

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Aktivierungsmuster muskulärer C2C12- sowie hepatischer Hepa1-6- und HepG2- Zellen durch IL-6- und IL- 12- artige Zytokine sowie Cytokimera mit Neugeneration zweier Chimäre

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nadine Julia Youssef

2026

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hadi Al-Hasani

„Man sieht nur, was man weiß“

Johann Wolfgang von Goethe

Zusammenfassung

Zytokine sind Botenstoffe, die die interzelluläre Kommunikation sowie Zellproliferation und -differenzierung regulieren. Das im Zentrum dieser Arbeit stehende Interleukin-6 (IL-6) ist insbesondere aufgrund seiner zentralen Rolle im Entzündungsgeschehen von Bedeutung. Neben seinen überwiegend proinflammatorischen Eigenschaften wurden in den letzten Jahren zunehmend metabolische Effekte charakterisiert. Kurzfristige, lokale IL-6-Bildung im Rahmen körperlicher Aktivität vermittelt positive metabolische Effekte, darunter eine Senkung des Blutzuckerspiegels, eine gesteigerte Insulinsensitivität und eine erhöhte Lipolyse. Demgegenüber trägt chronisch gebildetes IL-6, wie dies beim Typ-2-Diabetes mellitus vorliegt, zu einer anhaltenden metabolischen Entzündung („Meta-Inflammation“) bei und fördert die Krankheitsprogression.

Kallen *et al.* entwickelten 1999 das Designerzytokin IC7. Findeisen *et al.* modifizierten IC7 mit dem Ziel einer therapeutischen Anwendung beim Typ-2-Diabetes. IC7 ist ein Chimär aus IL-6 und *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), bei dem die Bindestelle III des IL-6, welche ursprünglich mit dem transmembranären Glykoprotein 130 (gp130) interagiert, strukturbasiert durch den entsprechenden Struktur-homologen Abschnitt von CNTF, welcher nativ den LIF-Rezeptor (LIFR, *Leukemia inhibitory factor Receptor*) bindet, ersetzt wurde. Dadurch adressiert IC7 die neuartige, nicht-natürliche Rezeptorkonstellation IL-6 α /gp130/LIFR auf der Zielzelle. CNTF gehört – ebenso wie IL-6, IL-11, LIF und Oncostatin M (OSM) – zur IL-6-Zytokinfamilie.

Ziel dieser Arbeit war die Generierung und Charakterisierung neuartiger chimärer Zytokine (pIL35 und pIL19), die strukturelle Elemente der IL-6- und der IL-12-Zytokinfamilie kombinieren. Darüber hinaus sollten bereits entwickelte Chimäre (GIL-6, GIO-6, GIL-11) auf metabolisch relevanten Zelllinien weiter charakterisiert werden (murine C2C12-Myoblasten, murine Hepa1-6-Hepatoma-Zellen sowie humane HepG2-Hepatoma-Zellen). GIL-6, GIO-6 und GIL-11 bestehen jeweils aus IL-6 in Kombination mit LIF, OSM bzw. IL-11; analog zu IC7 erfolgte ein strukturbasierter Austausch der Bindestelle III.

Beim Design von pIL35 und pIL19 wurde, ebenfalls analog zu IC7, die Bindestelle III des IL-6 durch p35 bzw. p19, die α -Untereinheiten von IL-12 bzw. IL-23, ersetzt. IL-12 und IL-23 sind Mitglieder der IL-12-Zytokinfamilie. Die resultierenden Chimären sollten neue Rezeptorkomplexe adressieren: Für pIL35 wurde die Interaktion mit IL-6 α /gp130/IL-12 β 2 angestrebt, für pIL19 mit IL-6 α /gp130/IL-23R. Die Expression erfolgte zunächst in HEK293T-Zellen, anschließend in Expi293-Zellen. Die Reinigung der Fc-Fusionsproteine wurde mittels Protein-A-Chromatographie durchgeführt. Zur Untersuchung der biologischen Aktivität wurden murine prä-B-Zellen (Ba/F3) verwendet, in die die erforderlichen humanen Rezeptoren zuvor durch retrovirale Transduktion stabil integriert worden waren. Proliferations- und Stimulationsassays zeigten keine biologische Aktivität der Chimären pIL35 und pIL19. Nachfolgende Analysen der Bindungskinetik mittels Immunpräzipitation und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie belegten jedoch die Bindung von pIL35 an den IL-6-Rezeptor. Die Affinität von pIL35 ($K_D = 26,54$ nM) war mit der von natürlichem IL-6 an den IL-6R ($K_D = 27,47$ nM) vergleichbar.

Zur Vorbereitung funktioneller metabolischer Analysen der Chimären GIL-6, GIO-6 und GIL-11 wurden C2C12-, Hepa1-6- und HepG2-Zellen hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression charakterisiert, um geeignete Zelllinien für angestrebte *Seahorse*-Assays zu identifizieren. In Stimulationsassays konnte auf allen drei Zelllinien eine Oberflächenexpression des LIFR nachgewiesen werden. Eine Expression des OSMR erscheint wahrscheinlich, konnte jedoch aufgrund der Rezeptor-Promiskuität von OSM (Bindung an OSMR und LIFR) nicht eindeutig bestätigt werden. Differenzierte C2C12-Zellen (ab Tag 5) sowie HepG2-Zellen exprimieren IL-6 α ; HepG2- und Hepa1-6-Wildtypzellen zeigen zudem eine IL-11 α -Expression. HepG2-Zellen sind somit durch IC7, GIL-6, GIO-6 und GIL-11 stimulierbar und für *Seahorse*-Analysen geeignet. Zur Ermöglichung einer Stimulierbarkeit der Hepa1-6-Zellen durch GIL-6, GIO-6 und GIL-11 wurde die cDNA kodierend für den IL-6R transient sowie stabil eingebracht. Die neu etablierte stabile Zelllinie Hepa1-6_{hIL-6R} stellt damit ebenfalls ein geeignetes Modell für metabolische Analysen dar.

Zusammenfassend konnte trotz fehlender biologischer Aktivität der neu generierten Chimären ein Erkenntnisgewinn hinsichtlich der Ligand-Rezeptor-Interaktionen erzielt werden. Zudem stehen mit HepG2 und Hepa1-6_{hIL-6R} zwei geeignete Zellmodelle für die weiterführende funktionelle Charakterisierung der aktiven Designerzytokine zur Verfügung.

Summary

Cytokines are signalling molecules that regulate intercellular communication as well as cell proliferation and differentiation. Interleukin-6 (IL-6), which is the focus of this work, is of particular importance due to its central role in inflammatory processes. In addition to its predominantly pro-inflammatory properties, metabolic effects of IL-6 have been increasingly characterized in recent years. Transient elevations of IL-6 during physical exercise mediate beneficial metabolic effects, including reduced blood glucose levels, enhanced insulin sensitivity, and increased lipolysis. In contrast, chronically elevated IL-6 concentrations, as observed in type 2 diabetes mellitus, contribute to persistent metabolic inflammation (“meta-inflammation”) and promote disease progression.

In 1999, Kallen *et al.* designed the cytokine IC7. Findeisen *et al.* subsequently modified IC7 with the aim of therapeutic application in type 2 diabetes. IC7 is a chimera composed of IL-6 and Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), in which binding site III of IL-6, which actually binds gp130, was structurally replaced by the corresponding region of CNTF, that naturally binds the LIFR (Leukemia Inhibitory Factor Receptor). As a result, IC7 engages a novel receptor complex consisting of IL-6R α /gp130/LIFR on target cells. CNTF belongs to the IL-6 cytokine family, which also includes IL-6, IL-11, LIF, and Oncostatin M (OSM).

The aim of this study was the generation and characterization of novel chimeric cytokines (pIL35 and pIL19) combining structural elements of the IL-6 and IL-12 cytokine families. In addition, previously developed chimeras (GIL-6, GIO-6, and GIL-11) were further characterized in metabolically relevant cell lines (murine C2C12 myoblasts, murine Hepa1-6 hepatoma cells, and human HepG2 hepatoma cells). GIL-6, GIO-6, and GIL-11 consist of IL-6 fused to LIF, OSM, or IL-11, respectively; analogous to IC7, binding site III was structurally exchanged.

For the design of pIL35 and pIL19, binding site III of IL-6 was replaced, again analogous to IC7, by p35 or p19, the α -subunits of IL-12 and IL-23, respectively. IL-12 and IL-23 are members of the IL-12 cytokine family. The resulting chimeras were designed to engage novel receptor complexes: IL-6R α /gp130/IL-12R β 2 for pIL35 and IL-6R α /gp130/IL-23R for pIL19. Expression was initially performed in HEK293T cells and subsequently in Expi293 cells. The Fc-fusion proteins were purified by protein A chromatography. Biological activity was assessed using murine pre-B cells (Ba/F3), in which the required human receptors had been stably integrated via retroviral transduction. Proliferation and stimulation assays demonstrated no biological activity of the chimeric cytokines. However, subsequent binding analyses using immunoprecipitation and surface plasmon resonance confirmed binding of pIL35 to the IL-6 receptor. The binding affinity of pIL35 ($K_D = 26.54$ nM) was comparable to that of native IL-6 binding to IL-6R ($K_D = 27.47$ nM).

To prepare for functional metabolic analyses of GIL-6, GIO-6, and GIL-11, C2C12, Hepa1-6, and HepG2 cells were characterized with respect to receptor expression to identify suitable models for intended *Seahorse* assays. Surface expression of LIFR was confirmed in all three cell lines. Expression of OSMR was considered likely but could not be conclusively demonstrated due to the receptor promiscuity of OSM, which binds both OSMR and LIFR. Differentiated C2C12 cells (from day 5) and HepG2 cells expressed IL-6R α ; HepG2 and Hepa1-6 wild-type cells additionally expressed IL-11R α . Consequently, HepG2 cells are responsive to IC7, GIL-6, GIO-6, and GIL-11 and are suitable for *Seahorse* analyses. To enable stimulation of Hepa1-6 cells by GIL-6, GIO-6, and GIL-11, IL-6R was introduced transiently as well as stably. The newly established stable Hepa1-6_{hIL-6R} cell line therefore represents an additional suitable model for metabolic analyses.

In summary, although the newly generated chimeras did not exhibit biological activity, this work provides important insights into ligand-receptor interactions. Furthermore, two suitable cellular models (HepG2 and Hepa1-6_{hIL-6R}) are now available for the continued functional characterization of designer cytokines.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
α	anti	IFN γ	Interferon γ
μg	Mikrogramm	Ig	Immunglobulin
μL	Mikroliter	IL	Interleukin
(p)Tyr, Y	(phospho-) Tyrosin	IP	Immunpräzipitation
a.e.	am ehesten	IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
Abb.	Abbildung	JAK	Janus-Kinase
ADA	<i>Anti drug antibodies</i>	JH1	<i>JAK Homology 1</i>
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease</i>	JH2	<i>JAK Homology 2</i>
AG	Arbeitsgruppe	JIA	<i>Juvenile idiopathic arthritis</i>
AK	Antikörper	K	Lysin
Akt	Protein kinase B (PKB)	kDa	Kilodalton
APS	Ammoniumperoxodisulfat	lat.	lateinisch
AS	Aminosäure	LE	<i>Lupus erythematoses</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>	LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
BSF-2	<i>B-cell stimulatory factor 2</i>	m	murin
Bsp.	Beispiel	MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
bspw.	beispielsweise	MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
bzw.	beziehungsweise	min	Minute(n)
c	Konzentration	mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ca.	<i>circa</i>	mTOR(C)	<i>mammalian target of rapamycin (complex)</i>
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankung	my	myokin
CHR	<i>Cytokine binding homology region</i>	MyoD	<i>Myoblast determination protein 1</i>
CISH	<i>Cytokine-inducible SH2-containing protein</i>	Myog	Myogenin
CLC	<i>Cardiotrophin-like cytokine</i>	NC	<i>Negative Control</i> , Negativkontrolle
CNTF	<i>Ciliary neutrophic factor</i>	NC-Membran	Nitrocellulosemembran
CT-1	<i>Cardiotrophin-1</i>	NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	NK	<i>Natural killer cell</i> , natürliche Killer-Zelle
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
E	Glutaminsäure	o.g.	oben genannt
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	OSM	Oncostatin M
EBI3	<i>Epstein-Barr-virus (EBV) induced Gene</i>	p	Protein (p19, p35, p40)
engl.	englisch	p	phosphoryliert/Phospho-
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere	PA	<i>Physical activity</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	PC	<i>Positive control</i> , Positivkontrolle
Fc	<i>Fragment crystallizable (region)</i>	pc.DNA	<i>plasmid complementary deoxyribonucleic acid</i>
FFA	<i>Free fatty acids</i> , freie Fettsäuren	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
FN III	<i>Fibronectin type III (domain)</i>	pDNA	Plasmid-DNA
g	Gravitation	PDK-1	3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase	PEG	Polyethylenglykol
GH	<i>Growth hormon</i>	PHYRE2	<i>Protein homology analogy recognition engine 2</i>
GIT	Gastrointestinaltrakt	PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
GLP-1	<i>Glucagon-like peptide 1</i>	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
GLUT 1/4	<i>Glucose transporter 1 / 4</i>	PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
gp130	Glykoprotein 130	r	rekombinant
GPI	Glycosylphosphatidylinositol	R	Rezeptor
Grb	<i>Growth factor receptor-bound protein</i>	R	Arginin
h	human, mensch(lich)	RA	Rheumatoide Arthritis
h	<i>Hour</i> , Stunde	Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>	Ras	<i>Rat sarcoma</i> (kleine GTPase)
HWZ	Halbwertszeit	rpm	Runden pro Minute
i.S	im Sinne	RT	Raumtemperatur
IDF	<i>International diabetes federation</i>	s	<i>soluble (sIL-6R)</i>

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
s.u.	siehe unten	teilw.	teilweise
sat	<i>saturated</i> , gesättigt	TGF	<i>Transforming growth factor</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>	Th0	Naive T-Zelle
Sek, s	Sekunde	Th17	IL-17 produzierende T-Helferzelle
Ser/S	Serin	TLR	<i>Toll-like Receptor</i>
SH2	<i>Src-Homology 2 region</i>	TNFα	Tumornekrosefaktor alpha
sIL-6R	<i>soluble Interleukin-6 receptor</i>	Ts	TwinStrep®
SOCS	<i>Suppressor of cytokine signaling</i>	Tyk	Tyrosinkinase
sog.	sogenannt	u.a.	unter anderem
SOS	<i>Son of sevenless</i>	u.U.	unter Umständen
SPR	<i>Surface plasmon resonance spectroscopy</i>	v.a.	vor allem
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
syn.	synonym	vgl.	vergleiche
T	Tage; Threonin	vs.	<i>versus</i>
T2DM	Typ 2 Diabetes mellitus	W	Tryptophan
TAG	Triacylglycerid	wt	Wildtyp
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>	z.B.	zum Beispiel
TC	<i>Tissue culture</i>	z.T.	zum Teil

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zytokine	1
1.2	Der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg	2
1.3	Interleukin-6-Familie	3
1.3.1	Definition & Mitglieder der IL-6-Familie	3
1.3.2	Allgemeine Funktionen IL-6-artiger Zytokine	3
1.3.3	Zytokinstruktur IL-6-artiger Zytokine	5
1.3.4	Rezeptor-Struktur IL-6-artiger Zytokine	5
1.3.5	Zytokin/Rezeptor-Bindung und Komplexierung der IL-6-Familie	6
1.3.6	<i>Trans-Signalling</i>	7
1.3.7	Hyper-Zytokine	8
1.3.8	IL-6 im Typ 2 Diabetes mellitus und metabolischen Syndrom	8
1.4	Interleukin-12-Familie	11
1.4.1	Definition & Mitglieder der IL-12-Familie	11
1.4.2	Allgemeine Funktionen von IL-12 und IL-23	11
1.4.3	Zytokinstruktur IL-12-artiger Zytokine	11
1.4.4	Rezeptorkomplexe und -struktur der IL-12-Familie	12
1.4.5	Zytokin/Rezeptor-Bindung und Komplexierung der IL-12-Familie	12
1.5	<i>Crosstalks</i> und Rezeptor-Promiskuitivitäten der IL-6- und IL-12- Familie	13
1.6	Cytokimera	13
1.6.1	Cytokimera in der Therapie metabolischer Erkrankungen (IC7Fc)	14
1.6.2	Nachfolger von IC7	15
1.7	Ziele dieser Arbeit	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Antibiotika	16
2.1.2	Antikörper	16
2.1.3	Chimäre, Zytokine und Proteine	17
2.1.4	Chemikalien	18
2.1.5	Geräte	20
2.1.6	Kits	21
2.1.7	Kulturmedien	21
2.1.8	Oligonukleotide	22
2.1.9	Plasmide	23

2.1.10	Puffer und Lösungen	23
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	25
2.1.12	Zelllinien und Bakterienstämme.....	25
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	27
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	31
2.2.3	Zellbiologische Methoden	35
3	Ergebnisse	40
3.1	Cytokimera	40
3.1.1	<i>In silico</i> -Design der Cytokimera	40
3.1.2	Klonierung, Expression und Reinigung der Cytokimera pIL35 und pIL19	45
3.1.3	Erzeugung responsiver Ba/F3-Zielzellen.....	48
3.1.4	Charakterisierung der Cytokimera	51
3.2	Aktivierungsmuster metabolisch relevanter Zielzellen	57
3.2.1	Muskuläre C2C12-Zellen.....	57
3.2.2	Hepatozelluläre HepG2- und Hepa1-6 -Zellen.....	61
4	Diskussion.....	66
4.1	Die neu generierten Cytokimera pIL35 und pIL19 sind inaktiv.....	66
4.1.1	<i>In silico</i> -Design von pIL35 und pIL19	66
4.1.2	Fc-Fusionsproteine pIL35 und pIL19 sind verunreinigt und instabil.....	67
4.1.3	pIL35 und pIL19 induzieren keine Signaltransduktion.....	69
4.1.4	pIL35 und pIL19 binden nicht vollständig an die notwendigen Rezeptoren ...	69
4.2	Aktivierungsmuster metabolisch relevanter Zelllinien.....	71
4.2.1	C2C12-Aktivierungsmuster	71
4.2.2	HepG2-Aktivierungsmuster	73
4.2.3	Hepa1-6 -Aktivierungsmuster.....	73
4.3	Ausblick	74
4.3.1	pIL35 und pIL19: Zukünftige Optimierungen.....	74
4.3.2	GIL-6 und GIO-6 in der Zukunft	74
4.4	Schlussfolgerungen	75
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	76

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine (auch Cytokine; *altgriechisch* „*kýtos*“ = „Gefäß, Höhlung“ und „*kínēsis*“ = „Bewegung“) sind Botenstoffe des Körpers, die die interzelluläre Kommunikation und intrazelluläre Signaltransduktion (*Signalling*) mit konsekutiver Genexpression, Zellproliferation und -differenzierung regulieren [2]. Die Polypeptide (~15-25 kDa) mit kurzer Halbwertszeit [3] wirken pleiotrop [4, 5] spielen aber insbesondere im Entzündungsgeschehen [3] eine entscheidende Rolle, sodass Zytokine auch als Entzündungsmediatoren bezeichnet werden. Die Quelle der einzelnen Zytokine ist teils zelltypspezifisch, teils werden sie von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen synthetisiert. So können Immunzellen Syntheseort der Zytokine sein, aber auch Zellen wie Adipozyten, Myozyten, Neurone, Fibroblasten und Keratinozyten. Die Zytokine wirken endokrin/parakrin/autokrin [3, 6] auf Zielzellen, was die pleiotrope und überlappende Wirkung verschiedener Zytokine ausmacht [5]. Zielzellen können bspw. hämatopoetische Zellen wie Immunzellen oder auch nicht-hämatopoetische Zellen sein [5] (vgl. Kapitel 1.3.2 und 1.4.2). Deutlich wird die funktionell enge Verzahnung, insbesondere im Entzündungsgeschehen, bei Betrachtung der Interleukin (IL)-6- und IL-12-Zytokinfamilie, die in dieser Arbeit thematisiert werden (vgl. Kapitel 1.3.2 und 1.4.2). Neben spezifischen, sich ergänzenden und überlappenden Funktionen in der Entzündungsbiologie (pro- und/oder antiinflammatorisch), spielen Zytokine (insbesondere IL-6) eine wichtige regulative Rolle in der Homöostase und im Metabolismus.

Dass die Bildung der Zytokine streng reguliert ist, wird v.a. dann deutlich, wenn eine Dysregulation vorliegt und daraus eine Pathologie resultiert: Ein Überschuss an proinflammatorischen Zytokinen (wie IL-6, IL-12 und IL-23) kann zu Autoimmunerkrankungen mit fortschreitenden Gewebsschaden führen (z.B.: Rheumatoide Arthritis (RA) [5, 7-13], chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) [12, 14, 15], Psoriasis [16] und Lupus erythematosus (LE) [17]). Ein Mangel an proinflammatorischen Zytokinen/Überschuss antiinflammatorischer Zytokine (z.B. IL-10) [18] kann zur Immunschwäche, Infektanfälligkeit und Karzinomentstehung beitragen [5, 7, 19]. Zytokine und deren Signalwege als therapeutische Zielstrukturen (englisch: *Targets*) in diesem Zusammenhang zu nutzen, hat bereits an Bedeutung gewonnen [5].

Eingeteilt werden die Zytokine z.B. anhand ihres Syntheseortes (Adipokine, Myokine, Neurokine) [20-22], anhand ihrer Proteinstruktur (z.B. IL-6-Familie vs. IL-12-Familie), außerdem anhand ihres prädominant aktivierten Signaltransduktionsweges (syn.: Signalweg, Signalkaskade, *Pathway*). So aktivieren bspw. Zytokine der Tumornekrosefaktor (TNF)- und IL-1 -Superfamilie den Signalweg via *Nuclear Factor κ B* (NF κ B). Zytokine der Klasse I Hämatopoetin-Superfamilie wie IL-6 [5] aktivieren hingegen den JAK-STAT-Signalweg (Janus-Kinase, *Signal Transducer and Activator of Transcription proteins*). Die Superfamilien selbst werden nach dem Aufbau des vom zytokinbindenden Rezeptors eingeteilt: Typ I-Zytokinrezeptorfamilie (Klasse I Hämatopoetin-Zytokinfamilie), Typ II-Zytokinrezeptorfamilie (Interferon-Zytokinfamilie), TNF-Rezeptorfamilie, IL-1-Rezeptor/*Toll-Like-Receptors* (TLR)-Familie, IL-17-Rezeptorfamilie, Rezeptortyrosinkinasen-Familie und *Transforming-Growth-Factor* (TGF)-Familie und die Chemokine [23, 24].

Im Folgenden werden die der Klasse I Hämatopoetin-Superfamilie zugehörigen Zytokine der IL-6- und IL-12-Familie besprochen.

1.2 Der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg

Da Zytokine Proteine sind und nicht die Zellmembran (Lipiddoppelschicht) via Diffusion passieren können, benötigen sie transmembranäre Rezeptoren, um eine Signaltransduktion nach erfolgter Liganden-Rezeptor-Bindung nach intrazellulär zu initiieren [25, 26]. Die Rezeptoren der Typ I-Zytokinrezeptorfamilie (Klasse I Hämatopoetinfamilie, einschließlich der IL-6- und IL-12-Familie) haben keine intrinsische Kinaseaktivität, sind aber konstitutiv mit Januskinasen (JAKs) assoziiert [2, 3]. Der prädominante Signaltransduktionsweg der Klasse I Hämatopoetin-Superfamilie ist der JAK-STAT- (*Signal transducer and activator of transcription*) -Signalweg [5, 26]. Andere Signaltransduktionen via Grb-SoS-Ras-Raf-MAPK (*Growth factor receptor-bound protein 2, Son of sevenless, Rat sarcoma, Rapidly accelerated fibrosarcoma, Mitogen activated protein kinase*) [5], PI3K-Akt-mTOR (*Phosphoinositid-3-Kinase, Akt=PKB=Protein kinase B, mammalian target of rapamycin*) [5], NFκB [15] und Insulinrezeptorsubstrat [5, 27, 28] sind möglich. Zwischen den einzelnen Signalwegen könne zudem Wechselwirkungen/Kreuzreaktivitäten, sog. *Crosstalks*, entstehen, so kann bspw. die MAPK auch STATs phosphorylieren und somit den JAK-STAT-Signalweg modulieren [29].

Die extrazelluläre Zytokinrezeptorbindung induziert eine Rezeptordimerisierung oder -Oligomerisierung. Die Rezeptoroligomerisierung hat zur Folge, dass die an den einzelnen Rezeptoren intrazellulär assoziierten JAKs in räumliche Nähe kommen [5]. Dies wiederum führt zur gegenseitigen Aktivierung der JAKs (Transphosphorylierung von Tyrosinresten mit den sog. *Activation-Loops* der JAKs) [30]. Die Aktivierung bedeutet eine verstärkte Kinaseaktivität, sodass dann ebenfalls bestimmte Tyrosinreste der Rezeptoren (nicht wie im ersten Schritt der JAKs selbst) phosphoryliert werden [30]. Diese intrazellulären phosphorylierten Tyrosinreste (pTyr) der Rezeptoren stellen nun eine Bindestelle für Proteine mit einer SH2 (*Src Homology 2*) -Domäne dar [30]. Die konservierte SH2-Domäne der signaltransduzierenden Signalproteine wie STAT, Grb [31], PI3K [32] bindet an diese phosphorylierten Tyrosine des Rezeptors [29, 33]; die damit einhergehender räumlicher Nähe zu den assoziierten JAKs führt dann ebenfalls zur Tyrosin-Phosphorylierung des Signalproteins (z.B. STAT) durch die JAKs [29, 33]. Die STAT-Phosphorylierung hat dessen Dissoziation vom Rezeptor zur Folge [34]. Die phosphorylierten STATs (pSTATs) formieren sich im Zytoplasma zu Homo- oder Heterodimeren, wobei die SH2-Domäne wieder der Bindung eines phosphorylierten Tyrosinrestes (des zweiten pSTAT-Moleküls) dient. Als Dimer kann eine Translokation in den Zellkern stattfinden und dort die Transkription bestimmter Zielgenen veranlasst werden [3, 34-36], z.B. von SOCS (s.u.).

Es gibt vier Janus-Kinasen JAK1, JAK2, JAK3, und Tyk2 (Tyrosin Kinase 2). Charakteristisch sind ihre zwei Kinasedomänen: Die *JAK Homology 1* (JH1), welche die oben beschriebenen Tyrosinphosphorylierungen katalysiert, und die *JAK Homology 2* (JH2), auch Pseudokinase genannt [37-39], die die konstitutive Aktivität der JH1-Domäne unterdrückt.

STAT-Proteine wurden bisher sieben Verschiedene (in Säugern) identifiziert: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6 [40, 41].

SOCS-Proteine wurden bisher insgesamt 8 beschrieben: SOCS 1 bis 7 und CISH (*Cytokine-inducible SH2-containing protein*) [42], welche als STAT-Zielgene als Signalwegregulatoren fungieren.

Reguliert wird die Signaltransduktion durch verschiedene Faktoren: Dauer und Konzentration der Zytokinstimulation, Rezeptordichte auf der Zielzelle, den intrazellulären *Crosstalks* der verschiedenen Signalkaskaden (vgl. Abb. 1) und den Signalwegregulatoren [5]. Ein Signalweg-Regulator ist bspw. SOCS (*Suppressor of cytokine signalling*). SOCS vermittelt ein negatives *Feedback* und befindet sich insb. zytoplasmatisch, bei insgesamt hohen SOCS-Leveln ebenfalls nukleär [43, 44]. Hohe SOCS-Level sind durch *Toll-like Receptor* (TLR)-Stimulation z.B. bei Inflammation [44] mit anhaltender JAK-STAT-Signaltransduktion induzierbar. Das hierbei aktivierte SOCS supprimiert sodann die noch ablaufende Signaltransduktion [45]. SOCS vermittelt die Hemmung durch verschiedene Mechanismen [46]: Eine Bindung via seiner SH2-Domäne an pTyr der JAKs/Rezeptoren [47-49] kann als sterische Hinderung für die Rekrutierung nachgeschalteter Signalproteine initial die Signaltransduktion drosseln; später vermittelt SOCS als Bestandteil des E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes [50] den proteasomalen Abbau der JAKs und Rezeptoren [51], was einen längerfristigen Hemmungsmechanismus darstellt.

Es gibt keine eindeutige Zytokin-JAK-STAT-SOCS-Zuordnung, es werden simultan mehrere Mitglieder der JAK- (bzw. STAT) -Familie aktiviert, allerdings bestehen kontextabhängige Prädominanzen:

- IL-6 – JAK1/JAK2 – STAT3 – SOCS3 [3, 5, 43, 46, 52-57]
- IL-12 – Tyk/JAK2 – STAT4 – SOCS1 [5, 58-60]
- IL-23 – Tyk2/JAK2 – STAT3 – SOCS3-Expression [5, 61, 62] aber keine SOCS3-vermittelte Signaltransduktionshemmung nachgewiesen [33, 63]

Der JAK-STAT-Signalweg in Abbildung 1 ist beispielhaft für IL-6 dargestellt.

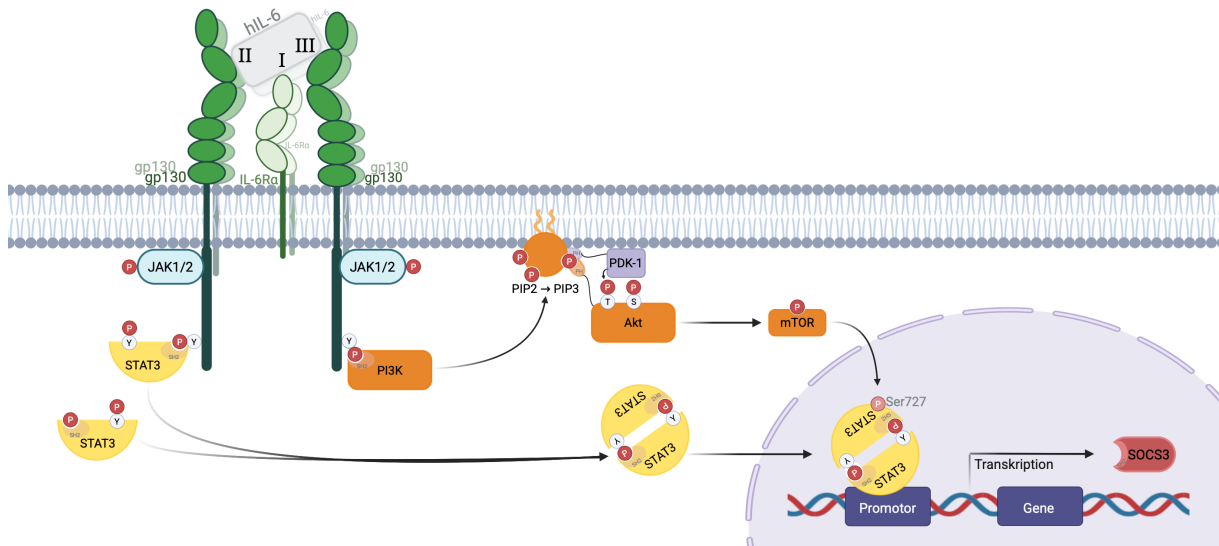


Abb. 1: Schematische Darstellung des IL-6 – JAK-STAT-Signalweges und intrazellulärer Crosstalks am Beispiel des PI3K/Akt-Signalweges.

In der Signaltransduktion für IL-6 wird überwiegend STAT3 Tyrosin (Y)-phosphoryliert (p), was die Transkription spezifischer Gene zur Folge hat, z.B. von SOCS3 im Sinne einer negativen *Feedback-Loops*. Dargestellt ist ebenfalls ein möglicher Signalweg-Crosstalk. Analog zu STAT3 kann PI3K auch an bestimmte pTyr des Rezeptors binden und den PI3K-Akt-mTOR-Signalweg initiieren [64]. mTOR kann das IL-6-induzierte STAT3 am Serin (Ser) 727 phosphorylieren, damit verstärkt aktiviert wird und dadurch die STAT3-anhängige SOCS3-Transkription (positiv) beeinflussen [65]. Created in <https://BioRender.com>

1.3 Interleukin-6-Familie

1.3.1 Definition & Mitglieder der IL-6-Familie

Die IL-6-Familie umfasst klassischerweise die monomeren Zytokine Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin 1 (CT-1), *Cardiotrophin-Like-Cytokine* (CLC) [3], Interleukin-27 [2], Interleukin-31 [66] und Neuropoetin [67]. Definiert ist die IL-6-Familie durch die Beteiligung von gp130 als signaltransduzierende β -Kette im Rezeptorkomplex [3, 5, 8, 68-72] (vgl. 1.3.4). Gp130 wird nahezu ubiquitär auf kernhaltigen Zellen exprimiert [3, 8, 68, 73, 74].

1.3.2 Allgemeine Funktionen IL-6-artiger Zytokine

IL-6-artige Zytokine zeigen sowohl spezifische als auch überlappende [3], pleiotrope [75] Effekte auf zahlreiche Zelltypen [5, 76, 77]. Sie sind zentral an immunologischen [3, 7], homöostatischen, metabolischen [8, 11, 78, 79] und neuronalen [3, 21] Prozessen beteiligt.

Interleukin-6:

Das proinflammatorische IL-6 [8] wurde erstmals 1986 durch Hirano *et al.* kloniert und als *B-cell stimulating factor 2* (BSF-2) beschrieben [80], basierend auf seiner Fähigkeit, die T-zellabhängige Antikörperproduktion von B-Zellen und damit die Differenzierung zu Plasmazellen zu fördern [77, 80-]

83]. Immunologisch spielt IL-6 daneben eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von naiven T-Zellen (Th0) zu proinflammatorischen Th17-Zellen [5, 84-86]. Die IL-6/Th17- bzw. IL-6/IL-17-Achse wird als „IL-6-Amplifier“ [11, 87] bezeichnet (siehe unten Kapitel 1.3.8.1.2). Weitere wichtige immunologische Funktionen übernimmt IL-6 in der Hämatopoese [88, 89] mit erhöhter Neutrophilenmobilisation [11, 90], in der Akut-Phase-Reaktion [5, 81], der mononukleären Infiltration [91] und der mukosalen Abwehr [92]. Insbesondere in den letzten Jahren sind die kontradiktorischen metabolischen Funktionen von IL-6 in den Fokus gerückt, welche in Kapitel 1.3.8.1 erörtert und in Abbildung 5 veranschaulicht werden.

Interleukin-11:

Dem 1990 entdeckten [93] IL-11 wurden initial hämatopoetische und antiinflammatorische [94-96], später aber auch proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben [97]. Immunologische Funktionen sind die Beteiligung an der Hämatopoese [93, 98-100], der Polarisation von M2-Makrophagen und Th2-Zellen [101-103] und der Akut-Phase-Reaktion [98, 104]. Metabolisch hemmt IL-11 die Adipogenese [98, 105] und ist am Knochenstoffwechsel beteiligt [98, 106, 107]; außerdem spielt es eine maßgebliche Rolle in der Entstehung von Fibrose [108], Zusammenhänge mit Organversagen von Herz und Niere [109] sind beschrieben. Neuronal ist IL-11 an der Neurogenese beteiligt [110].

Leukemia Inhibitory Factor:

Das pleiotrope [111], teils pro- [112] und antiinflammatorisch [113] wirkende Zytokin *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF) wurde nach der 1987 gemachten Beobachtung der Proliferationsinhibition muriner myeloischer Leukämiezellen [114] benannt. Immunologisch spielt LIF eine zentrale Rolle bei der Monozyten-Differenzierung [115, 116] in Richtung M2 [117] und bei der TNF α -Inhibition in Makrophagen [118], aus denen LIF im immunologischen Kontext auch sezerniert wird [118]. Metabolisch fördert LIF kontextabhängig die Glukose-Aufnahme [119, 120], die Lipolyse [121] aber auch die Lipogenese [119], außerdem ist LIF am Knochenstoffwechsel [122] beteiligt. LIF wird auch als Myokin [123-125] sezerniert. Neuronal fördert LIF die Neurogenese *in vitro* [126]. Eine entscheidende Rolle spielt LIF zudem in der Embryoimplantation [127] und dem Pluripotenz-Erhalt (Verhinderung der Differenzierung) embryonaler Stammzellen [128].

Ciliary Neurotrophic Factor:

CNTF wird auch als „Läsionsfaktor“ [129] bezeichnet, da es sich physiologischerweise aufgrund des fehlenden sekretorischen Signalpeptids [130] nur intrazellulär befindet und demnach nur bei Zellschädigung frei und extrazellulär detektierbar wird. Die Bezeichnung als *Ciliary Neurotrophic Factor* geht –ähnlich wie bei LIF– aus Beobachtungen bei der erstmaligen Isolation (aus einem Kükenauge) hervor: *Ciliary Neurotrophic Factor* fördert das Überleben von immunreaktiven „E8 chick ciliary ganglion neurons“ (E8=embryonic day 8) [131] in Kultur [132]; auch *in vivo* ist es ein wichtiger Überlebens- und Differenzierungsfaktor für Neurone [133, 134], Gliazellen [1, 135], Astrozyten und Oligodendrozyten [136]. Rekombinantes humanes CNTF (Axokione®) wurde mit seinen neuroprotektiven Eigenschaften an der neuromuskulären Endplatte [137] als Therapeutikum für Amyotrophe Lateralsklerose entwickelt [138]; als Nebenwirkung trat ein starker Gewichtsverlust auf [139, 140] (vgl. 1.6.1). Metabolisch fördert CNTF zudem die Muskelregeneration [137, 140]. Immunologisch spielt CNTF eine untergeordnete Rolle.

Oncostatin M:

OSM hat sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften [141]. Initial wurde es als Tumorzellwachstum-inhibierender Faktor identifiziert [141, 142] (vgl. Bezeichnung als Oncostatin M). OSM übernimmt wichtige Funktionen in der Hämatopoese [143, 144]. Proinflammatorisch wirkt es bspw. durch Beteiligung an der Akut-Phase-Reaktion [144] und antiinflammatorisch durch Reduktion der TNF-Antwort bei bakterieller Infektion [145]. Metabolisch fördert OSM die Lipolyse [146] und ist am Knochenstoffwechsel [147] beteiligt. Sezerniert wird es von Immunzellen [148], v.a. Monozyten/Makrophagen und T-Zellen [141, 145, 149, 150], außerdem als Myokin [151].

1.3.3 Zytokinstruktur IL-6-artiger Zytokine

IL-6-artige Zytokine (~20 kDa) weisen eine strukturell homologe [3, 152], vier- α -helikale Tertiärstruktur mit *up-up-down-down*-Topologie auf (Helices A-D) [1, 153]. Die Helices sind als zwei antiparallele Paare angeordnet (A/C und B/D) [153, 154] und über zwei lange *Cross-over*-Schleifen (englisch: *Loops*) (A-B, C-D) und eine kurze B-C-Schleife verbunden [1, 23] und durch konservierte intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert [3, 23] (vgl. Abb. 2).

Trotz ausgeprägter struktureller Homologie besteht eine nur geringe Aminosäuresequenzhomologie zwischen den Mitgliedern der IL-6-Familie [3] von 20% am Beispiel IL-6/IL-11 [155], konservierte Sequenzmotive deuten jedoch auf funktionell relevante Domänen hin [3, 156].

Die homologe Tertiärstruktur ermöglicht die Bindung an strukturell verwandte Rezeptoren und die Aktivierung ähnlicher intrazellulärer Signalwege [3, 77], was die o.g. funktionelle Überschneidungen z.T. erklärt [3, 157]. Die spezifische biologische Wirkung eines Zytokins wird dabei auch durch das jeweilige Rezeptorexpressionsmuster der Zielzelle bestimmt [3, 74, 158, 159]. Eine alleinige Aktivierung über den ubiquitär exprimierten β -Rezeptor gp130 ist durch kein natürliches Zytokin möglich [3] (*Trans-Signalling* ausgenommen [8, 72] (vgl. Kapitel 1.3.6)).

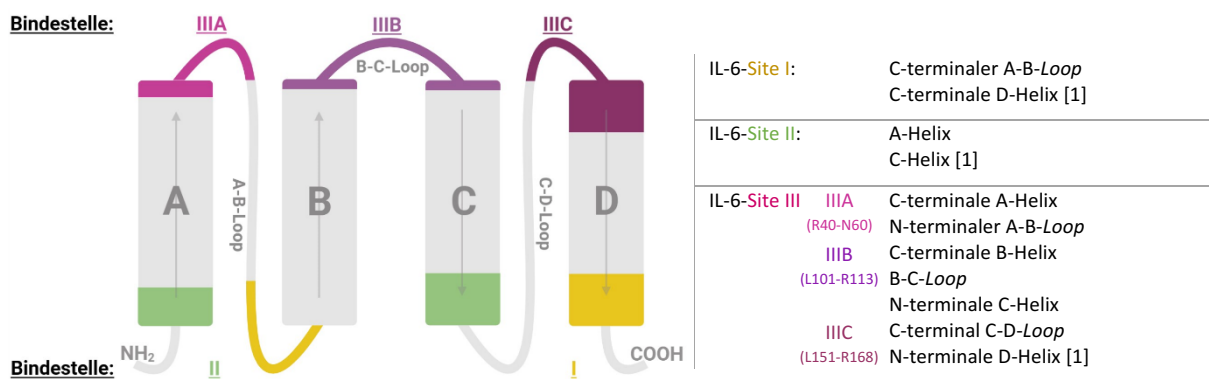


Abb. 2: Schematischer Strukturaufbau mit Bindestellen des hIL-6. Modifiziert nach Kallen *et al.* [1].

Darstellung der vier- α -helikalen Struktur des IL-6 mit *up-up-down-down*-Topologie. Die Helices A/C und B/D bilden ein antiparalleles Paar. Die einzelnen Helices sind durch Schleifen (syn.: *Loops*) verbunden. Die Rezeptorbindestellen (*Sites*) I (gelb), II (grün) und III (A, B, C; magenta) sind farblich codiert. Created in <https://BioRender.com>.

1.3.4 Rezeptor-Struktur IL-6-artiger Zytokine

Die Rezeptoren der Klasse-I-Hämatopoetin-Zytokin-Superfamilie, zu der die IL-6- und IL-12-Familie gehören, zählen zu den Typ-I-Zytokinrezeptoren und binden vier- α -helikale Zytokine [160]. Funktionell wird zwischen rein ligandenbindenden α -Rezeptoren (z. B. IL-6R α , IL-11R α , CNTFR α ; synonym: IL-6R, IL-11R, CNTFR) [68] und zugleich signaltransduzierenden β -Rezeptoren (gp130, LIFR β , OSMR β ; synonym: LIFR, OSMR) unterschieden [160, 161]. Während α -Rezeptoren keine intrinsische Signaltransduktionsfähigkeit besitzen, da ihnen eine JAK-assoziiierende zytoplasmatische Domäne fehlt (Ausnahme IL-23R, vgl. 1.4.4) und sie keine Tyrosin-Phosphorylierungsmotive enthalten (CNTFR ist zudem nur GPI-verankert [162]), vermitteln β -Rezeptoren über assoziierte Januskinasen (JAKs) die intrazelluläre Signalweiterleitung [160].

Strukturell bestehen Typ-I-Hämatopoetinrezeptoren aus vier Domänen:

- einer N-terminalen Zytokin-bindenden Domäne,
- einer membrannahen extrazellulären Domäne,
- einer einzelnen Transmembrandomäne und
- einer zytoplasmatischen Domäne [160].

Der IL-6R α bildet eine Ausnahme und besitzt anstelle der membrannahen extrazellulären Domäne eine *Stalk*-Region [5, 163]. Diese ist für Rezeptor-*Shedding* im Rahmen des *Trans-Signalling* (vgl. Kapitel 1.3.6) [163-165] relevant. Auch der IL-11R α verfügt über eine *Stalk*-Region [166].

Abbildung 3 zeigt den strukturellen Aufbau eines Typ-I-Hämatopoetinrezeptorkomplexes.

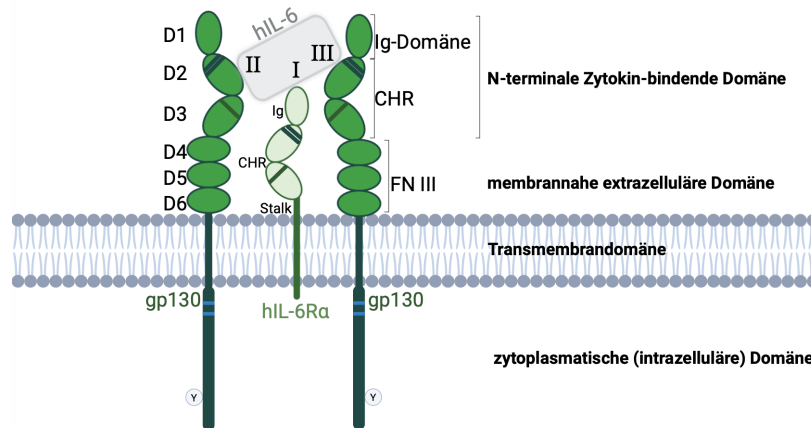


Abb. 3: Schematischer Aufbau von Hämatopoetin Typ 1-Rezeptoren am Beispiel von gp130. Modifiziert nach Wojno *et al.* [5] und Floss *et al.* [2].

Der Hämatopoetin Typ 1-Rezeptors (*hier*: gp130) wird in verschiedene Domänen (D1-6) unterteilt. D1 entspricht der Immunglobulin (Ig)-Domäne, D2-3 der *Cytokine Homology Region* (CHR) [2, 5, 167]. D1-3 sind an der Bindung IL-6-artiger Zytokine beteiligt [167-171], bzgl. der IL-12-Familie ist besonders D1 für die Ligandenbindung relevant [2, 172]. D2 ist charakterisiert durch vier konservierte Cystein-Residuen (in rot markiert), die an der Rezeptorkomplexbildung via Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind [2, 5, 173]. D3 ist durch das konservierte WSXWS-Motiv (Tyr-Ser-X-Tyr-Ser, X steht für eine beliebige Aminosäure; olive codiert) charakterisiert [169], das vermutlich ebenfalls für die Rezeptorkomplexierung [174, 175] wichtig und für Proteinfaltung [2] und Signaltransduktion [175] bedeutsam ist. D1 und D2 sind linear angeordnet, D2 steht fast orthogonal zu D3 [172]. Der D2-D3-Knick ist strukturell konserviert und funktionell relevant für die Ligandenbindung [2, 172, 176]. D4-6 sind die membrannahen extrazellulären Fibronektin (FN) III-Domänen [2, 5, 163, 168]. Hämatopoetin Typ 1-Rezeptoren passieren ein Mal die Zellmembran [2, 5, 24, 167, 172]. Die intrazelluläre Domäne besitzt das konservierte Box1- und Box2-Motiv [177-180] (in blau), die für die JAK-Assoziation notwendig sind [5, 181-183]. In der Mitte ist der ligandenbindende IL-6Rα dargestellt. Distal gelegene Tyrosinreste (Y) dienen als Andockstellen für SH2-Domänen-haltige Signalproteine wie STATs, PI3K oder SOCS [5] und ermöglichen die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Created in <https://BioRender.com>

1.3.5 Zytokin/Rezeptor-Bindung und Komplexierung der IL-6-Familie

Die vier- α -helikalen IL-6-artigen Zytokine besitzen zwei oder drei Stellen (englisch: *Site I/II/III*) zur Bindung eines Rezeptorkomplexes auf der Zielzelle [1]. Die einzelnen Bindestellen umfassen strukturell Teile der Helices und teilweise zusätzlich Teile der *Loops* (vgl. Abb. 2 oben). Für die Zytokine mit drei *Sites* (IL-6/IL-11/CNTF/CLC) [3, 184] erfolgt die zeitlich koordinierte Rezeptorbindung und -komplexierung nach dem sog. 1-2-3-Paradigma [168, 185]: Zuerst bindet *Site I* den ligandenbindenden α -Rezeptor (IL-6R α /IL-11R α /CNTFR α). Erst dadurch können die signaltransduzierenden β -Rezeptoren (gp130/LIFR/OSMR) rekrutiert und via *Site II* und *Site III* gebunden werden [3, 186]. Für Zytokine mit zwei *Sites* (z.B. LIF/OSM [170]) gilt: Es werden lediglich zwei signaltransduzierende β -Rezeptoren komplexiert [8], im Komplex befindet sich kein α -Rezeptor [187]. Die *Site II* bindet gp130, die *Site III* den LIFR bzw. den OSMR [8, 170]. Erst die vollständige Komplexbildung (Oligomerisierung) mit Dimerisierung zweier signaltransduzierender β -Rezeptoren führt zur intrazellulären Signaltransduktion (vgl. Kapitel 1.2) [3, 54, 158, 186].

Eine Übersicht der Rezeptorkomplexe ist in Abbildung 4 gezeigt.

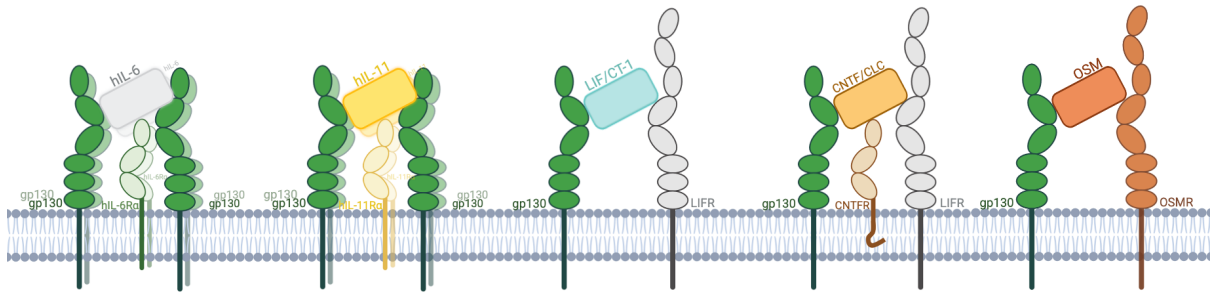


Abb. 4: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe IL-6-artiger Zytokine.

Der IL-6- und der IL-11-Rezeptorkomplex sind hexamerisch mit 2:2:2-Stöchiometrie (dargestellt durch entsprechende Schattierung). Einige Rezeptorkomplexe werden von mehreren IL-6-artigen Zytokinen adressiert, so bindet CLC an denselben Rezeptorkomplex wie CNTF (GPI-verankerten CNTFRα/LIFR/gp130) [188-190] und CT-1 bindet wie LIF an das Rezeptordimer LIFR/gp130 [189, 191]. OSM signalisiert über das Rezeptordimer OSMR/gp130 oder LIFR/gp130 [192-194], OSM ist also rezeptor-promiskuitiv (vgl. 1.5). Created in <https://BioRender.com>

Der hexamerische IL-6-Rezeptorkomplex bildet sich aus jeweils zwei Molekülen IL-6/IL-6Rα/gp130 [1, 3, 5, 158, 169, 195, 196] mit 2:2:2-Stöchiometrie [1, 197, 198]. Der IL-11-Rezeptorkomplex ist ebenfalls hexamerisch [154, 199]. Die Rezeptorkomplexe der anderen IL-6-artigen Zytokine folgt einer 1:1:1-Stöchiometrie [187, 199, 200].

Einige β-Rezeptoren werden in Rezeptorkomplexen verschiedener Zytokine rekrutiert [3, 152]. So wird bspw. der LIF-Rezeptor (LIFR) bei der Oligomerisierung des LIF-, CNTF-, CT-1- und CLC-Rezeptorkomplexes rekrutiert. Der LIFR ähnelt gp130 in seiner Struktur [3, 8, 201].

Die strukturelle Aufschlüsselung der Rezeptorkomplexe ist Grundlage für das Chimär-Design [3, 152].

1.3.6 Trans-Signalling

In Kapitel 1.2 und 1.3.5 ist das sog. *Classic-Signalling* für Zellen beschrieben, die die für das jeweilige Zytokin benötigten Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Für IL-6 (IL-11 und CNTF) ist auch ein sog. *Trans-Signalling* nachgewiesen [5]. Das *Trans-Signalling* beschreibt eine Signaltransduktion, die in Zellen aktiviert wird, die den entsprechenden α-Rezeptor (z.B. IL-6Rα) gar nicht auf ihrer Zelloberfläche exprimieren [3, 8] und somit für das in Kapitel 1.3.5 beschriebene *Classic-Signalling* nicht responsiv wären. Die Responsivität wird im Rahmen des *Trans-Signallings* durch einen löslichen (*soluble*, s) IL-6Rα gewährleistet. Der sIL-6Rα entsteht entweder durch alternatives *Splicing* (Expression ohne Transmembrandomäne; im Menschen, nicht in der Maus [160, 202, 203]) und wird dann direkt sezerniert [3, 204] oder durch limitierte Proteolyse (Protease-katalysiertes *Shedding* durch ADAM10 bzw. ADAM17, *A disintegrin and metalloprotease*) des membranständigen IL-6Rα [3, 203, 205, 206] in seiner *Stalk*-Region [207] (vgl. Kapitel 1.3.4). sIL-6Rα und IL-6 bilden extrazellulär einen Komplex [160]. Der Komplex IL-6/sIL-6Rα bindet an membranständiges, signaltransduzierendes gp130 [160] und induziert ein *Signalling* (JAK1/2 – STAT3) [3, 5, 165, 208]. Für das *Trans-Signalling* muss auf der Zelloberfläche demnach nur gp130 als membranständiger Rezeptor exprimiert werden, damit kann folglich nahezu jede kernhaltige Körperzelle stimuliert werden, die Anzahl der möglichen Zielzellen für bspw. IL-6 steigt drastisch [3, 203, 209].

Damit ist das *Trans-Signalling* weniger stark reguliert als das *Classic-Signalling*. Ein Mechanismus, der das *Trans-Signalling* kontrolliert, ist der sgp130-Puffer im Blut (Serum-sgp130-Level im Gesunden: 250-400 ng/mL; sIL-6Rα-Level: 40-75 ng/mL; IL-6-Level <5 pg/mL) [160, 208, 210-212]. Das sgp130 fängt den präformierten IL-6/sIL-6Rα-Komplex bereits im Blut ab [3], bevor dieser an membranständiges gp130 binden und eine Signaltransduktion induzieren kann. Der sgp130-Puffer stellt somit einen körpereigenen Schutzmechanismus vor IL-6-Überstimulation durch *Trans-Signalling* dar [3, 56, 211].

Verallgemeinern lässt sich, dass das *Classic-Signalling* eher mit den anti- und das *Trans-Signalling* eher mit den proinflammatorischen (und damit pathologischen) Eigenschaften des IL-6 assoziiert ist [3, 8,

213-215]. So wurden bei inflammatorischen und karzinogenen Prozessen erhöhte sIL-6R α -Level [3, 216-219] durch z.B. erhöhte ADAM17-Aktivität nachgewiesen und ein gestörtes sIL-6R/sgp130-System bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) [220].

Die therapeutische Blockade des *Trans-Signallings* erwies sich als effizienter als eine globale IL-6-Hemmung (Blockade des *Classic-* und *Trans-Signallings*). Bei einer globalen IL-6-Hemmung steigt das Risiko für bakterielle Infektionen [221], die selektive Blockade des *Trans-Signallings* vermindert die Infektionsabwehr nicht [222].

1.3.7 Hyper-Zytokine

Das *Trans-Signalling* wurde durch das Design von sog. Hyper-Zytokinen *in vitro* erforscht. Hyper-Zytokine setzen sich aus dem Zytokin (z.B. IL-6/IL-11/CNTF) und seinem entsprechendem löslichen α -Rezeptor (sIL-6R α /sIL-11R α /CNTFR α), die mittels eines Peptidlinkers kovalent gebunden sind, zusammen [223]. Die IL-6-artigen Hyperzytokine benötigen lediglich den β -Rezeptor auf der Zelloberfläche, um ein *Signalling* hervorzurufen (gp130 für HIL-6 und HIL-11). Die dimeren IL-12-artigen Hyperzytokine HIL-12 und HIL-23 sind die mittels eines Linkers kovalent verbundene α - und β -Untereinheit (p35/p19 + p40) [224, 225] [225], ohne dass zusätzliche lösliche Rezeptoren kovalent gebunden sind, wobei die β -Untereinheit p40 strukturell ohnehin einem löslichen Rezeptor ähnelt (vgl. Kapitel 1.4.3). Durch die *in vitro*-Stimulation mit den Hyperzytokinen HIL-6 [223], HIL-11 [226] und Hyper-CNTF [227] kann eine 100- bis 1000-fach stärkere Aktivierung der Zielzelle erreicht werden [223] im Vergleich zur *in vitro*-Stimulation mit dem nicht-kovalent gebundenen Komplex aus IL-6/sIL-6R α [223].

1.3.8 IL-6 im Typ 2 Diabetes mellitus und metabolischen Syndrom

Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) ist eine hochprävalente Stoffwechselerkrankung (mit 415 Millionen Erkrankten weltweit [228] und 9,1 Millionen Betroffenen in Deutschland [229]) mit chronischer Hyperglykämie infolge peripherer Insulinresistenz. Andauernd erhöhte postprandiale Glukoseserumlevel mit initial erhöhter Insulinsekretion führen zu einer Überlastung des Insulinrezeptor-Recyclings in Muskel- und Fettzellen mit verstärkter Insulin-Rezeptor-Internalisierung (es entsteht eine sog. periphere Insulinresistenz auf der Zelloberfläche von Myo- und Adipozyten) und damit zu verminderten Glukosetransporter (GLUT) 4-Translokation. Mit verringerter GLUT4-Präsentation auf der Zelloberfläche kommt es zum verminderten Transport der Serumglukose nach intrazellulär und konsekutiv nicht senkbarem Blutzuckerspiegel. Chronisch erhöhte Blutzuckerspiegel verursachen nicht-enzymatische Glykierungen, Langzeitkomplikationen derer sind bspw. Neuropathien und Atherosklerose [11, 230] mit folglich kardiovaskulären Erkrankungen [228, 231-233].

T2DM ist häufig mit dem metabolischen Syndrom und Adipositas assoziiert [228, 234, 235].

Das metabolische Syndrom ist durch folgende Kriterien definiert (nach *International Diabetes Federation*, IDF) [236]

- Stammbetonte Adipositas (Taillenumfang: ≥ 80 cm bei Frauen/ ≥ 94 cm bei Männern)
- + zwei der folgenden Kriterien:
 - Nüchternblutzucker ≥ 100 mg/dL oder T2DM
 - Erhöhte Triacylglyceride (TAG) ≥ 150 mg/dL
 - Verringertes HDL-Cholosterin: < 50 mg/dL bei Frauen/ < 40 mg/dL bei Männern
 - Erhöhter Blutdruck: ≥ 130 mmHg systolisch oder ≥ 85 mmHg diastolisch

Das metabolische Syndrom ist durch eine chronische, niedriggradige, systemische metabolische Entzündung (sog. *low-grade Meta-Inflammation*) [228, 237] gekennzeichnet. Diese betrifft insbesondere die die Glukosehomöostase-regulierenden Organe wie Pankreas, Leber und Fettgewebe [228, 238] und führt dort zu Dysfunktionen, was mit einem verschlechterten Verlauf des T2DM und einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert ist [228, 239]; chronisch leicht erhöhtes IL-6 von physiologisch < 5 pg/mL [79, 160, 212] auf bspw. 38,2 pg/mL bei übergewichtigen Diabetikern [240] spielt hier eine Schlüsselrolle.

1.3.8.1 Kontradiktorische Rolle des IL-6 im Metabolismus

Die Wirkung von IL-6 ist stark kontextabhängig und wird u.a. durch *Classic-* vs. *Trans-Signalling* [11, 241], Expositionsdauer (Chronizität der Meta-Inflammation vs. Periodizität physikalischer Aktivität) und der zellulären Quelle bestimmt.

Chronisch erhöhtes (auch adipokines [242]) IL-6 wirkt proinflammatorisch, etabliert selbstverstärkende Entzündungsschleifen („*IL-6-Amplifier*“, siehe 1.3.2 und 1.3.8.1.2) und entfaltet metabolisch pro-diabetogene Effekte [11, 243].

Transient erhöhtes IL-6, welches bei körperlicher Aktivität als Myokin aus der Skelettmuskulatur [11] sezerniert wird, wirkt dagegen antiinflammatorisch und metabolisch günstig.

Tabelle 1: IL-6 -Serumspiegel

IL-6:	<i>Physiologisch:</i> <5 pg/mL [79, 160, 212] bei physikalischer Aktivität steigt der Wert intensitätsabhängig transient 100-fach [11, 244, 245] bei Inflammation 1000-fache Steigerung, bei Sepsis teils bis in den µg/mL-Bereich [79, 160]
-------	--

1.3.8.1.1 Das Myokin IL-6: Antiinflammatorisch und anti-diabetogen

IL-6 als Myokin (myIL-6) dient im Metabolismus als kurzfristiger Regulator der Energiebereitstellung („*short-term energy allocator*“ [11]), insbesondere im Rahmen anhaltenden Ausdauersports. Myokines IL-6 wirkt antiinflammatorisch [11, 246, 247] und anti-diabetogen.

Drei Faktoren charakterisieren myokines IL-6 als kurzfristigen Regulator der Energiebereitstellung:

- Die Kinetik von myokinem IL-6,
- der Produktionsmechanismus bei Muskelkontraktion mit autokriner Sekretion und
- die durch myIL-6 geförderte Bereitstellung weiterer Energiesubstrate.

Kinetisch charakterisiert sich das myIL-6 durch seine sehr kurze Halbwertszeit (HWZ) von lediglich 5 min [11], während die HWZ von IL-6 bei systemischer Entzündung (z.B. bei Sepsis) 100 min bis 15,5 h beträgt [11, 248, 249]. myIL-6 wird rasch durch die Leber abgebaut, sodass der Plasmawert nach 1 h wieder normalisiert ist; die Effekte der kurzfristig erhöhten IL-6-Serumlevel (sog. Serumspitze/-*Peaks*) sind damit leicht steuerbar.

Streng gesteuert ist ebenfalls der Produktions- und Sekretionsmechanismus von myIL-6. Das Myokin wird bei physikalischer Aktivität (PA) [11, 250-253] 100-fach ausgeschüttet [11, 244, 245] (vgl. Tabelle 1). Stärkster Stimulus im Rahmen der PA ist die Muskelkontraktion [11], weitere Stimuli sind die fortlaufende Entleerung des muskulären Glykogenspeichers [11, 254], Laktatakkumulation [11, 252] und Redox-Signale [11, 255]. Der exponentiell steigende myIL-6-Plasmawert erreicht sein Maximum unmittelbar nach Beendigung der PA [11] und flaut dann rasch wieder ab (siehe oben). Das autokrin sezernierte myIL-6 bewirkt eine verbesserte Leistungsfähigkeit [11, 256, 257] z.B. durch verbesserter mitochondrialer Aktivität im Rahmen der PA [11, 258] und Hypertrophie [11, 259]. Die Hypertrophie wird nicht nur direkt durch autokrines myIL-6 vermittelt, sondern auch durch myIL-6-induzierte GH-Sekretion [11, 260] und Satellitenzell-Differenzierung [259]. Eine verbesserte Regeneration wird bspw. durch erhöhte Substratbereitstellung für den Muskel durch para- und endokrine Wirkungen des myIL-6 vermittelt [11, 261]. So bewirkt das durch Kontraktion und Glykogenspeicherdepletion getriggerte myIL-6 [11] initial erhöhte Blutzuckerwerte [11, 262] durch gesteigerte Glukoneogenese [11], indem IL-6 die Glucagon-Ausschüttung stimuliert [263] mit gleichzeitig erhöhter Glukoseaufnahme in den Muskel [264, 265] durch erhöhte GLUT4-Translokation durch Kontraktion [266-268] und erhöhter Insulinsensitivität durch myIL-6 [11] bei zeitgleicher via GLP-1 (*Glucagon-like peptide 1*)-vermittelter erhöhter Insulinsekretion [11, 244]. Die erhöhte Substratbereitstellung des myIL-6 als sog. „*short-term energy allocator*“ beschränkt sich nicht nur auf Glukose, sondern auch auf freie Fettsäuren (englisch: *free fatty acids*, FAA). Das Myokin IL-6 bzw. die PA triggert die Lipolyse im Fettgewebe [269, 270], was den Körperfettanteil reduziert, verstärkt die myozytäre FAA-Aufnahme (kontraktionsinduziert) [256, 271, 272] und erhöht die Fettsäureoxidation im Muskel [269, 273, 274].

Akut erhöhtes myIL-6 hat zusammenfassend als „*short-term energy allocator*“ benefizielle, anti-diabetogene Effekte. myIL-6 wird im Rahmen von anhaltender PA (Muskelkontraktionen, Glykogenspeicherentleerung) aus der Skelettmuskulatur sezerniert und bewirkt die Mobilisation

somatisch gespeicherter Energie (Lipolyse im Fettgewebe $\rightarrow$ FFA $\uparrow$ sowie Glukoneogenese $\rightarrow$ Glukose $\uparrow$) in Richtung Muskel [11] (GLUT4-Translokation, und FFA-Transporter-Aktivitätssteigerung). Dies wiederum führt zu einer nachweislich besseren Leistung, Regeneration und Trainingsadaptation (Hypertrophie, mitochondriale Leistung).

1.3.8.1.2 Das Adipokin IL-6: Proinflammatorisch und pro-diabetogen

Während transient und spitzenförmig sezerniertes myokines IL-6 im Rahmen körperlicher Aktivität antiinflammatorische und metabolisch günstige Effekte entfaltet, wirkt chronisch erhöhtes IL-6 überwiegend proinflammatorisch und pro-diabetogen. Dieses im Rahmen der Meta-Inflammation chronisch erhöhte IL-6 stammt vor allem aus hypoxischen, hypertrophen Adipozyten [11, 275-280] des viszeralen Fettgewebes [277, 281-283] (IL-6 als Adipokin [242]) sowie aus M1-polarisierten Makrophagen [281]; insgesamt stammen ca. 15 – 30% des zirkulierenden IL-6 aus Fettgewebe [284].

Chronisch erhöhtes IL-6 verstärkt die systemische (Meta-) Inflammation über mehrere Mechanismen: Es stimuliert die Myelopoese [11, 89] und Neutrophilenmobilisation [11, 90], fördert die Leukozyteninfiltration ins entzündliche (Fett-) Gewebe [91, 281, 285-287] und verschiebt die T-Zell-Differenzierung zugunsten proinflammatorischer Th17-Zellen auf Kosten regulatorischer T-Zellen [11, 13, 288] (vgl. Kapitel 1.3.2). Über die IL-6/IL-17-Achse kommt es zur Aktivierung von STAT3 [87, 289] und NF- κ B [87, 289], was zur verstärkten Chemokinproduktion [289] mit konsekutiv verstärkter Leukozyteninfiltration [287, 289] und Prolongierung der Entzündung [87] führt. Über die IL-6/IL-17-Achse kommt es außerdem zur Ausbildung eines selbstverstärkenden Entzündungszyklus mit letztendlich IL-6-getriggelter verstärkter IL-6-Sekretion [290-292] (sog. „IL-6-Amplifier“) [289].

Metabolisch führt die chronische Inflammation zu einer Umstellung des Energiestoffwechsels. Bspw. tritt eine Insulinresistenz (z.B. in Hepatozyten, Adipozyten und Myozyten) auf [11, 284, 293-297] (mit folglich nicht senkbarem Blutzuckerspiegel). Außerdem ist chronisch erhöhtes IL-6 mit Dyslipidämie und muskulärem Katabolismus assoziiert [11, 298]. Dabei freigesetzten Substrate können die chronische Entzündung energetisch unterstützen und aufrechterhalten („energy allocator“-Konzept) [11], ein *circulus vitiosus* schließt sich.

Die kontradiktorischen Effekte des IL-6 im Metabolismus sind in der Abbildung 5 zusammengefasst:

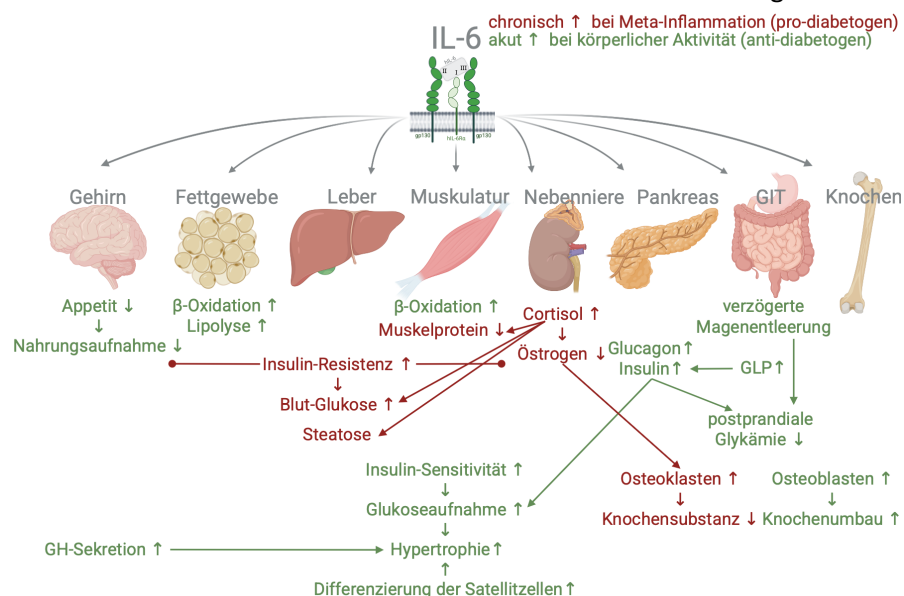


Abb. 5: Metabolische Funktionen von IL-6.

Das im Rahmen physikalischer Aktivität akut und transient autokrin sezernierte Myokin IL-6 hat metabolisch vorteilhafte, anabole und anti-diabetogene Effekte (in grün dargestellt), wie z.B. Muskelhypertrophie, verbesserter Knochenumbau [11, 299], reduzierter Appetit [11, 244, 300, 301] und verzögerte Magenentleerung [11, 302]. Chronisch erhöhtes IL-6, z.B. im Rahmen der Meta-Inflammation, wirkt sich eher metabolisch destruktiv, katabol und pro-diabetogen aus (in rot dargestellt), bspw. durch IL-6-getriggerte erhöhte Cortisol-Ausschüttung [11, 79, 260, 303], was zum Abbau peripherer Gewebe (Muskulatur, Knochen), Stammfettsucht und Steatose [304-306] mit erhöhter Glukoneogenese und hierdurch steigendem Blutzuckerspiegel führt. Created in <https://BioRender.com>

Die metabolisch günstigen Eigenschaften des IL-6 sollen in Zukunft Anwendung in der Therapie metabolischer Erkrankungen (Adipositas, T2DM) finden. Zur Generierung respektive Herstellung eines sicheren Therapeutikums muss das Zytokin allerdings so modifiziert werden, dass keine proinflammatorischen Effekte auftreten. (vgl. Kapitel 1.6 und 1.7).

1.4 Interleukin-12-Familie

1.4.1 Definition & Mitglieder der IL-12-Familie

Die Interleukin-12-Familie umfasst die fünf Zytokine IL-12, IL-23, IL-27 (ebenfalls Mitglied der IL-6-Familie vgl. 1.3.1), IL-35 und IL-39 [2]. Definiert ist die IL-12-Familie durch ihre klassische heterodimere Zytokinstruktur [307] (siehe unten Kapitel 1.4.3).

1.4.2 Allgemeine Funktionen von IL-12 und IL-23

Die Zytokine der IL-12-Familie weisen ebenfalls sowohl spezifische als auch überlappende Funktionen auf [5, 308]. Funktionelle Redundanzen entstehen durch die Nutzung gemeinsamer Rezeptorkomponenten und Signalwege, sowohl innerhalb der IL-12-Familie als auch familienübergreifend mit der IL-6-Familie [5].

Eine zentrale biologische Rolle der IL-12-artigen Zytokine liegt in der Regulation der T-Zell-Differenzierung [5]. Entsprechend sind vor allem T-Lymphozyten ihre Hauptzielzellen [5]. Die Sekretion erfolgt überwiegend durch Immunzellen [5].

Interleukin-12:

Das proinflammatorische [2, 309, 310] IL-12 wurde von Trinchieri *et al.* [311] 1989 erstmals gereinigt und aufgrund der Stimulation der IFN γ -Produktion [312] in *Natural-Killer* (NK)-Zellen [313, 314] mit folglich verstärkter Zytotoxizität [315] als „NK-Zell-Stimulierender-Faktor“ [5, 316] bezeichnet. IL-12 fördert zudem die Th0-Differenzierung in Richtung Th1 [317-319] und damit verbundener erhöhter Th1-Effektorfunktion mit gleichzeitig verminderter Th2-Antwort [5, 320].

Interleukin-23:

IL-23 ist ein proinflammatorisches [2, 321] Zytokin, dessen α -Untereinheit (p19) im Jahre 2000 entdeckt wurde [5, 322]. Immunologisch spielt IL-23 eine entscheidende Rolle in der Differenzierung, Stabilisierung [323, 324] und Expansion (insb. zusammen mit IL-6) [5, 84, 86] von Th17-Zellen und ist damit zentraler Akteur in chronischer Inflammation und Gewebsdestruktion [61].

1.4.3 Zytokinstruktur IL-12-artiger Zytokine

Die IL-12-Familie gehört wie die IL-6-Familie zur Klasse I Hämatopoetin-Superfamilie. IL-12-artige Zytokine sind Heterodimere. Sie bestehen aus einer vier- α -helikalen α -Untereinheit (ähnlich dem IL-6) und der kovalent via Disulfidbrücken [2, 322, 325] daran gebundenen β -Untereinheit [5, 325]. Die β -Untereinheit ist ähnlich wie ein löslicher Hämatopoetin Typ 1-Rezeptor aufgebaut [5] (vgl. Kapitel 1.3.4 und Abb. 3) und verfügt über eine Ig-Domäne (D1) sowie zwei (Tandem-) Fibronektin III-Domänen (D2, D3) [326-328].

Bekannt sind drei α -Untereinheiten (p19, p28 und p35) sowie zwei β -Untereinheiten (p40, EBI3) [2]. „p19“ beschreibt ein Protein eines Molekulargewichtes von 19 kDa (Analoges gilt für p35 und p40). EBI3 bedeutet *Eppstein-Barr-Virus (EBV) induced Gene* [3].

In Tabelle 2 sind die Untereinheiten der einzelnen IL-12-Familienmitglieder aufgeschlüsselt.

Tabelle 2: Untereinheiten der IL-12-artigen Zytokine.

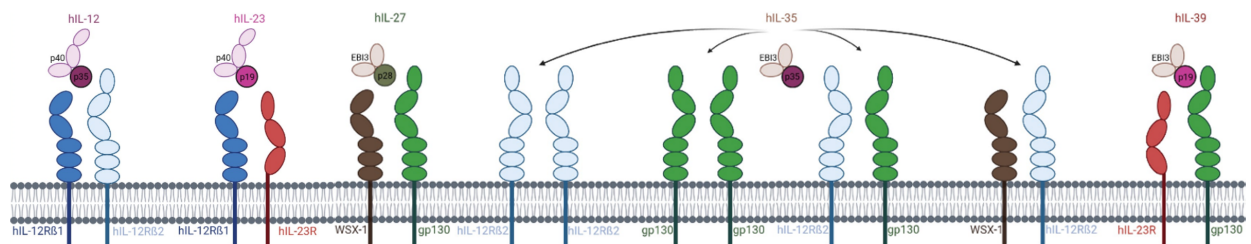
		α -Untereinheiten		
		p19	p28	p35
	β -Untereinheiten			
	p40	IL-23 [2]	bisher nicht beschrieben [2]	IL-12 [2, 5]
	EBI3	IL-39 [2]	IL-27 [2]	IL-35 [2]

Modifiziert nach Floss *et al.* [2]

1.4.4 Rezeptorkomplexe und -struktur der IL-12-Familie

IL-12-artige Zytokine adressieren ebenfalls Hämatopoetin Typ 1-Rezeptoren (vgl. Kapitel 1.3.4 und Abb. 3). Im Gegensatz zur IL-6-Familie sind alle Rezeptoren signaltransduzierend, auch der IL-23R [2], obwohl dieser strukturell dem IL-6R ähnelt (vgl. *Stalk*-Region; vgl. 1.3.4).

Die Rezeptorkomplexe der IL-12-Familie sind in der folgenden Abbildung 6 dargestellt.

**Abb. 6: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe IL-12-artiger Zytokine.**

α - als auch β -Untereinheit der IL-12-artigen heterodimeren Zytokine binden jeweils einen Rezeptor. Der α -Untereinheit-spezifische Rezeptor (z.B. IL-23R für p19) wird als ligandenbindende (α) Kette bezeichnet [5, 62, 322]. Für die Bindung IL-12-artiger Zytokine ist insbesondere die Immunglobulin (Ig)-Domäne (D1) von Bedeutung (vgl. Abb. 3 und Abb. 31). Besonderheiten einzelner Rezeptoren: Dem IL-12Rβ1 und WSX-1 fehlt die D1 [2], dem IL-23R die D4-6 (*Stalk*-Region). Besonderheiten einzelner Zytokine: IL-35 kann die abgebildeten verschiedenen Rezeptorkomplexe adressieren [2], der Zytokinuntereinheit EBI3 fehlt die Ig-Domäne [2]. Created in <https://BioRender.com>

Der heterodimere IL-12-Rezeptorkomplex setzt sich aus dem IL-12Rβ1 und IL-12Rβ2 [5, 329, 330] zusammen. Bei Koexpression beider Rezeptoren ist eine IL-12-Responsivität der Zelle gewährleistet [5, 329]. Die α -Untereinheit des IL-12 (p35) bindet den IL-12Rβ2, die β -Untereinheit (p40) den IL-12Rβ1. Der heterodimere IL-23-Rezeptorkomplex setzt sich aus dem IL-12Rβ1 und dem IL-23R zusammen. Somit ist der IL-12Rβ1 Teil des IL-12- und des IL-23-Rezeptorkomplexes, da das IL-12Rβ1-bindende p40 sowohl die β -Untereinheit des IL-12 als auch des IL-23 ist. Die α -Untereinheit des IL-23 (p19) bindet den IL-23R. Es konnte gezeigt werden, dass bei hohen IL-23-Konzentrationen auch IL-23R-Homodimere signaltransduzierend sind [331, 332].

1.4.5 Zytokin/Rezeptor-Bindung und Komplexierung der IL-12-Familie

Im Gegensatz zur IL-6-Familie, deren Zytokine über drei Rezeptor-Bindestellen (*Site I/II/III*) verfügen, sodass zwei bis drei Rezeptoren pro Ligand gebunden werden, bindet in der IL-12-Familie eine Zytokin-Untereinheit lediglich einen Rezeptor; damit bestehen wesentliche Unterschiede zum IL-6-typischen 1-2-3-Bindungsparadigma.

Beim IL-23 ist die p19/p40-Interaktionsfläche analog zur IL-6-*Site I* [176]. Die *Site III* des IL-23 liegt in der α -Untereinheit p19 und bindet, im Gegensatz zu IL-6 nicht an die CHR, sondern an die N-terminale Ig-Domäne des IL-23R [172, 176]. Nach erfolgter *Site III*-Bindung an den IL-23R, bindet die ausschließlich im p40 liegende *Site II* den IL-12Rβ1 [176]. Die sequenzielle Rezeptorkomplexierung vom IL-23 (vgl. 4.1.4 und Abb. 31) unterscheidet sich damit deutlich von dieser des IL-6.

1.5 Crosstalks und Rezeptor-Promiskuitivitäten der IL-6- und IL-12- Familie

Die pleiotropen [4, 5] und teilweise redundanten Wirkungen IL-6- und IL-12-artiger Zytokine beruhen unter anderem auch auf Rezeptor-Promiskuitivität. Promiskuitivität beschreibt die Fähigkeit eines Rezeptors, mehrere unterschiedliche Zytokine zu binden [152, 160] oder umgekehrt eines Zytokins mehrere Rezeptoren zu adressieren – meist mit unterschiedlicher Affinität. Nichtsdestotrotz werden häufig ähnliche Signalwege (v. a. JAK-STAT) aktiviert [160].

Die IL-6-Familie zeigt eine begrenzte, die IL-12-Familie hingegen eine ausgeprägte Rezeptor-Promiskuitivität [159, 307], bedingt durch ihre heterodimere Struktur.

Interspezies-Kreuzreaktivitäten (*Crosstalks*) bezeichnet, dass einige humane Zytokine murine Rezeptoren binden und ein *Signalling* verursachen können, und/oder umgekehrt:

- hIL-6 bindet sowohl an hIL-6R α als auch an mL-6R α [333], mL-6 bindet jedoch nur an mL-6R α [333], nicht aber an den hIL-6R α [333].
- hIL-6 kann an hIL-11R α [334] und mL-11R α [334] binden.
- hIL-11 bindet nicht an hIL-6R α [335], aber an den mL-11R α [334].
- CNTF bindet primär an CNTFR α , kann jedoch auch IL-6R α binden [139, 335, 336] und eine Signaltransduktion mit gp130 und LIFR im Komplex induzieren [337]; bei hohen Konzentrationen des murinen CNTF ist eine Signaltransduktion sogar ohne α -Rezeptor möglich [336]. Andersherum bindet IL-6 nicht an den CNTFR α . CLC [22, 160, 189, 338, 339] bindet an den CNTFR α . CNTF zeigt eine speziesübergreifende Bioaktivität [130].
- hLIF bindet an den mLIFR [192]. mLIF bindet nicht an den hLIFR [192].
- hOSM bindet an hOSMR, hLIFR [192-194] und mLIFR [192], jedoch nicht an mOSMR [192].
- mOSM bindet an mOSMR und mLIFR [192], aber nicht an humane Rezeptoren [192], weder an hOSMR noch an hLIFR. Ein von mOSM gebundenes gp130/mOSMR-Heterodimer zeigt eine stärkeren Affinität [340] bzw. Aktivierung [341] als eine Bindung an das Dimer gp130/LIFR.
- IL-12 zeigt keine Rezeptor-Promiskuitivitäten [322], hIL-12 ist nicht auf murinen Zellen aktiv [342, 343], mL-12 bindet jedoch humane Rezeptoren [343] und induziert eine Signaltransduktion [185].
- hIL-23 und mL-23 bedienen die Rezeptoren der anderen Spezies [172, 185].

Die Rezeptor-Promiskuitivitäten sowie die *Crosstalks* zwischen den Spezies (human und murin) gilt es für die Evaluation der Aktivierungsmuster von murinen (C2C12-, Hepa1-6-) und humanen (HepG2-) Zellen durch humane Zytokine und Cytokimera zu beachten (vgl. Kapitel 4).

1.6 Cytokimera

Designer-Zytokine lassen sich in Zytokin-Analoga (z.B. Synthekine [344], Neoleukine [345], Fusokine [346]), chimäre Zytokine [1] (Cytokimera) [347, 348] und synthetisch Zytokin-Rezeptor-Systeme wie SyCyRs [63]) unterteilen.

Cytokimera sind chimäre Zytokine, die einzelne Regionen verschiedener Zytokine in einem neuen Designer-Zytokin vereinen [1]. Der Austausch einzelner Zytokinabschnitte erfolgt hierbei strukturbasiert. Dies kann insbesondere bei Struktur-konservierten Zytokinen, wie bspw. den Mitgliedern der IL-6-Familie (vier- α -helikale Struktur) trotz geringer Sequenzhomologie (~6% bei IL-6 und CNTF [1]) erfolgen.

Eine prominente Cytokimera ist IC7.

IC7 ist ein Cytokimera aus humanem (h) IL-6 und hCNTF [1]. „I“ steht für „Interleukin-6“, „C“ steht für „CNTF“ und „7“ steht für die „experimentelle Chimär-Variante Nummer 7“ (siehe unten) [1]. Hierbei wurden die in der Tertiärstruktur der Proteine nah beieinander liegenden Rezeptorbindestellen (*Sites*) ausgetauscht: In das IL-6-artige Grundgerüst (sog. *Backbone*, inkludierend *Site I* und *Site II* von IL-6) wurde die *Site III* des CNTFs transferiert [1].

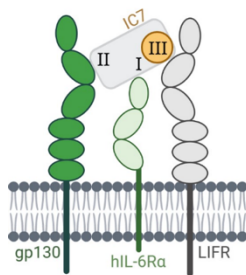


Abb. 7: Schematische Darstellung des IC7 und seiner Rezeptoren.

Die Site III des IL-6-Grundgerüsts wurde durch die CNTF-Site III strukturbasiert ausgetauscht. IC7 rekrutiert eine neuartige Rezeptorkonstellation aus IL-6Rα/gp130/LIFR. Created in <https://BioRender.com>.

Anhand der bekannten CNTF-Röntgen- und IL-6-NMR-Struktur (*Nuclear Magnetic Resonance*, Kernspinresonanz) [1] sowie mit Hilfe der Daten der Brookhaven Datenbank konnten die Rezeptorbindestellen (*Sites*) in der Tertiärstruktur der Proteine lokalisiert werden (vgl. Abb. 2). Mithilfe des WHAT IF-Programms [349] konnten die Strukturen der Zytokine verglichen (starke Strukturähnlichkeit von IL-6 und CNTF [1, 196]) und ein Austausch weitgehend strukturhomologer Abschnitte, die die *Sites* inkludieren, simuliert werden. An einigen Stellen wurden beim strukturbasierten Austausch Anteile (Helices/Loops) um einige Aminosäuren vergrößert oder verkleinert, so resultierte der Transfer der CNTF-Site IIIB in das IL-6-Grundgerüst in einer um fünf Aminosäuren verbreiterten Helix B und einem um zwei Aminosäuren verlängerten BC-Loop beim Design des IC7 [1]. Abbildung 8 veranschaulicht den Austausch der Site III.

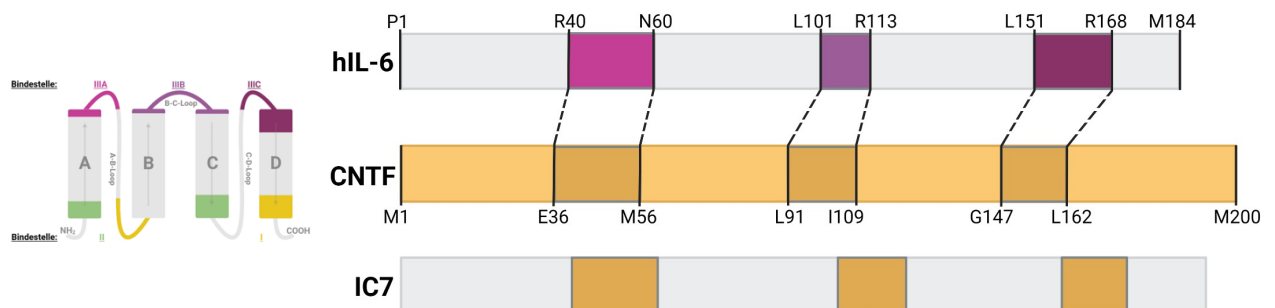


Abb. 8: Sequenzabschnitte von hIL-6 und CNTF für den Site III-Austausch zum Chimärdesign von IC7.

Modifiziert nach [1] Kallen *et al.*

Ausgetauscht wurde die gp130-bindende IL-6-Site III (Site IIIA: R40-N60, Site IIIB: L101-R113 und Site IIIC: L151-R168) gegen strukturhomologe CNTF-Abschnitte, die unter anderem das LIFR-bindende Modul (C-terminale B-Helix, B-C-Loop, C-D-Loop, N-terminale D-Helix) umfassen [1, 350]. Die drei CNTF-Sequenzabschnitte sind E35-M56, L91-I109, und G147-L162 und wurden in den hIL-6-Backbone transferiert. Bei den weiteren von Kallen synthetisierten Cytokimera IC1/2/3/4/5/6 wurden andere Tertiärstrukturanteile ausgetauscht. IC7 zeigte schlussendlich jedoch die höchste biologische Aktivität. Created in <https://BioRender.com>

Das Cytokimera IC7 bindet somit via Site I den IL-6Rα, via Site II gp130 und über die Site III den LIFR, eine Rezeptorkonstellation, die mit keinem natürlichen Zytokin adressiert wird [1]. Die responsive Zellpopulation muss also alle drei Rezeptoren (IL-6Rα, gp130 und LIFR) exprimieren und ist damit im Vergleich zum IL-6 geschrumpft [1]. IC7 ist also spezifischer als IL-6 [1] und induziert entsprechend seines Rezeptorkomplexes ein CNTF-artiges, aber IL-6Rα-abhängiges JAK-STAT3-Signalling [1]. Der IL-6Rα muss nicht notwendigerweise membranständig sein [1], bei Zugabe von sIL-6R konnte ein IC7-Trans-Signalling beobachtet werden [1]. Durch die hohe Spezifität und die Wirkung als (vermutlich) kompetitiver Antagonist zu IL-6 erschien IC7 therapeutisch interessant.

1.6.1 Cytokimera in der Therapie metabolischer Erkrankungen (IC7Fc)

IC7Fc ist ein Fc-fusioniertes Designerzytokin auf Basis von IC7 und ist als Therapeutikum für metabolische Erkrankungen wie Adipositas und T2DM in der präklinischen Entwicklung. Ziel ist es, die metabolisch günstigen Effekte von IL-6 (z.B. verbesserte Insulinsensitivität, Appetitregulation; vgl. 1.3.8.1.1 und Abb. 5) zu nutzen, ohne dessen proinflammatorische Wirkungen zu verstärken [351]. Durch Fusion mit einer *Fragment crystallizable* (Fc)-Domäne eines humanen IgGs steigt die Molekülgröße (51,8 kDa), sodass die Halbwertszeit verlängert wird (verzögerte renale Elimination,

Recycling durch den hepatischen neonatalen Fc-Rezeptor [352-354]), wodurch stabilere systemische Effekte erzielt werden [351].

Im Mausmodell verbesserte IC7Fc die Glukosetoleranz, erhöhte die Insulin- und Inkretinsekretion, steigerte die β -Oxidation, reduzierte Körpergewicht sowie Fettmasse und förderte Muskelhypertrophie und Knochendichte [351].

Sicherheitsuntersuchungen in nicht-humanen Primaten und *in vitro* zeigten keine inflammatorischen Nebenwirkungen und keine Bildung neutralisierender *Anti-Drug*-Antikörper (ADA) [351]. Im Gegensatz dazu scheiterte das CNTF-basierte Therapeutikum Axokine® ursprünglich zur Therapie der Amyotrophen Lateralsklerose, unter derer die Probanden stark an Gewicht verloren [351, 355-358], aufgrund der hoher ADA-Rate [351, 354, 357, 359]. Das geringere Immunogenitätsrisiko von IC7Fc wird auf das physiologisch extrazelluläre Vorkommen von IL-6 zurückgeführt, während der neuronale Wachstumsfaktor CNTF ein intrazelluläres Zytokin ist (vgl. 1.3.2).

Ob die im Mausmodell beobachteten Effekte auf den Menschen übertragbar sind, bleibt bisher offen. Die Wirkung von IL-6 ist stark kontextabhängig [11, 216, 351, 360] und das Zytokinmilieu chronisch erkrankter T2DM-Patienten unterscheidet sich wesentlich von dem junger Mausmodelle.

1.6.2 Nachfolger von IC7

Am hiesigen Institut wurden die neuen Cytokimera GIL-6, GIO-6 und GIL-11 mittels strukturbasierten Austausches der *Site* III generiert und auf Ba/F3-Zelllinien, die die entsprechenden Rezeptoren stabil exprimieren, funktionell charakterisiert.

GIL-6 und GIO-6 basieren – analog zu IC7 – auf einem IL-6-*Backbone* mit transferierter *Site* III aus LIF (GIL-6) bzw. OSM (GIO-6). GIL-11 besitzt ein IL-11-Grundgerüst mit einer *Site* III aus LIF. Entsprechend adressieren sie die Rezeptorkomplexe hIL-6R α /hgp130/hLIFR (GIL-6), hIL-6R α /hgp130/hOSMR (GIO-6) und hIL-11R α /hgp130/hLIFR (GIL-11).

GIL-6 und GIO-6 wurden als Fc-, GIL-11 als TwinStrep-Fusionsprotein eingesetzt (IC7Fc, GIL-6Fc, GIO-6Fc, GIL-11Ts folglich synonym mit IC7, GIL-6, GIO-6 und GIL-11 zu bezeichnen). Die biologische Aktivität aller drei Cytokimera wurde in Vorarbeiten auf Ba/F3-Zellen bestätigt.

1.7 Ziele dieser Arbeit

Angeichts der steigenden Prävalenz von T2DM, Adipositas und dem Metabolischen Syndrom besteht Bedarf an gezielt wirksamen Therapeutika, da bisherige Antidiabetika die chronische Meta-Inflammation nicht ursächlich adressieren. Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung neuartiger Designerzytokine (Cytokimera) mit potenziell therapeutischem Nutzen.

Nach der Vorlage des IC7Fc sollen in dieser Arbeit erstmals chimäre Zytokine aus der IL-6- und IL-12-Familie (pIL35 und pIL19, jeweils auch als Fc-Fusionsproteine) generiert, gereinigt und hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität und Bindungskinetik untersucht werden (Stimulations-/Proliferationsassays, Immunpräzipitation, Oberflächenplasmonenresonanz).

Darüber hinaus sollen die bereits etablierte Cytokimera (IC7, GIL-6, GIO-6, GIL-11) auf metabolisch relevanten murinen und humanen Zelllinien (C2C12, Hepa1-6, HepG2) funktionell weiter charakterisiert werden. Die Ergebnisse dienen sowohl der Analyse zellulärer Aktivierungsmuster als auch als Grundlage für weiterführende metabolische *in vitro*-Untersuchungen (z. B. *Seahorse*-Assay) und zukünftige *in vivo*-Studien mit dem Ziel einer therapeutischen Anwendung bei metabolischen und kardiovaskulären Erkrankungen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Verwendete Antibiotika.

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/mL	Agarplatten: 200 µg/mL Flüssigmedium: 100 µg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Hygromycin B	100 mg/mL	2 mg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	10.000 U/mL	60 mg/L	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Puromycin	1 mg/mL	3 µg/mL	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	10 mg/mL	100 mg/L	Genaxxon, Ulm, Deutschland

2.1.2 Antikörper

Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind Tabelle 4 gelistet.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
APC Streptavidin	-	1:100	BD Biosciences, Becton, USA	554067
α -goat IgG POD-konjugiert	Kaninchen	1:2.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	31402
α -human (h) IL12R β 2-biotinyliert	Ziege	1:300	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA	BAF1959
α -hIL-6R α	Maus [361]	1:1.000	AG Scheller	-
α -mouse (m) IgG-POD-konjugiert	Ziege	1:2.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	31432
α -rabbit (r) IgG-POD-konjugiert	Ziege	1:2.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	31462
α -Akt	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	9272
α -HA-Tag	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	3724
α -hIL-12R β 2	Ratte	1:100	BD Biosciences, Becton, USA	550722
α -hIL-23R	Ziege	1:40 für FACS, 1:1.000 für Co-IP	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA	BAF1400

α -mIL-6R (CD126)-PE	Ratte	1:300	BD Biosciences Pharmingen, Becton, USA	554462
α -mIL-6R α	Maus	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	sc-374259
α -mIL-6R α DuoSet ELISA	Ziege	1:1.000	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA	DY1830, Part number: 841966
α -mouse IgG; Alexa Fluor™ 488	Ziege	1:500	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	A.11029
α -Phospho-Akt	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	4060
α -rat IgG; Alexa Fluor™ 647	Ziege	1:100	Dianova	112-607-003
α -goat IgG IRDye 800CW	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland	926-32214
α -mouse IgG IRDye 680RD	Esel	1:10.000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland	926-68072
α -myc-Tag	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	2278
α -Phospho-STAT3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	9145
α -rabbit IgG IRDye 800CW	Ziege	1:10.000	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland	926-32213
α -STAT3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	4904
α -hFc	Ziege	1:1.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	31163
α -STAT3	Maus	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	9139
α -hFc POD-konjugiert	Kaninchen	1:1.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland	31423

2.1.3 Chimäre, Zytokine und Proteine

In Tabelle 5, Tabelle 6 und Tabelle 7 sind die verwendeten Chimären, Zytokine und Proteine zusammengestellt.

Tabelle 5: Verwendete Chimäre.

Chimär	Stammkonzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Herkunft
GIL-11 Ts	170	AG Scheller

GIL-6-Fc	214	AG Scheller
GIO-6-Fc	256	AG Scheller
IC7-Fc	200	AG Scheller
pIL19 (IL-6/p19)	105	In dieser Arbeit generiert
pIL35 (IL-6/p35)	111	In dieser Arbeit generiert

Tabelle 6: Verwendete humane/murine Zytokine.

Zytokin	Stammkonzentration (µg/ml)	Herkunft
Flag_Humanes Hyper-IL-12-Ts	0,5	AG Scheller
Humanes CNTF	10	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA; 257-NT
Humanes Hyper-IL-11-Ts	0,1	AG Scheller
Humanes Hyper-IL-6	5	AG Scheller
Humanes IL-11-Ts	100	AG Scheller
Humanes IL-6	100	Miltenyl Biotec GmbH; 170-076-160
Humanes IL-6-Fc	235	AG Scheller
Humanes LIF	10	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA; 7734-LF
Humanes OSM	10	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA; 295-OM
Murines Hyper-IL-27	315	AG Scheller
Murines OSM-TEV	1026	AG Scheller
TS_Humanes Hyper-IL-23	1710	AG Scheller

Tabelle 7: Verwendete Proteine.

Protein	Stammkonzentration (µg/ml)	Herkunft
Humanes IL-12/IL-23 p40 Monomer	1	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
Humanes Insulin	10.000	AG Ahmadian
Löslicher humaner hIL-6Rα	100	R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
Löslicher humaner hIL-12Rβ2	500	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Löslicher humaner hIL-23P	250	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
Lösliches gp130Fc	100	AG Scheller

2.1.4 Chemikalien

Tabelle 8 zeigt in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien.

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Bovine Serum Albumine (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail Tabletten	Roche, Severin, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue G-250 Dye	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland

dNTP-Mix (25 nM)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Eisessig (Ethansäure)	VWR Chemicals, Randor, USA
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Express DNA Ladder 100-5000 Basenpaare (bp)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Gibco™Opti-MEM™ Serumreduziertes Medium	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Merck, Darmstadt, Deutschland
HD-Green Plus DNA StainR	INTAS, Göttingen
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	VWR International BVBA, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
LB-Medium	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ligase	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na ₂ CO ₃)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitratdihydrat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
NP-40 (Nonident P-40 Detergens)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Duetschland
Orange G/Blue Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deustchland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polybren Transfection Reagent TR-1003-G	Merck Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Polyethylenglycol 4000 (PEG4000)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Polyethylenimin	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Protein-A-Agarose	Roche, Severin, Schweiz
Restriktionsenzyme (HindIII, NdeI, NheI, NotI, PmeI, XbaI, XhoI)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase	Qiagen, Hilden, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Roth, Karsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Sterilium classic pure Händedesinfektionsmittel	Bode Chemie GmbH, Hamburg
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Tris	Bethesda Research Laboratories, New Jersey, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
TriTrack DNA-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, München, Deutschland
Trypsin/EDTA (10x solution)	GENAXXON bioscience
Turbofect Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Tween® 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Zelldissoziationsreagenz Gibco™ StemPro™ Accutase™	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.1.5 Geräte

Alle eingesetzten Geräte sind in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Verwendete Geräte.

Geräte	Hersteller
ÄKTA Start	GE Healthcare, Chicago , USA
Analysewaage KERN EMB 2000	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland
Analysewaage Sartorius	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle, Deutschland
Automatischer Zellzähler TC10 mit CSA Printer Citizen-Systems	Bio-Rad, München, Deutschland
BD FACS Canto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Biacore X 100 mit Sensor Chip Protein-A	Cytiva, Freiburg im Breisgau, Deutschland
Bunsenbrenner	Campingaz, Hungen-Inheiden, Deutschland
CO ₂ -Inkubator HERAccl® 150	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Coomassie-Geldokumentation iPhone 13 Pro	Apple, Cupertino, USA
Dewar-Gefäß	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Digital Monochrom Printer P93DW	Mitsubishi Electric, Senai, Malaysia
Digitalmikroskop BZ-9000	Keyence, Ōsaka, Japan
Drehteller-Rotator	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Dual LED Blue/White Light Transilluminator	Thermo Scientific, St. Leon.Rot, Deutschland
ECL ChemoCam Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Elektrophorese-Spannungsquelle PowerPac Basic	Bio-Rad, München, Deutschland
Etikettendrucker	Dymo, Deutschland
Etikettendrucker BMP51	Brady, Milwaukee, USA
Flexibler Überkopfmischer Digi Mixer	Sunlab Instruments, Mannheim, Deutschland
Flexibler Überkopfmischer Intelli-Mixer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Fluorometer Infinite® M200 PRO	Tecan, Männedorf, Schweiz
Gefrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Gefrierschrank Forma 900	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Geldokumentationssystem Gel Jet Imager	INTAS, Göttingen, Deutschland
Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg Deutschland
Hamilton-Pipette	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Hebelschneidemaschine IDEAL 1058	IDEAL, Balingen, Deutschland
Heizbad	Lauda Dr. Wobser GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
HiTrap MabSelect Prisma Protein-A-Säule	Cytiva, Pasching, Österreich
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Fresco17	Thermo Fisher Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Kulturschüttler Multitron HT	INFORS GmbH, Einsbach, Deutschland
Leuchtplatte	Rex, Blaustein, Deutschland
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instr. GmbH, Schwabach, Deutschland
Mehrkanalpipette mit Pipettierreservoir	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Mikropipetten Research	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Primovert	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland
Mini-PROTEAN Short plates & glass plates	Bio-Rad, München, Deutschland
Minizentrifuge	Axon, Kaiserslautern, Deutschland
Multipipette Mehrfachdispenser-Pipette mit Combitips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop 2000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland

4D-Nucleofector Unit	Lonza, Basel, Schweiz
Orbitalschüttler	Ohaus, Nänikon, Schweiz
PCR Thermozykler peqStar	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Sartorius, Ratingen, Deutschland
Pipettierhelfer	Labsolute, Renningen, Deutschland
Pipettierhelfer Pipetus-Akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Plattformschüttler Titramax 1000	Heidoph-Instruments, Kelheim, Deutschland
QuantStudio 3 Real-Time PCR Instrument	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Rollmischer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Rotilabo-Spritzenfilter, PVDF, steril, Porengröße 0,22µm und 0,45µm	Carl Roth, Karlsruhe Deutschland
SDS-Gel-Preparations-System	Bio-Rad, München, Deutschland
Sterilbank	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Bovenden, Deutschland
Taschenrechner CASIO fx-991DE PLUS	Casio Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland
Thermomixer compact & comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Trans-Blot® Turbo	Bio-Rad, München, Deutschland
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland
Vortexer	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Western Blot Elektrophoresekammer: Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad, München, Deutschland
Western Blot Walze	Thermo Sciences, St. Leon-Rot, Deutschland
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.6 Kits

In Tabelle 10 sind alle Kits aufgeführt, die bei dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 10: Verwendete Kits.

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
BD-FACSDiva CS&T Research Beads	BD Biosciences, Becton, USA
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Dream Taq DNA Polymerase + Dream Taq 10x Buffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Immobilon Western chemilumineszentes HRP-Substrate	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
iTaq™ Universal SYBR green One-Strep Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nucleofector Kit SF Cell Line Solution Box, large Volume	Lonza, Basel, Schweiz
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® RNA	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SignalFire Elite ECL Reagent	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

2.1.7 Kulturmedien

In Tabelle 11 sind die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Medien zur Kultivierung von Bakterien und eukaryotischen Zellen aufgelistet.

Tabelle 11: Auflistung der verwendeten Kultivierungsmedien.

Kulturmedium	Zusammensetzung/Hersteller
C2C12-Differenzierungsmedium	Dulbecco's modified eagle medium, high glucose (4,5 g/L) with stable glutamine; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland + Horse Serum

	+ 1% Penicillin/Streptomycin
DMEM ^{-/-}	Dulbecco's <i>modified eagle medium, high glucose</i> (4,5 g/L) <i>with stable glutamine</i> ; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
HepG2-Medium DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX-I	Dulbecco's <i>modified eagle medium F-12 nutrient mixture (Ham)</i> ; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland +10% FBS +1,1% Penicillin/Streptomycin
DMEM ^{+/+}	Dulbecco's <i>modified eagle medium, high glucose</i> (4,5 g/L) <i>with stable glutamine</i> ; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland + 10% FBS + 1% Penicillin/Streptomycin
Expi293 Expression Medium + GlutaMAX-I	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
FBS (FCS)	<i>Ultra-low IgG fetal bovine serum (fetal calf serum)</i> ; Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Horse Serum	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
Kryokonservierungsmedium für adhärenzte Zellen (C2C12, Hepa1-6, HepG2)	20% FBS, 10% DMSO, 1% Penicillin/Streptomycin,
Kryokonservierungsmedium für Ba/F3-Zellen	90% FBS, 10% DMSO
LB-Agar	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton (10 g/L), 1,5% Agar-Agar
LB-Medium	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton

2.1.8 Oligonukleotide

Zur Klonierung oder Sequenzierung von Plasmid-DNA (pDNA) und Genfragmenten wurden Oligonukleotide extern von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert und sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide zur Sequenzierung und Klonierung von pDNA und Genfragmenten.

Name/Bezeichnung		Sequenz (5'→3')
DF17 (pcDNA3.1)	<i>reverse</i>	5'-AGG CAC AGT CGA GGC TG-3'
DF534 (HA-FP2)	<i>forward</i>	5'-ATT ATG CCG GCT ATC CCT ATG ACG T-3'
DF85 (5'pMOWS)	<i>forward</i>	5'-AGC CCT TTG TAC ACC CTA AGC-3'
DF86 (3'pMOWS)	<i>reverse</i>	5'-AGC AAT AGC ATG ATA CAA AGG-3'
DF87 (pcDNA3.1, T7-Promotor)	<i>forward</i>	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
GAPDH	<i>reverse</i>	5'-ACC ACC CTG TTG CTG TAG CCA A-3'
GAPDH	<i>forward</i>	5'-GTC TCC TCT GAC TTC AAC AGC G-3'
hIL-6R	<i>reverse</i>	5'-ACT TCC TCA CCA AGA GCA CAG C-3'
hIL-6R	<i>forward</i>	5'-GAC TGTGCA CTTGCT GGT GGA T-3'
JE102 (mIL-6Rwt)	<i>forward</i>	5'-CTG GGA CCC GAG TTA CTA CTT -3'
JE103 (mIL-6Rwt)	<i>reverse</i>	5'-CAG CAA CAC CGT GAA CTC CTT T -3'
MyoD	<i>reverse</i>	5'-/CT GTA CTA GGC GGT CTC GT-3'
MyoD	<i>forward</i>	5'-CTT CTA CCC ACC TGG ACC G-3'
Myog	<i>reverse</i>	5'-GTT GCG ACC GAA CTCCAG TG-3'
Myog	<i>forward</i>	5'-CTT GCT CAC CTC CCT CAA CC-3'
PR18 (mLIFR)	<i>forward</i>	5'-ATG CAA ACG GTC TGA AGA GAG-3'
PR19 (mLIFR)	<i>reverse</i>	5'-TGG GTG ACA AGA ATG GAA CCT-3'
PR20 (mOSMR)	<i>forward</i>	5'-GGG AAC CTG GGG TAG ATA CGA -3'
PR21 (mOSMR)	<i>reverse</i>	5'- GCC TTT GGA TGA ACT CTA TGG G-3'
PR26 (mIL-11R)	<i>forward</i>	5'- CTC TTG CCA AGC GGT AGA CTA-3'
PR27 (mIL-11R)	<i>reverse</i>	5'- GGA TGG ACT TTC CCT CTG ACT C-3'
β-Actin	<i>reverse</i>	5'-CGC TCA GGA GGA GCA ATG-3'
β-Actin	<i>forward</i>	5'-TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA-3'

2.1.9 Plasmide

Nachfolgend sind die während dieser Arbeit verwendeten Plasmide im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten und klonierten Plasmide.

Name	Referenz	Resistenz
pMOWS_hygroMCS hIL-6R wt_3xHA	AG Scheller	Ampicillin, Hygromycin
pMOWS_puro_hIL-6Rwt_3xHA	AG Scheller	Ampicillin, Puromycin
p409-hIL-12R β 2	AG Scheller	Ampicillin
p409-hIL-23R-P310	AG Scheller	Ampicillin
pEGFP	AG Scheller	Kanamycin
pMOWS_puro_GFP	AG Scheller	Ampicillin, Puromycin
pcDNA3.1_hIL-6Rwt_3xHA	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1_3xHA_hIL-6Rwt	AG Scheller	Ampicillin
pcDNA3.1 Signalpeptid_myc_IL6/p35_Fc (pIL35)	In dieser Arbeit generiert aus pcDNA3.1 mit IL6/p19 von GeneUniversal, Newark, USA	Ampicillin
pcDNA3.1 Signalpeptid_myc_IL6/p19_Fc (pIL19)	In dieser Arbeit generiert aus pcDNA3.1 mit IL6/p35 von GeneUniversal, Newark, USA	Ampicillin

2.1.10 Puffer und Lösungen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Puffer sind aus Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Verwendete Puffer und Lösungen.

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
10% APS	5g Ammoniumperoxidsulfat (APS) auf 50 mL <i>Aqua dest.</i>
10x Standard Restriktionspuffer (rot, orange, tango)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
10x T4 DNA Ligasepuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
5x Lämmli-Puffer	20% SDS 50% Glycerol 1 M Tris-HCl, pH 8,8 5% β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
6x Lämmli SDS-PAGE Probenpuffer	375 mM Tris-HCl, pH 6,8 9% SDS 50% Glycerol 9% β -Mercaptoethanol 0,03% Bromphenolblau
Blockierlösung 5% Magermilchpulver in TBS-T	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Blockierlösung Intercept TBS	LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland
BSA-Lösung 5% BSA in TBS-T	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citratpuffer pH 3,3	8,35 mM Natriumcitratdihydrat 41,65 mM Zitronensäure
Citratpuffer pH 5,5	35,17 mM Natriumcitratdihydrat 14,83 mM Zitronensäure
Coomassie-Entfärbelösung	35% Ethanol 10% Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	35% Ethanol 10% Essigsäure 0,3% Coomassie <i>Brilliant Blue</i> G250
Ethanol (70%, 96%, 99,9%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
FACS-Puffer	1% BSA in PBS

IP-Lysis Puffer	±20 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA 150 mM NaCl 1 mM Na ₃ VO ₄ 10 mM NaF 1 mM PMSF 0,5% NP-40 cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail Tablette (1 Tablette für 50 mL Puffer)
JAK-Lysis Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,5% NP-40 1 mM NaCO ₃ 10 mM MgCl ₂ cOmplete, EDTA-free protease inhibitor cocktail Tablette (1 Tablette für 50 mL Puffer)
Orange G Ladepuffer	30% Glycerol 50 mM EDTA 0,25% Orange G
Phosphat Buffered Saline (PBS)	1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ 137 mM NaCl, pH 7,4
SDS-PAGE Running Buffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Solution 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
Solution 2 (S2) für DNA-Minipräparation	200 mM NaOH 1% SDS
Solution 3 (S3) für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat 11,5% Essigsäure
TAE-Puffer	400 mM Tris-HCl, pH 8,8 10 mM EDTA 200 mM Essigsäure
TBS-T	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1% Tween20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% SDS 5% Methanol
Tris Buffered Saline (TBS)	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
Trypsin/EDTA-Lösung	1:10 Trypsin/EDTA (10x) in PBS

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Eine Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien ist in Tabelle 15 gezeigt.

Tabelle 15: Liste der benutzten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheit	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
<i>BCA-96-Well Microplate, PS, F-Bottom, Non-Binding</i>	Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
Einmalspritze Omnifix Luer Lock Solo 10 mL	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalspritze Omnifix Luer Lock Solo 20 mL	B.Braun, Melsungen, Deutschland
Falcon Reaktionsgefäße (15 mL und 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
<i>Microtubes</i> (1,5 mL und 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NAP-25-Säule	GE Healthcare, Chicago, USA).
Nitrilhandschuhe	Ansell, München, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Cytiva, Pasching, Österreich
PCR Kappen Gr. 125	StarLab, Hamburg, Deutschland
PCR Tubes 0,2 mL	StarLab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PVDF-Transfermembran	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>Real-Time-PCR 96-Well Platte: MicroAmp Endura Plate Optical 96-Well Clear Reaction Plate applied biosystems</i>	Life technologies, Singapore
<i>Real-Time-PCR-Folie für die 96-Well-Platte: StarSeal Sealing Tape Polyolefin Film 100</i>	Starlab, Hamburg, Deutschland
T75 Flaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Zellkulturschale 10 cm ² (adhärente Zellen)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
TC-Zellkulturschale 6-well	TPP, Trasadingen, Schweiz
TC-Zellkulturschale 96-well	TPP, Trasadingen, Schweiz
Whatman-Papier	VWR, Randor, USA
Zellkulturschale 10 cm ² (Suspensionszellen und Bakterien)	Greiner bio-one, Solingen, Deutschland
Zellkulturschale 6-Well	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschale 96-Well	CytoOne, Hamburg, Deutschland
Zellzählkammer Dual-Chamber Cell Counting Slide	Bio-Rad, München, Deutschland

2.1.12 Zelllinien und Bakterienstämme

Zur Klonierung und Amplifikation von pDNA wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (E. coli) XL1-Blue verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland). Die verwendeten eukaryotischen Zellen sind im Folgenden in Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: Liste der verwendeten eukaryotischen Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Zellart	Hersteller
Ba/F3 gp130	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen	Immunex, Seattle, USA
Ba/F3 gp130, hIL-12Rβ1	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen, die hIL-6 -abhängig proliferieren	AG Scheller [331]

Ba/F3 gp130, hIL-12R β 2	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen, die hIL-6 -abhängig proliferieren	AG Scheller
Ba/F3 gp130, hIL-12R β 2, hIL-6R	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen, die hIL-6 -abhängig proliferieren	In dieser Arbeit generiert
Ba/F3 gp130, hIL-23R	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen, die hIL-6 -abhängig proliferieren	AG Scheller
Ba/F3 gp130, hIL-23R, hIL-6R	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen, die hIL-6 -abhängig proliferieren	In dieser Arbeit generiert
Ba/F3 gp130, hLIFR, hCNTFR	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen, die hIL-6 -abhängig proliferieren	AG Scheller
C2C12	Murine Myoblasten	Adhärente Zellen	DSMZ ACC 565, Braunschweig, Deutschland
Expi293	Humane embryonale Nierenzelle	Suspensionszellen	Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelle	Adhärente Zellen	DSMZ ACC 635, Braunschweig, Deutschland
Hepa1-6	Murine Hepatoma	Adhärente Zellen	DSMZ ACC 175, Braunschweig, Deutschland
Hepa1-6 (IL-6R)	Murine Hepatoma	Adhärente Zellen	In dieser Arbeit generiert
HepG2	Humane Hepatoma/ Hepatoblastoma Zellen	Adhärente Zellen	DSMZ ACC 180, Braunschweig, Deutschland
Phönix-Eco	Humane embryonale Nierenzelle	Adhärente Zellen	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg, Deutschland
Primäre murine Hepatozyten IL-6R-K.O.	Maus	Primär isolierte Hepatozyten	McFarland-Mancini <i>et al.</i> [362]
Primäre murine Hepatozyten Wildtyp	Maus	Primär isolierte Hepatozyten	C57BL/6N

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese wurde Desoxyribonukleinsäure (DNA) hinsichtlich ihrer Größe analysiert. Hierbei werden negativ geladene DNA-Moleküle im 1%igen Agarosegel nach Anlegung der elektrischen Spannung entsprechend ihrer Moleküllänge voneinander getrennt: Kleine Fragmente wandern schneller zur Anode als große Fragmente. Das Agarosegel wirkt hier als molekulares Sieb. Sichtbar gemacht werden die größenspezifisch getrennten DNA-Fragmente durch 0,0002%-iges HD-Green. HD-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher mit der DNA interkaliert und diese somit unter UV- oder auch LED-Bestrahlung sichtbar macht. Das entstandene Bandenmuster wurde mittels eines Geldokumentationssystems (INTAS, Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

2.2.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die in der Agarosegelelektrophorese getrennten DNA-Fragmente wurden auf dem UV-Tisch bei 365 nm sichtbar gemacht. Das Gelstück mit der Bande, welche das gewünschte DNA-Fragment enthält, wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein 2 mL Microtube überführt. Die Isolation der DNA aus dem Gel erfolgte gemäß der Herstellerangaben mittels NucleoSpin® -Gel and PCR Clean-up Kit.

2.2.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäure und Proteinen

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren und Proteinen wurde mittels NanoDrop 2000 spektroskopisch bestimmt. Die Konzentration von DNA und RNA wurde bei 260 nm gemessen, die Reinheit über das Absorptionsverhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ bestimmt. Der Quotient soll für DNA bei 1,8 und für RNA bei 2,0 liegen. Niedrigere Werte deuten auf eine Kontamination hin. Die Konzentrationsmessung von Proteinen erfolgt bei 280 nm. Bei dieser Wellenlänge haben aromatische Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin ihr Absorptionsmaximum. Da der Anteil aromatischer Aminosäuren in Proteinen variabel ist, wurde das Lambert-Beer-Gesetz zur Konzentrationsbestimmung herangezogen: Der Extinktionskoeffizient ϵ berücksichtigt die in einem Protein enthaltene Anzahl aromatischer Aminosäuren:

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

2.2.1.4 Restriktionsspaltung von DNA

Die Restriktionsspaltung wurde zur Sequenzkontrolle neu generierter Plasmid DNA (pDNA) und zum Herausschneiden des Inserts für eine anschließende Subklonierung herangezogen. Die verwendeten Restriktionsenzyme stammten von der Firma Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot, Deutschland). Nach Spaltung von Phosphodiesterbindungen der doppelsträngigen DNA an enzymespezifischen palindromischen Sequenzen können glatte (*blunt*) oder überhängende (*sticky*) DNA-Enden (*ends*) entstehen. Für die Spaltung von 10 µg Plasmid-DNA wurden 10 U des Restriktionsenzym im vom Hersteller empfohlenen 10-fach Puffer bei einem Gesamtvolumen von 50 µL für mindestens 2 Stunden oder auch über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei der simultanen Verwendung zweier Restriktionsenzyme in einem Ansatz wurde, die Kompatibilität im selben Puffer mithilfe der Herstellerangaben überprüft. Zwecks der Sequenzkontrolle neu generierter Plasmid-DNA werden Reaktionsansätze von 4 µg DNA, zwecks des Herausschneiden von Inserts für anschließende Klonierungen 30 µg DNA, verwendet. Gestoppt wurde die Reaktion im Gesamtvolumen von 50 µL durch Zugabe von 12,5 µL Orange G Ladepuffer bzw. 10 µL TriTrack DNA-Ladefarbstoff (6x). Die Analyse erfolgte anschließend durch Agarosegelelektrophorese.

2.2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Durch die Ligation wird das zuvor bei der Restriktionsspaltung herausgeschnittene Insert in einen linearisierten, offenen Vektor eingebracht, so dass eine neue zirkuläre, doppelsträngige DNA entsteht. Dies geschieht unter Neubildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-Hydroxygruppe und dem 5'-Phosphat an den *sticky ends* der zu ligierenden DNA-Fragmente. Um die korrekte Ligation überlappender *sticky ends* mitzugewährleisten, müssen Insert und Vektor Restriktionsenden besitzen, die komplementäre überhängende Sequenzen aufweisen, was mit der Auswahl entsprechender Restriktionsenzyme reguliert werden kann. Das molare Verhältnis von Insert zu Vektor betrug 5:1. In einem Gesamtvolumen von 20 µL wurden standardgemäß 100 ng Vektor, 2 µL T4-Ligase, 2 µL Ligase-Puffer und 2 µL Polyethylenglycol (PEG4000) (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) angesetzt. Die Inkubation erfolgt anschließend über 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C.

2.2.1.6 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *Escherichia. coli* Bakterien

Die Einbringung (Transformation) von Plasmiden in chemisch kompetente *E. coli* XL-1 Blue Bakterien erfolgt zur Vermehrung von DNA. Verfügbar waren die o.g. Bakterien in 30 µL-Aliquots, gelagert bei minus (-) 80°C. Nach dem fünfminütigen Auftauen auf Eis, wurden die *E.coli* XL-1 Blue mit 1 µL 1:10 verdünnter pDNA oder 10 µL Ligationsansatz versetzt. Dieser Transformationsansatz inkubierte weitere fünf Minuten auf Eis bevor dann der Hitzeschock (50 Sekunden bei 42°C) erfolgte; anschließend erneute fünfminütige Inkubation auf Eis. Der Bakteriensuspension wurden 500 µL antibiotikafreies LB-Medium zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen für 50 bis 60 Minuten bei 37°C und 850 rpm regeneriert. Die gesamte Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten mit Ampicillinresistenz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur weiteren Vermehrung der mit der pDNA transformierten *E.coli* XL-1 Blue mit anschließender pDNA-Sequenzkontrolle zur Überprüfung der zuvor erfolgten Subklonierung und Ligation wurde jeweils ein Klon von der Agarplatte entnommen und je in einem Microtube mit 2 mL LB-Medium mit 0,1% Ampicillin über Nacht bei 37°C, 800 rpm inkubiert. Zur Kontrolle der transformierten pDNA wurde die pDNA mittels Mini-Präparation isoliert. Hierfür werden 1900 µL der trüben Bakteriensuspension für 30 Sekunden bei Raumtemperatur (20.000xg) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µL kalter S1-Lösung resuspendiert. Es erfolgte die alkalische Lyse durch Zugabe von 200 µL S2-Lösung, welche durch die Zugabe von 200 µL kalter S3-Lösung und mehrmaligem Invertieren gestoppt wurde. Anschließend wird für zehn Minuten bei 4°C 20.000xg zentrifugiert. Die Denaturierung der zellulären Proteine, welche als Pellet ausfallen, wird durch das in der S3-Lösung enthaltene Kaliumacetat gewährleistet. Nach Überführung des DNA-haltigen Überstandes und Zugabe von 500 µL kaltem Isopropanol wurde bei 4°C 20.000xg für 15 min zentrifugiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 500 µL 70%igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4°C 20.000xg zentrifugiert. Zum Trocknen des entstandenen DNA-Pellets wurde das Ethanol herauspipettiert, der verbleibende Alkohol verdampft bei der anschließenden Trocknung auf dem Thermoshaker (37°C, 10 min). Für die folgende DNA-Konzentrationsmessung am NanoDrop 2000 (s.o.) erfolgt eine Resuspension des getrockneten Pellets in 50 µL destilliertem Wasser (ddH_2O).

2.2.1.8 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Eine Midi-Präparation wurde durchgeführt, um größere Mengen pDNA zu isolieren; vorausgesetzt ist die Bestätigung des Vorliegens der korrekten DNA-Sequenz. Hierfür wurden 100 ml LB-Medium (0,1% Ampicillin) mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Im Anschluss wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4.000xg, 20 min, 4°C) pelletiert und die pDNA aus dem Pellet mithilfe des NucleoBond Xtra Midi Kits gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die isolierte pDNA wurde in 200 µL ddH_2O gelöst und die Konzentration gemessen.

2.2.1.9 RNA-Isolation

Die RNA-Isolation für eine anschließende *Real-Time Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) bzw. quantitative PCR (qPCR) erfolgte mittels NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren), entsprechend der Herstellerangaben. Hierzu wurden C2C12-Zellen, die zuvor in verschiedene Stadien differenzierten, sowie Hepa1-6-Zellen, die zum Teil zuvor retroviral transduziert wurden (IL-6R) sowie als Kontrolle primäre murine Hepatozyten (Wildtyp und IL-6R-K.O.) verwendet. Alle Zellen wurden vor der RNA-Isolation in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach der Elution in 40 µl ddH₂O wurde die RNA-Konzentration am NanoDrop 2000 gemessen. Eine Lagerung bei -80°C der isolierten RNA erfolgte bis zur Analyse.

2.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

ColonyPCR (cPCR):

Die Amplifikation ausgewählter Abschnitte einer pDNA erfolgte über eine PCR. Die cPCR erfolgte zur Kontrolle der richtigen Orientierung des Inserts im neuen Vektor nach Subklonierung. Hierzu wurden zwei Primer verwendet: Ein Primer, der im Vektor hybridisiert und den Startpunkt der Amplifikation in Richtung und bis in das Insert hinein darstellt; ein anderer Primer, der im Insert hybridisiert und den Ausgangspunkt der richtungsbezogen entgegengesetzten Amplifikation vom Insert in den Vektor hinein darstellt. Für die Reaktion wurden neben den Primern (sequenzspezifische Oligonukleotide) und der Ausgangs-pDNA (Template) eine thermostabile DNA-Polymerase, Polymerase-Puffer und freie Desoxynukleotide (dNTP) in einem Ansatz zusammengegeben. Bei der cPCR fungiert die in der Bakterienkolonie enthaltene pDNA als Template.

cPCR zur Amplifikation von DNA-Fragmenten:

Eine Bakterienkolonie wurde von der Agarplatte in ein Microtube überführt und in 20 µl ddH₂O suspendiert. 5 µl der Bakteriensuspension wurden für den folgenden PCR-Ansatz verwendet:

Tabelle 17: Reaktionsansatz 20 µL einer PCR mit dem DreamTaq Green PCR Master Mix (2x).

Komponente	Volumen
DreamTaq Green PCR Master Mix (2x)	10 µL
Forward Primer (0,2 µM)	1 µL
Reverse Primer (0,2 µM)	1 µL
ddH ₂ O	Ad 20 µL

Alternativ wurde folgender 50 µL-Ansatz (20 µL Bakteriensuspension + 30 µL Master Mix) verwendet (Tabelle 18):

Tabelle 18: Reaktionsansatz 50 µL einer PCR mit eigens hergestelltem Master Mix (30 µL).

Komponente	Volumen
DreamTaq Puffer (10x)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 µL
Forward Primer (100 pmol/µL)	0,25 µL
Reverse Primer (100 pmol/µL)	0,25 µL
dNTPs (10 mM)	1 µL
DreamTaq-Polymerase (5 U/µL)	0,2 µL
ddH ₂ O	19,3 µL

Die Reaktion wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt (Tabelle 19):

Tabelle 19: PCR-Programm zur Amplifikation bestimmter DNA-Regionen.

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	60 Sekunden (s)	
Denaturierung	95°C	30 s bei DreamTaqGreen PCR Master Mix 60 s bei DreamTaq Master Mix	30 Zyklen
Annealing	54°-60°C	Primer-spezifisch	

Elongation	72°C	60 s pro kb
Finale Elongation	72°C	5 min
Kühlung	4°C	∞

Die Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte anschließend über Agarosegelelektrophorese und verifiziert die korrekte Orientierung des Inserts nach Subklonierung in einen neuen Vektor.

2.2.1.11 Quantitative Real-Time PCR (RT-PCR/qPCR)

Mithilfe der qPCR lassen sich Rückschlüsse auf das Genexpressionsniveau ziehen.

Bei der qPCR wurde die nach der Isolation bei 80°C gelagerte RNA (Template), unter Einsatz entsprechender *Forward*- und *Reverse*-Primer sowie der Reversen Transkriptase (iTaQ™ Universal SYBR green One-Step Kit, Bio-Rad, München, Deutschland), in doppelsträngige *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese fungiert dann als *single-stranded* (ss) DNA wieder als Vorlage für die PCR. Somit steigt die Produktmenge während der qPCR exponentiell. Die hier entstehende Amplifikatmenge einer ausgewählten Ausgang-RNA wurde in Relation zu der Amplifikatmenge der mRNA von sogenannten *House-Keeping*-Genen gesetzt. Die mRNA-Menge von House-Keeping-Genes ist nicht-fluktuierend und nicht (in)aktivierbar. Die qPCR setzt die Transkriptionsproduktmenge von House-Keeping-Genes vs. aktivierbare Gene ins Verhältnis. Die fluoreszenz-basierte Messung erfolgt in Echtzeit. Der im iTaQ™ Universal SYBR green One-Step Kit (Bio-Rad, München, Deutschland) enthaltene Fluoreszenzfarbstoff interkaliert mit der kleinen Furche der cDNA, proportional zu ihrer gebildeten Menge, und wird durch das QuantStudio 3 Real-Time PCR Instrument (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) gemessen.

In Tabelle 20 wird der Reaktionsansatz dargestellt.

Tabelle 20: Reaktionsansatz Master Mix 10 µL einer qPCR mit iTaq™ Universal SYBR green One-Step Kit.

Komponente	Volumen
Puffer	5 µL
<i>Forward</i> Primer	0,125 µL
<i>Reverse</i> Primer	0,125 µL
Reverse Transkriptase	0,125 µL
ddH ₂ O (RNase-frei)	2,625 µL

Pro Well: 2 µL RNA-Template/House-Keeping-Gene-RNA + 8 µL des Master Mixe (Σ10 µL).

Es wurden Duplikate in die Real-Time-PCR 96-Well Platte (MicroAmp EnduraPlate Optical 96-Well Clear Reaction Plate applied biosystems, Life technologies, Singapore) pipettiert. Die Platte wurde mit einer Folie abgedichtet und mittels QuantStudio 3 Real-Time PCR Instrument gemessen (Sealing Tape Polyolefin Film 100, Starlab, Hamburg, Deutschland).

Das Standard-qPCR-Programm ist in Tabelle 21 dargestellt:

Tabelle 21: qPCR-Programm, Probenvolumen Σ10 µL.

Schritt	Temperatur	Zeit	
cDNA Synthese	50°C	10 min	
Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 s	40 Zyklen
Annealing + Elongation	60°C	1 min	

Berechnung der relativen Transkriptmenge:

Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden mit der Software QuantStudio™ (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Germany) ausgewertet. Der Cycle-Threshold(CT)-Wert bezeichnet die PCR-Zyklusanzahl, bei der erstmalig ein Transkriptionsprodukt nachgewiesen werden kann. Je niedriger der CT-Wert ist, desto schneller (früher Zyklus) ist eine nachweisbare Transkriptionsproduktmenge in der qPCR entstanden. Das bedeutet wiederum, dass eine höhere Menge an amplifizierbarer Template-mRNA in der Probe war. Eine hohe Menge an mRNA eines bestimmten *Gen's of interest* spricht für eine Genaktivierung.

Der CT-Wert wird stets im Verhältnis zum CT-Wert des *House-Keeping-Genes* (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder β -Actin) betrachtet. Der Δ CT-Wert wird wie folgt berechnet:

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

Der CT-Wert ist unempfindlicher gegenüber Schwankungen hinsichtlich der eingesetzten Transkriptmengen und ermöglicht somit Vergleiche zwischen verschiedenen Zellen.

Ein Problem der Fluoreszenz-basierten Messung ist, dass keine DNA-spezifische Interkalierung des Farbstoffes berechnet werden kann. Um die Amplifikation eines spezifischen RNA-Fragmentes zu analysieren, wird die Schmelzkurve herangezogen.

Schmelzkurve:

Die Schmelzkurvenanalyse erfolgt immer nach Ablauf des eigentlichen qPCR-Programms.

Hierbei werden die hybridisierten Transkriptionsprodukte noch einmal langsam kontinuierlich erwärmt (0,2°C/s), so dass die dsDNA in ssDNA dissoziiert. Diese Dissoziation wird in der Schmelzkurve visualisiert („Schmelzen“, Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren). Der Schmelzpunkt (Vorhandensein von 50% ds- und 50% ssDNA) ist von der spezifischen Länge und dem spezifischen Basengehalt des DNA-Fragmentes abhängig. Je mehr Wasserstoffbrücken „geschmolzen“ werden müssen, desto höher liegt die Temperatur des Schmelzpunktes (lange DNA-Fragmente und Guanin-Cytosin-reiche DNA-Fragmente; Guanin und Cytosin bilden drei Wasserstoffbrücken aus, Adenin und Thymin bilden nur zwei Wasserstoffbrücken aus). Bei der temperatur- und fragmentlängenabhängigen Dissoziation wird also wieder ein spezifischer Anteil des zuvor in der kleinen DNA-Furche interkalierten SYBR Green Fluoreszenzfarbstoffes frei. Durch die Menge des freigewordenen Farbstoffes lassen sich Rückschlüsse auf die Länge und Basenzusammensetzung des nun dissoziierten DNA-Fragmentes ziehen; dem Problem aus dem vorherigen Abschnitt wird also begegnet. Des Weiteren ist eine Aussage über eine ggf. fehlerhafte Transkription mit konsekutiv falscher Basenpaarung, welche in einer dsDNA-Instabilität und damit erleichterter Dissoziation mündet, möglich. Außerdem kann die Primerqualität anhand der Schmelzkurve bewertet werden: Unspezifisch entstehende Primerdimere haben einen besonders niedrigen Schmelzpunkt. Die Darstellung der Schmelzkurve erfolgt wie folgt: Fluoreszenzsignal (y-Achse) gegen Temperatur (x-Achse). Die Schmelzkurven-Peaks sind charakteristisch für das jeweilige qPCR-Produkt. Tauchen in der für ein DNA-Fragment spezifischen Darstellung mehr als ein Peak auf, spricht dies für eine „unreine“ Amplifikation von mehr als einem einzigen DNA-Fragmentes mit demselben Primer. Der Primer ist also weniger spezifisch.

2.2.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

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

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Gewinnung von Zellpellets und Herstellung von Zelllysaten

Suspensionszellen (Ba/F3-Zellen):

Die Zellsuspension wurde in einem Falcon zentrifugiert (450xg, 5 min, RT). Das DMEM+/+ Medium im Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit *Phosphat Buffered Saline* (PBS) zweimal gewaschen (Resuspension, Zentrifugation, Überstand absaugen), im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Lyse bei -20°C gelagert.

Adhärente Zellen:

Das Kultivierungsmedium wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS einmal gewaschen (PBS-Zugabe, Schwenken, Absaugen) und anschließend mit 1 mL warmer Trypsin/EDTA-Lösung bei 37°C im CO₂-Inkubator HERAcell® 150 (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) inkubiert. Die Inkubationszeiten können in der folgenden Tabelle 22 entnommen werden:

Tabelle 22: Inkubationszeiten von Trypsin/EDTA bei 37°C im CO₂-Inkubator auf verschiedene adhärenzte Zelllinien.

Zelllinie	Inkubationszeit
Undifferenzierte C2C12	8 min
Differenzierte C2C12 (>5 Tage)	12 min
Hepa1-6 (±IL-6R)	3 min
HepG2	10 min

Die gelösten Zellen wurden in 9 mL PBS (Σ10 mL) gewaschen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur Zelllyse gelagert. Zur Zelllyse wurde das Pellet in JAK-Lysispuffer (120 – 200 µL) resuspendiert und für mindestens 1 h im Drehteller-Rotator (Neolab, Heidelberg, Deutschland) bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (15.000xg, 10 min, 4°C) und Überführung des proteinhaltigen Überstandes in ein neues Microtube für die nachfolgende Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA).

Das Volumen des verwendeten JAK-Lysispuffer ist der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 23: Volumen des JAK-Lysispuffers für verschiedene Zelllinien.

Zelllinie	Volumen
Ba/F3	120 µL
Undifferenzierte C2C12	150 µL
Differenzierte C2C12 (>5 Tage)	200 µL
Hepa1-6 (±IL-6Rneu)	200 µL
HepG2	150 µL

Die zellspezifischen Volumina richten sich nach der Zell- und Pelletgröße.

Die Zellpellet und -lysatgewinnung von HEK293T-Zellen ist abweichend und wird im Rahmen der Co-Immunpräzipitation (vgl. 2.2.3.11) erläutert.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde entsprechend der Herstellerangaben mithilfe des BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) bestimmt. Es wurde eine 1:10-Verdünnung der Lysatüberstände angesetzt und zu der Kit-Lösung A und B zugesetzt. Hierbei wird das in den Lösungen enthaltene Cu²⁺ durch eine Redoxreaktion mit den Probenproteinen zu Cu⁺ reduziert. Das entstandene Kation Cu⁺ fungiert als Lewis-Säure, so dass Koordinationsbindungen vom Komplexbildner Bicinchoninsäure (BCA) ausgehen. Ein Chromophor mit Absorptionsmaximum bei 562 nm (violette Farbe) entsteht. Die BCA/Cu⁺-Komplexbildung ist proportional zur Proteinkonzentration. Die photometrische Messung erfolgt in Duplikaten in einer 96-Well-Platte am Fluorometer Infinite® M200 PRO (Tecan, Männedorf, Schweiz) und wurde in Relation zu einer BSA-Standardgeraden gesetzt. Ziel war die Einstellung einer Proteinkonzentration von 2,5 µg/µL.

2.2.2.3 Sodiumdodecylsulphate-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE wurden Proteine nach Anlegung einer elektrischen Spannung ihrer Länge (Molekulargewicht) nach voneinander getrennt, um im Folgenden durch Western Blotting analysiert zu werden.

Die Denaturierung und Reduktion von Disulfidbrücken durch β-Mercaptoethanol zur Linearisierung erfolgt durch kurzes Kochen im 6-fach Lämmli-Puffer (95°C, 10 min). Des Weiteren verleiht das im 6-fach Lämmli-Puffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) den linearisierten Proteinen eine negative Ladung.

Die Proben wurden auf ein 10%-iges Polyacrylamidgel (Stärke 1,5 mm) nach Tabelle 24 aufgetragen.

Tabelle 24: Auftragsschemata SDS-Page.

Probe	(6x) Lämmli-Volumen für $\Sigma 100$ μL Probenvolumen	Proteinkonzentration	Gesamtproteingehalt	Auftragsvolumen
Zellysate	16,8 μL	2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	50 μg	20 μL
Zellkultur-überstände	1/5	variabel	variabel	45 μL

Nach Anlegung einer elektrischen Spannung (90 Volt für 15 min + 160 Volt für 45 min) wandern die linearisierten, negativ geladenen kleinen Proteine schneller in Richtung Anode. Das ebenfalls im Laufpuffer enthaltene SDS garantiert die negative Ladung der wandernden Proteine. Als Referenz für die Molekulargröße in kDa wurde 1,3 μL PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) in die erste Tasche des Gels aufgetragen.

2.2.2.4 Western Blot

Western Blotting dient der spezifischen Detektion eines Protein.

Die zuvor in der SDS-PAGE voneinander getrennten Proteine wurden mittels des semi-dry-Systems (Trans-Blot® Turbo, Bio-Rad, München, Deutschland) transferiert. Durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen der Proteine erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose (NC) oder Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran. Die Membranen wurden im semi-dry-Transfer-System auf und unter 3-4 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatmann-Papier gelegt. Abhängig von der gewählten Membran und dem gewählten Geldokumentationssystem, wurde unterschiedlich vorangegangen (vgl. Tabelle 25). Die PVDF-Membran wurde zuvor zur Aktivierung zwei min in Methanol, die NC-Membran zur Äquilibration eine min in Transferpuffer gelegt.

Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte durch die vertikale Spannung im Trans-Blot® Turbo-System bei konstanter Spannung von 25 V und konstanter Stromstärke von 1 A. Die Membran wurde in eine Blockierlösung, um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, bei Raumtemperatur inkubiert. Die Primärantikörperlösung wurde nach Herstellerangaben über Nacht bei 4°C unter Rotation angesetzt. Die Membran wurde dreimal mit TBS-T für 10 min gewaschen und anschließend mit einer Sekundärantikörperlösung versetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran dreimal mit TBS-T gewaschen und zuletzt mit 10 mL TBS bis zur Detektion des Blots gelagert.

Tabelle 25: Transferprogramme, Blockierlösungen und -zeiten, Primärantikörperlösungen und Sekundärantikörper (-lösungen und -inkubationszeiten) sind abhängig von der gewählten Membran und dem gewählten Geldokumentationssystem.

Membran	PVDF	NC	NC
Geldokumentation	Chemilumineszenz -INTAS	Chemilumineszenz -LI-COR	Fluoreszenz -LI-COR
Semi-Dry Transfer	1 h	1 h	30 min
Blockierlösung	Milch-TBS-T*	Milch-TBS-T*	LI-COR-Puffer**
Blockierungsdauer	3 h	2 h	1 h
3x Waschen TBS-T nach dem Blockieren	ja	ja	nein
Primärantikörperlösung	Σ ca. 3 mL: • 3 mL BSA-TBS-T*** • 3 μL Primärantikörper	Σ ca. 2 mL: • 1330 μL TBS • 665 μL Intercept TBS (LI-COR)	Σ ca. 2 mL: • 1330 μL TBS • 665 μL Intercept TBS (LI-COR)

	****	• 2 µL Primärantikörper (1:1000) • 4 µL Tween20 (0,02%)	• 2 µL Primärantikörper (1:1000) • 4 µL Tween20 (0,02%)
Inkubationszeit des Primärantikörpers	Über Nacht	Über Nacht	Über Nacht
3x Waschen TBS-T nach der Inkubation des Primärantikörpers	ja	ja	ja
Sekundärantikörperlösung	Σca. 5 mL • 5 mL Milch-TBS-T* • 2,5 µL POD konjugierter Sekundärantikörper (1:2000) (<i>α-rabbit-IgG/α-mouse-IgG/α-goat-IgG/α-hFc</i>)	Σca. 5 mL • 5 mL Milch-TBS-T* • 2,5 µL POD konjugierter Sekundärantikörper (1:2000) (<i>α-rabbit-IgG/α-mouse-IgG</i>)	Σ3 mL • 2 mL TBS • 1 mL Intercept TBS (LI-COR) • 0,3 µL Sekundärantikörper-fluoreszenzgekoppelt (1:10 000) • 6 µL Tween20
Inkubationszeit des Sekundärantikörpers	2 h	2 h	1 h
3x Waschen mit TBS-T nach Inkubation des Sekundärantikörpers, zuletzt Zugabe von TBS	ja	ja	ja

*Milch-TBS-T: 5% Magermilchpulver in TBS-T (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

**LI-COR-Puffer: 2 mL TBS + 1 mL Intercept TBS (LI-COR Biosciences GmbH, Bad Homburg, Deutschland)

***BSA-Lösung 5% BSA in TBS-T (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

*****Ausnahme:* Der Primärantikörper α -hIL12R β 2 biotinyliert (R&D Systems GmbH, Minneapolis) wird folgendermaßen dosiert: 10 µL in 3 mL BSA-TBS-T

2.2.2.5 Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen diente zur Untersuchung der Proteinreinheit. Die in dieser Arbeit exprimierten Designerzytokine (pIL35 und pIL19) wurden einer Reinigung (Protein-A-Affinitätschromatografie) unterzogen, danach mittels SDS-PAGE ihrer molekularen Größe nach voneinander getrennt und durch die Coomassie Färbung auf dem Gel visualisiert. Das Coomassie G250 bindet hierbei an die basischen Aminosäuren des im Gel linearisierten Proteins. Hierzu wurde das Polyacrylamidgel in die Färbelösung eingelegt, in die Mikrowelle gegeben (30 Sekunden, 900 Watt) und für 15 Minuten bei Raumtemperatur leicht schüttelnd inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Entfärbung in iterativen Zyklen, um nicht-interkalierte Coomassie-G-250-Farbstoffmoleküle aus dem Gel zu entfernen. Dabei wurde das Gel in der Entfärbelösung bei 900 Watt für 30 min entfärbt. Das gewaschene Gel wurde auf einer Leuchtplatte (Rex, Blaustein, Deutschland) dokumentiert (iPhone 13Pro, Apple, Cupertino, USA).

2.2.2.6 Protein-A-Affinitätschromatografie

Die Zellkulturüberstände von Expi293-Zellen mit sekretiertem Fc-Tag versehenen Proteinen (pIL35 und pIL19) wurden über eine Affinitätschromatografie mittels Protein-A gereinigt. Protein A, welches ursprünglich aus der Zellwand des Bakteriums *Staphylococcus aureus* stammt, bindet spezifisch den Fc-Teil von IgG-Antikörpern pH-abhängig. Die HiTrap MabSelect Prisma Protein-A-Säule (Cytiva, Pasching, Österreich) im Proteinreinigungssystem (ÄKTA Start GE, Healthcare, Chicago, USA) bindet entsprechend durchlaufende Fc-Fusionsproteine an die Säulenmatrix. Vor dem Einsatz wurde die Protein-A-Säule mit H₂O und PBS äquilibriert, um 30 mL Zellkulturüberstand mit einer Durchflussrate

von 0,5 mL/min zu beladen. Die Säule wurde mit 20 Säulenvolumen (sv) PBS zur Beseitigung von Verunreinigungen gewaschen. Im Anschluss erfolgte eine zweistufige Elution des gebundenen Proteins durch die Senkung des pH-Wertes mittels Citratpuffer. Das eluierte Fc-Fusionsprotein (Eluat E) wurde in zwei Fraktionen gesammelt, in welchen 1 mL 1 M Tris pH 11,0 zur Neutralisierung des sauren Milieus vorgelegt wurde. Proteinhaltige Fraktionen wurden mittels NanoDrop Messung bestimmt, vereinigt und mit Hilfe eines Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filters (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) bei 4.000xg, 4°C auf ein Gesamtvolumen von 1500 µL konzentriert. Im Anschluss erfolgte der Pufferaustausch zu PBS mittels NAP-25-Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) entsprechend der Herstellerangaben mit einer Bestimmung der Proteinkonzentration. Die gereinigten Fusionsproteine pIL35 und pIL19 wurden via Western Blotting detektiert und der Reinheitsgrad überprüft (Coomassie Färbung).

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Ba/F3-Suspensionszellen wurden in 10 cm Petrischalen in 10 mL DMEM^{+/+} mit humanem Hyper-IL-6 (10 ng/ml) kultiviert. Die Passage fand alle sieben Tage im Verhältnis 1:10.000 statt.

Adhärenzte C2C12-, HEK293T-, Hepa1-6-, HepG2- und Phönix-Zellen wurde alle drei bis vier Tage im jeweiligen Medium (vgl. Tabelle 26) passagiert.

Tabelle 26: Kultivierungsmedien.

Zelllinie	Kultivierungsmedium
Ba/F3	DMEM ^{+/+}
C2C12	DMEM ^{+/+}
Expi293	Expi293 Expression Medium + GlutaMAX
HEK293-T	DMEM ^{+/+}
Hepa1-6 (±IL-6R)	DMEM ^{+/+}
HepG2	HepG2-Medium DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX-I
Phönix-Eco	DMEM ^{+/+}

Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂ (Ausnahme: Expi293-Zellen auf dem Orbitalschüttler mit 110 rpm bei 8% CO₂) in gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert.

Die drei bis vier-tägige Passage der adhärenzten Zellen ist voneinander unterscheidbar.

Die C2C12- und Hepa1-6-Zellen wurden gesplittet, wenn eine Konfluenz von 50-60% erreicht wurde. Dazu wurden die adhärenzten Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und mit frischem Medium verdünnt. Es wurden $1 - 1,2 \cdot 10^5$ C2C12-Zellen in eine 10 cm *Tissue culture* (TC)-Schale mit einem finalen Gesamtvolumen von $\Sigma 10$ mL bzw. $1,2 \cdot 10^6$ Hepa1-6(±IL-6R)-Zellen in eine T75-Flasche mit einem finalen Gesamtvolumen von $\Sigma 20$ mL ausgesät.

Für die Passage von HEK293-T- und Phönix-Eco-Zellen wurden die Zellen bei einer 70-90%igen Konfluenz mit 1 mL PBS abgelöst und von der Zellsuspension 80 µL HEK293T- bzw 250 µL-Phönix-Eco-Zellen in eine neue 10 cm TC-Schale mit einem finalen Gesamtvolumen von $\Sigma 10$ mL nach Verdünnung mit frischem Medium transferiert.

Bei der Passage von HepG2-Zellen wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und mit 5 mL einfacher Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und mit frischem Medium in eine neue T75-Flasche mit $\Sigma 20$ mL transferiert.

Für die drei- bis viertägige Passage in von Expi293-Zellen wurde die Zellzahl automatisch bestimmt und eine Zelldichte von $0,3 \cdot 10^6$ Zellen/mL in Kolben mit einem finalen Gesamtvolumen von $\Sigma 30$ mL ausgesät. Eine Passage war nicht indiziert, sofern die Zellkonzentration $< 3 \cdot 10^6$ Zellen/mL betrug.

Retroviral transduzierten Zelllinien wurden Selektionsantibiotika beim Passagevorgang zugesetzt (vgl. Tabelle 27).

Tabelle 27: Selektionsantibiotika und Zytokine mit Konzentration c bei der Passage retroviral transduzierter Zelllinien.

Zelllinie	Selektionsmedium
Ba/F3 gp130, IL-12R β 2, IL-6R	Hygromycin B (c=2 mg/mL) + hIL-6 (c=20 ng/mL) die ersten zwei Wochen nach retroviraler Transduktion
Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R	Hygromycin B (c=2 mg/mL) + hIL-6 (c=20 ng/mL) die ersten zwei Wochen nach retroviraler Transduktion
Hepa1-6 _{IL-6R}	Puromycin (c=3 μ g/mL) bei jeder Passage

2.2.3.2 Differenzierung von C2C12-Zellen

Bei einer Konfluenz von >85% beginnt der Differenzierungsvorgang von C2C12-Zellen. Um die Differenzierung einzuleiten, wurde C2C12-Differenzierungsmedium nach einem PBS-Waschvorgang auf 80%-konfluente Zellen gegeben. Für die darauffolgenden Tage wurde das Medium täglich, nach dem 4. Tag alle 12 h gewechselt.

2.2.3.3 Kryokonservierung von eukaryotischen Zellen

Die Kryokonservierung von Suspensions- und adhärenenten Zellen unterscheidet sich in der Mediumzusammensetzung, wie in Tabelle 28 aufgeführt.

Tabelle 28: Kryokonservierungsmedien.

Zellen	Kryokonservierungsmedium
Ba/F3-Zellen	90% FBS, 10% DMSO
Adhärenente Zellen (C2C12, Hepa1-6, HepG2)	20% FBS, 10% DMSO, 1% Penicillin/Streptomycin,

Ba/F3-Suspensionszellen wurden zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, RT). Anschließend wurde das Zellpellet in 2 mL Kryokonservierungsmedium resuspendiert und je 1 mL in ein Kryoröhrchen transferiert. Adhärenenten Zellen wurden mit PBS gewaschen und entsprechend von der Platte gelöst. Nach einer Zentrifugation (5 min, 1400 rpm, RT) wurden die Zellen mit einer definierten Zellzahl von $5 \cdot 10^5$ Zellen im Kryokonservierungsmedium in ein Kryoröhrchen überführt, in einem Gefrierbehälter Mr. Frosty (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) bei -80°C durch Isopropanol-Isolation im Behälter langsam heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

2.2.3.4 Chemische Transfektion von adhärenenten Zellen (Hepa1-6-, HEK293T-, Phönix-Eco-Zellen)

HEK293T-Zellen wurden im Rahmen von Testexpression und Co-Immunoprecipitation, Phönix-Eco-Zellen zur retroviralen Transduktion chemisch transient transfiziert.

An Tag -1 wurden $2 \cdot 10^6$ Hepa1-6 -Zellen pro 10 cm TC-Schale in 10 mL Kulturmedium ausgesät, sodass am Folgetag (Tag 0) eine Konfluenz von lediglich 50-60% erreicht war. An Tag 0 erfolgte die Transfektion: Es wurden 5 μ g pDNA mit 10 μ L Turbofect Transfektionsreagenz (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) in 1 mL DMEM^{-/-} gegeben, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend tropfenweise zu den Zellen gegeben. Nach 48 h Inkubation wurden Zelllysate für eine anschließende Western-Blot-Analyse hergestellt.

Am Tag -1 wurden Phönix-Eco-Zellen in einem 6-Well von $4 \cdot 10^5$ Zellen in 2 mL DMEM^{+/+} ausgesät. An Tag 0 erfolgte die Transfektion: 2 μ g pMOWS-DNA mit 4 μ L Turbofect wurden in 200 μ L DMEM^{-/-} verdünnt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Suspension tropfenweise auf die Phönix-Eco-Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel zu 2 mL DMEM^{+/+} mit 30% FBS erfolgte die retrovirale Transduktion von Ba/F3 und Hepa1-6-Zellen mittels des Phönix-Zellüberstandes.

2.2.3.5 Retrovirale Transduktion (Ba/F3- und Hepa1-6-Zellen)

Für eine retrovirale Transduktion wurden 250 µL des Phönix-Eco-Zellüberstandes (5 min, 1500 rpm, RT) mit 3 µL Polybrene ($c=10$ mg/mL) und 50 µL mit PBS gewaschener Ba/F3- bzw. Hepa1-6-Zellsuspension ($1 \cdot 10^5$ Zellen) gemischt. Anschließend wurde für 2,5 h, 1800 rpm bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 mL DMEM^{+/+} mit 10 ng/mL Hyper-IL-6 aufgenommen und in einer 6-Well Zellkulturschale kultiviert. Transduzierte Zellen wurden durch eine Antibiotikaselektion mit 1 mg/mL Hygromycin B (24 h nach Transduktion) und/oder 1,5 µg/mL Puromycin (48 h nach Transduktion) über 2-3 Wochen selektiert.

2.2.3.6 Elektroporation

Als weitere Methode für transiente Transfektion wurde die Elektroporation angewendet. Hierbei wurde die Membran von Zellen für DNA durchlässig, indem ein elektrisches Feld diese kurzzeitig permeabilisierte. Durchgeführt wurde die Elektroporation entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des Nucleofector Kit SF Cell Line Solution Box, large Volume (Lonza, Basel, Schweiz).

2.2.3.7 Durchflusszytometrie

Mithilfe von Durchflusszytometrie wurde die Expression von Zelloberflächenproteinen analysiert. Für die Analyse wurden je zwei Antikörper verwendet. Der Primärantikörper bindet den Rezeptor auf der Zelloberfläche. Der Sekundärantikörper, welcher den Fc-Teil des Primärantikörpers bindet, ist mit einem Fluorophor für die Detektion gekoppelt. Die Intensität des resultierenden Fluoreszenzsignals ist proportional zur Anzahl der auf der Zelloberfläche befindlichen Rezeptoren.

Adhärente C2C12- und Hepa1-6-Zellen wurden zunächst mit 1 mL Accutase (GibcoTM StemProTM AccutaseTM, Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) gelöst und durch 9 mL DMEM^{+/+} in Suspension gebracht. $5 \cdot 10^5$ Zellen wurden in 50 µL FACS-Puffer inkl. Primärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde 1 mL FACS-Puffer zum Waschen gegeben und das Pellet in 50 µL FACS-Puffer inkl. Sekundärantikörper für 1 h bei RT lichtgeschützt inkubiert. Nachfolgend wurde 1 mL FACS-Puffer hinzugegeben, zentrifugiert und in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert. Die Analyse erfolgte am BD FACS Canto II (Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mithilfe der Software FlowJo_V10.

2.2.3.8 Proliferationsassay

Proliferationsassays wurden zur Charakterisierung von pIL35 und pIL19 sowie zur Kontrolle der stabil transduzierten Rezeptoren auf Ba/F3-Zellen durchgeführt.

Hierbei wurden die o.g. Chimären und rekombinante Zytokine auf die Zellen gegeben, so dass bei passender Zytokinrezeptorinteraktion eine Proliferation der Zellen zu erwarten ist.

Hierbei wird durch die Zugabe von Resazurin dessen Reduktion zum fluoreszierenden Resorufin gemessen, welches in der Reagenz *CellTiter-Blue* enthalten ist. Die Detektion von Resorufin bei 560 nm erfolgte mit einem Tecan Infinite M200 PRO Reader.

Nur vitale, metabolisch aktive Zellen verfügen über intakte Dehydrogenaseenzyme, welche die Reduktion von Resazurin zu Redorufin katalysieren. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der vitalen Zellen, rückschließend zur Zytokin-induzierten Proliferation.

Hierzu wurden Ba/F3-Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und anschließend eine Zellkonzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/mL eingestellt. 200 µL Zellsuspension (in DMEM^{+/+}) wurden mit 200 µL zytokinhaltigem DMEM^{+/+} vermengt. Aus der mit Zytokin versetzten Zellsuspension ($\Sigma 400$ µL) wurde ein Volumen von 100 µL in eine Kavität einer 96-Well-Platte als Triplikate gegeben. Es folgte eine 72 stündige Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatmosfera. Nach der Zugabe von 20 µL *CellTiter-Blue* pro Well erfolgte die oben beschriebene Messung zum Zeitpunkt $t=0$ min, $t=40$ min, $t=60$ min, $t=80$

min, $t=100$ min und $t=120$ min. Die Werte zum Zeitpunkt $t=0$ min wurden bei der Auswertung von den $t=120$ Min-Werten abgezogen. Der Versuch erfolgte in Drei- bis Vierfachbestimmung.

2.2.3.9 Stimulationassay

Die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren ist Folge einer Zytokin-induzierten Zellstimulation. In den durchgeführten Stimulationassays wurde die Phosphorylierung von STAT3 und Akt untersucht. Stimuliert durch Zytokine, Chimären und bioaktive Peptide (vgl. 2.1.3) wurden Ba/F3-, C2C12-, Hepa1-6 und HepG2-Zellen. Die 5x PBS gewaschenen Zellen wurden in 10 mL DMEM^{-/-} im CO₂-Inkubator HERAcell®150 (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) in 10 cm Schalen inkubiert. Für Ba/F3-Zellen erfolgt das *Starving* über 3 h, für adhärenzte Zellen für 4 h. Die Zellen wurden mit dem jeweiligen Zytokin für entsprechende Zeiten von 15 – 30 min stimuliert, pelletiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Adhärenzte Zellen wurden vor Beendigung der Stimulation mittels TE von der Platte gelöst.

2.2.3.10 Proteinexpression in Expi293-Zellen

Die Kultivierung von Expi293-Zellen erfolgte nach Herstellerangaben.

Am Tag der Transfektion wurde eine Zelldichte von $2,8 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingestellt.

1,5 mL Opti-MEM I (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) wurden mit 40 µg pDNA vermengt. Ein weiterer Ansatz mit 1,5 mL Opti-MEM I wurde mit 160 µL Polyethylenimin (PEI) versetzt. Die Mischung wurde 5 min Inkubation bei RT vermischt und nach 15 min tropfenweise unter Schwenken zu den Zellen gegeben. Nach 15 h Inkubation (37°C, 8% CO₂, 110 rpm) wurde 850 µL 20% Trypton zugesetzt. Nach insgesamt 6 Tagen erfolgte die Ernte der Fc-Fusionsproteine pIL35 und pIL19.

Der Zellkulturüberstand wurde durch zweimalige Zentrifugation (5 min 400xg und 10 min 4000xg 4°C) gewonnen. Der Überstand wurde durch steriltfiltriert (Rotilabo-Spritzenfilter, PVDF, steril, Porengröße 0,22µm und 0,45µm; Carl Roth, Karlsruhe Deutschland) und bis zur Reinigung der Proteine (vgl. 2.2.2.6) bei -80°C gelagert.

Parallel wurden 100 µL des Zellkulturüberstandes, sowie eine Probe des Zellpellets für eine Western-Blot-Analyse aufbewahrt.

2.2.3.11 Immunpräzipitation (IP)

Die Co-Immunpräzipitation dient dem Nachweis von Ligand-Rezeptor-Interaktionen.

Transfizierte HEK293T-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion in 400 µL IP-Lysepuffer 90 min auf Eis lysiert. Mit Fokus auf die Ligand-Rezeptor-Interaktionen, wurden die Lysate vermischt, 80 µL wurden mit (5x) Lämmli aufgekocht (10 min, 95°C). Diese diente als *Input-Control*. Der restliche Überstand wurde mit 30 µL anti-Fc-Beads (Protein-A-Agarose) versetzt und über Nacht (leichte Agitation, 4°C) inkubiert. Die Beads wurden drei Mal mit IP-Lysispuffer (+Triton) gewaschen. Am Folgetag wurde 80 µL Überstand für die sog. *Non-Bound-Fraction* abgenommen und mit 5x Lämmli aufgekocht (10 min, 95°C). Im Folgenden wurde das Pellet drei Mal mit IP-Lysispuffer (ohne Triton) gewaschen. Das unter Einsatz der Hamilton-Pipette liquidfrei gewonnene Beads-Pellet wurde in 50 µL 2,5x-Lämmli resuspendiert („IP“) und gekocht (10 min, 95°C). Mit der *Input-Control*, *Non-Bound-Fraction* und der IP wurde eine Western-Blot-Analyse in Hinblick auf Ligand-Rezeptor-Interaktionen durchgeführt.

2.2.3.12 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) diente der Analyse von Ligand-Rezeptor-Interaktionen auf proteinbiochemischer Ebene.

Das grundlegende Oberflächenplasmonenresonanzsystem erlaubt detaillierte Aussagen zur Affinität, Bindungskinetik, Konzentration und Spezifität in Echtzeit und basiert auf Massenänderungen bei Interaktionen zwischen den zu analysierenden Molekülen.

Oberflächenplasmonen (longitudinalen Schwingungen entlang der Metalloberfläche, hier Gold) entstehen durch kollektive Anregung (z.B. durch Licht) der freien Elektronen im Metall. Es resultiert eine erhöhte elektrische Feldstärke im Raum oberhalb der sich entlang des Metalls ausbreitenden Wellen.

Das Biacore-System verfügt über drei wesentliche Komponenten: Einen Sensorchip, ein *Microflow*-System und eine SPR-Detektionseinheit.

In dieser Arbeit wurde ein Fc-spezifischer Protein-A-Chip verwendet. Es binden lediglich Fc-Fusionsproteine, die im Rahmen des sogenannten *Capture-Screens* bestimmt werden. Die Fc-Fusionsproteine (Liganden) sind damit auf dem Chip immobilisiert.

Falls ein löslicher Analyt an den auf dem Chip immobilisierten Liganden bindet, ändert sich die Masse, die am Chip gebunden ist. Nun ist über die Protein-A-Matrix nicht nur der Ligand, sondern auch der Analyt gebunden.

Durch diese Massenänderung verändert sich die SPR und damit der Brechungsindex des Chips, sodass sich der Winkel des reflektierten Lichts verändert.

Die SPR-Spektroskopie wurde mit einem Protein-A-Chip (Sensor Chip Protein-A, Cytiva, Freiburg im Breisgau, Deutschland) im Biacore X100 Instrument (Cytiva, ehemals GE Healthcare Life Sciences, Freiburg im Breisgau, Deutschland) während einer *Multi-Cycle* Analyse durchgeführt. Die Experimente wurden in PBS pH=7,4 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM HPO_4^{2-} und H_2PO_4^-) zugesetzt mit 0,05% (v/v) P20 (GE Healthcare) bei 25°C durchgeführt, indem die Fc-Fusionsproteine auf dem Protein-A-Chip mit 200 *Response units* (RU) nicht-kovalent gebunden wurden. Die Analyten shIL-6R, shIL-12R β 2, shIL-23R wurden mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ in einer 1:2-Stoffmengenkonzentrations-Verdünnungsreihe (500 – 0,98 nM und 0 nM) mit einem technischen Replikat 15,625 nM für 120 s injiziert. Die Assoziation der Analyten wurde für 120 s und die Dissoziation für 400 s konzentrationsabhängig gemessen. Die finalen Bindungskurven wurden mittels 1:1 *Binding Mode* der Biacore X100 Software, Version 2.0.1 interpoliert.

3 Ergebnisse

Basierend auf den Arbeiten von Kallen *et al.* [1] und der Vorarbeit in der Arbeitsgruppe (AG) Scheller sollten chimäre Zytokine, sog. Cytokimera [1], generiert, exprimiert und charakterisiert werden, die Rezeptoren von IL-6- und IL-12-artigen Zytokinen miteinander kombinieren. In den Vorarbeiten wurden Chimäre aus zwei IL-6-artigen Zytokinen (IC7 [1], GIL-6, GIO-6 und GIL-11 [354]) generiert. Designt wurden zwei neuartige Cytokimera: pIL35 (IL-6 und p35) und pIL19 (IL-6 und p19), ebenfalls als Fc-Fusionsproteine (syn.: pIL35Fc und pIL19Fc), analog zum IC7Fc von Findeisen *et al.* [351]. Entsprechend des IC7 wurde die Bindestelle-III vom IL-6-Grundgerüst gegen eine andere strukturhomologe humane Untereinheit, p35 bzw. p19, die α -Untereinheiten von IL-12 und IL-23, ausgetauscht. Anschließend wurden pIL-35 und pIL-19 auf ihre biologische Aktivität hin charakterisiert; außerdem wurden für die bereits bekannten, biologisch aktiven, Cytokimera IC7, GIL-6, GIO-6 und GIL-11 weitere *in vitro*-Aktivitätsanalysen auf metabolisch relevanten Zelllinien (muskuläre C2C12- und hepatische HepG2- und Hepa1-6-Zellen) durchgeführt. Ziel der in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Analysen zu den Cytokimera sind die weitere Erprobung *in vivo* bis perspektivisch zum therapeutischen Einsatz metabolischer Systemerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2.

3.1 Cytokimera

3.1.1 *In silico*-Design der Cytokimera

Das *in silico*-Design von pIL35 und pIL19 wurde in Vorarbeiten der AG Scheller erstellt und basiert auf Strukturhomologien [347, 354]. Unter anderem auch aus der Arbeit von Kallen *et al.* [1] ist bekannt, dass die Zytokine der IL-6-Familie eine starke Strukturhomologie aufweisen. Die vier α -helikale Struktur der IL-6-artigen Zytokine kann in der α -Untereinheit der IL-12-artigen Zytokine wiedergefunden werden [5].

Strukturen von Proteinen werden bspw. durch Röntgenanalyse oder Kryo-Elektronenmikroskopie ermittelt, weisen jedoch Unschärfe/undefinierte Regionen insbesondere in den *Loop*-Regionen aufgrund des hohen Bewegungsgrades auf. Computergestützte, auf künstlicher Intelligenz basierende, Strukturvorhersageverfahren wie AlphaFold können diese experimentellen Methoden ergänzen, indem sie auch für experimentell schwer zugängliche Proteinbereiche Strukturmodelle liefern.

Für den strukturbasierten Austausch ist eine lückenlose Strukturvorhersage notwendig, die alleinig durch die Röntgenanalyse und Kryo-Elektronenmikroskopie nicht zu bewerkstelligen ist. Die Strukturvorhersage bspw. der *Loop*-Regionen erfolgte webbasiert über *Protein homology analogy recognition engine* (PHYRE2) [363]. PHYRE2 verfügt über eine breite Datenbank. Visualisiert wurde diese Strukturvorhersage mittels der Software UCSF Chimera 1.14. Für den strukturbasierten Austausch wurden die vorhergesagten Strukturen optisch übereinandergelegt (unter Verwendung des Needleman-Wunsch-Algorithmus sowie einer BLOSUM-62 Matrix). Eine Strukturhomologie ist anhand von Überlagerungen zu erkennen. In diesem Falle ist ein Austausch der Domänen ohne Verlust der ursprünglichen Proteinfaltung möglich.

Die Festlegung der auszutauschenden Abschnitte erfolgte nach der Vorlage IC7. Im IC7 definierte Kallen *et al.* [1] Regionen im IL-6, die den Ausschnitt der *Site III* aus dem IL-6 heraus mit Neueinsatz der CNTF-*Site III* lückenlos möglich machten (vgl. Kapitel 1.6, Abb. 2 und Abb. 8).

Die Grenzstellen im IL-6 für das Design von pIL35 und pIL19 sind in dieser Arbeit analog zu diesen im IC7. Beim pIL35 wurde die α -helikale p35-Untereinheit abschnittsweise (nicht in ihrer gänzlichen Aminosäuren-Länge) eingesetzt (vgl. Abb. 9 und 10). Die PHYRE2-Strukturvorhersage betrug lediglich 74% (Confidence >90%), da in der Datenbank keine bekannte Struktur für p35 hinterlegt war. Beim pIL19 musste die α -helikale p19-Untereinheit vor Einsatz in das IL-6 modifiziert werden bzw. hätten nach dem Prinzip von Kallen *et al.*, mit seinen fest definierten Grenzstellen, nur begrenzte Teile des p19 in das IL-6-Grundgerüst transferiert werden sollen. Problematisch erschien hier aber, dass ausgelassene p19-Teile eine für die Rezeptorbindung wichtige Aminosäure beinhalten. Die für die p19/IL-23-Bindung wichtigen drei Aminosäuren sind: Glutaminsäure (E) an Stelle 58, Tryptophan (W) an Stelle 156 und Lysin (K) an Stelle 164 [172, 176]. Dem rein strukturbasierten Prinzip von Kallen *et*

al. zur Folge, hätte E58 ausgelassen und nicht in das IL-6 hinein transferiert werden sollen. Dies hätte eine fehlende Bindung des pIL19 an den IL-23R sehr wahrscheinlich gemacht. Um eine p19/IL-23R-Bindung theoretisch möglich zu machen, wurde – entgegen des Prinzips nach Kallen *et al.* – auch die Aminosäure E58 mit zwei proximal des zu übertragenden p19-Abschnittes liegenden Aminosäuren (Arginin (R)56 und E57) transferiert; pIL19-Strukturvorhersage 99% (Confidence >90%). Abbildung 9 und 10 zeigen das Sequenz-Alignment und die schematische Darstellung der Sequenzabschnitte für den Site III-Austausch für pIL35 und pIL19.

pIL35 und pIL19 wurden weiter modifiziert:

Sowohl bei pIL19 als auch bei pIL35 wurde C-terminal ein Aminosäure (AS)-Linker (Glycin(G)-G-G-G-Serin(S)) eingebracht. Nach Umklonierung soll sich C-terminal des Linkers ein Fc-Tag befinden (vgl. 1.6). Der Linker verbreitert die räumliche Distanz zwischen Chimär und Fc-Tag, um etwaige sterische Interferenzen zwischen eben genannten Komponenten zu reduzieren. Ebenso ermöglicht der Linker, welcher nur aus kleinen, unverzweigten Aminosäuren besteht, eine Rotation des angehängten Fc-Tags um deren Längsachse. Dies verleiht dem Fc-Tag eine besondere Beweglichkeit, was sich als vorteilhaft für die Protein-A-Reinigung darstellt [351, 364].

Die den neuen Proteinen zugrundeliegenden Sequenzen wurden in cDNA umgeschrieben und extern durch BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland) synthetisiert (Chimärinsert pIL35 bzw. pIL19 mit Linker ohne Fc-Tag).

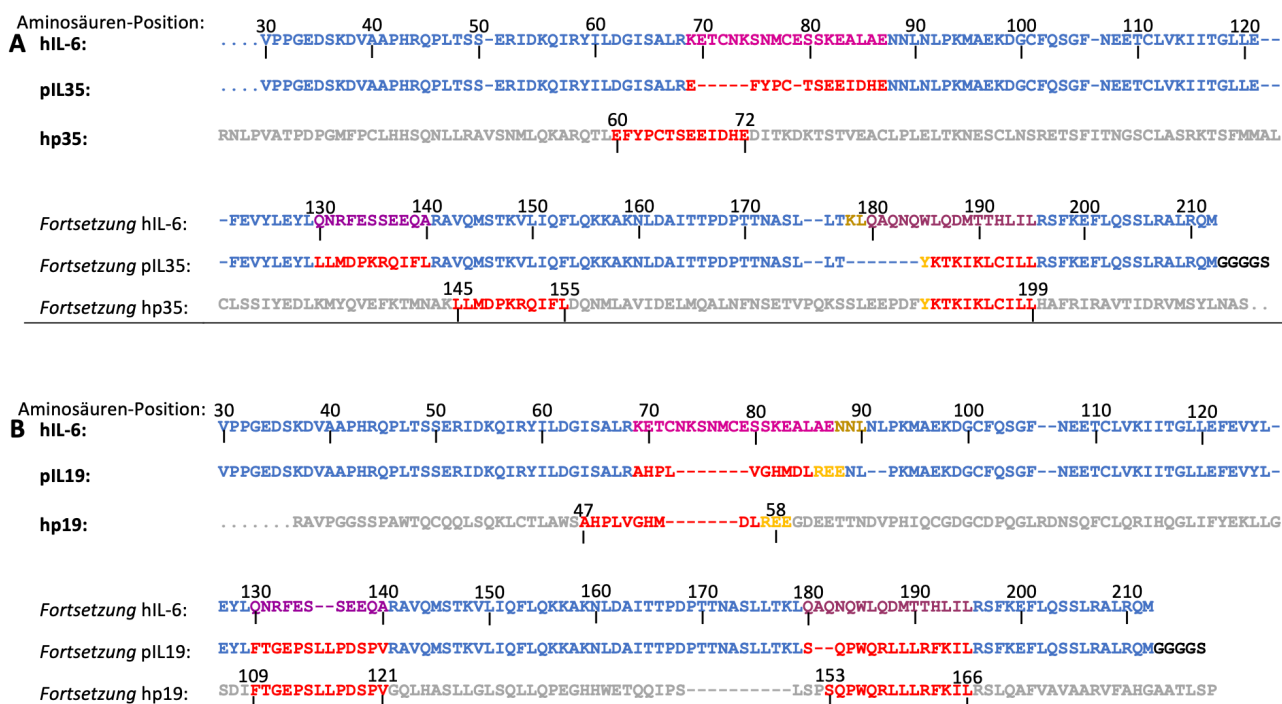


Abb. 9: Sequenz-Alignment zum Chimär-Design.

A) Sequenz-Alignment von humanem (h) IL-6, hp35 und pIL35. Dargestellt sind die Aminosäure-Sequenzen von hIL6, hp35 und pIL35. Für das Design des Chimärs pIL35 wurde ein IL-6-Backbone verwendet. Demnach ist die Sequenz von hIL-6 und pIL35 zu großen Teilen kongruent (blau). Die rot markierten Abschnitte im pIL35 sind allerdings zum hIL-6 abweichend, jedoch zum hp35 deckungsgleich. Hier hat der Austausch der Site III stattgefunden. Die Sequenzabschnitte der Site III des hIL-6 (magenta, vgl. Abb. 2), wurden nicht in das pIL35 integriert; stattdessen wurden strukturhomologe Abschnitte des hp35 in entsprechende Bereiche des pIL35 implementiert (rot). Die nicht in das pIL35 transferierten hp35-Abschnitte sind grau dargestellt. Gelb markiert ist die Aminosäure Y189, das Analogon im hIL-6 ist ocker-farbig dargestellt. Y189 wurde additiv in das pIL35 übertragen. Grund hierfür ist, dass Y189 wahrscheinlich für die IL-12R β 2-Bindung benötigt wird [185]. Am C-Terminus des pIL35 befindet sich der Glycin₄-Serin-Linker (schwarz). **B)** Sequenz-Alignment von hIL-6, hp19 und pIL19. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen von hIL6, hp19 und pIL19. Für das Design des Chimärs pIL19 wurde ein IL-6-Backbone verwendet. Demnach ist die Sequenz von hIL-6 und pIL19 zu großen Teilen kongruent (blau codiert). Die rot markierten Abschnitte im pIL19 sind allerdings zum hIL-6 abweichend, jedoch zum hp19 deckungsgleich. Hier hat der Site III-Austausch stattgefunden. Die Sequenzabschnitte der Site III des hIL-6 (magenta, vgl. Abb. 2), wurden nicht in das pIL19 integriert; stattdessen wurden strukturhomologe Abschnitte des hp19 in entsprechende Bereiche des pIL19 implementiert (rot markiert). Die nicht in das pIL19 transferierten hp19-Abschnitte sind grau dargestellt. Gelb markiert sind die drei Aminosäuren R56, E57 und E58 des hp19, Analoga im hIL-6 sind ocker-farbig dargestellt. R56, E57 und E58 wurden additiv – trotz topologischer Abweichungen der Struktur-kongruenten auszutauschenden Abschnitte – in das pIL19 übertragen. Grund hierfür ist, dass die Aminosäuren E58 für die IL-23R-Bindung benötigt wird [172, 176]. Am C-Terminus des pIL19 befindet sich der Glycin₄-Serin-Linker (schwarz). Die Chimär-Sequenz ist hier ohne Signalpeptid, Myc-Tag und ohne Fc-Tag dargestellt. Die N-terminalen Aminosäuren des hIL-6 (**MNSFSTSAFG PVAFSLGLLL VLPAAFPAP**), des hp35 (**MCPARSLLL V ATLVLDDHLS LA**) und des hp19 (**MLGSRVAMLL LLLPWTAQG**), wurden der Übersicht halber nicht dargestellt. Created with *multalign.toulouse.inra.fr*.

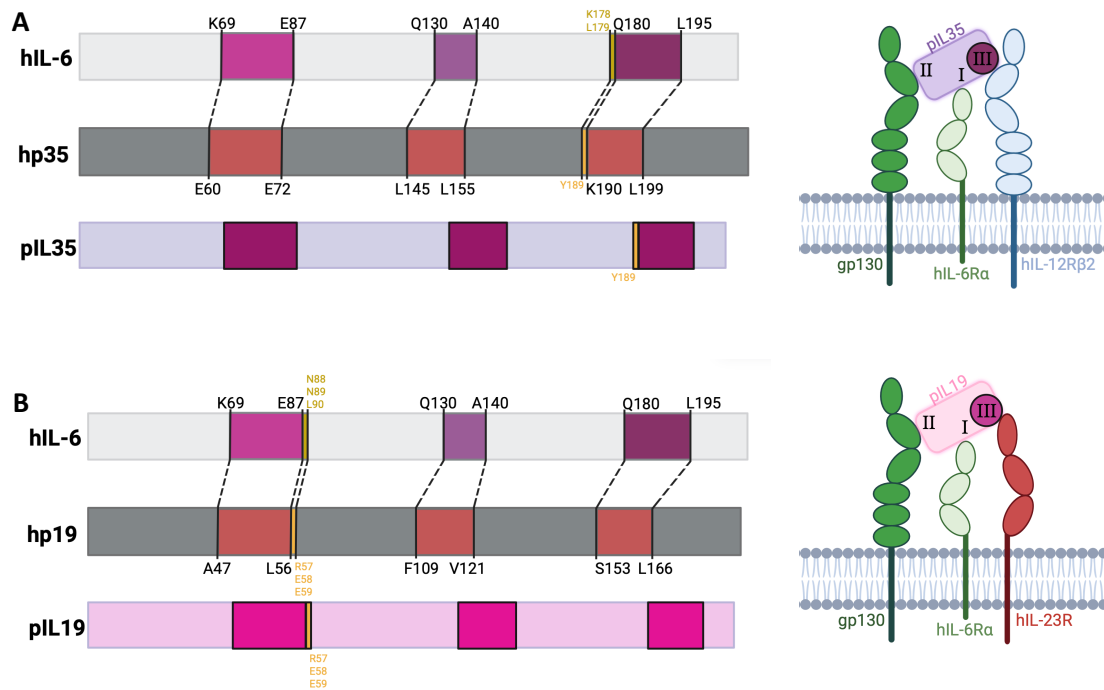


Abb. 10: Sequenzabschnitte von hIL-6 und hp35 bzw. hp19 für den Site III-Austausch zum Chimärdesign von pIL35 und pIL19.

Ausgetauscht wurde die gp130-bindende IL-6-Site III (Site IIIA: K69-E87, Site IIIB: Q130-A140, Site IIIC Q180-L195; vgl. Abb. 2 und Abb. 8) gegen Abschnitte von humanem (h) p35 (**A**) bzw. p19 (**B**) unter Berücksichtigung des Einschlusses von Rezeptorbindenden Aminosäuren (in gelb dargestellt) und dem entsprechenden Pendant im hIL-6 (ocker-farbig). Im Falle von p35 wurde Y189 in den Transfer inkludiert, im Falle von p19 R57, E58, E59. In der rechten Spalte ist die schematische Darstellung der gewünschten Rezeptorkonstellationen orientierend illustriert. Created in <https://BioRender.com>.

Die neu designten Cytokimera pIL35 und pIL19 sind in Abbildung 11 mit ihren entsprechenden Rezeptoren dargestellt. Es gibt keine natürlichen Zytokine, die diese Rezeptorkonstellationen binden. Voraussetzung für eine biologische Wirksamkeit ist das Vorhandensein aller benötigten Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

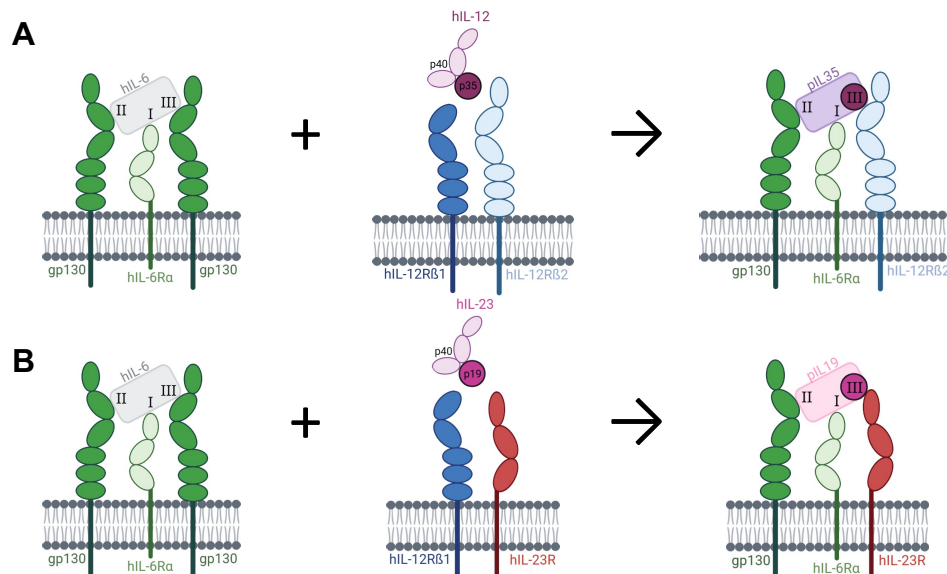


Abb. 11: Schematische Darstellung der generierten Cytokimera pIL35 und pIL19 mit ihren gewünschten spezifischen Rezeptorkomplexen.

A) pIL35: Site I des hIL-6-Proteins soll, wie auch das natürliche hIL-6, an den hIL-6Rα binden, Site II an gp130, Site III an hIL-12Rβ2. Die signaltransduzierenden Rezeptoren gp130 und IL-12Rβ2 befänden sich durch die pIL35-Bindung in räumlicher Nähe, genauso wie ihre assoziierten Januskinasen. Eine potenzielle Signaltransduktion könnte durch Kinasentransphosphorylierung in Gang gesetzt werden.

B) pIL19: Site I des hIL-6-Konstrukts soll, wie auch das natürliche hIL-6, an den hIL-6R binden, Site II an gp130, Site III an den hIL-23R. Die signaltransduzierenden Rezeptoren gp130 und IL-12Rβ2 befänden sich durch pIL19-Bindung in räumlicher Nähe, genauso wie ihre assoziierten Januskinasen. Eine potenzielle Signaltransduktion könnte durch Kinasentransphosphorylierung in Gang gesetzt werden. Created in <https://BioRender.com>.

3.1.2 Klonierung, Expression und Reinigung der Cytokimera pIL35 und pIL19

Die von BioCat GmbH (Heidelberg, Deutschland) synthetisierte cDNA (Chimärinsert pIL35 bzw. pIL19 mit Linker ohne Fc-Tag) wurde in einen pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor subkloniert. Er beinhaltet das im Rahmen der Klonierung herauszuschneidende DNA-Insert „5'-Signalpeptid/Myc-Tag/sIL-11R/IL-11/Fc-Tag-3'“. Für eine anschließende Subklonierung mit Verbleiben des „5'-Signalpeptids/Myc-Tag“ und des „Fc-Tag-3'“ im pcDNA3.1(+)-Vektor, wurden entsprechende Restriktionsstellen eingebaut (5'-HindIII und 3'-NotI). Das Insert der umklonierten pcDNA lautet wie folgt: „5'-Signalpeptid/Myc-Tag/pIL35 mit Linker/Fc-Tag-3'“ bzw. „5'-Signalpeptid/Myc-Tag/pIL19 mit Linker/Fc-Tag-3'“. Illustriert ist das Klonierungsschema in Abbildung 12. Methodisch kontrolliert wurde die Umklonierung durch Restriktionsspaltung, ColonyPCR und externer Sequenzierung bei Microsynth (Balgach, Schweiz).

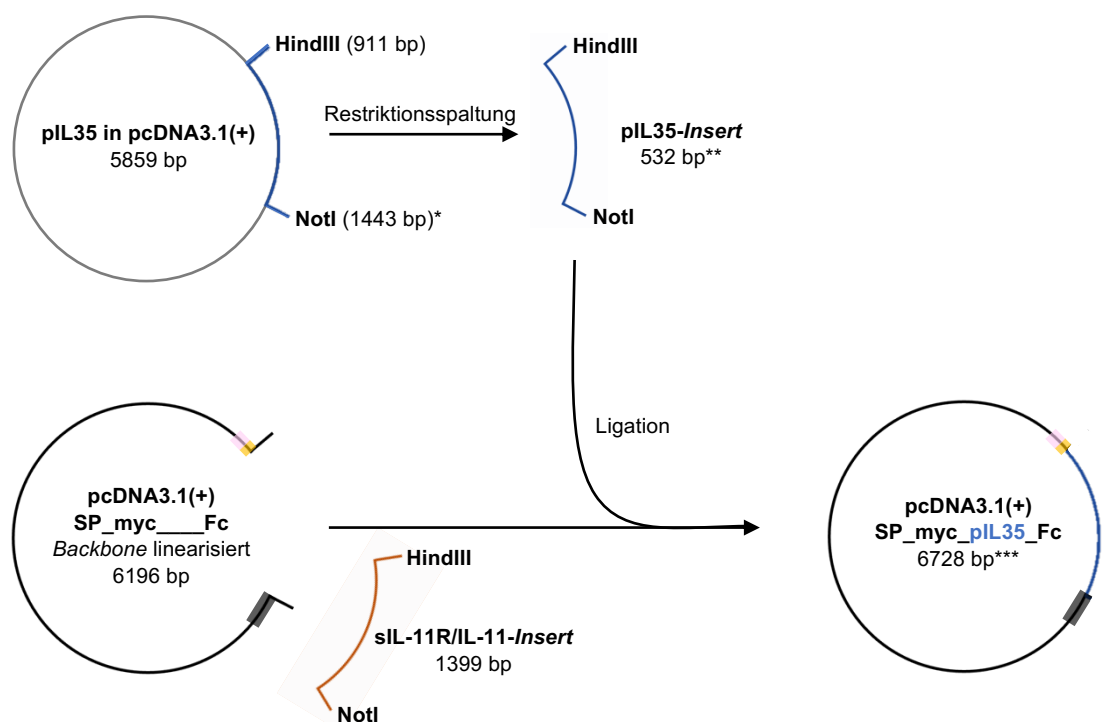


Abb. 12: Klonierungsschema exemplarisch für pIL35.

Als Ausgangsplasmid diente der im hiesigen Institut vorhandene pcDNA3.1(+)-Expressionsvektor 5'-Signalpeptid(SP)_myc-Tag_sIL-11R/IL-11_Fc-Tag-3'. Das Signalpeptid ist schematisch in rosa, das Myc-Tag in gelb und das Fc-Tag in schwarz dargestellt. Der initiale, das Chimärinsert (pIL35) umfassende pcDNA3.1(+)-Vektor wurden extern von BioCut, Heidelberg, Deutschland synthetisiert. Nach Restriktionsverdau mit HindIII (5') und NotI (3') wurde das unter Verwendung der Primer DF87 und DF17 mittels PCR amplifizierte pIL35-Insert in den linearisierten 5'-SP_myc_Fc-3'-Backbone ligiert. Analoges gilt für die Klonierung von pIL19, Abweichungen sind mit * gekennzeichnet: *Die NotI-Restriktionsstelle für pIL19 liegt bei 1455 Basenpaare (bp), **Das pIL19-Insert besitzt eine Länge von 544 bp. ***Der resultierende Vektor pcDNA3.1(+)-SP_myc_pIL19_Fc besitzt 6740 bp. Die subklonierten Plasmide pcDNA3.1(+)-SP_myc_pIL35_Fc und pcDNA3.1(+)-SP_myc_pIL19_Fc wurden letztlich in Expi293-Zellen transfiziert.

Die Aminosäuresequenzen der resultierenden Designerzytokine pIL35 und pIL19 sind in Abbildung 13 dargestellt.

pIL35:

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLISEEDLK
 LVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALREFYPTSEEIDHENNLNLPKMAEKDGCFSQGFNEETCLVKIITGLLEFEVYL
 EYLLLMDPKRQIFLRAVQMSTKVLIQFLQKAKNLDAITTPDPTTNASLLTYKTKIKLCILLRSFKEFLQSSLRALRQMGGGGS
 AAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

pIL19:

MSSSCSGLSRVLVAVATALVSASSEQKLISEEDLK
 LVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRAHPLVGHMDLREENLPKMAEKDGCFSQGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYL
 FTGEPSLLPDSFVRAVQMSTKVLIQFLOKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLSQPWQRLRLRKFILRSFKEFLOSSLRALRQMGGGGS
 AAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
 VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

Abb. 13: Aminosäuresequenzen von pIL35 und pIL19.

Schematische Darstellung der Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine pIL35 und pIL19 mit Signalpeptid (rosa), Myc-Tag (gelb), Chimärsequenz (lila), GGGs-Linker (grau) und Fc-Tag (schwarz). Die Aminosäure Methionin (M) ist in rot dargestellt; diese kann Ausgangspunkt einer verkürzten Translation mit Verlust des N-terminalen Abschnittes sein.

Das N-terminal gelegene Signalpeptid (24 AS) vermittelt den Transport nach extrazellulär, sodass die Cytokimera sezerniert und im Zellkulturüberstand zu finden sind. C-terminal des Signalpeptids befindet sich das Myc-Tag (11 AS: EQKLISEEDL + K), welches der Detektion im Zellkulturüberstand dient. Der sterisch bewegliche Fc-Tag (35 kDa) ist zur Detektion und für die Protein-A-Reinigung notwendig. Das Gesamtmolekulargewicht von pIL35, einschließlich der beiden Tags, beträgt ~47,7 kDa, dieses von pIL19 ~48,1 kDa.

Eine Testexpression erfolgte zunächst in HEK293T-Zellen. Die Expression zur Reinigung wurde anschließend in Expi293-Zellen durchgeführt.

In beiden Fällen wurden der Kulturüberstand mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert, dasselbe wurde mit dem Zelllysate durchgeführt, um ggf. zytoplasmatische Cytokimera zu detektieren, deren Sekretion scheiterte. Die Chimäre konnten im α -myc und α -Fc (Primärantikörper)-Western Blot detektiert werden. Final wurden die Cytokimera rein im Zellkulturüberstand der Expi293-Zellen bei zu erwartenden ~50 kDa identifiziert. Die Expression von pIL35 war stärker als von pIL19. Die Nebenprodukte bei ~35 kDa im α -Fc-Blot sind am ehesten auf C-terminale Anteile der neuen Proteine einschließlich des Fc-Tags zurückzuführen, was auf eine Instabilität und Degradation der Proteine hinweist (vgl. nachfolgende Abb. 14 oben). Die Nebenprodukte in sowohl α -myc als auch α -Fc-Blot bei ~150 kDa deuten auf unspezifische Aggregationen der Fc-Fusionsproteine hin.

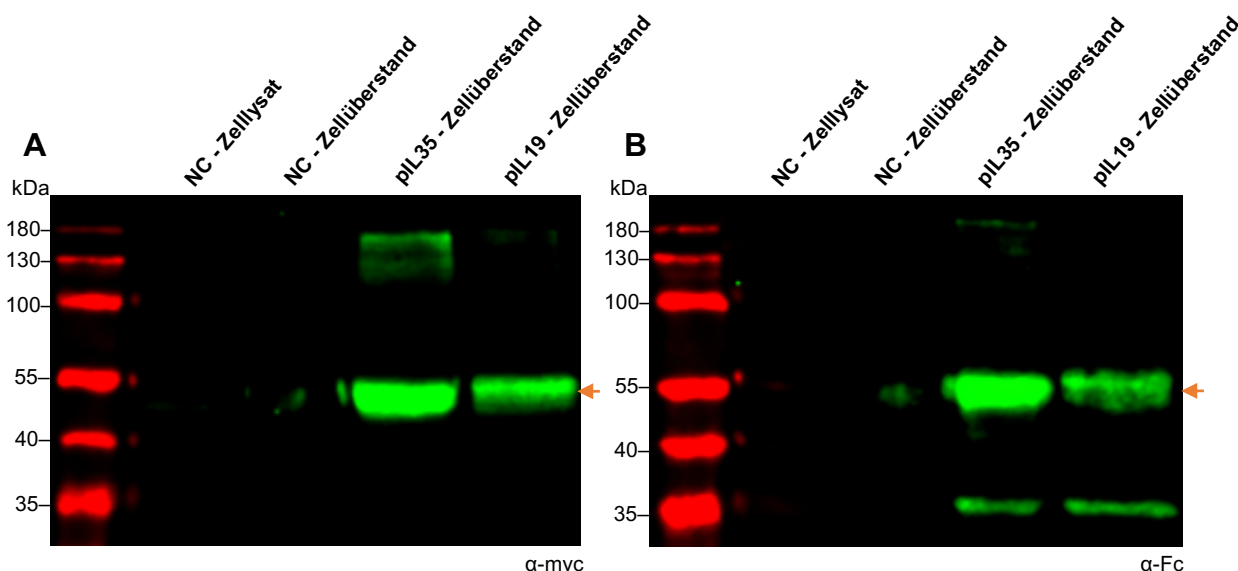


Abb. 14: Expression der Cytokimera pIL35 und pIL19 in Expi293-Zellen.

Es wurden 50 µg Expi293-Zelllysate und 45 µL Expi293-Überstand aufgetragen. Verwendet wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) zur Verifizierung der Molekulargewichte von pIL35 (47,7 kDa) und pIL19 (48,1 kDa). Bei der Negativkontrolle (*Negative Control*, NC) handelt es sich um nicht-transfizierte Expi-293-Zellen. **A)** Detektion α -myc. Die Chimären befinden sich auf einer Höhe von ~50 kDa. Ein Nebenprodukt von 150 kDa ist detektierbar, a.e. handelt es sich um unspezifische Aggregationen. **B)** Detektion α -Fc. Die Chimären befinden sich auf einer Höhe von ~50 kDa. Ein Nebenprodukt von 150 kDa ist detektierbar, außerdem eines von 35 kDa (Fc-Tag ohne Chimär). n=1. kDa: Kilodalton.

Die Fc-Fusionsproteine pIL35 und pIL19 wurden mittels Protein-A-Säule gereinigt. Hierbei wurden die Proteine in zwei Fraktionen eluiert (Elutionsfraktion 1 und 2 bzw. Eluat 1 und 2) und vereinigt. Es ergaben sich folgende Proteinkonzentrationen für pIL35: c(Eluat 1)=10 µg/mL und c(Eluat 2)=3 µg/mL, welche auf eine eher geringe Ausbeute hinweisen. Letztendlich konnte eine Endkonzentration von 111 µg/mL für pIL35 und von 105 µg/mL für pIL19 erzielt werden. Die gemessene Konzentration spiegelt nicht zwingend die tatsächliche Menge der produzierten Cytokimera wider, weil co-eluiertes Fremdprotein die Bestimmung verfälschen kann. So zeigt pIL19 bereits in den initialen Western Blots (α -myc und α -Fc) in Abb. 14 (oben) – erkenntlich an der herabgesetzten Bandenintensität – eine stärkere Verunreinigung, was zudem in Abb. 15 (unten, rechts) in der Coomassie-Färbung bestätigt wird. Am ehesten zu begründen ist dies durch eine fehlerhafte Proteinfaltung von pIL19 (vgl. 4.1.1).

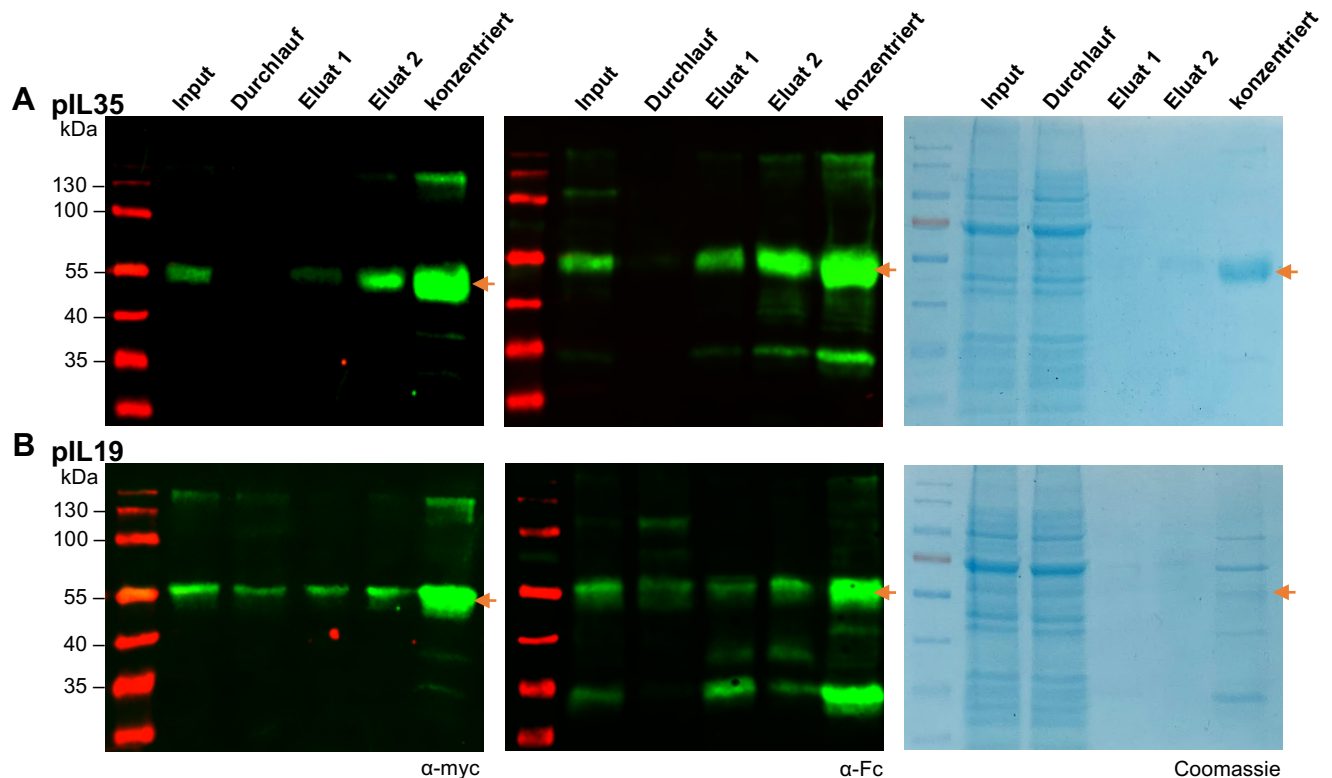


Abb. 15: Protein-A-Reinigung von den Fc-Fusionsproteinen pIL35 und pIL19.

Analysiert wurde der Zellkulturüberstand (*Input*, 30 mL) von pIL35- bzw. pIL19-exprimierende Expi293-Zellen, sowie die erste und zweite Elutionsfraktion (*Eluat 1* und *2*, jeweils ca. 1 mL). Pro Spur wurden jeweils 45 µL aufgetragen. Verwendet wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) zur Verifizierung der Molekulargewichte. Die Cytokimera sind durch einen Pfeil (orange) markiert **A)** pIL35: Detektion im Westernblot α-myc (links) sowie α-Fc (mittig); Coomassie rechts. **B)** pIL19: Detektion im Westernblot α-myc (links) sowie α-Fc (mittig); Coomassie rechts. n=1. kDa: Kilodalton.

3.1.3 Erzeugung responsiver Ba/F3-Zielzellen

Da die Charakterisierung der designten Cytokimera auf Ba/F3-Zellen stattfinden sollte, mussten diese die entsprechenden Rezeptorkonstellationen exprimieren. Zwei Ba/F3-Zelllinien waren im Labor bereits etabliert und wurden als Ausgangspunkt genutzt: Ba/F3 gp130, IL-12Rβ2 sowie Ba/F3 gp130, IL-23R. Die verwendeten Ba/F3-Zellen exprimieren ausschließlich die angegebenen (humanen, h) Rezeptoren.

Beide Zelllinien wurden retroviral mit dem hIL-6R transfiziert. Die zwei neuen Zelllinien Ba/F3 gp130, IL-12Rβ2, IL-6R sowie Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R verfügen über die benötigten Rezeptorkonstellationen für eine Charakterisierung von pIL35 und pIL19.

Hierzu wurde das Insert hIL-6R in einen offenen pMOWS-Expressionsvektor mit Hygromycin-Resistenzgen zur Selektion kloniert (vgl. Abb. 16), beides lag in der AG Scheller bereits geschnitten (Restriktionsenzym PmeI) vor (Kontrolle: ColonyPCR, Restriktionsspaltung, externe Sequenzierung durch Microsynth, Balgach, Schweiz).

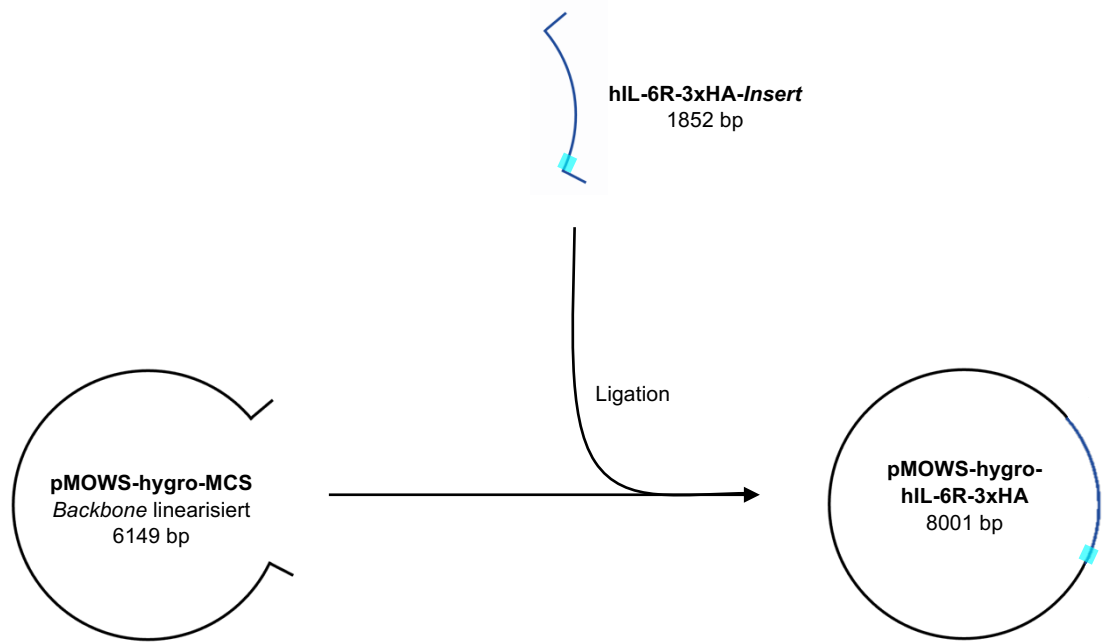


Abb. 16: Retrovirale Transduktion des hIL-6R.

Das subklonierte Plasmid pMOWS-hygro-hIL-6R-3xHA wurde retroviral in zwei Zelllinien Ba/F3 gp130, hIL-12R β 2 und Ba/F3 gp130, hIL-23R transfiziert. Das *Insert* hIL-6R-3xHA (1852 Basenpaare (bp) mit dreifachem HA-Tag in zyan markiert) wurde unter Verwendung der Primer DF86 und DF534 mittels PCR amplifiziert und in den linearisierten pMOWS-Vektor mit Hygromycin (hygro)-Resistenzgen zwecks Selektion ligiert.

Die erfolgreiche retrovirale Transduktion mit Oberflächenpräsentation des hIL-6R auf den Ba/F3-Zellen wurde anhand FACS-Analysen sowie durch Proliferationsassays (vgl. Abb. 17) und Stimulationsassays verifiziert.

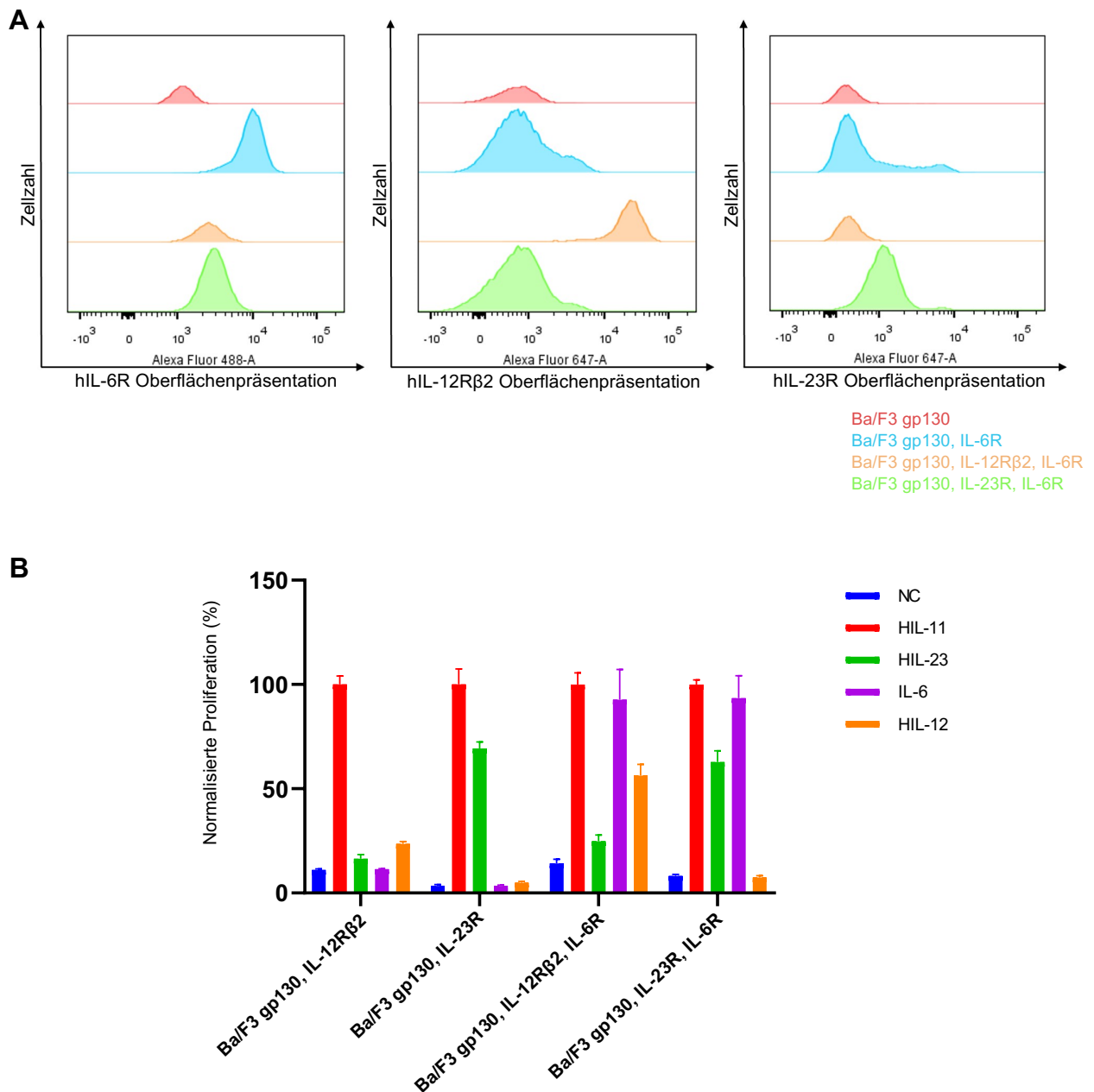


Abb. 17: Verifizierung der korrekten Rezeptorkonstellationen auf der Ba/F3-Zelloberfläche.

A) FACS-Analyse. Pro Ansatz wurden $5 \cdot 10^5$ Ba/F3-Zellen analysiert. Die Intensitätszunahme der Fluoreszenz (Rechts-Shift auf der x-Achse) repräsentiert das Maß der Rezeptoroberflächenpräsentation. Die gegen den Rezeptor gerichteten Antikörper verfügen über ein Fluorophor mit Emission spezifischer Wellenlänge. Die y-Achse zeigt die Zellzahl. $n(\text{hIL-6R})=2$, $n(\text{hIL-12R}\beta 2)=1$, $n(\text{hIL-23R})=1$. **B)** Proliferationsassay. Ba/F3-Zellen proliferieren unter Zytokinstimulation, sofern die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche repräsentiert werden. Stimuliert wurden vier verschiedene Ba/F3-Zelllinien (Ba/F3 gp130, IL-12R β 2; Ba/F3 gp130, IL-23R; Ba/F3 gp130, IL-12R β 2, IL-6R; Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R) mit humanen Zytokinen: HIL-11 (100 ng/mL), HIL-23 (200 ng/mL), HIL-12 (200 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL). Die Negativkontrolle (NC) blieb ohne Zytokin-Zusatz. Normalisierung in Bezug auf die Positivkontrolle HIL-11. Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Repräsentative Abbildung aus $n=2$ Experimenten.

Die erfolgreiche Oberflächenpräsentation des hIL-6R auf den Zelllinien Ba/F3 gp130, IL-12R β 2, IL-6R (Abb. 17A links, in orange) und Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R (Abb. 17A links, in grün) nach erfolgter retroviraler Transduktion wird durch die Zunahme der Fluoreszenzintensität (grafisch als Rechtsverschiebung dargestellt) bestätigt. Beide Zelllinien zeigen zudem eine Proliferation unter IL-6 (vgl. Abb. 17B, lila), was die Expression des transduzierten hIL-6R verifiziert.

Eine Proliferation unter HIL-23 zeigt sich bei den Zelllinien Ba/F3 gp130, IL-23R und Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R (vgl. Abb. 17B, grün), obwohl diese Zellen den IL-12R β 1 nicht exprimieren (vgl. Kapitel 1.4.4

und Abb. 6). In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bei hohen IL-23-Konzentrationen auch IL-23R-Homodimere signaltransduzierend sind [331, 332].

Die erhöhte Proliferation der Zelllinie Ba/F3 gp130, IL-12R β 2, IL-6R unter HIL-12 (vgl. Abb. 17B, orange und Abb. 18A, lila) konnte im Wiederholungsexperiment nicht dargestellt werden. Auch eine Phosphorylierung von STAT3 unter HIL-12 konnte in dieser Zelllinie, die den IL-12R β 1 nicht exprimiert, nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 18B). Weitere Untersuchungen hierzu werden angeschlossen.

3.1.4 Charakterisierung der Cytokimera

3.1.4.1 pIL35 und pIL19 sind biologisch inaktiv

Die funktionelle Analyse fand mit den zwei retroviral transduzierten Zelllinien Ba/F3 gp130, IL-12R β 2, IL-6R und Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R statt. Als Negativkontrolle dienten Ba/F3-Zelllinien, welche lediglich gp130 exprimieren.

Durchgeführt worden sind konzentrationsabhängige Stimulations- und Proliferationsassays.

Beide Assays weisen auf eine Inaktivität von pIL19 und pIL35 hin. Es ist keine Proliferation unter pIL35 bzw. pIL19 nachweisbar, genauso wenig wie eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3, welcher u.a. auch eine etwaige Proliferation vermitteln würde [365, 366]. Auch eine simultane Stimulation mit p40, der β -Untereinheit von IL-12 und IL-23, zeigte keinerlei Chimäraktivität. Hintergrund der simultanen Zugabe von p40 ist eine vermutete, noch nicht definitiv erforschte, Interaktion mit dem IL-12R β 2 bzw. IL-23R [176]. Für die Bindung von p35/p19 an den IL-12R β 2/IL-23R bzw. die biologische Aktivität scheint p40 obligat zu sein [322, 367] (vgl. Kapitel 4.1.4 und Abb. 31); daraus hergeleitet wurde für die experimentelle Co-Stimulation mit p40 zur Funktionsanalyse von pIL35 und pIL19.

Da in den murinen prä B-Zellen nur zytokinabhängig eine Signaltransduktion zur Teilung (weitergehend Proliferation) induziert werden kann, diente als Positivkontrolle die Stimulation mit HIL-11 bzw. HIL-6, als Negativkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Auswahl der Kontrollzytokine richtete sich nach den für pIL35 und pIL19 involvierten Rezeptoren: hIL-6, hIL-12, hIL-23 (vgl. Abb. 11).

Erwartungsgemäß zeigte sich unter HIL-11 bzw. HIL-6 -Stimulation bei jeder untersuchten Ba/F3-Zelllinien eine Phosphorylierung von STAT3 und eine Proliferation (vgl. Abb. 18). Die unbehandelten Zellen zeigten entsprechend weder ein Signal im Stimulations- noch im Proliferationsassay (vgl. Abb. 18). Nach Behandlung mit den Kontrollzytokinen zeigten sich reguläre STAT3-Phosphorylierungen und Proliferationen, sofern die analysierte Zelllinie über den entsprechenden Rezeptor verfügte: Demnach zeigte sich eine Proliferation und eine Stimulation bzw. Signaltransduktion (STAT3-Phosphorylierung) für die Zelllinie Ba/F3 gp130, IL-12R β 2, IL-6R neben der Positivkontrolle unter hIL-6 und für die Zelllinie Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R ebenfalls unter hIL-6 (vgl. Abb. 18). (p) STAT3 ist im Western Blot bei ~79,86 kDa zu identifizieren.

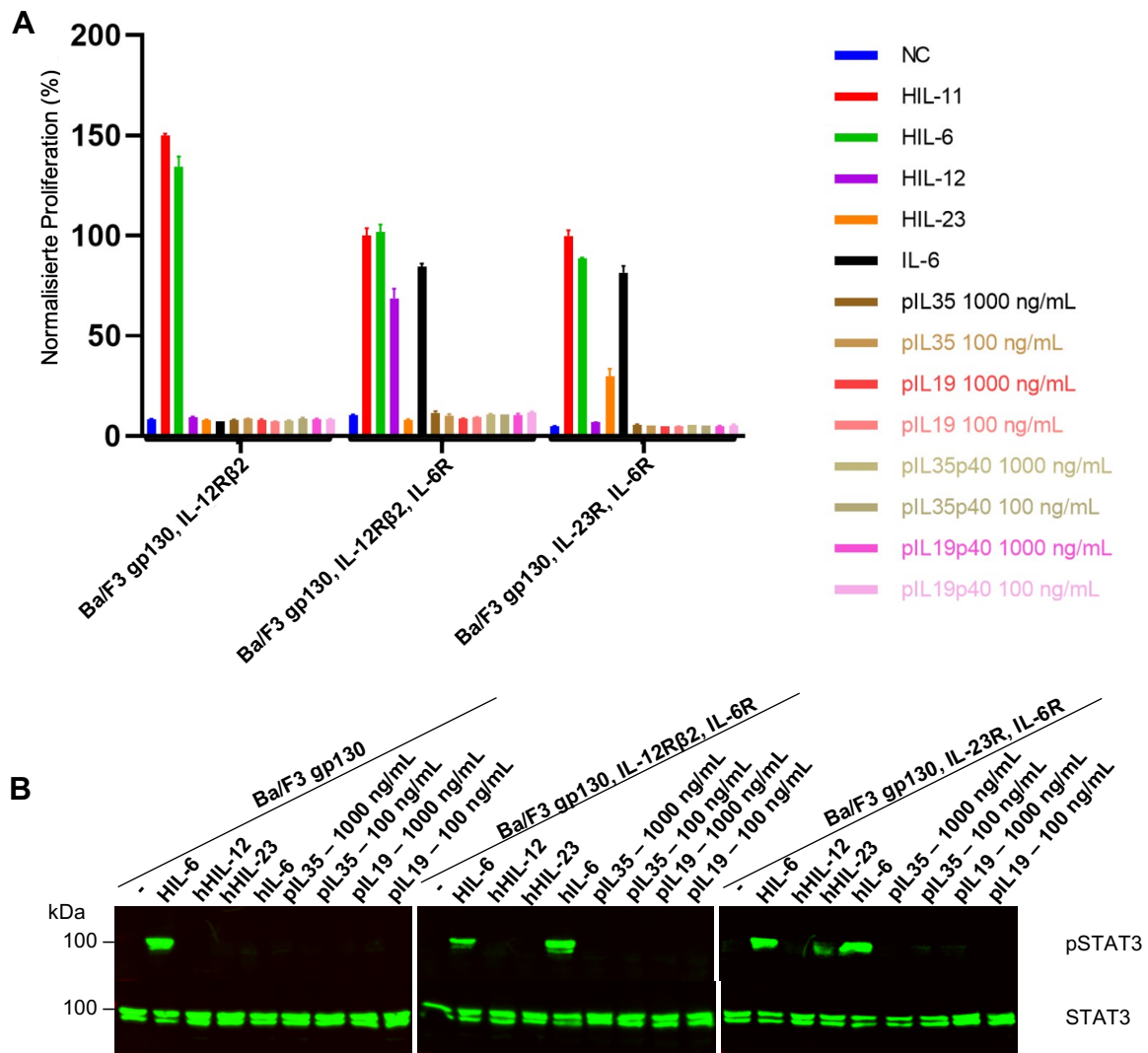


Abb. 18: pIL35 und pIL19 sind auf Ba/F3-Zellen biologisch inaktiv.

A) Proliferationsassay. Trotz korrekter Rezeptorpräsentation auf der Zelloberfläche der jeweiligen Ba/F3-Zelllinie ist keine Proliferation unter pIL35 (100 ng/mL und 1000 ng/mL) oder pIL19 (100 ng/mL und 1000 ng/mL) detektierbar, unabhängig von der Chimärkonzentration und dem Zusatz von p40 (im 1:10-Volumenverhältnis zu pIL35 bzw. pIL19). Eine entsprechende Proliferation unter den humanen Kontroll-Zytokinen HIL-6 (0,2 Volumenprozent), HIL-12 (200 ng/mL), HIL-23 (200 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL) bestätigt die adäquate Rezeptorexpression. Die Negativkontrolle (NC) blieb unbehandelt. Die Normalisierung erfolgte in Bezug auf die Positivkontrolle HIL-11 (100 ng/mL). Angegeben sind der Mittelwert und der Standardfehler. Die Repräsentanz ergibt sich aus n=4 Experimenten. **B)** Stimulationsassay. Fluoreszenzbasierter Western Blot α-pSTAT3 und α-STAT3. Aufgetragen wurden pro Spur 50 µg Protein. Nach 15-minütiger Zytokin-Stimulation mit HIL-6 (0,2 Volumenprozent) als Positivkontrolle, HIL-12 (200 ng/mL), HIL-23 (200 ng/mL) und IL-6 (10 ng/mL) erfolgt bei aktiver Ligand-Rezeptor-Interaktion eine Phosphorylierung von STAT3. Zur Referenz der Molekulargewichte von STAT3 und pSTAT3 (beides 79,86 kDa) wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Obwohl die Zelllinie Ba/F3 gp130, IL-23R, IL-6R nicht über den IL-12Rβ1 verfügt, ist eine Phosphorylierung von STAT3 nach HIL-23-Stimulation erkennbar. Grund hierfür ist am ehesten eine IL-23R-Homosimerisierung mit konsekutiver Signaltransduktion bei Zugabe von hohen IL-23-Konzentrationen. Es ist keine Phosphorylierung von STAT3 nach pIL35/pIL19-Stimulation (100 ng/mL und 1000 ng/mL) nachweisbar, konzentrationsunabhängig.

3.1.4.2 Cytokimera binden teilweise an die Rezeptoren

Um eine mögliche Ursache der Inaktivität von pIL35 und pIL19 zu eruieren, wurden Analysen zur Bindungskinetik angeschlossen. Durchgeführt wurde eine Immunpräzipitation und eine Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse (*Surfaceplasmonresonance*, SPR) im Biacore-System.

3.1.4.2.1 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) diene als alternative Methode zur Analyse von Interaktionen zwischen Liganden und Rezeptoren auf zellulärer Ebene. HEK293T-Zellen wurden jeweils einzeln mit pcDNA3.1 für lösliche Zytokine (pIL35, pIL19, hIL-6Fc) und membranständige Rezeptoren (hIL-6R-HA, hIL-12R β 2, hIL-23R) transfiziert. Die pcDNA3.1 für gp130 wurde nicht transfiziert. Analysiert wurden Zelllysate, da vorherige Testexpressionen in HEK293T-Zellen eine gesteigerte intrazelluläre Expression der sekretorischen Chimäre zeigten. Mit dem Hintergrund der Analyse von Zytokin-Rezeptor-Interaktion wurden entsprechende Lysate gemischt (vgl. Tabelle 29), einige blieben unvermischt („ohne Zytokin/ohne Rezeptor“).

Tabelle 29: Analyisierte Konditionen in der Immunpräzipitation mit Molekulargewicht.

	Zytokin	IL-6Fc (48,7 kDa)	pIL35 (47,7 kDa)	pIL19 (48,1 kDa)	ohne Zytokin
Rezeptor					
hIL-6R-HA (55,2 kDa)		X	X	X	X
hIL-12Rβ2 (99,8 kDa)			X		X
hIL-23R (74,4 kDa*)				X	X
ohne Rezeptor	X		X	X	

Protein-A-Agarose-Beads (45 kDa)

*das berechnete Molekulargewicht des hIL-23R liegt bei 74,4 kDa. Aufgrund von acht posttranslationales Glykosilierungen [368] ist das tatsächliche Molekulargewicht erhöht.

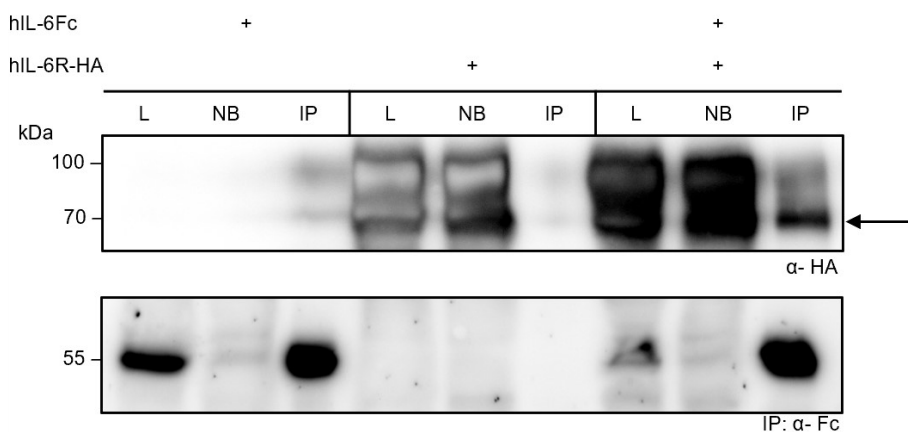
Die IP-Kondition „hIL-6Fc+hIL-6R“ diene als Positivkontrolle.

Analysiert wurden pro IP-Kondition drei Proben: *Input* (I), *Non-Bound*-Fraktion (NB) und die eigentliche IP unter Verwendung von Protein-A-Agarose-Beads (IP). Der *Input* stellt eine Probe des (gemischten) Lysats dar, die *Non-Bound*-Fraktion ist jene Fraktion, die im Gegensatz zur IP-Probe nicht an die Protein-A-Agarose-Beads bindet. Alle Proben wurden nach erfolgter Immunpräzipitation mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert.

Die verwendeten Primärantikörper sind α -HA (zur Detektion des hIL-6R), α -hIL-12R β 2 und α -hIL-23R. Zur Kontrolle der erfolgten Immunpräzipitation wurden auch die Beads an sich α -Fc detektiert.

Mithilfe der Immunpräzipitation konnte die Bindung des pIL35 an den hIL-6R nachgewiesen werden. Zudem konnten weitere Rezeptorbindungen ausgeschlossen werden: pIL35 bindet nicht an den IL-12R β 2. pIL19 bindet weder an den IL-6R noch an den IL-23R (vgl. Abb. 19).

A



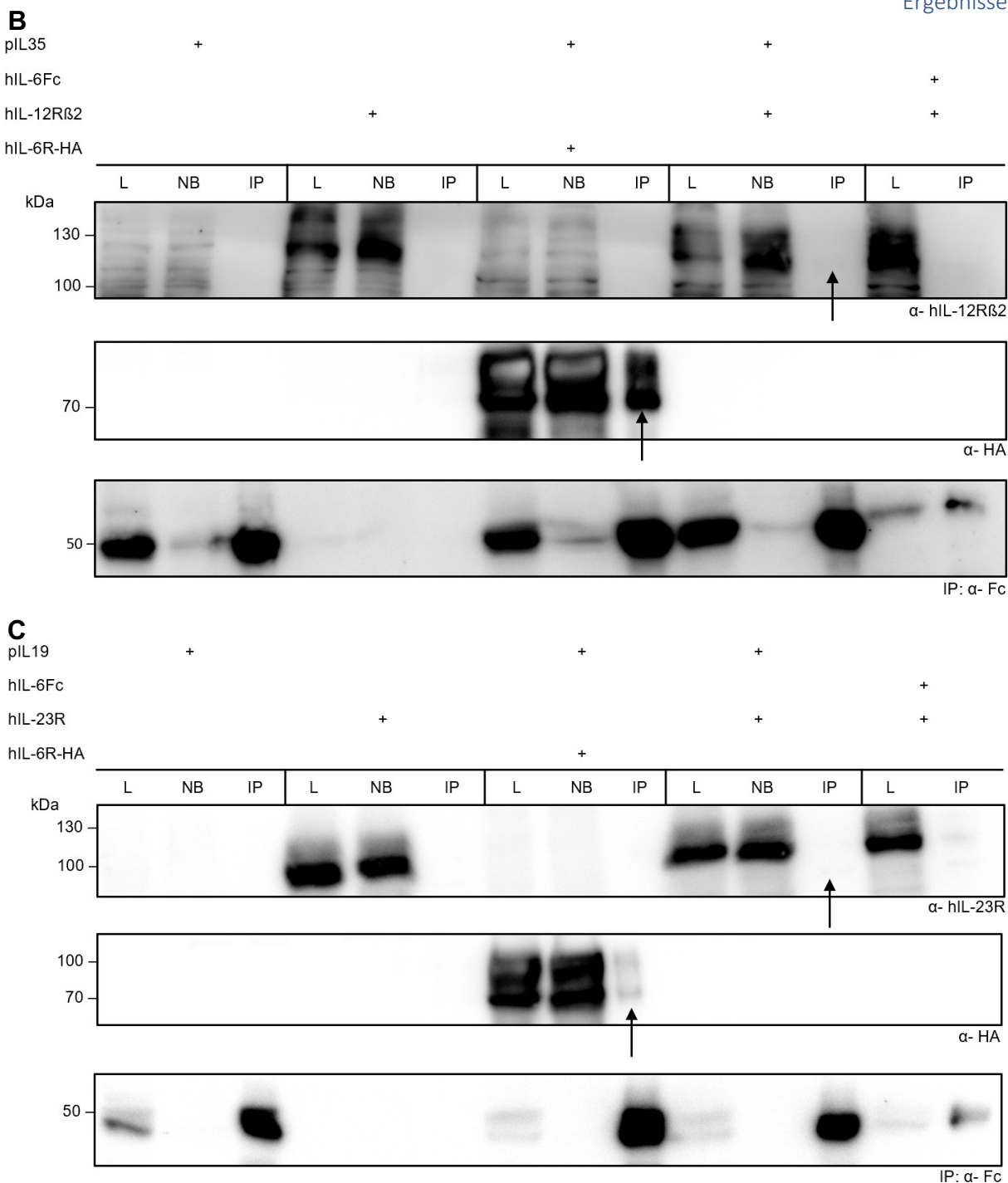


Abb. 19: Nachweis der Bindung von pIL35 an den hIL-6R und Ausschluss anderer pIL35/pIL19-Rezeptor-Bindungen durch Immunpräzipitation.

Es wurden HEK293T-Zellen mit einzelnen Plasmiden (Fc-Fusionsproteine: hIL-6Fc, pIL35 und pIL19; Rezeptoren: hIL-6R-HA, hIL-12R β 2, hIL-23R) transfiziert. Zur mikroskopischen Kontrolle wurde mit pEGFP transfiziert. Die Zellen wurden lysiert. Teilweise wurden Zelllysate der *single-plasmid*-transfizierten Zellen gemischt. Nach Zentrifugation wurde ein Teil des Überstandes (*Non-Bound-Fraktion*; NB) abgenommen. Das Zelllysate wiederum wurde teils mit Protein-A-Agarose-Beads versehen (Immunpräzipitation, IP), der andere unversehene Teil diente als *Input-Probe* (Lysat, L) und wurde keiner Immunpräzipitation unterzogen. Verwendete Primärantikörper: α -HA, α -hIL-12R β 2, α -hIL-23R und α -Fc. Verwendet wurde außerdem der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) zur Verifizierung der Molekulargewichte von hIL-6Fc (48,7 kDa), pIL35 (47,7 kDa), pIL19 (48,1 kDa), hIL-6R-HA (55,2 kDa), hIL-12R β 2 (99,8 kDa) und hIL-23R (74,4 kDa). **A)** Positivkontrolle. hIL-6Fc bindet an den HA-getagten hIL-6R. **B)** pIL35 bindet an den hIL-6R, aber nicht an den hIL-12R β 2. **C)** pIL19 bindet weder an den hIL-6R noch an den hIL-23R. Ein repräsentatives Ergebnis von n=2 (für A, B, C) ist dargestellt. kDa: Kilodalton.

Dieselben Ergebnisse konnten mittels SPR-Analyse im Biacore-System validiert werden.

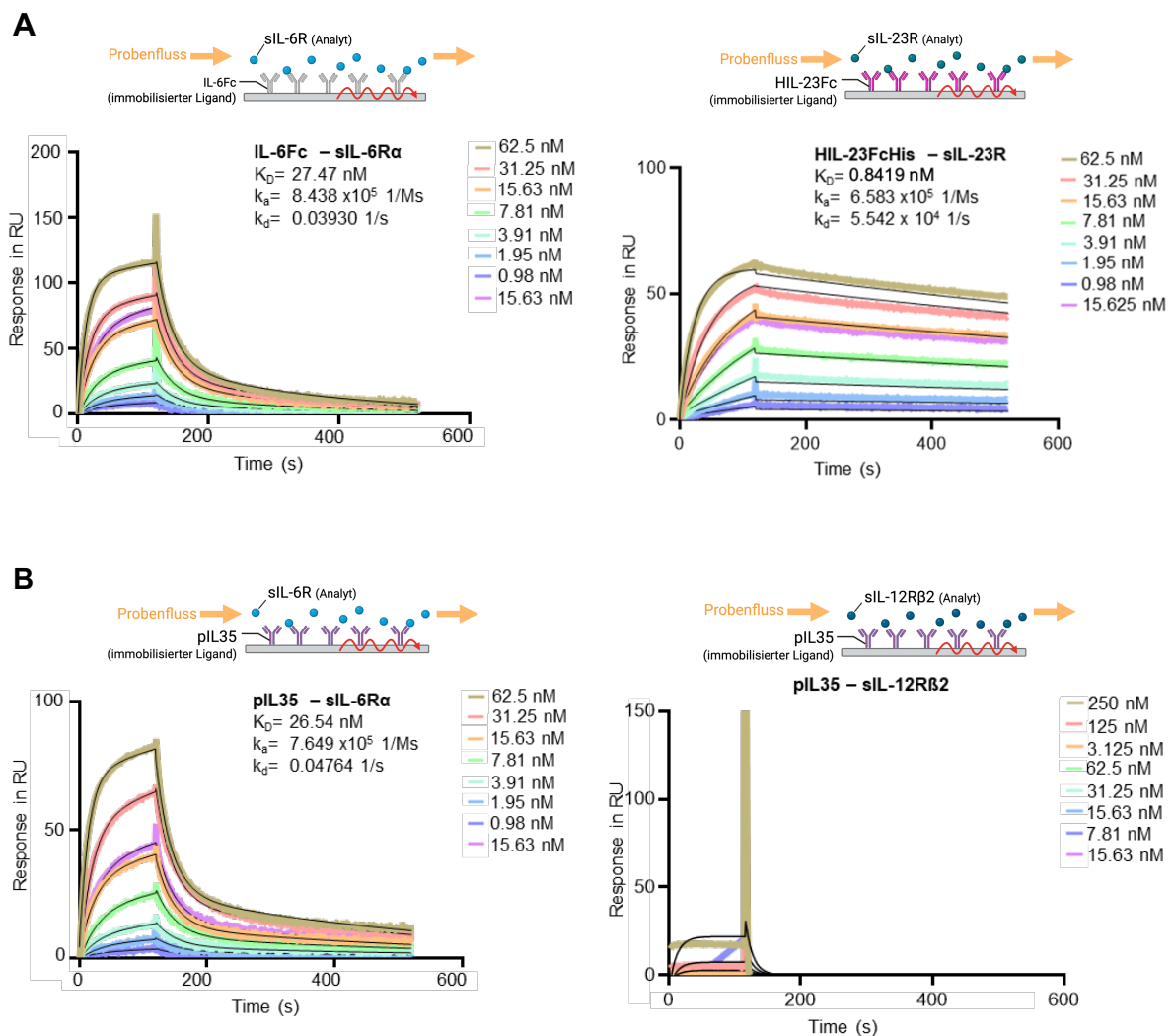
3.1.4.2.2 Oberflächenplasmonenresonanz zur Bindungsanalyse der Chimäre

Die SPR-Spektroskopie diente der Analyse von Ligand-Rezeptor-Interaktionen auf biophysikalischer Ebene. Ein Maß der Interaktion zwischen Proteinen ist die Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D). Die K_D stellt über folgende Formel den Zusammenhang zwischen der Assoziations- k_a und Dissoziationskonstante k_d her:

$$K_D = \frac{k_a}{k_d}$$

Je kleiner die K_D ist, desto höher ist die Affinität zwischen den Interaktionspartnern, da die Assoziation einen höheren Wert als die Dissoziation aufweist.

Die Zytokine hIL-6, pIL35 und pIL19 als Fc-Fusionsproteine wurden auf einem Protein-A-Chip nicht-kovalent gebunden (Nomenklatur unten: hIL-6Fc, pIL35, pIL19). Die Analyten wurden in einer 1:2 Verdünnungsreihe (0,9765 – 500 nM) angesetzt, die Assoziation für 120 s und die Dissoziation für 400 Sekunden aufgezeichnet (vgl. Abb. 20).



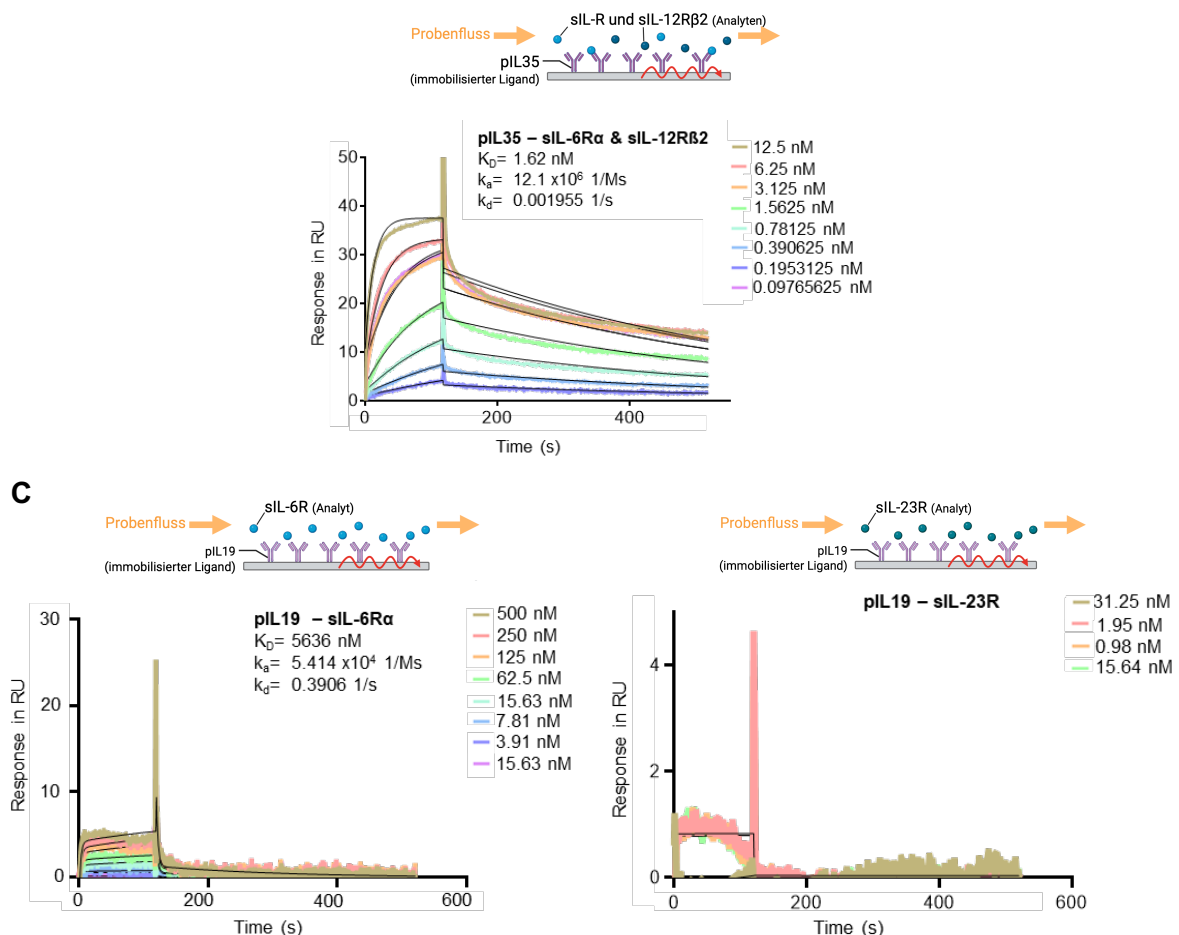


Abb. 20: Bindungskinetik von pIL35 und pIL19 an die löslichen Rezeptoren sIL-6Rα und sIL-23R.

Die Fc-fusionierten Liganden (hIL-6Fc/HIL-23Fc/pIL35/pIL19) wurden an einem Protein-A-Chip gekoppelt, so dass eine Response Unit (RU; y-Achse) von bis zu 200 RU analysiert werden kann. Die Bindungsinteraktion der löslichen Rezeptoren (Analyten) wurde in absteigenden Konzentrationen (500 nM bis 0,9765 nM und 0 nM, interne Kontrolle von 15,63 nM) gemessen. Die Assoziation wurde für 120 s und die Dissoziation für 400 s aufgenommen (x-Achse: Zeit, englisch: „Time“ in Sekunden, s). **A)** Bindung von sIL-6Rα an hIL-6Fc (links) und sIL-23R an HIL-23Fc (rechts). **B)** Bindung von sIL-6Rα (links oben), sIL-12Rβ2 (rechts oben; Der Peak im Graphen ist durch einen abweichenden Puffer des darin gelösten hIL-12Rβ2 (Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland) bedingt) und in Kombination sIL-6Rα und sIL-12Rβ2 (mittig) an pIL35. **C)** Bindung von sIL-6Rα (links) und sIL-23R (rechts) an pIL19. Cartoons Created in <https://BioRender.com>.

Zunächst wurde die Affinität von hIL-6Fc und sIL-6Rα mit einer $K_D = 27,47 \text{ nM}$ und HIL-23Fc zu sIL-23R mit einer $K_D = 0,8419 \text{ nM}$ bestimmt, welches als endogene Kontrolle für die synthetischen Zytokine diente (vgl. Abb. 20A). Eine ähnliche Affinität des IL-6/IL-6R-Komplexes von $K_D = 22 \text{ nM}$ (immobilisierter sIL-6R) wurde bereits durch Baran *et al.* beschrieben [207]. Anschließend wurde die Bindungskinetik von pIL35 und den sIL-6Rα und sIL-12Rβ2 untersucht (vgl. Abb. 20B). Die Affinität von 26,54 nM von pIL35 zu sIL-6Rα war vergleichbar mit der Affinität von IL-6Fc zu sIL-6Rα ($K_D = 27,47 \text{ nM}$) – während keine Bindung zu sIL-12Rβ2 nachgewiesen wurde. Die Bindung von pIL35 an den sIL-12Rβ2, wie es bei IL-12 der Fall ist, konnte nicht nachgewiesen werden.

Zudem wurde die Affinität von pIL35 zu beiden Rezeptoren sIL-6Rα und sIL-12Rβ2 untersucht (vgl. Abb. 20B mittig). Die K_D von 1,62 nM wies eine höhere Assoziation und niedrigere Dissoziation auf, was auf eine unterstützende Konformationsänderung beider Rezeptoren beruhen könnte. Dies deutet auf eine unveränderte Bindungsstelle I im hIL-6-Grundgerüst des pIL35 hin, da die Bindung zum sIL-6Rα mit dem natürlichen hIL-6 vergleichbar ist.

Zur Analyse der Bindungskinetik des pIL19 wurden sIL-6Rα und sIL-23R jeweils einzeln gemessen (vgl. Abb. 20C). Das synthetische Zytokin pIL19 bindet weder den sIL-6Rα noch den hIL-23R. Die Bindungsstelle I des IL-6-Grundgerüsts sowie die zu p19 ausgetauschte Bindungsstelle III scheinen ihre korrespondierende Rezeptorbindung (hIL-6R und hIL-23R) verloren zu haben.

Die generierten Chimäre pIL35 und pIL19, mit denen die Rezeptoren der IL-6- und IL-12-artiger Zytokine kombiniert werden sollten, indem die Bindestelle III des IL-6-*Backbones* strukturhomolog gegen p35 bzw. p19, die α -Untereinheiten von IL-12 und IL-23, ausgetauscht wurde, zeigten zusammenfassend keinerlei biologische Aktivität weder in Stimulations- noch in Proliferationsanalysen. Die Untersuchung zur Bindungskinetik (Immunpräzipitation und Oberflächenplasmonenresonanz) zeigten eine Bindung des pIL35 an den hIL-6R mit vergleichbarer Affinität wie der natürliche IL-6/sIL-6R-Komplex (K_D : 26,54 nM vs. 27,47 nM). Damit scheint die *Site I* des IL-6-*Backbones* im pIL35 strukturell nicht beeinflusst worden zu sein. Die hohe Assoziation von pIL35 an den sIL-6R, wenn zeitgleich sIL-12R β 2 vorliegt (vgl. Abb. 20B mittig), könnte auf eine unterstützende Konformationsänderung beider Rezeptoren hinweisen, wobei eine alleinige Bindung von pIL35 an den sIL-12R β 2 nicht nachgewiesen werden konnte. Für pIL19 konnte weder eine Bindung an den sIL-6R noch an den sIL-23R gezeigt werden, was die Inaktivität begründet.

3.2 Aktivierungsmuster metabolisch relevanter Zielzellen

Ziel dieser Arbeit war neben der Generierung der neuen Cytokimera pIL35 und pIL19 nach dem Vorbild von IC7Fc die weiterführende *in vitro*-Charakterisierung der biologisch aktiven Cytokimera GIL-6, GIO-6 und GIL-11. Die biologische Aktivität von GIL-6 und GIO-6 wurde bislang ausschließlich in murinen Ba/F3-Zellen mit entsprechender humaner Rezeptorexpression untersucht. Die Stimulation dieser Zelllinien induziert STAT3- und ERK-Phosphorylierung sowie Proliferation und belegt damit die Funktionalität der Cytokimera [354].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde geprüft, ob GIL-6 und GIO-6 (GIL-11 war aufgrund von Verunreinigungen nur eingeschränkt einsetzbar) auch in metabolisch relevanten Zelllinien eine Signaltransduktion und Proliferation auslösen. Langfristiges Ziel ist, analog zu IC7Fc, eine potenzielle Anwendung in *in vivo*-Mausmodellen und perspektivisch in der Therapie des Typ-2-Diabetes mellitus zu evaluieren (vgl. Kapitel 1.6.1).

Untersucht wurden die etablierten Zelllinien C2C12 (murine Myoblasten), HepG2 (humane Hepatozyten) und Hepa1-6 (murine Hepatozyten) als metabolisch repräsentative Modelle. Zunächst wurden Stimulationsassays durchgeführt, um die Expression der für die Signaltransduktion erforderlichen Rezeptoren zu prüfen. Bei nachweisbarer Stimulierbarkeit durch GIL-6, GIO-6 (und gegebenenfalls GIL-11) sollten nachfolgend Analysen des Energiestoffwechsels mittels *Seahorse*-Assay erfolgen.

Die Stimulation erfolgte mit humanen und murinen Zytokinen der IL-6- und IL-12-Familie, den entsprechenden Cytokimera sowie Insulin. Dabei ist zu berücksichtigen, dass zwischen humanen und murinen Zytokinrezeptorkonstellationen *Crosstalks* sowie zwischen Mitgliedern verschiedener Zytokinfamilien funktionelle Promiskuitivitäten bestehen (vgl. Kapitel 1.5).

3.2.1 Muskuläre C2C12-Zellen

C2C12-Zellen sind murine Myoblasten. Bei den an Tag 0 (T0) 80%-konfluenten C2C12-Zellen wurde das DMEM^{+/+}-Medium gegen C2C12-Differenzierungsmedium getauscht (vgl. Differenzierung von C2C12-Zellen im Kapitel 2.2.3.2). Hierdurch wird der Differenzierungsvorgang eingeleitet. Die C2C12-Zellen entwickeln sich zu kontraktile, spindel-förmigen Myotuben. Die Differenzierung kann neben der Kultivierung in niedrig-Serum-Leveln (geringerer pro-proliferativer Anteil an Wachstumsfaktoren im Serum ausgewachsener Pferde im Vergleich zum Wachstumsfaktor-Anteil in fetalem Kälberserum) durch Elektrostimulation (Kontraktion und Kontaktinhibition (Konfluenz >85%)) induziert werden [369]. Der Folgetag nach initialem Mediumwechsel ist als (Differenzierungs-) Tag 1 (T1) definiert, der zweite Tag nach initialem Mediumwechsel als T2. Es wurde bis T7 bzw. T14 differenziert.

Vor dem Hintergrund, dass chronisch erhöhtes IL-6 im Rahmen einer Meta-Inflammation, wie diese bei Typ 2 Diabetes mellitus auftritt, zum Verlust von Muskelmasse führt [370-372] währenddessen akut erhöhtes IL-6, welches bei Muskelkontraktion autokrin von den Myozyten sezerniert wird und zu Satellitellendifferenzierung und Myozythypertrophie führt [259, 261], wurden die muskulären C2C12-

Zellen mit IL-6 artigen Zytokinen stimuliert, genauso wie mit IL-12 artigen Zytokinen, den Cytokimera IC7, GIL-6 und GIO-6, außerdem mit Insulin.

Auf eine Signaltransduktion hin analysiert wurden C2C12-Zellen sowohl im undifferenzierten als auch im differenzierten Stadium, da sich mit Differenzierungsgrad auch die Signaltransduktionsstärke [373] und die Rezeptorexpression dieser Zellen, wie aus dieser Arbeit hervorgeht, verändert. Das durch IL-6-artige Zytokine induzierte *Signalling* ist vorwiegend der JAK1/2-STAT3- in C2C12-Myoblasten [373-375], außerdem der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg [374], allerdings weniger stark ausgeprägt. IL-12-artige Zytokine aktivieren ebenfalls den JAK-STAT-Signalweg [376]. Durch Zytokinstimulation der C2C12-Zellen mit konsekutiver Signaltransduktion wird wiederum die Proliferation, der Differenzierungsgrad und die damit einhergehende Rezeptorexpression beeinflusst [374]. Serumdepriviert wurden die adhärennten Zellen über vier Stunden, stimuliert über 15 Minuten. Als Positivkontrolle für die STAT3-Aktivierung (Phosphorylierung) wurden die Zellen mit hIL-11 oder hIL-6 behandelt, für die Akt-Aktivierung mit humanem (h) Insulin. Die Negativkontrolle blieb unbehandelt.

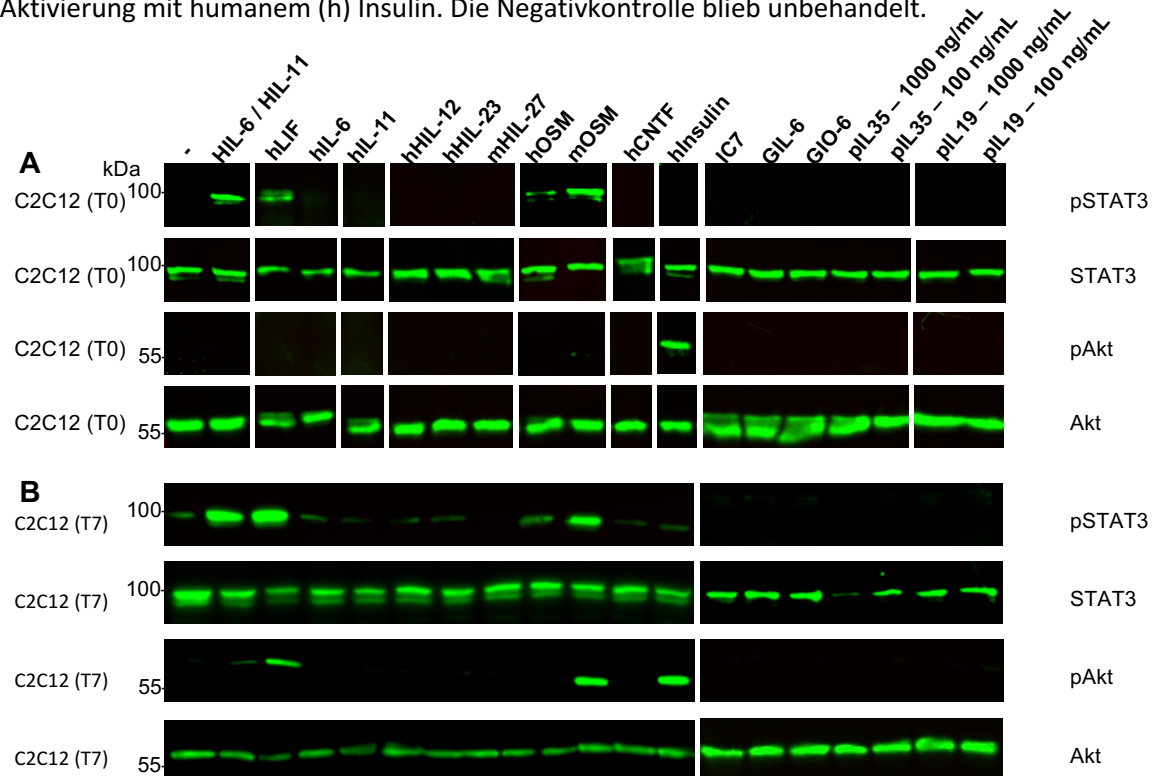


Abb. 21: C2C12-Zellen sind in verschiedenen Differenzierungsstadien durch LIF, OSM und Insulin stimulierbar. Fluoreszenzbasierter Western Blot α -pSTAT3 und α -STAT3. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μ g Protein. Die undifferenzierten (T0) und sieben-tägig differenzierten (T7) C2C12-Zellen wurden über 4h gestarvt. Nach 15-minütiger Zytokin-Stimulation (hLIF (10 ng/mL), hIL-6 (10 ng/mL), hIL-11 (100 ng/mL), hHIL-12 (200 ng/mL), hHIL-23 (200 ng/mL), mHIL-27 (50 ng/mL), hOSM (10 ng/mL), mOSM (50 ng/mL), hCNTF (100 ng/mL), IC7 (100 ng/mL), GIL-6 (200 ng/mL), GIO-6 (200 ng/mL), pIL35 (1000 ng/mL und 100 ng/mL), pIL19 (1000 ng/mL und 100 ng/mL)) erfolgt bei aktiver Ligand-Rezeptor-Interaktion eine Phosphorylierung von STAT3 bzw. Akt. Zur Referenz der Molekulargewichte von STAT3 und pSTAT3 (beides 79,86 kDa) und Akt sowie pAkt (beides 60 kDa) wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Als Negativkontrolle (-) gelten Zytokin-unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle für die STAT3-Phosphorylierung dient die Stimulation mit hHIL-11 (100 ng/mL) oder hHIL-6 (0,2 Volumenprozent). hIL-11/6 bindet an das auf allen kernhaltigen Zellen repräsentierte, signaltransduzierende gp130. Als Positivkontrolle für die Akt-Phosphorylierung dient hInsulin (500 ng/mL). **A)** Undifferenzierte (T0) C2C12-Zellen: Eine STAT3-Phosphorylierung wurde nach Stimulation mit hLIF, hOSM und mOSM nachgewiesen. **B)** Differenzierte (T7) C2C12-Zellen: Eine STAT3- und Akt-Phosphorylierung wurde nach Stimulation hLIF und mOSM nachgewiesen. Lediglich eine leichte nach hOSM und eine nicht konsistente STAT3-Phosphorylierung nach hIL-6, hIL-11, hHIL-12, hHIL23 und hCNTF -Stimulation wurde dargestellt. Auch unstimulierte T7-C2C12-Zellen weisen pSTAT auf, was auf eine konstitutive Aktivierung von STAT im Rahmen einer erhöhten Passagenzahl (*hier*: 10) oder auf eine unvollständige Serum-Deprivation nach 4h Starvation der adhärennten Zellen hinweisen könnte. n=3. kDa: Kilodalton.

Die T7-C2C12-Zellen zeigen mehr STAT3-Aktivierung als die undifferenzierten Zellen. Neben pSTAT3 (79,86 kDa) nach hLIF-, hOSM- und mOSM-Stimulation, welche auch bei den T0-Zellen nachweisbar ist (vgl. Abb. 21A und B), wird STAT3 auch unter hIL-6, hIL-11, hHIL-12, hHIL23 und hCNTF in den differenzierten Zellen nicht konsistent phosphoryliert (vgl. Abb. 21B). In diesen kommt es unter hLIF und mOSM nicht nur zu einer STAT3-, sondern auch zu einer Akt-Phosphorylierung (60 kDa) (vgl. Abb. 21B).

Da die T7-Zellen nach hIL-6-Stimulation nur eine geringe Aktivierung zeigten (geringe pSTAT3-Bandenintensität (vgl. Abb. 21B)) und kein pSTAT3 nach Stimulation mit den aktiven Cytokimera IC7, GIL-6 und GIO-6, die allesamt zur Induktion einer Signaltransduktion den IL-6R benötigen, detektierbar war, wurden weitere Untersuchungen zum *Screening* auf den mL-6R auf den C2C12-Zellen angeschlossen. Als weitere Untersuchungen wurden ein IL-6-spezifischer Stimulationsassay (vgl. Abb. 22), eine qPCR- (vgl. Abb. 23) und FACS-Analyse (vgl. Abb. 24) durchgeführt.

In den IL-6-spezifischen Stimulationsassays (Abb. 22) wurden die C2C12-Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien mit h-IL6 stimuliert (Negativkontrolle: unstimulierte Zellen; Positivkontrolle: HIL-6). Ziel war die Erfassung von pSTAT3/pAkt im Western Blot, hergeleitet aus der Hypothese, dass die mL-6R-Expression vom Differenzierungsstadium der C2C12-Zellen abhängt.

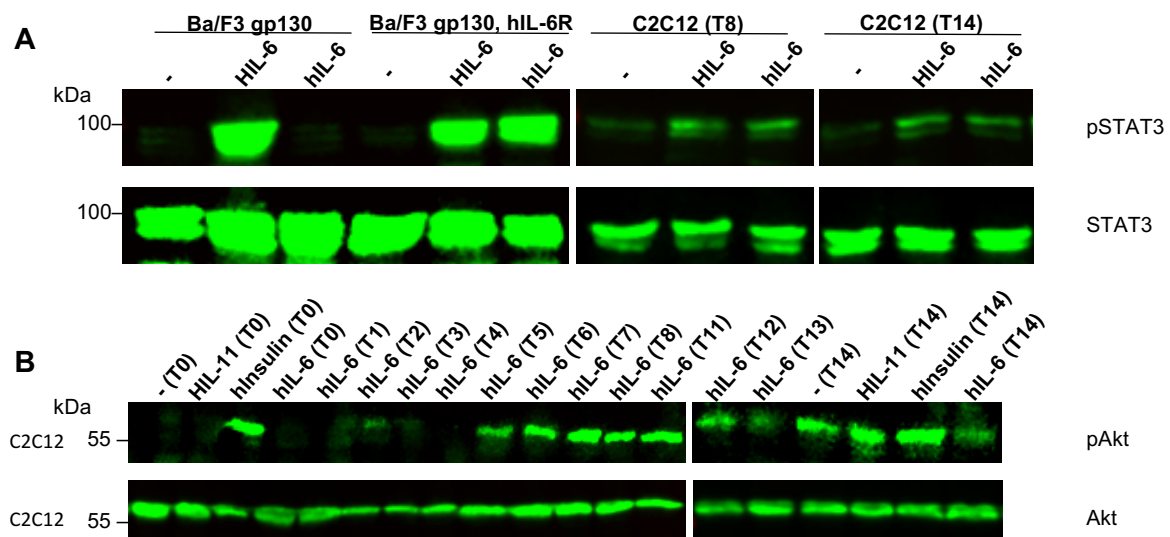


Abb. 22: Stimulationsassay. hIL-6-Stimulation von C2C12-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien. Phosphorylierung von STAT3 ab dem achten Differenzierungstag, von Akt ab dem fünften Differenzierungstag. Fluoreszenzbasierter Western Blot α -pSTAT3, α -STAT3 sowie α -pAkt und α -Akt. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μ g Protein. Die undifferenzierten (T0) und differenzierten (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8, T11, T12, T13, T14) C2C12-Zellen wurden über 4h gestarvt. Nach 15-minütiger hIL-6-Stimulation (20 ng/mL für (p)STAT3 und 10 ng/mL für (p)Akt) erfolgt bei aktiver und ausreichender Ligand-Rezeptor-Interaktion eine Phosphorylierung von STAT3 bzw. Akt. Zur Referenz der Molekulargewichte von STAT3 und pSTAT3 (beides 79,86 kDa) und Akt sowie pAkt (beides 60 kDa) wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Als Negativkontrolle (-) gelten Zytokin-unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle für die STAT3-Phosphorylierung dient die Stimulation mit hHIL-11 (100 ng/mL) oder hHIL-6 (0,2 Volumenprozent). HIL-11/6 bindet an das auf allen kernhaltigen Zellen repräsentierte, signaltransduzierende gp130. Als Positivkontrolle für die Akt-Phosphorylierung dient hInsulin (500 ng/mL). **A)** Differenzierte (T8 und T14) C2C12-Zellen zeigen eine STAT3-Phosphorylierung nach hIL-6-Stimulation. Als Positivkontrolle eine aktiven hIL-6 wurde die Zelllinie Ba/F3 gp130, hIL-6R stimuliert. n=1. **B)** Eine Phosphorylierung von Akt nach hIL-6-Stimulation tritt bei C2C12-Zellen auf, die fünf Tage (T5) oder mehr (T6, T7, T8, T12, T13, T14) differenziert worden waren. Auch unstimulierte T14-C2C12-Zellen weisen pAkt auf, was auf eine konstitutive Aktivierung von Akt im Rahmen einer erhöhten Passagezahl (*hier*: 14) hinweisen könnte oder unvollständige Serum-Deprivation nach 4h Starvation der adhären Zellen. n=1. kDa: Kilodalton.

In den IL-6-spezifischen Stimulationsassays (Abb. 22) zeigen sich eine Phosphorylierung von Akt ab T5, von STAT3 ab T8, wobei pSTAT3 für T5 nicht vergleichend untersucht wurde. Die Beobachtungen sind mit der aufgestellten Hypothese vereinbar. Um zu verifizieren, dass der mL-6R ab Differenzierungstag

5 in einer zur Signaltransduktion (pSTAT3/pAkt) führenden Menge exprimiert wird, wurden eine qPCR und eine FACS-Analyse angeschlossen.

Normiert wurden die zu untersuchende Expression des mL-6R auf die Expression des *House-Keeping-Genes* Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Als Negativkontrolle gilt die Zelllinie Ba/F3 gp130, sie verfügt über keinen h/mL-6R. Simultan wurden qPCRs zur Detektion der Differenzierungsmarker MyoD (*Myoblast determination protein 1*) und Myog (Myogenin) durchgeführt. Beide Marker sind Regulatoren der Myogenese. Ihre Expression steigt im Verlauf der Differenzierung von Myoblasten zu kontraktile Myotuben. MyoD und MyoG werden nicht in undifferenzierten Myoblasten exprimiert.

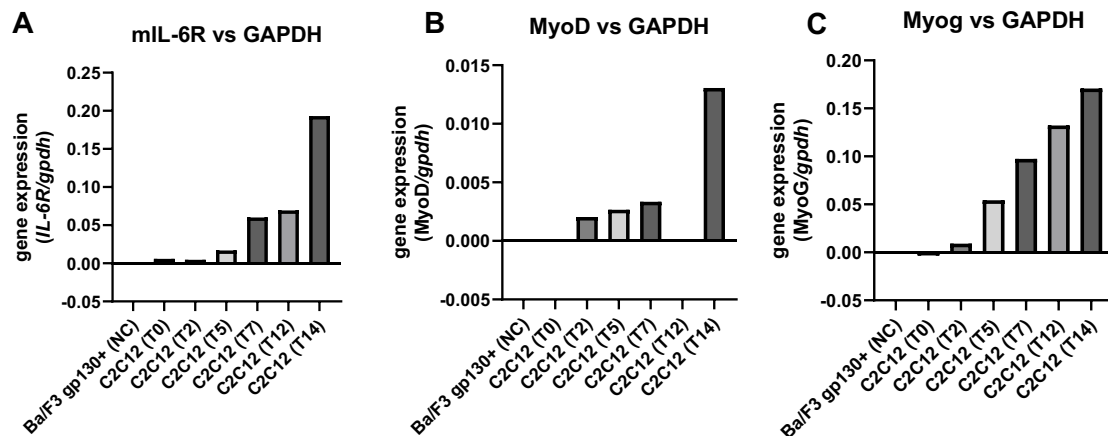


Abb. 23: qPCR. Screening auf den mL-6R auf der C2C12-Oberfläche in verschiedenen Differenzierungsstadien. Der mL-6R wird auf C2C12-Zellen exprimiert, die fünf oder mehr Tage differenziert worden waren.

Es wurde die RNA aus den Zelllysaten von Ba/F3 gp130 -Zellen und aus C2C12-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien (T0, T2, T5, T7, T12, T14) isoliert. Die Zelllinie Ba/F3 gp130 präsentiert keinen IL-6R auf ihrer Zelloberfläche und dient somit als Negativkontrolle (NC). Relativiert wurde auf die RNA-Quantität des *House-Keeping-Genes* Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **A)** Genexpression des mL-6R. Undifferenzierte oder zweitägig differenzierte C2C12-Zellen exprimieren keinen mL-6R. Die quantitative mL-6R-Expression nimmt im weiteren Verlauf der Differenzierung (ab T5) zu. n=1. **B)** Der Marker MyoD (*Myoblast determination protein 1*) steigt mit zunehmender Differenzierung. T12 wurde exkludiert. n=2. **C)** Der Marker Myog (Myogenin) steigt ebenfalls mit zunehmender Differenzierung. n=2.

Die Daten der Genexpressionsanalyse mittels qPCR zeigten eine Expression des mL-6R ab dem fünften Differenzierungstag (T5). Diese Expression nimmt bis T14 zu. Dies deutete sich in den vorangegangenen Stimulationsassays (vgl. Abb. 22) bereits an. In der nachfolgenden FACS-Analyse wurde die Präsentation des mL-6R auf der Zelloberfläche untersucht (vgl. Abb. 24).

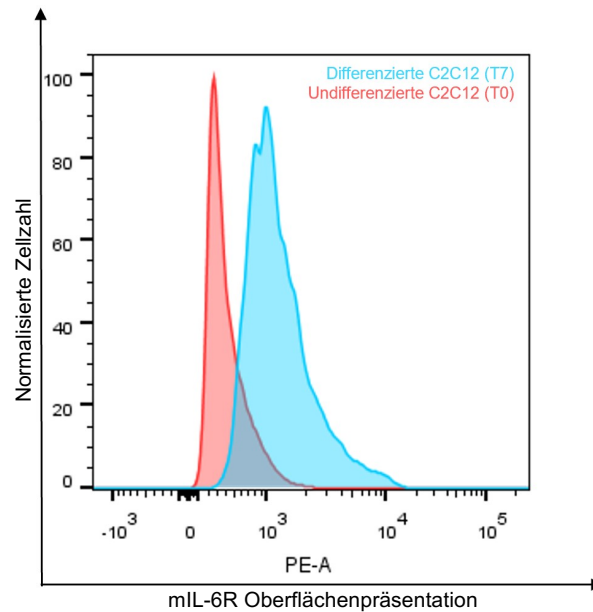


Abb. 24: FACS-Analyse. Der mIL-6R wird auf sieben-tägig differenzierten C2C12-Zellen exprimiert.

Pro Ansatz wurden $5 \cdot 10^5$ Ba/F3-Zellen analysiert. Die Intensitätszunahme der Fluoreszenz (Rechts-Shift auf der x-Achse) repräsentiert das Maß der mIL-6R-Oberflächenpräsentation. Der gegen den mIL-6R gerichtete Antikörper verfügt über ein Fluorophor mit Emission spezifischer Wellenlänge (Emissionsmaximum bei 576 nm). Die y-Achse zeigt die auf den absoluten Maximalwert normalisierte Zellzahl. $n=1$.

Vergleichend untersucht wurden T0- und T7-Zellen. Die adhärenen Zellen wurden zum Schutz der Oberflächenproteine mittels Accutase zwecks Analyse gelöst. Es wurde ein α -mIL-6R (CD126) Phycoerythrin (PE)-gekoppelter Primärantikörper verwendet. Eine Zunahme der PE-Emission bei 576 nm zeigt das Vorhandensein des mIL-6R auf der C2C12-Zelloberfläche an. Diese wird durch den Rechts-Shift des Graphen visualisiert. Damit wurden die Ergebnisse der Stimulationsassays (vgl. Abb. 21 und 22) und der Genexpressionsanalyse (qPCR) (vgl. Abb. 23) verifiziert: Die Expression des mIL-6R nimmt im Differenzierungsvorgang der C2C12-Zellen zu und ist ab T5 insbesondere durch sensitive Verfahren (qPCR und IL-6-spezifischer Stimulationsassay) nachweisbar.

Da die C2C12-Zellen den mIL-6R erst im Verlauf ihres Differenzierungsvorgangs auf ihrer Oberfläche mit zunehmender Tendenz präsentieren, sind diese nicht einheitlich durch die aktiven Cytokimera IC7, GIL-6 und GIO-6 stimulierbar (vgl. Abb. 21), obgleich die ebenfalls notwendigen LIF- und OSM-Rezeptoren in jedem Differenzierungsstadium exprimiert werden. Damit sind die C2C12-Zellen für weitere GIL-6/GIO-6-Analysen über Alterationen im Energiemetabolismus ungeeignet.

3.2.2 Hepatozelluläre HepG2- und Hepa1-6 -Zellen

Zwecks weiterer Charakterisierung von GIL-6 und GIO-6 wurden im Folgenden die Aktivierungsmuster (pSTAT3) von Hepatozyten (humanen HepG2- und murinen Hepa1-6-Zellen) analysiert. Die Hepatoma-Zellen stellen ebenfalls metabolisch relevante Zelllinien dar und wurden mit Zytokinen der IL-6- und IL-12-Familie sowie mit Cytokimera stimuliert. Die Stimulierbarkeit der Hepatoma-Zellen durch aktives GIL-6 und GIO-6 – als Pendant zum aktiven IC7Fc – stand angesichts des finalen *Seahorse*-Assays (Analyse der Metabolismusalteration nach Cytokimera-Stimulation) im Fokus.

3.2.2.1 HepG2-Zellen

HepG2-Zellen sind Hepatoma-Zellen humanen Ursprungs. Die durchgeführten Stimulationsassays zeigen eine STAT3-Phosphorylierung und damit Stimulierbarkeit durch hIL-6, hIL-11, hLIF, hOSM folglich ebenfalls durch IC7Fc, GIL-6, GIO-6 und GIL-11. Als Positivkontrolle wurde hIL-6 verwendet.

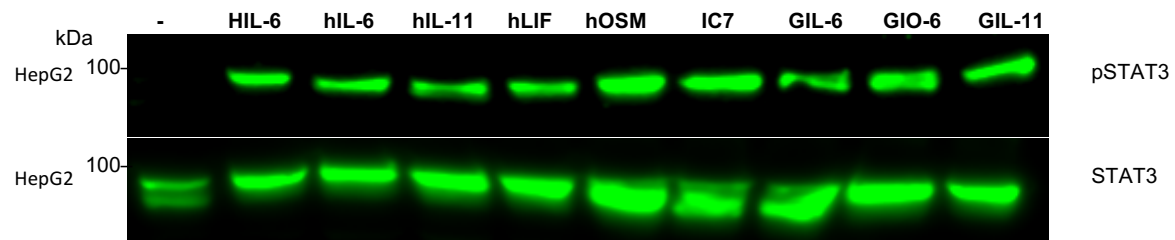


Abb. 25: Stimulationsassay von HepG2-Zellen.

Fluoreszenzbasierter Western Blot α -pSTAT3 und α -STAT3. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μ g Protein. HepG2-Zellen wurden über 4 h gestarvt. Nach 15 -minütiger Stimulation (h-IL6 (10 ng/mL), hIL-11 (100 ng/mL), hLIF (10 ng/mL), hOSM (10 ng/mL), IC7 (100 ng/mL), GIL-6 (100 ng/mL), GIO-6 (100 ng/mL), GIL-11 (100 ng/mL)) erfolgt bei aktiver und ausreichender Ligandrezeptorinteraktion eine Phosphorylierung von STAT3. Zur Referenz der Molekulargewichte von STAT3 und pSTAT3 (beides 79,86 kDa) wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Als Negativkontrolle (-) gelten Zytokin-unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle für die STAT3-Phosphorylierung dient die Stimulation mit hIL-6 (0,2 Volumenprozent). hIL-6 bindet an das auf allen kernhaltigen Zellen repräsentierte, signaltransduzierende gp130. Eine STAT3-Aktivierung ist nachweisbar nach Stimulation unter hIL-6, hIL-11, hLIF, hOSM, IC7, GIL-6, GIO-6 und GIL-11. n=3. kDa: Kilodalton.

Die für den finalen *Seahorse*-Assay etablierten HepG2-Zellen eignen sich dem zufolge aufgrund der Stimulierbarkeit durch die Cytokimera IC7Fc, GIL-6 und GIO-6, was hinweisend ist für die Expression des hIL-6R [377], hLIFR und des hOSMR zur weitere metabolische Analyse.

3.2.2.2 Hepa1-6-Zellen

Hepa1-6-Zellen sind das murine Äquivalent zu HepG2-Zellen. Die durchgeführten Stimulationsassays zeigten keine Signaltransduktion unter hIL-6 sowie den IL-6-artigen Cytokimera IC7Fc, GIL-6 und GIO-6 (vgl. Abb. 28A), was hinweisend auf eine fehlende Expression des mIL-6R ist.

Die fehlende IL-6- und Cytokimera-Stimulierbarkeit machte diese Zelllinie unbrauchbar für weitere Charakterisierungen der Designerzytokine. Folglich wurde eine neue Hepa1-6-Zelllinie, die den hIL-6R stabil exprimiert, generiert.

3.2.2.2.1.1 Generierung einer murinen Hepa1-6-Zelllinie, die den humanen IL-6R exprimiert

Die neue Zelllinie Hepa1-6 sollte zwecks angestrebter Stimulierbarkeit durch die Cytokimera zur weiteren Charakterisierung derer den humanen IL-6R (3xHA-getagt) auf der Zelloberfläche exprimieren. Methodisch erfolgte dies auf drei verschiedene Weisen: Transient via Elektroporation und chemischer Transfektion, stabil via retroviraler Transduktion.

Kontrolliert wurden die einzelnen Methoden durch α -HA Western Blot sowie durch Stimulationsassays (siehe Abb. 26, 27 und 28). Stimuliert wurde mit IL-6-artigen Zytokinen und den aktiven Cytokimera. Die stabile Transduktion des hIL-6R wurde zusätzlich mittels FACS-Analyse (vgl. Abb. 29) verifiziert.

3.2.2.2.1.2 Elektroporation

Verwendet wurde ein pMOWS-Vektor mit Puromycin-Resistenz, welche zur anschließenden Selektion diente. Die elektroporierten Zellen zeigten im Western Blot ein HA-Antigen, was auf eine erfolgreiche Nucleofektion hindeutete, genauso wie eine neu nachweisbare STAT3-Phosphorylierung nach hIL-6-Stimulation.

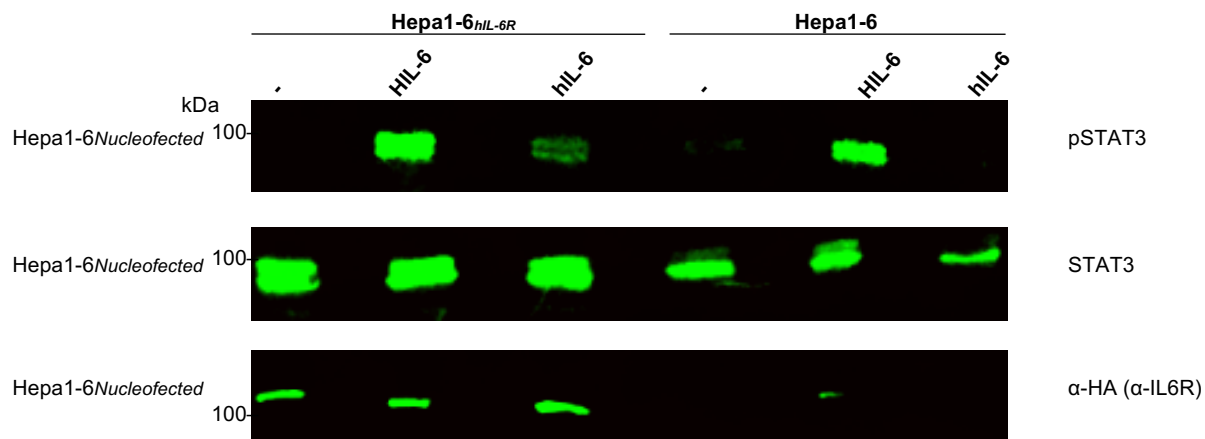


Abb. 26: Elektroporation des hIL-6R in Hepa1-6-Zellen.

Fluoreszenzbasierter Western Blot α -pSTAT3 und α -STAT3. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μ g Protein. Hepa1-6-Zellen wurden über 4 h gestarvt. Nach 15-minütiger hIL-6-Stimulation (10 ng/mL) erfolgt bei aktiver und ausreichender Ligand-Rezeptor-Interaktion eine Phosphorylierung von STAT3. Zur Referenz der Molekulargewichte von STAT3 und pSTAT3 (beides 79,86 kDa) wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Als Negativkontrolle (-) gelten Zytokin-unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle für die STAT3-Phosphorylierung dient die Stimulation mit hHIL-6 (0,2 Volumenprozent). HIL-6 bindet an das auf allen kernhaltigen Zellen repräsentierte, signaltransduzierende gp130. Eine STAT3-Aktivierung ist in den nukleofizierten Zellen nachweisbar nach Stimulation unter hIL-6. Demnach wird der neu elektroporierte hIL-6R (transient) auf der Hepa1-6-Zelloberfläche präsentiert. Dies lässt sich entsprechend durch den α -HA-Blot bestätigen. n=1. kDa: Kilodalton.

3.2.2.2.1.3 Chemische Transfektion

Verwendet wurde ein pcDNA3.1-Vektor. Die transfizierten Zellen zeigten im Western Blot ein HA-Antigen, was auf eine erfolgreiche Transfektion hindeutet, genauso wie eine neu nachweisbare STAT3-Phosphorylierung nach hIL-6-Stimulation.

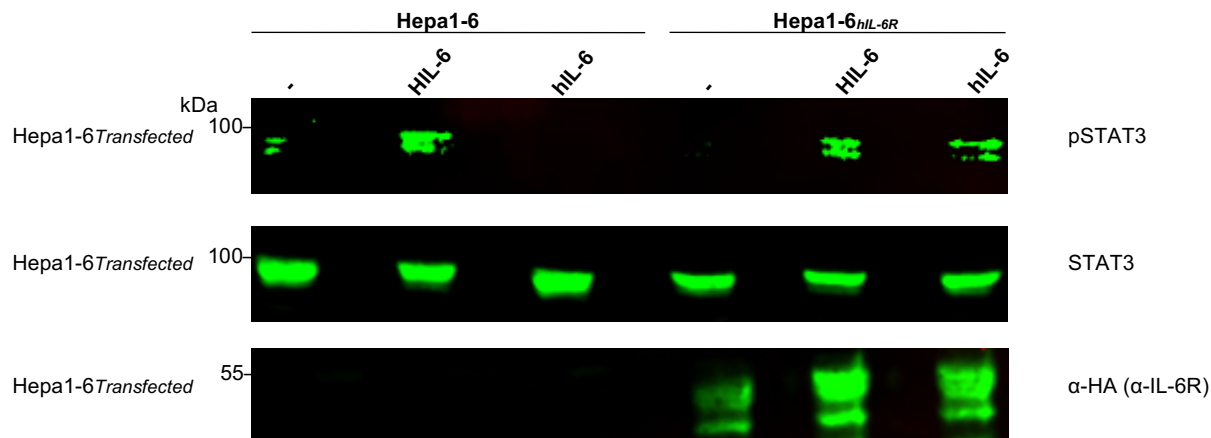


Abb. 27: Chemische Transfektion des hIL-6R in Hepa1-6-Zellen.

Fluoreszenzbasierter Western Blot α -pSTAT3 und α -STAT3. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μ g Protein. Hepa1-6-Zellen wurden über 4h gestarvt. Nach 15-minütiger hIL-6-Stimulation (20 ng/mL) erfolgt bei aktiver und ausreichender Ligand-Rezeptor-Interaktion eine Phosphorylierung von STAT3. Zur Referenz der Molekulargewichte von STAT3 und pSTAT3 (beides 79,86 kDa) sowie von hIL-6R-HA (55,2 kDa) wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Als Negativkontrolle (-) gelten Zytokin-unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle für die STAT3-Phosphorylierung dient die Stimulation mit hHIL-6 (0,2 Volumenprozent). HIL-6 bindet an das auf allen kernhaltigen Zellen repräsentierte, signaltransduzierende gp130. Eine STAT3-Aktivierung ist in den transfizierten Zellen nachweisbar nach Stimulation unter hIL-6. Demnach wird der neu transfizierte hIL-6R (transient) auf der Hepa1-6-Zelloberfläche präsentiert. Dies lässt sich entsprechend durch den α -HA-Blot bestätigen. n=1. kDa: Kilodalton.

3.2.2.2.1.4 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion führte zu einer stabilen Expression des hIL-6R auf der Hepa1-6-Zelloberfläche. Hiermit wurde die neue Zelllinie Hepa1-6_{hIL-6R} mit dem Ziel etabliert, im nachfolgenden *Seahorse*-Assay zur weiteren Charakterisierung der Cytokimera Anwendung zu finden. Verwendet wurde für die anschließende Selektion derselbe pMOWS-Vektor mit Puromycin-Resistenzgen wie bei der Elektroporation. Zur Kontrolle der erfolgreichen retroviralen Transduktion wurde hier neben α -HA Western Blot und Stimulationsassay (Abb. 28) auch eine FACS-Analyse (Abb. 29) angeschlossen.

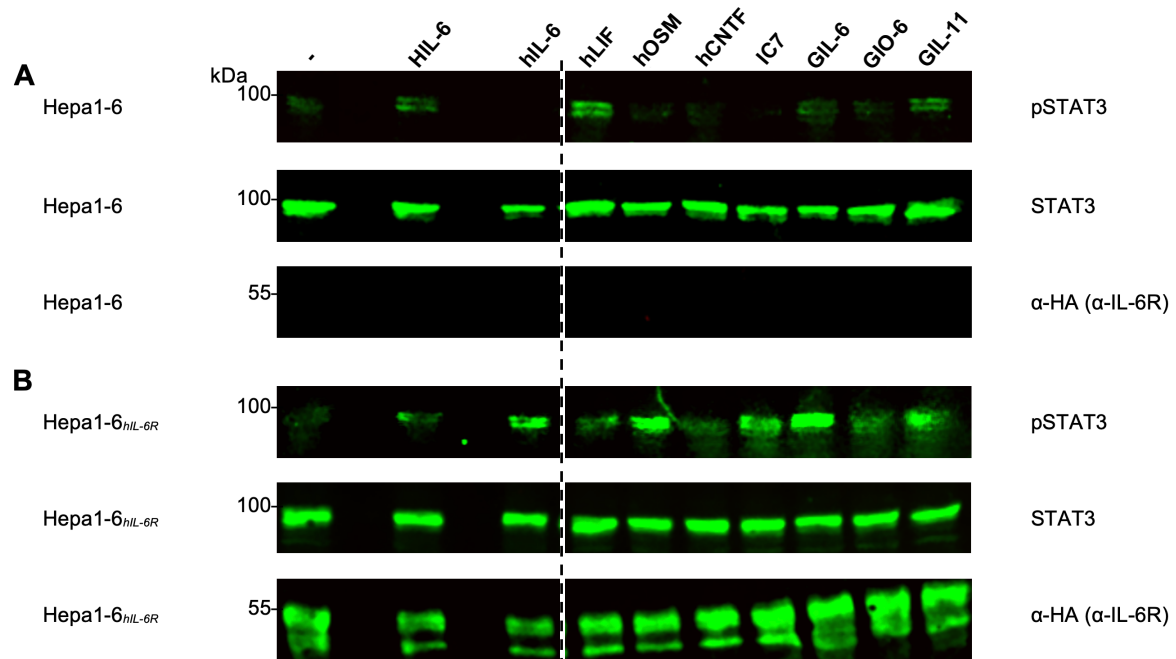


Abb. 28: Retrovirale Transduktion des hIL-6R in Hepa1-6-Zellen.

Fluoreszenzbasierter Western Blot α -pSTAT3 und α -STAT3. Aufgetragen wurden pro Spur 50 μ g Protein. Hepa1-6-Zellen wurden über 4h gestarvt. Nach 15-minütiger Stimulation (hIL-6 (10 ng/mL), hLIF (10 ng/mL), hOSM (10 ng/mL), hCNTF (10 ng/mL), IC7 (100 ng/mL), GIL-6 (100 ng/mL), GIO-6 (100 ng/mL), GIL-11 (100 ng/mL)) erfolgt bei aktiver und ausreichender Ligand-Rezeptor-Interaktion eine Phosphorylierung von STAT3. Zur Referenz der Molekulargewichte von STAT3 und pSTAT3 (beides 79,86 kDa) sowie von hIL-6R-HA (55,2 kDa) wurde der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Als Negativkontrolle (-) gelten Zytokin-unbehandelte Zellen. Als Positivkontrolle für die STAT3-Phosphorylierung dient die Stimulation mit hIL-6 (0,2 Volumenprozent). hIL-6 bindet an das auf allen kernhaltigen Zellen repräsentierte, signaltransduzierende gp130. **A)** Hepa1-6: Eine STAT3-Aktivierung in Hepa1-6-Zellen zeigt sich deutlich nach hLIF-Stimulation, schwach nach Stimulation mit GIL-11 und hOSM. Es ist keine STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit hIL-6, IC7, GIL-6, GIO-6 und CNTF nachweisbar. n=4. n(GIL-11)=3. **B)** Hepa1-6_{hIL-6R}: Eine STAT3-Aktivierung ist wie bei der Zelllinie Hepa1-6 nach Stimulation mit hLIF, GIL-11 und hOSM nachweisbar; außerdem nach hIL-6, IC7, GIL-6, GIO-6 und hCNTF-Stimulation, was hinweisend ist für eine erfolgreiche Transduktion und Expression des hIL-6R. Dies lässt sich entsprechend durch den α -HA-Blot bestätigen. n=1. kDa: Kilodalton.

Hepa1-6-Zellen zeigen eine deutliche STAT3-Phosphorylierung nach hLIF-Stimulation sowie eine schwache Aktivierung nach GIL-11 und hOSM. Eine Signaltransduktion unter hIL-6, hCNTF sowie IC7Fc, GIL-6 und GIO-6 ist nicht nachweisbar. Dies spricht für die Expression von mLIFR und mLIL-11R. Die fehlende STAT3-Phosphorylierung nach hIL-6 und den IL-6-basierte Cytokimera weist auf eine Abwesenheit des mLIL-6R hin, die fehlende Aktivierung durch hCNTF auf eine Absenz des CNTFR (vgl. Abb. 28A).

Nach stabiler Expression des humanen IL-6R (Hepa1-6_{hIL-6R}) wird eine STAT3-Phosphorylierung unter hIL-6, IC7Fc, GIL-6 und GIO-6 induziert, was die erfolgreiche Transduktion bestätigt. Zusätzlich reagieren diese Zellen auf hOSM und hCNTF mit pSTAT3 (vgl. Abb. 28B).

Die hOSM-induzierte Signaltransduktion ist mLIFR-vermittelt [192-194, 378], da hOSM nicht an den mOSMR bindet [192]. Eine mOSMR-Expression kann daher funktionell nicht validiert werden. GIO-6 wirkt entsprechend über hIL-6R und mLIFR [354].

Die schwache hCNTF-Antwort tritt ausschließlich in den transduzierten Zellen auf und ist daher hIL-6R-vermittelt (Rezeptor-Promiskuitivität, vgl. Kapitel 1.5) [3, 139, 334-336], nicht mCNTFR-abhängig.

Zur weiteren Validierung der hIL-6R-Transduktion in die Hepa1-6_{hIL-6R}-Zellen wurde eine FACS-Analyse angeschlossen (vgl. Abb. 29).

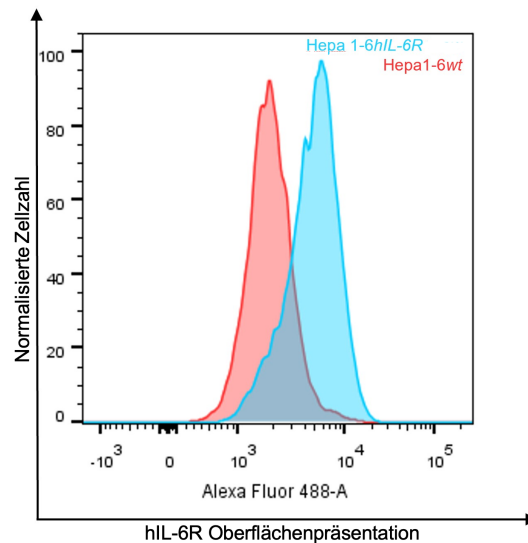


Abb. 29: FACS-Analyse. Der hIL-6R wird auf den transduzierten Hepa1-6_{hIL-6R}-Zellen präsentiert.

Pro Ansatz wurden $5 \cdot 10^5$ Hepa1-6-Zellen analysiert. Die Intensitätszunahme der Fluoreszenz (Rechts-Shift auf der x-Achse) repräsentiert das Maß der hIL-6R-Oberflächenpräsentation. Der gegen den hIL-6R gerichtete Antikörper verfügt über ein Fluorophor (Emissionsmaximum 520 nm). Die y-Achse zeigt die auf den absoluten Maximalwert normalisierte Zellzahl. n=1.

Die erfolgreiche hIL-6R-Transduktion in die Hepa1-6-Zellen konnte durch Stimulationsassays und FACS-Analyse bestätigt werden.

Die neue Zelllinie Hepa1-6_{hIL-6R} sind also responsiv auf die aktiven Cytokimera IC7Fc, GIL-6 und GIO-6 und GIL-11. Die neue Zelllinie kann demnach für die weitere Charakterisierung mit Fokus auf durch Cytokimera induzierte metabolische Alterationen im *Seahorse*-Assay im Rahmen nachfolgender Arbeiten Verwendung finden, denn für diese Methodik bestehen bereits etablierte Protokolle für Hepa1-6-Zellen.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei neue chimäre Zytokine (die Cytokimera pIL35 und pIL19) aus zwei strukturell verschiedenen Zytokin-Familien, der IL-6- und der IL-12-Familie, generiert und auf ihre biologische Aktivität hin analysiert. Die Struktur der IL-6-artigen Zytokine im *Classic-Signalling* ist monomerisch (vier- α -helikal) (vgl. 1.3.3) [153, 154, 379], während diese der IL-12-artigen Zytokine dimerisch, aus einer ebenfalls vier- α -helikalen α -Untereinheit [322, 325] und einer β -Untereinheit, die einem löslichen IL-6-artigen Rezeptor ähnelt [5], ist (vgl. Kapitel 1.4.3). Das Design der neuen Chimäre pIL35 und pIL19 wurde –analog zu IC7– durch den möglichst deckungsgleichen Austausch von Abschnitten vier- α -helikaler Strukturen vorgenommen. So wurde die *Site III* des hIL-6 durch strukturalomologe, Rezeptor-bindende Abschnitte des p35 bzw. des p19 (α -Untereinheit des hIL-12 bzw. des hIL-23) ausgetauscht. Das neue chimäre Zytokin pIL35 soll somit mit seiner IL-6-artigen *Site I* und *Site II* den nicht-signaltransduzierenden humanen (h) IL-6R α bzw. den signaltransduzierenden β -Rezeptor hgp130 binden. Mit der transferierten *Site III* (p35-Abschnitt) soll der hIL-12R β 2 gebunden werden. Analoges gilt für pIL19, hier sollte die *Site III* den korrespondierenden Rezeptor hIL-23R binden (vgl. Abb. 11). Mit den Cytokimera werden demnach kalkulierte Rezeptorkonstellationen spezifisch adressiert. Damit wird die responsive Zellpopulation gesteuert eingegrenzt, und damit die Tragweite der Effekte beschränkt – im Gegensatz zu den pleiotropen und teils redundanten ggf. damit einhergehenden amplifizierenden Wirkungen der natürlichen Zytokine [336, 380]. Da die Cytokimera-bindenden Rezeptorkonstellationen von keinem natürlichen Zytokin gebunden würden, sind modifizierte *Signallings* mit konsekutiv veränderten *Outcomes* zu erwarten. Vor diesem Hintergrund wurden die im hiesigen Institut bestätigt aktiven Cytokimera (GIL-6, GIO-6, GIL-11) in dieser Arbeit weiter charakterisiert. Die Bioaktivität und Spezifität von GIL-6, GIO-6 und GIL-11 wurde bisher nur auf retroviral transduzierten Ba/F3-Zelllinien, die sicher die passenden humanen Rezeptoren exprimieren, untersucht. Zur weiteren Charakterisierung sollte nun die Stimulierbarkeit metabolisch relevanter Zelllinien (muskuläre murine C2C12-, sowie hepatische murine Hepa1-6- und hepatische humane HepG2-Zellen) untersucht werden. Die Aktivierungsmuster dieser Zelllinien wurden referierend durch weitere IL-6- und IL-12-artiger Zytokine analysiert. In diesem Zusammenhang zu beachten sind Rezeptor-Promiskuitivitäten und Interspezies-*Crosstalks* (vgl. Kapitel 1.5). Durch Kenntnis der Stimulierbarkeit können die Cytokimera-responsiven Zelllinien zukünftig im *Seahorse*-Assay Verwendung finden, und so die Cytokimera-induzierten Alterationen im intrazellulären Metabolismus untersucht werden; mit dem perspektivischen Ziel des therapeutischen Einsatzes im metabolischen Syndrom/T2DM, ähnlich zum IC7Fc von Findeisen *et al.* [351] (vgl. Kapitel 1.6.1), nachdem dem *Seahorse*-Assay angeschlossene *in vivo*-Studien (z.B. in der Maus) zur Erforschung systemischer *Outcomes* erfolgt sind.

4.1 Die neu generierten Cytokimera pIL35 und pIL19 sind inaktiv

Das molekulare (*in silico*)-Design, die Expression und Reinigung der beiden in dieser Arbeit generierten Cytokimera pIL35 und pIL19 sind in Abschnitt 3.1.2 beschrieben. Die funktionelle Analyse (Kapitel 3.1.4) zeigte keine biologische Aktivität. Die Chimäre pIL35 zeigte allerdings eine Bindung an den hIL-6R (vgl. Abb. 19 und Abb. 20), was auf eine partiell korrekte Faltung (im Bereich der *Site I*) hindeutet und könnte damit Ausgangspunkt für weitere Optimierungen sein.

4.1.1 *In silico*-Design von pIL35 und pIL19

Das Design der Chimären pIL35 und pIL19 erwies sich aufgrund der strukturellen Unterschiede zwischen IL-6-artigen Zytokinen und den Untereinheiten der IL-12-Familie als komplexer als bei GIL-6, GIO-6 und GIL-11. Beim Transfer der vier- α -helikalen p35- bzw. p19-Untereinheit in das IL-6-Grundgerüst wurden strukturelle Elemente unter Erhalt der für die IL-6-typische Tertiärstruktur relevanten Bereiche übernommen. Ziel war eine möglichst IL-6-konforme Faltung, da eine intakte Tertiärstruktur Voraussetzung für die Bindung an IL-6R α (*Site I*) und gp130 (*Site II*) ist. Ebenfalls

mussten die für die Rezeptorbindung (des IL-12R β 2 bzw. IL-23R) relevanten Stellen (Aminosäuren) beim Transfer der *Site* III berücksichtigt werden (vgl. 3.1.1).

Neben der Ligand-Rezeptor-Affinität ist für die Signaltransduktion auch die korrekte räumliche Anordnung der Rezeptoren entscheidend nach erfolgter Konformationsänderung einzelner Rezeptoren nach Ligandenbindung, die die weitere Komplexierung zugehöriger Rezeptoren begünstigt. pIL35 bzw. pIL19 vermitteln (theoretisch) die Bildung eines trimolekularen Rezeptorkomplexes (IL-6R α /gp130/IL-12R β 2 bzw. IL-23R). Der Abstand der assoziierten Rezeptoren beeinflusst die JAK-Transphosphorylierung; bei zu großer Distanz ist keine effiziente Signalweiterleitung möglich. Auch die Distanz zwischen Ligand und Zellmembran spielt eine Rolle, wie für andere IL-6-Familienrezeptoren beschrieben (vgl. *Stalk*-Region des IL-6R α , des IL-11R α [163, 381] und des IL-23R [2]) (vgl. Kapitel 1.3.4 und 1.4.4).

Das strukturbasierte Design erfolgte analog zum IC7-Konzept. Beim pIL19 wurde ein größerer Abschnitt transferiert, um die für die IL-23R-Bindung essentielle Aminosäure E58 sowie die zwei davon proximal liegenden Aminosäuren (E57 und R56) einzuschließen, was sich im leicht erhöhten Molekulargewicht widerspiegelt. Für p35 war die Tertiärstruktur zu Beginn der Arbeiten im Rezeptorkomplex nicht vollständig aufgeklärt; die Auswahl des Transfersegments erfolgte daher unter Unsicherheit bezüglich der IL-12R β 2-bindenden Regionen (vermutet wird α -Rezeptor-bindende Aminosäure Y189 im p35 [172]). Entsprechend lag die Strukturvorhersage-Konfidenz (PHYRE2) bei 74% für pIL35 gegenüber 99% für pIL19.

Beide Chimären wurden C-terminal über einen flexiblen GGGGS-Linker mit einem humanen IgG-Fc-Fragment fusioniert. Der Linker dient der Reduktion sterischer Interaktionen und ermöglicht eine flexible Orientierung des Fc-Anteils, was sowohl die Rezeptorbindung als auch die Protein-A-Reinigung begünstigen kann. Aufgrund der Größe des Fc-Tags (~25 kDa vs. pIL35=24,9 kDa) ist eine potenzielle sterische Beeinflussung der Rezeptorbindung theoretisch denkbar, insbesondere im Bereich der C-terminalen D-Helix (*Site* I) [1]. Ein solcher Effekt erscheint unter Berücksichtigung der bestehenden Literatur sowie praktischer Erfahrungen mit Fc-Fusionsproteinen und Chimären im hiesigen Institut unwahrscheinlich. Frühere Studien berichten übereinstimmend, dass Fc-Fusionen keine substanziellen Einschränkungen der Bioaktivität verursachen [351, 364, 382-384]. Vor diesem Hintergrund erscheint es unwahrscheinlich, dass die Fusion mit einem Fc-Tag globale Strukturverschiebungen verursachte. Globale Strukturveränderungen, die zu einer fehlenden Liganden-Rezeptor-Interaktion führen und damit die Chimär-Inaktivität begründen könnten, sind wahrscheinlicher auf ein fehlerhaftes *in silico*-Design zurückzuführen.

4.1.2 Fc-Fusionsproteine pIL35 und pIL19 sind verunreinigt und instabil

Es wurde das Fc-Design bewusst analog zum IC7Fc [351] gewählt. Frühere Arbeiten zeigen, dass Fc-Fusionen Liganden-Rezeptor-Interaktion [382] und die Bioaktivität [382] nicht beeinträchtigen und in bestimmten Kontexten sogar von Aviditätseffekten [385, 386] im Rahmen einer extrazellulären Fc-Dimerisierung profitieren können: Hierbei führt die bivalente Bindung desselben Antigens (in diesem Falle die Chimär-vermittelte Rezeptorbindung) zur erhöhten Bindungsstärke (Avidität=Affinität x Valenz) [387, 388]. Das würde in einer stärkeren Chimär-Rezeptorbindung resultieren. Darüber hinaus bietet das Fc-Tag entscheidende praktische Vorteile: vereinfachte Protein-A-Reinigung [382, 385, 386], sensitive Detektion, erhöhte Stabilität [385] sowie eine verlängerte Halbwertszeit [389] *in vivo* [351].

Fc-Fusionsproteine liegen intrazellulär [385] sowie nach Sekretion durch die Ausbildung von Disulfidbrücken in der Hinge-Region überwiegend als Homodimere vor (vgl. Abb. 30) [390]. Unter physiologischen, oxidativen Bedingungen bleiben diese Disulfidbindungen bestehen, sodass die Chimäre im Stimulationsassay überwiegend als Fc-vermittelte Dimere agieren. Diese Dimerisierung erhöht die molekulare Größe [352, 391] der ohnehin sehr kleinen pILs drastisch, was zu einer sterischen Hinderung der Bindung und Komplexierung dreier Rezeptoren pro Ligandenmonomer führen könnte, obgleich die hydrophile Oberfläche des IgG die Löslichkeit der Proteine erhöht. Die in dieser Arbeit beobachteten Aggregationen (vgl. Abb. 14 und Abb. 15), die im Rahmen der Chimär-

Expression auftraten, können nur bedingt auf Fc-vermittelte Mechanismen (Fc-vermittelte Dimerisierung) zurückgeführt werden und sind eher Ausdruck suboptimaler Proteinfaltung.

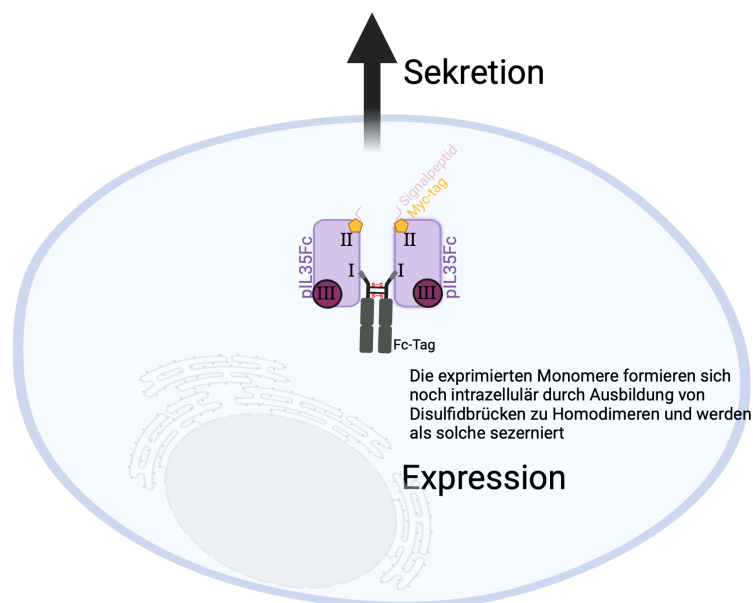


Abb. 30: Expression und Sekretion der neuen Chimäre pIL35 und pIL19.

Repräsentativ dargestellt ist die Expression und Sekretion des chimären Fc-Fusionsprotein pIL35; Analoges gilt für pIL19. N-Terminus wurde bei der Umklonierung ein Signalpeptid (Expression eines sekretorischen Proteins) sowie ein Myc-Tag (zwecks Detektion) berücksichtigt, C-Terminus ein Fc-Tag (zwecks Detektion und Proteinreinigung). In der ribosomalen Protein-Biosynthese entstehen monomere Fc-Fusionsproteine. Im Zytoplasma der Expi-293-Zellen formieren sich durch das oxidative Milieu Dimere mit Ausbildung von Disulfidbrücken an der Hinge-Region des humanen IgG-Fc-Teils durch Oxidation der Thiol-Gruppen an den konstanten schweren Ketten (C_{H2} , in rot dargestellt). Sezerniert werden die Proteine also als Homodimer, was die biologische Aktivität beeinträchtigen könnte. Monomere entstehen erst im reduktiven Milieu, z.B. bei der analytischen Probenbereitung für den Western Blot. Damit werden im Western Blot Monomere der ursprünglich sezernierten Dimere visualisiert. Created in <https://BioRender.com>.

Die Expressionsexperimente zeigten Unterschiede zwischen pIL35 und pIL19. Während pIL35 in Expi293-Zellen mit höherer Ausbeute produziert werden konnte, war die pIL19-Expression gering und mit mehr Nebenprodukten („Verunreinigung“) assoziiert (vgl. Abb. 15). Die beobachtete ~35 kDa-Bande deutet auf eine verkürzte Translation mit N-terminalem Verlust hin, während ~100 kDa-Banden nicht-reduzierte Dimere repräsentieren können. Die ~35 kDa-Bande (vgl. Abb. 15) zeigt womöglich ein verkürztes, Fc-gebundenes Fusionsprotein (~35 kDa = ~10 kDa unvollständiges Chimär + ~25 kDa Fc-Domäne). Aufgrund dessen sind die ~35 kDa-Banden nur im α -Fc-, jedoch nicht im α -myc-Blot, zu erkennen (vgl. Abb. 15). Der geringen pIL19-Ausbeute kann neben der Verunreinigung (Entstehung vieler Nebenprodukte) auch eine intrazelluläre Resilienz zugrunde liegen. Auch Oppmann *et al.* [322] konnte in seinen Arbeiten kein „getagtes“ p19 im Zellkulturüberstand von HEK293T-Zellen, dafür aber im Lysat, nachweisen. Grund hierfür könnte eine fehlerhafte Proteinfaltung sein, die eine Sekretion verhindert. Von einer erfolgreichen Faltung sekretorischer Proteine wird jedoch durch die Detektion im Zellkulturüberstand (vgl. Abb. 14) und durch die erfolgte Protein-A-Reinigung ausgegangen, denn fehlerhaft gefaltete Proteine mit drastischen Fc-einbegreifenden Strukturveränderungen können nicht mittels Protein-A-Sepharose Matrix gereinigt werden [392], eine leichte Strukturveränderung kann aber nicht ausgeschlossen werden. Auch die Protein-A-Reinigung selbst kann durch die Verwendung saurer (pH=3,2) und alkalischer (pH=11) Lösungen (vgl. Kapitel 2.2.2.6) zu Änderungen in der Proteinfaltung und damit zu Denaturierung und Proteininstabilität [393-395] führen, was in einem veränderten Bindungsverhalten und ggf. herabgesetzter Aktivität resultieren kann [393]. Eine alternative StrepTactin®XT-Reinigung wäre schonender [396] und würde u.U. zu weniger Aktivitätsverlusten führen [396].

Letztendlich hängt es von vielen Faktoren ab, ob das Protein (hier das Cytokimer) nach Fc-Fusion seine Bioaktivität behält oder nicht [385].

4.1.3 pIL35 und pIL19 induzieren keine Signaltransduktion

In Ba/F3-Zellen, die die gewünschten humanen Rezeptorkonstellationen (IL-6R α /gp130/IL-12R β 2 bzw. IL-23R) exprimieren, konnte keine biologische Aktivität von pIL35 und pIL19 nachgewiesen werden. Weder eine STAT3-Phosphorylierung noch eine proliferative Antwort wurde induziert (vgl. Abb. 18). Die Analyse fokussierte sich auf den STAT3-Signalweg als primären gp130-assoziierten Signalweg [57].

Die ausbleibende Signaltransduktion kann auf eine gestörte Ligand-Rezeptor-Bindung, eine ineffiziente Rezeptorkomplexierung oder eine insuffiziente intrazelluläre Signalweiterleitung zurückzuführen sein. Um dies weiter zu untersuchen, wurden Analysen zur Bindungskinetik angeschlossen.

4.1.4 pIL35 und pIL19 binden nicht vollständig an die notwendigen Rezeptoren

Zur Analyse der initialen Liganden-Rezeptor-Bindung wurden eine Immunpräzipitation (IP; Analyse auf zellulärer Ebene) und eine Oberflächenplasmonenresonanz-Analyse (*Surfaceplasmonresonance*, SPR; Analyse auf proteinbiochemischer Ebene) durchgeführt.

Sowohl in der IP als auch in der SPR konnte gezeigt werden, dass pIL35 an den nicht-signaltransduzierenden hIL-6R α bindet (vgl. Abb. 19 und 20). Die Bindung des pIL35 an den hIL-6R α hat eine vergleichbare Affinität wie die des natürlichen IL-6. Diese *Site I*-Bindung begünstigt vermutlich eine unterstützende Konformationsänderung beider Rezeptoren IL-6R α und IL-12R β 2, was aus der hohen Assoziation im Kombinationslauf (siehe Abb. 20B unten mittig; pIL35 auf dem Protein-A-Chip immobilisiert, sIL-6R und sIL-12R β 2 als simultane Analyten) ableiten lässt. Nichtsdestotrotz bleibt eine adäquate Bindung des IL-12R β 2 (in der Einzelanalyse, vgl. Abb. 20B rechts) aus. pIL19 bindet hingegen nicht an den hIL-6R α und auch nicht an den IL-23R (auch hier wurde gp130 nicht überprüft; vgl. Abb. 19 und 20). Damit fehlt in beiden Fällen essenzielle Rezeptorpartner für die Formation des trimeren Signalrezeptorkomplexes und erklärt die ausbleibende Signaltransduktion in Kapitel 4.1.3.

Mechanistisch spricht die erhaltene pIL35/hIL-6R α -Bindung für eine intakte *Site I* im IL-6-*Backbone*, während die fehlenden pIL19-Rezeptor-Bindungen auf eine globale Konformationsänderung (trotz theoretisch beabsichtigtem unveränderte *Site-I* und *II* -Design) hindeutet, vermutlich ausgelöst durch den größeren p19-Transfer in *Site III*, da trotz Transfers aller den IL-23R-bindenden Aminosäuren im p19 eine Rezeptorbindung der *Site III* ausblieb. Für die fehlende *Site III*-Bindung kann also eine alterierte Tertiärstruktur der *Site III* selbst oder des gesamten Moleküls verantwortlich sein. Für eine fehlende IL-12R β 2-Bindung via *Site III* kommen außerdem unvollständig übertragene/unklare Bindungsdeterminanten (bzgl. p35) in Betracht, hier bedarf es weiterer Strukturaufklärungen. Eine veränderte Tertiärstrukturen des gesamten Moleküls durch den Transfer von p35/p19 kann zudem die Bindungseigenschaften von *Site I*- und *Site II* beeinträchtigen. Ob zusätzlich eine fehlende gp130-Bindung (*Site II*) konformative Effekte beiträgt, bleibt offen und sollte durch gp130-Bindungsanalysen (IP/SPR) überprüft werden; gerade in Hinblick auf die Komplexierung der drei notwendigen Rezeptoren, für deren Rekrutierung (Lateraldiffusion in der Zellmembran) unterstützende Konformationsänderungen der einzelnen Rezeptoren und die damit einhergehende räumlich Nähe der Rezeptoren obligat für ein suffizientes *Signalling* (JAK-Transphosphorylierung) sind.

Rezeptorkomplex-Konformations- und Stabilisierungseffekte für eine suffiziente Ligandenbindung und konsekutiver Signaltransduktion von IL-23 (und möglicherweise analog von IL-12) gehen zudem auf p40 zurück [172, 322]. p40 bindet als gemeinsame β -Untereinheit des IL-12 und IL-23 an den gemeinsamen IL-12R β 1 [172, 176, 397]. P40 ist trotzdem an der p19/IL-23R-Bindung beteiligt [172, 176]: IL-23 bindet initial über seine α -Untereinheit p19 an die D1-Domäne des IL-23R [172]. Entscheidend hierfür sind die Aminosäuren E58, K164 und insbesondere W156 (im murinen IL-23p19 W157), das als funktionelles und sterisches Zentrum der Bindung gilt [172, 185]. W156 liegt in einer strukturell sensiblen Region der N-terminalen D-Helix (Übergang von α -Helix zu 3_{10} -Helix) und fungiert

als Konformations-Hotspot [172]. Die initiale p19/IL-23R-Interaktion, maßgeblich vermittelt durch W156, triggert eine globale Konformationsänderung des gesamten IL-23-Moleküls einschließlich der β -Untereinheit p40 [172] (vgl. Abb. 31).

Das p40 interagiert ebenfalls mit der D1-Domäne des IL-23R [172] und stabilisiert sowohl die Liganden- als auch die Rezeptorkonformation. Erst diese p40-abhängige Stabilisierung [398] ermöglicht die Rekrutierung von IL-12R β 1 und damit die vollständige Bildung des signaltransduzierenden Rezeptorkomplexes [172]. Ohne einer der beiden Zytokineinheiten kann keine adäquate Rezeptordimerisierung stattfinden [176]. P19 allein ist biologisch inaktiv [322], p40 alleine interagiert nicht mit dem IL-23R [176]. Die fehlende pIL19/IL-23R-Bindung lässt sich daher wahrscheinlich durch das Fehlen der p40-vermittelten Konformations- und Stabilisierungseffekte erklären. Selbst durch separate p40-Zugabe (vgl. Kapitel 3.1.4.1) konnte keine Aktivität von pIL35 und pIL19 induziert werden, da für eine adäquate IL-23R-Interaktion p40 und p19 komplexiert vorliegen müssen [172, 176]. Obwohl pIL19 die für die IL-23R-Bindung obligaten Aminosäuren enthält, fehlt die p40-getriggerte strukturelle Umlagerung, die für eine stabile Rezeptorbindung und Komplexbildung notwendig ist. Zusätzlich können wie oben beschrieben strukturelle Veränderungen des p19 und des gesamten IL-6-Gerüsts nach Transfer der α -Untereinheit die Ligandenbindung an Site I bis III weiter beeinträchtigen.

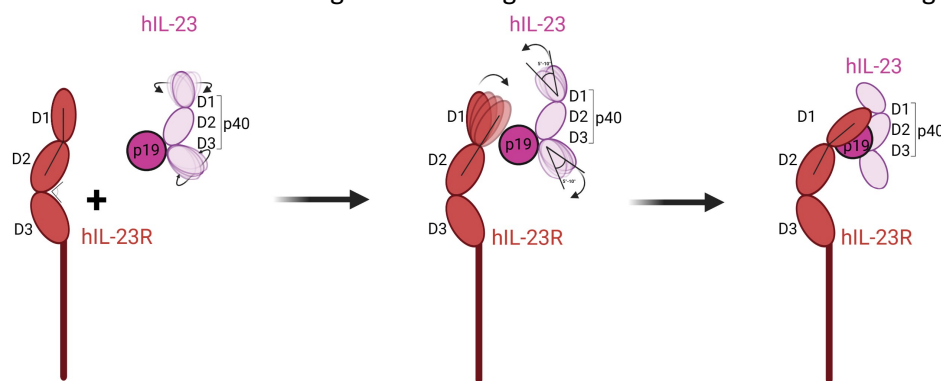


Abb. 31: Konformationsänderungen des IL-23 und des IL-23R nach Bindung. Modifiziert nach Bloch *et al.* [172] und Glassman *et al.* [176].

Aufbau des nativen hIL-23R: Der IL-23R ist Hämatoopoetin Typ 1-Rezeptor. N-terminal befindet sich die Immunglobulin (Ig)-Domäne (D1), die für die initiale Ligandenbindung verantwortlich ist. Membran-proximaler befinden sich die Fibronektin (FN) III-Domänen D2 und D3. Der IL-23R besitzt keine membran-nahen FN III-Domänen, stattdessen eine *Stalk*-Region. D1 und D2 stehen nahezu linear aufeinander, D3 fast orthogonal dazu. Dieser D2-D3-Knick ist für Klasse-I-Hämatoopoetinrezeptoren strukturell konserviert und funktionell bedeutsam für die Ligandenbindung. **Aufbau des nativen Heterodimers hIL-23** aus der α -Untereinheit p19 und der β -Untereinheit p40: Die β -Untereinheit p40 ähnelt dem Aufbau eines löslichen Hämatoopoetin Typ 1-Rezeptors. Sie besitzt die drei FN III-Domänen D1, D2, D3, die typisch zueinander orientiert sind (vgl. IL-23R). Die vier- α -helikale α -Untereinheit p19 ist über Disulfidbrücken an p40 in der Region des D2-D3-Knicks gebunden. **Mechanismus der IL-23/IL-23R-Bindung mit simultaner Konformationsänderung beider Komponenten:** p19 bindet initial (vermutlich weniger stark) an die D1 des IL-23R, es entsteht zunächst ein binärer p19/IL-23R-Komplex. Diese initiale Bindung an den IL-23R bewirkt in derselben Region, die strukturell durch einen Helix-Wechsel gekennzeichnet ist, eine Konformationsänderung (Bindungs-getriggerte Helix-Verdrehung). Diese p19-Konformationsänderung breitet sich auf das gesamte IL-23-Molekül aus, sodass auch das komplexierte p40 seine Konformation ändert. p40-D1 und -D3 knicken um 5°-10° gegenüber D2 ab. p40-D3 schwingt dabei in Richtung p19, p40-D1 nähert sich der IL-23R-D1. Das konformierte p40 kann somit an die D1 des IL-23R binden. Die p40/IL-23R-D1-Interaktion bewirkt ein konformatorisches Abknicken der IL-23R-D1 in Richtung des interagierenden p40. Zu beachten hierbei ist, dass die IL-23R-D1, welche gerade konformiert (abgenickt) ist, weiterhin die initiale Bindung zum p19 ausbildet. Durch die IL-23R-D1-Konformationsänderung (IL-23R-D1-Abknicken) verändert sich vermutlich auch die IL-23R-D1/p19-Interaktion: Die IL-23R-D1/p19-Interaktionsfläche könnte sich verbreitert haben, was in einer festeren (finalen) p19/IL-23R-Bindung resultiert. Zudem stabilisiert die IL-23R-Konformationsänderung die (neue) Konformation des p40. Das strukturell stabil (≠fluktuierend) konformierte p40 kann dann den IL-12R β 1 binden. Damit ist die D1 des IL-23R nicht nur für die initiale Ig(D1)-vermittelte Zytokinbindung wichtig, sondern auch – wie die konservierten Domänen D2 und D3 – funktionell, im strukturellen Sinne, für eine feste Ligandenbindung (p19) und Stabilisierung der Ligandenkonformation (p40) bedeutsam. Die Rezeptorrekrutierung von IL-23 weicht somit vom klassischen 1-2-3-Paradigma IL-6-artiger Zytokine ab. Created in <https://BioRender.com>.

Das Design eines Hyperzytokins (z.B. pIL19 + p40) wäre wahrscheinlich keine suffiziente Optimierungsstrategie, da p40 im Komplex die exakt selbe Konformationsänderung durchlaufen müsste wie durch die native p19/IL-23R-Bindung hervorgerufen. Dies ist aufgrund sterischer und struktureller Veränderungen des pIL19 (*IL-6-Backbone*), von denen bereits jetzt ausgegangen wird, unwahrscheinlich; zudem fehlt im pIL19 die natürliche p19-Bindestelle für das p40. Auch eine Fusion von p40 an den IL-23R wäre funktionell nicht zielführend, da in der Literatur explizit beschrieben ist, dass p19 zeitlich vor p40 an den IL-23R binden muss [172].

Ein fehlender IL-12R β 1 erklärt die ausbleibende p19/IL-23R-Bindung nicht, da p19 nicht mit IL-12R β 1 interagiert [176, 398]; ausschließlich p40 bindet IL-12R β 1 [176] und im Komplex mit p19 zusätzlich IL-23R [176].

Für IL-12 wird ein analoger p40-abhängiger Mechanismus diskutiert (p35-Y189 als funktionelles Analogon zu p19-W156 [172, 185]), jedoch unterscheiden sich die p40-Interaktionsflächen zwischen IL-23 und IL-12 [399], sodass eine direkte Übertragbarkeit weiterer struktureller Validierung bedarf.

Zusammenfassend scheint der alleinige Transfer der α -Untereinheiten p35 respektive p19 von IL-12 bzw. IL-23 in die *Site III* des *IL-6-Backbones* nicht ausreichend für eine adäquate *Site III*-Rezeptorbindung (an den IL-12R β 2 bzw. IL-23R) zu sein. Begründet werden kann dies durch Interaktion der beiden Untereinheiten im IL-12 bzw. im IL-23. Die sich im Vorgang der Rezeptorbindung verschiebende Interaktionsfläche von p35 bzw. p19 zu p40, scheint eine gewisse Bindungsenergie für die finale Liganden-Rezeptorbindung beizusteuern. Das Design eines Hyperzytokins (z.B. pIL19 + p40) scheint aus sterischen Gründen nicht erfolgversprechend zu sein und wird daher nicht weiterverfolgt.

4.2 Aktivierungsmuster metabolisch relevanter Zelllinien

4.2.1 C2C12-Aktivierungsmuster

Aus den Daten dieser Arbeit geht hervor, dass C2C12-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien eine stadienabhängige Stimulierbarkeit gegenüber IL-6- und IL-12-artigen Zytokinen zeigen. Dies weist auf eine differenzierungsabhängige Regulation der Rezeptorexpression hin. Zur Überprüfung wurde exemplarisch die Expression des murinen IL-6R untersucht (siehe unten).

Undifferenzierte C2C12-Zellen (T0) zeigten nach hIL-6-Stimulation keine STAT3-Phosphorylierung (vgl. Abb. 21A), während 7 Tage differenzierte Zellen (T7) eine leichte STAT3-Aktivierung aufwiesen (vgl. Abb. 21B). Unter hLIF-, hOSM- und mOSM-Stimulation war in T0-Zellen eine moderate STAT3-Phosphorylierung nachweisbar, die in T7-Zellen deutlich stärker ausfiel. Dies unterstützt die Annahme einer mit dem Differenzierungsgrad zunehmenden Rezeptorexpression.

Der prädominante Signalweg der IL-6-artigen Zytokine ist der JAK-STAT- [374], für Insulin der PI3K-Akt-*Pathway* [400, 401]. Gp130 vermittelt kann durch IL-6 ebenfalls der PI3K-Akt-mTORC1-Signalweg eingeschlagen werden [402] und in C2C12-Zellen zur erhöhten Proteinsynthese führen [402] und ist damit von zentraler Bedeutung für Muskelhypertrophie [402]. Gao *et al.* [402] zeigten, dass der PI3K-Akt-mTORC1-Signalweg bzw. die gemessene erhöhte Proteinsynthese insbesondere nach Stimulation mit hohen IL-6-Konzentrationen und längerer Stimulationsdauer (im Vergleich zur STAT3-Phosphorylierung) induziert wurde. Eine Induktion des PI3K-Akt-mTORC1-Signalweges durch IL-6, welches eigentlich primär via JAK-STAT signalisiert, ist also bspw. durch einen starken Stimulus im Sinne einer hohen Ligandenkonzentration und -stimulationsdauer möglich. Ein stärkerer Stimulus bzw. eine erhöhte Sensitivität auf einen Stimulus könnte ebenfalls durch eine erhöhte Rezeptorexpression (z.B. des mIL-6R in differenzierten C2C12-ellen) dargestellt werden, was neben einer sensitiven STAT3-Phosphorylierung analog zum oben Genannten auch zu einer Akt-Phosphorylierung führen würde.

Entsprechend wurde in T7-Zellen unter hLIF- und mOSM-Stimulation neben STAT3 auch Akt phosphoryliert (vgl. Abb. 21B). Dies würde für eine erhöhte mLIFR-Expression sprechen, da sowohl hLIF als auch mOSM den mLIFR binden [192] (vgl. Kapitel 1.5).

hOSM bindet ausschließlich an den mLIFR [192] und induziert lediglich eine Phosphorylierung im sensitiveren STAT3-Signalweg, in dieser Arbeit jedoch keine Akt-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu führt die hoch affine hLIF/mLIFR-Interaktion [403, 404] zur Aktivierung beider Signalwege. Die starke Aktivierung von STAT3 und Akt nach mOSM-Stimulation in T7-Zellen spricht zusätzlich für die Expression des mOSMR. Zwar bindet mOSM auch an den mLIFR, jedoch mit geringer Affinität [340]. Die vergleichbare Signalstärke von hLIF und mOSM lässt daher auf eine additive Signalübertragung über den hochaffinen mOSMR schließen.

Die differenzierten (T7)-C2C12-Zellen zeigen insgesamt eine erhöhte Aktivierbarkeit. Diese ist primär durch eine erhöhten Rezeptorexpression erklärbar. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass in einzelnen Blots eine leichte Basalphosphorylierung von STAT3 bzw. Akt auch in unstimulierten Kontrollen nachweisbar war (siehe Abb. 21B: pSTAT unter siebentägig differenzierten (T7) unbehandelten C2C12-Zellen der Passagenzahl 10 und vgl. Abb. 22B: pAkt unter vierzehntägig (T14) unbehandelten C2C12-Zellen der Passagenzahl 14). Mögliche Ursachen sind eine unvollständige Serum-Deprivation (4 h Starvation, jedoch im Bereich publizierter Protokolle [405]) oder eine erhöhte Passagenzahl. Brown *et al.* [406] zeigte bspw. eine erhöhte Akt-Phosphorylierung in replikativ „gealterten“ C2C12-Zellen (Passagezahl 44 bis 48). Sharples *et al.* [407] beschreiben in „gealterten“ C2C12-Zellen (Passagezahl 58) eine erhöhte Zellzyklusprogression und weniger Differenzierungspotential, was unter anderem mit dem Verlust des Zellzyklusregulators p16 [374] und damit einhergehendem reduzierten G1-Phasen-Austritt assoziiert sein könnte. Generell sollte daher die Verwendung hochpassagierter C2C12-Zellen kritisch hinterfragt werden.

Zur Überprüfung der Hypothese einer differenzierungsabhängigen Rezeptorregulation wurde exemplarisch der mL-6R analysiert. In IL-6-spezifischen Stimulationsassays zeigte sich eine Akt-Phosphorylierung bereits ab Differenzierungstag 5 (siehe Abb. 22B), während in früheren Stadien keine klare Aktivierung nachweisbar war. Die mL-6R-Expression ab T5 wurde durch qPCR (vgl. Abb. 23) bestätigt und die Oberflächenpräsentation mittels FACS (vgl. Abb. 24) verifiziert. Unterschiede zwischen einzelnen Western Blots (z.B. fehlendes pAkt nach hIL-6-Stimulation bei T7-Zellen (vgl. Abb. 21B) im Vergleich zu T5-Zellen (siehe Abb. 22B) sind wahrscheinlich auf methodische Unterschiede wie Zytokinkonzentration (10 vs. 20 ng/mL) oder Belichtungsbedingungen zurückzuführen.

Die IL-6R-Expression ist, wie in dieser Arbeit gezeigt, differenzierungsabhängig. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits beschriebener Myokinabhängigkeit (Konzentration und der Expositionsdauer): Für primäre humane Myoblasten wurde gezeigt, dass IL-6 initial in niedrigen Konzentrationen die IL-6R-Expression induziert (positiver *Feedback*-Mechanismus), während eine lange Expositionsdauer sie zur Vermeidung von Überstimulation reduziert [374]. IL-6 wirkt in hohen Konzentrationen differenzierungsfördernd, in niedrigen Konzentrationen proliferationsfördernd [374]. Im biologischen Kontext erscheint dies plausibel: Bei erhöhter Muskelkontraktion entstehen transient hohe myIL-6-Serum-Peaks [371, 402] (vgl. 1.3.8.1.1), die initial die IL-6R-Expression [374] erhöhen und ein *Signalling* initiieren, welches die Differenzierung [371, 374] und die Proteinsynthese [373, 402] der Muskelzellen von Myoblasten durch Fusion [125, 408] über multinukleäre [409, 410] Myotuben bis hin zu kontraktilen [410], proteinreichen [373, 408], Muskelfasern fördern, im Sinne eines positiven *Feedback-Loops*. Bei anhaltend hohem IL-6-Leveln (z.B. im Rahmen der Meta-Inflammation) bleiben die differenzierenden Effekte aufgrund reduzierter IL-6R-Expression aus, langanhaltend hohe IL-6-Level können sich sogar negativ, z.B. im Sinne einer Atrophie [371, 402] äußern. IL-6 zeigt bei der Stimulation von Muskelzellen also eine deutliche Kontextabhängigkeit (Konzentration und Expositionsdauer) [374, 402].

Ähnlich zu IL-6 wurden für andere Myokine ebenfalls positive *Feedback-Loops* festgestellt: Xiao *et al.* [411] zeigten eine OSM-medierte verstärkte OSMR-Expression in C2C12-Muskelzellen, Kamohara *et al.* [412] eine LIF-vermittelte erhöhte LIFR-Expression im Tumorzell-Modell. Eine Expression des mLIFR [413] auf C2C12-Zellen wurde bereits beschrieben.

Zusammenfassend exprimieren murine C2C12-Zellen sicher den mLIFR und vermutlich den mOSMR. Der mL-6R wird erst ab Differenzierungstag 5 deutlich exprimiert und nimmt mit dem Differenzierungsgrad bis Tag 14 (Ende der Messung) weiter zu. Mit steigender Rezeptordichte erhöht

sich die zelluläre Zytokin-Responsivität. Ein ausreichender Stimulus induziert zunächst STAT3-Phosphorylierung; ein stärkerer Stimulus aktiviert zusätzlich den PI3K-Akt-Signalweg.

Die zunächst geringe mIL-6R-Expression in frühen Stadien erklärt die fehlende Stimulierbarkeit durch IL-6-basierte Designerzytokine (IC7, GIL-6, GIO-6). Damit war die C2C12-Zelllinie – zumindest in frühen Differenzierungsstadien – für weiterführende funktionelle Charakterisierungen dieser Konstrukte nur eingeschränkt geeignet.

4.2.2 HepG2-Aktivierungsmuster

HepG2-Zellen zeigen eine STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit hIL-6, hIL-11, hLIF, hOSM sowie mit den IL-6-basierten Cytokimera IC7, GIL-6, GIO-6 und GIL-11. Aufgrund bekannter Rezeptor-Promiskuitäten (vgl. Kapitel 1.5) kann aus einer pSTAT3-Induktion jedoch nicht direkt auf die Expression des jeweils namensgebenden Rezeptors geschlossen werden.

Die Signaltransduktion nach IC7-, GIL-6- und GIO-6-Stimulation belegt die Expression des hIL-6R auf der Zelloberfläche, da in dieser Arbeit kein sIL-6R verwendet wurde. Die IL-6R α -Expression wurde in der Literatur schon beschrieben [414, 415]. Die pSTAT3-Aktivierung durch hLIF sowie durch GIL-6 und GIL-11 spricht zudem für die Expression des hLIFR. Die STAT3-Phosphorylierung nach hIL-11 bestätigt die Oberflächenpräsentation des hIL-11R.

Ob zusätzlich ein hOSMR exprimiert wird, bleibt aufgrund der Promiskuität von hOSM, GIO-6 und IC7 (Bindung an hOSMR und hLIFR [192, 354] (vgl. 1.5)) unklar. Zur eindeutigen Klärung wäre eine funktionelle Blockade des hLIFR mit anschließender hOSM-Stimulation erforderlich.

4.2.3 Hepa1-6 -Aktivierungsmuster

Hepa1-6-Wildtypzellen zeigen eine deutliche STAT3-Phosphorylierung nach hLIF-Stimulation sowie eine schwache Aktivierung nach GIL-11 und hOSM. Eine Signaltransduktion unter hIL-6, hCNTF sowie IC7Fc, GIL-6 und GIO-6 ist nicht nachweisbar. Dies spricht für die Expression von mLIFR und mL-11R. Die fehlende STAT3-Phosphorylierung nach hIL-6 und den IL-6-basierte Cytokimera weist auf eine Abwesenheit des mL-6R hin, die fehlende Aktivierung durch hCNTF auf eine Absenz des CNTFR (vgl. Abb. 28A).

Nach stabiler Expression des humanen IL-6R (Hepa1-6_{hIL-6R}) wird eine STAT3-Phosphorylierung unter hIL-6, IC7Fc, GIL-6 und GIO-6 induziert, was die erfolgreiche Transduktion bestätigt. Zusätzlich reagieren diese Zellen auf hOSM und hCNTF mit pSTAT3 (vgl. Abb. 28B).

Die hOSM-induzierte Signaltransduktion ist mLIFR-vermittelt [192-194], da hOSM nicht an den mOSMR bindet [192]. Eine mOSMR-Expression kann daher funktionell nicht validiert werden. GIO-6 wirkt entsprechend über hIL-6R und mLIFR [354].

Die hCNTF-Antwort tritt ausschließlich in den transduzierten Zellen auf und ist daher hIL-6R-vermittelt (Rezeptor-Promiskuität) [3, 139, 334-336], nicht mCNTFR-abhängig.

Zusammenfassend exprimieren Hepa1-6-Wildtypzellen sicher mLIFR und mL-11R (vgl. Abb. 28), jedoch keinen funktionellen mL-6R oder mCNTFR. In der transduzierten Zelllinie ist der hIL-6R stabil integriert, was durch die FACS-Analyse (Abb. 29) validiert wird.

4.3 Ausblick

4.3.1 pIL35 und pIL19: Zukünftige Optimierungen

Die generierten Cytokimera pIL35 und pIL19, welche IL-6- und IL-12-Familienstrukturen kombinieren, erwiesen sich als biologisch inaktiv. Für pIL35 wurde jedoch eine suffiziente Bindung an hIL-6R α (*Site I*) nachgewiesen, was darauf hinweist, dass ein partieller Austausch der IL-6-*Site III* prinzipiell möglich ist, ohne die Gesamtstruktur zwingend zu destabilisieren. Zukünftig sollte die gp130-Bindung (*Site II*) funktionell und kinetisch überprüft werden.

Die fehlende pIL19/hIL-6R α -Bindung spricht dagegen für eine global veränderte Tertiärstruktur infolge des Strukturaustauschs. Ein optimiertes *in silico*-Design müsste einen strukturhomologeren p19-Abschnitt identifizieren, der die IL-23R-bindenden Aminosäuren umfasst, ohne die IL-6-typische Gesamtfaltung zu stören. Auch Fusionsrezeptor-Strategien oder das Design von Hyper-Zytokinen stellen keine überzeugende Alternative dar.

Selbst bei erfolgreicher trimärer Rezeptorbindung müsste die korrekte räumliche Anordnung der Rezeptoren gewährleistet sein, da die Transphosphorylierung der assoziierten Kinasen (z. B. gp130 mit IL-12R β 2 oder IL-23R) nur bei ausreichender Nähe möglich ist. Als funktionelle Referenz sollten native IL-35- (gp130/IL-12R β 2) und IL-39-Signalwege (gp130/IL-23R) hinsichtlich Bindungskinetik und Bioaktivität vergleichend untersucht werden.

Die fehlende Bindung beider Chimären an IL-12R β 2 bzw. IL-23R könnte auf das Fehlen der β -Untereinheit p40 zurückzuführen. Im nativen IL-12/IL-23 stabilisiert p40 durch eigene Rezeptorinteraktionen die finale Ligandenbindung. Die Generierung von Hyperzytokinen (pIL35+p40 bzw. pIL19+p40) erscheint konzeptionell denkbar, ist jedoch strukturell problematisch, da die p40-abhängigen Konformationsänderungen exakt reproduziert werden müssten. Zudem fehlt im pIL19 die native p19-*Site I* (p19 *Site I* bindet an p40-D2 und p40-D3) für eine korrekte p40-Komplexierung. Auch Fusionsrezeptor-Strategien (IL-23R + p40) stellen keine überzeugende Alternative dar.

Selbst bei erfolgreicher trimärer Rezeptorbindung müsste die korrekte räumliche Anordnung der Rezeptoren gewährleistet sein, da die Transphosphorylierung der assoziierten Kinasen (z. B. gp130 mit IL-12R β 2 oder IL-23R) nur bei ausreichender Nähe möglich ist. Als funktionelle Referenz sollten native IL-35- (gp130/IL-12R β 2) und IL-39-Signalwege (gp130/IL-23R) hinsichtlich Bindungskinetik und Bioaktivität vergleichend untersucht werden.

4.3.2 GIL-6 und GIO-6 in der Zukunft

GIL-6, GIO-6 und GIL-11 sind bioaktive Cytokimera. Ihre Signalinduktion (pSTAT3, teilweise pAkt) wurde zunächst in murinen Prä-B-Lymphozyten, die humane Rezeptoren sicher exprimieren, und im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich in metabolisch relevanten Zelllinien untersucht (murine C2C12- und Hepa1-6-Zellen sowie humane HepG2-Zellen).

Zukünftig sollten weitere Signalwege wie PI3K und NF- κ B analysiert werden, da diese für metabolische [64] bzw. inflammatorische [416] Prozesse besonders relevant sind. Aufgrund der guten Stimulierbarkeit der HepG2- und Hepa1-6_{hIL-6R}-Zellen eignen sich diese für *Seahorse*-Analysen zur Untersuchung zytokininduzierter metabolischer Veränderungen.

Therapeutisch zielt insbesondere GIL-6 darauf ab, über einen IL-6R-abhängigen, LIF-ähnlichen Signalweg proinflammatorische IL-6-Effekte zu reduzieren und gleichzeitig günstige metabolische Effekte zu erhalten. Sollten im *Seahorse*-Assay vorteilhafte metabolische Veränderungen bestätigt werden, könnten nach Validierung in primären Zellen und *in vivo*-Studien Anwendungen bei metabolischen Erkrankungen wie metabolischem Syndrom oder Typ-2-Diabetes erwogen werden.

Im Gegensatz zu IC7 werden für GIL-6 weniger *Anti-Drug*-Antikörper erwartet, da LIF physiologisch extrazellulär vorkommt, im Gegensatz zum CNTF. Damit besitzt insbesondere GIL-6 potenziell therapeutischen Wert.

4.4 Schlussfolgerungen

Durch diese Forschungsarbeit konnte – trotz biologischer Inaktivität der Chimären – ein Erkenntnisgewinn über Ligand-Rezeptor-Interaktionen gewonnen werden. Des Weiteren stehen nun zwei Zelllinien (HepG2 und Hepa1-6_{hIL-6R}) zur weiteren Charakterisierung der biologisch aktiven Cytokimera zur Verfügung.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. 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*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(17): p. 11859-67.
2. Floss, D.M., J.M. Moll, and J. Scheller, *IL-12 and IL-23-Close Relatives with Structural Homologies but Distinct Immunological Functions*. Cells, 2020. **9**(10).
3. Rose-John, S., *Interleukin-6 Family Cytokines*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2018. **10**(2).
4. Paul, W.E., *Pleiotropy and redundancy: T cell-derived lymphokines in the immune response*. Cell, 1989. **57**(4): p. 521-4.
5. Tait Wojno, E.D., C.A. Hunter, and J.S. Stumhofer, *The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 851-870.
6. Gerharz, C.D., U. Ramp, P. Reinecke, C. Schardt, U. Friebe, M. Déjosez, T. Nitsch, and H.E. Gabbert, *Analysis of growth factor-dependent signalling in human epithelioid sarcoma cell lines. clues To the role of autocrine, juxtacrine and paracrine interactions in epithelioid sarcoma*. European Journal of Cancer, 2000. **36**(9): p. 1171-9.
7. Tanaka, T., M. Narazaki, and T. Kishimoto, *IL-6 in inflammation, immunity, and disease*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2014. **6**(10): p. a016295.
8. Jones, S.A., J. Scheller, and S. Rose-John, *Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling*. Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(9): p. 3375-83.
9. Maini, R.N., P.C. Taylor, J. Szechinski, K. Pavelka, J. Bröll, G. Balint, P. Emery, F. Raemen, J. Petersen, J. Smolen, D. Thomson, and T. Kishimoto, *Double-blind randomized controlled clinical trial of the interleukin-6 receptor antagonist, tocilizumab, in European patients with rheumatoid arthritis who had an incomplete response to methotrexate*. Arthritis and Rheumatism, 2006. **54**(9): p. 2817-29.
10. Smolen, J.S., M.E. Weinblatt, S. Sheng, Y. Zhuang, and B. Hsu, *Sirukumab, a human anti-interleukin-6 monoclonal antibody: a randomised, 2-part (proof-of-concept and dose-finding), phase II study in patients with active rheumatoid arthritis despite methotrexate therapy*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2014. **73**(9): p. 1616-25.
11. Kistner, T.M., B.K. Pedersen, and D.E. Lieberman, *Interleukin 6 as an energy allocator in muscle tissue*. Nature Metabolism, 2022. **4**(2): p. 170-179.
12. Maggio, M., J.M. Guralnik, D.L. Longo, and L. Ferrucci, *Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway*. Journals of Gerontology. Series A: Biological Sciences and Medical Sciences, 2006. **61**(6): p. 575-84.
13. Kimura, A. and T. Kishimoto, *IL-6: regulator of Treg/Th17 balance*. European Journal of Immunology, 2010. **40**(7): p. 1830-5.
14. Moschen, A.R., H. Tilg, and T. Raine, *IL-12, IL-23 and IL-17 in IBD: immunobiology and therapeutic targeting*. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2019. **16**(3): p. 185-196.

15. Wang, L., B. Walia, J. Evans, A.T. Gewirtz, D. Merlin, and S.V. Sitaraman, *IL-6 induces NF-kappa B activation in the intestinal epithelia*. Journal of Immunology, 2003. **171**(6): p. 3194-201.
16. Saggini, A., S. Chimenti, and A. Chiricozzi, *IL-6 as a druggable target in psoriasis: focus on pustular variants*. Journal of Immunology Research, 2014. **2014**: p. 964069.
17. Xia, L.P., B.F. Li, H. Shen, and J. Lu, *Interleukin-27 and interleukin-23 in patients with systemic lupus erythematosus: possible role in lupus nephritis*. Scandinavian Journal of Rheumatology, 2015. **44**(3): p. 200-5.
18. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nature Reviews Immunology, 2010. **10**(3): p. 170-81.
19. Puel, A., C. Picard, M. Lorrot, C. Pons, M. Chrabieh, L. Lorenzo, M. Mamani-Matsuda, E. Jouanguy, D. Gendrel, and J.L. Casanova, *Recurrent staphylococcal cellulitis and subcutaneous abscesses in a child with autoantibodies against IL-6*. Journal of Immunology, 2008. **180**(1): p. 647-54.
20. Chow, L.S., R.E. Gerszten, J.M. Taylor, B.K. Pedersen, H. van Praag, S. Trappe, M.A. Febbraio, Z.S. Galis, Y. Gao, J.M. Haus, I.R. Lanza, C.J. Lavie, C.H. Lee, A. Lucia, C. Moro, A. Pandey, J.M. Robbins, K.I. Stanford, A.E. Thackray, S. Villeda, M.J. Watt, A. Xia, J.R. Zierath, B.H. Goodpaster, and M.P. Snyder, *Exerkines in health, resilience and disease*. Nature Reviews Endocrinology, 2022. **18**(5): p. 273-289.
21. Erta, M., A. Quintana, and J. Hidalgo, *Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system*. International Journal of Biological Sciences, 2012. **8**(9): p. 1254-66.
22. Sims, N.A., *Cardiotrophin-like cytokine factor 1 (CLCF1) and neuropoietin (NP) signalling and their roles in development, adulthood, cancer and degenerative disorders*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 517-22.
23. Bazan, J.F., *Haemopoietic receptors and helical cytokines*. Immunology Today, 1990. **11**(10): p. 350-4.
24. Bazan, J.F., *Emerging families of cytokines and receptors*. Current Biology, 1993. **3**(9): p. 603-6.
25. Morris, R., N.J. Kershaw, and J.J. Babon, *The molecular details of cytokine signaling via the JAK/STAT pathway*. Protein Science, 2018. **27**(12): p. 1984-2009.
26. Villarino, A.V., Y. Kanno, and J.J. O'Shea, *Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system*. Nature Immunology, 2017. **18**(4): p. 374-384.
27. Kelly-Welch, A., E.M. Hanson, and A.D. Keegan, *Interleukin-4 (IL-4) pathway*. Signal Transduction Knowledge Environment, 2005. **2005**(293): p. cm9.
28. Weigert, C., A.M. Hennige, R. Lehmann, K. Brodbeck, F. Baumgartner, M. Schauble, H.U. Häring, and E.D. Schleicher, *Direct cross-talk of interleukin-6 and insulin signal transduction via insulin receptor substrate-1 in skeletal muscle cells*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(11): p. 7060-7.
29. Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. Journal of Cell Science, 2004. **117**(Pt 8): p. 1281-3.
30. Jatiani, S.S., S.J. Baker, L.R. Silverman, and E.P. Reddy, *Jak/STAT pathways in cytokine signaling and myeloproliferative disorders: approaches for targeted therapies*. Genes & Cancer, 2010. **1**(10): p. 979-93.

31. Heinrich, P.C., I. Behrmann, S. Haan, H.M. Hermanns, G. Müller-Newen, and F. Schaper, *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. Biochemical Journal, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
32. Cantley, L.C., *The phosphoinositide 3-kinase pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1655-7.
33. Floss, D.M., S. Mrotzek, T. Klöcker, J. Schröder, J. Grötzinger, S. Rose-John, and J. Scheller, *Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(27): p. 19386-400.
34. Schindler, C., D.E. Levy, and T. Decker, *JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(28): p. 20059-63.
35. Liu, L., K.M. McBride, and N.C. Reich, *STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(23): p. 8150-5.
36. Levy, D.E. and J.E. Darnell, Jr., *Stats: transcriptional control and biological impact*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(9): p. 651-62.
37. Harpur, A.G., A.C. Andres, A. Ziemiecki, R.R. Aston, and A.F. Wilks, *JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases*. Oncogene, 1992. **7**(7): p. 1347-53.
38. Min, X., D. Ungureanu, S. Maxwell, H. Hammarén, S. Thibault, E.K. Hillert, M. Ayres, B. Greenfield, J. Eksterowicz, C. Gabel, N. Walker, O. Silvennoinen, and Z. Wang, *Structural and Functional Characterization of the JH2 Pseudokinase Domain of JAK Family Tyrosine Kinase 2 (TYK2)*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(45): p. 27261-27270.
39. Takahashi, T. and T. Shirasawa, *Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases*. FEBS Letters, 1994. **342**(2): p. 124-8.
40. Copeland, N.G., D.J. Gilbert, C. Schindler, Z. Zhong, Z. Wen, J.E. Darnell, Jr., A.L. Mui, A. Miyajima, F.W. Quelle, J.N. Ihle, and et al., *Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes*. Genomics, 1995. **29**(1): p. 225-8.
41. Ivashkiv, L.B. and X. Hu, *Signaling by STATs*. Arthritis Research & Therapy, 2004. **6**(4): p. 159-68.
42. Alexander, W.S. and D.J. Hilton, *The role of suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins in regulation of the immune response*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**: p. 503-29.
43. White, G.E., A. Cotterill, M.R. Addley, E.J. Soilleux, and D.R. Greaves, *Suppressor of cytokine signalling protein SOCS3 expression is increased at sites of acute and chronic inflammation*. Journal of Molecular Histology, 2011. **42**(2): p. 137-51.
44. Bätz, A., *Untersuchungen zur Funktion und Lokalisation des Proteins Suppressor of Cytokine Signaling 1 (SOCS1) in Zellen des angeborenen Immunsystems*. 2007.
45. Sasi, W., A.K. Sharma, and K. Mokbel, *The role of suppressors of cytokine signalling in human neoplasms*. Molecular Biology International, 2014. **2014**: p. 630797.
46. Babon, J.J., L.N. Varghese, and N.A. Nicola, *Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3*. Seminars in Immunology, 2014. **26**(1): p. 13-9.

47. Kershaw, N.J., J.M. Murphy, N.P. Liao, L.N. Varghese, A. Laktyushin, E.L. Whitlock, I.S. Lucet, N.A. Nicola, and J.J. Babon, *SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition*. Nature Structural & Molecular Biology, 2013. **20**(4): p. 469-76.
48. Babon, J.J. and N.A. Nicola, *The biology and mechanism of action of suppressor of cytokine signaling 3*. Growth Factors, 2012. **30**(4): p. 207-19.
49. Lee, K.H., K.J. Moon, H.S. Kim, B.C. Yoo, S. Park, H. Lee, S. Kwon, E.S. Lee, and S. Yoon, *Increased cytoplasmic levels of CIS, SOCS1, SOCS2, or SOCS3 are required for nuclear translocation*. FEBS Letters, 2008. **582**(15): p. 2319-24.
50. Chikuma, S., M. Kanamori, S. Mise-Omata, and A. Yoshimura, *Suppressors of cytokine signaling: Potential immune checkpoint molecules for cancer immunotherapy*. Cancer Science, 2017. **108**(4): p. 574-580.
51. Croker, B.A., D.L. Krebs, J.G. Zhang, S. Wormald, T.A. Willson, E.G. Stanley, L. Robb, C.J. Greenhalgh, I. Förster, B.E. Clausen, N.A. Nicola, D. Metcalf, D.J. Hilton, A.W. Roberts, and W.S. Alexander, *SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo*. Nature Immunology, 2003. **4**(6): p. 540-5.
52. Fischer, P., U. Lehmann, R.M. Sobota, J. Schmitz, C. Niemand, S. Linnemann, S. Haan, I. Behrmann, A. Yoshimura, J.A. Johnston, G. Müller-Newen, P.C. Heinrich, and F. Schaper, *The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling*. Biochemical Journal, 2004. **378**(Pt 2): p. 449-60.
53. Lehmann, U., J. Schmitz, M. Weissenbach, R.M. Sobota, M. Hortner, K. Friederichs, I. Behrmann, W. Tsiaris, A. Sasaki, J. Schneider-Mergener, A. Yoshimura, B.G. Neel, P.C. Heinrich, and F. Schaper, *SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(1): p. 661-71.
54. Lupardus, P.J., G. Skiniotis, A.J. Rice, C. Thomas, S. Fischer, T. Walz, and K.C. Garcia, *Structural snapshots of full-length Jak1, a transmembrane gp130/IL-6/IL-6R α cytokine receptor complex, and the receptor-Jak1 holocomplex*. Structure, 2011. **19**(1): p. 45-55.
55. Huang, B., X. Lang, and X. Li, *The role of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway in cancers*. Frontiers in Oncology, 2022. **12**: p. 1023177.
56. Schaper, F. and S. Rose-John, *Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 475-87.
57. Garbers, C., S. Aparicio-Siegmund, and S. Rose-John, *The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition*. Current Opinion in Immunology, 2015. **34**: p. 75-82.
58. Eyles, J.L., D. Metcalf, M.J. Grusby, D.J. Hilton, and R. Starr, *Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(46): p. 43735-40.
59. Jacobson, N.G., S.J. Szabo, R.M. Weber-Nordt, Z. Zhong, R.D. Schreiber, J.E. Darnell, Jr., and K.M. Murphy, *Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4*. Journal of Experimental Medicine, 1995. **181**(5): p. 1755-62.

60. Thierfelder, W.E., J.M. van Deursen, K. Yamamoto, R.A. Tripp, S.R. Sarawar, R.T. Carson, M.Y. Sangster, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G.C. Grosveld, and J.N. Ihle, *Requirement for Stat4 in interleukin-12-mediated responses of natural killer and T cells*. *Nature*, 1996. **382**(6587): p. 171-4.
61. Pastor-Fernández, G., I.R. Mariblanca, and M.N. Navarro, *Decoding IL-23 Signaling Cascade for New Therapeutic Opportunities*. *Cells*, 2020. **9**(9).
62. Parham, C., M. Chirica, J. Timans, E. Vaisberg, M. Travis, J. Cheung, S. Pflanz, R. Zhang, K.P. Singh, F. Vega, W. To, J. Wagner, A.M. O'Farrell, T. McClanahan, S. Zurawski, C. Hannum, D. Gorman, D.M. Rennick, R.A. Kastelein, R. de Waal Malefyt, and K.W. Moore, *A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R*. *Journal of Immunology*, 2002. **168**(11): p. 5699-708.
63. 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.
64. Lien, E.C., C.C. Dibble, and A. Toker, *PI3K signaling in cancer: beyond AKT*. *Current Opinion in Cell Biology*, 2017. **45**: p. 62-71.
65. Kim, J.H., J.E. Kim, H.Y. Liu, W. Cao, and J. Chen, *Regulation of interleukin-6-induced hepatic insulin resistance by mammalian target of rapamycin through the STAT3-SOCS3 pathway*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(2): p. 708-15.
66. Dillon, S.R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S.R. Presnell, H.S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J.L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D.L. Dong, M. Dasovich, F.J. Grant, L. Lockwood, S.D. Levin, C. LeCiel, K. Waggle, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak, and J.A. Gross, *Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice*. *Nature Immunology*, 2004. **5**(7): p. 752-60.
67. Derouet, D., F. Rousseau, F. Alfonsi, J. Froger, J. Hermann, F. Barbier, D. Perret, C. Diveu, C. Guillet, L. Preisser, A. Dumont, M. Barbado, A. Morel, O. deLapeyrière, H. Gascan, and S. Chevalier, *Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. **101**(14): p. 4827-32.
68. Schroers, A., O. Hecht, K.J. Kallen, M. Pachta, S. Rose-John, and J. Grötzinger, *Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane*. *Protein Science*, 2005. **14**(3): p. 783-90.
69. Schaeffer, M., M. Schneiderbauer, S. Weidler, R. Tavares, M. Warmuth, G. de Vos, and M. Hallek, *Signaling through a novel domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk kinases*. *Molecular and Cellular Biology*, 2001. **21**(23): p. 8068-81.
70. Hirano, T., T. Matsuda, and K. Nakajima, *Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily*. *Stem Cells*, 1994. **12**(3): p. 262-77.
71. Taga, T. and T. Kishimoto, *Signaling mechanisms through cytokine receptors that share signal transducing receptor components*. *Current Opinion in Immunology*, 1995. **7**(1): p. 17-23.

72. Jones, S.A. and S. Rose-John, *The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex*. Biochimica et Biophysica Acta, 2002. **1592**(3): p. 251-63.
73. Chen, Y.H., G. Grigelioniene, P.T. Newton, J. Gullander, M. Elfving, A. Hammarsjö, D. Batkovskytė, H.S. Alsaif, W.I.Y. Kurdi, F. Abdulwahab, V. Shanmugasundaram, L. Devey, S. Bacrot, J. Brodzki, C. Huber, B. Hamel, D. Gisselsson, N. Papadogiannakis, K. Jedrycha, B. Gürtl-Lackner, A.S. Chagin, G. Nishimura, D. Aschenbrenner, F.S. Alkuraya, A. Laurence, V. Cormier-Daire, and H.H. Uhlig, *Absence of GP130 cytokine receptor signaling causes extended Stüve-Wiedemann syndrome*. Journal of Experimental Medicine, 2020. **217**(3).
74. Oberg, H.H., D. Wesch, S. Grüssel, S. Rose-John, and D. Kabelitz, *Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells*. International Immunology, 2006. **18**(4): p. 555-63.
75. Linge, I., A. Tsareva, E. Kondratieva, A. Dyatlov, J. Hidalgo, R. Zvartsev, and A. Apt, *Pleiotropic Effect of IL-6 Produced by B-Lymphocytes During Early Phases of Adaptive Immune Responses Against TB Infection*. Frontiers in Immunology, 2022. **13**: p. 750068.
76. Hunter, C.A. and S.A. Jones, *IL-6 as a keystone cytokine in health and disease*. Nature Immunology, 2015. **16**(5): p. 448-57.
77. Kishimoto, T., *Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology*. Annual Review of Immunology, 2005. **23**: p. 1-21.
78. Amarasekara, D.S., H. Yun, S. Kim, N. Lee, H. Kim, and J. Rho, *Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks*. Immune Network, 2018. **18**(1): p. e8.
79. Fischer, C.P., *Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?* Exercise Immunology Review, 2006. **12**: p. 6-33.
80. 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.
81. 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.
82. Poholek, A.C., K. Hansen, S.G. Hernandez, D. Eto, A. Chandele, J.S. Weinstein, X. Dong, J.M. Odegard, S.M. Kaeck, A.L. Dent, S. Crotty, and J. Craft, *In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development*. Journal of Immunology, 2010. **185**(1): p. 313-26.
83. Eto, D., C. Lao, D. DiToro, B. Barnett, T.C. Escobar, R. Kageyama, I. Yusuf, and S. Crotty, *IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation*. PLOS ONE, 2011. **6**(3): p. e17739.
84. Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo, *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.

85. Mangan, P.R., L.E. Harrington, D.B. O'Quinn, W.S. Helms, D.C. Bullard, C.O. Elson, R.D. Hatton, S.M. Wahl, T.R. Schoeb, and C.T. Weaver, *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
86. Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger, *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. *Immunity*, 2006. **24**(2): p. 179-89.
87. Ogura, H., M. Murakami, Y. Okuyama, M. Tsuruoka, C. Kitabayashi, M. Kanamoto, M. Nishihara, Y. Iwakura, and T. Hirano, *Interleukin-17 promotes autoimmunity by triggering a positive-feedback loop via interleukin-6 induction*. *Immunity*, 2008. **29**(4): p. 628-36.
88. Tie, R., H. Li, S. Cai, Z. Liang, W. Shan, B. Wang, Y. Tan, W. Zheng, and H. Huang, *Interleukin-6 signaling regulates hematopoietic stem cell emergence*. *Experimental and Molecular Medicine*, 2019. **51**(10): p. 1-12.
89. Chiba, Y., I. Mizoguchi, H. Hasegawa, M. Ohashi, N. Orii, T. Nagai, M. Sugahara, Y. Miyamoto, M. Xu, T. Owaki, and T. Yoshimoto, *Regulation of myelopoiesis by proinflammatory cytokines in infectious diseases*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018. **75**(8): p. 1363-1376.
90. Hashizume, M., Y. Higuchi, Y. Uchiyama, and M. Mihara, *IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation*. *Cytokine*, 2011. **54**(1): p. 92-9.
91. Hurst, S.M., T.S. Wilkinson, R.M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G.M. Fuller, N. Topley, and S.A. Jones, *Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation*. *Immunity*, 2001. **14**(6): p. 705-14.
92. Dann, S.M., M.E. Spehlmann, D.C. Hammond, M. Iimura, K. Hase, L.J. Choi, E. Hanson, and L. Eckmann, *IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens*. *Journal of Immunology*, 2008. **180**(10): p. 6816-26.
93. Paul, S.R., F. Bennett, J.A. Calvetti, K. Kelleher, C.R. Wood, R.M. O'Hara, Jr., A.C. Leary, B. Sibley, S.C. Clark, D.A. Williams, and et al., *Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990. **87**(19): p. 7512-6.
94. Permyakov, E.A., V.N. Uversky, and S.E. Permyakov, *Interleukin-11: A Multifunctional Cytokine with Intrinsically Disordered Regions*. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 2016. **74**(3): p. 285-96.
95. 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.
96. Schwertschlag, U.S., W.L. Trepicchio, K.H. Dykstra, J.C. Keith, K.J. Turner, and A.J. Dorner, *Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11*. *Leukemia*, 1999. **13**(9): p. 1307-15.
97. Izquierdo, J.M., *Pro-inflammatory cytokine 11 plays a pivotal role in inflammaging-associated pathologies*. *Aging Cell*, 2024. **23**(11): p. e14360.

98. Du, X. and D.A. Williams, *Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use*. Blood, 1997. **89**(11): p. 3897-908.
99. Bertolini, F., L. Lazzari, E. Lauri, C. Corsini, and G. Sirchia, *Cord blood plasma-mediated ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells*. Bone Marrow Transplantation, 1994. **14**(3): p. 347-53.
100. van de Ven, C., L. Ishizawa, P. Law, and M.S. Cairo, *IL-11 in combination with SLF and G-CSF or GM-CSF significantly increases expansion of isolated CD34+ cell population from cord blood vs. adult bone marrow*. Experimental Hematology, 1995. **23**(12): p. 1289-95.
101. Ernst, M. and T.L. Putoczki, *Molecular pathways: IL11 as a tumor-promoting cytokine-translational implications for cancers*. Clinical Cancer Research, 2014. **20**(22): p. 5579-88.
102. Putoczki, T. and M. Ernst, *More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer*. Journal of Leukocyte Biology, 2010. **88**(6): p. 1109-17.
103. Curti, A., M. Ratta, S. Corinti, G. Girolomoni, F. Ricci, P. Tazzari, M. Siena, A. Grande, M. Fogli, S. Tura, and R.M. Lemoli, *Interleukin-11 induces Th2 polarization of human CD4(+) T cells*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2758-63.
104. Fukuda, Y. and S. Sassa, *Effect of interleukin-11 on the levels of mRNAs encoding heme oxygenase and haptoglobin in human HepG2 hepatoma cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993. **193**(1): p. 297-302.
105. Ohsumi, J., K. Miyadai, I. Kawashima, H. Ishikawa-Ohsumi, S. Sakakibara, K. Mita-Honjo, and Y. Takiguchi, *Adipogenesis inhibitory factor. A novel inhibitory regulator of adipose conversion in bone marrow*. FEBS Letters, 1991. **288**(1-2): p. 13-6.
106. Hughes, F.J. and G.L. Howells, *Interleukin-11 inhibits bone formation in vitro*. Calcified Tissue International, 1993. **53**(5): p. 362-4.
107. Suda, T., N. Udagawa, I. Nakamura, C. Miyaura, and N. Takahashi, *Modulation of osteoclast differentiation by local factors*. Bone, 1995. **17**(2 Suppl): p. 87s-91s.
108. Corden, B., W.W. Lim, W. Song, X. Chen, N.S.J. Ko, L. Su, N.G.Z. Tee, E. Adami, S. Schafer, and S.A. Cook, *Therapeutic Targeting of Interleukin-11 Signalling Reduces Pressure Overload-Induced Cardiac Fibrosis in Mice*. Journal of Cardiovascular Translational Research, 2021. **14**(2): p. 222-228.
109. 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, et al., *IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis*. Nature, 2017. **552**(7683): p. 110-115.
110. Airapetov, M.I., S.O. Eresko, P.D. Ignatova, A.A. Lebedev, E.R. Bychkov, and P.D. Shabanov, *Interleukin-11 in Pathologies of the Nervous System*. Molecular Biology, 2023. **57**(1): p. 1-6.
111. Pinho, V., M. Fernandes, A. da Costa, R. Machado, and A.C. Gomes, *Leukemia inhibitory factor: Recent advances and implications in biotechnology*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2020. **52**: p. 25-33.

112. Alaaeddine, N., J.A. Di Battista, J.P. Pelletier, K. Kiansa, J.M. Cloutier, and J. Martel-Pelletier, *Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-11 (anti-inflammatory) on TNF-alpha-induced PGE(2) release and on signalling pathways in human OA synovial fibroblasts*. Cytokine, 1999. **11**(12): p. 1020-30.
113. Banner, L.R., P.H. Patterson, A. Allchorne, S. Poole, and C.J. Woolf, *Leukemia inhibitory factor is an anti-inflammatory and analgesic cytokine*. Journal of Neuroscience, 1998. **18**(14): p. 5456-62.
114. 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 Journal, 1987. **6**(13): p. 3995-4002.
115. Duluc, D., Y. Delneste, F. Tan, M.P. Moles, L. Grimaud, J. Lenoir, L. Preisser, I. Anegon, L. Catala, N. Ifrah, P. Descamps, E. Gamelin, H. Gascan, M. Hebbbar, and P. Jeannin, *Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells*. Blood, 2007. **110**(13): p. 4319-30.
116. Hamelin-Morrisette, J., A. Dallagi, J. Girouard, M. Ravelojaona, Y. Oufqir, C. Vaillancourt, C. Van Themsche, C. Carrier, and C. Reyes-Moreno, *Leukemia inhibitory factor regulates the activation of inflammatory signals in macrophages and trophoblast cells*. Molecular Immunology, 2020. **120**: p. 32-42.
117. Chaparro, V., L.-P. Leroux, A. Lebourg, S. Chagneau, T.E. Graber, T. Alain, and M. Jaramillo, *Leukemia inhibitory factor drives transcriptional programs that promote lipid accumulation and M2 polarization in macrophages*. Journal of Leukocyte Biology, 2024. **117**(1).
118. Hendriks, J.J., H. Slaets, S. Carmans, H.E. de Vries, C.D. Dijkstra, P. Stinissen, and N. Hellings, *Leukemia inhibitory factor modulates production of inflammatory mediators and myelin phagocytosis by macrophages*. Journal of Neuroimmunology, 2008. **204**(1-2): p. 52-7.
119. Pasquin, S., M. Sharma, and J.F. Gauchat, *Cytokines of the LIF/CNTF family and metabolism*. Cytokine, 2016. **82**: p. 122-4.
120. Florholmen, G., G.H. Thoresen, A.C. Rustan, J. Jensen, G. Christensen, and V. Aas, *Leukaemia inhibitory factor stimulates glucose transport in isolated cardiomyocytes and induces insulin resistance after chronic exposure*. Diabetologia, 2006. **49**(4): p. 724-31.
121. Marshall, M.K., W. Doerrler, K.R. Feingold, and C. Grunfeld, *Leukemia inhibitory factor induces changes in lipid metabolism in cultured adipocytes*. Endocrinology, 1994. **135**(1): p. 141-7.
122. Lorenzo, J., *Osteoimmunology Interactions of the Immune and Skeletal Systems*. 2015.
123. Kami, K. and E. Senba, *Localization of leukemia inhibitory factor and interleukin-6 messenger ribonucleic acids in regenerating rat skeletal muscle*. Muscle and Nerve, 1998. **21**(6): p. 819-22.
124. Kami, K., Y. Morikawa, M. Sekimoto, and E. Senba, *Gene expression of receptors for IL-6, LIF, and CNTF in regenerating skeletal muscles*. Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2000. **48**(9): p. 1203-13.

125. Broholm, C., M.J. Laye, C. Brandt, R. Vadalasetty, H. Pilegaard, B.K. Pedersen, and C. Scheele, *LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation*. Journal of Applied Physiology, 2011. **111**(1): p. 251-9.
126. Oshima, K., D.T. Teo, P. Senn, V. Starlinger, and S. Heller, *LIF promotes neurogenesis and maintains neural precursors in cell populations derived from spiral ganglion stem cells*. BMC Developmental Biology, 2007. **7**: p. 112.
127. Stewart, C.L., P. Kaspar, L.J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Köntgen, and S.J. Abbondanzo, *Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor*. Nature, 1992. **359**(6390): p. 76-9.
128. Smith, A.G., J.K. Heath, D.D. Donaldson, G.G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers, *Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides*. Nature, 1988. **336**(6200): p. 688-90.
129. Sendtner, M., R. Götz, B. Holtmann, and H. Thoenen, *Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice*. Journal of Neuroscience, 1997. **17**(18): p. 6999-7006.
130. Masiakowski, P., H.X. Liu, C. Radziejewski, F. Lottspeich, W. Oberthuer, V. Wong, R.M. Lindsay, M.E. Furth, and N. Panayotatos, *Recombinant human and rat ciliary neurotrophic factors*. Journal of Neurochemistry, 1991. **57**(3): p. 1003-12.
131. Kriegstein, K., L. Farkas, and K. Unsicker, *TGF-beta regulates the survival of ciliary ganglionic neurons synergistically with ciliary neurotrophic factor and neurotrophins*. Journal of Neurobiology, 1998. **37**(4): p. 563-72.
132. Adler, R., K.B. Landa, M. Manthorpe, and S. Varon, *Cholinergic neuronotrophic factors: intraocular distribution of trophic activity for ciliary neurons*. Science, 1979. **204**(4400): p. 1434-6.
133. Wen, R., W. Tao, Y. Li, and P.A. Sieving, *CNTF and retina*. Progress in Retinal and Eye Research, 2012. **31**(2): p. 136-51.
134. Sendtner, M., Y. Arakawa, K.A. Stöckli, G.W. Kreutzberg, and H. Thoenen, *Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival*. Journal of Cell Science. Supplement, 1991. **15**: p. 103-9.
135. Sendtner, M., R. Götz, B. Holtmann, J.L. Escary, Y. Masu, P. Carroll, E. Wolf, G. Brem, P. Brület, and H. Thoenen, *Cryptic physiological trophic support of motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF*. Current Biology, 1996. **6**(6): p. 686-94.
136. Mayer, M., K. Bhakoo, and M. Noble, *Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro*. Development, 1994. **120**(1): p. 143-53.
137. Lee, N., R.P. Spearry, K.M. Leahy, R. Robitz, D.S. Trinh, C.O. Mason, R.J. Zurbrugg, M.K. Batt, R.J. Paul, and A.J. MacLennan, *Muscle ciliary neurotrophic factor receptor α promotes axonal regeneration and functional recovery following peripheral nerve lesion*. Journal of Comparative Neurology, 2013. **521**(13): p. 2947-65.
138. Miller, R.G., J.H. Petajan, W.W. Bryan, C. Armon, R.J. Barohn, J.C. Goodpasture, R.J. Hoagland, G.J. Parry, M.A. Ross, and S.C. Stromatt, *A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group*. Annals of Neurology, 1996. **39**(2): p. 256-60.

139. Pasquin, S., M. Sharma, and J.F. Gauchat, *Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 507-15.
140. Sleeman, M.W., K.D. Anderson, P.D. Lambert, G.D. Yancopoulos, and S.J. Wiegand, *The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha*. Pharmaceutica Acta Helveticae, 2000. **74**(2-3): p. 265-72.
141. Van Wagoner, N.J., C. Choi, P. Repovic, and E.N. Benveniste, *Oncostatin M regulation of interleukin-6 expression in astrocytes: biphasic regulation involving the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38*. Journal of Neurochemistry, 2000. **75**(2): p. 563-75.
142. Zarling, J.M., M. Shoyab, H. Marquardt, M.B. Hanson, M.N. Lioubin, and G.J. Todaro, *Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(24): p. 9739-43.
143. Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki, and A. Miyajima, *Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis*. Blood, 2003. **102**(9): p. 3154-62.
144. Hermanns, H.M., *Oncostatin M and interleukin-31: Cytokines, receptors, signal transduction and physiology*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 545-58.
145. Wallace, P.M., J.F. MacMaster, K.A. Rouleau, T.J. Brown, J.K. Loy, K.L. Donaldson, and A.F. Wahl, *Regulation of inflammatory responses by oncostatin M*. Journal of Immunology, 1999. **162**(9): p. 5547-55.
146. van Krieken, P.P., J. Roos, P. Fischer-Posovszky, S. Wueest, and D. Konrad, *Oncostatin M promotes lipolysis in white adipocytes*. Adipocyte, 2022. **11**(1): p. 315-324.
147. Hoermann, G., S. Cerny-Reiterer, A. Perné, M. Klauser, K. Hoetzenecker, K. Klein, L. Müllauer, M. Gröger, S.M. Nijman, W. Klepetko, P. Valent, and M. Mayerhofer, *Identification of oncostatin M as a STAT5-dependent mediator of bone marrow remodeling in KIT D816V-positive systemic mastocytosis*. American Journal of Pathology, 2011. **178**(5): p. 2344-56.
148. Richards, C.D., *The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease*. ISRN Inflammation, 2013. **2013**: p. 512103.
149. Brown, T.J., M.N. Lioubin, and H. Marquardt, *Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells*. Journal of Immunology, 1987. **139**(9): p. 2977-83.
150. 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*. Molecular and Cellular Biology, 1989. **9**(7): p. 2847-53.
151. Negrini, K.A., D. Lin, D. Shah, H. Wu, K.M. Wehrung, H.J. Thompson, T. Whitcomb, and K.M. Sturgeon, *Role of Oncostatin M in Exercise-Induced Breast Cancer Prevention*. Cancers, 2024. **16**(15).

152. Spangler, J.B., I. Moraga, J.L. Mendoza, and K.C. Garcia, *Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering*. Annual Review of Immunology, 2015. **33**: p. 139-67.
153. Somers, W., M. Stahl, and J.S. Seehra, *1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling*. EMBO Journal, 1997. **16**(5): p. 989-97.
154. Metcalfe, R.D., T.L. Putoczki, and M.D.W. Griffin, *Structural Understanding of Interleukin 6 Family Cytokine Signaling and Targeted Therapies: Focus on Interleukin 11*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**: p. 1424.
155. Brocker, C., D. Thompson, A. Matsumoto, D.W. Nebert, and V. Vasilidou, *Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family*. Human Genomics, 2010. **5**(1): p. 30-55.
156. Wen, D., J.P. Boissel, M. Showers, B.C. Ruch, and H.F. Bunn, *Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(36): p. 22839-46.
157. Gearing, D.P., M.R. Comeau, D.J. Friend, S.D. Gimpel, C.J. Thut, J. McGourty, K.K. Brasher, J.A. King, S. Gillis, B. Mosley, and et al., *The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor*. Science, 1992. **255**(5050): p. 1434-7.
158. 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.
159. Jones, L.L. and D.A. Vignali, *Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily*. Immunologic Research, 2011. **51**(1): p. 5-14.
160. Rose-John, S., *Interleukin-6 signalling in health and disease*. F1000Research, 2020. **9**.
161. Stahl, N., T.G. Boulton, T. Farruggella, N.Y. Ip, S. Davis, B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, and et al., *Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components*. Science, 1994. **263**(5143): p. 92-5.
162. Davis, S., T.H. Aldrich, N.Y. Ip, N. Stahl, S. Scherer, T. Farruggella, P.S. DiStefano, R. Curtis, N. Panayotatos, H. Gascan, and et al., *Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses*. Science, 1993. **259**(5102): p. 1736-9.
163. 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*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(21): p. 14756-68.
164. Düsterhöft, S., K. Höbel, M. Oldefest, J. Lokau, G.H. Waetzig, A. Chalaris, C. Garbers, J. Scheller, S. Rose-John, I. Lorenzen, and J. Grötzinger, *A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(23): p. 16336-48.
165. Riethmueller, S., J.C. Ehlers, J. Lokau, S. Düsterhöft, K. Knittler, G. Dombrowsky, J. Grötzinger, B. Rabe, S. Rose-John, and C. Garbers, *Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 25550.

166. Lokau, J. and C. Garbers, *The length of the interleukin-11 receptor stalk determines its capacity for classic signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(17): p. 6398-6409.
167. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
168. 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.
169. Chow, D., X. He, A.L. Snow, S. Rose-John, and K.C. Garcia, *Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex*. Science, 2001. **291**(5511): p. 2150-5.
170. Plun-Favreau, H., D. Perret, C. Diveu, J. Froger, S. Chevalier, E. Lelièvre, H. Gascan, and M. Chabbert, *Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(29): p. 27169-79.
171. Scheller, J., A. Berg, J.M. Moll, D.M. Floss, and C. Jungesblut, *Current status and relevance of single nucleotide polymorphisms in IL-6-/IL-12-type cytokine receptors*. Cytokine, 2021. **148**: p. 155550.
172. Bloch, Y., L. Bouchareychas, R. Merceron, K. Składanowska, L. Van den Bossche, S. Detry, S. Govindarajan, D. Elewaut, F. Haerynck, M. Dullaers, I.E. Adamopoulos, and S.N. Savvides, *Structural Activation of Pro-inflammatory Human Cytokine IL-23 by Cognate IL-23 Receptor Enables Recruitment of the Shared Receptor IL-12Rβ1*. Immunity, 2018. **48**(1): p. 45-58.e6.
173. Mackiewicz, A., M. Wiznerowicz, E. Roeb, J. Nowak, T. Pawlowski, H. Baumann, P.C. Heinrich, and S. Rose-John, *Interleukin-6-type cytokines and their receptors for gene therapy of melanoma*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1995. **762**: p. 361-73; discussion 373-4.
174. Siupka, P., O.T. Hamming, L. Kang, H.H. Gad, and R. Hartmann, *A conserved sugar bridge connected to the WSXWS motif has an important role for transport of IL-21R to the plasma membrane*. Genes and Immunity, 2015. **16**(6): p. 405-13.
175. Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, A. Timmermann, A. Küster, H. Dahmen, I. Tacke, P.C. Heinrich, and G. Müller-Newen, *Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130*. Journal of Immunology, 2000. **164**(1): p. 273-82.
176. Glassman, C.R., Y.K. Mathiharan, K.M. Jude, L. Su, O. Panova, P.J. Lupardus, J.B. Spangler, L.K. Ely, C. Thomas, G. Skiniotis, and K.C. Garcia, *Structural basis for IL-12 and IL-23 receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells*. Cell, 2021. **184**(4): p. 983-999.e24.
177. 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(24): p. 11349-53.
178. Ihle, J.N. and I.M. Kerr, *Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily*. Trends in Genetics, 1995. **11**(2): p. 69-74.

179. Kloeck, C., A.K. Haq, S.L. Dunn, H.J. Lavery, A.S. Banks, and M.G. Myers, Jr., *Regulation of Jak kinases by intracellular leptin receptor sequences*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(44): p. 41547-55.
180. Usacheva, A., R. Sandoval, P. Domanski, S.V. Kotenko, K. Nelms, M.A. Goldsmith, and O.R. Colamonici, *Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(50): p. 48220-6.
181. Floss, D.M., T. Klöcker, J. Schröder, L. Lamertz, S. Mrotzek, B. Strobl, H. Hermanns, and J. Scheller, *Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to Janus kinases*. Molecular Biology of the Cell, 2016. **27**(14): p. 2301-16.
182. Heinrich, P.C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve, *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochemical Journal, 1998. **334**(Pt 2): p. 297-314.
183. Narazaki, M., B.A. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, J.N. Ihle, T. Kishimoto, and T. Taga, *Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(6): p. 2285-9.
184. Pennica, D., T.A. Swanson, K.J. Shaw, W.J. Kuang, C.L. Gray, B.G. Beatty, and W.I. Wood, *Human cardiotrophin-1: protein and gene structure, biological and binding activities, and chromosomal localization*. Cytokine, 1996. **8**(3): p. 183-9.
185. Esch, A., A. Masiarz, S. Mossner, J.M. Moll, J. Grötzinger, J. Schröder, J. Scheller, and D.M. Floss, *Deciphering site 3 interactions of interleukin 12 and interleukin 23 with their cognate murine and human receptors*. Journal of Biological Chemistry, 2020. **295**(30): p. 10478-10492.
186. Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto, *Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130*. Cell, 1989. **58**(3): p. 573-81.
187. Nicola, N.A. and J.J. Babon, *Leukemia inhibitory factor (LIF)*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2015. **26**(5): p. 533-44.
188. Kraves, S. and C.J. Weitz, *A role for cardiotrophin-like cytokine in the circadian control of mammalian locomotor activity*. Nature Neuroscience, 2006. **9**(2): p. 212-9.
189. de Bovis, B., D. Derouet, J.F. Gauchat, G. Elson, H. Gascan, and O. Delapeyrière, *clc is co-expressed with clf or cntfr in developing mouse muscles*. Cell Communication and Signaling, 2005. **3**(1): p. 1.
190. Ettich, J., *Bispezifische Inhibitoren der Interleukin-6 Trans-Signaltransduktion und Weiterentwicklung synthetischer Zytokinrezeptoren*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II*. 2024, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
191. Robledo, O., M. Fourcin, S. Chevalier, C. Guillet, P. Auguste, A. Pouplard-Barthelaix, D. Pennica, and H. Gascan, *Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(8): p. 4855-63.

192. 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*. Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(52): p. 20181-20199.
193. Chollangi, S., T. Mather, K.K. Rodgers, and J.D. Ash, *A unique loop structure in oncostatin M determines binding affinity toward oncostatin M receptor and leukemia inhibitory factor receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2012. **287**(39): p. 32848-59.
194. Mosley, B., C. De Imus, D. Friend, N. Boiani, B. Thoma, L.S. Park, and D. Cosman, *Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(51): p. 32635-43.
195. Brakenhoff, J.P., F.D. de Hon, V. Fontaine, E. ten Boekel, H. Schooltink, S. Rose-John, P.C. Heinrich, J. Content, and L.A. Aarden, *Development of a human interleukin-6 receptor antagonist*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(1): p. 86-93.
196. Ehlers, M., J. Grötzinger, F.D. deHon, J. Müllberg, J.P. Brakenhoff, J. Liu, A. Wollmer, and S. Rose-John, *Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction*. Journal of Immunology, 1994. **153**(4): p. 1744-53.
197. Ward, L.D., G.J. Howlett, G. Discolo, K. Yasukawa, A. Hammacher, R.L. Moritz, and R.J. Simpson, *High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(37): p. 23286-9.
198. Paonessa, G., R. Graziani, A. De Serio, R. Savino, L. Ciapponi, A. Lahm, A.L. Salvati, C. Toniatti, and G. Ciliberto, *Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling*. EMBO Journal, 1995. **14**(9): p. 1942-51.
199. Kubin, T., P. Gajawada, P. Bramlage, S. Hein, B. Berge, A. Cetinkaya, H. Burger, M. Schönburg, W. Schaper, Y.H. Choi, and M. Richter, *The Role of Oncostatin M and Its Receptor Complexes in Cardiomyocyte Protection, Regeneration, and Failure*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(3).
200. Stahl, N. and G.D. Yancopoulos, *The tripartite CNTF receptor complex: activation and signaling involves components shared with other cytokines*. Journal of Neurobiology, 1994. **25**(11): p. 1454-66.
201. Gearing, D.P., C.J. Thut, T. VandeBos, S.D. Gimpel, P.B. Delaney, J. King, V. Price, D. Cosman, and M.P. Beckmann, *Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130*. EMBO Journal, 1991. **10**(10): p. 2839-48.
202. Schumacher, N., D. Meyer, A. Mauermann, J. von der Heyde, J. Wolf, J. Schwarz, K. Knittler, G. Murphy, M. Michalek, C. Garbers, J.W. Bartsch, S. Guo, B. Schacher, P. Eickholz, A. Chalaris, S. Rose-John, and B. Rabe, *Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(43): p. 26059-71.
203. Rose-John, S. and P.C. Heinrich, *Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function*. Biochemical Journal, 1994. **300**(Pt 2): p. 281-90.

204. 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.
205. Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P.C. Heinrich, and S. Rose-John, *Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1992. **189**(2): p. 794-800.
206. Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Günther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P.C. Heinrich, and S. Rose-John, *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. European Journal of Immunology, 1993. **23**(2): p. 473-80.
207. Baran, P., S. Hansen, G.H. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H.J. Huber, M.R. Ahmadian, J.M. Moll, and J. Scheller, *The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6-sIL-6R-sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling*. Journal of Biological Chemistry, 2018. **293**(18): p. 6762-6775.
208. 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 Reports, 2016. **14**(7): p. 1761-1773.
209. Mackiewicz, A., H. Schooltink, P.C. Heinrich, and S. Rose-John, *Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins*. Journal of Immunology, 1992. **149**(6): p. 2021-7.
210. Rose-John, S., *The soluble interleukin-6 receptor and related proteins*. Best Practice & Research: Clinical Endocrinology & Metabolism, 2015. **29**(5): p. 787-97.
211. Garbers, C., N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, J. Lokau, P. Baran, M.A. Nowell, S.A. Jones, S. Rose-John, and J. Scheller, *The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases*. Biochimica et Biophysica Acta, 2014. **1842**(9): p. 1485-94.
212. Rose-John, S., *Therapeutic targeting of IL-6 trans-signaling*. Cytokine, 2021. **144**: p. 155577.
213. Calabrese, L.H. and S. Rose-John, *IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease*. Nature Reviews Rheumatology, 2014. **10**(12): p. 720-7.
214. Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John, *IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy*. Journal of Hepatology, 2016. **64**(6): p. 1403-15.
215. Kallen, K.J., *The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases*. Biochimica et Biophysica Acta, 2002. **1592**(3): p. 323-43.
216. Rabe, B., A. Chalaris, U. May, G.H. Waetzig, D. Seegert, A.S. Williams, S.A. Jones, S. Rose-John, and J. Scheller, *Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1021-8.
217. Nowell, M.A., A.S. Williams, S.A. Carty, J. Scheller, A.J. Hayes, G.W. Jones, P.J. Richards, S. Slinn, M. Ernst, B.J. Jenkins, N. Topley, S. Rose-John, and S.A. Jones, *Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis*. Journal of Immunology, 2009. **182**(1): p. 613-22.
218. Braun, G.S., Y. Nagayama, Y. Maruta, F. Heymann, C.R. van Roeyen, B.M. Klinkhammer, P. Boor, L. Villa, D.J. Salant, U. Raffetseder, S. Rose-John, T. Ostendorf, and J. Floege,

- IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN*. Journal of the American Society of Nephrology, 2016. **27**(1): p. 132-42.
219. Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John, *ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration*. Trends in Immunology, 2011. **32**(8): p. 380-7.
 220. Aparicio-Siegmund, S., Y. Garbers, C.M. Flynn, G.H. Waetzig, I. Gouni-Berthold, W. Krone, H.K. Berthold, M. Laudes, S. Rose-John, and C. Garbers, *The IL-6-neutralizing sIL-6R-sgp130 buffer system is disturbed in patients with type 2 diabetes*. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 2019. **317**(2): p. E411-e420.
 221. Selmi, C., A. Ceribelli, S.M. Naguwa, L. Cantarini, and Y. Shoenfeld, *Safety issues and concerns of new immunomodulators in rheumatology*. Expert Opinion on Drug Safety, 2015. **14**(3): p. 389-99.
 222. 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*. Journal of Immunology, 2013. **190**(2): p. 703-11.
 223. Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J.P. Brakenhoff, K.J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzinger, and S. Rose-John, *A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion*. Nature Biotechnology, 1997. **15**(2): p. 142-5.
 224. Engelowski, E., N.F. Modares, S. Gorressen, P. Bouvain, D. Semmler, C. Alter, Z. Ding, U. Flögel, J. Schrader, H. Xu, P.A. Lang, J. Fischer, D.M. Floss, and J. Scheller, *IL-23R Signaling Plays No Role in Myocardial Infarction*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 17078.
 225. 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*. Journal of Biological Chemistry, 2023. **299**(11): p. 105343.
 226. 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 Letters, 1999. **450**(1-2): p. 117-22.
 227. März, P., S. Ozbek, M. Fischer, N. Voltz, U. Otten, and S. Rose-John, *Differential response of neuronal cells to a fusion protein of ciliary neurotrophic factor/soluble CNTF-receptor and leukemia inhibitory factor*. European Journal of Biochemistry, 2002. **269**(12): p. 3023-31.
 228. Russo, S., M. Kwiatkowski, N. Govorukhina, R. Bischoff, and B.N. Melgert, *Meta-Inflammation and Metabolic Reprogramming of Macrophages in Diabetes and Obesity: The Importance of Metabolites*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**: p. 746151.
 229. DDG, *Gesundheitsbericht Diabetes 2025*. 2025, Deutsche Diabetes Gesellschaft.
 230. Reiss, A.B., N.M. Siegart, and J. De Leon, *Interleukin-6 in atherosclerosis: atherogenic or atheroprotective?* Clinical Lipidology, 2017. **12**(1): p. 14-23.
 231. Dal Canto, E., A. Ceriello, L. Rydén, M. Ferrini, T.B. Hansen, O. Schnell, E. Standl, and J.W. Beulens, *Diabetes as a cardiovascular risk factor: An overview of global trends of*

- macro and micro vascular complications*. European Journal of Preventive Cardiology, 2019. **26**(2_suppl): p. 25-32.
232. Javed, S., T. Hayat, L. Menon, U. Alam, and R.A. Malik, *Diabetic peripheral neuropathy in people with type 2 diabetes: too little too late*. Diabetic Medicine, 2020. **37**(4): p. 573-579.
 233. Agashe, S. and S. Petak, *Cardiac Autonomic Neuropathy in Diabetes Mellitus*. Methodist Debaque Cardiovascular Journal, 2018. **14**(4): p. 251-256.
 234. Okamura, T., Y. Hashimoto, M. Hamaguchi, A. Obora, T. Kojima, and M. Fukui, *Ectopic fat obesity presents the greatest risk for incident type 2 diabetes: a population-based longitudinal study*. International Journal of Obesity (2005), 2019. **43**(1): p. 139-148.
 235. Barazzoni, R., G. Gortan Cappellari, M. Ragni, and E. Nisoli, *Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations*. Eating and Weight Disorders, 2018. **23**(2): p. 149-157.
 236. Alberti, K.G., P. Zimmet, and J. Shaw, *The metabolic syndrome--a new worldwide definition*. Lancet, 2005. **366**(9491): p. 1059-62.
 237. Hotamisligil, G.S., *Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders*. Nature, 2017. **542**(7640): p. 177-185.
 238. Wellen, K.E. and G.S. Hotamisligil, *Inflammation, stress, and diabetes*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(5): p. 1111-9.
 239. Franssens, B.T., J. Westerink, Y. van der Graaf, H.M. Nathoe, and F.L.J. Visseren, *Metabolic consequences of adipose tissue dysfunction and not adiposity per se increase the risk of cardiovascular events and mortality in patients with type 2 diabetes*. International Journal of Cardiology, 2016. **222**: p. 72-77.
 240. Goyal, R., A.F. Faizy, S.S. Siddiqui, and M. Singhai, *Evaluation of TNF- α and IL-6 Levels in Obese and Non-obese Diabetics: Pre- and Postinsulin Effects*. North American Journal of Medical Sciences, 2012. **4**(4): p. 180-4.
 241. Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John, *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochimica et Biophysica Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
 242. Matsuzawa, Y., T. Funahashi, and T. Nakamura, *The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism*. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis, 2011. **18**(8): p. 629-39.
 243. Wang, X., W. Bao, J. Liu, Y.Y. Ouyang, D. Wang, S. Rong, X. Xiao, Z.L. Shan, Y. Zhang, P. Yao, and L.G. Liu, *Inflammatory markers and risk of type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis*. Diabetes Care, 2013. **36**(1): p. 166-75.
 244. Ellingsgaard, H., I. Hauselmann, B. Schuler, A.M. Habib, L.L. Baggio, D.T. Meier, E. Eppler, K. Bouzakri, S. Wueest, Y.D. Muller, A.M. Hansen, M. Reinecke, D. Konrad, M. Gassmann, F. Reimann, P.A. Halban, J. Gromada, D.J. Drucker, F.M. Gribble, J.A. Ehses, and M.Y. Donath, *Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells*. Nature Medicine, 2011. **17**(11): p. 1481-9.
 245. Pedersen, B.K., A. Steensberg, and P. Schjerling, *Exercise and interleukin-6*. Current Opinion in Hematology, 2001. **8**(3): p. 137-41.

246. Petersen, A.M. and B.K. Pedersen, *The anti-inflammatory effect of exercise*. Journal of Applied Physiology, 2005. **98**(4): p. 1154-62.
247. Dagdeviren, S., D.Y. Jung, R.H. Friedline, H.L. Noh, J.H. Kim, P.R. Patel, N. Tsitsilianos, K. Inashima, D.A. Tran, X. Hu, M.M. Loubato, S.M. Craige, J.Y. Kwon, K.W. Lee, and J.K. Kim, *IL-10 prevents aging-associated inflammation and insulin resistance in skeletal muscle*. FASEB Journal, 2017. **31**(2): p. 701-710.
248. 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*. Journal of Experimental Medicine, 1989. **169**(1): p. 333-8.
249. Wirtz, D.C., K.D. Heller, O. Miltner, K.W. Zilkens, and J.M. Wolff, *Interleukin-6: a potential inflammatory marker after total joint replacement*. International Orthopaedics, 2000. **24**(4): p. 194-6.
250. Pedersen, B.K., *Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor*. Medicine and Science in Sports and Exercise, 2012. **44**(3): p. 392-6.
251. Hennigar, S.R., J.P. McClung, and S.M. Pasiakos, *Nutritional interventions and the IL-6 response to exercise*. FASEB Journal, 2017. **31**(9): p. 3719-3728.
252. Hojman, P., C. Brolin, N. Nørgaard-Christensen, C. Dethlefsen, B. Lauenborg, C.K. Olsen, M.M. Åbom, T. Krag, J. Gehl, and B.K. Pedersen, *IL-6 release from muscles during exercise is stimulated by lactate-dependent protease activity*. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 2019. **316**(5): p. E940-e947.
253. Pedersen, B.K., *Muscle as a secretory organ*. Comprehensive Physiology, 2013. **3**(3): p. 1337-62.
254. Steensberg, A., M.A. Febbraio, T. Osada, P. Schjerling, G. van Hall, B. Saltin, and B.K. Pedersen, *Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content*. Journal of Physiology, 2001. **537**(Pt 2): p. 633-9.
255. Fischer, C.P., N.J. Hiscock, M. Penkowa, S. Basu, B. Vessby, A. Kallner, L.B. Sjöberg, and B.K. Pedersen, *Supplementation with vitamins C and E inhibits the release of interleukin-6 from contracting human skeletal muscle*. Journal of Physiology, 2004. **558**(Pt 2): p. 633-45.
256. Lukaszuk, B., I. Bialuk, J. Górski, M. Zajączkiewicz, M.M. Winnicka, and A. Chabowski, *A single bout of exercise increases the expression of glucose but not fatty acid transporters in skeletal muscle of IL-6 KO mice*. Lipids, 2012. **47**(8): p. 763-72.
257. Chowdhury, S., L. Schulz, B. Palmisano, P. Singh, J.M. Berger, V.K. Yadav, P. Mera, H. Ellingsgaard, J. Hidalgo, J. Brüning, and G. Karsenty, *Muscle-derived interleukin 6 increases exercise capacity by signaling in osteoblasts*. Journal of Clinical Investigation, 2020. **130**(6): p. 2888-2902.
258. Wojewoda, M., K. Kmiecik, J. Majerczak, R. Ventura-Clapier, D. Fortin, M. Onopiuk, J. Rog, K. Kaminski, S. Chlopicki, and J.A. Zoladz, *Skeletal Muscle Response to Endurance Training in IL-6-/- Mice*. International Journal of Sports Medicine, 2015. **36**(14): p. 1163-9.

259. Serrano, A.L., B. Baeza-Raja, E. Perdiguero, M. Jardí, and P. Muñoz-Cánoves, *Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy*. Cell Metabolism, 2008. **7**(1): p. 33-44.
260. Nemet, D., A. Eliakim, F. Zaldivar, and D.M. Cooper, *Effect of rhIL-6 infusion on GH-->IGF-I axis mediators in humans*. American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2006. **291**(6): p. R1663-8.
261. Muñoz-Cánoves, P., C. Scheele, B.K. Pedersen, and A.L. Serrano, *Interleukin-6 myokine signaling in skeletal muscle: a double-edged sword?* FEBS Journal, 2013. **280**(17): p. 4131-48.
262. Febbraio, M.A., N. Hiscock, M. Sacchetti, C.P. Fischer, and B.K. Pedersen, *Interleukin-6 is a novel factor mediating glucose homeostasis during skeletal muscle contraction*. Diabetes, 2004. **53**(7): p. 1643-8.
263. Barnes, T.M., Y.F. Otero, A.D. Elliott, A.D. Locke, C.M. Malabanan, A.G. Coldren, M. Brissova, D.W. Piston, and O.P. McGuinness, *Interleukin-6 amplifies glucagon secretion: coordinated control via the brain and pancreas*. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 2014. **307**(10): p. E896-905.
264. Carey, A.L., G.R. Steinberg, S.L. Macaulay, W.G. Thomas, A.G. Holmes, G. Ramm, O. Prelovsek, C. Hohnen-Behrens, M.J. Watt, D.E. James, B.E. Kemp, B.K. Pedersen, and M.A. Febbraio, *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-97.
265. Saini, A., S.H. Faulkner, H. Moir, P. Warwick, J.A. King, and M.A. Nimmo, *Interleukin-6 in combination with the interleukin-6 receptor stimulates glucose uptake in resting human skeletal muscle independently of insulin action*. Diabetes, Obesity & Metabolism, 2014. **16**(10): p. 931-6.
266. Ploug, T., B. van Deurs, H. Ai, S.W. Cushman, and E. Ralston, *Analysis of GLUT4 distribution in whole skeletal muscle fibers: identification of distinct storage compartments that are recruited by insulin and muscle contractions*. Journal of Cell Biology, 1998. **142**(6): p. 1429-46.
267. Lauritzen, H.P., *Insulin- and contraction-induced glucose transporter 4 traffic in muscle: insights from a novel imaging approach*. Exercise and Sport Sciences Reviews, 2013. **41**(2): p. 77-86.
268. Lizcano, J.M. and D.R. Alessi, *The insulin signalling pathway*. Current Biology, 2002. **12**(7): p. R236-8.
269. van Hall, G., A. Steensberg, M. Sacchetti, C. Fischer, C. Keller, P. Schjerling, N. Hiscock, K. Møller, B. Saltin, M.A. Febbraio, and B.K. Pedersen, *Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans*. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2003. **88**(7): p. 3005-10.
270. Wolsk, E., H. Mygind, T.S. Grøndahl, B.K. Pedersen, and G. van Hall, *IL-6 selectively stimulates fat metabolism in human skeletal muscle*. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 2010. **299**(5): p. E832-40.
271. Kiens, B., S. Kristiansen, P. Jensen, E.A. Richter, and L.P. Turcotte, *Membrane associated fatty acid binding protein (FABPpm) in human skeletal muscle is increased*

- by endurance training*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1997. **231**(2): p. 463-5.
272. Glatz, J.F., J.J. Luiken, and A. Bonen, *Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: implications for metabolic disease*. Physiological Reviews, 2010. **90**(1): p. 367-417.
 273. Kim, J.K., J.J. Fillmore, Y. Chen, C. Yu, I.K. Moore, M. Pypaert, E.P. Lutz, Y. Kako, W. Velez-Carrasco, I.J. Goldberg, J.L. Breslow, and G.I. Shulman, *Tissue-specific overexpression of lipoprotein lipase causes tissue-specific insulin resistance*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001. **98**(13): p. 7522-7.
 274. Kim, H.J., T. Higashimori, S.Y. Park, H. Choi, J. Dong, Y.J. Kim, H.L. Noh, Y.R. Cho, G. Cline, Y.B. Kim, and J.K. Kim, *Differential effects of interleukin-6 and -10 on skeletal muscle and liver insulin action in vivo*. Diabetes, 2004. **53**(4): p. 1060-7.
 275. Radványi, Á. and T. Röszer, *Interleukin-6: An Under-Appreciated Inducer of Thermogenic Adipocyte Differentiation*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(5).
 276. Weisberg, S.P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R.L. Leibel, and A.W. Ferrante, Jr., *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. Journal of Clinical Investigation, 2003. **112**(12): p. 1796-808.
 277. Fain, J.N., A.K. Madan, M.L. Hiler, P. Cheema, and S.W. Bahouth, *Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans*. Endocrinology, 2004. **145**(5): p. 2273-82.
 278. Trayhurn, P. and I.S. Wood, *Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue*. British Journal of Nutrition, 2004. **92**(3): p. 347-55.
 279. Huynh, P.M., F. Wang, and Y.A. An, *Hypoxia signaling in the adipose tissue*. Journal of Molecular Cell Biology, 2025. **16**(8).
 280. Mirabelli, M., R. Misiti, L. Sicilia, F.S. Brunetti, E. Chiefari, A. Brunetti, and D.P. Foti, *Hypoxia in Human Obesity: New Insights from Inflammation towards Insulin Resistance-A Narrative Review*. International Journal of Molecular Sciences, 2024. **25**(18).
 281. Eder, K., N. Baffy, A. Falus, and A.K. Fulop, *The major inflammatory mediator interleukin-6 and obesity*. Inflammation Research, 2009. **58**(11): p. 727-36.
 282. Fried, S.K., D.A. Bunkin, and A.S. Greenberg, *Omental and Subcutaneous Adipose Tissues of Obese Subjects Release Interleukin-6: Depot Difference and Regulation by Glucocorticoid1*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 1998. **83**(3): p. 847-850.
 283. Wajchenberg, B.L., *Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome*. Endocrine Reviews, 2000. **21**(6): p. 697-738.
 284. Rotter, V., I. Nagaev, and U. Smith, *Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(46): p. 45777-84.

285. Tang, P., S. Virtue, J.Y.G. Goie, C.W. Png, J. Guo, Y. Li, H. Jiao, Y.L. Chua, M. Campbell, J.M. Moreno-Navarrete, A. Shabbir, J.M. Fernández-Real, S. Gasser, D.M. Kemeny, H. Yang, A. Vidal-Puig, and Y. Zhang, *Regulation of adipogenic differentiation and adipose tissue inflammation by interferon regulatory factor 3*. *Cell Death and Differentiation*, 2021. **28**(11): p. 3022-3035.
286. King, G.L., *The role of inflammatory cytokines in diabetes and its complications*. *Journal of Periodontology*, 2008. **79**(8 Suppl): p. 1527-34.
287. Wensveen, F.M., S. Valentić, M. Šestan, T. Turk Wensveen, and B. Polić, *The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation*. *European Journal of Immunology*, 2015. **45**(9): p. 2446-56.
288. Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. *Nature*, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
289. Murakami, M., M. Harada, D. Kamimura, H. Ogura, Y. Okuyama, N. Kumai, A. Okuyama, R. Singh, J.J. Jiang, T. Atsumi, S. Shiraya, Y. Nakatsuji, M. Kinoshita, H. Kohsaka, M. Nishida, S. Sakoda, N. Miyasaka, K. Yamauchi-Takahara, and T. Hirano, *Disease-association analysis of an inflammation-related feedback loop*. *Cell Reports*, 2013. **3**(3): p. 946-59.
290. Lee, J., T. Nakagiri, T. Oto, M. Harada, E. Morii, Y. Shintani, M. Inoue, Y. Iwakura, S. Miyoshi, M. Okumura, T. Hirano, and M. Murakami, *IL-6 amplifier, NF-κB-triggered positive feedback for IL-6 signaling, in grafts is involved in allogeneic rejection responses*. *Journal of Immunology*, 2012. **189**(4): p. 1928-36.
291. Singh, M., N. Prasad, M. Rai, A.K. Jaiswal, M.R. Behera, V. Agarwal, and D.P. Misra, *MO919THE INTERPLAY BETWEEN IL-6 AND IL-17 MIGHT PLAY A SIGNIFICANT ROLE IN CHRONIC ANTIBODY MEDIATED REJECTION IN RENAL ALLOGRAFT RECIPIENTS*. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2021. **36**(Supplement_1).
292. Hou, W., Y.H. Jin, H.S. Kang, and B.S. Kim, *Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 synergistically promote viral persistence by inhibiting cellular apoptosis and cytotoxic T cell function*. *Journal of Virology*, 2014. **88**(15): p. 8479-89.
293. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 860-7.
294. Ikeda, S.I., Y. Tamura, S. Takehi, H. Sanada, R. Kawamori, and H. Watada, *Exercise-induced increase in IL-6 level enhances GLUT4 expression and insulin sensitivity in mouse skeletal muscle*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016. **473**(4): p. 947-952.
295. Klover, P.J., T.A. Zimmers, L.G. Koniaris, and R.A. Mooney, *Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice*. *Diabetes*, 2003. **52**(11): p. 2784-9.
296. Senn, J.J., P.J. Klover, I.A. Nowak, and R.A. Mooney, *Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes*. *Diabetes*, 2002. **51**(12): p. 3391-9.
297. Han, M.S., A. White, R.J. Perry, J.P. Camporez, J. Hidalgo, G.I. Shulman, and R.J. Davis, *Regulation of adipose tissue inflammation by interleukin 6*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020. **117**(6): p. 2751-2760.
298. Tournadre, A., B. Pereira, F. Dutheil, C. Giraud, D. Courteix, V. Sapin, T. Frayssac, S. Mathieu, S. Malochet-Guinamand, and M. Soubrier, *Changes in body composition and*

- metabolic profile during interleukin 6 inhibition in rheumatoid arthritis*. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2017. **8**(4): p. 639-646.
299. Blanchard, F., L. Duplomb, M. Baud'huin, and B. Brounais, *The dual role of IL-6-type cytokines on bone remodeling and bone tumors*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2009. **20**(1): p. 19-28.
 300. Timper, K., J.L. Denson, S.M. Steculorum, C. Heilinger, L. Engström-Ruud, C.M. Wunderlich, S. Rose-John, F.T. Wunderlich, and J.C. Brüning, *IL-6 Improves Energy and Glucose Homeostasis in Obesity via Enhanced Central IL-6 trans-Signaling*. Cell Reports, 2017. **19**(2): p. 267-280.
 301. Martins, C., M.D. Robertson, and L.M. Morgan, *Effects of exercise and restrained eating behaviour on appetite control*. Proceedings of the Nutrition Society, 2008. **67**(1): p. 28-41.
 302. Lang Lehrskov, L., M.P. Lyngbaek, L. Soederlund, G.E. Legaard, J.A. Ehses, S.E. Heywood, N.J. Wewer Albrechtsen, J.J. Holst, K. Karstoft, B.K. Pedersen, and H. Ellingsgaard, *Interleukin-6 Delays Gastric Emptying in Humans with Direct Effects on Glycemic Control*. Cell Metabolism, 2018. **27**(6): p. 1201-1211.e3.
 303. Steensberg, A., C.P. Fischer, C. Keller, K. Møller, and B.K. Pedersen, *IL-6 enhances plasma IL-1ra, IL-10, and cortisol in humans*. American Journal of Physiology: Endocrinology and Metabolism, 2003. **285**(2): p. E433-7.
 304. Gavito, A.L., D. Bautista, J. Suarez, S. Badran, R. Arco, F.J. Pavón, A. Serrano, P. Rivera, J. Decara, A.L. Cuesta, F. Rodríguez-de-Fonseca, and E. Baixeras, *Chronic IL-6 Administration Desensitizes IL-6 Response in Liver, Causes Hyperleptinemia and Aggravates Steatosis in Diet-Induced-Obese Mice*. PLOS ONE, 2016. **11**(6): p. e0157956.
 305. Vida, M., A.L. Gavito, F.J. Pavón, D. Bautista, A. Serrano, J. Suarez, S. Arrabal, J. Decara, M. Romero-Cuevas, F. Rodríguez de Fonseca, and E. Baixeras, *Chronic administration of recombinant IL-6 upregulates lipogenic enzyme expression and aggravates high-fat-diet-induced steatosis in IL-6-deficient mice*. Disease Models & Mechanisms, 2015. **8**(7): p. 721-31.
 306. Wieckowska, A., B.G. Papouchado, Z. Li, R. Lopez, N.N. Zein, and A.E. Feldstein, *Increased hepatic and circulating interleukin-6 levels in human nonalcoholic steatohepatitis*. American Journal of Gastroenterology, 2008. **103**(6): p. 1372-9.
 307. Vignali, D.A. and V.K. Kuchroo, *IL-12 family cytokines: immunological playmakers*. Nature Immunology, 2012. **13**(8): p. 722-8.
 308. Hirahara, K., A. Onodera, A.V. Villarino, M. Bonelli, G. Sciumè, A. Laurence, H.W. Sun, S.R. Brooks, G. Vahedi, H.Y. Shih, G. Gutierrez-Cruz, S. Iwata, R. Suzuki, Y. Mikami, Y. Okamoto, T. Nakayama, S.M. Holland, C.A. Hunter, Y. Kanno, and J.J. O'Shea, *Asymmetric Action of STAT Transcription Factors Drives Transcriptional Outputs and Cytokine Specificity*. Immunity, 2015. **42**(5): p. 877-89.
 309. Trinchieri, G., *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity*. Annual Review of Immunology, 1995. **13**: p. 251-76.
 310. Pearce, E.L. and H. Shen, *Generation of CD8 T cell memory is regulated by IL-12*. Journal of Immunology, 2007. **179**(4): p. 2074-81.

311. Trinchieri, G., *Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12*. International Reviews of Immunology, 1998. **16**(3-4): p. 365-96.
312. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nature Reviews Immunology, 2003. **3**(2): p. 133-46.
313. Mahmoudzadeh, S., H. Nozad Charoudeh, C.S. Marques, S. Bahadory, and E. Ahmadpour, *The role of IL-12 in stimulating NK cells against Toxoplasma gondii infection: a mini-review*. Parasitology Research, 2021. **120**(7): p. 2303-2309.
314. Ma, X. and G. Trinchieri, *Regulation of interleukin-12 production in antigen-presenting cells*. Advances in Immunology, 2001. **79**: p. 55-92.
315. Tugues, S., S.H. Burkhard, I. Ohs, M. Vrohling, K. Nussbaum, J. Vom Berg, P. Kulig, and B. Becher, *New insights into IL-12-mediated tumor suppression*. Cell Death and Differentiation, 2015. **22**(2): p. 237-46.
316. Kobayashi, M., L. Fitz, M. Ryan, R.M. Hewick, S.C. Clark, S. Chan, R. Loudon, F. Sherman, B. Perussia, and G. Trinchieri, *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. Journal of Experimental Medicine, 1989. **170**(3): p. 827-45.
317. Heufler, C., F. Koch, U. Stanzl, G. Topar, M. Wysocka, G. Trinchieri, A. Enk, R.M. Steinman, N. Romani, and G. Schuler, *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells*. European Journal of Immunology, 1996. **26**(3): p. 659-68.
318. Hsieh, C.S., S.E. Macatonia, C.S. Tripp, S.F. Wolf, A. O'Garra, and K.M. Murphy, *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
319. Kaliński, P., C.M. Hilken, A. Snijders, F.G. Snijdwint, and M.L. Kapsenberg, *IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells*. Journal of Immunology, 1997. **159**(1): p. 28-35.
320. Yap, G., M. Pesin, and A. Sher, *Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii*. Journal of Immunology, 2000. **165**(2): p. 628-31.
321. Wong, U. and R.K. Cross, *Expert opinion on interleukin-12/23 and interleukin-23 antagonists as potential therapeutic options for the treatment of inflammatory bowel disease*. Expert Opinion on Investigational Drugs, 2019. **28**(5): p. 473-479.
322. Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J.C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J.S. Abrams, K.W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J.F. Bazan, and R.A. Kastelein, *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-25.
323. Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver, *Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages*. Nature Immunology, 2005. **6**(11): p. 1123-32.

324. Zielinski, C.E., F. Mele, D. Aschenbrenner, D. Jarrossay, F. Ronchi, M. Gattorno, S. Monticelli, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto, *Pathogen-induced human TH17 cells produce IFN- γ or IL-10 and are regulated by IL-1 β* . *Nature*, 2012. **484**(7395): p. 514-8.
325. Reitberger, S., P. Haimerl, I. Aschenbrenner, J. Esser-von Bieren, and M.J. Feige, *Assembly-induced folding regulates interleukin 12 biogenesis and secretion*. *Journal of Biological Chemistry*, 2017. **292**(19): p. 8073-8081.
326. Yoon, C., S.C. Johnston, J. Tang, M. Stahl, J.F. Tobin, and W.S. Somers, *Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12*. *EMBO Journal*, 2000. **19**(14): p. 3530-41.
327. Hildenbrand, K., I. Aschenbrenner, F.C. Franke, O. Devergne, and M.J. Feige, *Biogenesis and engineering of interleukin 12 family cytokines*. *Trends in Biochemical Sciences*, 2022. **47**(11): p. 936-949.
328. Gately, M.K., L.M. Renzetti, J. Magram, A.S. Stern, L. Adorini, U. Gubler, and D.H. Presky, *The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses*. *Annual Review of Immunology*, 1998. **16**: p. 495-521.
329. Presky, D.H., H. Yang, L.J. Minetti, A.O. Chua, N. Nabavi, C.Y. Wu, M.K. Gately, and U. Gubler, *A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996. **93**(24): p. 14002-7.
330. Bastian, D., Y. Wu, B.C. Betts, and X.Z. Yu, *The IL-12 Cytokine and Receptor Family in Graft-vs.-Host Disease*. *Frontiers in Immunology*, 2019. **10**: p. 988.
331. Hummel, T.M., T. Ackfeld, M. Schönborg, G. Ciupka, F. Schulz, A. Oberdoerster, J. Grötzinger, J. Scheller, and D.M. Floss, *Synthetic Deletion of the Interleukin 23 Receptor (IL-23R) Stalk Region Led to Autonomous IL-23R Homodimerization and Activation*. *Molecular and Cellular Biology*, 2017. **37**(17).
332. Reetz, J., *unveröffentlicht*, in *Institut für Biochemie und Molekularbiologie II*. unveröffentlicht, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
333. Peters, M., S. Jacobs, M. Ehlers, P. Vollmer, J. Müllberg, E. Wolf, G. Brem, K.H. Meyer zum Büschenfelde, and S. Rose-John, *The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6*. *Journal of Experimental Medicine*, 1996. **183**(4): p. 1399-406.
334. Weitz, H.T., J. Ettich, P. Rafii, C. Wittich, L. Schultz, N.C. Frank, D. Heise, M. Krusche, J. Lokau, C. Garbers, K. Behnke, D.M. Floss, H. Kolmar, J.M. Moll, and J. Scheller, *Interleukin-11 receptor is an alternative α -receptor for interleukin-6 and the chimeric cytokine IC7*. *FEBS Journal*, 2025. **292**(3): p. 523-536.
335. Nitz, R., J. Lokau, S. Aparicio-Siegmund, J. Scheller, and C. Garbers, *Modular organization of Interleukin-6 and Interleukin-11 α -receptors*. *Biochimie*, 2015. **119**: p. 175-82.
336. 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003. **278**(11): p. 9528-35.

337. Plun-Favreau, H., G. Elson, M. Chabbert, J. Froger, O. deLapeyrière, E. Lelièvre, C. Guillet, J. Hermann, J.F. Gauchat, H. Gascan, and S. Chevalier, *The ciliary neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine*. EMBO Journal, 2001. **20**(7): p. 1692-703.
338. Kim, J.W., C.P. Marquez, R.A.P. Sperberg, J. Wu, W.G. Bae, P.S. Huang, E.A. Sweet-Cordero, and J.R. Cochran, *Engineering a potent receptor superagonist or antagonist from a novel IL-6 family cytokine ligand*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020. **117**(25): p. 14110-14118.
339. Elson, G.C., E. Lelièvre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, I. Suard, A.B. de Coignac, Y. Delneste, J.Y. Bonnefoy, J.F. Gauchat, and H. Gascan, *CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex*. Nature Neuroscience, 2000. **3**(9): p. 867-72.
340. Walker, E.C., R.W. Johnson, Y. Hu, H.J. Brennan, I.J. Poulton, J.G. Zhang, B.J. Jenkins, G.K. Smyth, N.A. Nicola, and N.A. Sims, *Murine Oncostatin M Acts via Leukemia Inhibitory Factor Receptor to Phosphorylate Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) but Not STAT1, an Effect That Protects Bone Mass*. Journal of Biological Chemistry, 2016. **291**(41): p. 21703-21716.
341. Houben, E., N. Hellings, and B. Broux, *Oncostatin M, an Underestimated Player in the Central Nervous System*. Frontiers in Immunology, 2019. **10**: p. 1165.
342. Schoenhaut, D.S., A.O. Chua, A.G. Wolitzky, P.M. Quinn, C.M. Dwyer, W. McComas, P.C. Familletti, M.K. Gately, and U. Gubler, *Cloning and expression of murine IL-12*. Journal of Immunology, 1992. **148**(11): p. 3433-40.
343. Zou, J.J., D.S. Schoenhaut, D.M. Carvajal, R.R. Warrier, D.H. Presky, M.K. Gately, and U. Gubler, *Structure-function analysis of the p35 subunit of mouse interleukin 12*. Journal of Biological Chemistry, 1995. **270**(11): p. 5864-71.
344. Moraga, I., J.B. Spangler, J.L. Mendoza, M. Gakovic, T.S. Wehrman, P. Krutzik, and K.C. Garcia, *Synthetic cytokines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers*. eLife, 2017. **6**.
345. Silva, D.A., S. Yu, U.Y. Ulge, J.B. Spangler, K.M. Jude, C. Labão-Almeida, L.R. Ali, A. Quijano-Rubio, M. Ruterbusch, I. Leung, T. Biary, S.J. Crowley, E. Marcos, C.D. Walkey, B.D. Weitzner, F. Pardo-Avila, J. Castellanos, L. Carter, L. Stewart, S.R. Riddell, M. Pepper, G.J.L. Bernardes, M. Dougan, K.C. Garcia, and D. Baker, *De novo design of potent and selective mimics of IL-2 and IL-15*. Nature, 2019. **565**(7738): p. 186-191.
346. Ng, S. and J. Galipeau, *Concise review: engineering the fusion of cytokines for the modulation of immune cellular responses in cancer and autoimmune disorders*. Stem Cells Translational Medicine, 2015. **4**(1): p. 66-73.
347. 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*. Journal of Biological Chemistry, 2024. **300**(5): p. 107251.
348. Scheller, J., J. Ettich, C. Wittich, S. Pudewell, D.M. Floss, and P. Rafii, *Exploring the landscape of synthetic IL-6-type cytokines*. FEBS Journal, 2024. **291**(10): p. 2030-2050.
349. Vriend, G., *WHAT IF: a molecular modeling and drug design program*. Journal of Molecular Graphics, 1990. **8**(1): p. 52-6, 29.

350. Di Marco, A., I. Gloaguen, R. Graziani, G. Paonessa, I. Saggio, K.R. Hudson, and R. Laufer, *Identification of ciliary neurotrophic factor (CNTF) residues essential for leukemia inhibitory factor receptor binding and generation of CNTF receptor antagonists*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(17): p. 9247-52.
351. 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, et al., *Treatment of type 2 diabetes with the designer cytokine IC7Fc*. Nature, 2019. **574**(7776): p. 63-68.
352. Strohl, W.R., *Fusion Proteins for Half-Life Extension of Biologics as a Strategy to Make Biobetters*. BioDrugs, 2015. **29**(4): p. 215-39.
353. In Het Panhuis, W., E. Thiemann, D. van Dijk, B. Been, K.E. Jarrett, A. Meurs, S. Kooijman, M.V. Hovingh, M. Modder, B.W. van Os, T.J. Sluiter, N. Blomberg, A.C.M. Pronk, S. Afkir, T.C.M. Streefland, R.A. Lalai, M.O. Taveras, S. Zhang, T.E. Adams, L.V. Terry, S.M. Turpin-Nolan, M.R. de Vries, M. Giera, S. Rose-John, N. Zelcer, J.F. de Boer, T.Q. de Aguiar Vallim, M.A. Febbraio, P.C.N. Rensen, and M. Schönke, *The designer cytokine IC7Fc attenuates atherosclerosis development by targeting hyperlipidemia in mice*. Science Advances, 2025. **11**(43): p. eadx3794.
354. Rafii-Baharlo, P., *Generierung synthetischer Zytokine und Einfluss von IC7Fc auf Myokardinfarkt*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät*. 2022, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
355. *A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rHCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis*. ALS CNTF Treatment Study Group. Neurology, 1996. **46**(5): p. 1244-9.
356. Duff, E. and C.A. Baile, *Ciliary neurotrophic factor: a role in obesity?* Nutrition Reviews, 2003. **61**(12): p. 423-6.
357. Ettinger, M.P., T.W. Littlejohn, S.L. Schwartz, S.R. Weiss, H.H. McIlwain, S.B. Heymsfield, G.A. Bray, W.G. Roberts, E.R. Heyman, N. Stambler, S. Heshka, C. Vicary, and H.P. Guler, *Recombinant variant of ciliary neurotrophic factor for weight loss in obese adults: a randomized, dose-ranging study*. JAMA, 2003. **289**(14): p. 1826-32.
358. Matthews, V.B. and M.A. Febbraio, *CNTF: a target therapeutic for obesity-related metabolic disease?* Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany), 2008. **86**(4): p. 353-61.
359. Preti, A., *Axokine (Regeneron)*. IDrugs, 2003. **6**(7): p. 696-701.
360. Kraakman, M.J., H.L. Kammoun, T.L. Allen, V. Deswaerte, D.C. Henstridge, E. Estevez, V.B. Matthews, B. Neill, D.A. White, A.J. Murphy, L. Peijs, C. Yang, S. Risis, C.R. Bruce, X.J. Du, A. Bobik, R.S. Lee-Young, B.A. Kingwell, A. Vasanthakumar, W. Shi, A. Kallies, G.I. Lancaster, S. Rose-John, and M.A. Febbraio, *Blocking IL-6 trans-signaling prevents high-fat diet-induced adipose tissue macrophage recruitment but does not improve insulin resistance*. Cell Metabolism, 2015. **21**(3): p. 403-16.
361. Seibel, C., *Untersuchungen der Rezeptoren Glykoprotein 130 und Interleukin-6 Rezeptor in Hinblick auf deren Komplexbildung, Signalwege und Präformation*, in

- Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Institut für Molekularbiologie und Biochemie II.* 2024, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
362. 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*. Journal of Immunology, 2010. **184**(12): p. 7219-28.
 363. Kelley, L.A. and M.J. Sternberg, *Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server*. Nature Protocols, 2009. **4**(3): p. 363-71.
 364. Chen, X., J.L. Zaro, and W.C. Shen, *Fusion protein linkers: property, design and functionality*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2013. **65**(10): p. 1357-69.
 365. Bromberg, J.F., M.H. Wrzeszczynska, G. Devgan, Y. Zhao, R.G. Pestell, C. Albanese, and J.E. Darnell, Jr., *Stat3 as an oncogene*. Cell, 1999. **98**(3): p. 295-303.
 366. Kiuchi, N., K. Nakajima, M. Ichiba, T. Fukada, M. Narimatsu, K. Mizuno, M. Hibi, and T. Hirano, *STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(1): p. 63-73.
 367. Georgy, J., *Funktionelle Charakterisierung der site II Interaktion zwischen IL-12/IL-23p40 und IL-12R β 1*, in *Medizinischen Fakultät, Institut für Molekularbiologie und Biochemie II.* 2024, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
 368. Horstmeier, F.C., *Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion von IL-23 und eines möglichen Einflusses von SOCS3 und CIB2*, in *Medizinischen Fakultät, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II.* 2022, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf, Germany.
 369. Evers-van Gogh, I.J.A., S. Alex, R. Stienstra, A.B. Brenkman, S. Kersten, and E. Kalkhoven, *Electric Pulse Stimulation of Myotubes as an In Vitro Exercise Model: Cell-Mediated and Non-Cell-Mediated Effects*. Scientific Reports, 2015. **5**(1): p. 10944.
 370. Haddad, F., F. Zaldivar, D.M. Cooper, and G.R. Adams, *IL-6-induced skeletal muscle atrophy*. Journal of Applied Physiology, 2005. **98**(3): p. 911-7.
 371. Pelosi, L., M.G. Berardinelli, L. Forcina, F. Ascenzi, E. Rizzuto, M. Sandri, F. De Benedetti, B.M. Scicchitano, and A. Musarò, *Sustained Systemic Levels of IL-6 Impinge Early Muscle Growth and Induce Muscle Atrophy and Wasting in Adulthood*. Cells, 2021. **10**(7).
 372. Chen, H., X. Huang, M. Dong, S. Wen, L. Zhou, and X. Yuan, *The Association Between Sarcopenia and Diabetes: From Pathophysiology Mechanism to Therapeutic Strategy*. Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity, 2023. **16**: p. 1541-1554.
 373. Hoene, M., H. Runge, H.U. Häring, E.D. Schleicher, and C. Weigert, *Interleukin-6 promotes myogenic differentiation of mouse skeletal muscle cells: role of the STAT3 pathway*. American Journal of Physiology: Cell Physiology, 2013. **304**(2): p. C128-36.
 374. Steyn, P.J., K. Dzobo, R.I. Smith, and K.H. Myburgh, *Interleukin-6 Induces Myogenic Differentiation via JAK2-STAT3 Signaling in Mouse C2C12 Myoblast Cell Line and Primary Human Myoblasts*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(21).
 375. Zanders, L., M. Kny, A. Hahn, S. Schmidt, S. Wundersitz, M. Todiras, I. Lahmann, A. Bandyopadhyay, T. Wollersheim, L. Kaderali, F.C. Luft, C. Birchmeier, S. Weber-

- Carstens, and J. Fielitz, *Sepsis induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting*. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2022. **13**(1): p. 713-727.
376. Jung, Y.K., S. Lee, J.I. Yoo, and K.W. Baek, *The protective effect of IL-12/23 neutralizing antibody in sarcopenia associated with dextran sulfate sodium-induced experimental colitis*. Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle, 2023. **14**(2): p. 1096-1106.
377. Song, L., R. Xu, W. Cai, J. Liang, N. Cao, J. Gao, and X. Tang, *IL-6 upregulates the expression of IL-6R through the JAK2/STAT3 signalling pathway to promote progression of hepatocellular carcinoma*. Scandinavian Journal of Immunology, 2023. **98**(1): p. e13271.
378. 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.
379. Simpson, R.J., A. Hammacher, D.K. Smith, J.M. Matthews, and L.D. Ward, *Interleukin-6: structure-function relationships*. Protein Science, 1997. **6**(5): p. 929-55.
380. Akdis, M., S. Burgler, R. Cramer, T. Eiwegger, H. Fujita, E. Gomez, S. Klunker, N. Meyer, L. O'Mahony, O. Palomares, C. Rhyner, N. Ouaked, A. Schaffartzik, W. Van De Veen, S. Zeller, M. Zimmermann, and C.A. Akdis, *Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : receptors, functions, and roles in diseases*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2011. **127**(3): p. 701-21.e1-70.
381. Lokau, J., M. Agthe, C.M. Flynn, and C. Garbers, *Proteolytic control of Interleukin-11 and Interleukin-6 biology*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2017. **1864**(11 Pt B): p. 2105-2117.
382. Lo, K.M., Y. Sudo, J. Chen, Y. Li, Y. Lan, S.M. Kong, L. Chen, Q. An, and S.D. Gillies, *High level expression and secretion of Fc-X fusion proteins in mammalian cells*. Protein Engineering, 1998. **11**(6): p. 495-500.
383. Ki, M.R. and S.P. Pack, *Fusion tags to enhance heterologous protein expression*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. **104**(6): p. 2411-2425.
384. Carson, M., D.H. Johnson, H. McDonald, C. Brouillette, and L.J. Delucas, *His-tag impact on structure*. Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography, 2007. **63**(Pt 3): p. 295-301.
385. Czajkowsky, D.M., J. Hu, Z. Shao, and R.J. Pleass, *Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives*. EMBO Molecular Medicine, 2012. **4**(10): p. 1015-28.
386. Carter, P.J., *Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective*. Experimental Cell Research, 2011. **317**(9): p. 1261-9.
387. Gressner, A.M. and T. Arndt, *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik (3. Auflage.)*. 2019: Springer Berlin Heidelberg Imprint: Springer.
388. Amann-Vesti, B.R., C. Arnold, R. Bals, F. Beuschlein, M. Böhm, U. Büttner, R. Düsing, F. Er, M. Fromm, R. Gärtner, S. Gay, M. Geißler, D. Häussinger, M. Hallek, S. Harendza, U. Hoffmann, R. Hohlfeld, L. Kanz, S.H.E. Kaufmann, M. Kindermann, J. Kohlhasse, K.A. Kreuzer, U. Laufs, A. Link, M. Ludwig, C. Maack, S. Martin, D. Moradpour, U. Müller-Ladner, P.P. Nawroth, et al., *Klinische Pathophysiologie*, W. Siegenthaler and H.E. Blum, Editors. 2006, Georg Thieme Verlag KG: Stuttgart.

389. Kontermann, R.E., *Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics*. Current Opinion in Biotechnology, 2011. **22**(6): p. 868-76.
390. Murphy, K. and C. Weaver, *Janeway Immunologie 9. Auflage*. 2018.
391. Arakawa, T. and T. Akuta, *Beyond Purification: Evolving Roles of Fusion Tags in Biotechnology*. Current Issues in Molecular Biology, 2025. **47**(9).
392. Zwolak, A., A.A. Armstrong, S.H. Tam, J.R. Pardinas, D.R. Goulet, S. Zheng, K. Brosnan, E. Emmell, J. Luo, G.L. Gilliland, and M.L. Chiu, *Modulation of protein A binding allows single-step purification of mouse bispecific antibodies that retain FcRn binding*. MAbs, 2017. **9**(8): p. 1306-1316.
393. Onufriev, A.V. and E. Alexov, *Protonation and pK changes in protein-ligand binding*. Quarterly Reviews of Biophysics, 2013. **46**(2): p. 181-209.
394. Talley, K. and E. Alexov, *On the pH-optimum of activity and stability of proteins*. Proteins, 2010. **78**(12): p. 2699-706.
395. Yang, A.S. and B. Honig, *On the pH dependence of protein stability*. Journal of Molecular Biology, 1993. **231**(2): p. 459-74.
396. Skerra, A. and T.G. Schmidt, *Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins*. Methods in Enzymology, 2000. **326**: p. 271-304.
397. Georgy, J., Y. Arlt, J.M. Moll, M. Ouzin, H.T. Weitz, L. Gremer, D. Willbold, J. Grötzinger, F. Thives-Kurenbach, J. Scheller, and D.M. Floss, *Tryptophan (W) at position 37 of murine IL-12/IL-23 p40 is mandatory for binding to IL-12R β 1 and subsequent signal transduction*. Journal of Biological Chemistry, 2021. **297**(5): p. 101295.
398. Schröder, J., J.M. Moll, P. Baran, J. Grötzinger, J. Scheller, and D.M. Floss, *Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor β 1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III*. Journal of Biological Chemistry, 2015. **290**(1): p. 359-70.
399. Lupardus, P.J. and K.C. Garcia, *The structure of interleukin-23 reveals the molecular basis of p40 subunit sharing with interleukin-12*. Journal of Molecular Biology, 2008. **382**(4): p. 931-41.
400. Saltiel, A.R. and C.R. Kahn, *Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 799-806.
401. Taniguchi, C.M., B. Emanuelli, and C.R. Kahn, *Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2006. **7**(2): p. 85-96.
402. Gao, S., J.L. Durstine, H.J. Koh, W.E. Carver, N. Frizzell, and J.A. Carson, *Acute myotube protein synthesis regulation by IL-6-related cytokines*. American Journal of Physiology: Cell Physiology, 2017. **313**(5): p. C487-c500.
403. Zhang, J.G., C.M. Owczarek, L.D. Ward, G.J. Howlett, L.J. Fabri, B.A. Roberts, and N.A. Nicola, *Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution*. Biochemical Journal, 1997. **325**(Pt 3): p. 693-700.
404. Layton, M.J., P. Lock, D. Metcalf, and N.A. Nicola, *Cross-species receptor binding characteristics of human and mouse leukemia inhibitory factor suggest a complex binding interaction*. Journal of Biological Chemistry, 1994. **269**(25): p. 17048-55.

405. Lim, R.W., C.Y. Zhu, and B. Stringer, *Differential regulation of primary response gene expression in skeletal muscle cells through multiple signal transduction pathways*. Biochimica et Biophysica Acta, 1995. **1266**(1): p. 91-100.
406. Brown, A.D., G.L. Close, A.P. Sharples, and C.E. Stewart, *Murine myoblast migration: influence of replicative ageing and nutrition*. Biogerontology, 2017. **18**(6): p. 947-964.
407. Sharples, A.P., N. Al-Shanti, M.P. Lewis, and C.E. Stewart, *Reduction of myoblast differentiation following multiple population doublings in mouse C2 C12 cells: a model to investigate ageing?* Journal of Cellular Biochemistry, 2011. **112**(12): p. 3773-85.
408. McMahon, D.K., P.A. Anderson, R. Nassar, J.B. Bunting, Z. Saba, A.E. Oakeley, and N.N. Malouf, *C2C12 cells: biophysical, biochemical, and immunocytochemical properties*. American Journal of Physiology, 1994. **266**(6 Pt 1): p. C1795-802.
409. Wu, C., Y. Tong, J. Huang, S. Wang, H. Kobori, Z. Zhang, and K. Suzuki, *Atrophic C2C12 Myotubes Activate Inflammatory Response of Macrophages In Vitro*. Cells, 2025. **14**(5).
410. Chargé, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiological Reviews, 2004. **84**(1): p. 209-38.
411. Xiao, F., H. Wang, X. Fu, Y. Li, K. Ma, L. Sun, X. Gao, and Z. Wu, *Oncostatin M inhibits myoblast differentiation and regulates muscle regeneration*. Cell Research, 2011. **21**(2): p. 350-64.
412. Kamohara, H., M. Ogawa, T. Ishiko, K. Sakamoto, and H. Baba, *Leukemia inhibitory factor functions as a growth factor in pancreas carcinoma cells: Involvement of regulation of LIF and its receptor expression*. International Journal of Oncology, 2007. **30**(4): p. 977-83.
413. 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*. Communications Biology, 2023. **6**(1): p. 418.
414. Stonāns, I., E. Stonāne, S. Russwurm, H.P. Deigner, K.J. Böhm, M. Wiederhold, L. Jäger, and K. Reinhart, *HepG2 human hepatoma cells express multiple cytokine genes*. Cytokine, 1999. **11**(2): p. 151-6.
415. Reeh, H., N. Rudolph, U. Billing, H. Christen, S. Streif, E. Bullinger, M. Schliemann-Bullinger, R. Findeisen, F. Schaper, H.J. Huber, and A. Dittrich, *Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor α to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling*. Cell Communication and Signaling, 2019. **17**(1): p. 46.
416. Liu, C.P., X. Zhang, Q.L. Tan, W.X. Xu, C.Y. Zhou, M. Luo, X. Li, R.Y. Huang, and X. Zeng, *NF- κ B pathways are involved in M1 polarization of RAW 264.7 macrophage by polyporus polysaccharide in the tumor microenvironment*. PLOS ONE, 2017. **12**(11): p. e0188317.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Professor Dr. rer. nat. Jürgen Scheller. Durch sein umfassendes Fachwissen und seine präzisen, analytischen Schlussfolgerungen ermöglichte er die Realisierung meines Projekts. Unter seiner exzellenten wissenschaftlichen wie auch menschlichen Leitung hatte ich durchweg einen konkreten Fahrplan zur stringenten Vollendung meiner Arbeit.

Ebenfalls danke ich Dr. Puyan Rafii, meinem Betreuer, der mich bei der praktischen Umsetzung meiner Arbeit unterstützte.

In besonderer Weise danke ich PD Dr. rer. nat. Doreen Manuela Floss, Dr. rer. nat. Julia Ettich, Dr. rer. nat. Kristina Vogel und Dr. rer. nat. Hendrik Weitz. Ihre volle Unterstützung sowohl in der Projektdurchführung als auch auf persönlicher Ebene war von erheblicher Bedeutung und trug entscheidend zum Erfolg der Arbeit, zur Freude an der Arbeit und zu langjährigen Freundschaften bei.