alle Zytokine zeigten hierbei eine ähnliche EC50: wt IL-6-ts $3,89 \pm 0,83$ pM; IL-6-K53D-ts $4,99 \pm 2,34$ pM; IL-6-E68V-ts $11,19 \pm 9,44$ pM; IL-6-E171A-ts $7,02 \pm 5,31$ pM; IL-6-S175A-ts $8,23 \pm 5,90$ pM (Abbildung 38 A). Anschließend wurde die Proliferationsstärke jeder IL-6 Variante auf den IL-6:IL-11R Crosstalk hin geprüft. Hierbei zeigten alle getesteten Varianten auf Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen ebenfalls eine nicht stark abweichende EC50: wt IL-6-ts $4,40 \pm 0,98$ nM; IL-6-K53D-ts

5,28 ± 1,60 nM; IL-6-E68V-ts 5,31 ± 4,51 nM; IL-6-E171A-ts 16,15 ± 11,05 nM; IL-6-S175A-ts 15,69 ± 11,05 pM (Abbildung 38 B).

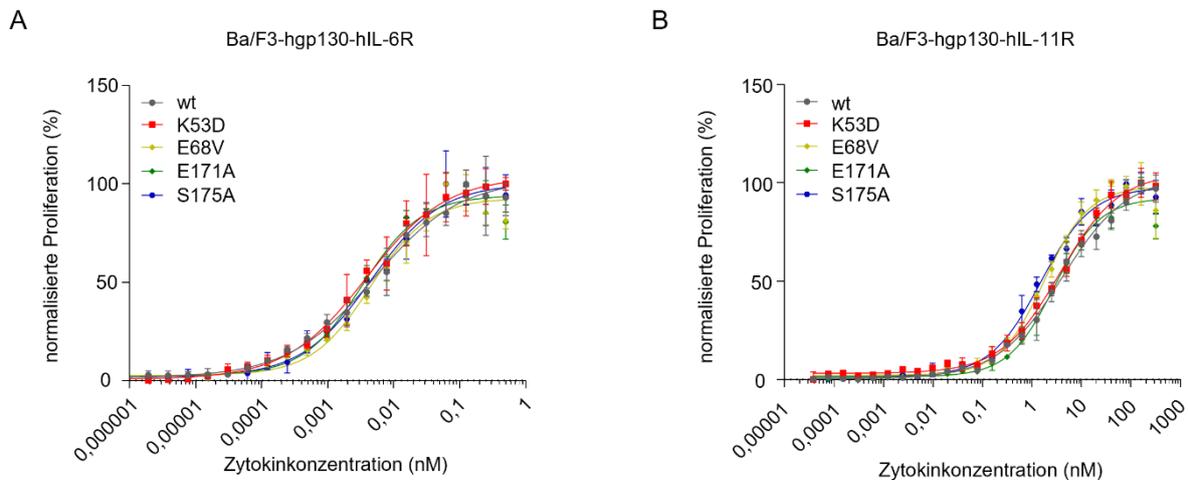


Abbildung 38 Einzelmutationen im IL-6 zeigen kein verändertes IL-6:IL-11R Crosstalk Potenzial.

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen inkubiert für 72 h mit wt hIL-6-ts, hIL-6-K53D-ts, hIL-6-E68V-ts, hIL-6-E171A-ts und hIL-6-S175A-ts in den angezeigten Konzentrationen. (B) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL11R Zellen inkubiert für 72 h mit wt hIL-6-ts, hIL-6-K53D-ts, hIL-6-E68V-ts, hIL-6-E171A-ts und hIL-6-S175A-ts in den angezeigten Konzentrationen. Zu A und B: Je ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert.

Auch wenn es als ersten Erfolg galt, dass sich die Varianten der Einzelmutationen exprimieren und Reinigen ließen, so schienen die eingebrachten Mutationen im Vergleich zum wildtyp IL-6 wenig bis gar keinen Effekt auf den IL-6:IL-11R Crosstalk zu zeigen. Die ursprüngliche Funktion, der Komplexbildung mit dem IL-6R blieb aber wohl erhalten. Aus diesem Ansatz heraus wurde versucht, ein IL-6 zu generieren, welches diese vier Mutationen vereint. Ein hIL-6-K53D-E68V-E171A-S175A-ts, welches folgend zur Vereinfachung als „Monospecific IL-6-ts“ oder kurz „MIL-6-ts“ bezeichnet wird. Die Gensequenz von MIL-6-ts in einem pcDNA3.1(+) Plasmid wurde *in silico* erstellt und über die BioCat GmbH bestellt. Die synthetisierte Sequenz wurde dann in einen

pcDNA3.1-Twin-Step-tag[®] Expressionsvektor kloniert. Diese kombinierte Variante der Mutationen wurde dann ebenfalls in ExpiCHO[™] Zellen per Transfektion exprimiert und aus dem Kulturüberstand mittels Affinitätschromatographie gereinigt (Abbildung 39).

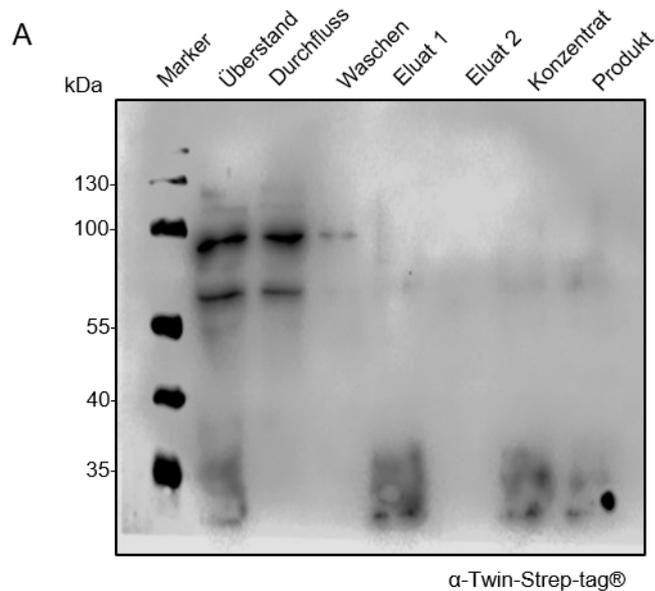


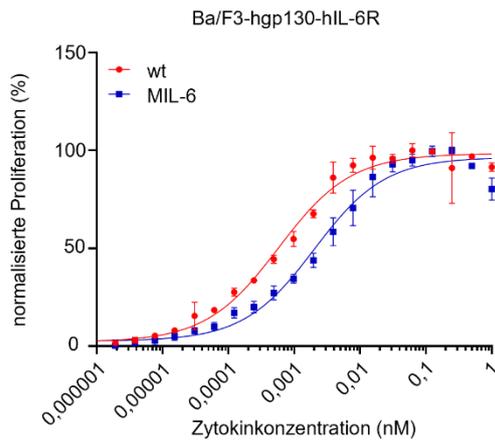
Abbildung 39 Proteinreinigung von MIL-6-ts.

Proteinreinigung von MIL-6-ts aus einem Kulturüberstand von transfizierten ExpiCHO™ Zellen. Reinigung mittels Affinitätschromatographie über einen Twin-Strep-Tag®. Theoretische Größe 25,3 kDa. Aufgetragene Reinigungsfractionen wie angezeigt und detektiert mittels StrepMABclassicHRP Antikörper.

Auch bei dieser IL-6 Variante schien eine Expression und Reinigung erfolgreich zu sein, sodass anschließend die biologische Aktivität auf den IL-6R und das IL-6:IL-11R *crossstalk* Potential getestet werden konnte.

Das MIL-6 wurde zunächst auf Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen auf seine biologische Aktivität hin getestet und mit dem wt IL-6 verglichen. Während das wt IL-6-ts wie erwartet wieder eine EC50 im Bereich im pikomolaren Bereich zeigte (hier genauer: $0,77 \pm 0,22$ pM), erwies sich das MIL-6-ts als ähnlich aktiv mit $3,97 \pm 3,37$ pM (**Abbildung 40 A**). Danach wurde das MIL-6-ts auf den IL-6:IL-11R *crossstalk* hin überprüft, aber auch hier zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zum wt IL-6-ts (EC50 wt IL-6-ts $7,74 \pm 1,81$ nM gegenüber MIL-6-ts $2,93 \pm 1,50$ nM) (**Abbildung 40 B**).

A



B

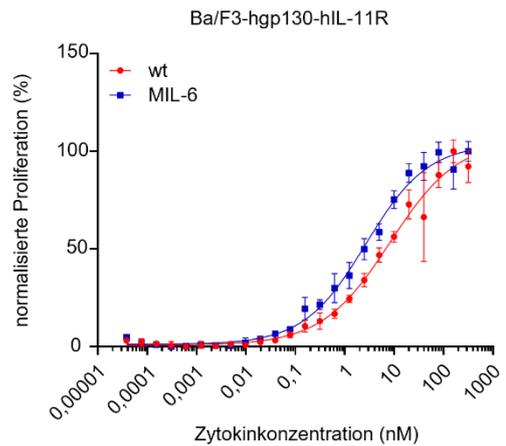


Abbildung 40 MIL-6-ts zeigt kein verändertes IL-6:IL-11R crosstalk Potenzial im Proliferationsassay.

(A) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen inkubiert für 72 h mit wt hIL-6-ts und MIL-6-ts in den angezeigten Konzentrationen. (B) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL11R Zellen inkubiert für 72 h mit wt hIL-6-ts und MIL-6-ts in den angezeigten Konzentrationen. Zu A und B: Je ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert.

Auch wenn Stimulationsassays oder SPR-Messungen zum MIL-6-ts noch fehlend sind, zeigt sich aus diesen initialen Untersuchungen, dass durch die Einzelmutationen, sowie in Kombination dieser, bislang keine Verringerung im IL-6:IL-11R *crosstalk* erzielt wurde.

IL-11 trans-signaling in der Leberregeneration nach PHx

Die partielle Hepatektomie stellt eine Methode zur Untersuchung der Leberregeneration dar, da ein konkreter Zeitpunkt zu Initiierung der Regeneration gegeben ist und kein nekrotisches Gewebe das Milieu der Leber zusätzlich belastet oder die Analyse beeinflusst (siehe Methoden, Kapitel Leber, Leberregeneration und partielle Hepatektomie). Der positive Einfluss von HIL-6, und damit beispielgebend für das *trans-signaling* von IL-6, in der Leberregeneration, wurde bereits zuvor beschrieben [183, 189].

5.8 Generierung und *in vitro* Charakterisierung von HIL-11Fc

Das Designerzytokin HIL-11 allerdings wurde bislang noch nicht in diesem Kontext untersucht, beziehungsweise es konnten im allgemeinen bislang wenige physiologische oder pathophysiologische Prozesse dem IL-11 *trans-signaling* zugeschrieben werden [190, 191]. Mit der Generierung von HIL-11Fc wurde im Rahmen dieses Projekts auch in IL-6R^{-/-} Mäusen die ersten Versuche diesbezüglich unternommen. Die IL-6R^{-/-} Mäuse wurden hierbei gewählt, um den Einfluss von IL-6 zunächst zu unterbinden, sodass die Regeneration und damit verbundene Prozesse/Parameter den Funktionen von HIL-11 zugeordnet werden können. Das Expressionsplasmid pcDNA3.1-HIL-11Fc lag bereits aus Vorarbeiten innerhalb unserer Arbeitsgruppe vor. HIL-11Fc wurde im Expressionssystem Expi293F™ produziert und **Abbildung 41** zeigt zunächst die Reinigung aus dem Kulturüberstand mittels Affinitätschromatographie (**Abbildung 41 A**), sowie eine Charakterisierung auf seine biologische Aktivität in der Zellkultur auf Ba/F3-hgp130 Zellen (EC50: 7,77 ± 5,52 pM) (**Abbildung 41 B**).

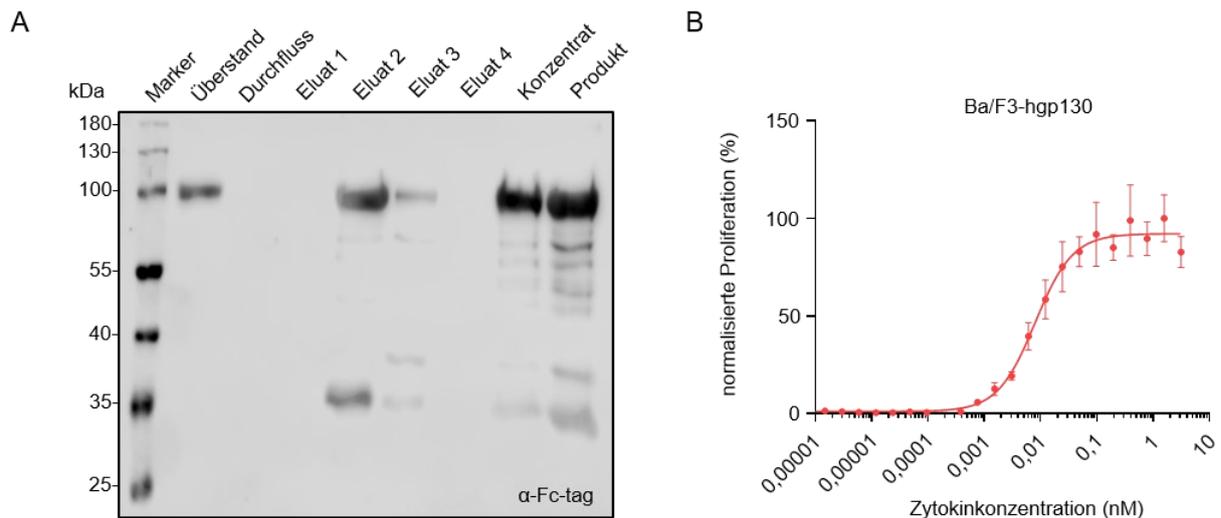


Abbildung 41 *Reinigung von HIL-11Fc und Aktivitätstest in der Zellkultur.*

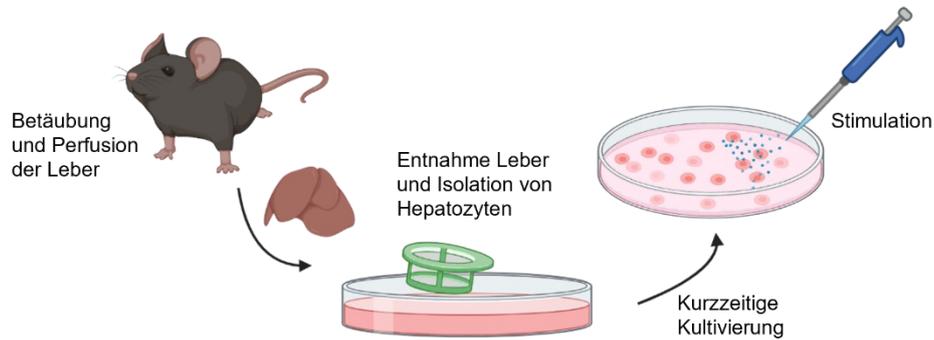
(A) Western Blot zur Proteinreinigung von HIL-11Fc. Aufgetragene Reinigungsfraktionen wie angezeigt und detektiert mittels Fc-POD Antikörper. Theoretische Proteingröße für HIL-11Fc: 80kDa (Angabe für ein Monomer) (B) Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130 Zellen angeregt durch HIL-11Fc in den angezeigten Konzentrationen einer Verdünnungsreihe. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt. Für die EC50 wurden Mittelwerte aus drei Replikaten mit Standardabweichung kalkuliert.

Aus diesen Ergebnissen ließ sich eine erfolgreiche Produktion des HIL-11Fc schließen.

5.9 Biologische Aktivität von HIL-11Fc ex vivo auf primären Hepatozyten

Nachdem also die Produktion und Aktivität des rekombinanten Proteins HIL-11Fc durchgeführt und getestet wurde, wurde das Designerzytokin weiterführend in einem *ex vivo* Stimulationsassay auf seine Aktivität auf primäre Leberzellen hin untersucht. Dies dient als gute Kontrolle und Zwischenschritt zur Übertragbarkeit zwischen *in vitro* Zellkulturversuche und dem *in vivo* System im Tierversuch mit Mäusen, die einer PHx unterzogen werden. Hierbei wurden primäre Hepatozyten verwendet, die sowohl aus wildtyp als auch aus IL-6R defizienten Mäusen isoliert wurden (**Abbildung 42 A**). Nach kurzzeitiger Kultivierung der Hepatozyten über Nacht wurden diese mit 50 ng/ml pro Zytokin für 20 Minuten bzw. 24 Stunden stimuliert (**Abbildung 42 B**).

A



B

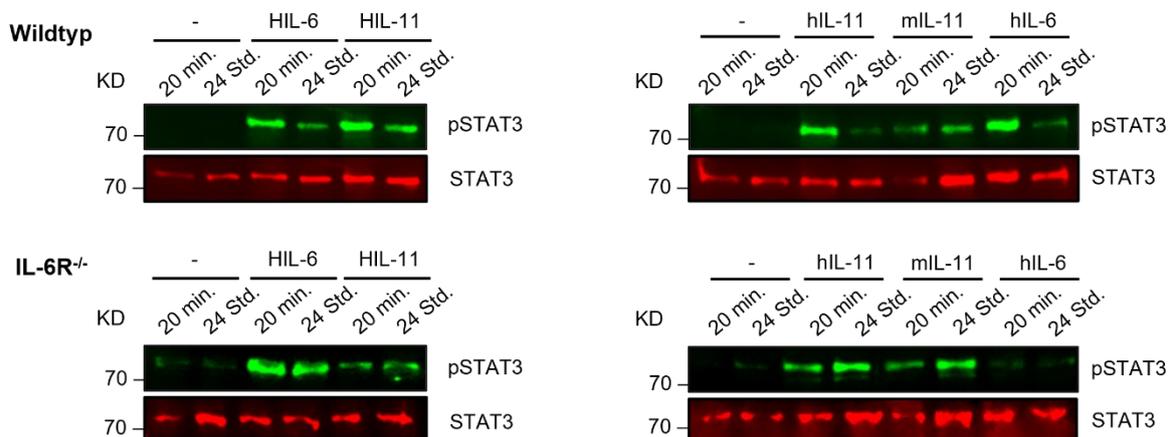


Abbildung 42 Primäre Hepatozyten Isolation als zum *ex vivo* Aktivitätsnachweis von HIL-11Fc.

(A) Schema zur Isolation von primären Hepatozyten aus wildtyp und IL-6R defizienten Mäusen. Genauere Details zum Versuchsablauf in Methoden beschrieben. Erstellt mit biorender.com (B) Stimulation von primären Hepatozyten zur Analyse der Signaltransduktion, ausgelöst durch die angezeigten Zytokine (50 ng/ml). Oben: Wildtyp-Mäuse, unten: IL-6R^{-/-} Mäuse. Links: Stimulation mit HIL-6Fc und HIL-11Fc. Rechts: Stimulation mit hIL-11-ts, mIL-11-ts und hIL-6-ts. Rote Banden: STAT3 Signal, Grüne Banden: phosphoryliertes STAT3 Signal. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten gezeigt.

In der Stimulation von primären Hepatozyten mit HIL-11Fc wurde die STAT3 Aktivierung sowohl bereits nach 20 Minuten als auch noch nach 24 Stunden detektiert. HIL-11Fc verhält sich hierbei ähnlich zum HIL-6Fc, welches zum Vergleich und als mögliche Positivkontrolle mitgeführt wurde. Bei den nicht-Hyperzytokinen: hIL-11-ts, mIL-11-ts sowie hIL-6-ts lässt sich ebenfalls eine Aktivität für beide Zeitpunkte feststellen. Einzig hIL-6-ts löste keine Phosphorylierung von STAT3 auf den Hepatozyten aus IL-6R^{-/-} Mäusen aus, was den Genotypen der Maus zusätzlich bestätigt. Mit Hilfe dieses Experiments wurde zusätzlich die leberspezifische Aktivität von HIL-11Fc erwiesen, was als wichtiger Zwischenschritt in der Vorbereitung eines Tierversuchs gilt. Zwar wird bei der Hepatozytenisolation bereits ein Tier verwendet und verstirbt im Zuge dessen, doch bevor das Protein mehrfach in lebend Tiere gespritzt wird (also *in vivo*) und diese dann im Versuch gehalten werden, kann so vorab bereits eine Wirksamkeit *ex vivo* evaluiert werden.

5.10 Partielle Hepatektomie: HIL-11Fc steigert das Überleben von IL-6R^{-/-} Mäusen

Die partielle Hepatektomie an IL-6R^{-/-} Mäusen wurde generell für zwei Versuchsansätze durchgeführt. Zum einen, für ein Überlebensexperiment, und zum anderen für eine Zeitkinetik, für die sich die PHx als Methode gut eignet. Ein Schema zu den generellen Versuchsaufbau ist in **Abbildung 43 A** gezeigt. Das Resultat für den ersten Teil, das Überlebensexperiment nach PHx, ist in **Abbildung 43 B** dargestellt.

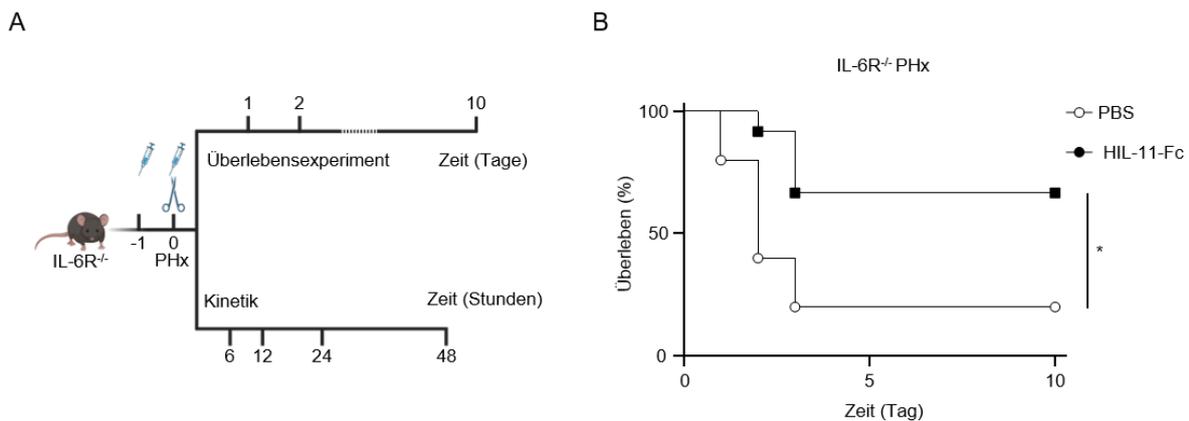


Abbildung 43 Gesteigertes Überleben von IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx durch Injektion von HIL-11Fc. (A) Schema zum Versuchsaufbau der Tierexperimente. IL-6R^{-/-} Mäuse wurden ein Tag vor, sowie direkt nach der PHx (Schere) mit HIL-11Fc oder PBS (Spritze) i.p. gespritzt. Das Überlebensexperiment verlief dann über 10 Tage im Anschluss der PHx, wobei die Tiere täglich beobachtet wurden. Für die Kinetik wurden die Tiere ebenfalls täglich begutachtet und zu den gewählten Zeitpunkten 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach PHx aus dem Versuch genommen. Grafik erstellt mit biorender.com. (B) Überlebenskurve von IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx. Behandelt wurden die Tiere entweder mit zweimaliger Injektion von PBS als Kontrolle oder zweimal mit je 20 µg HIL-11Fc i.p., 24 Stunden vor- und unmittelbar nach der PHx. Für die Statistik wurde ein Log-rank (Mantel-Cox) Test durchgeführt. PBS n=5, HIL-11Fc n=12, * = p ≤ 0,05.

Entgegen den IL-6R^{-/-} Mäusen mit PBS, mit einer Überlebensrate von 20% (n=5), haben die Tiere mit HIL-11Fc Injektionen zu 66% überlebt (n=12). Daraus lässt sich schließen, dass das Überleben der Tiere durch Injektion von HIL-11Fc signifikant gesteigert wurde, und der akute Verlust der Lebermasse um ca. 70% in dieser Kohorte anscheinend besser kompensiert wurde.

Im Kinetikexperiment wurden dann zu definierten Zeitpunkten Proben entnommen, um genauer untersuchen zu können, weshalb die Tiere mit HIL-11Fc besser überleben.

5.11 Serumparameter für Leberschäden sind reduziert bei PHx mit Behandlung mit HIL-11Fc.

Zunächst wurde das Serum der behandelten Mäuse untersucht. Hierbei wurden im Serum die Mengen der Lebertransaminasen Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-

Aminotransferase (ALT) bestimmt. Diese Transaminasen sind für den Abbau von Aminosäuren durch Desaminierung verantwortlich und obwohl sie in Organen und Zellen vorkommen, sind sie je nach Organ unterschiedlich stark konzentriert, wodurch sich eine Organselektivität ergibt. AST ist in der Leber am stärksten konzentriert, ist allerdings auch im Herzen, Skelettmuskel Gehirn, Niere, Pankreas und Lunge im Verhältnis von 96:52:36:15:10:3:1 zu finden. ALT hingegen hat in der Leber die weitaus höchste Konzentration, > 10-fach höher als im Herz- oder Skelettmuskel, und hat dadurch eine noch höhere Organselektivität als ALT. Während AST im Zytoplasma und im Mitochondrium vorkommt, so ist ALT überwiegend zytoplasmatisch gelöst, kommt aber auch mitochondrial gebunden vor. Da die Transaminasen für gewöhnlich zellgebundene Enzyme sind, erlaubt die Messung der Serumkonzentration eine Aussage über das Ausmaß einer Zellschädigung, in diesem Fall der Leber [192]. Aus diesem Grund werden AST und ALT in der Diagnostik als gängige Parameter für Erkrankungen der Leber und Leberschädigungen gemessen. Als dritter Parameter für den Zustand der Leber wurden die alkalische Phosphatasen (ALP) gemessen. Die ALP sind eine Gruppe von zytoplasmatischen Enzymen welche Phosphosäuremonoester spalten und in fast allen Geweben vorkommen. Erhöhte Konzentrationen von ALP im Serum deuten vor allem auf Krankheiten der Gallenwege, Leber oder Knochen hin z.B. als Indikator einer Cholestase [192, 193]. **Abbildung 44** zeigt die Messungen der Serumkonzentrationen von AST, ALT und ALP aus PBS oder HIL-11Fc behandelten Mäusen jeweils 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der PHx.

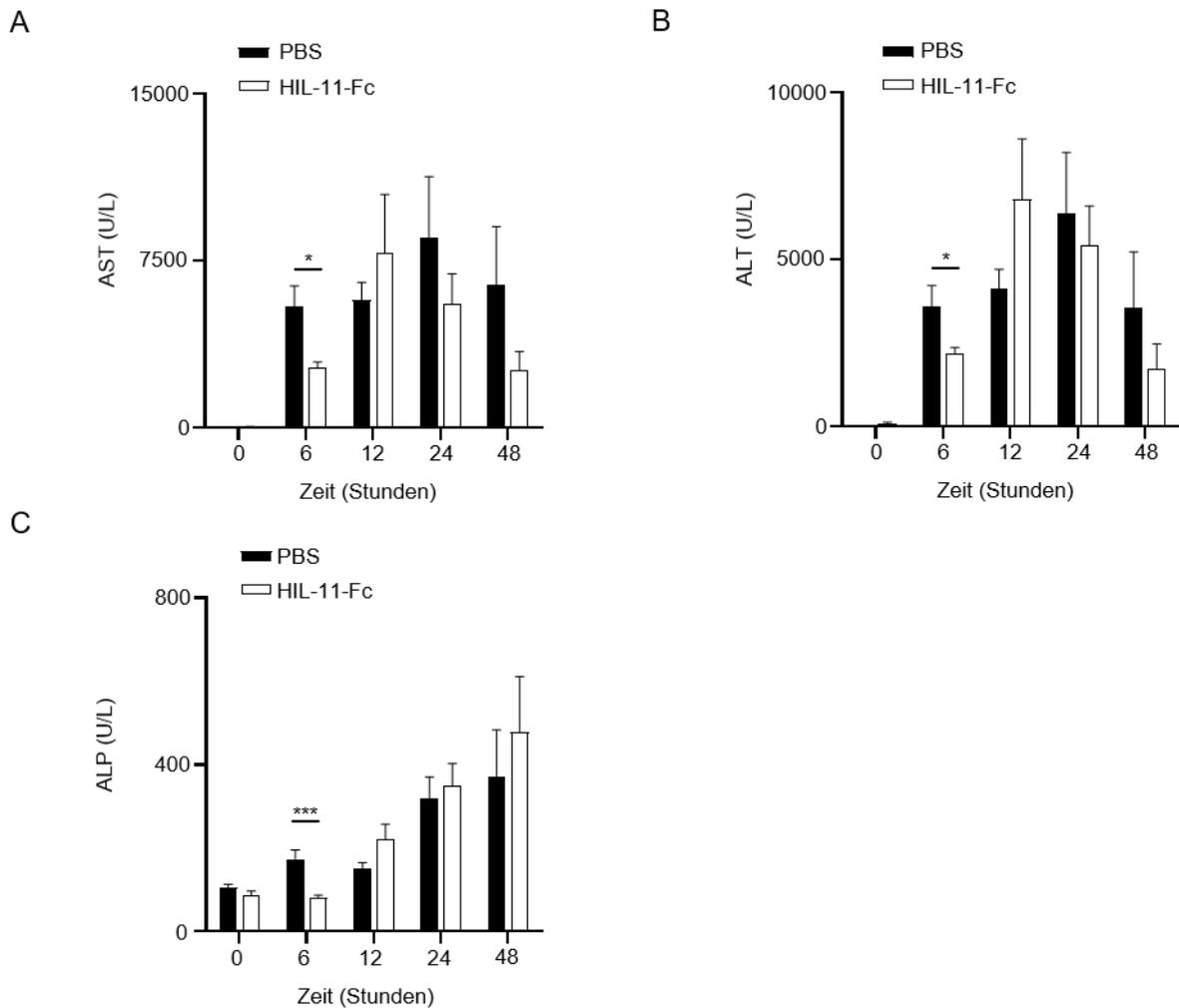


Abbildung 44 Geringere Serumparameter für Leberschädigungen 6 Stunden nach PHx in HIL-11Fc behandelten Tieren.

Serumkonzentrationen zu den angezeigten Zeitpunkten aus *IL-6R^{-/-}* Mäusen nach PHx mit PBS bzw. HIL-11Fc Applikation. (A) AST (B) ALT (C) ALP. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistik wurde erstellt in GraphPad Prism mit einem unpaired multiple t test. * = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$. $n=4-7$.

Aus den drei hier gemessenen Parametern ist vor allem zu einem frühen Zeitpunkt nach der PHx, nämlich nach 6 Stunden, im Serum der HIL-11Fc behandelten Mäuse eine jeweils signifikant geringere Konzentration zu finden, gegenüber den Tiere die PBS verabreicht bekommen haben. Dies spricht für eine geringere Beschädigung der Leber, was zu einer besseren Kompensation des akuten Leberschadens führen könnte. Passend zu dem, was im Überlebensexperiment zu beobachten war, nämlich das vor allem in den ersten 1-2 Tagen die meisten Tiere verstarben. Das heißt die ersten Tage nach PHx sind der kritische Zeitraum, in dem die Tiere den Verlust von Lebertumoren überstehen und baldig kompensieren müssen. Zusätzlich scheinen für AST und ALT im zeitlichen Verlauf die Werte wieder eher abzusinken mit Tendenz hin zu den Ausgangswerten. Für ALP hingegen verbleiben die Serumkonzentrationen auch 48 Stunden nach PHx erhöht. Interessant wäre hier für alle drei

Parameter einen noch späteren Zeitpunkt, z.B. 72 Stunden nach PHx, aufzunehmen, um zu untersuchen, ob AST und ALT weiter absinken, in Richtung Ausgangskonzentration und ob die ALP-Konzentration nicht auch ein Plateau erreicht oder gar absinkt.

5.12 Aktivierte STAT3 Signale durch HIL-11Fc in der Leber nach PHx

Durch die Organentnahme der regenerierenden Leberlappen zum Zeitpunkt des Versuchsendes, wurden aus dem Lebergewebe Lysate hergestellt, welche sodann mittels Western Blot auf eine aktivierte Signaltransduktion hin untersucht wurden. **Abbildung 45** zeigt einen Western Blot mit Detektion des phospho-STAT3 Signals zu den verschiedenen Zeitpunkten der Kinetik aus den HIL-11Fc behandelten IL-6R^{-/-} Mäusen, gegenüber denen, die mit PBS behandelt wurden.

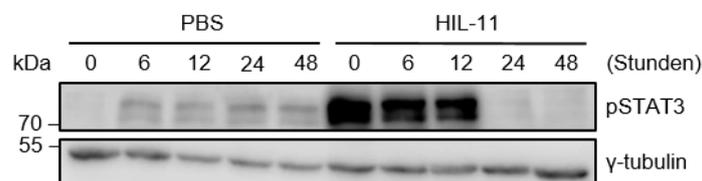


Abbildung 45 Western Blot aus Leberlysaten zeigt STAT3 Aktivierung in IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx mit HIL-11Fc Behandlung.

Western Blot zu den Zeitpunkten 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach PHx von Leberlysaten aus PBS- und HIL-11Fc behandelten IL-6R^{-/-} Mäusen. Detektion von phosphoryliertem STAT3 als Signal für eine aktivierte Signaltransduktion und γ -tubulin als Ladekontrolle. Gezeigt ist jeweils das Leberlysat aus einer Maus zu den angezeigten Konditionen. Ein repräsentatives Beispiel aus drei Replikaten ist gezeigt.

Die pSTAT3 Banden zeigen ein deutliches Signal in den HIL-11Fc behandelten Tieren zu den Zeitpunkten 0, 6 und 12 Stunden nach der PHx. Ein pSTAT3 Signal kann hierbei vorerst mit der möglichen Induktion der Proliferation oder als Überlebensstimulus der Hepatozyten interpretiert werden. Dies passt zur erhöhten Überlebensquote aus dem Überlebensexperiment.

5.13 Histologische Untersuchungen zu Leberbiopsien nach PHx

Im Kinetikexperiment wurden zu den zuvor erwähnten Zeitpunkten auch Leberproben für histologische Untersuchungen entnommen und mittels Kryostaten geschnitten. In dieser Arbeit wurden drei Färbemethoden zur Visualisierung des Zustands der regenerierenden Leberlappen angewendet. Die erste Methode ist die Hämatoxylin und Eosin (H&E) Färbung. Durch Anfärben des Zytoplasmas und der Zellkerne lässt sich die Mikrostruktur der Leber erkennen. **Abbildung 46** zeigt exemplarisch einen solche H&E Färbung. Da im Folgenden die Kinetik Zeitpunkte gegenübergestellt werden, mögen Details aufgrund der Bildgröße hier schwer erkennbar sein.

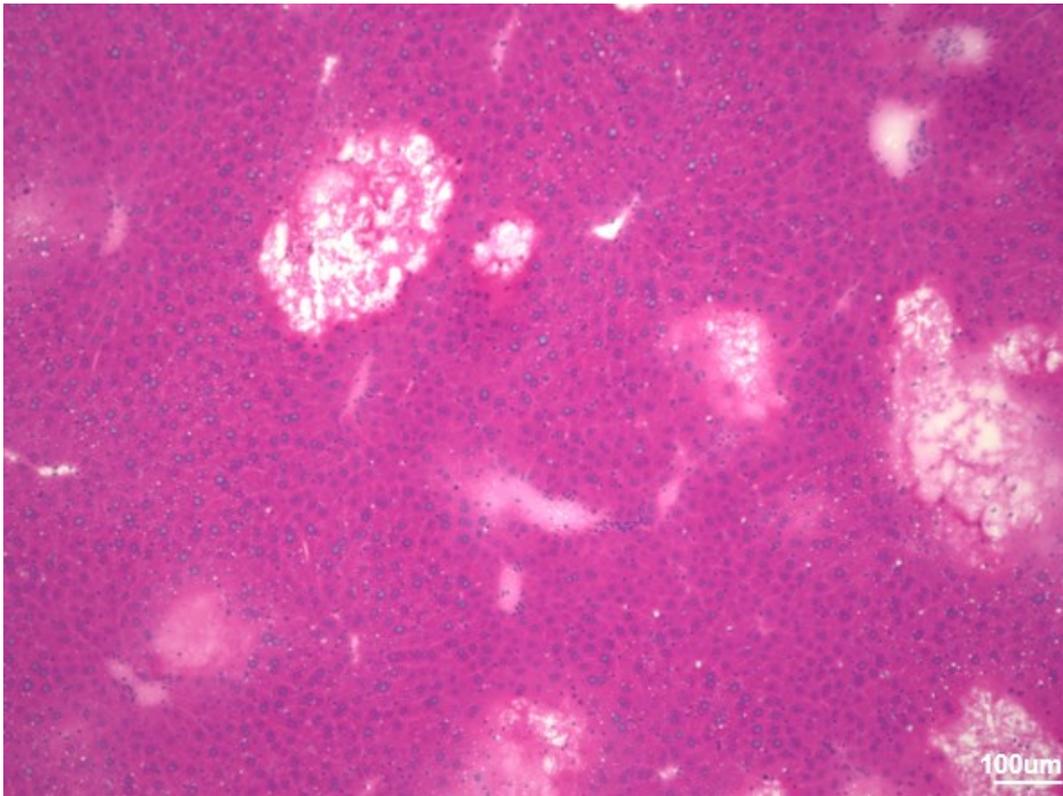


Abbildung 46 Beispielbild einer H&E Färbung von einem Leberschnitt.

Gezeigt ist eine Probe 6 Stunden nach PHx aus einer PBS behandelten IL-6R^{-/-} Maus.

In intaktem Lebergewebe wie z.B. in den naiven Konditionen oder in Proben in denen eine effiziente Leberregeneration vorzuliegen scheint, können die *Glisson-Trias* oder Zentralvenen erkennbar sein. Die Blutgefäße sind im Querschnitt an ihrer runden Form und der Abgrenzung durch eine ringförmige Endothelschicht erkennbar. Arterien haben dabei für gewöhnlich eine dickere Endothelschicht als Venen. Sind viele Zellkerne an einer Stelle als komprimiert erkennbar, so kann dies eine Infiltration von Immunzellen bedeuten. Große helle Stellen, wie hier im Beispielbild deutlich erkennbar, weisen auf eine zerstörte Leberstruktur hin. In **Abbildung 47** sind nun die Konditionen 0, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach einer PHx von IL-6R^{-/-} Mäusen behandelt mit PBS bzw. HIL-11Fc gegenübergestellt.

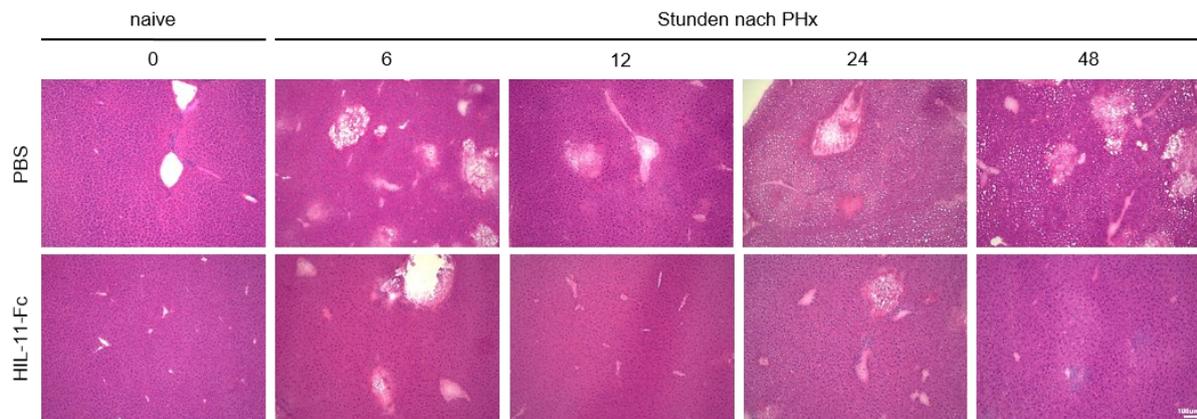


Abbildung 47 HIL-11Fc Konditionen zeigen in H&E Färbungen weniger Nekrosen in Leberbiopsien. Gezeigt sind Leberschnitte mit H&E Färbung aus *IL-6R^{-/-}* Mäusen mit PBS bzw. HIL-11Fc Behandlungen. Die Proben entstammen aus den angezeigten Zeitpunkten des Kinetikexperiments. Je ein repräsentatives Beispiel pro Kondition ist gezeigt. $n=3-7$.

In den naiven Proben, also zum Zeitpunkt null, sind in beiden Konditionen die Lebern als intaktes Gewebe erkennbar. Im Zeitverlauf nach der PHx ist ein Trend zu beobachten, dass die Lebern der mit HIL-11Fc behandelten Mäuse eine bessere Struktur aufweisen als die Proben aus den mit PBS behandelten Mäusen. Die Lymphozyteninfiltrate und die Anzahl der Stellen in denen das Parenchym gestört ist (hier zunächst als nekrotische Areale gedeutet), wurden erhoben und auf die Größe des jeweiligen Gewebeschnittes relativiert. Die daraus resultierenden Wertungen für relative Infiltrate und relative Gewebsstörungen sind in **Abbildung 48 A+B** dargestellt.

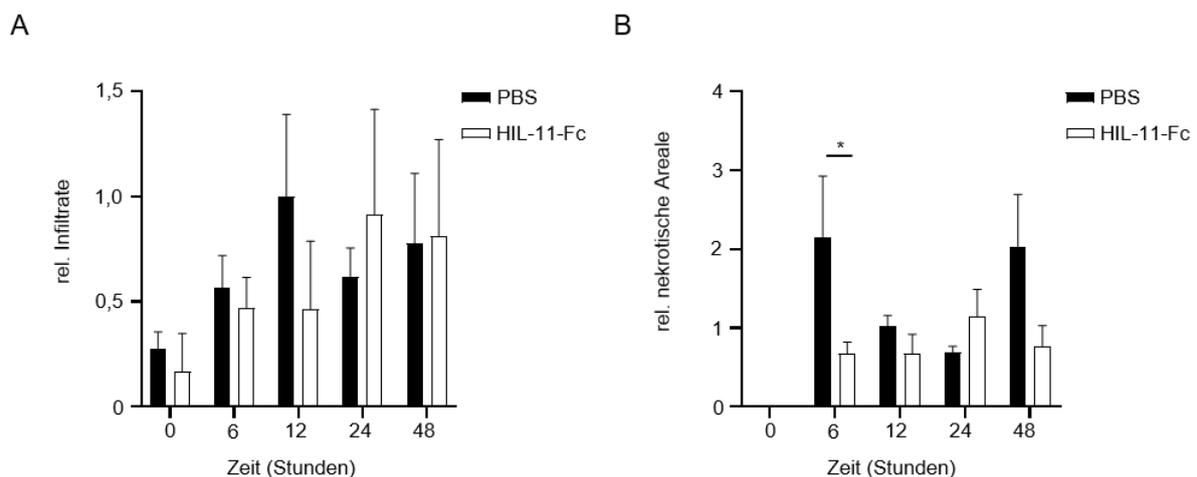


Abbildung 48 Verbesserte Leberarchitektur nach PHx durch HIL-11Fc Injektionen.

Bewertungen zu den H&E-Färbungen aus dem Kinetikexperiment (A) Relative nekrotische Areale zu den angezeigten Konditionen. (B) Relative Gewebsstörungen zu den angezeigten Konditionen. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistik erstellt in GraphPad Prism mit einem unpaired multiple t test. $*=p \leq 0,05$ $n=3-7$.

Bei der Beurteilung der relativierten Infiltrate war zunächst kein eindeutiger Unterschied zu ermitteln. Die Proben schienen sehr heterogen zu sein und aufgrund der Probengröße (n) in den jeweiligen Konditionen ist die Standardabweichung hoch. Mehr Proben könnten hier ein deutlicheres Bild abzeichnen. In der Beurteilung der relativierten nekrotischen Arealen ist in den Kohorten zum Zeitpunkt von 6 Stunden ein signifikanter Unterschied erkennbar. Die HIL-11Fc behandelten Mäuse wiesen weniger Schäden in den Lebern auf, was auf eine bessere Leberstruktur hindeutet. Zu erwähnen ist hierbei, dass die Größe der jeweiligen nekrotischen Areale nicht berücksichtigt wurde, so sind kleine Störungen im Leberparenchym genauso gewichtet wie großflächige. Ebenso ist stellenweise bei einer Kombination von zwei oder mehr dicht beieinanderliegenden nekrotischen Arealen, schwer zu differenzieren, ob diese jeweils einzeln gezählt werden oder als ein großer nekrotischer Bereich zusammengefasst wird. Gleiches gilt für die Beurteilung eines jeweiligen Lymphozyteninfiltrats, da hier die Zellanhäufungen nur absolut gezählt wurden, und die Größe des betroffenen Areals oder die Menge der infiltrierenden Zellen nicht differenziert wurde.

Zur weiteren Visualisierung von geschädigtem Gewebe wurde in dieser Arbeit eine TUNEL Färbung angewendet. TUNEL steht dabei für *terminal transferase mediated dUTP nick end labeling*. Das bedeutet, bei dieser Methode werden DNA-Strangbrüche visualisiert, was hierbei als Maß für apoptotische Zellen interpretiert werden kann. Im Fluoreszenzmikroskop können diese markierten Stellen dann im GFP-Farbkanal visualisiert und aufgenommen werden. Zusätzlich wurden die Schnitte mit DAPI gefärbt, wodurch die Zellkerne (genauer die DNA) aller Zellen cyan-blau gefärbt sind, wenn man sie im Fluoreszenzmikroskop unter UV-Licht betrachtet. So kann das Gewebe im sonst dunklen Bild im Fluoreszenzmikroskop besser erkannt und mit spezifischen Fluoreszenzsignalen aus der TUNEL-Färbung zusammengebracht werden. **Abbildung 49** zeigt exemplarisch ein solches Bild.

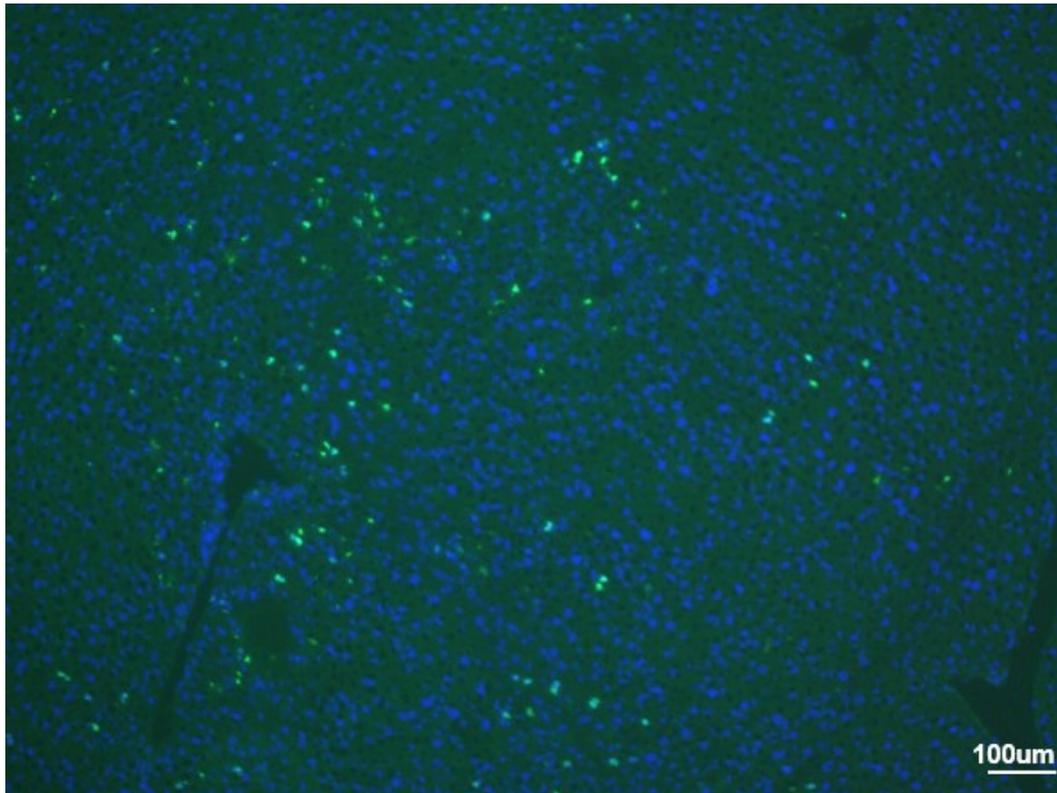


Abbildung 49 Beispielbild einer TUNEL Färbung von einem Leberschnitt.

Gezeigt ist eine Probe 24 Stunden nach PHx aus einer PBS behandelten $IL-6R^{-/-}$ Maus. Blau: DAPI, Grün: TUNEL Färbung

Zur deutlichen Erkennung der positiven Färbungen wurde hier als Beispiel ein Schnitt gewählt der viele grüne, also positive, Signale aufwies. Generell sind die Signale vom sonstigem dunkelgrünen Hintergrundsignal des Gewebes, eine Art Grundrauschen, zu unterscheiden.

Abbildung 50 zeigt eine Gegenüberstellung aus dem Kinetikexperiment, ähnlich wie zuvor zur H&E Färbung.

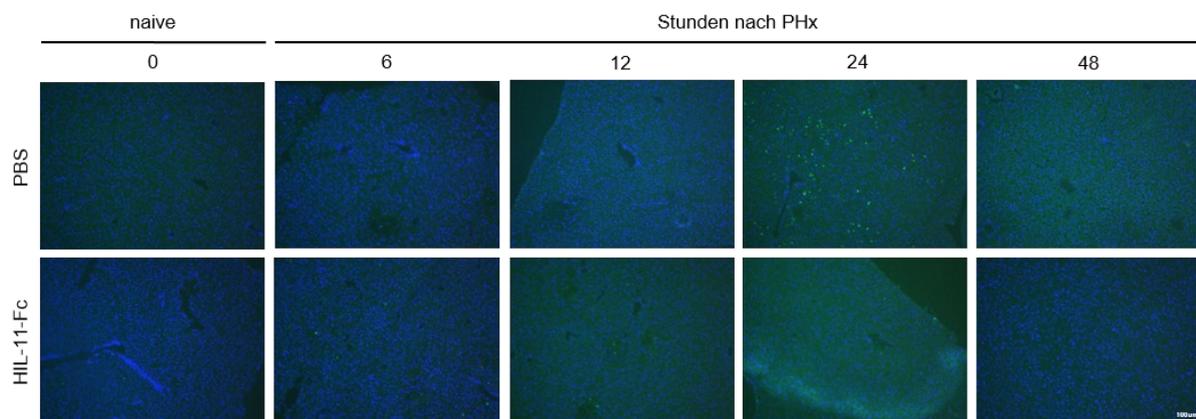


Abbildung 50 Mehr apoptotische Hepatozyten in PBS behandelten $IL-6R^{-/-}$ Mäusen nach PHx gegenüber HIL-11Fc behandelten Mäusen.

Gezeigt sind Leberschnitte mit TUNEL Färbung aus $IL-6R^{-/-}$ Mäusen mit PBS bzw. HIL-11Fc Behandlungen. Die Proben entstammen aus den angezeigten Zeitpunkten des Kinetikexperimentes. Je ein repräsentatives Beispiel pro Kondition gezeigt. $n=3$ Blau: DAPI, Grün: TUNEL Färbung.

Die naiven Proben zum Zeitpunkt 0 Stunden, sowohl von den PBS als auch der HIL-11Fc behandelten Mäuse zeigten die wenigsten, bis gar keine, apoptotischen Signale. Zu den Zeitpunkten 6 und 12 Stunden nach der PHx waren wenige Signale im Lebergewebe sichtbar und generell war kein Unterschied zwischen der Behandlung mit PBS oder HIL-11Fc zu beobachten. Allerdings waren apoptotische Hepatozyten in den PBS behandelten Mäusen zum Zeitpunkt von 24 und 48 Stunden deutlich erkennbar, während in den HIL-11Fc Konditionen signifikant weniger TUNEL Signale erkennbar waren. Hierbei ist zu erwähnen, dass in der Übersicht in **Abbildung 50** nur lediglich ein Beispiel aus drei Replikaten gezeigt wird, wodurch dieser allgemeine Trend nicht deutlich erkennbar ist. Aus der Auswertung der jeweiligen drei Replikate, gezeigt in **Abbildung 51**, geht dies eher hervor. Für den Zeitpunkt 24 Stunden nach PHx war demnach ein signifikanter Anstieg von TUNEL Signalen in den PBS behandelten Mäusen, gegenüber denen die HIL-11Fc appliziert bekommen haben zu erkennen. Besonders auffällig war, dass in den Proben der PBS Kondition zum Zeitpunkt 48 Stunden nach PHx eine von drei Proben sehr stark mit Signalen der TUNEL Färbung versehen war. Aufgrund dessen ist der Mittelwert deutlich höher als der, der HIL-11Fc behandelten Mäuse. Allerdings ist deshalb auch die Standardabweichung sehr hoch, weshalb keine Signifikanz vorliegt. Hierbei ist nochmals zu erwähnen, dass lediglich drei Schnitte pro Kondition gefärbt und ausgewertet wurden, weshalb eine solch hohe Varianz innerhalb der Konditionen möglich ist.

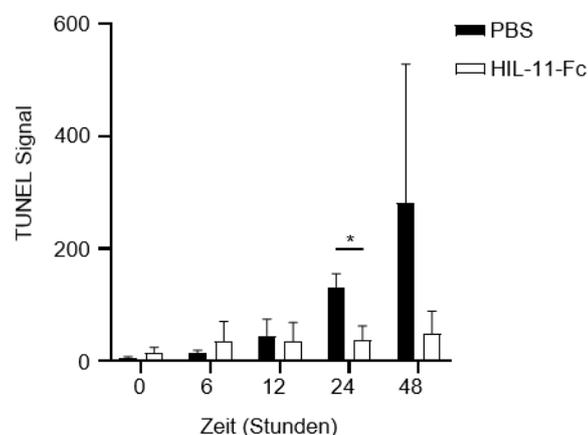


Abbildung 51 Auswertung der TUNEL Färbung zeigt weniger DNA Schäden in HIL-11Fc behandelten $IL-6R^{-/-}$ Mäusen nach PHx. Gezählt wurden alle TUNEL Signale aus je drei Aufnahmen aus drei Replikaten. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistik wurde erstellt in GraphPad Prism mit einem unpaired multiple t test. * = $p \leq 0,05$, $n=3$.

Als dritte histologische Methode wurde in dieser Arbeit eine pH3+ Färbung von Leberschnitten angefertigt. pH3+ steht dabei für das phospho-Histon H3, ein Zellkernprotein, welches bei der DNA Kondensation zum Chromatin eine Rolle spielt. Im Zellzyklus werden während der

Mitose Serin 10 und 28 im Histon phosphoryliert, sodass in der G2- Phase pH3+ nachweisbar ist und damit als spezifischer Proliferationsmarker gilt [194]. Die Färbung in dieser Arbeit detektiert das phosphorylierte Ser10 im Histon H3. **Abbildung 52** zeigt eine Leberprobe einer HIL-11Fc behandelten Maus 48 Stunden nach der OP, mit möglichst vielen positiven pH3+ Signalen zur exemplarischen Darstellung.

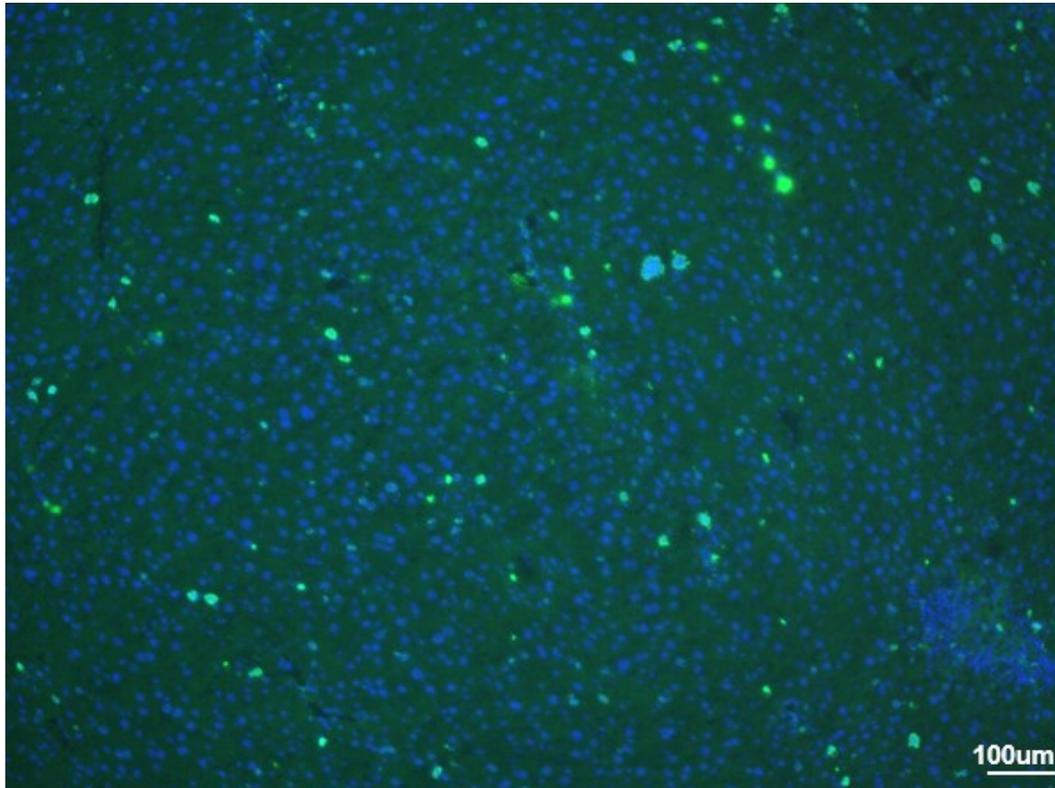


Abbildung 52 Beispielbild einer pH3+ Färbung von einem Leberschnitt.

Gezeigt ist eine Probe 48 Stunden nach PHx aus einer HIL-11Fc behandelten IL-6R^{-/-}Maus. Blau: DAPI, Grün: pH3+ Färbung

Abbildung 53 zeigt die Gegenüberstellung von pH3⁺ gefärbten Leberschnitten aus dem Kinetikexperiment.

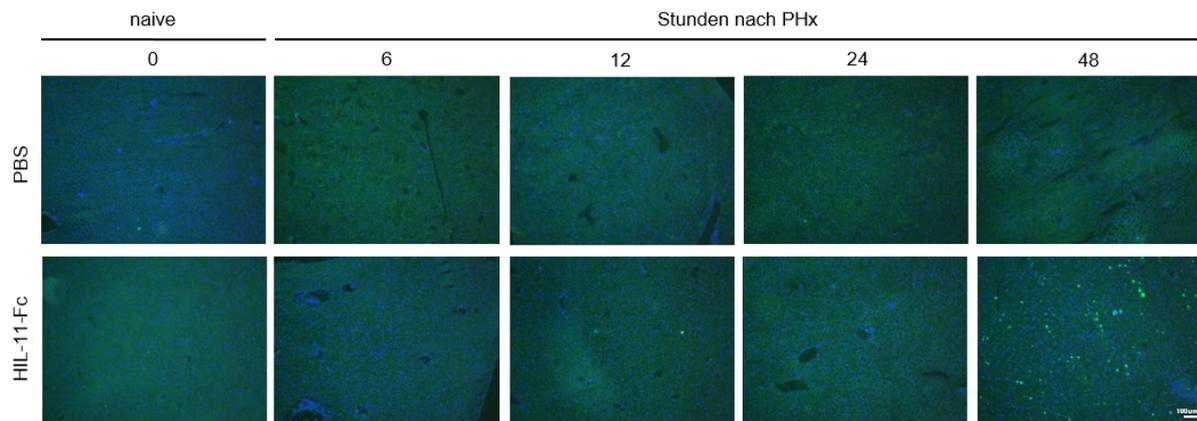


Abbildung 53 Gesteigerte Proliferation in HIL-11Fc behandelten $IL-6R^{-/-}$ Mäusen nach PHx.

Gezeigt sind Leberschnitte mit pH3 Färbung aus $IL-6R^{-/-}$ Mäusen mit PBS bzw. HIL-11Fc Behandlungen. Die Proben entstammen aus den angezeigten Zeitpunkten des Kinetikexperiments. Je ein repräsentatives Beispiel pro Kondition gezeigt. $n=3$ Blau: DAPI, Grün: pH3+ Färbung

In der pH3⁺ Färbung waren 48 Stunden nach der PHx mehr positive Signale für die Proben der HIL-11Fc behandelten Mäuse zu sehen, verglichen mit denen, die lediglich PBS gespritzt bekommen haben.

In **Abbildung 54** wurde dies genauer analysiert indem auch hier alle positiven Signale von je drei Mikroskopaufnahmen von je drei biologischen Replikaten gezählt wurden.

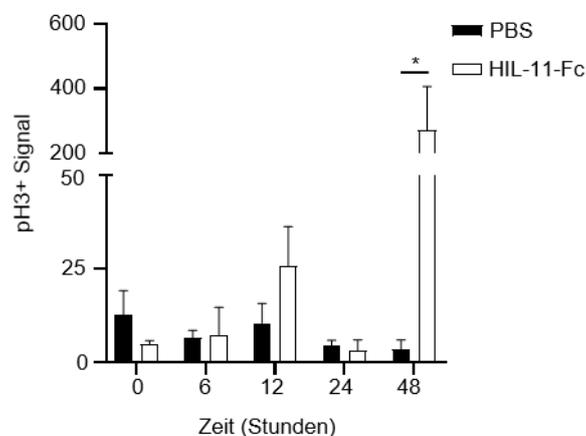


Abbildung 54 Auswertung der pH3 Färbung zeigt mehr Proliferation in Leberproben von $IL-6R^{-/-}$ Mäusen 48 Stunden nach PHx wenn diese mit HIL-11Fc statt mit PBS behandelt wurden.

Gezählt wurden alle pH3⁺ Signale aus je drei Aufnahmen von jeweils drei Replikaten. Gezeigt sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Statistik wurde erstellt in GraphPad Prism mit einem unpaired multiple t test. $*=p \leq 0,05$ $n=3$

Aus dieser Auswertung ging hervor, dass 48 Stunden nach PHx signifikant mehr pH3⁺ Signale in der HIL-11Fc Kondition gegenüber den mit PBS behandelten Tiere gezählt wurden.

Gemeinsam ergeben diese drei histologischen Untersuchungen das Gesamtbild, dass HIL-11Fc zu einem verbesserten Erhalt oder Wiederherstellung einer intakten Leberstruktur mit weniger Apoptose und mehr Proliferation nach PHx verhilft.

Zusammenfassend lässt sich aus den Serumparametern, dem phospho-STAT3 Signal in den Leberlysaten und den histologischen Untersuchungen der Leberschnitte der Trend erkennen, dass das HIL-11Fc zu einer verbesserten Leberregeneration nach PHx führt. Durch das HIL-11Fc wird ein IL-11 *trans-signaling* mit Stimulation von gp130 induziert. Im Gesamten passt dies zu dem beobachteten gesteigerten Überleben von IL-6R^{-/-} Tieren mit HIL-11Fc Behandlung gegenüber der Kontrollgruppe mit PBS Injektionen. Somit kann aus diesem initialen Daten dem IL-11 *trans-signaling* eine bislang unbeschriebene protektive Rolle in der Leberregeneration zugeschrieben werden.

6. Diskussion

IL-6:IL-11R crosstalk

Die Zytokine der Interleukin-6-Familie sind an zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt. Die pathophysiologischen Konditionen betreffen dabei weltweit Millionen von Menschen und können sogar lebensbedrohlich werden. Daher ist die Erforschung dieser Interleukine und ihre pathophysiologischen Mechanismen essenziell zur Behandlung dieser Patienten [34, 49, 195]. Die Erkundung weiterer *crosstalk* Kombinationen innerhalb der Familie der IL-6-artigen Zytokine ist von entscheidender Bedeutung, um die Wirkungsweisen und Mechanismen dieser Zytokinfamilie besser zu verstehen. Gerade im Hinblick auf medizinische Behandlungsmöglichkeiten, bei Dysregulationen in der Zytokin-Homöostase oder bei Infektionen, ist eine zielgenaue Intervention wichtig. Je gezielter die pathologischen Bedingungen getroffen werden, umso weniger Nebenwirkungen werden den Patienten belasten, und desto besser wird die Behandlung.

Mit dieser Arbeit wird ein neuer und alternativer α -Rezeptor für IL-6 beschrieben. IL-6 kann neben seinem kanonischen Rezeptor, den IL-6R, auch an den IL-11R binden und eine Signaltransduktion auslösen, hier als „IL-6:IL-11R *crosstalk*“ betitelt. Die biologische Aktivität dieser Zytokinrezeptorkombination wurde hier anhand der ausgelösten Proliferation und Aktivierung des JAK-STAT Signalwegs dargestellt und gemessen am pSTAT3 im Western Blot. Dabei erwies sich, die Bindung bzw. die Effizienz zur Signaltransduktion im *crosstalk* schwächer als über den kanonischen Rezeptor. Für eine vergleichbare Induktion einer Proliferation oder auch der STAT3 Aktivierung über den IL-11R, waren gegenüber IL-11 100-1000fach höhere Konzentrationen von IL-6 nötig. Zum Erreichen einer vergleichbaren Signalstärke über den IL-11R:gp130 Rezeptorkomplex, wird mehr IL-6 benötigt, was sich durch eine geringere Affinität von IL-6 zum IL-11R erklären lässt. Verglichen mit dem IL-11, ist die Affinität von IL-6 zum IL-11R 40-fach geringer ($K_D = 22,6$ nM) (IL-11 zum IL-11R: $K_D = 0,53$ nM). Hierbei erwies sich die gemessene IL-11:IL-11R Affinität als vergleichbar zu zuvor publizierten Daten wie z.B. von D.J. Curtis *et al.* wo eine Affinität in einem Bereich von 1 bis 10 nM beschrieben wurde [196]. Unter den IL-6-artigen Zytokinen, die einen α -Rezeptor zur Signaltransduktion benötigen, wie IL-6, IL-11, CNTF, CLF-1 oder auch p28, gibt es auch andere Hinweise für die Promiskuität innerhalb dieser Zytokinfamilie. So ist bislang auch ein *crosstalk* für CNTF oder auch p28 beschrieben [197]. CNTF vermag nicht nur ausschließlich über den CNTF Rezeptor (CNTFR) ein Signal zu induzieren, sondern laut Kallen *et al.* ist dies

auch über Komplexbildung mit dem IL-6R, LIFR und gp130 möglich [123]. Schuster *et al.* beschrieben ebenfalls, dass verglichen mit dem typischen CNTF-induziertem Signal über den CNTFR, höhere Konzentrationen von CNTF benötigt wurden (Faktor 42-fach höher) um eine vergleichbare Signaltransduktion über den IL-6R zu vermitteln [119]. Die IL-27 Untereinheit p28 erwies sich, neben seinem kanonischen nicht-signaltransduzierenden α -Rezeptor Epstein-Barr-virus-induced gene 3 (EBI3), ebenfalls als potentieller Bindungspartner für den IL-6R. Während p28:EBI3 über das Heterodimer der Rezeptoren WSX-1 und gp130 die Signaltransduktion initiiert, funktioniert dies auch über ein gp130 Homodimer wenn p28 an den IL-6R bindet. Auch hierbei sind höhere Konzentrationen von p28 nötig um dieses nicht-kanonische *signaling* über den IL-6R in vergleichsweise zu induzieren (EC50 von p28 auf Ba/F3-gp130-hIL-6R Zellen: 13,7 nM) [120].

Zur Überprüfung, ob analog vom IL-11 ausgehend ein *crosstalk* über den IL-6R (IL-11:IL-6R) existiert, wurden Ba/F3-gp130-hIL-6R Zellen mit hohen Konzentrationen (bis zu 360 nM) mit IL-11-ts co-kultiviert. Nach 72 Stunden Inkubation konnte keine konzentrationsabhängige Proliferation ermittelt werden. Interessanterweise konnte allerdings mit der SPR nicht nur eine Bindungsaffinität von IL-6 an den IL-6R, IL-11 an den IL-11R sowie von IL-6 an den IL-11R gemessen werden, sondern auch von IL-11 an den IL-6R. Möglicherweise liegt es an der vergleichsweise hohen K_D von 58,37 nM weshalb das IL-11 nicht biologisch aktiv auf den Ba/F3-hgp130-hIL-R Zellen war, oder es gibt keine effiziente Komplexbildung mit den gp130 Molekülen mit IL-11 und dem IL-6R. Dies wurde in dieser Arbeit jedoch nicht näher untersucht.

Um Fehlinterpretationen zum IL-6:IL-11R *crosstalk* auszuschließen, wurde die Spezifität mit inhibitorischen Experimenten überprüft. So hat zum einem das Rezeptorfusionsprotein IL-6-RFPFc, die IL-6-abhängige Proliferation und Stimulation von Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen inhibieren können. IL-6-RFPFc, welches von M. Wiesinger *et al.* entwickelt wurde und uns freundlicherweise aus der Arbeitsgruppe von Prof. Gerhard Müller-Newen von der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt wurde, besteht aus den extrazellulären Domänen D1-D3 des murinen gp130 und den Domänen D1-D3 vom murinen IL-6R, verbunden über einen flexiblen Peptidlinker [185, 186]. Dieser Inhibitor ist wie eine Zytokinfalle für frei verfügbares IL-6. Die Signaltransduktion von IL-11 auf Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen war vom IL-6-RFP nicht betroffen. Erkennbar im Western Blot am IL-11 induzierten pSTAT3 Signal verglichen zu der Kondition mit IL-11 und IL-6-RFPFc (Kondition von IL-11 und IL-6-RFPFc Kombination hier in dieser Arbeit nicht gezeigt).

Des Weiteren konnte mit Tocilizumab, einem antagonistischen monoklonalen Antikörper der an den IL-6R bindet, bestätigt werden, dass auf diesen Zellen kein IL-6R irrtümlicherweise für die induzierte Proliferation oder STAT3 Aktivierung verantwortlich ist. So ließen sich Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen, welche mit hohen Konzentrationen von IL-6 behandelt wurden, nicht in ihrer Aktivität durch Tocilizumab einschränken. Ähnlich könnte so auch der Antikörper Sarilumab, ein weiterer Antikörper gerichtet gegen den IL-6R wirken, was hier aber nicht evaluiert wurde, da die Inhibition mit Tocilizumab bereits als Bestätigung galt. Interessant wäre hingegen den Einfluss von Siltuximab, einen Antikörper der gegen das Zytokin IL-6 gerichtet ist [198], auf den IL-6:IL-11R *crossstalk* zu testen. Zu erwarten wäre hierbei eine Inhibition der IL-6 vermittelten Signaltransduktion, ähnlich wie bei der Verwendung vom IL-6-RFPFc.

Stattdessen wurde hier ein anderes zusätzliches Inhibitionsexperiment durchgeführt, mithilfe eines Antikörpers gegen den murinen IL-11R. Generell sind bisweilen zwar einige IL-11R Antikörper bekannt, aber nicht kommerziell verfügbar. Da das humane IL-6 aber auch in der Lage ist, die Signalvermittlung über den murinen IL-11R zu vermitteln, und ein mIL-11R Antikörper (R&D) kommerziell erwerblich ist, wurden hier Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen verwendet. Mit IL-11 und hohen IL-6 Konzentrationen ließen sich diese Zellen sowohl zur Proliferation, als auch zur Phosphorylierung von STAT3 anregen. In co-kultivierung mit dem mIL-11R Antikörper ließen sich die Stimulation durch beide Zytokine reduzieren. Dadurch konnte die spezifische Interaktion beider Zytokine am IL-11R nachgewiesen werden. Neben den klassisch verwendeten IgG Antikörpern zur Inhibition könnten auch Einzeldomänenantikörper, sogenannte Nanobodies (VHH, variable heavy domain of heavy chain antibody), gegen IL-6 bzw. IL-11 für derartige *crossstalk* Untersuchungen verwendet werden [199, 200].

Im zuvor genannten inhibitorischen Assay mit einem mIL-11R Antikörper, konnte hier auch nochmals gezeigt werden, dass die humanen Versionen von IL-11 und IL-6 über den murinen IL-11R, also genauer gesagt hier auf Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen aktiv sind. Interessanterweise besteht für das murine IL-6 über den mIL-11R keine *crossstalk* Aktivität, hier getestet mittels Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen. Ob dies am gp130 Molekül liegt und ob ein zusätzliches Einbringen des murinen gp130 in diese Zellen, eine Aktivität herstellen kann, ist bislang nicht geklärt.

Mit den Ba/F3-gp130 Zelllinien inklusive der membranständigen α -Rezeptoren wird *in vitro* das *classic signaling* von IL-6 und IL-11 nachgeahmt. Wie eingangs beschrieben, können IL-6 und IL-11 auch ein Signal über das *trans-signaling* mit ihrem jeweiligen kanonischen Rezeptor

vermitteln [80]. Ob der IL-6:IL-11R *crosstalk* auch im *trans-signaling* funktioniert wurde hier mittels Ba/F3-hgp130 Zellen getestet, stimuliert mit den Zytokinen IL-6 bzw. IL-11 und in Kombination mit dem sIL-6R oder sIL-11R. Während die Kombinationen der Zytokine mit ihren kanonischen α -Rezeptoren, wie erwartet, auf diesen Zellen die Signaltransduktion aktivierten, tat dies das IL-6 in Kombination mit dem sIL-11R nicht. Selbst mit hohen Konzentrationen von 40 nM IL-6 und 4,4 nM (im Proliferationsassay) bzw. 22,2 nM (im Stimulationsassay) vom sIL-11R war keine Aktivierung erkennbar. Ob damit das *trans-signaling* des IL-6:IL-11R *crosstalk* auch *in vivo* auszuschließen ist, lässt sich daraus nicht eindeutig festlegen, auch wenn dies ein erster Hinweis sein könnte. Schließlich ist die lokale IL-6 Konzentration bei Infektionen und chronischen Entzündungen oder auch die systemische Konzentration bei einem Zytokinsturm oder einer Sepsis um ein Vielfaches erhöht [19, 38]. Zudem gibt es *in vivo* weitere Faktoren, die den *crosstalk* beeinflussen könnten, die *in vitro* nicht abgedeckt werden, wie z.B. verschiedene Zellpopulationen, Konzentrationsgradienten und die gleichzeitige endogene Expression von IL-6R und sIL-11R. Sowohl membran-gebunden als auch in löslicher Form, und nicht zuletzt kommt auch das natürliche sgp130 Puffersystem im Organismus vor [90].

Ein anderes Modell, um *in vitro* das *trans-signaling* untersuchen zu können, ist die Verwendung von Hyperzytokinen. Während HIL-6 und HIL-11 bereits beschrieben wurden [111, 113, 116, 201], wurde hier ein neuartiges Hyperzytokin entworfen, bestehend aus IL-6 verbunden über einen Peptidlinker und dem sIL-11R, hier als chimäres Hyper-IL-6:sIL-11R (cHIL-6) bezeichnet. Entgegen der Verwendung der Zytokine und Rezeptoren als separate Komponenten erwies sich das cHIL-6 auf Ba/F3-hgp130 Zellen als aktiv, indem es ein Signal transduzierte. Auch wenn die EC50 für cHIL-6 in etwa um Faktor 4 höher war als für HIL-6 und HIL-11, lag sie dennoch im pikomolaren Bereich. Zur Vollständigkeit und um Nebeneffekte ausschließen zu können, erwies sich das sgp130Fc auch als potenter Inhibitor des cHIL-6. Die Inhibitionen von HIL-6 und HIL-11 mit sgp130 dienten hier als Referenzen. Zusätzlich ließ sich die Bindung des cHIL-6 an sgp130Fc mittels SPR messen. Auch hier zeigte cHIL-6 eine etwas geringere Bindungsaffinität gegenüber HIL-6 und HIL-11. Dies passt zu dem Ergebnis des Proliferationsassays mit den drei Hyperzytokinen. Ebenfalls passt dies tendenziell zu dem zuvor beschriebenen Effekt, dass IL-6 und sIL-11R in Co-kultivierung nicht im Stande waren, Ba/F3-hgp130 Zellen zu stimulieren. Die Kombination von IL-6 und IL-11R scheint im *trans-signaling* nicht effizient genug zu sein, lies sich durch Generierung des Hyperzytokins cHIL-6 allerdings ermöglichen. Möglicherweise ist es ein additiver Effekt aus dem was in den

SPR Ergebnissen zu beobachten war. Während unter den Kombinationsmöglichkeiten der Zytokin und Rezeptorvarianten, die Kombination von IL-6 an den IL-11R schwächer war als die kanonischen Kombinationen. War auch das chimäre Hyperzytokin zum sgp130 am schwächsten. Das heißt, für eine erfolgreiche IL-6:IL-11R *crossstalk* Signaltransduktion muss auch die geringere Affinität des temporären IL-6:IL-11R Komplexes zum gp130 berücksichtigt werden.

Erwähnenswert ist hierbei noch, dass andersherum zukünftig mit einem weiteren neuartigen Hyperzytokin, die Möglichkeit eines analogen IL-11:IL-6R *crossstalk* untersucht werden könnte. Dieses könnte als cHIL-11 bezeichnet werden, bestehend aus dem IL-11 verbunden über einen Peptidlinker mit dem sIL-6R. Schließlich war mit der SPR eine Andeutung für die Bindung von IL-11 an den IL-6R aufgetreten, welche im Proliferationsassay aber nicht biologisch aktiv war. **Abbildung 55** zeigt eine Übersicht zu den möglichen Kombinationen von IL-6, IL-11, IL-6R und IL-11R und deren bislang bekannte Aktivität.

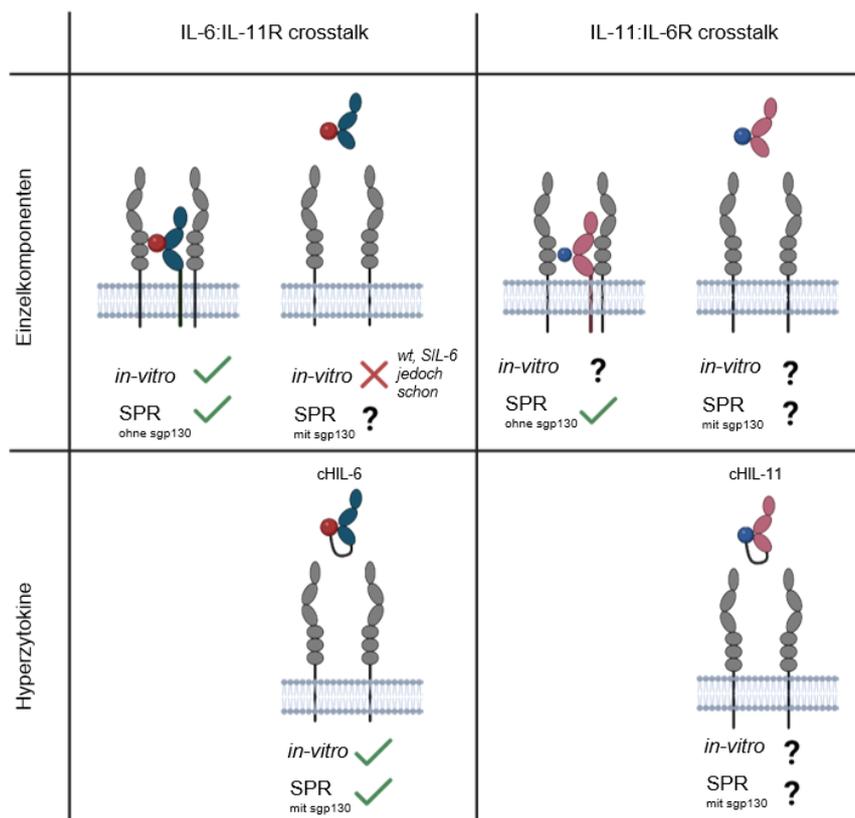


Abbildung 55 Übersicht zum IL-6:IL-11R *crossstalk* und IL-11:IL-6R *crossstalk*.

Links: IL-6:IL-11R *crossstalk* mit Einzelkomponenten (oben) und dem Hyperzytokin cHIL-6 (unten). **Rechts:** theoretischer IL-11:IL-6R *crossstalk* mit Einzelkomponenten (oben) und dem theoretischen Hyperzytokin cHIL-11. In Rot IL-6 und IL-6R, in blau IL-11 und IL-11R. Hyperzytokine sind durch schwarzen Peptidlinker symbolisiert. Erstellt mit biorender.com.

Der IL-6:IL-11R *crossstalk* lässt sich nur unter Verwendung von hohen IL-6 Konzentrationen induzieren. Folglich ist die Modifikation von IL-6 von Interesse, um das *crossstalk* Potential von IL-6 zu verändern. Möglicherweise könnte eine IL-6 Mutante mit einer höheren IL-11R *crossstalk* Effizienz generiert werden, sodass das *trans-signaling* im IL-6:IL-11R Modell doch induzierbar ist. Durch die Aminosäuren KTRL am N-Terminus des IL-11, wird ein weiterer *loop* an der α -Helix generiert, welche dem Rezeptor bei Interaktion zugewandt ist. Diese Aminosäuren existieren im wildtyp von IL-11 und sind im IL-6 nicht vorhanden. Die Addition dieser Aminosäuren am IL-6 führt zum IL-6-KTRL. Das IL-6-KTRL ließ sich in dieser Arbeit produzieren und erwies sich als biologisch aktiv. Im *classic signaling* mit Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen konnte allerdings kein Unterschied in den EC50 Werten für wt IL-6 und dem IL-6-KTRL festgestellt werden. Auch im Western Blot nach Stimulation dieser Zellen traten keine deutlichen Unterschiede zwischen dem wt IL-6 und dem IL-6-KTRL im pSTAT3 Signal auf.

Ein anderer Ansatz zur Generierung eines IL-6 mit verändertem IL-6:IL-11R *crossstalk* Potenzial, basierte auf einer IL-6 Variante, die bereits zuvor publiziert wurde [188] aber nicht auf den IL-6:IL-11R *crossstalk* untersucht wurde. Das IL-6-IRA-KD wurde in dieser Arbeit unter dem Namen SIL-6 generiert und produziert. SIL-6 erwies sich als biologisch aktiv und ähnelte im *classic signaling* im Proliferationsassay auf Ba/F3-hgp130-hIL-6R-hLIFR Zellen dem wt IL-6. Auf den Ba/F3-hgp130-hIL-11R-LIFR Zellen zeigte SIL-6 jedoch eine niedriger EC50 als die wildtyp Variante, was zunächst für ein gesteigertes *crossstalk* Potenzial spricht. Eine ähnliche Tendenz war auch bei der Phosphorylierung von STAT3 zu sehen. Der deutlichste Unterschied zwischen dem wt IL-6 und dem SIL-6 wurde allerdings bei der Simulation des *trans-signaling crossstalk* erkennbar. Während das wt IL-6 wie zuvor erwähnt nicht in der Lage war, in Cokultivierung mit sIL-11R die Ba/F3-hgp130 Zellen anzuregen, zeigte das SIL-6 sich bei dieser Kombination als signifikant aktiver und induzierten eine Proliferation bzw. STAT3 Phosphorylierung. In den SPR Messungen konnte allerdings keine bessere Bindungsaffinität von SIL-6 ($K_D = 22,58$ nM) zum sIL-11-R, verglichen mit dem wt IL-6 zum sIL-11R ($K_D = 22,58$ nM), festgestellt werden. Zusammenfassend, lässt sich daraus nicht direkt eine stärkere Interaktion vom SIL-6 mit dem IL-11R ableiten. Möglicherweise nehmen die Mutationen im SIL-6 auch Einfluss auf die gesamte Rezeptorkomplexbildung inkl. den gp130 Molekülen. Eine mögliche stärkere Interaktion mit gp130 ist nämlich hier in den SPR Messungen nicht berücksichtigt und kann in den biologischen Assays bislang nicht erkannt werden. Als Versuch könnte hier der IC50 Wert von

sgp130 auf Ba/F3-hgp130 Zellen, welche mit sIL-11R und IL-6 bzw. SIL-6 co-kultiviert werden bestimmt werden. Wäre die IC₅₀ von sgp130 bei der SIL-6 Kondition geringer als beim wildtyp IL-6, wäre dies ein Indiz für eine stärkere Bindung von SIL-6 über den sIL-11R im Komplex mit gp130. Ebenso wäre eine SPR Messung mit einer Kopplung von sgp130 als Ligand und sIL-11R und SIL-6 als Analyten ein möglicher Versuchsansatz der hierzu Aufschluss geben könnte. Leider ist solch ein Vergleich über SPR Messungen mit Hilfe von Rezeptorfusionsproteinen wie IL-6-RFP hier nicht umsetzbar, denn zum Vergleich fehlt ein IL-11-RFP. Zwar erhielten wir auch dafür die Gensequenz zur Expression, aber das Protein ließ sich nicht in unserem Expressionssystem herstellen, auch die Arbeitsgruppe von Prof. G. Müller-Newen selbst konnte bislang keine ausreichende Proteinproduktion etablieren. Andernfalls hätten mit IL-6-RFP und IL-11-RFP als Liganden in der SPR auch die Analyten IL-6, IL-11, sowie die Mutationsvarianten getestet und verglichen werden können.

Mit dem Ziel den IL-6:IL-11R *crosstalk* zu reduzieren, wurden Aminosäuren in der *site I* des IL-6 als mögliche Kandidaten für Mutationen gesucht. Die Mutationen wurden *in silico* mithilfe der verfügbaren Strukturmodellen so gewählt wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 5.7). Die vier Mutationen K53D, E68V, E171A und S175A wurden zunächst einzeln im IL-6 substituiert und nach der Expression und Reinigung auf ihre Aktivität getestet. Hierbei war kein Unterschied in den EC₅₀ Werten, sowohl im Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen als auch mit den Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen, gegenüber dem wildtyp IL-6 zu beobachten. Mit der Annahme, dass diese Mutationen von jeweils einer Aminosäure im IL-6 vielleicht nicht ausreichend genug für eine Veränderung des *crosstalk* Potentials waren, wurde die Kombinationsvariante, das MIL-6 (IL-6-K53D-E68V-E171A-S175A) generiert. Aber auch hier zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zum wt IL-6 im Proliferationsassay mit auf Ba/F3-hgp130-hIL-6R Zellen und Ba/F3-hgp130-hIL-11R Zellen.

Die Zytokinchimäre IC7, wurde von Findeisen *et al.* mit der Fähigkeit zur verbesserten Glukosetoleranz und Hyperglykämie beschreiben [127]. IC7 basiert auf der Sequenz von IL-6, wobei die gp130 Bindestelle *site III* vom IL-6 gegen die CNTF Bindestelle für den LIFR substituiert wurde [123]. Folglich ergab sich aus den Erkenntnissen zum IL-6:IL-11R *crosstalk* die Frage, ob das IC7 nicht auch eine Affinität zum IL-11R beinhaltet, da die *site I* mit der vom IL-6 gleich ist. Mit dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass das IC7 mit niedriger Affinität auch den IL-11R als α -Rezeptor bindet und somit Signale über einen IL-11R:LIFR:gp130 Komplex vermittelt. Auch wenn hier nur das *classic signaling* von IC7 untersucht wurde, so konnte der *crosstalk* im Proliferationsassay, Western Blot und mittels SPR simuliert werden. Ähnlich wie

für IL-6 ist die Aktivität von IC7 über den IL-6R höher als über den IL-11R. IC7 ist etwas ineffizienter als IL-6, zeigt aber ähnliche Tendenzen in den jeweiligen EC50 und K_D Werten, zu sehen in Tabelle 14.

Tabelle 14 Übersicht von IL-6 und IC7 beim kanonischen Signalweg verglichen mit dem *crossstalk* über den IL-11R.

		IL-6R	IL-11R
IL-6	Proliferation EC50 SPR K_D	$3,30 \pm 0,40$ pM 2,29 nM	$1,97 \pm 0,42$ nM 22,26 nM
IC7	Proliferation EC50 SPR K_D	$38,42 \pm 19,78$ pM 6,38 nM	$7,87 \pm 1,70$ nM 48,41 nM

Die Verwendung von IL-6 Analogika ist von Interesse, da sie in ihrer Anwendung möglicherweise Zelltypspezifischer sind und damit weniger Nebenwirkungen, wie eine übermäßige Entzündung hervorrufen. Verglichen mit IL-6 stellt IC7 einen solch möglichen Kandidaten dar, jedoch wurde kürzlich auch eine weitere *crossstalk* Aktivität dem IC7 und CNTF, nämlich über den Komplex von IL-6R:OSMR:gp130 zugewiesen [128]. Folglich könnte IC7 auch über den Komplex von IL-11R:OSMR:gp130 aktiv sein, was bislang nicht untersucht wurde.

Der IL-6:IL-11R *crossstalk* ist hier nur *in vitro* untersucht worden. Ob der *crossstalk* auch *in vivo* eine Rolle spielt, ist bislang nicht nachgewiesen. IL-6 und IL-11 werden für regenerative Prozesse und Geweberemodellierungen benötigt [202]. In vorherigen Publikationen wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu IL-6- und IL-11R-defizienten Mäusen, IL-6R defiziente Mäuse keine gestörten regenerativen Kapazitäten hatten [21, 203]. Dies dient als Indiz, dass der IL-6:IL-11R *crossstalk* eine biologische Relevanz haben könnte.

Verglichen mit IL-11 muss für den IL-6:IL-11R *crossstalk* eine höhere Konzentration von IL-6 gegeben sein (Faktor 100-1000 mehr). Auch wenn dies zunächst nach unnatürlichen Bedingungen für die Signalvermittlung von Zytokinen klingt, und im physiologischen Zustand IL-6 Serumkonzentrationen von wenigen pg/ml zu finden sind, können diese bei Inflammationen stark hochreguliert sein, bis zu ng/ml Konzentrationen [204]. Bei einer Sepsis können sogar IL-6 Konzentrationen im Bereich von ug/ml erreicht werden [1, 38]. Neben der globalen IL-6 Konzentration müssen bei regenerativen Prozessen oder bei Entzündungen auch die Konzentrationen im lokalen, also dem Milieu einer Entzündung berücksichtigt werden. Hierzu gibt es allerdings nur eine geringe Datenlage, da IL-6 Konzentrationen weitestgehend im Serum gemessen wird. Wie hoch die Konzentrationen im Mileu einer Entzündung sind ist

schwer zu bestimmen. Im Fall der Rheumatoiden Arthritis wird die Synovialflüssigkeit im Gelenk als Ursprung hoher IL-6 Konzentrationen beurteilt, demnach ist die lokale IL-6 Konzentration höher als die systemische, im Serum bestimmbare, IL-6 Konzentration [205, 206]. Dadurch könnten im lokalem Gewebe auch hohe IL-6 Konzentrationen vorliegen, wodurch IL-6 eine IL-11R vermittelte Aktivierung hervorbringt. Für parakrine Signalvermittlung, wenn die IL-6 produzierende Zelle in näherem Kontakt mit der Empfängerzelle ist, können ebenfalls höhere lokale Konzentrationen von IL-6 erreicht werden [207, 208], sodass die Möglichkeit für einen IL-6:IL-11R *crosstalk* auch in physiologischen Konditionen *in vivo* besteht. Daraus abgeleitet könnte der IL-6:IL-11R *crosstalk* also die IL-11R-vermittelte Phosphorylierung von STAT3 als Antwort auf Gewebsschäden und zur beschleunigten Gewebsheilung aktivieren.

Neben IL-11 kann, wie hier zum ersten Mal gezeigt, auch IL-6 über den IL-11R und einem gp130 Homodimer eine Signaltransduktion auslösen. Ob die assoziierten Signalkaskaden und die Expression von Zielgenen, durch die aktivierten Transkriptionsfaktoren, dabei identisch oder unterschiedlich sind, ist allerdings bislang ungeklärt. Denn auch wenn die Zytokine der IL-6 Familie ähnliche Rezeptorkomplexe bilden, so kommt es im Anschluss der Signaltransduktion zu unterschiedlichen Effekten, ausgelöst durch die Signaltransduktion [63]. Wie J. Martinez-Fabregas *et al.* bereits für das wt IL-6, IL-6 Mutationsvarianten und HIL-6 zeigten, dass es zu unterschiedlichen Signaltransduktionen führen kann, obwohl all diese Varianten über denselben α -Rezeptor (und einem gp130 Homodimer) ihr Signal vermitteln [209].

Die Erkenntnisse aus diesem *crosstalk* können in Zukunft für die Anwendung von Antikörpern, welche die IL-6 Signalwege inhibieren sollen von Bedeutung sein. Antikörper wie Siltuximab, die IL-6 binden, oder Tocilizumab und Sarilumab, die hingegen den IL-6R binden, führen möglicherweise zu unterschiedlichen Effekten, neben dem bereits bekanntem Unterschied das je nach *target* das *classic*- und/oder *trans-signaling* von IL-6 betroffen ist. So blockieren Antikörper die gegen den IL-6R gerichtet sind, nicht den möglichen IL-6:IL-11R *crosstalk*, anders als Antikörper gegen IL-6.

Das IL-6 *trans-signaling* ist häufig mit chronischen Entzündungen und pathologischen Prozessen assoziiert. Da die *in vivo* Effekte des IL-11 *trans-signaling* bislang weitestgehend unerforscht sind, ist es bislang auch unklar, was der IL-6:IL-11R *crosstalk* im *trans-signaling* bewirken könnte. Hierbei ist zu beachten, dass *in-vitro* kein *trans-signaling* mit dem wt IL-6 zu

erkennen war. Ob dies allerdings an den Konzentrationsverhältnissen liegt ist unklar, jedenfalls war mit dem cHIL-6 oder auch SIL-6 ein *trans-signaling* induzierbar.

Ebenfalls unbekannt ist die Rolle eines IL-11 *cluster signaling*. Hierbei stellt sich ebenso die Frage ob ein IL-6:IL-11R *cluster signaling* existieren könnte.

Mit diesem Projekt konnte ein alternativer Weg der Signaltransduktion von IL-6 und ein weiterer *crossstalk* innerhalb der IL-6 Familie gezeigt werden.

Verbesserte Leberregeneration nach PHx durch HIL-11Fc Applikation in IL-6R^{-/-} Mäusen:

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die physiologische Rolle des IL-11 *trans-signaling*s untersucht. Wie bereits erwähnt, ist dieser Signalweg bislang wenig erforscht. Aus den Vorarbeiten in unserem Institut ist bekannt, dass das IL-6 *trans-signaling* eine essenzielle Funktion bei der Leberregeneration nach einem akuten Leberschaden hat. Hierbei handelt es sich um die Simulation eines akuten Leberschadens durch eine partielle Hepatektomie. Bei einem operativen Entfernen von bis zu 70% der Leber besitzen wildtyp Mäuse eine 70-100%ige Überlebensquote, was die immense regenerative Fähigkeit der Leber in nicht-beeinträchtigten Tieren demonstriert [179, 210]. In IL-6R defizienten Tieren hingegen ist die Leberregeneration stark beeinträchtigt was sich durch eine deutlich verringerte Überlebensquote, von lediglich 20% nach einer PHx abzeichnet. Bei Mäusen, welche den IL-6R ausschließlich als löslichen Rezeptor produzieren, konnte eine Überlebensquote, die mit dem Wildtypen übereinstimmt, festgestellt werden [179]. Zusätzlich zeigte Peters *et al.* dass mittels HIL-6 Applikation die Lebermasse nach PHx schneller wieder zunimmt [183]. Damit also der Einfluss von HIL-11 in der Leberregeneration, ohne den Einfluss vom IL-6 *signaling* untersucht werden kann, wurden hier ebenfalls IL-6R^{-/-} Mäuse verwendet.

Die laboreigene Produktion von HIL-11Fc in Form von Expression und Proteinreinigung war erfolgreich und das rekombinante Protein erwies sich als biologisch aktiv im Proliferationsassay auf Ba/F3-hgp130 Zellen mit einer vergleichbaren EC50 zu HIL-6Fc. Zusätzlich wurden primären Hepatozyten, die aus wildtyp und IL-6R^{-/-} Mäusen isoliert wurden, *ex vivo* mit HIL-11Fc in der Zellkultur stimuliert, wodurch die JAK-STAT Signalkaskade aktiviert wurde, gemessen am pSTAT3 Signal.

Die PHx wurde bei IL-6R^{-/-} Mäusen durchgeführt, wobei eine Kohorte mit PBS als Kontrolle und eine mit einer zweifachen Injektion von je 20 µg HIL-11Fc, 24 Stunden vor und direkt im Anschluss der OP, behandelt wurden. Das Überleben der Tiere wurde über einen Zeitraum von 10 Tagen verfolgt, wobei die meisten Todesfälle innerhalb der ersten 2-3 Tage auftraten. HIL-11Fc erwies sich hierbei als vorteilhaft für die Leberregeneration, da sich die Überlebensquote von 20% (PBS Kohorte) zu 66% (HIL-11Fc Kohorte) signifikant unterschied. Intern wurde eine ähnliche Überlebenskinetik mit einer Kohorte die HIL-6Fc appliziert bekommen hat durchgeführt, und auch hier kam es zu einem Anstieg im Überleben (hier nicht gezeigt).

In den Kinetikexperimenten wurden von den Tieren, die einer partiellen Hepatektomie unterzogen wurden, Proben zum Zeitpunkt 6, 12, 24 und 48 Stunden nach PHx, sowie zum Ausgangspunkt 0 Stunden, entnommen. Hier wurde nur auf initiale Untersuchungen zu Serum und Leberproben eingegangen. Im Serum wurden die Leberparameter AST, ALT und ALP untersucht. Für alle drei Parameter war 6 Stunden nach der PHx ein signifikanter Unterschied, mit geringeren Konzentrationen, in den IL-6R^{-/-} Mäusen die mit HIL-11Fc behandelt wurden, zu beobachten. Dies spricht für einen besseren Zustand der Leber durch HIL-11Fc. Für ALP allerdings stiegen die Konzentrationen bis 48 Stunden nach der Operation stetig an, hier war kein Unterschied zwischen der PBS oder HIL-11Fc Behandlung zu erkennen. Von großem Interesse wäre demnach die Untersuchung eines noch späteren Zeitpunktes, wie zum Beispiel 72 Stunden oder gar 96 Stunden nach der Operation, um zu sehen, ob die Werte sich mit fortgeschrittener Proliferation der Hepatozyten und damit verbundenen Zunahme der Lebermasse, zumindest auf einem konstanten Niveau arretieren, oder sich wieder (unterschiedlich schnell) reduzieren.

In der Leber konnte ein HIL-11 induziertes pSTAT3 Signal detektiert werden, was im Allgemeinen für das Überleben von Zellen und der Anregung von Proliferation assoziiert ist. In sämtlichen Modellen eines Leberschadens, ist die induzierte STAT3 Aktivierung erkennbar. STAT3-Signale können durch eine Vielzahl an Faktoren in den Hepatozyten ausgelöst werden, wie IL-6 und IL-6 Familienmitglieder (LIF, CNTF, OSM, CT-1 und IL-11). Während IFN- α/β und IFN- γ in Hepatozyten überwiegend STAT1, aber auch STAT3 aktivieren [211]. Die STAT3 Aktivierung resultiert in einer verstärkten Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF und IFN, sowie Zellzyklus assoziierte Proteine wie Histon 3 und Wachstumsfaktoren wie hier HGF [212]. Für gewöhnlich wird IL-6 bei der Leberregeneration hochreguliert, interagiert mit dem IL-6R und gp130 auf Hepatozyten und

folglich wird STAT3 in diesen phosphoryliert und führt zur Expression von Zielgenen, die an der Leberregeneration beteiligt sind [213]. Durch die Abwesenheit des IL-6 Signalweges in IL-6R defizienten Tieren, ist das pSTAT3 Signal fehlend [182], was hier in der Kohorte die lediglich mit PBS behandelt wurde im Western Blot erkennbar ist. Neben pSTAT3 könnten hier zusätzliche Western Blots das Bild einer aktivierten Signaltransduktion anderer Signalwege erkennbar an pERK oder AKT Signalen oder auch Zielgenen einer induzierten Proliferation wie PCNA (*proliferating-cell-nuclear antigen*) oder Cyclin D1 untermauern [214].

In den histologischen Untersuchungen zeichnete sich der Trend ab, dass durch Behandlung mit HIL-11Fc die IL-6R^{-/-} Tiere nach einer PHx eine gesündere Leberarchitektur aufwiesen. Neben der visuellen Interpretation wurden hier Lymphozyteninfiltrate sowie Stellen in denen das Lebergewebe gestört erscheint per Zählung ausgewertet. Aufgrund der hohen Standardabweichung war kein signifikanter Unterschied in den Infiltraten zu verzeichnen. Hier könnte sich ein klareres Bild ergeben, wenn mehr Tiere pro Kohorte analysiert wurden, oder die Schnitte zusätzlich auf bestimmte Zellpopulationen angefärbt werden z.B. mit Antikörper gegen CD45 (Lymphozyten), B220 (B-Zellen), CD4 (T-Helferzellen) oder CD8 (cytotoxische T-Zellen) um bestimmte Immunzellpopulationen sichtbar zu machen [215]. Zum Zeitpunkt von 6 Stunden nach der PHx in den IL-6R^{-/-} Mäuse wurden signifikant mehr nekrotische Areale in den PBS behandelten Tieren beobachtet und auch zum Zeitpunkt von 48 Stunden zeichnete sich ein Trend ab, welcher durch Erhöhung der Probenanzahl sich als signifikant herausstellen könnte. Bei den Gewebstörungen lassen sich nekrotische Areale vermuten [216, 217].

Nach einer 70%igen Hepatektomie teilen sich die Hepatozyten in den verbliebenen Leberlappen etwa 1,6-mal, während das Gewicht der Leberlappen um den Faktor 2,4 zunimmt. Das heißt, die Hepatozyten unterliegen nicht nur einer Hyperplasie (Vervielfältigung) sondern auch einer Hypertrophie (Größenzunahme) [218]. Die Proliferation der Hepatozyten startet in Mäusen nach ca. 36-48 Stunden nach der PHx innerhalb der *Lobuli* an den *Glisson-Trias*, hin zu den perizentralen Bereichen [219]. Während die Hepatozyten ihren Höchstpunkt der DNA-Synthese 24 Stunden nach der PHx haben, folgen die anderen Zelltypen der Leber mit ihrer DNA-Synthese, wobei die Synthese nach 24 Stunden beginnt und 48 Stunden oder 72 Stunden erst ihren Höhepunkt erreicht. Regenerierende Hepatozyten vermitteln dabei über Wachstumsfaktoren (z.B. *vascular endothelial growth factor* VEGF, *fibroblast growth factor* FGF 1 und 2 oder *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* GM-CSF) ein parakrines Signal, welches die anderen Zelltypen der Leber anregen [170, 218, 220]. Mit der pH3⁺ Färbung

als Marker für Zellproliferation wurden signifikant mehr proliferative Hepatozyten in den HIL-11Fc behandelten Tieren 48 Stunden nach der PHx beobachtet, verglichen zu den Mäusen, die lediglich PBS appliziert bekamen. Auch 12 Stunden nach PHx wurden mehr positive Signale in der Kohorte mit HIL-11Fc Behandlung beobachtet auch wenn die Differenz nicht signifikant war. Da nur jeweils 3 Tiere pro Kondition untersucht wurden ist hier die Standardabweichung relativ hoch. Eine Erhöhung der Probenanzahl würde mehr Aufschluss liefern. Weitere Färbungen z.B. gegen pSTAT3, PCNA, Ki-67 oder BrdU, die ebenfalls für einen aktivierten Zellzyklus interpretiert werden können, würden sich hier anbieten, um das Bild zu vervollständigen [214, 221, 222].

Als Indikation für apoptotische Zellen wurden bei der TUNEL-Färbung, signifikant mehr Signale 24 Stunden nach der PHx in den PBS behandelten IL-6R^{-/-} Mäusen gezählt. Auch für 48 Stunden nach der PHx scheinen noch deutlich mehr Apoptose Signale für die PBS Kontrollen vorzuliegen, auch wenn die Ergebnisse zu den drei Proben aus dieser Kohorte sehr unterschiedlich waren. Hierbei sollten mehr Proben in Betracht gezogen werden um das Bild, dass entgegen der PBS Kontrolle, das HIL-11Fc einen protektiven Effekt auf die Hepatozyten in der Leberregeneration beinhaltet, zu verdeutlichen. Gegebenenfalls bietet sich hier auch die Untersuchung eines noch späteren Zeitpunkts (72 Stunden) an.

Da die IL-11 vermittelte Signaltransduktion in anderen Modellen von chronischen Leberschäden auch mit Fibrose in Kontext gebracht wird [53, 223] würde sich hier auch zusätzlich eine Färbung für fibrotisches Gewebe anbieten (Masson-Trichromfärbung) [224]. Auch wenn die Fibrose überwiegend bei chronischen Leberschäden und deren Progression untersucht wird [225] so zeigen auch akute Leberschäden fibrotische Züge, deren anhaltende Progression zu Leberversagen führen kann.

Aus dieser und vorherigen Arbeiten geht hervor, dass HIL-11 und damit assoziiert, der IL-11 trans-Signalweg, unterstützend in der Leberregeneration nach PHx in IL-6R^{-/-} Mäusen wirkt. Die Analysen werden zukünftig aber noch weiter vervollständigt.

8. Outlook

IL-6:IL-11R crosstalk

Die Ergebnisse aus beiden Projekten führen zu neuen Fragestellungen und bergen noch offene Punkte die adressiert werden sollten. Zum einen kann der IL-6:IL-11R *crosstalk in vitro* vollständigshalber noch auf anderen Zellkultursystemen getestet werden, da hier bislang Ba/F3 modifizierte Zelllinien verwendet wurden. Die Ba/F3 Zellen bieten sich für die Zytokinforschung der IL-6 Familie an, da sie eine der wenigen Zelltypen sind, die keine endogene Expression von gp130, IL-6R oder IL-11R haben. Andere Zellen die keinen IL-6R, wohl aber einen IL-11R auf ihrer Oberfläche präsentieren, sollten zur Validierung ebenfalls mit hohen Konzentrationen von IL-6 stimuliert werden. NIH/3T3, eine Fibroblasten-Zelllinie, verfügt beispielsweise über gp130 und IL-11R, aber keinen IL-6R, weshalb bislang von einer Responsivität auf HIL-6, nicht aber auf IL-6 ausgegangen wird [226]. Die IL-11R positive Zelllinie K562 verfügt ebenfalls für gewöhnlich nicht über eine IL-6R Expression. Dieser kann allerdings je nach Kondition exprimiert werden [227, 228]. Für einen solchen Fall könnte sich die CRISPR-CAS9 Technologie anbieten, um die Gensequenz für den IL-6R zu deletieren.

Wie bereits erwähnt, ist in der SPR eine Bindung von IL-11 an den IL-6R beobachtet worden, was sich allerdings in keiner biologischen Aktivität nachweisen ließ, bspw. im Proliferationsassay. Da IL-6 kein *trans-signaling* mit dem sIL-11R induzieren konnte, wohl aber das cHIL-6 (IL-6:IL-11R), könnte ein analoges derartiges Hyperzytokin (cHIL-11, IL-11 gekoppelt an den IL-6R) auch zur weiteren Untersuchung eines analogen IL-11:IL-6R *crosstalk* generiert und erprobt werden. Durch den Peptidlinker würde die erste Bindung zwischen Zytokin und α -Rezeptor „erzwungen“ werden, sodass zunächst überprüft werden kann ob der Komplex aus IL-11:sIL-6R überhaupt an ein gp130 Dimer binden und eine Signaltransduktion induzieren kann.

Entgegen dem wildtyp IL-6 konnte SIL-6 ein *trans-signaling* auf den Ba/F3-hgp130 Zellen mit dem IL-11R auslösen. Die Mutationen im SIL-6 wurden von Toniatti *et al.* mit einer höheren Affinität zum IL-6R beschrieben, was hier in den SPR Messungen mit dem IL-6R als Liganden allerdings nicht eindeutig erkennbar wurde. Daraus ergab sich die Vermutung, ob die eingebrachten Mutationen im SIL-6 auch verstärkt mit den gp130 Molekülen interagieren und deshalb das *trans-signaling* ermöglicht wird. In den SPR Messungen war die Interaktion mit gp130 nicht mit einbezogen. Ein anderer Ansatz zur Messung mit sgp130Fc, IL-11R-his und IL-6-ts bzw. verglichen mit SIL-6-ts könnte hierzu näheren Aufschluss geben. Zusätzlich

könnte ein Proliferationsassay mit Ba/F3-hgp130 Zellen und sIL-6R und IL-6 bzw. SIL-6 zur Untersuchung der IC₅₀ von sgp130Fc untersucht werden. Ist der IC₅₀ Wert von sgp130Fc in der Cokultivierung mit SIL-6 geringer als in der Kultivierung mit dem wt IL-6, so bindet der SIL-6:sIL-6R Komplex vermutlich stärker an das sgp130Fc als der IL-6:sIL-6R Komplex.

Der IL-6:IL-11R *crosstalk* ist in Teilen auch Speziesübergreifend zwischen dem humanem und murinem System. Während das humane IL-6 sowohl den hIL-11R als auch den mIL-6R binden und eine Signaltransduktion induzieren kann, kann dies das murine IL-6 nicht [187]. Dies wurde beispielsweise im inhibitorischen Proliferationsassay in Kapitel 5.2 unter Verwendung von Ba/F3-hgp130-mIL-11R Zellen gezeigt. Hieraus ergab sich die Fragestellung, ob die Spezies des gp130 dafür essenziell ist. Wir haben in diese Zellen zusätzlich das mgp130 retroviral transduziert und dennoch war keine Aktivierung mit mIL-6 auf den neuen Ba/F3-hgp130-mIL-11R-mgp130 Zellen möglich (präliminäre Experimente hier nicht gezeigt). Als nächsten Ansatz könnte man das mIL-6 modifizieren um den *crosstalk* zu ermöglichen. Interessant wäre hierbei der Austausch von einzelnen Sequenzen des murinen IL-6 gegen Teile des humanen IL-6, beispielsweise in der *site I*, die für die α -Rezeptorbindung verantwortlich ist. Adrian-Segarra *et al.* hat bereits für OSM einen ähnlichen Ansatz verfolgt. Während OSM keine Spezieskreuzreaktivität besitzt konnte durch Austausch von Aminosäuren im AB-loop des Zytokins solch eine Kreuzreaktivität hergestellt werden [229].

Anders gesagt, könnte durch eine human-murine IL-6 Chimäre nicht nur der *crosstalk* von mIL-6 ermöglicht werden, sondern auch ein humanes IL-6 erzeugt werden, welches keine *crosstalk* Aktivität mehr zum IL-11R aufweist. Da die einzelnen Mutationen sowie die Kombimutationsvariante MIL-6 nicht den erhofften Effekt zeigten (siehe Kapitel 5.7 Einzelne Aminosäuresubstitutionen sowie eine Kombination dieser Mutationen im IL-6 zeigten keine Reduzierung des IL-6:IL-11R *crosstalk* Potenzials), könnte so eine Alternative gefunden werden um den IL-6:IL-11R *crosstalk* zu reduzieren oder gar aufzuheben.

Für CNTF ist bereits ein *crosstalk* zum IL-6R beschrieben worden [119] und die IL-6/CNTF Chimäre IC7 erwies sich ebenfalls als kreuzreaktiv auf die Rezeptorkombination IL-11R:LIFR:gp130 (siehe Kapitel 5.4 Das chimäre Zytokin IC7 kann auch über den IL-11R einen nicht-kanonischen gp130 Rezeptorkomplex bilden). Folglich könnte hier ebenfalls ein CNTF:IL-11R *crosstalk* existieren, welchen es zu untersuchen gilt. Ein erster Proliferationsassay auf Ba/F3-gp130-hIL-11R-hLIFR Zellen mit serieller Verdünnung von rekombinantem CNTF, beginnend ab 1000 ng/ml, deutete auf eine Zytokin basierte

Proliferation hin (hier nicht gezeigt). Hierzu bedarf es an mehr Replikaten und weiteren Experimenten zur Verifizierung.

Darüber hinaus wäre es insgesamt Interessant die Relevanz des IL-6/IL-11R *crosstalk* in *ex vivo* oder *in vivo* Untersuchungen weiter zu studieren, um Möglicherweise eine physiologische Rolle des *crosstalks* zuordnen zu können.

HIL-11Fc Applikation in IL-6R^{-/-} Mäusen und PHx:

Die HIL-11Fc induzierten Effekte in der Leberregeneration von IL-6R^{-/-} Mäusen nach PHx sollten noch erweitert werden um ein genaueres Bild zu geben und Vergleiche zu anderen Modellen (Leberschaden oder Mausgenotypen) oder Proteinen (z.B. HIL-6Fc) zu ermöglichen.

Das Blutbild der operierten Mäuse wurde gemessen und Unterschiede in den Neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu den Zeitpunkten 0 und 6 Stunden nach PHx deuteten sich an (Analyse nicht abgeschlossen, hier nicht gezeigt). Für eine vollständige Auswertung könnten in den Geweben Leber und (ggf. Milz) zusätzliche Färbungen von Histologieschnitten oder FACS Messungen gegen diese Populationen vorgenommen werden, um zu überprüfen, ob zu späteren Zeitpunkten als 6 Stunden diese Zellpopulationen in der Leber oder Milz vermehrt vorzufinden sind, d.h. ob sie aus dem Blut in das Gewebe einwandern, um dort möglicherweise eine Funktion auszuüben.

In der beginnenden Phase der Leberregeneration haben Gallensalze als wichtige metabolische Faktoren eine unterstützende Rolle. Die erhöhten Konzentrationen von Gallensalzen induzieren durch den Farnesoid-X-Rezeptor (FXR) –Signale, die die Leberregeneration beschleunigen [230]. Neben dem positiven Effekt, können die Gallensalze allerdings auch die Apoptose initiieren, weshalb eine dauerhafte Akkumulation beziehungsweise bestimmte toxische Gallensalzderivate wie Lithocholsäure (LCA)) eher von Nachteil für die Leberregeneration sein können [231]. Aus dem Serum und aus Organstücken aus den Leberproben können mittels *ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry* (UPLS-MS/MS) die Konzentrationen an Gallensalzen und deren konjugierten Derivate bestimmt werden. Hierzu werden aus der Kooperation mit Dr. Diran Herebian aus der Pädiatrie des Universitätsklinikums Düsseldorf zukünftig noch weitere Ergebnisse erhoben.

Mittels ELISA und Luminex Messungen können aus Serumproben weitere Konzentrationsbestimmungen von Zytokinen und Wachstumsfaktoren die mit der Leberregeneration assoziiert sind (z.B. TNF α , HGF, IL-6, IL-11) in den PBS bzw. HIL-11Fc behandelten Tieren verglichen werden. Zusätzlich kann aus der isolierten RNA von

Organproben der Leber und Milz mittels qPCR auch eine Aussage über die Zytokinexpressionen der zuvor genannten *targets* oder auch von Zellzyklusgenen (z.B. CD1, Ki67) getroffen werden. Zusätzlich könnten mit weiteren Western Blots auch die anderen Signalwege (z.B. anhand pERK oder AKT Signale) oder auch Zellzyklusgene (z.B. PCNA) zu den verschiedenen Zeitpunkten und Konditionen detektiert werden. Weiterhin kann aus der isolierten RNA auch das Transkriptom zwischen den Konditionen verglichen werden, also welche Gene durch PBS oder HIL-11Fc gemeinsam bzw. unterschiedlich exprimiert werden. Darüber hinaus kann die Fülle an Daten mit analogen Kinetikexperimenten mit HIL-6Fc Applikation bei einer PHx verglichen werden. Wenngleich beide Hyperzytokine, HIL-6 und HIL-11, die Signaltransduktion über gp130 initiieren, kann es zu unterschiedlichen Genexpressionen kommen. So können auch gemeinsame bzw. unterschiedliche *targets* zwischen HIL-6Fc und HIL-11Fc Behandlungen bei einer PHx identifiziert werden.

In den hier gezeigten Analysen wurden die Proben aus Organentnahmen von Milz und Darm bisweilen nicht in Betracht gezogen. Die Untersuchung dieser könnte die systemische Komplexität der Leberregeneration weiter beleuchten und weitere Aufschlüsse dazu geben, warum HIL-11Fc insgesamt die Überlebensquote der IL-6R^{-/-} Mäuse gesteigert hat.

Anders als beim IL-6 sind innerhalb der Familie der IL-6-artigen Zytokine die Funktionen zur Leberregeneration noch weitestgehend unerforscht. Deshalb wäre es relevant auch zu untersuchen, ob die heterodimeren gp130 Rezeptorkomplexe ebenfalls die PHx in IL-6R defizienten Tieren kompensieren können. Für LIF und OSM ist beispielweise die mögliche Induktion der Akuten-Phase-Proteine bekannt [232] was für eine Aktivität dieser Zytokine auf der Leber spricht. Für OSM ist eine regenerative Kapazität bei CCl₄-induziertem Leberschädigungen beschrieben, sowie das OSMR^{-/-} Mäuse in der Wiederherstellung der Lebermasse nach PHx beeinträchtigt sind [233]. Neben HIL-6 und HIL-11, sollten deshalb auch LIF, OSM (und OSMAB2) in Überlebensexperimenten von IL-6R^{-/-} Tieren mit PHx untersucht werden. Um anschließend auch genauer begründen zu können, warum bei diesen dann die Leberregeneration verbessert oder nicht beeinflusst wäre, bedarf es ähnliche Kinetikexperimente und Analysen.

In der vorangegangenen Arbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe von N. Fazel-Modares, wurde eine andere Mauslinie verwendet, welche den sIL-6R lediglich in seiner löslichen Form produzierte [179]. Daraus ließ sich die positive Wirkung des IL-6 *trans-signaling* auf die Leberregeneration nach PHx schließen. Durch Gabe von sgp130Fc konnte die

Leberregeneration in Ihrem Modell eingeschränkt werden. Nachdem hier nun auch ein positiver Effekt dem HIL-11Fc zuzuschreiben ist, könnte zur Verifizierung den Tieren zusätzlich zum HIL-11Fc ebenfalls der *trans-signaling* Inhibitor sgp130Fc verabreicht werden. So könne man die Effekte tatsächlich auf die HIL-11 vermittelte Signaltransduktion zurückführen. In ähnlicher Hinsicht wäre es interessant die HIL-11Fc Injektion mit einer HIL-11-ts Variante zu vergleichen. Oder als Kontrolle ein nicht immunogenes Protein mit demselben Fc-Teil wie im HIL-11Fc zu applizieren.

Generell wurden die Hyperzytokine HIL-6 und HIL-11 basierend auf den humanen Zytokinen und Rezeptoren in der Leberregeneration nach PHx untersucht. Interessant wäre ebenfalls ein Vergleich mit den murinen Hyperzytokin-Varianten.

Zusammenfassend wurde hier erstmals erkannt, dass durch HIL-11Fc simuliertes IL-11 *trans-signaling* in der Lage ist, die beeinträchtigte Leberregeneration nach PHx in IL-6R^{-/-} Mäusen zu kompensieren.

9. Referenzen

1. Rose-John, S., B.J. Jenkins, C. Garbers, J.M. Moll, and J. Scheller, *Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects*. Nat Rev Immunol, 2023. **23**(10): p. 666-681.
2. Kang, S., M. Narazaki, H. Metwally, and T. Kishimoto, *Historical overview of the interleukin-6 family cytokine*. J Exp Med, 2020. **217**(5).
3. Dinarello, C.A., *Historical insights into cytokines*. Eur J Immunol, 2007. **37 Suppl 1**(Suppl 1): p. S34-45.
4. Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, and et al., *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin*. Nature, 1986. **324**(6092): p. 73-6.
5. Murakami, M., D. Kamimura, and T. Hirano, *Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 812-831.
6. Naka, T., N. Nishimoto, and T. Kishimoto, *The paradigm of IL-6: from basic science to medicine*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**(Suppl 3): p. S233-42.
7. Jones, S.A., S. Horiuchi, N. Topley, N. Yamamoto, and G.M. Fuller, *The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease*. Faseb j, 2001. **15**(1): p. 43-58.
8. Heike, T. and T. Nakahata, *Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 313-21.
9. Jones, S.A. and B.J. Jenkins, *Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(12): p. 773-789.
10. Dienz, O., J.G. Rud, S.M. Eaton, P.A. Lanthier, E. Burg, A. Drew, J. Bunn, B.T. Suratt, L. Haynes, and M. Rincon, *Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung*. Mucosal Immunol, 2012. **5**(3): p. 258-66.
11. Hoge, J., I. Yan, N. Jänner, V. Schumacher, A. Chalaris, O.M. Steinmetz, D.R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John, and H.W. Mittrücker, *IL-6 controls the innate immune response against Listeria monocytogenes via classical IL-6 signaling*. J Immunol, 2013. **190**(2): p. 703-11.
12. Kopf, M., H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Köhler, *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*. Nature, 1994. **368**(6469): p. 339-42.
13. Hunter, C.A. and S.A. Jones, *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease*. Nat Immunol, 2015. **16**(5): p. 448-57.
14. Rose-John, S., *Interleukin-6 signalling in health and disease*. F1000Res, 2020. **9**.
15. Ohshima, S., Y. Saeki, T. Mima, M. Sasai, K. Nishioka, S. Nomura, M. Kopf, Y. Katada, T. Tanaka, M. Suemura, and T. Kishimoto, *Interleukin 6 plays a key role in the*

- development of antigen-induced arthritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8222-6.
16. Alonzi, T., E. Fattori, D. Lazzaro, P. Costa, L. Probert, G. Kollias, F. De Benedetti, V. Poli, and G. Ciliberto, *Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis*. J Exp Med, 1998. **187**(4): p. 461-8.
 17. Scott, L.J., *Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis*. Drugs, 2017. **77**(17): p. 1865-1879.
 18. Sanmartí, R., V. Ruiz-Esquide, C. Bastida, and D. Soy, *Tocilizumab in the treatment of adult rheumatoid arthritis*. Immunotherapy, 2018. **10**(6): p. 447-464.
 19. Raimondo, M.G., M. Biggioggero, C. Crotti, A. Becciolini, and E.G. Favalli, *Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis*. Drug Des Devel Ther, 2017. **11**: p. 1593-1603.
 20. Smolen, J.S., R.B.M. Landewé, S.A. Bergstra, A. Kerschbaumer, A. Sepriano, D. Aletaha, R. Caporali, C.J. Edwards, K.L. Hyrich, J.E. Pope, S. de Souza, T.A. Stamm, T. Takeuchi, P. Verschueren, K.L. Winthrop, A. Balsa, J.M. Bathon, M.H. Buch, G.R. Burmester, F. Buttgereit, M.H. Cardiel, K. Chatzidionysiou, C. Codreanu, M. Cutolo, A.A. den Broeder, K. El Aoufy, A. Finckh, J.E. Fonseca, J.E. Gottenberg, E.A. Haavardsholm, A. Iagnocco, K. Lauper, Z. Li, I.B. McInnes, E.F. Mysler, P. Nash, G. Poor, G.G. Ristic, F. Rivellese, A. Rubbert-Roth, H. Schulze-Koops, N. Stoilov, A. Strangfeld, A. van der Helm-van Mil, E. van Duuren, T.P.M. Vliet Vlieland, R. Westhovens, and D. van der Heijde, *EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update*. Ann Rheum Dis, 2023. **82**(1): p. 3-18.
 21. Sommer, J., E. Engelowski, P. Baran, C. Garbers, D.M. Floss, and J. Scheller, *Interleukin-6, but not the interleukin-6 receptor plays a role in recovery from dextran sodium sulfate-induced colitis*. Int J Mol Med, 2014. **34**(3): p. 651-60.
 22. Pawłowska-Kamieniak, A., P. Krawiec, and E. Pac-Kożuchowska, *Interleukin 6: Biological significance and role in inflammatory bowel diseases*. Adv Clin Exp Med, 2021. **30**(4): p. 465-469.
 23. Schreiber, S., K. Aden, J.P. Bernardes, C. Conrad, F. Tran, H. Höper, V. Volk, N. Mishra, J.I. Blase, S. Nikolaus, J. Bethge, T. Kühbacher, C. Röcken, M. Chen, I. Cottingham, N. Petri, B.B. Rasmussen, J. Lokau, L. Lenk, C. Garbers, F. Feuerhake, S. Rose-John, G.H. Waetzig, and P. Rosenstiel, *Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease*. Gastroenterology, 2021. **160**(7): p. 2354-2366.e11.
 24. Tie, Y., M. Chen, and S. Zhang, *Insights into the molecular mechanisms and therapeutic implications of interleukin-6 for inflammatory bowel disease*. Chin Med J (Engl), 2023. **136**(18): p. 2143-2146.
 25. Nakase, H., N. Sato, N. Mizuno, and Y. Ikawa, *The influence of cytokines on the complex pathology of ulcerative colitis*. Autoimmun Rev, 2022. **21**(3): p. 103017.
 26. Alhendi, A. and S.A. Naser, *The dual role of interleukin-6 in Crohn's disease pathophysiology*. Front Immunol, 2023. **14**: p. 1295230.
 27. Gesiorowski, A., J. Ettich, J. Werner, C. Wittich, S. Pieper, G. Padrini, K. Behnke, D.M. Floss, P.A. Lang, J.M. Moll, and J. Scheller, *Bispecific soluble cytokine receptor-*

- nanobody fusions inhibit Interleukin (IL-)6 trans-signaling and IL-12/23 or tumor necrosis factor (TNF) signaling.* J Biol Chem, 2023. **299**(11): p. 105343.
28. Rašková, M., L. Lacina, Z. Kejík, A. Venhauerová, M. Skaličková, M. Kolář, M. Jakubek, D. Rosel, K. Smetana, Jr., and J. Brábek, *The Role of IL-6 in Cancer Cell Invasiveness and Metastasis-Overview and Therapeutic Opportunities.* Cells, 2022. **11**(22).
 29. Huseni, M.A., L. Wang, J.E. Klementowicz, K. Yuen, B. Breart, C. Orr, L.F. Liu, Y. Li, V. Gupta, C. Li, D. Rishipathak, J. Peng, Y. Şenbabaoğlu, Z. Modrusan, S. Keerthivasan, S. Madireddi, Y.J. Chen, E.J. Fraser, N. Leng, H. Hamidi, H. Koeppen, J. Ziai, K. Hashimoto, M. Fassò, P. Williams, D.F. McDermott, J.E. Rosenberg, T. Powles, L.A. Emens, P.S. Hegde, I. Mellman, S.J. Turley, M.S. Wilson, S. Mariathasan, L. Molinero, M. Merchant, and N.R. West, *CD8(+) T cell-intrinsic IL-6 signaling promotes resistance to anti-PD-L1 immunotherapy.* Cell Rep Med, 2023. **4**(1): p. 100878.
 30. Firor, A.E., A. Jares, and Y. Ma, *From humble beginnings to success in the clinic: Chimeric antigen receptor-modified T-cells and implications for immunotherapy.* Exp Biol Med (Maywood), 2015. **240**(8): p. 1087-98.
 31. Si, W., C. Li, and P. Wei, *Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy.* Synth Syst Biotechnol, 2018. **3**(3): p. 179-185.
 32. Maalej, K.M., M. Merhi, V.P. Inchakalody, S. Mestiri, M. Alam, C. Maccalli, H. Cherif, S. Uddin, M. Steinhoff, F.M. Marincola, and S. Dermime, *CAR-cell therapy in the era of solid tumor treatment: current challenges and emerging therapeutic advances.* Mol Cancer, 2023. **22**(1): p. 20.
 33. Norelli, M., B. Camisa, G. Barbiera, L. Falcone, A. Purevdorj, M. Genua, F. Sanvito, M. Ponzoni, C. Doglioni, P. Cristofori, C. Traversari, C. Bordignon, F. Ciceri, R. Ostuni, C. Bonini, M. Casucci, and A. Bondanza, *Monocyte-derived IL-1 and IL-6 are differentially required for cytokine-release syndrome and neurotoxicity due to CAR T cells.* Nat Med, 2018. **24**(6): p. 739-748.
 34. Kishimoto, T. and S. Kang, *IL-6 Revisited: From Rheumatoid Arthritis to CAR T Cell Therapy and COVID-19.* Annu Rev Immunol, 2022. **40**: p. 323-348.
 35. *Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial.* Lancet, 2021. **397**(10285): p. 1637-1645.
 36. Rodríguez-Hernández, M., D. Carneros, M. Núñez-Núñez, R. Coca, R. Baena, G.M. López-Ruiz, M.E. Cano-Serrano, A. Martínez-Tellería, A. Fuentes-López, J.M. Praena-Fernandez, C. Garbers, J. Hernández-Quero, F. García, S. Rose-John, and M. Bustos, *Identification of IL-6 Signalling Components as Predictors of Severity and Outcome in COVID-19.* Front Immunol, 2022. **13**: p. 891456.
 37. Ettich, J., J. Werner, H.T. Weitz, E. Mueller, R. Schwarzer, P.A. Lang, J. Scheller, and J.M. Moll, *A Hybrid Soluble gp130/Spike-Nanobody Fusion Protein Simultaneously Blocks Interleukin-6 trans-Signaling and Cellular Infection with SARS-CoV-2.* J Virol, 2022. **96**(4): p. e0162221.
 38. Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf, and T. Espevik, *The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock.*

- Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome.* J Exp Med, 1989. **169**(1): p. 333-8.
39. Kaye, J.A., *FDA licensure of NEUMEGA to prevent severe chemotherapy-induced thrombocytopenia.* Stem Cells, 1998. **16 Suppl 2**: p. 207-23.
 40. Dong, B., M. Hiasa, Y. Higa, Y. Ohnishi, I. Endo, T. Kondo, Y. Takashi, M. Tsoumpra, R. Kainuma, S. Sawatsubashi, H. Kiyonari, G. Shioi, H. Sakaue, T. Nakashima, S. Kato, M. Abe, S. Fukumoto, and T. Matsumoto, *Osteoblast/osteocyte-derived interleukin-11 regulates osteogenesis and systemic adipogenesis.* Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 7194.
 41. Kespohl, B., T. Schumertl, J. Bertrand, J. Lokau, and C. Garbers, *The cytokine interleukin-11 crucially links bone formation, remodeling and resorption.* Cytokine Growth Factor Rev, 2021. **60**: p. 18-27.
 42. Agthe, M., Y. Garbers, T. Putoczki, and C. Garbers, *Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice.* Placenta, 2017. **57**: p. 13-16.
 43. Lokau, J., B. Kespohl, S. Kirschke, and C. Garbers, *The role of proteolysis in interleukin-11 signaling.* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2022. **1869**(1): p. 119135.
 44. Allanki, S., B. Strilic, L. Scheinberger, Y.L. Onderwater, A. Marks, S. Günther, J. Preussner, K. Kikhi, M. Looso, D.Y.R. Stainier, and S. Reischauer, *Interleukin-11 signaling promotes cellular reprogramming and limits fibrotic scarring during tissue regeneration.* Sci Adv, 2021. **7**(37): p. eabg6497.
 45. 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. Guimarães-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, *IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis.* Nature, 2017. **552**(7683): p. 110-115.
 46. Fung, K.Y., C. Louis, R.D. Metcalfe, C.C. Kosasih, I.P. Wicks, M.D.W. Griffin, and T.L. Putoczki, *Emerging roles for IL-11 in inflammatory diseases.* Cytokine, 2022. **149**: p. 155750.
 47. Metcalfe, R.D., E. Hanssen, K.Y. Fung, K. Aizel, C.C. Kosasih, C.O. Zlatic, L. Doughty, C.J. Morton, A.P. Leis, M.W. Parker, P.R. Gooley, T.L. Putoczki, and M.D.W. Griffin, *Structures of the interleukin 11 signalling complex reveal gp130 dynamics and the inhibitory mechanism of a cytokine variant.* Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 7543.
 48. Heichler, C., K. Scheibe, A. Schmied, C.I. Geppert, B. Schmid, S. Wirtz, O.M. Thoma, V. Kramer, M.J. Waldner, C. Büttner, H.F. Farin, M. Pešić, F. Knieling, S. Merkel, A. Grüneboom, M. Gunzer, R. Grützmann, S. Rose-John, S.B. Koralov, G. Kollias, M. Vieth, A. Hartmann, F.R. Greten, M.F. Neurath, and C. Neufert, *STAT3 activation through IL-6/IL-11 in cancer-associated fibroblasts promotes colorectal tumour development and correlates with poor prognosis.* Gut, 2020. **69**(7): p. 1269-1282.
 49. Rose-John, S., *Interleukin-6 Family Cytokines.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(2).

50. Boulanger, M.J., D.C. Chow, E.E. Brevnova, and K.C. Garcia, *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex*. *Science*, 2003. **300**(5628): p. 2101-4.
51. Neben, S. and K. Turner, *The biology of interleukin 11*. *Stem Cells*, 1993. **11 Suppl 2**: p. 156-62.
52. Putoczki, T.L., R.C. Dobson, and M.D. Griffin, *The structure of human interleukin-11 reveals receptor-binding site features and structural differences from interleukin-6*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014. **70**(Pt 9): p. 2277-85.
53. Widjaja, A.A., S.P. Chothani, and S.A. Cook, *Different roles of interleukin 6 and interleukin 11 in the liver: implications for therapy*. *Hum Vaccin Immunother*, 2020. **16**(10): p. 2357-2362.
54. Madeira, F., M. Pearce, A.R.N. Tivey, P. Basutkar, J. Lee, O. Edbali, N. Madhusoodanan, A. Kolesnikov, and R. Lopez, *Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022*. *Nucleic acids research*, 2022. **50**(W1): p. W276-W279.
55. Lin, L.F., D. Mismar, J.D. Lile, L.G. Armes, E.T. Butler, 3rd, J.L. Vannice, and F. Collins, *Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF)*. *Science*, 1989. **246**(4933): p. 1023-5.
56. Vlotides, G., K. Zitzmann, G.K. Stalla, and C.J. Auernhammer, *Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004. **15**(5): p. 325-36.
57. Pennica, D., K.L. King, K.J. Shaw, E. Luis, J. Rullamas, S.M. Luoh, W.C. Darbonne, D.S. Knutzon, R. Yen, K.R. Chien, and et al., *Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(4): p. 1142-6.
58. Gearing, D.P., N.M. Gough, J.A. King, D.J. Hilton, N.A. Nicola, R.J. Simpson, E.C. Nice, A. Kelso, and D. Metcalf, *Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF)*. *Embo j*, 1987. **6**(13): p. 3995-4002.
59. Malik, N., J.C. Kallestad, N.L. Gunderson, S.D. Austin, M.G. Neubauer, V. Ochs, H. Marquardt, J.M. Zarling, M. Shoyab, C.M. Wei, and et al., *Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M*. *Mol Cell Biol*, 1989. **9**(7): p. 2847-53.
60. Zhang, Q., P. Putheti, Q. Zhou, Q. Liu, and W. Gao, *Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008. **19**(5-6): p. 347-56.
61. Niedbala, W., X.Q. Wei, B. Cai, A.J. Hueber, B.P. Leung, I.B. McInnes, and F.Y. Liew, *IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(11): p. 3021-9.
62. Wang, X., Y. Wei, H. Xiao, X. Liu, Y. Zhang, G. Han, G. Chen, C. Hou, N. Ma, B. Shen, Y. Li, C.E. Egwuagu, and R. Wang, *A novel IL-23p19/Ebi3 (IL-39) cytokine mediates inflammation in Lupus-like mice*. *Eur J Immunol*, 2016. **46**(6): p. 1343-50.

63. Gardner, S., Y. Jin, P.K. Fyfe, T.B. Voisin, J.S. Bellón, E. Pohler, J. Piehler, I. Moraga, and D. Bubeck, *Structural insights into IL-11-mediated signalling and human IL6ST variant-associated immunodeficiency*. Nat Commun, 2024. **15**(1): p. 2071.
64. Garbers, C., H.M. Hermanns, F. Schaper, G. Müller-Newen, J. Grötzinger, S. Rose-John, and J. Scheller, *Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines*. Cytokine Growth Factor Rev, 2012. **23**(3): p. 85-97.
65. Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano, and T. Kishimoto, *Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor*. Science, 1988. **241**(4867): p. 825-8.
66. Hirata, Y., T. Taga, M. Hibi, N. Nakano, T. Hirano, and T. Kishimoto, *Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies*. J Immunol, 1989. **143**(9): p. 2900-6.
67. Bork, P., L. Holm, and C. Sander, *The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core*. J Mol Biol, 1994. **242**(4): p. 309-20.
68. Leahy, D.J., W.A. Hendrickson, I. Aukhil, and H.P. Erickson, *Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein*. Science, 1992. **258**(5084): p. 987-91.
69. Yawata, H., K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga, and T. Kishimoto, *Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130*. Embo j, 1993. **12**(4): p. 1705-12.
70. Simpson, R.J., A. Hammacher, D.K. Smith, J.M. Matthews, and L.D. Ward, *Interleukin-6: structure-function relationships*. Protein Sci, 1997. **6**(5): p. 929-55.
71. Horiuchi, S., Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto, and N. Yamamoto, *Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism*. Eur J Immunol, 1994. **24**(8): p. 1945-8.
72. Holub, M.C., C. Szalai, A. Polgár, S. Tóth, and A. Falus, *Generation of 'truncated' interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA by alternative splicing; a possible source of soluble IL-6R*. Immunol Lett, 1999. **68**(1): p. 121-4.
73. Lamas, J.R., L. Rodríguez-Rodríguez, P. Tornero-Esteban, E. Villafuertes, J. Hoyas, L. Abasolo, J. Varadé, R. Alvarez-Lafuente, E. Urcelay, and B. Fernández-Gutiérrez, *Alternative splicing and proteolytic rupture contribute to the generation of soluble IL-6 receptors (sIL-6R) in rheumatoid arthritis*. Cytokine, 2013. **61**(3): p. 720-3.
74. Riethmueller, S., P. Somasundaram, J.C. Ehlers, C.W. Hung, C.M. Flynn, J. Lokau, M. Agthe, S. Düsterhöft, Y. Zhu, J. Grötzinger, I. Lorenzen, T. Koudelka, K. Yamamoto, U. Pickhinke, R. Wichert, C. Becker-Pauly, M. Rädisch, A. Albrecht, M. Hessefort, D. Stahnke, C. Unverzagt, S. Rose-John, A. Tholey, and C. Garbers, *Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation*. PLoS Biol, 2017. **15**(1): p. e2000080.
75. Lust, J.A., K.A. Donovan, M.P. Kline, P.R. Greipp, R.A. Kyle, and N.J. Maihle, *Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor*. Cytokine, 1992. **4**(2): p. 96-100.

76. Müllberg, J., W. Oberthür, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P.C. Heinrich, and S. Rose-John, *The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site.* J Immunol, 1994. **152**(10): p. 4958-68.
77. Baran, P., R. Nitz, J. Grötzinger, J. Scheller, and C. Garbers, *Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling.* J Biol Chem, 2013. **288**(21): p. 14756-68.
78. Schumacher, N. and S. Rose-John, *ADAMI7 orchestrates Interleukin-6, TNF α and EGF-R signaling in inflammation and cancer.* Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2022. **1869**(1): p. 119141.
79. Lokau, J. and C. Garbers, *The length of the interleukin-11 receptor stalk determines its capacity for classic signaling.* J Biol Chem, 2018. **293**(17): p. 6398-6409.
80. Lokau, J., R. Nitz, M. Agthe, N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, N. Schumacher, J. Wolf, K. Möller-Hackbarth, G.H. Waetzig, J. Grötzinger, G. Müller-Newen, S. Rose-John, J. Scheller, and C. Garbers, *Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling.* Cell Rep, 2016. **14**(7): p. 1761-1773.
81. Kimura, R., M. Maeda, A. Arita, Y. Oshima, M. Obana, T. Ito, Y. Yamamoto, T. Mohri, T. Kishimoto, I. Kawase, Y. Fujio, and J. Azuma, *Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine.* Cytokine, 2007. **38**(2): p. 107-15.
82. Ropeleski, M.J., J. Tang, M.M. Walsh-Reitz, M.W. Musch, and E.B. Chang, *Interleukin-11-induced heat shock protein 25 confers intestinal epithelial-specific cytoprotection from oxidant stress.* Gastroenterology, 2003. **124**(5): p. 1358-68.
83. Baars, I., J. Lokau, I. Sauerland, A.J. Müller, and C. Garbers, *Interleukin-11 receptor expression on monocytes is dispensable for their recruitment and pathogen uptake during Leishmania major infection.* Cytokine, 2021. **148**: p. 155699.
84. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto, *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130.* Cell, 1990. **63**(6): p. 1149-57.
85. Wang, X., P. Lupardus, S.L. Laporte, and K.C. Garcia, *Structural biology of shared cytokine receptors.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 29-60.
86. Müller-Newen, G., *The cytokine receptor gp130: faithfully promiscuous.* Sci STKE, 2003. **2003**(201): p. Pe40.
87. Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, and T. Kishimoto, *Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(24): p. 11349-53.
88. Schmitz, J., H. Dahmen, C. Grimm, C. Gendo, G. Muller-Newen, P.C. Heinrich, and F. Schaper, *The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction.* The Journal of Immunology, 2000. **164**(2): p. 848-854.
89. Müller, S.A., M.D. Shmueli, X. Feng, J. Tüshaus, N. Schumacher, R. Clark, B.E. Smith, A. Chi, S. Rose-John, M.E. Kennedy, and S.F. Lichtenthaler, *The Alzheimer's disease-linked protease BACE1 modulates neuronal IL-6 signaling through shedding of the receptor gp130.* Mol Neurodegener, 2023. **18**(1): p. 13.

90. Wolf, J., G.H. Waetzig, A. Chalaris, T.M. Reinheimer, H. Wege, S. Rose-John, and C. Garbers, *Different Soluble Forms of the Interleukin-6 Family Signal Transducer gp130 Fine-tune the Blockade of Interleukin-6 Trans-signaling*. *J Biol Chem*, 2016. **291**(31): p. 16186-96.
91. Wolf, J., S. Rose-John, and C. Garbers, *Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system*. *Cytokine*, 2014. **70**(1): p. 11-20.
92. Skiniotis, G., M.J. Boulanger, K.C. Garcia, and T. Walz, *Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor*. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. **12**(6): p. 545-51.
93. Barton, V.A., M.A. Hall, K.R. Hudson, and J.K. Heath, *Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(46): p. 36197-203.
94. Heink, S., N. Yogev, C. Garbers, M. Herwerth, L. Aly, C. Gasperi, V. Husterer, A.L. Croxford, K. Möller-Hackbarth, H.S. Bartsch, K. Sotlar, S. Krebs, T. Regen, H. Blum, B. Hemmer, T. Misgeld, T.F. Wunderlich, J. Hidalgo, M. Oukka, S. Rose-John, M. Schmidt-Supprian, A. Waisman, and T. Korn, *Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T(H)17 cells*. *Nat Immunol*, 2017. **18**(1): p. 74-85.
95. Lamertz, L., F. Rummel, R. Polz, P. Baran, S. Hansen, G.H. Waetzig, J.M. Moll, D.M. Floss, and J. Scheller, *Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses*. *Sci Signal*, 2018. **11**(550).
96. Chalaris, A., C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John, and J. Scheller, *The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer*. *European journal of cell biology*, 2011. **90**(6-7): p. 484-494.
97. Garbers, C., S. Heink, T. Korn, and S. Rose-John, *Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine*. *Nat Rev Drug Discov*, 2018. **17**(6): p. 395-412.
98. Ghoreschi, K., A. Laurence, and J.J. O'Shea, *Janus kinases in immune cell signaling*. *Immunol Rev*, 2009. **228**(1): p. 273-87.
99. Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. *Biochem J*, 1998. **334** (Pt 2)(Pt 2): p. 297-314.
100. Ihle, J.N., *Cytokine receptor signalling*. *Nature*, 1995. **377**(6550): p. 591-4.
101. Hu, Q., Q. Bian, D. Rong, L. Wang, J. Song, H.S. Huang, J. Zeng, J. Mei, and P.Y. Wang, *JAK/STAT pathway: Extracellular signals, diseases, immunity, and therapeutic regimens*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2023. **11**: p. 1110765.
102. Lokau, J., V. Schoeder, J. Haybaeck, and C. Garbers, *Jak-Stat Signaling Induced by Interleukin-6 Family Cytokines in Hepatocellular Carcinoma*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(11).
103. Eulenfeld, R., A. Dittrich, C. Khouri, P.J. Müller, B. Mütze, A. Wolf, and F. Schaper, *Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs*. *Eur J Cell Biol*, 2012. **91**(6-7): p. 486-95.
104. Liu, G.H., T. Chen, X. Zhang, X.L. Ma, and H.S. Shi, *Small molecule inhibitors targeting the cancers*. *MedComm (2020)*, 2022. **3**(4): p. e181.

105. Gu, Z.J., J. Wijdenes, X.G. Zhang, M.M. Hallet, C. Clement, and B. Klein, *Anti-gp130 transducer monoclonal antibodies specifically inhibiting ciliary neurotrophic factor, interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor or oncostatin M*. J Immunol Methods, 1996. **190**(1): p. 21-7.
106. Scheller, J., M. Kovaleva, B. Rabe, J. Eichler, K.J. Kallen, and S. Rose-John, *Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoabsorbent assay for the binding of gp130 to the IL-6/IL-6R complex and its competitive inhibition*. J Immunol Methods, 2004. **291**(1-2): p. 93-100.
107. Scheller, J., B. Schuster, C. Hölscher, T. Yoshimoto, and S. Rose-John, *No inhibition of IL-27 signaling by soluble gp130*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **326**(4): p. 724-8.
108. Tenhumberg, S., G.H. Waetzig, A. Chalaris, B. Rabe, D. Seegert, J. Scheller, S. Rose-John, and J. Grötzinger, *Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130*. J Biol Chem, 2008. **283**(40): p. 27200-7.
109. Heise, D., A. Derrac Soria, S. Hansen, C. Dambietz, M. Akbarzadeh, A.F. Berg, G.H. Waetzig, S.A. Jones, R. Dvorsky, M.R. Ahmadian, J. Scheller, and J.M. Moll, *Selective inhibition of IL-6 trans-signaling by a miniaturized, optimized chimeric soluble gp130 inhibits T(H)17 cell expansion*. Sci Signal, 2021. **14**(696).
110. Berg, A.F., J. Ettich, H.T. Weitz, M. Krusche, D.M. Floss, J. Scheller, and J.M. Moll, *Exclusive inhibition of IL-6 trans-signaling by soluble gp130(FlyR)Fc*. Cytokine X, 2021. **3**(4): p. 100058.
111. Chebath, J., D. Fischer, A. Kumar, J.W. Oh, O. Kolett, T. Lapidot, M. Fischer, S. Rose-John, A. Nagler, S. Slavina, and M. Revel, *Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities*. Eur Cytokine Netw, 1997. **8**(4): p. 359-65.
112. Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J.P. Brakenhoff, K.J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzinger, and S. Rose-John, *I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(2): p. 142-5.
113. Peters, M., G. Blinn, F. Solem, M. Fischer, K.H. Meyer zum Büschenfelde, and S. Rose-John, *In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6*. J Immunol, 1998. **161**(7): p. 3575-81.
114. Jostock, T., G. Blinn, C. Renné, K.J. Kallen, S. Rose-John, and J. Müllberg, *Immunoadhesins of interleukin-6 and the IL-6/soluble IL-6R fusion protein hyper-IL-6*. J Immunol Methods, 1999. **223**(2): p. 171-83.
115. Peters, M., A.M. Müller, and S. Rose-John, *Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3495-504.
116. Pflanz, S., I. Tacke, J. Grötzinger, Y. Jacques, S. Minvielle, H. Dahmen, P.C. Heinrich, and G. Müller-Newen, *A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130*. FEBS Lett, 1999. **450**(1-2): p. 117-22.
117. Suchorska, W.M., H. Dams-Kozłowska, U. Kazimierczak, P.J. Wysocki, and A. Mackiewicz, *Hyper-interleukin-11 novel designer molecular adjuvant targeting gp130 for whole cell cancer vaccines*. Expert Opin Biol Ther, 2011. **11**(12): p. 1555-67.

118. Moll, J.M., M. Wehmöller, N.C. Frank, L. Homey, P. Baran, C. Garbers, L. Lamertz, J.H. Axelrod, E. Galun, H.D. Mootz, and J. Scheller, *Split(2) Protein-Ligation Generates Active IL-6-Type Hyper-Cytokines from Inactive Precursors*. ACS Synth Biol, 2017. **6**(12): p. 2260-2272.
119. Schuster, B., M. Kovaleva, Y. Sun, P. Regenhard, V. Matthews, J. Grötzinger, S. Rose-John, and K.J. Kallen, *Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF*. J Biol Chem, 2003. **278**(11): p. 9528-35.
120. Garbers, C., B. Spudy, S. Aparicio-Siegmund, G.H. Waetzig, J. Sommer, C. Hölscher, S. Rose-John, J. Grötzinger, I. Lorenzen, and J. Scheller, *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, 2013. **288**(6): p. 4346-54.
121. Yang, X., H. Hao, Z. Xia, G. Xu, Z. Cao, X. Chen, S. Liu, and Y. Zhu, *Soluble IL-6 Receptor and IL-27 Subunit p28 Protein Complex Mediate the Antiviral Response through the Type III IFN Pathway*. J Immunol, 2016. **197**(6): p. 2369-81.
122. Ichihara, M., T. Hara, H. Kim, T. Murate, and A. Miyajima, *Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice*. Blood, 1997. **90**(1): p. 165-73.
123. Kallen, K.J., J. Grötzinger, E. Lelièvre, P. Vollmer, D. Aasland, C. Renné, J. Müllberg, K.H. Myer zum Büschenfelde, H. Gascan, and S. Rose-John, *Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules. Transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 11859-67.
124. Rafii, P., C. Seibel, H.T. Weitz, J. Ettich, A.R. Minafra, P. Petzsch, A. Lang, D.M. Floss, K. Behnke, K. Köhrer, J.M. Moll, and J. Scheller, *Cytokimera GIL-11 rescued IL-6R deficient mice from partial hepatectomy-induced death by signaling via non-natural gp130:LIFR:IL-11R complexes*. Commun Biol, 2023. **6**(1): p. 418.
125. Adam, N., B. Rabe, J. Suthaus, J. Grötzinger, S. Rose-John, and J. Scheller, *Unraveling viral interleukin-6 binding to gp130 and activation of STAT-signaling pathways independently of the interleukin-6 receptor*. J Virol, 2009. **83**(10): p. 5117-26.
126. Scheller, J., J. Ettich, C. Wittich, S. Pudewell, D.M. Floss, and P. Rafii, *Exploring the landscape of synthetic IL-6-type cytokines*. Febs j, 2023.
127. Findeisen, M., T.L. Allen, D.C. Henstridge, H. Kammoun, A.E. Brandon, L.L. Baggio, K.I. Watt, M. Pal, L. Cron, E. Estevez, C. Yang, G.M. Kowalski, L. O'Reilly, C. Egan, E. Sun, L.M. Thai, G. Krippner, T.E. Adams, R.S. Lee, J. Grötzinger, C. Garbers, S. Risis, M.J. Kraakman, N.A. Mellet, J. Sligar, E.T. Kimber, R.L. Young, M.A. Cowley, C.R. Bruce, P.J. Meikle, P.A. Baldock, P. Gregorevic, T.J. Biden, G.J. Cooney, D.J. Keating, D.J. Drucker, S. Rose-John, and M.A. Febbraio, *Treatment of type 2 diabetes with the designer cytokine IC7Fc*. Nature, 2019. **574**(7776): p. 63-68.
128. Rafii, P., P.R. Cruz, J. Ettich, C. Seibel, G. Padriani, C. Wittich, A. Lang, P. Petzsch, K. Köhrer, J.M. Moll, D.M. Floss, and J. Scheller, *Engineered interleukin-6-derived cytokines recruit artificial receptor complexes and disclose CNTF signaling via the OSMR*. J Biol Chem, 2024. **300**(5): p. 107251.

129. Wolf, D.C., *Evaluation of the Size, Shape, and Consistency of the Liver*, in *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, H.K. Walker, W.D. Hall, and J.W. Hurst, Editors. 1990, Butterworths

Copyright © 1990, Butterworth Publishers, a division of Reed Publishing.: Boston.

130. Abdel-Misih, S.R. and M. Bloomston, *Liver anatomy*. Surg Clin North Am, 2010. **90**(4): p. 643-53.

131. Fiebig, T., H. Boll, G. Figueiredo, H.U. Kerl, S. Nittka, C. Groden, M. Kramer, and M.A. Brockmann, *Three-dimensional in vivo imaging of the murine liver: a micro-computed tomography-based anatomical study*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31179.

132. Eipel, C., K. Abshagen, and B. Vollmar, *Regulation of hepatic blood flow: the hepatic arterial buffer response revisited*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(48): p. 6046-57.

133. Lauth, W.W., *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function to Disease*, in *Hepatic Circulation: Physiology and Pathophysiology*. 2009, Morgan & Claypool Life Sciences

Copyright © 2010 by Morgan & Claypool Life Sciences.: San Rafael (CA).

134. Ramachandran, P., K.P. Matchett, R. Dobie, J.R. Wilson-Kanamori, and N.C. Henderson, *Single-cell technologies in hepatology: new insights into liver biology and disease pathogenesis*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020. **17**(8): p. 457-472.

135. Selden, C., M. Khalil, and H.J. Hodgson, *What keeps hepatocytes on the straight and narrow? Maintaining differentiated function in the liver*. Gut, 1999. **44**(4): p. 443-6.

136. Kmiec, Z., *Cooperation of liver cells in health and disease*. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2001. **161**: p. Iii-xiii, 1-151.

137. Patten, D.A., G.K. Wilson, D. Bailey, R.K. Shaw, S. Jalkanen, M. Salmi, A. Rot, C.J. Weston, D.H. Adams, and S. Shetty, *Human liver sinusoidal endothelial cells promote intracellular crawling of lymphocytes during recruitment: A new step in migration*. Hepatology, 2017. **65**(1): p. 294-309.

138. Grigoraş, A., A. Floarea-Strat, C. Cotuțiu, and M. Stancu, *[New data about hepatic sinusoidal endothelial cell]*. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2005. **109**(3): p. 584-8.

139. Bilzer, M., F. Roggel, and A.L. Gerbes, *Role of Kupffer cells in host defense and liver disease*. Liver Int, 2006. **26**(10): p. 1175-86.

140. Wong, C.H., C.N. Jenne, B. Petri, N.L. Chrobok, and P. Kubers, *Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cells precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance*. Nat Immunol, 2013. **14**(8): p. 785-92.

141. Flisiak, R., *Role of Ito cells in the liver function*. Pol J Pathol, 1997. **48**(3): p. 139-45.

142. Kamm, D.R. and K.S. McCommis, *Hepatic stellate cells in physiology and pathology*. J Physiol, 2022. **600**(8): p. 1825-1837.

143. Chen, X.M., S.P. O'Hara, and N.F. LaRusso, *The immunobiology of cholangiocytes*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(6): p. 497-505.

144. Rui, L., *Energy metabolism in the liver*. Compr Physiol, 2014. **4**(1): p. 177-97.

145. Almazroo, O.A., M.K. Miah, and R. Venkataramanan, *Drug Metabolism in the Liver*. Clin Liver Dis, 2017. **21**(1): p. 1-20.

146. Adeva-Andany, M.M., N. Pérez-Felpete, C. Fernández-Fernández, C. Donapetry-García, and C. Pazos-García, *Liver glucose metabolism in humans*. Biosci Rep, 2016. **36**(6).
147. Alves-Bezerra, M. and D.E. Cohen, *Triglyceride Metabolism in the Liver*. Compr Physiol, 2017. **8**(1): p. 1-8.
148. Paulusma, C.C., W.H. Lamers, S. Broer, and S.F.J. van de Graaf, *Amino acid metabolism, transport and signalling in the liver revisited*. Biochem Pharmacol, 2022. **201**: p. 115074.
149. Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John, *IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy*. J Hepatol, 2016. **64**(6): p. 1403-15.
150. Streetz, K.L., T. Wüstefeld, C. Klein, M.P. Manns, and C. Trautwein, *Mediators of inflammation and acute phase response in the liver*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2001. **47**(4): p. 661-73.
151. Zhang, D., M. Sun, D. Samols, and I. Kushner, *STAT3 participates in transcriptional activation of the C-reactive protein gene by interleukin-6*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9503-9.
152. Da, B.L., T. Kushner, M. El Halabi, P. Paka, M. Khalid, A. Uberoi, B.T. Lee, P.V. Perumalswami, S.M. Rutledge, T.D. Schiano, S.L. Friedman, and B. Saberi, *Liver Injury in Patients Hospitalized with Coronavirus Disease 2019 Correlates with Hyperinflammatory Response and Elevated Interleukin-6*. Hepatol Commun, 2021. **5**(2): p. 177-188.
153. Gewiese-Rabsch, J., C. Drucker, S. Malchow, J. Scheller, and S. Rose-John, *Role of IL-6 trans-signaling in CCl₄-induced liver damage*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(11): p. 1054-61.
154. Streetz, K.L., F. Tacke, L. Leifeld, T. Wüstefeld, A. Graw, C. Klein, K. Kamino, U. Spengler, H. Kreipe, S. Kubicka, W. Müller, M.P. Manns, and C. Trautwein, *Interleukin 6/gp130-dependent pathways are protective during chronic liver diseases*. Hepatology, 2003. **38**(1): p. 218-29.
155. Blindenbacher, A., X. Wang, I. Langer, R. Savino, L. Terracciano, and M.H. Heim, *Interleukin 6 is important for survival after partial hepatectomy in mice*. Hepatology, 2003. **38**(3): p. 674-82.
156. Dong, J., S. Viswanathan, E. Adami, B.K. Singh, S.P. Chothani, B. Ng, W.W. Lim, J. Zhou, M. Tripathi, N.S.J. Ko, S.G. Shekeran, J. Tan, S.Y. Lim, M. Wang, P.M. Lio, P.M. Yen, S. Schafer, S.A. Cook, and A.A. Widjaja, *Hepatocyte-specific IL11 cis-signaling drives lipotoxicity and underlies the transition from NAFLD to NASH*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 66.
157. Wang, D., X. Zheng, B. Fu, Z. Nian, Y. Qian, R. Sun, Z. Tian, and H. Wei, *Hepatectomy promotes recurrence of liver cancer by enhancing IL-11-STAT3 signaling*. EBioMedicine, 2019. **46**: p. 119-132.
158. Zhu, M., B. Lu, Q. Cao, Z. Wu, Z. Xu, W. Li, X. Yao, and F. Liu, *IL-11 Attenuates Liver Ischemia/Reperfusion Injury (IRI) through STAT3 Signaling Pathway in Mice*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126296.
159. Devarbhavi, H., S.K. Asrani, J.P. Arab, Y.A. Nartey, E. Pose, and P.S. Kamath, *Global burden of liver disease: 2023 update*. J Hepatol, 2023. **79**(2): p. 516-537.

160. De Siervi, S., S. Cannito, and C. Turato, *Chronic Liver Disease: Latest Research in Pathogenesis, Detection and Treatment*. Int J Mol Sci, 2023. **24**(13).
161. Tsuchida, T. and S.L. Friedman, *Mechanisms of hepatic stellate cell activation*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017. **14**(7): p. 397-411.
162. Hammerich, L. and F. Tacke, *Hepatic inflammatory responses in liver fibrosis*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2023. **20**(10): p. 633-646.
163. Sun, M. and T. Kisseleva, *Reversibility of liver fibrosis*. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015. **39 Suppl 1**(0 1): p. S60-3.
164. Lan, Y., H. Wang, H. Weng, X. Xu, X. Yu, H. Tu, K. Gong, J. Yao, S. Ye, Y. Shi, and J. Sheng, *The burden of liver cirrhosis and underlying etiologies: results from the Global Burden of Disease Study 2019*. Hepatol Commun, 2023. **7**(2): p. e0026.
165. Tsochatzis, E.A., J. Bosch, and A.K. Burroughs, *Liver cirrhosis*. Lancet, 2014. **383**(9930): p. 1749-61.
166. Matsuda, M. and E. Seki, *Hepatic Stellate Cell-Macrophage Crosstalk in Liver Fibrosis and Carcinogenesis*. Semin Liver Dis, 2020. **40**(3): p. 307-320.
167. Ho, W.J., Q. Zhu, J. Durham, A. Popovic, S. Xavier, J. Leatherman, A. Mohan, G. Mo, S. Zhang, N. Gross, S. Charmsaz, D. Lin, D. Quong, B. Wilt, I.R. Kamel, M. Weiss, B. Philosophe, R. Burkhart, W.R. Burns, C. Shubert, A. Ejaz, J. He, A. Deshpande, L. Danilova, G. Stein-O'Brien, E.A. Sugar, D.A. Laheru, R.A. Anders, E.J. Fertig, E.M. Jaffee, and M. Yarchoan, *Neoadjuvant Cabozantinib and Nivolumab Converts Locally Advanced HCC into Resectable Disease with Enhanced Antitumor Immunity*. Nat Cancer, 2021. **2**(9): p. 891-903.
168. Yasuda, S., T. Nomi, D. Hokuto, T. Yoshikawa, Y. Matsuo, and M. Sho, *Liver Regeneration After Major Liver Resection for Hepatocellular Carcinoma in the Elderly*. J Invest Surg, 2020. **33**(4): p. 332-338.
169. Yagi, S., M. Hirata, Y. Miyachi, and S. Uemoto, *Liver Regeneration after Hepatectomy and Partial Liver Transplantation*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
170. Michalopoulos, G.K. and B. Bhushan, *Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021. **18**(1): p. 40-55.
171. Kruepunga, N., T.B.M. Hakvoort, J. Hikspoors, S.E. Köhler, and W.H. Lamers, *Anatomy of rodent and human livers: What are the differences?* Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2019. **1865**(5): p. 869-878.
172. Greene, A.K. and M. Puder, *Partial hepatectomy in the mouse: technique and perioperative management*. J Invest Surg, 2003. **16**(2): p. 99-102.
173. Michalopoulos, G.K., *Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas*. Am J Pathol, 2010. **176**(1): p. 2-13.
174. Higgins, G.M., *Experimental pathology of the liver, Restoration of the liver of the white rat following surgical removal*. Arch pathol, 1931. **12**: p. 186-202.
175. Lortat-Jacob, J., *Un cas d'hepatectomie droite regle*. Memoires del'Academie de Chirurgie, 1952. **78**: p. 244-251.
176. Jiang, H., V. Garcia, J.A. Yanum, J. Lee, and G. Dai, *Circadian clock core component Bmal1 dictates cell cycle rhythm of proliferating hepatocytes during liver regeneration*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2021. **321**(4): p. G389-g399.

177. Tao, Y., M. Wang, E. Chen, and H. Tang, *Liver Regeneration: Analysis of the Main Relevant Signaling Molecules*. Mediators Inflamm, 2017. **2017**: p. 4256352.
178. Trautwein, C., T. Rakemann, M. Niehof, S. Rose-John, and M.P. Manns, *Acute-phase response factor, increased binding, and target gene transcription during liver regeneration*. Gastroenterology, 1996. **110**(6): p. 1854-62.
179. Fazel Modares, N., R. Polz, F. Haghghi, L. Lamertz, K. Behnke, Y. Zhuang, C. Kordes, D. Häussinger, U.R. Sorg, K. Pfeffer, D.M. Floss, J.M. Moll, R.P. Piekorz, M.R. Ahmadian, P.A. Lang, and J. Scheller, *IL-6 Trans-signaling Controls Liver Regeneration After Partial Hepatectomy*. Hepatology, 2019. **70**(6): p. 2075-2091.
180. Tiberio, G.A., L. Tiberio, A. Benetti, E. Cervi, N. Montani, M. Dreano, G. Garotta, K. Cerea, N. Steimberg, G. Pandolfo, A. Ferrari-Bravo, G. Mazzoleni, S.M. Giulini, and L. Schiaffonati, *IL-6 Promotes compensatory liver regeneration in cirrhotic rat after partial hepatectomy*. Cytokine, 2008. **42**(3): p. 372-8.
181. Sakamoto, T., Z. Liu, N. Murase, T. Ezure, S. Yokomuro, V. Poli, and A.J. Demetris, *Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy*. Hepatology, 1999. **29**(2): p. 403-11.
182. Cressman, D.E., L.E. Greenbaum, R.A. DeAngelis, G. Ciliberto, E.E. Furth, V. Poli, and R. Taub, *Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice*. Science, 1996. **274**(5291): p. 1379-83.
183. Peters, M., G. Blinn, T. Jostock, P. Schirmacher, K.H. Meyer zum Büschenfelde, P.R. Galle, and S. Rose-John, *Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration*. Gastroenterology, 2000. **119**(6): p. 1663-71.
184. Koniaris, L.G., I.H. McKillop, S.I. Schwartz, and T.A. Zimmers, *Liver regeneration*. J Am Coll Surg, 2003. **197**(4): p. 634-59.
185. Görtz, D., G.S. Braun, Y. Maruta, S. Djudjaj, C.R. van Roeyen, I.V. Martin, A. Küster, H. Schmitz-Van de Leur, J. Scheller, T. Ostendorf, J. Floege, and G. Müller-Newen, *Anti-interleukin-6 therapy through application of a monogenic protein inhibitor via gene delivery*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14685.
186. Wiesinger, M.Y., S. Haan, S. Wüller, M.E. Kauffmann, T. Recker, A. Küster, P.C. Heinrich, and G. Müller-Newen, *Development of an IL-6 inhibitor based on the functional analysis of murine IL-6Ralpha(1)*. Chem Biol, 2009. **16**(7): p. 783-94.
187. Coulie, P.G., M. Stevens, and J. Van Snick, *High- and low-affinity receptors for murine interleukin 6. Distinct distribution on B and T cells*. Eur J Immunol, 1989. **19**(11): p. 2107-14.
188. Toniatti, C., A. Cabibbo, E. Sporena, A.L. Salvati, M. Cerretani, S. Serafini, A. Lahm, R. Cortese, and G. Ciliberto, *Engineering human interleukin-6 to obtain variants with strongly enhanced bioactivity*. Embo j, 1996. **15**(11): p. 2726-37.
189. Nechemia-Arbely, Y., A. Shriki, U. Denz, C. Drucker, J. Scheller, J. Raub, O. Pappo, S. Rose-John, E. Galun, and J.H. Axelrod, *Early hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy is modulated by IL-6 trans-signaling and PI3K/AKT activation*. J Hepatol, 2011. **54**(5): p. 922-9.
190. Giraldez, M.D., D. Carneros, C. Garbers, S. Rose-John, and M. Bustos, *New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology*. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021. **18**(11): p. 787-803.

191. Ye, W., Q. Wang, L. Zhao, C. Wang, D. Zhang, M. Zhou, F. Chen, W. Wang, Z. Zhu, W. Guo, Y. Liu, H. Zou, and Y. Xue, *Blockade of IL-11 Trans-Signaling or JAK2/STAT3 Signaling Ameliorates the Profibrotic Effect of IL-11*. *Immunol Invest*, 2023. **52**(6): p. 703-716.
192. Kohse, K.P., V. Haselmann, I. Faust, D. Hendig, C. Knabbe, M. Kiehntopf, T. Deufel, R. Dörner, and K. Dörner, *Grundlagen der Klinischen Chemie*, in *Taschenlehrbuch Klinische Chemie und Hämatologie*, K.P. Kohse, Editor. 2019, Georg Thieme Verlag.
193. Satilmis, B., S. Akbulut, T.T. Sahin, Y. Dalda, A. Tuncer, Z. Kucukakcali, Z. Ogut, and S. Yilmaz, *Assessment of Liver Regeneration in Patients Who Have Undergone Living Donor Hepatectomy for Living Donor Liver Transplantation*. *Vaccines (Basel)*, 2023. **11**(2).
194. Kim, J.Y., H.S. Jeong, T. Chung, M. Kim, J.H. Lee, W.H. Jung, and J.S. Koo, *The value of phosphohistone H3 as a proliferation marker for evaluating invasive breast cancers: A comparative study with Ki67*. *Oncotarget*, 2017. **8**(39): p. 65064-65076.
195. Soler, M.F., A. Abaurrea, P. Azcoaga, A.M. Araujo, and M.M. Caffarel, *New perspectives in cancer immunotherapy: targeting IL-6 cytokine family*. *J Immunother Cancer*, 2023. **11**(11).
196. Curtis, D.J., D.J. Hilton, B. Roberts, L. Murray, N. Nicola, and C.G. Begley, *Recombinant soluble interleukin-11 (IL-11) receptor alpha-chain can act as an IL-11 antagonist*. *Blood*, 1997. **90**(11): p. 4403-12.
197. Garbers, C. and J. Scheller, *Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different*. *Biol Chem*, 2013. **394**(9): p. 1145-61.
198. Markham, A. and T. Patel, *Siltuximab: first global approval*. *Drugs*, 2014. **74**(10): p. 1147-52.
199. Engelowski, E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, P. Baran, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J.M. Moll, D.M. Floß, P.A. Lang, and J. Scheller, *Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands*. *Nature Communications*, 2018. **9**(1): p. 2034.
200. Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D.V. Serreze, F.A. Goldbaum, F. Haag, and F. Koch-Nolte, *Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity*. *Med Microbiol Immunol*, 2009. **198**(3): p. 157-74.
201. Dams-Kozłowska, H., K. Gryska, E. Kwiatkowska-Borowczyk, D. Izycki, S. Rose-John, and A. Mackiewicz, *A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine*. *BMC Biotechnol*, 2012. **12**: p. 8.
202. 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, *Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation*. *Sci Signal*, 2012. **5**(207): p. ra5.
203. 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, *Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor*. *J Immunol*, 2010. **184**(12): p. 7219-28.

204. Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schütz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J.F. Schlaak, H.A. Lehr, F. Autschbach, G. Schürmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P.R. Galle, S. Rose-John, and M.F. Neurath, *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*. *Nat Med*, 2000. **6**(5): p. 583-8.
205. van Leeuwen, M.A., J. Westra, P.C. Limburg, P.L. van Riel, and M.H. van Rijswijk, *Clinical significance of interleukin-6 measurement in early rheumatoid arthritis: relation with laboratory and clinical variables and radiological progression in a three year prospective study*. *Ann Rheum Dis*, 1995. **54**(8): p. 674-7.
206. Mihailova, A., *Interleukin 6 Concentration in Synovial Fluid of Patients with Inflammatory and Degenerative Arthritis*. *Curr Rheumatol Rev*, 2022. **18**(3): p. 230-233.
207. Jayatilaka, H., P. Tyle, J.J. Chen, M. Kwak, J. Ju, H.J. Kim, J.S.H. Lee, P.H. Wu, D.M. Gilkes, R. Fan, and D. Wirtz, *Synergistic IL-6 and IL-8 paracrine signalling pathway infers a strategy to inhibit tumour cell migration*. *Nat Commun*, 2017. **8**: p. 15584.
208. Morrow, R.J., A.H. Allam, B. Yeo, S. Deb, C. Murone, E. Lim, C.N. Johnstone, and M. Ernst, *Paracrine IL-6 Signaling Confers Proliferation between Heterogeneous Inflammatory Breast Cancer Sub-Clones*. *Cancers (Basel)*, 2022. **14**(9).
209. Martinez-Fabregas, J., S. Wilmes, L. Wang, M. Hafer, E. Pohler, J. Lokau, C. Garbers, A. Cozzani, P.K. Fyfe, J. Piehler, M. Kazemian, S. Mitra, and I. Moraga, *Kinetics of cytokine receptor trafficking determine signaling and functional selectivity*. *Elife*, 2019. **8**.
210. Kuramitsu, K., D.Y. Sverdlov, S.B. Liu, E. Csizmadia, L. Burkly, D. Schuppan, D.W. Hanto, L.E. Otterbein, and Y. Popov, *Failure of fibrotic liver regeneration in mice is linked to a severe fibrogenic response driven by hepatic progenitor cell activation*. *Am J Pathol*, 2013. **183**(1): p. 182-94.
211. Wang, H., F. Lafdil, X. Kong, and B. Gao, *Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target*. *Int J Biol Sci*, 2011. **7**(5): p. 536-50.
212. Su, A.I., L.G. Guidotti, J.P. Pezacki, F.V. Chisari, and P.G. Schultz, *Gene expression during the priming phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(17): p. 11181-6.
213. Khaliq, M., S. Ko, Y. Liu, H. Wang, Y. Sun, L. Solnica-Krezel, and D. Shin, *Stat3 Regulates Liver Progenitor Cell-Driven Liver Regeneration in Zebrafish*. *Gene Expr*, 2018. **18**(3): p. 157-170.
214. Haga, S., W. Ogawa, H. Inoue, K. Terui, T. Ogino, R. Igarashi, K. Takeda, S. Akira, S. Enosawa, H. Furukawa, S. Todo, and M. Ozaki, *Compensatory recovery of liver mass by Akt-mediated hepatocellular hypertrophy in liver-specific STAT3-deficient mice*. *J Hepatol*, 2005. **43**(5): p. 799-807.
215. Fütterer, A., K. Mink, A. Luz, M.H. Kosco-Vilbois, and K. Pfeffer, *The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues*. *Immunity*, 1998. **9**(1): p. 59-70.

216. Sorg, U.R., K. Behnke, D. Degrandi, M. Reich, V. Keitel, D. Herebian, R. Deenen, M. Beyer, J.L. Schultze, K. Köhrer, H.E. Gabbert, E. Mayatepek, D. Häussinger, and K. Pfeffer, *Cooperative role of lymphotoxin β receptor and tumor necrosis factor receptor p55 in murine liver regeneration*. J Hepatol, 2016. **64**(5): p. 1108-1117.
217. Yang, M., D.J. Antoine, J.L. Weemhoff, R.E. Jenkins, A. Farhood, B.K. Park, and H. Jaeschke, *Biomarkers distinguish apoptotic and necrotic cell death during hepatic ischemia/reperfusion injury in mice*. Liver Transpl, 2014. **20**(11): p. 1372-82.
218. Michalopoulos, G.K. and M.C. DeFrances, *Liver regeneration*. Science, 1997. **276**(5309): p. 60-6.
219. Rabes, H.M., R. Wirsching, H.V. Tuzek, and G. Iseler, *Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy*. Cell Tissue Kinet, 1976. **9**(6): p. 517-32.
220. Häussinger, D., *Liver Regeneration*. 2011: De Gruyter.
221. Moh, A., Y. Iwamoto, G.X. Chai, S.S. Zhang, A. Kano, D.D. Yang, W. Zhang, J. Wang, J.J. Jacoby, B. Gao, R.A. Flavell, and X.Y. Fu, *Role of STAT3 in liver regeneration: survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery*. Lab Invest, 2007. **87**(10): p. 1018-28.
222. Gerlach, C., D.Y. Sakkab, T. Scholzen, R. Dassler, M.R. Alison, and J. Gerdes, *Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy*. Hepatology, 1997. **26**(3): p. 573-8.
223. Widjaja, A.A., B.K. Singh, E. Adami, S. Viswanathan, J. Dong, G.A. D'Agostino, B. Ng, W.W. Lim, J. Tan, B.S. Paleja, M. Tripathi, S.Y. Lim, S.G. Shekeran, S.P. Chothani, A. Rabes, M. Sombetzki, E. Bruinstroop, L.P. Min, R.A. Sinha, S. Albani, P.M. Yen, S. Schafer, and S.A. Cook, *Inhibiting Interleukin 11 Signaling Reduces Hepatocyte Death and Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis in Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis*. Gastroenterology, 2019. **157**(3): p. 777-792.e14.
224. Tsomaia, K., L. Patarashvili, N. Karumidze, I. Bebiashvili, E. Azmaipharashvili, I. Modebadze, D. Dzidziguri, M. Sareli, S. Gusev, and D. Kordzaia, *Liver structural transformation after partial hepatectomy and repeated partial hepatectomy in rats: A renewed view on liver regeneration*. World J Gastroenterol, 2020. **26**(27): p. 3899-3916.
225. Campana, L. and J.P. Iredale, *Regression of Liver Fibrosis*. Semin Liver Dis, 2017. **37**(1): p. 1-10.
226. Gytoku, E., E. Morita, Y. Kameyoshi, T. Hiragun, S. Yamamoto, and M. Hide, *The IL-6 family cytokines, interleukin-6, interleukin-11, oncostatin M, and leukemia inhibitory factor, enhance mast cell growth through fibroblast-dependent pathway in mice*. Arch Dermatol Res, 2001. **293**(10): p. 508-14.
227. Navarro, S., M.T. Mitjavila, A. Katz, J. Doly, and W. Vainchenker, *Expression of interleukin 6 and its specific receptor by untreated and PMA-stimulated human erythroid and megakaryocytic cell lines*. Exp Hematol, 1991. **19**(1): p. 11-7.
228. Chérel, M., M. Sorel, B. Lebeau, S. Dubois, J.F. Moreau, R. Bataille, S. Minvielle, and Y. Jacques, *Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11*. Blood, 1995. **86**(7): p. 2534-40.

229. Adrian-Segarra, J.M., K. Sreenivasan, P. Gajawada, H. Lörchner, T. Braun, and J. Pöling, *The AB loop of oncostatin M (OSM) determines species-specific signaling in humans and mice*. J Biol Chem, 2018. **293**(52): p. 20181-20199.
230. Huang, W., K. Ma, J. Zhang, M. Qatanani, J. Cuvillier, J. Liu, B. Dong, X. Huang, and D.D. Moore, *Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration*. Science, 2006. **312**(5771): p. 233-6.
231. Keitel, V., R. Kubitz, and D. Häussinger, *Endocrine and paracrine role of bile acids*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(37): p. 5620-9.
232. Richards, C.D., T.J. Brown, M. Shoyab, H. Baumann, and J. Gauldie, *Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro*. J Immunol, 1992. **148**(6): p. 1731-6.
233. Nakamura, K., H. Nonaka, H. Saito, M. Tanaka, and A. Miyajima, *Hepatocyte proliferation and tissue remodeling is impaired after liver injury in oncostatin M receptor knockout mice*. Hepatology, 2004. **39**(3): p. 635-44.

10. Anhang

Die Klonierungen für die Generierung rekombinanter Proteine für diese Arbeit werden hier nun dargestellt.

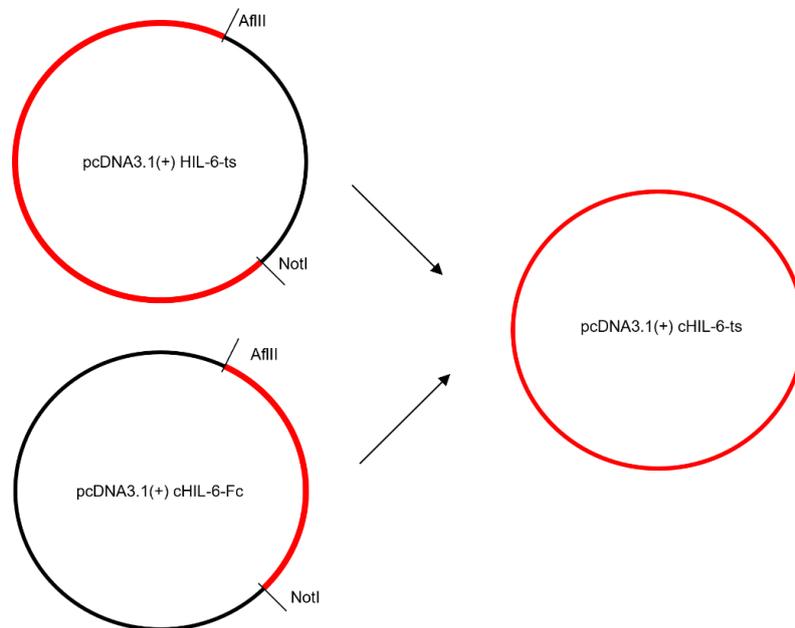


Abbildung 56 Klonierung des cHIL-6-ts.

Aus einem vorhandenem pcDNA3.1(+)cHIL-6Fc Plasmid wurde die Sequenz für das cHIL-6 mittels Restriktionsenzymen über die Schnittstellen AflIII und NotI gespalten. Ebenso wurde der vorhandene pcDNA3.1(+)HIL-6-ts Vektor über diese Schnittstellen geschnitten, sodass anschließend die Sequenz für das cHIL-6 in den offenen Vektor mit Twin-Strep-Tag® Sequenz ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde in E.coli XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Zur Sequenzüberprüfung mittels Schnittstellen und Gelelektrophorese oder externer Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA isoliert. Mit den Kulturen der positiven Klonen wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

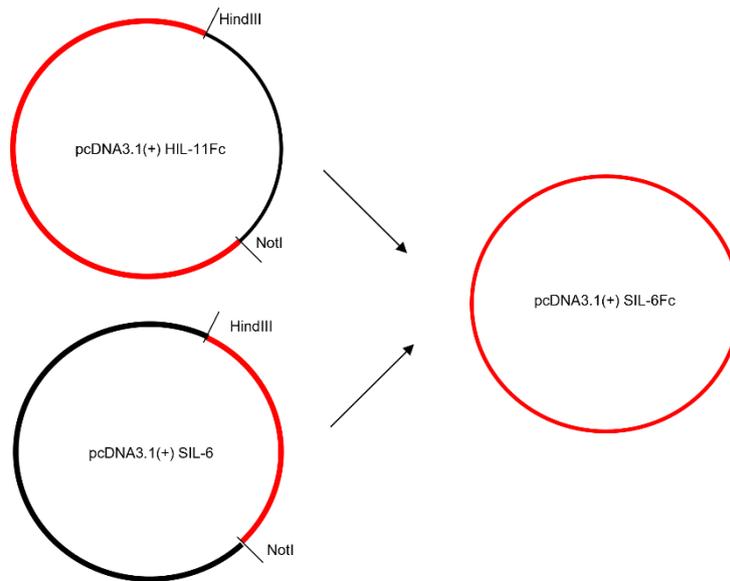


Abbildung 57 Klonierung des SIL-6Fc.

Die bestellte DNA-Sequenz für das SIL-6 wurde mittels Restriktionsenzymen an den generierten Schnittstellen HindIII und NotI gespalten. Ebenso wurde der vorhandene pcDNA3.1(+)HIL-11Fc Vektor über diese Schnittstellen geschnitten, sodass anschließend die Sequenz für das SIL-6 in den offenen Vektor mit Fc-Tag Sequenz ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Zur Sequenzüberprüfung mittels Schnittstellen und Gelelektrophorese oder externer Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA isoliert. Mit den Kulturen der positiven Klone wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

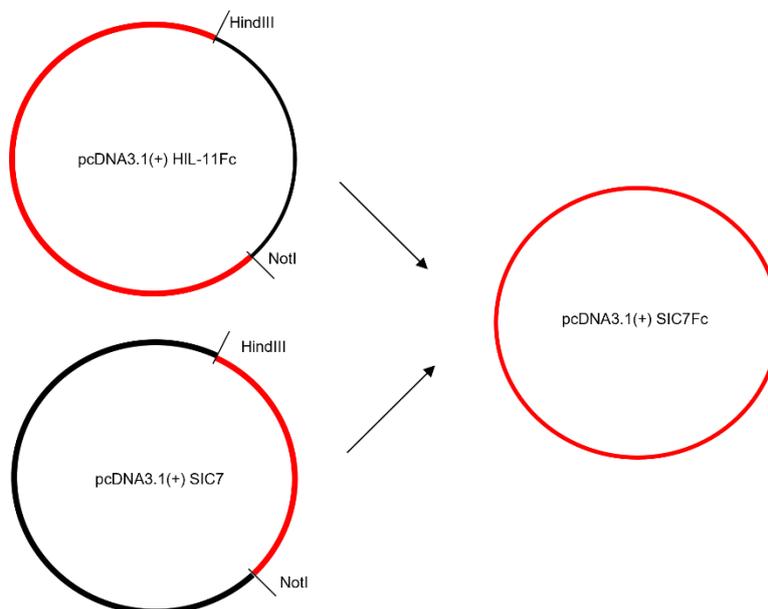


Abbildung 58 Klonierung des SIC-7Fc.

Die bestellte DNA-Sequenz für das SIC-7 wurde mittels Restriktionsenzymen an den generierten Schnittstellen HindIII und NotI gespalten. Ebenso wurde der vorhandene pcDNA3.1(+)HIL-11Fc Vektor über diese Schnittstellen geschnitten, sodass anschließend die Sequenz für das SIC-7 in den offenen Vektor mit Fc-Tag Sequenz ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Zur Sequenzüberprüfung mittels Schnittstellen und Gelelektrophorese oder externer Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA isoliert. Mit den Kulturen der positiven Klone wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

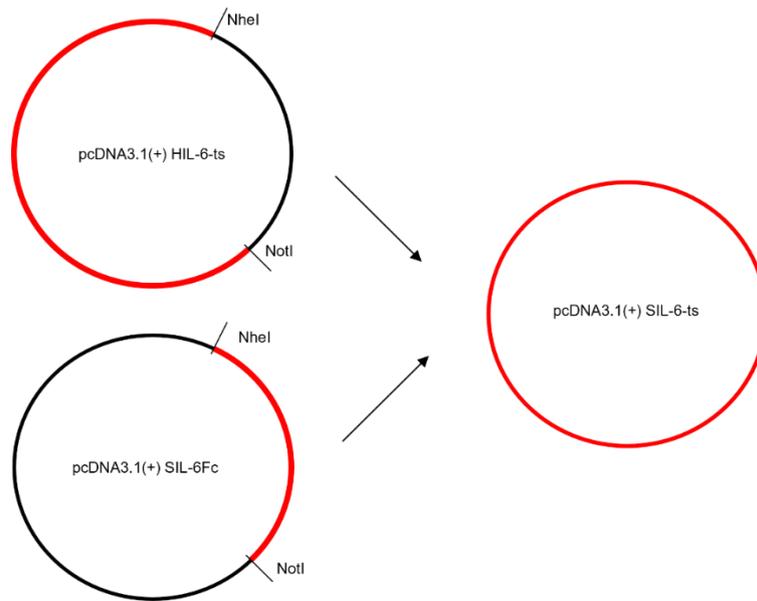


Abbildung 59 Klonierung des SIL-6-ts.

Aus einem vorhandenem pcDNA3.1(+)SIL-6Fc Plasmid wurde die Sequenz für das SIL-6 mittels Restriktionsenzymen Schnittstellen NheI und NotI gespalten. Ebenso wurde der vorhandene pcDNA3.1(+)HIL-6-ts Vektor über diese Schnittstellen geschnitten, sodass anschließend die Sequenz für das SIL-6 in den offenen Vektor mit Twin-Step-Tag[®] Sequenz ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde in E.coli XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Zur Sequenzüberprüfung mittels Schnittstellen und Gelelektrophorese oder externer Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA isoliert. Mit den Kulturen der positiven Klonen wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

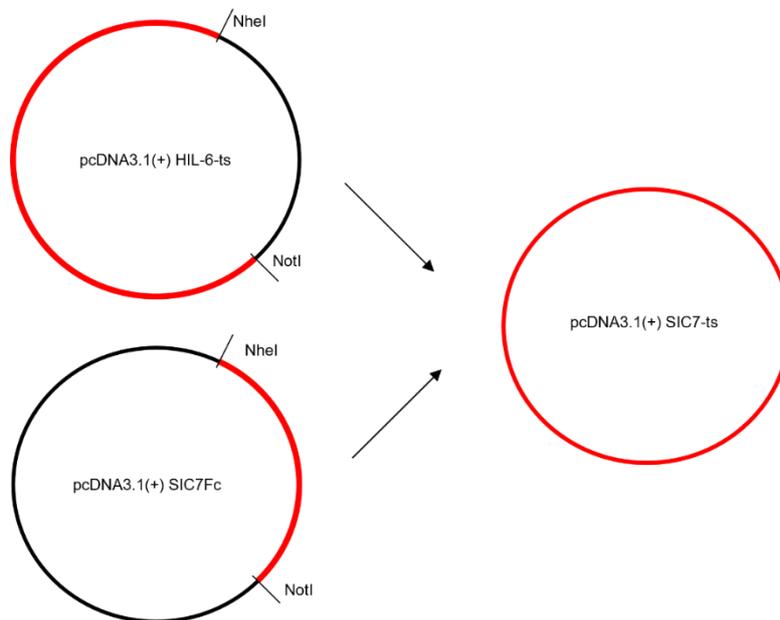


Abbildung 60 Klonierung des SIC7-ts.

Aus einem vorhandenem pcDNA3.1(+)SIC7Fc Plasmid wurde die Sequenz für das SIC7 mittels Restriktionsenzymen Schnittstellen NheI und NotI gespalten. Ebenso wurde der vorhandene pcDNA3.1(+)HIL-6-ts Vektor über diese Schnittstellen geschnitten, sodass anschließend die Sequenz für das SIC7 in den offenen Vektor mit Twin-Step-Tag[®] Sequenz ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde in E.coli XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Zur Sequenzüberprüfung mittels Schnittstellen und Gelelektrophorese oder externer Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA isoliert. Mit den Kulturen der positiven Klonen wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

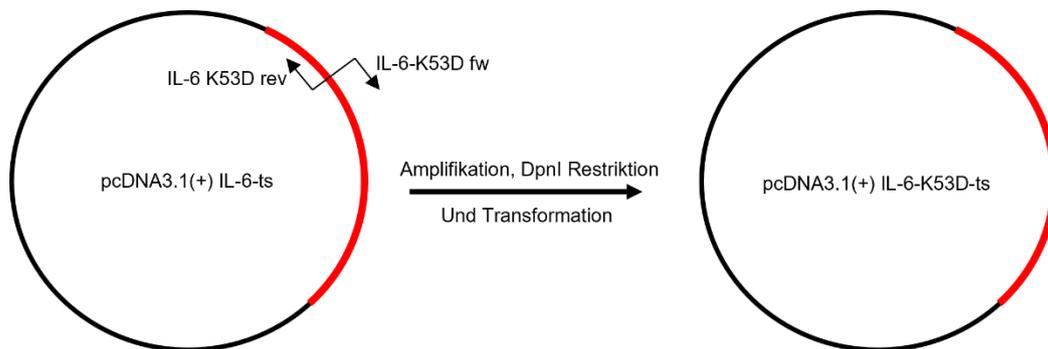


Abbildung 61 Generierung des IL-6-K53D-ts.

Aus einem vorhandenem pcDNA3.1(+)IL-6-ts Plasmid wurde mittels PCR und des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs®) die Sequenz für das IL-6-K53D-ts amplifiziert. Die Primer hierfür sind in Kapitel 3.7 aufgeführt. Das PCR Produkt wurde mit dem Enzym DpnI behandelt und anschließend in *E.coli* XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Die isolierte DNA der Klone wurden für die Überprüfung der spezifischen Mutation zur externen Sequenzierung eingeschickt. Mit den Kulturen der positiven Klone wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

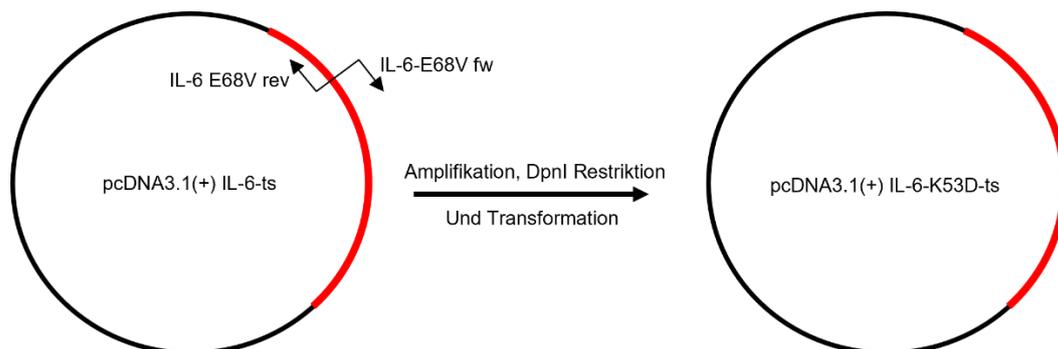


Abbildung 62 Generierung des IL-6-E68V-ts.

Aus einem vorhandenem pcDNA3.1(+)IL-6-ts Plasmid wurde mittels PCR und des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs®) die Sequenz für das IL-6-E68V-ts amplifiziert. Die Primer hierfür sind in Kapitel 3.7 aufgeführt. Das PCR Produkt wurde mit dem Enzym DpnI behandelt und anschließend in *E.coli* XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Die isolierte DNA der Klone wurden für die Überprüfung der spezifischen Mutation zur externen Sequenzierung eingeschickt. Mit den Kulturen der positiven Klone wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

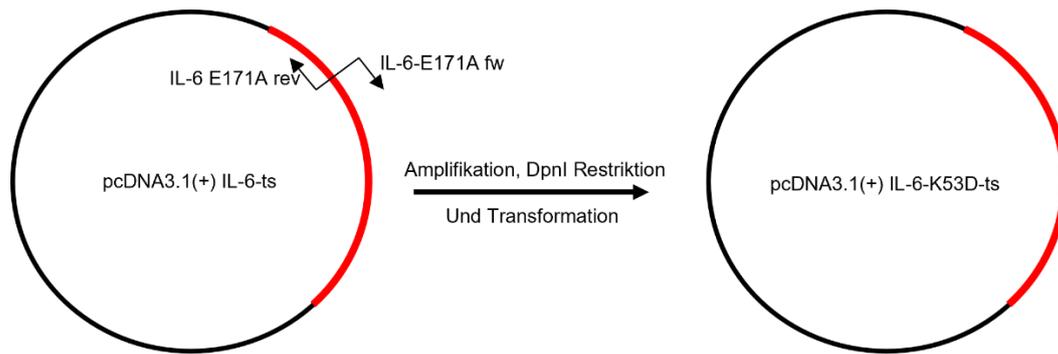


Abbildung 63 Generierung des IL-6-E171A-ts.

Aus einem vorhandenem pcDNA3.1(+)IL-6-ts Plasmid wurde mittels PCR und des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs®) die Sequenz für das IL-6-E171A-ts amplifiziert. Die Primer hierfür sind in Kapitel 3.7 aufgeführt. Das PCR Produkt wurde mit dem Enzym DpnI behandelt und anschließend in E.coli XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Die isolierte DNA der Klone wurden für die Überprüfung der spezifischen Mutation zur externen Sequenzierung eingeschickt. Mit den Kulturen der positiven Klone wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

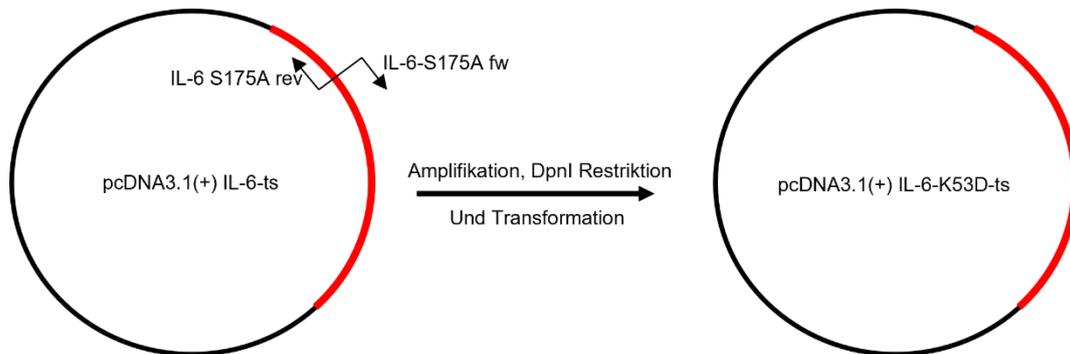


Abbildung 64 Generierung des IL-6-S175A-ts.

Aus einem vorhandenem pcDNA3.1(+)IL-6-ts Plasmid wurde mittels PCR und des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs®) die Sequenz für das IL-6-S175A-ts amplifiziert. Die Primer hierfür sind in Kapitel 3.7 aufgeführt. Das PCR Produkt wurde mit dem Enzym DpnI behandelt und anschließend in E.coli XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Die isolierte DNA der Klone wurden für die Überprüfung der spezifischen Mutation zur externen Sequenzierung eingeschickt. Mit den Kulturen der positiven Klone wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.

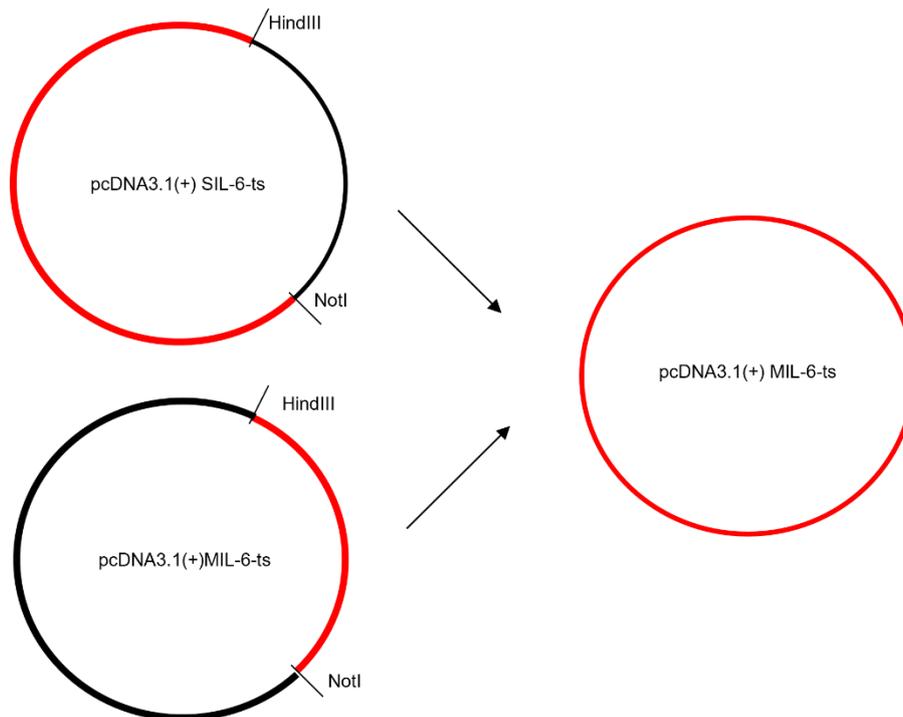


Abbildung 65 Klonierung des MIL-6-ts.

Die bestellte DNA-Sequenz für das MIL-6-ts wurde mittels Restriktionsenzymen an den generierten Schnittstellen HindIII und NotI gespalten. Ebenso wurde der vorhandene pcDNA3.1(+)SIL-6-ts Vektor über diese Schnittstellen geschnitten, sodass anschließend die Sequenz für das MIL-6-ts in den offenen Vektor mit Fc-Tag Sequenz ligiert werden konnte. Der Ligationsansatz wurde in *E.coli* XL-1 blue Zellen transformiert und auf Agar-Platten mit LB-Medium und Ampicilin kultiviert. Aus den gewachsenen Kolonien wurden größere Kulturen in flüssigem LB-Medium mit Ampicilin angelegt. Zur Sequenzüberprüfung mittels Schnittstellen und Gelelektrophorese oder externer Sequenzierung wurde die Plasmid-DNA isoliert. Mit den Kulturen der positiven Klonen wurden zwecks Vervielfältigung der Plasmid-DNA weitere Kulturen mit flüssigem LB-Medium und Ampicilin angelegt für eine Midi-Präparation.