

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ČERNE

MOLEKULARNI MEHANIZMI DELOVANJA INTERLEVKINA-6 V KULTURI  
SKELETNOMIŠIČNIH CELIC

UNIVERZITETNI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA ČERNE

MOLEKULARNI MEHANIZMI DELOVANJA INTERLEVINA-6 V KULTURI  
SKELETNOMIŠIČNIH CELIC

MOLECULAR MECHANISMS OF INTERLEUKIN-6 ACTIONS  
IN CULTURED SKELETAL MUSCLE CELLS

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljala na Inštitutu za patološko fiziologijo, Medicinske fakultete, Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Zorana Grubiča in doc. dr. Sergeja Pirkmajerja.

Zahvaljujem se mentorju, somentorju in ostalim članom raziskovalne skupine za pomoč pri izdelavi diplomske naloge.

#### Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Zorana Grubiča in somentorja doc. dr. Sergeja Pirkmajerja.

#### Študentov lastnoročni podpis

## Kazalo

1	Povzetek .....	3
2	Abstract.....	4
3	Seznam okrajšav .....	5
4	Uvod .....	7
4.1	Družina interlevkina-6 .....	7
4.2	IL-6 in oblikovanje miokinskega koncepta.....	8
4.3	Uravnavanje izražanja in izločanja IL-6 .....	11
4.3.1	Izločanje IL-6 pod vplivom vnetnih dejavnikov .....	11
4.3.2	Izločanje IL-6 med telesnim naporom.....	12
4.4	Receptor za IL-6 in znotrajcelično signaliziranje .....	13
4.4.1	Receptor za IL-6 .....	13
4.4.2	IL-6 in znotrajcelične signalne poti .....	14
4.4.3	Receptor za IL-6 je pomembna terapevtska tarča .....	16
4.5	Skeletna mišica in biološki učinki IL-6 .....	17
4.5.1	Učinki IL-6 na skeletno mišico (avtokrino/parakrino delovanje) .....	17
4.5.2	Sistemski učinki IL-6 (endokrino delovanje) .....	19
4.6	Ali so učinki IL-6 za skeletno mišico škodljivi ali koristni? .....	20
5	Namen dela in delovne hipoteze.....	22
6	Materiali in metode.....	23
6.1	Kultura skeletnomišičnih celic.....	23
	Kultura človeških primarnih mišičnih celic.....	24
	Kultura podganjih skeletnomišičnih celic L6.....	24
6.2	Opis poskusov.....	25
	Časovna odvisnost odziva na rhIL-6 v podganjih mišičnih cevčicah L6 .....	25
	Tretiranje skeletnomišičnih celic z rhIL-6 in tocilizumabom .....	26
6.3	Homogenizacija celičnih lizatov za odtis western .....	26
	Vpliv postopka homogenizacije na izolacijo beljakovin.....	26
	Priprava vzorcev za odtis western v poskusih z rhIL-6 in/ali tocilizumabom .....	27

6.4	Merjenje koncentracije beljakovin.....	27
6.5	Analiza znotrajceličnih signalnih poti z odtisom western (angl. <i>Western Blot</i> ) .....	28
	Gelska elektroforeza.....	28
	Prenos (transfer) z gela na PVDF membrano.....	29
	Imunodetekcija specifičnih beljakovin.....	30
6.6	Analiza rezultatov .....	33
7	Rezultati.....	33
7.1	Vpliv postopka homogenizacije na izolacijo specifičnih beljakovin.....	33
7.2	Vpliv tocilizumaba na aktivnost znotrajcelične signalne poti JAK/STAT3 v kulti človeških skeletnomišičnih celic .....	38
7.3	Vpliv tocilizumaba na aktivnost znotrajcelične signalne poti ERK1/2 v kulti človeških skeletnomišičnih celic .....	39
7.4	Aktivacija znotrajceličnih signalnih poti v podganjih mišičnih cevčicah L6 pri tretiranju z rhIL-6 .....	41
7.5	Vpliv tocilizumaba na podganje (L6) skeletnomišične celice .....	43
8	Razprava .....	43
9	Sklep .....	52
10	Literatura .....	53

# 1 Povzetek

Interlevkin-6 (IL-6) je glavni predstavnik citokinov družine gp130. Ugotovitev, da je njegova krvna koncentracija povečana v stanjih kot so razna vnetja, rak in kaheksija, je pripeljala do njegove uvrstitve med provnetne citokine. Pozneje so ugotovili, da vloga IL-6 ni enostranska in da lahko v določenih okoliščinah deluje celo protivnetno. Danes je znano, da je IL-6 pomemben tudi v razvoju različnih vrst celic, ohranjanju presnovne homeostaze med telesnim naporom ter pri mišični regeneraciji. Odkrili so tudi, da je izločanje IL-6 glavni odziv skeletne mišice na razne dražljaje, in da ima izločeni IL-6 avto-, para- in endokrine učinke na skeletno mišico. Te ugotovitve kažejo na velik pomen IL-6 pri skeletnomišičnem signaliziranju, kljub tej pomembnosti pa je glede signaliziranja IL-6 v tem tkivu še veliko odprtih vprašanj, pri čemer tudi ni znano, ali in kdaj so učinki IL-6 za mišico ugodni in kdaj škodljivi. Do odgovorov na ta vprašanja lahko pripelje le vpogled v molekularne mehanizme signaliziranja prek IL-6. To je v širšem smislu tudi tema te naloge, kjer smo se namenili ugotoviti, kako blokada receptorja za IL-6 (IL-6R $\alpha$ ) vpliva na signalni poti JAK/STAT3 in ERK1/2, ki sta tesno povezani z aktivacijo receptorja za IL-6 in sta hkrati zelo pomembni za uravnavanje delovanja skeletnomišičnih vlaken. IL-6R $\alpha$  smo blokirali z tocilizumabom, ki je humanizirano monoklonsko protitelo proti IL-6R $\alpha$  in se v kliniki uporablja za zaviranje učinkov IL-6. Učinki tocilizumaba na signalne poti v skeletni mišici še niso bili preučevani.

Preverjali smo tri hipoteze: 1) Tocilizumab v kulturi primarnih človeških mišičnih cevčic med inkubacijo z rekombinantnim humanim IL-6 (rhIL-6) zavre aktivacijo signalne poti JAK/STAT3; 2) Tocilizumab v kulturi primarnih človeških mišičnih cevčic med inkubacijo z rekombinantnim humanim IL-6 (rhIL-6) zavre aktivacijo signalne poti ERK1/2; 3) Kultura podganjih mišičnih cevčic L6 je primerna za preučevanje molekularnih mehanizmov delovanja rhIL-6 in tocilizumaba. Kot poskusni model za preučevanje teh vplivov smo uporabili primarno kulturo človeških skeletnomišičnih celic in celično linijo podganjih skeletnomišičnih celic L6. Čeprav je tocilizumab usmerjen proti človeškemu receptorju za IL-6R $\alpha$ , nekateri imunohistokemični podatki namreč kažejo na rahlo navzkrižno reaktivnost s podganjimi tkivi. Celična linija L6 pa bi zaradi lažje dostopnosti, manjše biološke variabilnosti in hitrejše rasti celic v mnogokaterem pogledu predstavlja dobro alternativo primarnim človeškim skeletnomišičnim celicam.

Ugotovili smo, da tocilizumab v kulturi primarnih mišičnih cevčic popolnoma prepreči z rhIL-6 sproženo povečanje fosforilacije STAT3 ( $Tyr^{705}$ ), s čemer smo potrdili prvo hipotezo. Po 15 minutih izpostavljenosti rhIL-6 v kulturi primarnih mišičnih cevčic nismo opazili povečanja fosforilacije ERK1/2 ( $Thr^{202}/Tyr^{204}$ ), zato ne moremo opredeliti vpliva tocilizumaba na signalno pot ERK1/2 med inkubacijo z rhIL-6. S tem pa nismo ovrgli naše druge hipoteze, saj je možna razloga tudi prekratek inkubacijski čas z IL-6. Ugotovili pa smo, da se tocilizumab ne veže na podganji receptor IL-6R $\alpha$  oziroma da je morebitna vezava funkcionalno nepomembna. Rezultati torej ne podpirajo naše tretje hipoteze in zaključimo lahko, da kultura podganjih skeletnomišičnih cevčic ni primerna za preučevanje molekularnih mehanizmov IL-6 s tocilizumabom.

**Ključne besede:** interlevkin-6, celično signaliziranje, tocilizumab, skeletnomišične celice, mišična regeneracija

## 2Abstract

Interleukin-6 (IL-6), the eponymous member of the IL-6-type cytokine family, has been traditionally categorized as a proinflammatory cytokine. However, although several chronic inflammatory conditions, including rheumatoid arthritis, cancer and cachexia, are strongly associated with high plasma concentration of IL-6, more recent data indicate IL-6 may also exert anti-inflammatory effects, suggesting a more complex role for IL-6. Indeed, IL-6 signalling underlies divergent physiological processes, such as regulation of cell cycle and energy metabolism. Furthermore, aside from immune cells, skeletal muscle has emerged as a major source of IL-6, especially during exercise. Notably, transient, contraction-stimulated secretion of IL-6 from skeletal muscle during exercise contributes to whole-body energy homeostasis. In addition, muscle-derived IL-6 may stimulate skeletal muscle regeneration and hypertrophy, further underscoring a key role for IL-6 in skeletal muscle physiology. Nevertheless, the boundary between beneficial and deleterious effects of IL-6 in skeletal muscle remains obscure. Tocilizumab, a monoclonal humanized antibody against the IL-6 receptor (IL-6Ra), is widely used to suppress IL-6 signaling in rheumatic patients. However, despite its widespread use, possible effects of tocilizumab on IL-6 signalling in skeletal muscle have not been examined.

To shed further light on the underlying molecular mechanisms, we explored whether and how tocilizumab, alters the activity of intracellular signalling pathways JAK/STAT3 and ERK1/2, which are activated by IL-6 and are involved in regulation of different aspects of skeletal muscle function. As an experimental model we used primary human skeletal muscle cells and rat skeletal muscle cell line (L6). We tested three hypotheses: 1) Tocilizumab prevents stimulation of phosphorylation of STAT3 (at Tyr<sup>705</sup>) in cultured human myotubes during the incubation with human recombinant IL-6 (rhIL-6); 2) Tocilizumab prevents stimulation of phosphorylation of ERK1/2 (at Thr<sup>202</sup> and Tyr<sup>204</sup>) in cultured human myotubes during the incubation with rhIL-6; 3) Rat L6 myotubes are a suitable model for studying the molecular mechanisms of rhIL-6 and tocilizumab. Although tocilizumab is directed primarily against human IL-6Ra, immunohistochemical data suggest a minor degree of cross-reactivity with rat tissues. Importantly, due to their availability, lower biological variability as well as easier cultivation rat L6 cells could present a useful alternative to human skeletal muscle cells.

We demonstrate that tocilizumab abrogates the increase in phosphorylation of STAT3 in human skeletal myotubes during rhIL-6 exposure, consistent with our first hypothesis. On the other hand, neither rhIL-6 nor tocilizumab altered ERK1/2 phosphorylation in human myotubes, probably due to short incubation time. Possible effect of tocilizumab on phosphorylation of ERK1/2 during more protracted exposure to rhIL-6 remains to be determined. Finally, we established that tocilizumab does not prevent rhIL-6-stimulated phosphorylation of STAT3 and ERK1/2 in rat L6 myotubes. Collectively, our results demonstrate that tocilizumab is an effective inhibitor of IL-6 signalling in primary human myotubes. In addition, we show that rat L6 myotubes are not a suitable model to study effects of tocilizumab on signalling pathways in cultured skeletal muscle.

**Keywords:** Interleukin-6, cellular signal transduction, Tocilizumab, skeletal muscle cells, muscle regeneration

### **3Seznam okrajšav**

IL-6 - *interleukin-6*, interlevkin-6

gp130 – *glycoprotein-130*, glikoprotein-130

CNTF - *ciliary neurotrophic factor*, ciliarni nevrotrofični dejavnik

LIF - *leukemia inhibitory factor*

OSM - *oncostatin M*, onkostatin M

CT-1 - *cardiotrophin-1*, kardiotrofin-1

CLC - *cardiotrophin-like cytokine*, kardiotrofinu podoben citokin

BDNF - *brain-derived neurotrophic factor*, nevrotrofični dejavnik možganskega izvora

CXCL-1 - *chemokine (C-X-C motif) ligand-1*

IGF-1 - *insulin-like growth factor-1*, inzulinu podoben rastni dejavnik-1

FGF-2 - *fibroblast growth factor-2*, fibroblastni rastni dejavnik-2

GLP-1 - *glucagon-like peptide-1*, glukagonu podobni peptid-1

NFIL6 - *nuclear factor interleukin-6*

NFκB - *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NFAT - *nuclear factor of activated T-cells*

TNF- $\alpha$  - *tumor necrosis factors- $\alpha$* , dejavnik tumorske nekroze- $\alpha$

IκBa - *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

IKK - *IκB kinase*

cGMP - *cyclic guanosine monophosphate*, ciklični gvanozin monofosfat

IL-6R $\alpha$  – *interleukin-6 receptor  $\alpha$* , interlevkin-6 receptor  $\alpha$

gp130R $\beta$  – *glycoprotein-130 receptor  $\beta$* , glikoprotein-130 receptor  $\beta$

JAK - *Janus tyrosine kinases*, Janus tirozinska kinaza

STAT3 - *signal transducer and activator of transcription*

ERK1/2 - *extracellular-signal-regulated kinases*

**MAPK** - *mitogen-activated protein kinase*

**PI3K** - *fosfatidilinozitol 3-kinaza*

**AMPK** - *adenosine monophosphate-activated protein kinase*, z AMP aktivirana protein kinaza

**SOCS** - *suppressor of cytokine signaling*

**SOCS-3** - *suppressor of cytokine signaling-3*

**IL-1Ra** - *interleukin-1 receptor antagonist*, interleukin-1 receptor antagonist

**MRF4** - *myogenic regulatory factors-4*

**SDS** - *sodium dodecyl sulfate*, natrijev dodecil sulfat

**BCA** - *bicinchoninic acid*

**GAPDH** - *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza

**FBS** - *fetal bovine serum*, goveji fetalni serum

**PBS** - *phosphate-buffered saline*

**EDTA** - *ethylenediaminetetraacetic acid*, etilendiamintetraocetna kislina

**MEM** - *minimal essential medium*

**PVDF** - *polyvinylidene fluoride*, polivinilidenfluorid

**TBS-T** - *mixture of Tris-Buffered Saline and Tween 20*

**BSA** - *bovine serum albumin*, goveji serumski albumin

**PMSF** - *phenylmethanesulfonylfluoride*, fenilmethylsulfonilflorid

**β-ME** - *2-mercaptoethanol*, 2-merkaptoetanol

**HRP** - *horseradish peroxidase*, hrenova peroksidaza

**ECL** - *enhanced chemiluminescence*, ojačana kemiluminiscenca

**NBT** - *nitro blue tetrazolium chloride*

**BCIP** - *(5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl) dihydrogen phosphate*

**SEM** - *standard error of the mean*, standardna napaka mediane

**SHP** - *SH homology containing tyrosine phosphatase*

**PIAS** - *protein inhibitors of activated STAT*

# 4Uvod

## 4.1Družina interlevkina-6

Interlevkin-6 (IL-6) je 26 kDa velik glikoprotein in eponimni predstavnik skupine citokinov, ki jo imenujemo družina IL-6 (angl. *IL-6-type cytokines, IL-6 family*) (1) (Razpredelnica 1). V to družino na podlagi molekularnobioloških lastnosti oziroma molekularne strukture receptorjev uvrščamo še druge interlevkine (IL-11, IL-27, IL-31), ciliarni nevrotrofični dejavnik (CNTF; angl. *ciliary neurotrophic factor*), LIF (angl. *leukemia inhibitory factor*), onkostatin M (OSM; angl. *oncostatin M*), kardiotrofin-1 (CT-1; angl. *cardiotrophin-1*) in kardiotrofinu podobni citokin (CLC; angl. *cardiotrophin-like cytokine*).

Citokin	Receptor	Nekateri učinki
IL-6*	IL-6R+gp130/gp130	Odziv akutne faze, povišana telesna temperatura, dozorevanje in aktivacija imunskih celic, aktivacija osteoklastov, proliferacija keratinocitov, diferenciacija nevronov
IL-11	IL-11R+gp130/gp130	Odziv akutne faze, nevrogeniza, hematopoeza, razvoj imunskih celic, presnova kosti
IL-27	WSX-1/gp130	Provnetni in protivnetni učinki (v levkocitih)
CNTF	CNTFR+LIFR/gp130	Odziv akutne faze, aktivacija acetilholintransferaze v motonevronih, antiapoptočni učinki po poškodbi živcev
LIF*	LIFR/gp130	Odziv akutne faze, preživetveni dejavnik nevronov, hematopoeza, presnova kosti
OSM	OSMR/gp130 ali LIFR/gp130	Odziv akutne faze, diferenciacija megakariocitov, izražanje adhezivnih molekul, celjenje ran
CT-1	CT-1R(?)+LIFR/gp130	Odziv akutne faze, preživetveni dejavnik nevronov, hipertrofija kardiomiocitov
CLC	CNTFR+LIFR/gp130 CLC-R(?)+LIFR/gp130	Embriogeneza
IL-31	GPL/OSMR	Vnetni učinki (koža, dihalne poti)

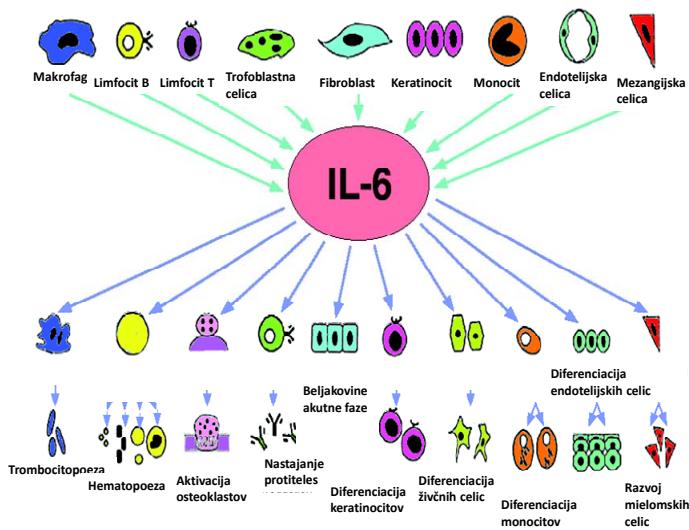
**Razpredelnica 1: Citokinska družina IL-6 (družina gp130).** Citokini iz družine IL-6 aktivirajo znotrajcelične signalne poti prek homodimernih (gp130/gp130) ali heterodimernih (LIFR/gp130, WSX-11/gp130, OSMR/gp130, GPL/OSMR) receptorjev β. IL-6 in nekateri drugi pripadniki družine za svoje delovanje potrebujejo še receptor α (IL-6R, IL-11R, CNTFR). Za CT-1 in CLC vloga tega receptorja ostaja nejasna (?). IL-27 je kompleksen citokin, ki ga sestavlja IL-30 in topni receptor α (EBI3). Povzeto po: (1,2).

\*IL-6 in LIF uvrščamo tudi med miokine (Razpredelnica 2).

Predstavniki družine IL-6 so si po primarni beljakovinski strukturi le malo sorodni, vendar jih povezujejo nekatere posebnosti v tridimenzionalni zgradbi in struktura membranskih receptorjev, prek katerih prožijo svoje biološke učinke (2). Membranski receptorji za IL-6 in sorodne citokine so namreč beljakovinski kompleksi (Razpredelnica 1), ki imajo v svoji strukturi vključeni tudi eno ali dve molekuli glikoproteina 130 (gp130). Edina izjema je IL-31, kjer je v receptorski kompleks namesto gp130 vključena glikoproteinu 130 podobna beljakovina (GPL, angl. *gp130-like protein*). Zaradi te osnovne molekularnobiološke zakonitosti družino IL-6 pogosto označujemo tudi kot družino gp130.

## 4.2 IL-6 in oblikovanje miokinskega koncepta

Biološko vlogo IL-6 v imunskem sistemu in uravnavanju hematopoeze (Slika 1) so prepoznali že ob njegovem odkritju v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (3). Nedolgo zatem so delovanje IL-6 povezali tudi z različnimi vnetnimi boleznimi (4), kancerogenezo (3) in nastankom kaheksije pri rakavih obolenjih (5). Prvih 10 do 15 let raziskav je bilo tako osredotočenih predvsem na patofiziološko vlogo IL-6 v povezavi z iztirjenim delovanjem imunskega sistema v kontekstu različnih bolezni (Slika 1).



**Slika 1. Raznovrstnost izvora in učinkov IL-6.** IL-6, ki ga izločajo imunske in neimunske celice, vpliva na proliferacijo in/ali diferenciacijo različnih vrst celic. V patofizioloških razmerah spodbuja prekomerno delovanje osteoklastov v kosteh, nastajanje beljakovin akutne faze v jetrih in razraščanje plazmocitomskih (mielomskih) celic. Prijeljeno po (1).

Skladno s takrat uveljavljenim pogledom na delovanje citokinov, ki je bil osredotočen predvsem na njihovo vlogo v imunskega sistema, so si zato sprva tudi porast plazemske koncentracije IL-6 med telesno aktivnostjo razlagali z aktivacijo vnetnih celic in/ali z okvaro mišičnih vlaken. V začetku devetdesetih let prejšnjega stoletja pa je postalo jasno, da v normalnih razmerah tudi maščevje predstavlja pomemben vir citokinov (t.i. adipokinov), ki ne vplivajo le na delovanje imunskega sistema, temveč se vpletajo tudi v uravnavanje presnovnih procesov in prehranjevanja (6). Spoznanje, da maščevje z izločanjem citokinov lahko deluje kot nekakšen endokrini organ, je privedlo do temeljnega premika v razumevanju (pato)fiziološke vloge citokinov, saj je raziskovalce napeljalo k razmišljjanju, da bi bil lahko porast IL-6 med telesnim naporom predvsem posledica sproščanja iz mišičnih vlaken, ki se krčijo, in ne aktivacije imunskega sistema.

V seriji raziskav so nato Bente Klarlund Pedersen in sodelavci v zadnjih 10 do 15 letih nedvoumno pokazali, da med telesnim naporom skeletna mišica sprošča v sistemski obtok IL-6 in da je v teh razmerah skeletna mišica tudi glavni vir IL-6 (7,8). Kmalu se je pokazalo, da poleg IL-6 skeletna mišica med krčenjem izloča še več drugih citokinov z lokalnimi in sistemskimi učinki. Te citokine so zaradi njihovega izvora poimenovali kot miokine.

Po današnjih merilih mora za uvrstitev med miokine citokin izpolniti dva temeljna pogoja nastajanje v mišičnih vlaknih (med krčenjem) in endokrino delovanje (6,7,9). Opredelitev miokinov je tako za razliko od družine IL-6 povsem funkcijске narave in ni pogojena s skupnim molekularnim mehanizmom delovanja (npr. glede receptorja, signalnih poti) ali strukturno homologijo posameznih miokinov. Kot je razvidno iz načina delovanja miokinov, trenutna definicija ni popolna, saj nekateri miokini delujejo pretežno lokalno in nimajo izrazitih endokrinskih učinkov (Razpredelnica 2). Poleg tega mišična aktivnost zmanjša nastajanje miostatina, ki pa ga v širšemu smislu kljub temu uvrščamo med miokine (6). Opredelitev miokinov se bo zato v prihodnje verjetno še spreminja. Vsekakor pa lahko na podlagi fizioloških značilnosti uvrstimo tudi med citokine mišičnega izvora ali miokine IL-6 in LIF (Razpredelnica 2).

	<b>Učinek</b>	<b>Miokin</b>
<b>Lokalni (avtokrini in parakrini) učinki v skeletni mišici</b>	Spodbujanje mišične hipertrofije in/ali regeneracije	IL-6, LIF, IL-4, IL-7, IL-15
	Zaviranje mišične hipertrofije	Miostatin
	Angiogeneza	IL-8, CXCL-1
	Privzem glukoze	IL-6
	Oksidacija mašobnih kislin	IL-6, BDNF
<b>Sistemski (endokrini) učinki</b>	Lipoliza (zalog trigliceridov v mišičnih vlaknih)	IL-6
	<b>Učinki po organih in tkivih</b>	
	<b>JETRA</b>	Izplavljanje glukoze med telesnim naporom
		Tvorba CXCL-1
		Sproščanje folistatina
	<b>MAŠČEVJE</b>	Lipoliza
		Pretvorba belega maščevja v rjavo maščevje
	<b>KOSTI</b>	Osteogeneza
	<b>TREBUŠNA SLINAVKA</b>	Povečano izločanje inzulina zaradi povečanega izražanja GLP-1
		IRISIN
		IGF-1, FGF-2
		IL-6

**Razpredelnica 2: Citokini mišičnega izvora (miokini) in njihovi učinki.** Miokini nastajajo v skeletni mišici med krčenjem in delujejo na mestu nastanka (avtokrino, parakrino) in sistemsko (endokrino). BDNF (nevrotrofični dejavnik možganskega izvora, angl. *brain-derived neurotrophic factor*), CXCL-1 (angl. *Chemokine (C-X-C motif) ligand 1*), FGF-2 (fibroblastni rastni dejavnik 2, angl. *fibroblast growth factor 2*), GLP-1 (glukagonu podobni peptid 1, angl. *glucagon-like peptide 1*), IGF-1 (inzulinu podobni rastni dejavnik I, angl. *Insulin-like growth factor 1*). Povzeto po: (6,9).

Čeprav skeletna mišica lahko izloča različne miokine, pa se bom v nadaljevanju osredotočila predvsem na IL-6 in njegovo vlogo v skeletni mišici. IL-6 je po eni strani prototipski miokin, ki ima po vsej verjetnosti – še zlasti med telesno aktivnostjo – pomembno vlogo pri uravnavanju delovanja skeletne mišice (parakrino delovanje) in presnovnih procesov v drugih delih telesa (endokrino delovanje). Po drugi strani pa je IL-6 povezan z nastankom vnetnih revmatoloških bolezni, kot je revmatoidni artritis, in nekaterih onkoloških obolenj. Nenazadnje IL-6 povezujejo tudi s kroničnim vnetjem, do katerega pride pri staranju in debelosti (6), kar bi morda lahko prispevalo k nastanku inzulinske rezistence ter sladkorne bolezni, ki v sodobnem času predstavljajo velik javnozdravstveni problem.

## **4.3 Uravnavanje izražanja in izločanja IL-6**

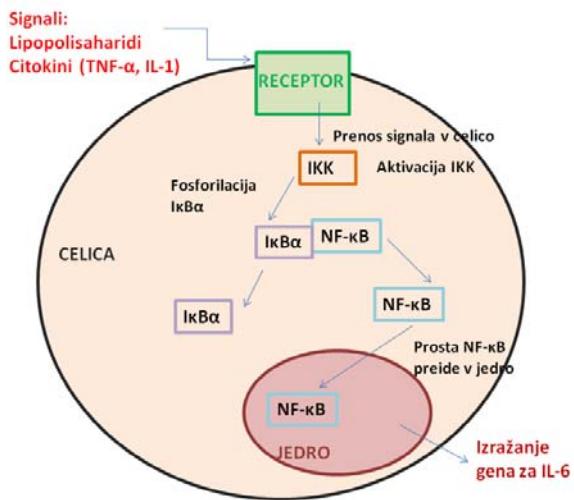
Izražanje IL-6 v skeletni mišici je med mirovanjem v normalnih (fizioloških) razmerah zelo šibko (10). Pod vplivom vnetnih dejavnikov in med telesno aktivnostjo pa izražanje IL-6 v mišičnih vlaknih skokovito poraste, kar privede do izrazitega povečanja koncentracije IL-6 tako v medcelični tekočini kot tudi v plazmi (8,12,10). Vnetje in telesna aktivnost privedeta do indukcije gena za IL-6 prek aktivacije različnih transkripcijskih dejavnikov, kot so na primer NFIL6 (angl. *nuclear factor interleukin-6*), NF $\kappa$ B (angl. *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) ali NFAT (jedrni dejavnik aktiviranih limfocitov T, angl. *nuclear factor of activated T-cells*). Čeprav je porast plazemskega IL-6 značilen tako za vnetje kot telesno aktivnost, pa so mehanizmi, ki privedejo do povečanega izločanja IL-6 različni in vsaj delno neodvisni (3).

### **4.3.1 Izločanje IL-6 pod vplivom vnetnih dejavnikov**

Pri različnih vnetnih boleznih in okužbah izražanje gena za IL-6 spodbudijo provnetni citokini, kot sta dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; angl. *tumor necrosis factors- $\alpha$* ) in IL-1, oziroma eksogeni dejavniki kot na primer bakterijski lipopolisaharid (LPS). V takšnih razmerah lahko plazemska koncentracija IL-6 poraste za več kot 10.000-krat (10). K takšnemu porastu prispeva tudi skeletna mišica, saj LPS in TNF- $\alpha$  predstavljata močan dražljaj za izločanje IL-6 iz mišičnih celic (11). Temeljna značilnost izločanja IL-6 v vnetnih razmerah je aktivacija signalne poti NF $\kappa$ B (Slika 2). Vnetni dejavniki namreč aktivirajo kinazo IKK (angl. *I $\kappa$ B kinase*), ki fosforilira inhibitorno beljakovino I $\kappa$ B $\alpha$  (angl. *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*). V nefosforiliranem stanju je I $\kappa$ B $\alpha$  vezana na NF $\kappa$ B, kar zavira delovanje NF $\kappa$ B v jedru. Po disociaciji beljakovinskega kompleksa I $\kappa$ B $\alpha$ /NF $\kappa$ B, NF $\kappa$ B lahko preide v jedro, kjer se veže na promotorsko regijo gena za IL-6 in tako poveča njegovo izražanje (12,13). Nasprotno od vnetnih dejavnikov pa glukokortikoidi zavirajo izražanje IL-6 in sicer tako, da spodbujajo izražanje I $\kappa$ B $\alpha$ , kar zavira delovanje signalne poti NF $\kappa$ B (12). Pri izpostavitvi glukokortikoidom se zato zmanjša tudi izločanje IL-6 iz mišičnih celic (11).

## Slika 2. Indukcija izražanja gena za IL-6 pod vplivom vnetnih dejavnikov.

Bakterijski lipopolisaharid (LPS) in provnetni citokini (TNF- $\alpha$ , IL-1) z vezavo na različne membranske receptorje aktivirajo kinazo IKK (angl. *IκB kinase*), ki nato fosforilira regulacijsko beljakovino I $\kappa$ B. Fosforilacija I $\kappa$ B povzroči disociacijo kompleksa NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B, kar omogoči translokacijo transkripcijskega dejavnika NF $\kappa$ B v jedro in s tem indukcijo izražanja IL-6.



### 4.3.2 Izločanje IL-6 med telesnim naporom

Porast IL-6 med telesnim naporom so pokazali v različnih študijah (8,14,15). Največjo koncentracijo doseže IL-6 ob zaključku telesnega napora oziroma tik po končani telesni aktivnosti. Na koncentracijo IL-6 v plazmi najbolj vplivata intenziteta in trajanje telesnega napora, medtem ko je tip telesne vadbe, kot kaže, manj pomemben. Koncentracija IL-6 v plazmi se lahko med intenzivnim in dolgotrajnejšim naporom poveča celo za stokrat, čeprav so bolj običajni manj izraziti porasti koncentracije (16). Pomembno je poudariti, da v nasprotju z vnetnimi razmerami in septičnimi stanji citokinski odziv med telesno aktivnostjo ni povezan s predhodnim porastom TNF- $\alpha$  v plazmi. Prav tako povečanje plazemske koncentracije IL-6 ni povezano s poškdbo mišičnih vlaken. Čeprav obstaja glede uravnavanja izločanja IL-6 med krčenjem mišičnih vlaken še veliko odprtih vprašanj, pa domnevajo, da transkripcija gena za IL-6 med mišično kontrakcijo ni odvisna od aktivacije transkripcijskega dejavnika NF $\kappa$ B (7,17). V ospredju preučevanja so zato signalne poti, za katere je znano, da se aktivirajo med krčenjem mišičnih vlaken.

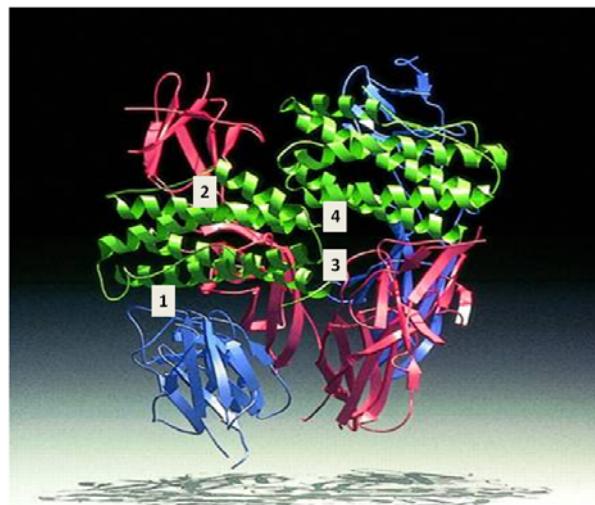
Porast znotrajcelične koncentracije  $\text{Ca}^{2+}$ , ki je pomemben za krčenje mišičnih vlaken, bi lahko na primer vplival tudi na izražanje in izločanje IL-6.  $\text{Ca}^{2+}$  namreč vpliva na različne signalne poti in nadzoruje številne celične funkcije. Med drugim aktivira tudi serinsko/treoninsko fosfatazo kalcinevrin, ki defosforilira transkripcijski dejavnik NFAT. Po defosforilaciji lahko NFAT preide v jedro in spodbudi izražanje gena za IL-6 (18). Poleg tega bi lahko tudi NO (dušikov oksid) prek redoks reakcij, nitrozilacije proteinov in povečanja cGMP vplival na transkripcijo gena za IL-6 (19,20). Čeprav ostajajo signalne poti, ki povezujejo krčenje mišičnih vlaken in izločanje IL-6, le delno opredeljene, pa je povsem jasno, da se razlikujejo od tistih, ki poganjajo izražanje IL-6 v vnetnih razmerah.

## 4.4 Receptor za IL-6 in znotrajcelično signaliziranje

### 4.4.1 Receptor za IL-6

Za prenos signala v celico je potrebna vezava IL-6 na receptor, ki je sestavljen iz podenot IL-6R (ali IL-6R $\alpha$ ) in gp130 (ali gp130R $\beta$ ). Po klasični poti aktivacije se IL-6 veže na membranski IL-6R $\alpha$ , kar sproži homodimerizacijo gp130 (preko disulfidne vezi) (21) in aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti. Kristalografske študije so pokazale, da ima funkcionalni receptorski kompleks zapleteno heksamerno strukturo, ki vključuje po dve molekuli IL-6, gp130 in IL-6R $\alpha$  (Slika 3).

**Slika 3. Kristalna struktura heksamernega signalnega kompleksa IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130.** Po vezavi IL-6 na IL-6R $\alpha$  pride do homodimerizacije gp130, kar sproži znotrajcelične signalne poti. Funkcionalni signalni kompleks je heksamer, ki je sestavljen iz po dveh molekul gp130 (rdeča barva), IL-6R $\alpha$  (modra barva) in IL-6 (zelena barva). Številka 1 prikazuje interakcijo IL-6 z IL-6R $\alpha$ . Številki 2 in 3 prikazujeta interakcijo IL-6 s prvo in drugo molekulo gp130. Številka 4 pa prikazuje interakcijo med molekulama IL-6, ki sta vezani na heksamerni kompleks (2).



Ker IL-6R $\alpha$  omogoča vezavo IL-6 in s tem nastanek kompleksa, homodimer gp130 pa je nujno potreben za transdukциjo signala v celico, IL-6 za svoje delovanje potrebuje obe podenoti. Podenota gp130, ki je nujna za delovanje številnih drugih citokinov (Razpredelnica 1), je prisotna v večini celic in tkiv, medtem ko je izražanje IL-6R $\alpha$  nekoliko bolj omejeno. Odzivnost celic na IL-6 zato določa predvsem prisotnost podenote IL-6R $\alpha$  (1). Poleg membranske oblike, imata IL-6R $\alpha$  in gp130 tudi topno obliko (sIL-6R $\alpha$  oziroma sgp130), ki nastane s proteolitično cepitvijo membranskega receptorja ali z alternativnim rezovanjem mRNA in se nahaja prosto v plazmi. Topni receptor sgp130 deluje inhibicijsko, ker veže IL-6 vendar ne more sprožiti bioloških učinkov. Nasprotno pa se lahko kompleks sIL-6R/IL-6 poveže z membransko podenoto gp130, kar vodi v aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti. V prisotnosti sIL-6R so na IL-6 torej odzivne tudi celice, ki izražajo samo gp130, kar imenujemo transsignalizacija (2). Ker podenoto gp130 na površini membrane izražajo skoraj vse celice, je lahko v bolezenskih razmerah delovanje IL-6 nenormalno povečano tudi v celicah, ki so sicer nanj slabo odzivne. Transsignalizacija je zato pomembna pri razlagi nekaterih učinkov IL-6 (22), še posebej pri kroničnih vnetnih boleznih in nekaterih vrstah raka (23).

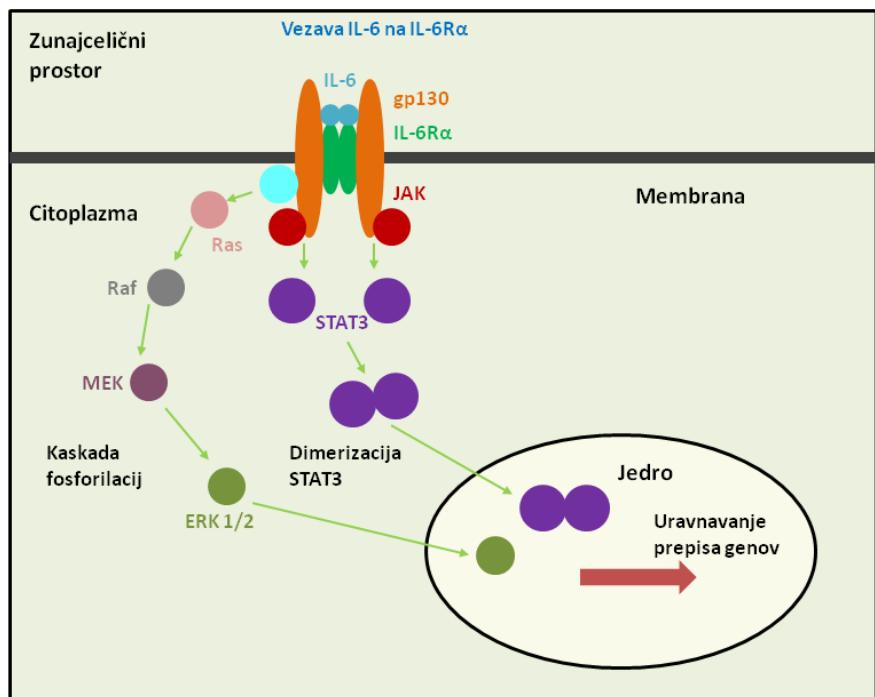
#### **4.4.2 IL-6 in znotrajcelične signalne poti**

Aktivacija receptorja za IL-6 sproži več različnih signalnih poti, ki nato zlasti prek sprememb v genskem izražanju vplivajo na delovanje celic in tkiv. Vendar je z delovanjem receptorja za IL-6 in drugih citokinskih receptorjev najbolj ozko povezana signalna pot JAK/STAT. Za razliko od receptorskih tirozinskih kinaz, kot je na primer insulinski receptor, receptor za IL-6 (podobno kot drugi citokinski receptorji) nima intrinzične kinazne aktivnosti (24). Za transdukcijo signala je zato ključnega pomena aktivacija kinaze JAK (angl. *Janus kinase*) (Slika 4), ki je vezana na znotrajcelični predel gp130. V odsotnosti IL-6 je JAK neaktivna, po vezavi IL-6 pa sledi (avto)fosforilacija JAK, kar privede do aktivacije JAK in nato od JAK odvisne fosforilacije tirozinskih ostankov na znotrajceličnem predelu gp130 (25). Fosfotirozinski ostanki na gp130 predstavljajo vezavno mesto za transkripcijski dejavnik STAT3 (angl. *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) in druge beljakovine vključene v znotrajcelično signaliziranje. Z vezavo na gp130 se STAT3 približa aktivirani kinazi JAK, čemur sledi fosforilacija STAT3 na tirozinskem ostanku 705 ( $Tyr^{705}$ ) in nato dimerizacija STAT3. Dimerizirani STAT3 potuje v jedro, kjer uravnava izražanje številnih

genov v različnih tkivih in organih (26,27). Sproženje signalne poti JAK/STAT3 je torej ključni in osrednji dogodek po aktivaciji receptorja za IL-6. Po drugi strani pa je aktivnost signalne poti pod nadzorom različnih negativnih regulacijskih mehanizmov, ki vključujejo tudi defosforilacijo receptorja, razgradnjo receptorskih podenot in interakcijo z regulacijskimi beljakovinami SOCS (zaviralci citokinskega signaliziranja, angl. *Suppressor(s) of cytokine signaling*) (28). SOCS3 se na primer kot psevdo-substrat veže na tirozinsko kinazo JAK in prepreči njeno nadaljnje delovanje (7).

#### Slika 4. IL-6 in znotrajcelične signalne poti.

IL-6 aktivira signalne poti JAK/STAT3 in ERK1/2. Aktivacija JAK privede do fosforilacija STAT3, kar vodi v nastanek dimera STAT3/STAT3 in njegove translokacije v jedro, kjer nato uravnava izražanje genov. Aktivacija signalne poti ERK1/2 poteka kot kaskada fosforilacij, v katero so vključene kinaze Ras, Raf in MEK. Fosforilacija privede do aktivacije ERK1/2, ki nato posredno vpliva na delovanje drugih kinaz in transkripcijskih dejavnikov (1).

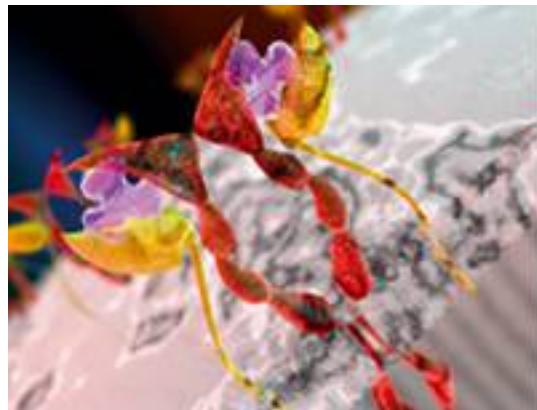


Poleg signalne poti JAK/STAT IL-6 sproži tudi signalno pot z mitogeni aktiviranih protein-kinaz (MAPK, angl. *mitogen-activated protein kinase*). Signalna pot MAPK je zelo pomembna, ker povezuje delovanje različnih mitogenov in rastnih dejavnikov z uravnavanjem celičnega cikla in s tem vpliva na proliferacijo in diferenciacijo celic. V primeru IL-6 gre za kaskado zaporednih fosforilacij, v katero so vključene kinaze Ras, Raf in MEK in ki na koncu privede privede do fosforilacije in s tem aktivacije kinaze ERK1/2 (angl. *extracellular signal-regulated kinase 1/2*), ki jo imenujemo tudi p44/42 MAPK. ERK1/2 lahko v citoplazmi in jedru nato fosforilira več kot osemdeset substratov (npr. transkripcijskih dejavnikov in drugih kinaz), prek katerih vpliva na uravnavanje najrazličnejših celičnih funkcij, vključno z uravnavanjem celičnega cikla, rastjo in diferenciacijo celic ter prilagoditvijo celic na stresne razmere (29,30). V skeletni mišici se ERK1/2 aktivira med krčenjem mišičnih vlaken in je med drugim vpletен tudi v uravnavanje presnove glikogena (31,32). Poleg signalnih poti JAK/STAT in Ras/Raf/MEK/ERK1/2 lahko IL-6 sproži tudi nekatere druge pomembne signalne poti, na primer signalno pot fosfatidilinozitol-3 kinaze (PI3K, angl. *fosfatidilinozitol 3-kinaza*) in signalno pot z AMP aktivirane protein-kinaze (AMPK; angl. *adenosine monophosphate-activated protein kinase*) (1).

#### 4.4.3 Receptor za IL-6 je pomembna terapevtska tarča

Zaradi vloge, ki jo ima v patogenezi različnih bolezni (gl. spodaj), predstavlja IL-6 pomembno farmakološko tarčo. Že pred dvajsetimi leti so na primer dokazali močno povezanost med povišano plazemsko koncentracijo IL-6 in izraženimi simptomi revmatoidnega artritisa (33) in kmalu se je za primerno terapijo revmatoidnega artritisa izkazalo zaviranje učinkov IL-6 (34,35). Medtem ko protitelo proti IL-6 v razmerah *in vivo* ni prineslo željenih rezultatov, pa so raziskave v zvezi z delovanjem receptorja za IL-6 nakazale, da bi bila lahko bolj uspešna strategija zaviranje delovanja IL-6 na ravni receptorja (Slika 5). Razvili so humanizirano monoklonsko protitelo proti receptorju za IL-6 (IL-6R $\alpha$ ), ki z vezavo na membransko ali topno obliko IL-6R $\alpha$  specifično prepreči učinke IL-6 (Slika 5) (36,37). Tocilizumab je od leta 2009 tudi registriran za zdravljenje revmatoidnega artritisa (RoActemra®).

**Slika 5. Tocilizumab vezan na receptor za IL-6.** Tocilizumab je humanizirano monoklonsko protitelo, ki se veže na epitop v zunajceličnem predelu receptorske podenote IL-6R $\alpha$ . Vezava tocilizumaba prepreči nastanek aktivnega receptorskega kompleksa IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130 in s tem aktivacijo od IL-6 odvisnih signalnih poti. Na sliki je tocilizumab obarvan vijolično, gp130 rdeče in IL-6R $\alpha$  rumeno (3).



## 4.5 Skeletna mišica in biološki učinki IL-6

Delovanje IL-6 običajno povezujemo z uravnavanjem imunskega sistema, kjer je njegova vloga najdlje in tudi najbolje opredeljena. Nenazadnje so beljakovino, ki jo danes imenujemo IL-6, odkrili pri preučevanju diferenciacije B limfocitov in jo ob izolaciji poimenovali »diferenciacijski dejavnik B limfocitov T-celičnega izvora« (angl. *T-cell-derived B-cell differentiation factor*) in kasneje interferon-β2 (38). Kot sem omenila že uvodoma, pa je v zadnjih desetih letih postalo jasno, da predstavlja zelo pomemben vir IL-6 tudi skeletna mišica. Med krčenjem mišičnih vlaken namreč močno poraste izražanje IL-6 v mišičnih vlaknih, kar privede do izrazitega povečanja koncentracije IL-6 na mestu nastanka v skeletni mišici in zaradi prestopanja prek kapilarne stene tudi v plazmi (8). Učinke IL-6 mišičnega izvora zato lahko v grobem razdelimo na lokalne (avtokrine/parakrine) in sistemske (endokrine).

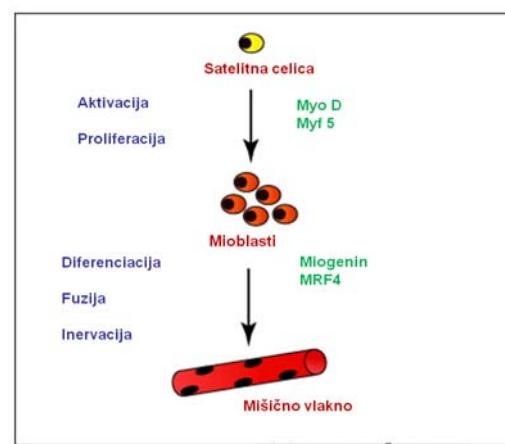
### 4.5.1 Učinki IL-6 na skeletno mišico (avtokrino/parakrino delovanje)

#### Vpliv IL-6 na regeneracijo in hipertrofijo

Mišična regeneracija je proces obnavljanja mišičnih vlaken. Začne se z aktivacijo satelitnih celic, nadaljuje s proliferacijo mioblastov, diferenciacijo mioblastov in fuzijo v mišične cevčice (Slika 6) (39). Proses mišične regeneracije je produkt interakcije intrinzičnega miogenega programa v celicah mišične vrste in različnih eksogenih dejavnikov, kot so na primer rastni dejavniki in citokini. Za celice, ki napredujejo skozi razvojne stopnje miogenega programa, so značilne velike razlike v genskem izražanju, ki so podlaga morfoloških in

funkcijskih fenotipskih sprememb. V zgodnjih stopnjah mišične regeneracije, ko prevladuje proliferacija, se močno izražajo transkripcijski dejavniki MyoD in Myf5 (Slika 6), ki so pomembni za napredovanje miogenih celic skozi celični cikel. Mutacije Myf5 in MyoD so zato na primer povezane z motnjo v razvoju aktiviranih satelitnih celic (39). Kasneje mioblasti izstopajo iz celičnega cikla in diferencirajo v mišične cevčice, kar je povezano z indukcijo genov za miogenin in MRF4 (angl. *myogenic regulatory factor 4*).

**Slika 6. Shematski prikaz mišične regeneracije.** Po poškodbi skeletne mišice pride do aktivacije satelitnih celic, ki se sicer nahajajo pod bazalno lamino mišičnega vlakna. Iz aktiviranih satelitnih celic nastanejo enojedrni mioblasti, ki sprva intenzivno proliferirajo. Proliferaciji sledi izstop iz celičnega cikla, diferenciacija in fuzija v večjedne mišične cevčice. Po oživčenju mišičnih cevčic se razvije zrelo mišično vlakno. Označeni so miogeni dejavniki v posamezni fazji mišične regeneracije (MyoD, Myf5, miogenin in MRF4). Prirejeno po (4).



Pomemben vpliv na uravnavanje procesa mišične regeneracije imajo tudi rastni dejavniki in citokini, med drugim tudi IL-6. Čeprav vloga IL-6 pri mišični regeneraciji ni povsem jasno opredeljena, podatki različnih študij kažejo, da spodbuja proliferacijo mioblastov in diferenciacijo mišičnih cevčic (40,41), kar bi lahko povečalo uspešnost mišične regeneracije. Do aktivacije satelitnih celic in proliferacije mioblastov pa ne pride le ob večjih poškodbah mišičnih vlaken, temveč tudi po telesni aktivnosti. Novonastali mioblasti se potem zlivajo z obstoječimi mišičnimi vlakni, kar verjetno vsaj nekoliko prispeva tudi k mišični hipertrofiji zaradi povečane obremenitve. Izločanje IL-6 v skeletni mišici med krčenjem naj bi tako po nekaterih podatkih pomembno prispevalo tudi k povečanju mišične mase (hipertrofiji), ki spreminja redno telesno aktivnost (42). Zanimivo pa je, da so starejše študije poudarjale predvsem nasprotni učinek, t.j. z IL-6 povzročeno zmanjšanje mišične mase v okviru rakaste kaheksije (5), kjer je bil ugotovljen pospeševalni vpliv IL-6 tako na katepsinski kot tudi na proteasom-ubikvitinski sistem (43). Je pa kombinacija dejavnikov (tako citokinskih kot

drugih) v rakasti kaheksiji najbrž precej različna od kombinacije med telesno aktivnosatjo pri zdravem človeku.

### **Vpliv na presnovo v mišici**

Med telesno aktivnostjo se močno poveča izločanje IL-6, kar ima po vsej verjetnosti pomembno vlogo pri vzdrževanju presnovne in energijske homeostaze v skeletni mišici. IL-6 na primer poveča porabo maščob, tako da spodbudi oksidacijo prostih maščobnih kislin in lipolizo znotrajmišičnih trigliceridov. Poleg tega IL-6 preko povečanja izločanja inzulina poveča prevzem glukoze v mišično vlakno. Na tesno povezano med energijsko presnovo v skeletni mišici in izločanjem IL-6, kaže tudi dejstvo, da na izločanje IL-6 vplivajo zaloge glikogena v mišici. Športniki, ki imajo večje zaloge mišičnega glikogena, imajo na primer nižje bazalne koncentracije plazemskega IL-6 med mirovanjem, visoke bazalne plazemske koncentracije IL-6 pa so povezane s telesno neaktivnostjo in metaboličnim sindromom (16).

#### **4.5.2 Sistemski učinki IL-6 (endokrino delovanje)**

##### **Presnovni učinki IL-6 med telesnim naporom**

Medtem ko so nekateri mnenja, da je presnovna vloga IL-6 med mišično kontrakcijo omejena izključno na skeletno mišico (44), pa vsaj nekateri podatki jasno podpirajo endokrino vlogo mišičnega IL-6. Med telesnim naporom namreč plazemska koncentracija IL-6 (mišičnega izvora) poraste tudi do 100-krat. Pospešeno izločanje IL-6 igra zelo verjetno pomembno vlogo pri ohranjanju presnovne homeostaze med telesnim naporom, ko se tako skeletna mišica kot celotno telo nahajata v stanju »energijskega stresa« (7,9,16,45). V takšnih razmerah naj bi IL-6 pomagal mišici pri zagotavljanju zadostnega dotoka energijsko bogatih molekul, kot so glukoza in proste maščobne kisline. IL-6 skupaj z drugimi miokini med telesnim naporom namreč spodbuja izplavljanje glukoze iz jeter in prostih maščobnih kislin iz maščobnega tkiva preko hormonsko senzitivne lipaze (16). V tem modelu IL-6 predstavlja opozorilni signal zmanjšanja zalog mišičnega glikogena in potrebo po novih virih energije med telesno aktivnostjo. IL-6 naj bi bil torej, poleg presnovnih hormonov, dodaten humoralni (endokrini) dejavnik, ki povezuje delovanje skeletne mišice s presnovnimi odzivi pomembnih presnovnih tkiv in organov, kot so jetra in maščevje (Razpredelnica 2). Poleg tega naj bi

skupaj z drugimi miokini prispeval tudi k nekaterim kroničnim presnovnim (in drugim) prilagoditvam, do katerih pride ob redni telesni aktivnosti.

### **Protivnetno delovanje IL-6 med telesnim naporom**

IL-6 je pomemben pri vzdrževanju homeostaze vnetnega odziva, saj po eni strani pospešuje vnetje, po drugi strani pa vnetje zavira. Kljub temu po klasičnem gledanju IL-6 običajno povezujemo s škodljivimi provnetnimi učinki, predvsem v smislu napredovanja nekaterih vnetnih revmatičnih bolezni. Povsem nasprotno pa naj bi bil IL-6 mišičnega izvora, ki nastaja med krčenjem mišičnih vlaken, vsaj deloma nosilec s telesno aktivnostjo povezanih protivnetnih učinkov. Izločanje IL-6 med telesnim naporom je namreč povezano s povečanim nastanjem protivnetnih citokinov (npr. IL-10) in antagonistov delovanja provnetnih citokinov, kot je na primer IL-1ra, ki se veže na receptor za IL-1 in s tem prepreči provnetno delovanje IL-1 $\alpha$  in IL-1 $\beta$  (46). Poleg tega naj bi bil IL-6 povezan tudi z zmanjšanim nastanjem nekaterih provnetnih citokinov (npr. TNF- $\alpha$ ) (47).

### **4.6 Ali so učinki IL-6 za skeletno mišico škodljivi ali koristni?**

IL-6 je povezan z razvojem bolezni, kot so revmatoidni artritis, rak in sladkorna bolezen. Povezava med IL-6 in revmatoidnim artritisom je še posebej očitna, ker za zdravljenje uspešno uporabljamo protitelo proti receptorju za IL-6 (tocilizumab) (37). Poleg tega so nekateri polimorfizmi gena za IL-6 pogostejši pri pacientih s sistemskim kroničnim juvenilnim artritisom (48). Povišana plazemska koncentracija IL-6 je povezana tudi z napredovanjem nekaterih vrst raka, kot je na primer plazmocitom. Pri plazmocitomu (multiplem mielomu) na primer IL-6 spodbuja proliferacijo in preživetje malignih plazmatk. Na tesno zvezo med IL-6 in plazmocitomom kažejo tudi starejša poimenovanja za IL-6 (»hibridomski/plazmocitomski rastni dejavnik«; angl. *hybridoma/plasmacytoma growth factor*) in tocilizumab (»protitelo proti mielomskemu receptorju«; angl. *myeloma receptor antibody*) (34). Visoka raven plazemskega IL-6 pri rakavih obolenjih ni le slab prognostični znak, ampak je po nekaterih študijah tudi pomemben patogenetski dejavnik natanka rakaste kaheksije, tudi zaradi neposrednih proteolitičnih učinkov na mišico s posledično izgubo mišične mase (5). Podobno nekatere študije nakazujejo, da je porast koncentracije IL-6 povezana z različnimi negativnimi

učinki kroničnega tlečega vnetja (angl. *low-grade inflammation*) (47), med drugim tudi z nastankom sarkopenije (starostne izgube skeletnomišične mase in funkcije) (49). Prispeval pa naj bi tudi k nastanku inzulinske rezistence in sladkorne bolezni tipa II (50).

V patoloških stanjih, kot so vnetne revmatične bolezni in nekatere vrste raka, je torej zaviranje delovanja IL-6 tudi klinično smiselno. Trenutno se tocilizumab, ki zavira delovanje IL-6, uporablja predvsem za zdravljenje revmatoidnega artritisa, vendar bi lahko imel pomembne terapevtske učinke tudi pri zdravljenju rakavih obolenj (36). Po drugi strani pa naj bi, kot sem omenila zgoraj, IL-6 zagotavljal presnovno homeostazo med telesnim naporom in pozitivno vplival na mišično regeneracijo. Zaviranje delovanja IL-6 s tocilizumabom bi v teh primerih lahko, vsaj s teoretičnega stališča, privedlo do neželenih učinkov. Čeprav kronični porast koncentracije IL-6 povezujejo z nastankom inzulinske rezistence (50), so poskusi pri miših z izbitim genom za IL-6 na primer pokazali, da vodi popolna odsotnost IL-6 v nastanek debelosti in sladkorne bolezni (51). Pri človeku popolna odsotnost IL-6 ni bila opisana, vendar lahko na presnovni pomen IL-6 sklepamo iz študij, ki so preučevale delovanje tocilizumaba pri bolnikih z revmatološkimi boleznimi. Pri teh bolnikih so namreč kljub bistvenemu izboljšanju osnovne bolezni opazili porast telesne mase, hipetrigliceridemijo in hiperholesterolemijo, kar podpira tezo, da ima IL-6 pomembno vlogo pri uravnavanju presnove tudi pri človeku (36). Poleg negativnih presnovnih učinkov bi lahko zaviranje delovanja IL-6 privedlo tudi do zmanjšane zmožnosti za mišično regeneracijo oziroma hipertrofijo pri povečani obremenitvi. Različne študije pri živalih so namreč pokazale, da je IL-6 pomemben za proliferacijo mioblastov in povrnitev mišične mase pri atrofiji skeletne mišice, ki je nastala zaradi telesne neaktivnosti oziroma razbremenitve skeletne mišice (42,52).

IL-6 je torej pomemben citokin in miokin, ki v fizioloških in patofizioloških razmerah na večplasten in kompleksen način uravnava delovanje skeletne mišice in drugih organov. Prav zaradi kompleksnosti učinkov IL-6 pa ostaja nerešeno vprašanje, kdaj se njegova nesporno pomembna in pozitivna fiziološka vloga v skeletni mišici prevesi v škodljivo delovanje in predstavlja podlago za napredovanje različnih bolezni. Bolj poglobljeno poznavanje molekularnih mehanizmov delovanja IL-6 bi lahko osvetlilo vsaj nekatera nerešena vprašanja glede (pato)fiziološke vloge IL-6 v skeletni mišici. V okviru diplomske

naloge smo se zato osredotočili na preučevanje znotrajceličnih signalnih poti, ki jih v mišični celicah uravnava IL-6.

## 5Namen dela in delovne hipoteze

IL-6 vpliva na procese v skeletni mišici na večplasten in kompleksen način. Prav zaradi kompleksnosti teh vplivov pa ni povsem jasno, kdaj se nesporno pomembna in pozitivna vloga IL-6 v skeletni mišici prevesi v škodljivo delovanje in predstavlja podlago za napredovanje različnih bolezni. Ena od poti do odgovora na to vprašanje je preučevanje učinkov tocilizumaba na molekularne mehanizme delovanja IL-6 v skeletni mišici. Tocilizumab je humanizirano monoklonsko protitelo proti receptorju za IL-6 (IL-6R $\alpha$ ), ki se v klinični praksi uporablja za zaviranje delovanja IL-6. O njegovih učinkih v skeletni mišici ni veliko znanega. Kot zaviralec učinkov IL-6 pa tocilizumab predstavlja potencialno raziskovalno orodje, s katerim bi lahko prek zaviranja delovanja IL-6 osvetlili molekularne mehanizme delovanja IL-6 v skeletni mišici. Po drugi strani pa je preučevanje mehanizmov delovanja tocilizumaba pomembno tudi s kliničnega stališča, saj bi, glede na pestrost vlog IL-6 v skeletni mišici, zdravljenje s tocilizumabom lahko pozitivno ali negativno vplivalo tudi na različne vidike delovanja skeletne mišice. V okviru diplomske naloge smo se namenili blokirati IL-6R $\alpha$  z tocilizumabom in ugotavljati kako ta blokada vpliva na molekularne mehanizme delovanja IL-6 v skeletnomišičnih celicah. Kot poskusni model za preučevanje teh vplivov smo uporabili primarno kulturo človeških skeletnomišičnih celic in celično linijo podganjih skeletnomišičnih celic L6.

### Namen dela smo strnili v preizkušanje treh hipotez:

1. Tocilizumab v kulturi primarnih človeških mišičnih cevčic med inkubacijo z rekombinantnim humanim IL-6 (rhIL-6) zavre aktivacijo signalne poti JAK/STAT3.
2. Tocilizumab v kulturi primarnih človeških mišičnih cevčic med inkubacijo z rekombinantnim humanim IL-6 (rhIL-6) zavre aktivacijo signalne poti ERK1/2.
3. Kultura podganjih mišičnih cevčic L6 je primerna za preučevanje molekularnih mehanizmov delovanja rhIL-6 in tocilizumaba.

## **Obrazložitev hipotez:**

### **Ad 1) in Ad 2)**

V okviru te raziskave nas je v prvi vrsti zanimalo vprašanje, ali lahko v mišičnih celicah tocilizumab učinkovito zavre delovanje signalnih poti, ki se aktivirajo med inkubacijo z rhIL-6. Na signalni poti JAK/STAT3 in ERK1/2 smo se osredotočili, ker sta tesno povezani z aktivacijo receptorja za IL-6 in sta hkrati zelo pomembni za uravnavanje delovanja skeletnomišičnih vlaken v fizioloških in patofizioloških razmerah.

### **Ad 3)**

Tocilizumab je humanizirano protitelo in naj se kot tak ne bi vezal na mišji receptor za IL-6. Vendar pa so imunohistokemične študije pokazale manjšo stopnjo navzkrižne reaktivnosti med tocilizumabom in nekaterimi podganjimi tkivi. Zaradi lažje dostopnosti in enostavnnejšega dela s podganjimi mišičnimi celicami L6 v primerjavi s primarnimi človeškimi mišičnimi celicami, nas je zanimalo, ali bi celice L6 lahko predstavljale ustrezno alternativo za preučevanje molekularnih učinkov zaviranja delovanja IL-6 s tocilizumabom.

## **6Materiali in metode**

Vsi poskusi so bili izvedeni v Laboratoriju za molekularno nevrobiologijo na Inštitutu za patološko fiziologijo Medicinske fakultete v Ljubljani. Za poskuse, ki smo jih izvedli na primarni kulturi človeških mišičnih celic, so bila pridobljena ustrezna dovoljenja (dovoljenje Komisije Republike Slovenije za medicinsko etiko št. 71/05/2012). Pri delu s človeškim tkivom smo upoštevali vse varnostne ukrepe, ki preprečujejo okužbe in njihovo širjenje. Vsi reagenti, za katere ni drugače navedeno, so bili kupljeni pri Sigma-Aldrich® (St. Louis, ZDA).

### **6.1Kultura skeletnomišičnih celic**

Poskuse smo izvedli na primarnih človeških skeletnomišičnih celicah in podganjih skeletnomišičnih celicah L6 (nesmrtna celična linija).

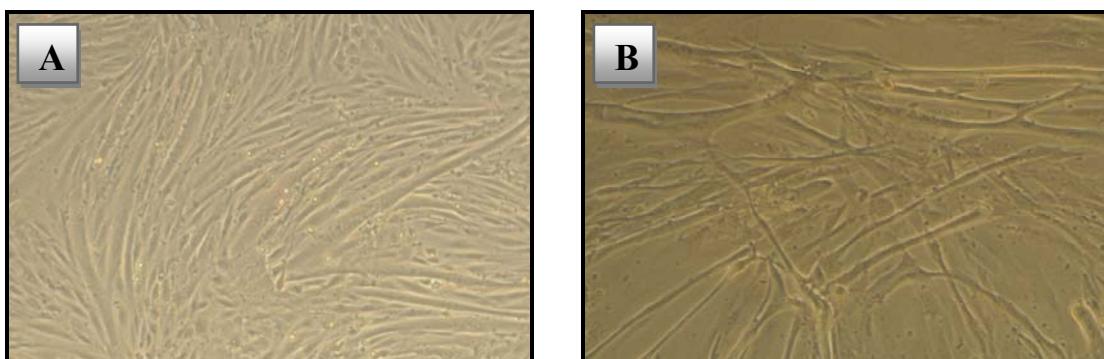
## **Kultura človeških primarnih mišičnih celic**

Kulturo človeških skeletnomišičnih celic smo pripravili iz miščnega tkiva mišice *semitendineus*, ki jih na Ortopedski kliniki UKC Ljubljana pri rutinskih operacijah zaradi rekonstrukcije križne vezi s kito mišice *semitendineus* ob čiščenju kite rutinsko odstranijo in zavržejo. Vsi donorji miščnega tkiva so v raziskavi sodelovali anonimno in prostovoljno. Kulture smo pripravili po standardnem postopku (53,54). Do začetka priprave kultur smo vzorce shranjevali pri 4 °C v 15 mL rastnega medija Advanced MEM (angl. *Minimal essential medium*), ki je vseboval 10 %(v/v) fetalnega govejega seruma (FBS, angl. *fetal bovine serum*). Po odstranitvi vezivnega in maščobnega tkiva smo mišično tkivo narezali na 0,5–1 mm velike koščke. Sledila je tripsinizacija koščkov tkiva pri 37 °C 30–45 minut. Pri tem so se sprostile satelitne celice, ki smo jih nato gojili v petrijevkah (d = 100 mm) (BD Falcon) v rastnem mediju Advanced MEM (10 %(v/v) FBS, 0,3 %(v/v) Fungizone, 0,15 %(v/v) Gentamicin) v inkubatorju (Heraeus) v atmosferi (5 % CO<sub>2</sub> /95 % zrak) z nasičeno vlago pri 37 °C. Celice smo pustili rasti 2-3 tedne brez menjave medija. Mioblastne kolonije smo ločili od fibroblastnih kolonij pred začetkom fuzije mioblastov. Nato smo mioblastne kolonije začeli gojiti v posodah za celične kulture (75 cm<sup>2</sup>) (BD Falcon ali TPP) v prisotnosti rastnega medija, ki smo ga menjavali na 2-3 dni. Celice smo vedno presajali preden so se začele stikati, kar bi povzročilo proces diferenciacije. Celice smo pred poskusom presadili v plošče s 6-vdolbinami (angl. *six-well plate*) (BD Falcon ali TPP). Z znižanjem koncentracije seruma na 2 % (Advanced MEM (2 %(v/v) FBS, 0,3 %(v/v) Fungizone, 0,15 %(v/v) Gentamicin) smo sprožili proces diferenciacije mioblastov v mišične cevčice. Poskuse smo izvedli na 7. – 9. dan diferenciacije. Vsi mediji in reagenti za delo s celičnimi kulturami so bili kupljeni pri družbi Invitrogen (Gibco®, Washington, ZDA)

## **Kultura podganjih skeletnomišičnih celic L6**

Podganje (L6) skeletnomišične celice (kupljene pri ATCC) smo gojili v posodah za celične kulture (75 cm<sup>2</sup>) (BD Falcon) v prisotnosti rastnega medija MEMalfa (angl. *Minimal essential medium alpha*) (10 %(v/v) FBS, 0,3 %(v/v) Fungizone, 0,15 %(v/v) Gentamicin), ki smo ga menjali na 2-3 dni. S pravočasnim presajanjem smo v tej fazи preprečili proces diferenciacije. Z znižanjem koncentracije seruma na 2 % (MEMalfa (2 %(v/v) FBS,

0,3 % (v/v) Fungizone, 0,15 % (v/v) Gentamicin) smo sprožili proces diferenciacije mioblastov v mišične cevčice. Poskuse smo izvedli na 7. – 9. dan diferenciacije.



**Slika 7. Kultura mišičnih cevčic.** A: Mišične cevčice podganje mišične linije L6 8. dan diferenciacije. B: Primarne človeške mišične cevčice 11. dan diferenciacije. Obe slikani z invertnim mikroskopom (100-kratna povečava).

## 6.2 Opis poskusov

### Časovna odvisnost odziva na rhIL-6 v podganjih mišičnih cevčicah L6

Želeli smo ugotoviti, kako različni časovni intervali izpostavljenosti rhIL-6 (PreproTech) vplivajo na fosforilacijo STAT3 in ERK1/2. Podganjem (L6) skeletnomišičnim celicam smo na 7. – 9. diferenciacije odstranili diferenciacijski medij in jih trikrat sprali s sterilnim fosfatnim pufrom, pripravljenim v fiziološki raztopini (PBS; angl. *Phosphate-Buffered Saline*), segretim na 37 °C. Celice smo nato tri ure gojili v MEMalfa brez dodanega seruma, antibiotikov in antimikotikov. Sledilo je tretiranje z rhIL-6 (50 ng/mL) v različnih časovnih intervalih (0, 5, 10, 15, 30, 60 min; gl. Slika 8). Ker je bil rhIL-6 pripravljen v raztopini serumskega govejega albumina (BSA; angl. *bovine serum albumin*), smo h kontrolni skupini dodali raztopino BSA brez rhIL-6. Poskus smo zaustavili s trikratnim spiranjem celic z ledenomrzlim PBS na ledu. Vzorce smo lizirali v litičnem pufru in nato homogenizirali, kot je opisano spodaj.

tretirali z rhIL-6 v različnih časovnih intervalih.

**Slika 8. Shematski prikaz plošče s 6 vdolbinami (angl. six-well plate).**  
Mišične cevčice L6 smo

Bazalno (samo BSA)	5 min rhIL-6 50 ng/mL	15 min rhIL-6 50 ng/mL 10 min rhIL-6 50 ng/mL	30 min rhIL-6 50 ng/mL	60 min rhIL-6 50 ng/mL

### Tretiranje skeletnomišičnih celic z rhIL-6 in tocilizumabom

Človeškim in podganjim (L6) skeletnomišičnim celicam smo 7. ali 8. dan diferenciacije odstranili diferenciacijski medij in jih trikrat sprali s sterilnim PBS (segretim na 37 °C). Celice smo nato tri ure inkubirali v Advanced MEM (človeške celice) oziroma MEMalfa (podganje celice) brez dodanega seruma, antibiotikov in antimikotikov v odsotnosti ali prisotnosti tocilizumaba (RoActemra, Roche) v koncentraciji 10 µg/mL ali 100 µg/mL. Sledilo je 15 oziroma 30-minutno tretiranje z 50 ng/mL rhIL-6 (Slika 9). Poskus smo zaustavili s trikratnim spiranjem celic z ledenomrzlim PBS na ledu. Za poskuse na primarnih mišičnih cevčicah smo uporabili celice treh različnih donorjev, vsak poskus pa smo naredili v 3 ali 4 ponovitvah (gl. Rezultati). Vzorce smo po končanem poskusu lizirali v litičnem pufru in nato homogenizirali, kot je opisano spodaj.

**Slika 9. Shematski prikaz plošče s 6 vdolbinami (angl. six-well plate) pri poskusu tretiranja celic s tocilizumabom in/ali z rhIL-6.** Mišične cevčice smo 3 ure inkubirali z ali brez tocilizumaba v dveh različnih koncentracijah in jih nato izpostavili IL-6 za 15 ali 30 minut.

Bazalno (samo BSA)	tocilizumab 10 µg/mL	tocilizumab 100 µg/mL
<b>rhIL-6</b> 50 ng/mL	<b>tocilizumab</b> 10 µg/mL + <b>rhIL-6</b> 50 ng/mL	<b>tocilizumab</b> 100 µg/mL + <b>rhIL-6</b> 50 ng/mL

### 6.3 Homogenizacija celičnih lizatov za odtis western

#### Vpliv postopka homogenizacije na izolacijo beljakovin

Celice L6 smo na 8. dan diferenciacije po spiranju z ledenomrzlim PBS lizirali v 150 – 200 µl homogenizacijskega pufra (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton, 10 % (v/v) glicerol, 20 mM Tris pH 7,8, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 0,5M M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM

PMSF, 1 % proteazni inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich®, St. Louis, ZDA) lizate smo nato centrifugirali 15 minut pri 12000g in 4 °C (postopek A). Da bi povečali delež izoliranih beljakovin v supernatantu, smo poskušali postopek homogenizacije celičnih lizatov izboljšati z alternativnim postopkom (postopek B). Lizate smo zato dodatno mehanično obdelali, tako da smo jih sedemkrat prepipetirali, pri čemer smo uporabili posebne (ozke in dolge) nastavke za pipeto. Na takšen način obdelane lizate smo intenzivno vorteksirali in jih nato izpostavili enournemu stresanju pri 4 °C (postopek B). Temu je sledilo centrifugiranje (15 minut pri 12000 g in 4 °C).

Da bi preverili, kakšna je izguba beljakovin v sedimentu, smo po odstranitvi supernatanta sediment pridobljen po postopku A ali B raztopili v enakem volumnu homogenizacijskega pufra, ki je vseboval še 3,7 % (v/v) natrijevega dodecil sulfata (SDS; angl. *sodium dodecyl sulfate*) in 6 M sečnino. V vzorcih sedimentov in supernatantov smo nato izmerili celokupno koncentracijo beljakovin z metodo merjenja koncentracije beljakovin z bikinkoninsko kislino (BCA Protein Assay Kit, Pierce, Thermo Scientific) in analizirali beljakovinsko sestavo z odtisom western (gl. spodaj in Rezultate).

### **Priprava vzorcev za odtis western v poskusih z rhIL-6 in/ali tocilizumabom**

Ker postopek B ni imel prednosti pred postopkom A, nekatere parametre pa je celo poslabšal, smo vse nadaljnje poskuse izvedli po postopku A. Po končanem poskusu in spiranju z ledenomrzlim PBS smo torej celice lizirali v 150 – 200 µl homogenizacijskega pufra (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton, 10 % (v/v) glicerol, 20 mM Tris pH 7,8, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 0,5mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 1 % proteazni inhibitor) in jih nato centrifugirali 15 minut pri 12000 g in 4 °C. Sediment smo zavrgli, supernatant pa smo uporabili za nadaljnje analize (merjenje beljakovin in odtis western).

### **6.4 Merjenje koncentracije beljakovin**

Koncentracijo beljakovin v supernatantu in/ali sedimentu smo merili z metodo BCA (BCA Protein Assay Kit, Pierce®) po navodilih proizvajalca (Thermo Scientific®, West Palm Beach, Florida, ZDA). Pri tej metodi se v prisotnosti beljakovin bakrovi Cu<sup>2+</sup> ioni reducirajo

do Cu<sup>1+</sup> ionov, ki se v naslednji stopnji vežejo z dvema molekulama bikinkoninske kisline (BCA, angl. *bichinchoninic acid*). Pri tem nastane vijoličen kompleks, ki absorbira svetlobo pri valovni dolžini 550-570 nm. Za pripravo standardnih raztopin smo uporabili goveji serumski albumin. V luknjice mikrotitrsko plošče smo v duplikatu nanesli 20 µl standardov in vzorcev in nato dodali 160 µl delovne raztopine, ki je vsebovala reagent A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Na-tartrat, NaOH in bikinoninska kislina) in reagent B (CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O v vodi) v razmerju 50:1. Po dodatku delovne raztopine smo ploščo 30 minut inkubirali pri 37 °C in nato pri sobni temperaturi spektrofotometrično izmerili absorbanco pri 550 nm (Victor 3) (PerkinElmer® precisely, Waltham, Massachusetts, ZDA).

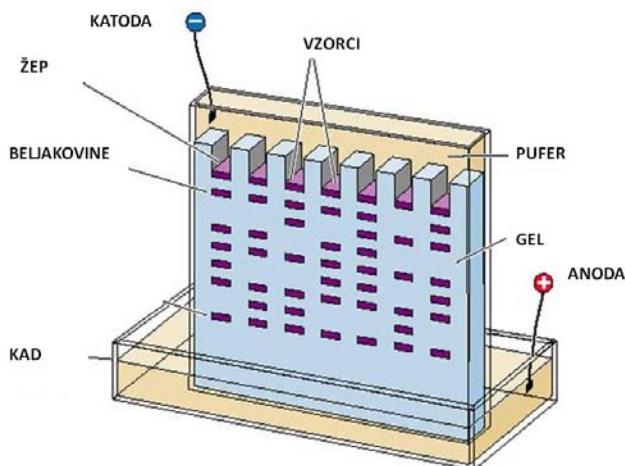
## 6.5 Analiza znotrajceličnih signalnih poti z odtisom western (angl. *Western Blot*)

### Gelska elektroforeza

Lizate celic (sediment ali supernatant) smo pripravili za gelsko elektroforezo tako, da smo jih na podlagi meritev koncentracije celokupnih beljakovin z dH<sub>2</sub>O razredčili do enake končne koncentracije beljakovin in jih nato raztopili v 4x Laemmlijevem pufru (250 mM Tris, 8 %(w/v) SDS, 40 %(v/v) glicerol, 0,008 %(w/v) bromfenol modro, pH 6,8) v razmerju 3 : 1 (običajno 75 µl vzorca in dodali 25 µl 4x Laemmlijevega pufra). Nato smo vzorce 20 minut inkubirali pri 56 °C ob starnem stresanju (500–600/min). Tako pripravljene vzorce smo nato nanesli na poliakrilamidni gel. Uporabili smo 12 + 2 oziroma 18 žepni gradientni (4–12 %) bis-tris gel (BioRad®, Hercules, California, ZDA). Elektroforeza je potekala v MES pufru (BioRad®, Hercules, California, ZDA). V prvi in zadnji žep smo nanesli 2,5 µl oziroma 4,5 µl proteinskega markerja (angl. *Full Range Rainbow Protein Molecular Weight Marker*; GE Healthcare, Uppsala, Švedska), v vmesne žepe pa smo nanesli 35 µl v Laemmlijevem pufru pripravljenih vzorcev. Elektroforeza je potekala pri 200 V v pufru za elektroforezo (running pufer) 45 min pri sobni temperaturi (Criterion, BioRad®, Hercules, California, ZDA). Postopek je shematsko prikazan na Sliki 10.

**Slika 10. Gelska elektroforeza.** V žepke nanesemo vzorce pripravljene v Laemmlijevem pufru. Zaradi vezanega SDS so beljakovine negativno nabite in ko sistem

priključimo na vir napetosti, začnejo potovati navzdol proti pozitivni anodi. Manjše beljakovine laže potujejo skozi gel, zato potujejo hitreje. Večje beljakovine potujejo počasneje in zato prepotujejo manjšo razdaljo (5).



### Prenos (transfer) z gela na PVDF membrano

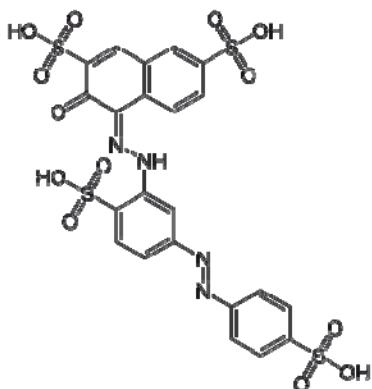
Po končani elektroforezi smo s pomočjo električnega polja izvedli prenos (transfer) negativno nabitih beljakovin iz gela na membrano. Za prenos smo uporabili polivinilidenfluoridno membrano (Immobilon-P, Millipore®, Billerica, Massachusetts, ZDA), ki smo jo pred tem aktivirali v 100-odstotnem metanolu (40 s). Pazili smo, da sta bila gel in membrana v neposrednem stiku in da med njima ni bilo zračnih mehurčkov, tako smo zagotovili optimalen prenos proteinov. Gel in membrano smo obdali s filter papirjem in gobicami ter vse plasti zaprli v kaseto (Slika 11). Kaseto smo vstavili v posodo za prenos (BioRad®, Hercules, California, ZDA), tako da je bila membrana obrnjena proti pozitivni katodi. Prenos je potekal 90 minut pri 100 V v tris-glicinskem pufru (31 mM Tris, 0,24 M glicin) z dodanim 10 % (v/v) metanolom, pri čemer smo okolico hladili z ledeno kopeljo.

**Slika 11. Prenos beljakovin iz gela na PVDF membrano.** Membrana in gel morata biti v popolnem stiku. Obdamo ju s filter papirjem in gobicami (označeno z modro barvo) ter zapremo kaseto. Kaseto vložimo v posodo, ki omogoča priključitev na vir napetosti. Membrana je obrnjena proti pozitivni anodi, zato negativno nabite

beljakovine potujejo iz gela na membrano (6).



Uspešnost prenosa na PVDF membrano smo preverili z barvilo Ponceau S (0.1% (w/v) Ponceau S v 5 % (v/v) ocetni kislini) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, ZDA). Ponceau S (Spojina 1) je natrijeva sol diazo barvila, ki se reverzibilno veže na proteine in se uporablja za nespecifično detekcijo proteinov na PVDF ali nitrocelulozni membrani. Membrano smo 1 min inkubirali v raztopini barvila Ponceau S ter jo sprali v 5 % ocetni kislini. Membrano smo razbarvali s pomočjo spiranja v pufru TBS-T (angl. *Tris-Buffered Saline and Tween 20*; sestava: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,02 % (v/v) Tween-20, pH 7,6).



Spojina 1: Ponceau S (7)

### Imunodetekcija specifičnih beljakovin

Prenosu na PVDF membrano je sledila enourna inkubacija PVDF membrane v 7,5 % (w/v) nemastnem mleku (Posneto mleko v prahu, Pomurske mlekarne, Ljutomer, Slovenija) v TBS-T na stresalniku pri sobni temperaturi, z namenom nasičenja nespecifičnih vezavnih mest na membrani (angl. *blocking*). Nato smo membrano inkubirali v raztopini ustreznih primarnih protitelesih čez noč na tresalniku pri 4 °C. Uporabili smo specifična primarna protitelesa (Tabela 3) proti pSTAT3 (Tyr<sup>705</sup>), celokupni STAT3, pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), GAPDH in

aktinu. Primarna protitelesa so bila pripravljena v ustreznih redčitvah v pufru za primarna protitelesa (5 ml TBS 20x, 80 ml dH<sub>2</sub>O, 100 mg NaN<sub>3</sub>, 100 mg BSA, ad 100 ml dH<sub>2</sub>O). Sledilo je polurno spiranje v pufru TBS-T in nato enourna inkubacija v raztopini sekundarnih protiteles (BioRad®, Hercules, California, ZDA) v 5 % (w/v) nemastnem mleku v prahu v TBS-T 1 h na tresalniku pri sobni temperaturi. Uporabili smo sekundarna protitelesa, ki so konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP; angl. *horseradish peroxidase*). Sekundarna protitelesa so bila pripravljena v redčitvah 1:12500 oziroma 1:25000 v 5 % (w/v) mleku v prahu v TBS-T. Membrano smo pred začetkom specifične imunodetekcije sprali s TBS-T.

<b>Beljakovina</b>	<b>Redčitev</b>	<b>Proizvajalec protiteles</b>
pSTAT3 (Tyr <sup>705</sup> )	1:2000	Cell Signaling Technologies® (Danvers, ZDA)
STAT3	1:2000	Cell Signaling Technologies®, (Danvers, ZDA)
pERK1/2 (Thr <sup>202</sup> /Tyr <sup>204</sup> )	1:20000	Cell Signaling Technologies®, (Danvers, ZDA)
GAPDH	1:1000	Cell Signaling Technologies®, (Danvers, ZDA)
Aktin	1:1000	Santa Cruz Biotechnology®, (Santa Cruz, ZDA)

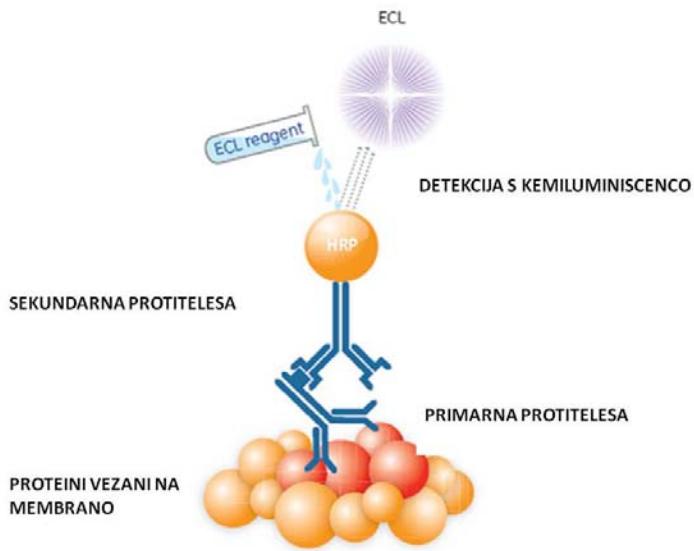
### **Razpredelnica 3. Seznam uporabljenih primarnih protiteles.**

Specifične beljakovinske pasove smo prikazali z metodo ojačane kemiluminiscence (ECL; angl. *enhanced chemiluminescence*, Slika 12). Uporabili smo kemiluminiscentni reagent (Pierce®, Thermo Scientific®, West Palm Beach, Florida, ZDA). Pri tej metodi neposredno na membrano dodamo kemiluminiscenčni substrat, ki vsebuje luminol in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hrenova peroksidaza, konjugirana na sekundarna protitelesa, katalizira reakcijo med H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in luminolom, pri čemer nastane 3-aminoftalat, ki pri prehodu v osnovno stanje oddaja svetlobo z valovno dolžino 428 nm. Svetlobni signal smo posneli na rentgenski film (Agfa, Zagreb, Hrvaska), ki smo ga razvili na napravi (Curix 60, Agfa HealthCare®, Greenville, South Carolina, ZDA).

**Slika 12. Detekcija z ECL.**  
Primarna protitelesa se specifično

vežejo na beljakovine. Sekundarna protitelesa, ki so konjugirana s hrenovo peroksidazo (HRP), se vežejo na Fc

regijo primarnih protiteles. ECL reagent vsebuje luminol in  $H_2O_2$ , ki v prisotnosti HRP (katalizator) reagirata. Pri reakciji nastaja svetloba, ki jo zajamemo z rentgenskim filmom (8).



V primeru, da smo želeli na uporabljeni membrani detektirati beljakovine s podobno molekulsko maso, smo morali odstraniti vezana primarna protitelesa (angl. *stripping*). Membrano smo inkubirali v pufru za »Stripping« (0,7 % (v/v)  $\beta$ -merkaptoetanol, 2 % (w/v) SDS, 0,62 M Tris, pH 6,8) 30 minut na tresalniku pri 37 °C. Sledilo je spiranje membrane v pufru TBS-T in blokiranje nespecifičnih vezavnih mest na membrani v 7,5 % (w/v) nemastnem mleku v prahu v TBS-T 1 uro na tresalniku pri sobni temperaturi (angl. *blocking*). Uspešnost odstranitve primarnih protiteles smo vedno preverili tako, da smo po ponovni inkubaciji s sekundarnimi protitelesi izvedli poskus imunodetekcije. Samo v primeru, da je bil postopek uspešen (signal v želenem časovnem intervalu ekspozicije povsem odsoten), smo membrano ponovno inkubirali v raztopini izbranih primarnih in sekundarnih protiteles, po enakem postopku, kot je opisano zgoraj.

Pri analizi specifičnih proteinov z odtisom western smo v nekaj primerih za prikaz pasov uporabili tudi alternativno metodo s protitelesi konjugiranimi z alkalno fosfatazo (Sigma-Aldrich®, St. Louis, ZDA). Po inkubaciji s primarnimi protitelesi čez noč pri 4 °C smo membrano trikrat sprali s pufrom «blocking» (500 mg I-Block (Invitrogen, Life Technologies, ZDA), 0,75 ml Tween 20x, ad 250 ml PBS). Sledila je 45 minutna inkubacija membrane v raztopini sekundarnih protiteles konjugiranih z alkalno fosfatazo (1:10000). Nato smo membrano trikrat po 10 minut spirali s pufrom 1 (11,61 g maleinska kislina, 8,766 g NaCl, ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O) in 2 minuti v pufru 3 (5 ml 1M MgCl<sub>2</sub>, 10 ml 1 M Tris-baza, 2 ml 5 M NaCl,

ad 100 ml dH<sub>2</sub>O). Nato smo po navodilih proizvajalca inkubirali membrano v pufru 3 z dodatkom 0,02 % (v/v) reagenta NBT/BCIP (angl. *nitro blue tetrazolium chloride/(5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl) dihydrogen phosphate*, Roche) in spremljali nastanek obarvanih pasov (precipitata) na membrani. Po končani reakciji smo membrano sprali v pufru 4 (1,576 g Tris-HCl, 2 ml 0,5 M EDTA, ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O, pH 7,5).

## 6.6 Analiza rezultatov

Za izdelavo grafov smo uporabljali program GraphPad Prism. Rezultati so prikazani kot povprečne vrednosti  $\pm$  standardna napaka povprečja (SEM; angl. *standard error of the mean*). Za primerjavo več statističnih razredov med seboj smo uporabili enosmerno ANOVO (angl. *One-way ANOVA*), ki ji je sledil Bonferronijev ali Dunnettov *post hoc* test. Kot mejo statistične značilnosti smo upoštevali  $P < 0,05$ .

# 7 Rezultati

## 7.1 Vpliv postopka homogenizacije na izolacijo specifičnih beljakovin

V okviru diplomske naloge smo preučevali znotrajcelične signalne poti, ki jih v mišičnih celicah sproži IL-6. Signalne beljakovine (npr. STAT3, ERK1/2) in beljakovine, ki jih pri odtisu western pogosto uporabljamo kot endogeno kontrolo (na primer aktin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH)), se razlikujejo po znotrajcelični lokalizaciji in topnosti v različnih pufrih. Pri običajnem postopku homogenizacije (postopek A, gl. Metode) vzorce za analizo z odtisom western pripravimo iz supernatanta celičnega lizata, medtem ko v homogenizacijskem pufru netopni sediment zavržemo. Zato smo najprej preverili, kakšen delež celokupnih beljakovin izgubimo med pripravo vzorca za odtis western. Lizat mišičnih cevčic L6 smo pripravili, kot je natančno opisano v Metodah (postopek A). Po centrifugiranju smo odstranili supernatant, nato smo sediment ponovno raztopili v enakem volumnu homogenizacijskega pufra z dodatkom SDS (3,7 %), trisa (20 mM) in sečnine (6 M). Z meritvijo koncentracije celokupnih beljakovin v vzorcih supernatanta in sedimenta smo

ugotovili, da se v supernatantu nahaja približno 80 % vseh beljakovin, medtem ko v sedimentu pri običajnem postopku zavržemo približno 20 % celokupnih beljakovin (Razprecelnica 4).

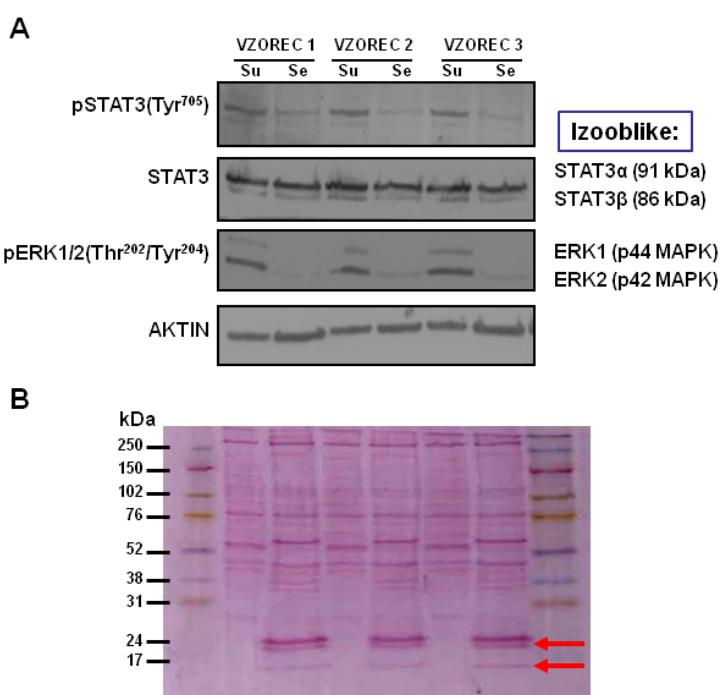
Vzorec	$m \pm SD (\mu\text{g})$	Delež $\pm SD (\%)$	n
Supernatant	$235 \pm 15$	$81 \pm 2$	6
Sediment	$55 \pm 7$	$19 \pm 2$	6

**Razprecelnica 4. Vsebnost beljakovin v supernatantu in sedimentu lizata celic L6.** Na podlagi meritev koncentracije celokupnih beljakovin in volumna vzorca smo izračunali maso beljakovin v supernatantu in sedimentu posameznega vzorca. Rezultati so navedeni kot povprečna masa ( $\pm SD$ ) izoliranih beljakovin oziroma kot v % izražen delež ( $\pm SD$ ) celotne mase izoliranih beljakovin.

Čeprav so meritve pokazale, da s postopkom homogenizacije A izoliramo večinski delež celičnih beljakovin, pa na podlagi meritev koncentracije celokupnih beljakovin ne moremo oceniti, ali je razmerje med posameznimi signalnimi beljakovinami in endogenimi kontrolami v supernatantu in sedimentu enako. Predvidevali smo, da bi se lahko v netopnem sedimentu beljakovine nahajal v vsaj deloma drugačnem medsebojnem razmerju kot v supernatantu, zato smo z odtisom western preverili, ali se supernatant in sediment razlikujeta po vsebnosti specifičnih beljakovin. Na poliakrilamidni gel smo nanesli enako maso beljakovin iz sedimenta in supernatanta. Celokupni STAT3 se je nahajal tako v sedimentu kot v supernatantu, pSTAT3 (Tyr<sup>705</sup>) in pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) pa sta bila prisotna predvsem v supernatantu (Slika 13 A). Nasprotno pa je bila relativna vsebnost citoskeletalne beljakovine aktin nekoliko večja v sedimentu kot v supernatantu.

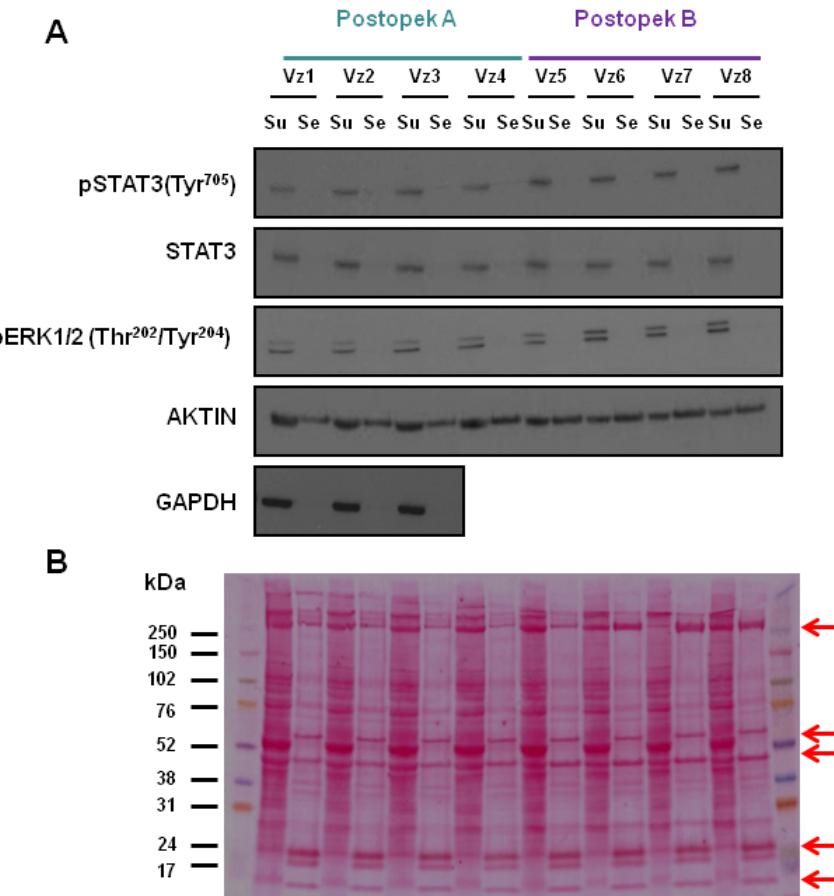
### Slika 13. Sediment in supernatant se razlikujeta po vsebnosti specifičnih beljakovin.

Na gel smo nanesli enake mase celokupnih beljakovin vzorcev supernatanta (Su) in sedimenta (Se) lizatov podganjih (L6) mišičnih cevčic in naredili odtis western. **A:** Imunodetekcija pSTAT3 (Tyr<sup>705</sup>), celokupnega STAT3, pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) in aktina. V primeru (p)STAT3 in pERK1/2 sta zaradi prisotnosti različnih izoblik vidna po dva pasova. **B:** Nespecifično obarvanje beljakovin na PVDF membrani (Ponceau S). Z rdečimi puščicami so označeni nekateri pasovi, ki se po intenziteti obarvanja še posebej izrazito razlikujejo pri sedimentu in supernatantu. Na levem in desnem robu se nahaja označevalec molekulske mase beljakovin, levo so označene molekulske mase (kDa).



Analiza izbranih specifičnih beljakovin je pokazala, da se sediment in supernatant razlikujeta tudi po razmerju med posameznimi (specifičnimi) beljakovinami. Da bi to ugotovitev še dodatno preverili, smo po prenosu beljakovin z gela na PVDF membrano svežo membrano še pred blokiranjem z mlekom obarvali z barvilom Ponceau S, ki se v kislem mediju nespecifično in reverzibilno veže na beljakovine. Pri tem barvanju se beljakovine obarvajo rdeče-vijolično, intenziteta obarvanja pa je sorazmerna količini beljakovin (55). Celokupna intenziteta obarvanja z barvilm Ponceau S se med posameznimi vzorci ni pomembno razlikovala (Slika 13 B), kar je skladno z dejstvom, da smo na gel nanesli enako maso beljakovinskih vzorcev sedimenta in supernatanta. Analiza vzorca (lestvice) obarvanja kot tudi intenzitete obarvanja posameznih pasov pa je jasno pokazala, da se sediment in supernatant razlikujeta po vsebnosti posameznih (skupin) beljakovin (puščice na sliki 13 B). Na podlagi vzorca obarvanja namreč lahko sklepamo, da so se nekatere beljakovine oziroma skupine beljakovin nahajale v sedimentu in supernatantu v izrazito različnih deležih.

Ker smo ugotovili, da z običajnim postopkom v sedimentu izgubimo velik delež aktina (in nekaterih drugih beljakovin, ki jih nismo posebej določali), ki se zelo pogosto uporablja kot endogena kontrola za odtis western, smo žeeli izboljšati ekstrakcijo aktina z optimizacijo postopka homogenizacije (postopek B). Kot je natančneje opisano v Metodah, smo zato vse vzorce dodatno mehanično obdelali in jih izpostavili podaljšani (enourni) inkubaciji v homogenizacijskem pufru pri 4 °C ob konstantnem stresanju. Po centrifugiraju smo sediment raztopili v homogenizacijskem pufru z dodatkom SDS (3,7 %) in sečinine (6 M) do enakega volumna kot supernatant. Nato smo na poliakrilamidni gel nanesli enak volumen vzorca brez izenačevanja koncentracije beljakovin in izvedli odtis western. Z imunodetekcijo smo ugotovili, da ne glede na postopek homogenizacije supernatant vsebuje veliko večino pSTAT3 ( $\text{Tyr}^{705}$ ), celokupnega STAT3 in pERK1/2 ( $\text{Thr}^{202}/\text{Tyr}^{204}$ ) (Slika 14 A). Prav nasprotno pa smo s poskusom optimizacije homogenizacijskega postopka (postopek B) občutno poslabšali izolacijo aktina (Slika 14 A). Čeprav je bila masa celokupnih beljakovin v sedimentu približno od 4 do 5-krat manjša, je bila raven aktina denzitometrično v vzorcih supernatanta in sedimenta praktično enaka. Nasprotno pa je bila pri standardnem postopku A, skladno z večjo maso beljakovin v supernatantu, raven aktina v supernatantu večja kot v sedimentu. Zaradi izgub aktina in odvisnosti izolacije aktina od postopka homogenizacije smo preverili tudi uspešnost izolacije alternativne endogene kontrole GAPDH. Ugotovili smo, da v supernatant z običajnim postopkom A izoliramo veliko večino GAPDH (Slika 14 A).



**Slika 14. Vpliv postopka homogenizacije na izolacijo celokupnih beljakovin.** Podganje mišične celice L6 smo homogenizirali po postopku A ali B. Vzorce supernatanta (Su) in sedimenta (Se) smo na gel nanesli v enakem volumnu in naredil odtis western. Razmerje mase celokupnih beljakovin med supernatanti in sedimenti je bil približno 4 : 1. **A:** Imunodetekcija pSTAT3 (Tyr<sup>705</sup>), celokupnega STAT3, pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>), aktina in GAPDH. **B:** Nespecifično obarvanje beljakovin na PVDF membrani (Ponceau S). Z rdečimi puščicami so označeni nekateri pasovi, ki so intenzivnejše obarvani v sedimentu, čeprav je količina beljakovin v sedimentu manjša (šibkejše celokupno obarvane). Na levem in desnem robu se nahaja označevalec molekulske mase beljakovin, levo so označene molekulske mase (kDa). Oznaka Vz nad sliko pomeni vzorec.

Pri barvanju z barvilom Ponceau S se je ponovno izkazalo tudi, da se sediment in supernatant precej razlikujeta po populaciji beljakovin, ki jih vsebujeta (Slika 14 B). Kljub dejstvu, da je bilo v sedimentu le okoli 20 % celokupnih beljakovin (skladno s tem je bila tudi celokupno obarvanja šibkejše pri vzorcih sedimenta), je bila intenziteta nekaterih beljakovinskih pasov bistveno večja v sedimentu kot supernatantu. Gledano v celoti so naši poskusi torej pokazali, da s standardnim postopkom homogenizacije (postopek A) izoliramo reprezentativen vzorec STAT3, ERK1/2 in endogene kontrole GAPDH. Ker novi postopek v

nobenem pogledu ni prinesel prednosti, smo za vse nadaljnje poskuse uporabili standardni postopek A. Za endogeno kontrolo pa smo raje kot aktin v nadaljevanju vseskozi uporabljali GAPDH. Kot dodatno kontrolo nanosa vzorcev na gel in uspešnosti prenosa beljakovin z gela na membrano smo pri vseh poskusih uporabili tudi barvanje z barvilom Ponceau S.

V grobem bi lahko posplošili, da je za razmerje beljakovin med supernatantom in sedimentom pomembno predvsem to, ali gre za citosolno beljakovino, kot je glikolitični encim GAPDH (prevladuje v supernatantu) ali pa za citoskeletno kot je aktin (prevladuje v sedimentu). Postopek homogenizacije pri katerem za nadaljno analizo beljakovin uporabimo le supernatant je torej bolj primeren za analizo citosolnih beljakovin. V našem poskusu smo pri interpretaciji rezultatov uporabili le citosolne beljakovine, zato sklepamo, da postopek homogenizacije ni vplival na naše rezultate.

## **7.2 Vpliv tocilizumaba na aktivnost znotrajcelične signalne poti**

### **JAK/STAT3 v kulturi človeških skeletnomišičnih celic**

Aktivnost signalne poti JAK/STAT3 v mišičnih cevčicah smo spremljali z merjenjem fosforilacije STAT3 na tirozinskem ostanku 705 ( $Tyr^{705}$ ), ki je potreben za aktivacijo in dimerizacijo transkripcijskega dejavnika STAT3. Zaradi precejšnje biološke variabilnosti primarnih kultur človeških mišičnih celic smo raziskavo zastavili tako, da smo vse poskuse izvedli na celicah treh različnih donorjev, vsakič v 3 ali 4 ponovitvah. Človeške mišične cevčice smo 3 ure inkubirali z ali brez tocilizumaba (10  $\mu\text{g/mL}$  ali 100  $\mu\text{g/mL}$ ) in jih nato 15 minut tretirali z rhIL-6 (50 ng/mL). Časovni interval smo izbrali na podlagi predhodnih poskusov, v katerih smo ugotovili, da se v človeških mioblastih rhIL-6 (50 ng/ml) močno aktivira STAT3 že v 15 minutah (53). V skladu s pričakovanji je 15-minutno tretiranje z rhIL-6 v mišičnih cevčicah povečalo fosforilacijo STAT3 (Slika 15 A-D). Odziv na rhIL-6 je bil v prisotnosti tocilizumaba, protitelesa, ki prepreči vezavo IL-6 na receptorsko podenoto IL-6R $\alpha$ , popolnoma odsoten. Čeprav se je pri izpostavitvi tocilizumabu konsistentno nakazoval trend k znižanju ravni pSTAT3 v odsotnosti rhIL-6 (bazalni pogoji), pa razlika v primerjavi z netretirano kontrolno skupino ni dosegla ravni statistične značilnosti ( $P>0,05$ ). Gledano v celoti naši rezultati torej kažejo, da akutno 15-minutno tretiranje z rhIL-6 selektivno vpliva na

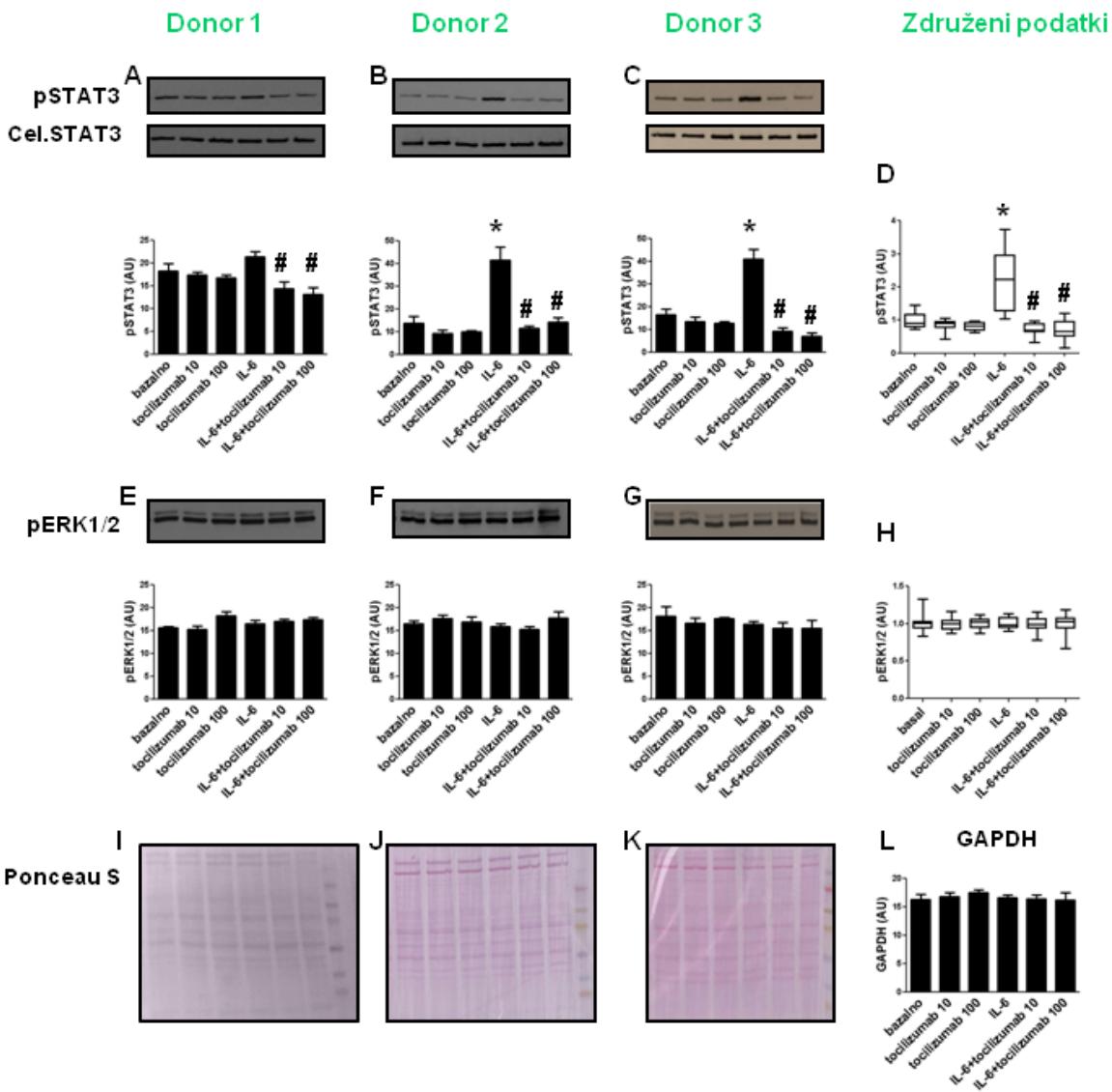
aktivacijo znotrajceličnih signalnih poti in da lahko odziv signalne poti JAK/STAT3 na IL-6 preprečimo s tocilizumabom. Poleg tega pa zgolj nakazan vpliv tocilizumaba na bazalno fosforilacijo STAT3 v mišičnih cevčicah nakazuje, da fosforilacija STAT3 ni odvisna izključno od izpostavitve IL-6.

Potrebno je tudi poudariti, da je aktivnost signalne poti JAK/STAT3 kazala precejšnjo raznolikost med kulturami posameznih donorjev. Čeprav je tocilizumab v vseh primerih preprečil z IL-6 sproženo povečanje fosforilacije STAT3 in je bila variabilnost rezultatov znotraj enega poskusa (isti donor) zelo majhna, pa je bil odziv na IL-6 v kvantitativnem smislu precej bolj raznolik, kadar smo primerjali rezultate med kulturami posameznih donorjev. Medtem ko je bilo pri donorju 1 povprečno povečanje ravni pSTAT3 17 % in ni doseglo ravni statistične značilnosti ( $P>0,05$ ), se je fosforilacija STAT3 pri donorju 3 povprečno povečala za 3-krat ( $P<0,05$ ). Kvantitativna raznolikost odziva pri celicah posameznih donorjev je razvidna tudi iz velike razpršenosti rezultatov pri celokupni (sumarni) analizi rezultatov (Slika 15 D). Povzamemo lahko torej, da so naši rezultati v kvalitativnem smislu konsistentni, vendar glede velikosti posameznih odzivov kažejo na precejšnjo biološko raznolikost med primarnimi kulturami mišičnih celic različnih donorjev.

### **7.3 Vpliv tocilizumaba na aktivnost znotrajcelične signalne poti**

#### **ERK1/2 v kulturi človeških skeletnomišičnih celic**

Prav nasprotno od signalne poti JAK/STAT3, ki je kazala veliko odzivnost na rhIL-6, pa povečanja fosforilacije ERK1/2 v naših poskusnih razmerah nismo opazili nikoli (Slika 15 E-G), četudi je znano, da IL-6 lahko aktivira tudi signalno pot Ras/Raf/MEK, kar privede do povečanja fosforilacije ERK1/2 (29). Skladno z odsotnostjo odziva na rhIL-6, tudi pri izpostavitvi tocilizumabu sprememb v ravni pERK1/2 nismo zaznali. Aktivnost signalne poti ERK1/2 med različnimi primarnimi kulturami se je v primerjavi s STAT3 bistveno manj razlikovala (Slika 15 H).

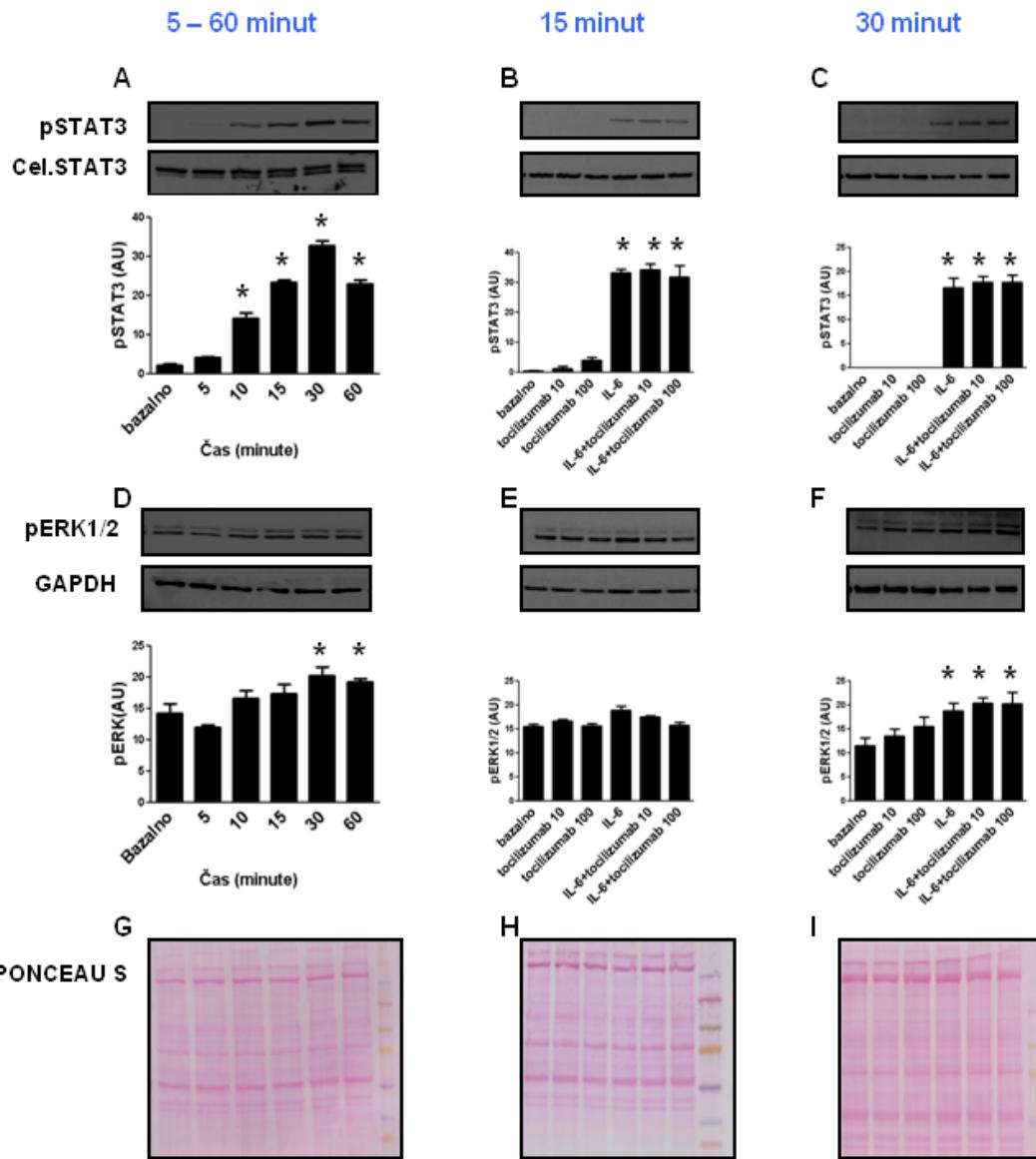


**Slika 15. Aktivnost znotrajceličnih signalnih poti JAK/STAT3 in ERK1/2 v človeških mišičnih cevčicah pod vplivom rhIL-6 in/ali tocilizumaba.** Primarne kulture mišičnih cevčic treh različnih donorjev smo inkubirali 3 ure z ali brez tocilizumaba ( $10 \mu\text{g/mL}$ ,  $100 \mu\text{g/mL}$ ) in jih nato za 15 minut izpostavili rhIL-6 (pod stolpcu je za to tretiranje oznaka IL-6) ( $50 \text{ ng/mL}$ ) ali samo vehiklu ( $0,1 \%(w/v)$  BSA). **A-C:** Odziv pSTAT3 (Tyr<sup>705</sup>) v kulturah posameznih donorjev ( $n = 3 - 4$ ). **D:** Celokupna analiza odziva pSTAT3 ( $n = 10 - 11$ ). **E-G:** Odziv pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) v kulturah posameznih donorjev ( $n = 3 - 4$ ). **H:** Celokupna analiza odziva pERK1/2 ( $n = 10 - 11$ ). **I – K:** Enakomernost nanosa beljakovinskih vzorcev in uspešnost prenosa na membrano smo preverili z barvilm Ponceau S. **L:** GAPDH smo uporabili kot endogeno kontrolo ( $n = 7$ ). Rezultati denzitometrije so navedeni v arbitarnih enotah (AU) kot povprečna vrednost  $\pm$  SEM. \* $P < 0,05$  glede na bazalno kontrolo (Bazalno), # $P < 0,05$  glede na stimulacijo z rhIL-6 (IL-6), Bonferronijev post hoc test.

## **7.4 Aktivacija znotrajceličnih signalnih poti v podganjih mišičnih cevčicah L6 pri tretiranju z rhIL-6**

Zaradi relativno velike biološke variabilnosti je pri delu s človeškimi primarnimi mišičnimi celicami za dosego konsistentnih in zanesljivih rezultatov pogosto potrebno narediti večje število poskusov. Žal pa relativno majhno število delitev, ki jih pred nastopom celične senilnosti še lahko opravijo primarne mišične celice, pomembno omejuje število poskusov, ki jih lahko naredimo s posamezno kulturo. Poleg tega so primarne kulture človeških mišičnih celic zaradi svojega izvora in načina priprave (gl. Metode) iz etičnih in drugih razlogov relativno težko dostopne. Zaradi tovrstnih ovir se pri preučevanju molekularnih mehanizmov v skeletni mišici pogosto uporablja podganjo celično linijo L6. Kljub prednostim, kot so velika razpoložljivost in praktično neomejeno število delitev (nesmrtna celična linija), pa so lahko takšne celice po svojih fizioloških značilnostih pomembno drugačne od primarnih po svojih fizioloških značilnostih.

Najprej smo preučili, kako se podganje celice L6 odzivajo na tretiranje z rhIL-6. Kljub precejšnji stopnji homologije se namreč primarni zaporedji v človeškem in podganjem IL-6 povsem ujemata le v približno 42 % aminokislinskih ostankov (56). Mišične cevčice L6 smo zato tretirali z 50 ng/mL rhIL-6 od 5 do 60 minut. Ugotovili smo, da rhIL-6 v koncentraciji 50 ng/mL močno aktivira STAT3. Aktivacija STAT3 je naraščala sorazmerno s časom od 5 do 30 minut in dosegla vrh po 30 minutni izpostavljenosti rhIL-6 v koncentraciji 50 ng/mL. Aktivacija STAT3 se je nekoliko zmanjšala, če smo interval tretiranja podganjih mišičnih celic podaljšali na 60 minut (Slika 16), vendar je bila raven pSTAT3 tudi v tem primeru močno povečana. Za razliko od primarnih človeških mišičnih cevčic smo pri tretiranju podganjih cevčic L6 z rhIL-6 opazili aktivacijo (povečanje fosforilacije) ERK1/2, vendar šele po 30-minutni izpostavitvi.



**Slika 16. Aktivnost znotrajceličnih signalnih poti JAK/STAT3 in ERK1/2 v podganjih (L6) mišičnih cevčicah pod vplivom rhIL-6 in/ali tocilizumaba.** Mišične cevčice L6 smo tretirali z 50 ng/mL rhIL-6 ali 0,1 % (w/v) BSA od 5 do 60 minut (A, D, G). V drugi seriji poskusov pa smo mišične cevčice L6 inkubirali 3 ure z ali brez tocilizumaba (10 µg/mL, 100 µg/mL) in jih nato za 15 minut (B, E, H) oziroma za 30 minut (C, F, I) izpostavili rhIL-6 (50 ng/mL) ali samo vehiklu (0,1 % (w/v) BSA). A-C: Odziv pSTAT3 (Tyr<sup>705</sup>) (n = 4). D-F: Odziv pERK1/2 (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) (n = 4). Rezultati denzitometrije so navedeni v arbitramih enotah (AU) kot povprečna vrednost ± SEM. \*P < 0,05 glede na basalno kontrolo (Bazalno), Bonferronijev in Dunnettov post hoc test. G-I: Enakomernost nanosa beljakovinskih vzorcev in uspešnost prenosa na membrano smo preverili z barvilom Ponceau S.

## **7.5 Vpliv tocilizumaba na podganje (L6) skeletnomišične celice**

Potem ko smo ugotovili, da se L6 celice odzivajo na rekombinantni humani IL-6 na podoben način kot človeški mioblasti (53) in mišične cevčice, smo preverili še, ali tocilizumab v mišičnih cevčicah L6 zavira aktivacijo signalne poti JAK/STAT3. Podganje mišične cevčice L6 smo 3 ure inkubirali v prisotnosti ali odsotnosti tocilizumaba (10 µg/mL ali 100 µg/mL) in jih nato 15 ali 30 minut stimulirali z rhIL-6 (Slika 16 B in C). V skladu s prejšnjim poskusom smo ugotovili, da rhIL-6 v koncentraciji 50 ng/mL po 15 oz. 30 minutah močno aktivira STAT3 v podganjih mišičnih celicah, medtem ko smo zmero aktivacijo (povečanje fosforilacije) ERK1/2 opazili samo v 30-minutnem poskusu (Slika 16 F). Tocilizumab v nobenem primeru ni vplival na z rhIL-6 spodbujeno fosforilacijo STAT3 ali ERK1/2. Naši rezultati torej prepričljivo kažejo na to, da tocilizumab ni učinkovit za preprečevanje delovanje IL-6 v podganjih mišičnih cevčicah.

## **8 Razprava**

Do sedaj še ni bilo znano, ali humano monoklonsko protitelo tocilizumab učinkovito prepreči aktivacijo podganjega receptorja za IL-6 (IL-6R $\alpha$ ) v skeletnomišičnih celicah. V naši študiji smo ugotovili, da je vezava tocilizumaba na podganji receptor neučinkovita. Prav tako ni veliko znanega o vplivu tocilizumaba na molekularne mehanizme v človeških skeletnomišičnih celicah in kliničnih učinkih na skeletne mišice pri pacientih, ki redno dobivajo tocilizumab. Da bi bolje razumeli učinke IL-6 na nivoju skeletnomišične celice in skeletnomišičnega tkiva, smo v naši študiji preučevali vpliv tocilizumaba na signalni poti JAK/STAT3 in Ras/Raf/MEK/ERK1/2, ki sta povezani z aktivacijo receptorja za IL-6 in pomembno vplivata na skeletnomišična vlakna.

Ugotovili smo, da tocilizumab v kulturi primarnih mišičnih cevčic popolnoma prepreči z rhIL-6 sproženo povečanje fosforilacije STAT3 (Tyr<sup>705</sup>). Rezultat je skladen s študijami na različnih vrstah imunskih in rakavih celic, kjer je pri tretiranju z IL-6 tocilizumab zavrl fosforilacijo STAT3 (57,58). Aktivacija signalne poti JAK/STAT3 je temeljni dogodek po vezavi IL-6 na IL-6R $\alpha$ , zato naši rezultati jasno kažejo, da tocilizumab učinkovito zavira

oziroma popolnoma prepreči delovanje IL-6 v človeških mišičnih celicah. Učinkovitost tocilizumaba je skladna z izražanjem IL-6R $\alpha$  v človeških mišičnih celicah, ki smo jo pokazali že v predhodnih raziskavah (53). Tocilizumab se veže izključno na receptor IL-6R $\alpha$ , in sicer na topno in membransko obliko tega receptorja, medtem ko se neučinkovito veže na receptorje drugih citokinov gp130 (59). Odsotnost povečanja fosforilacije STAT3 v prisotnosti tocilizumaba kljub visoki koncentraciji rhIL-6 (50 ng/mL) zato nakazuje, da lahko IL-6 sproži JAK/STAT3 v mišičnih celicah le prek receptorja IL-6R $\alpha$ . Ob prisotnosti alternativnega (četudi nizkoafinitetnega) citokinskega receptorja za IL-6 pri izpostavitvi visoki koncentraciji rhIL-6 (50 ng/mL) bi lahko sicer pričakovali vsaj minimalno povečanje fosforilacije STAT3. Razmišljanje v tej smeri podpirajo tudi raziskave, ki kažejo, da je IL-6R $\alpha$  edini receptor za IL-6, četudi se nekateri drugi člani družine gp130 lahko promiskuitetno vežejo na več različnih receptorjev (2,60). Povzamemo lahko torej, da je delovanje rhIL-6 v primarni kulturi človeških skeletnomišičnih celic odvisno od receptorja IL-6R $\alpha$  in da lahko aktivacijo od IL-6 odvisne signalne poti JAK/STAT3 učinkovito zavremo z uporabo tocilizumaba.

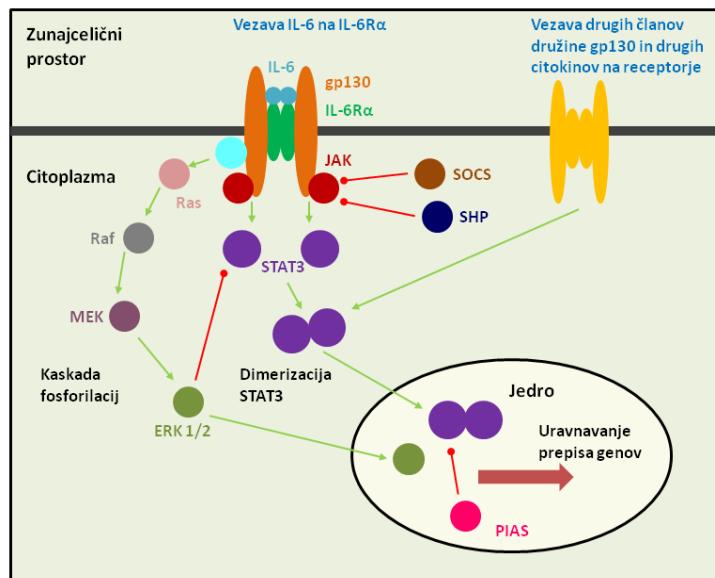
Na podlagi meritev pSTAT3(Tyr<sup>705</sup>) lahko sklepamo, da je bila v primarni kulturi človeških mišičnih cevčic signalna pot JAK/STAT3 dokaj aktivna tudi v bazalnih razmerah. Za razliko od mišičnih cevčic L6 je bila namreč fosforilacija STAT3 tudi v odsotnosti rhIL-6 vedno jasno izražena. Ker primarni človeški mioblasti in cevčice konstitutivno izločajo IL-6 (11), bi basalno fosforilacijo lahko razumeli kot odraz z endogenim IL-6 spodbujene aktivacije IL-6R $\alpha$ . Vendar pa je tretiranje s tocilizumabom pokazalo le (statistično neznačilen) trend k zmanjšanju bazalne fosforilacije STAT3, iz česar lahko sklepamo, da na fosforilacijo STAT3 v mišičnih cevčicah v bazalnih razmerah ne vpliva le signalna pot IL6/IL6R $\alpha$ /gp130, temveč da je odvisna tudi od drugih dejavnikov, na primer od aktivnosti drugih citokinskih receptorjev in specifičnih fosfataz. Fosforilacijo STAT3 poleg IL-6 povečajo tudi različni drugi citokini, kot so IL-2, IL-12, IL-21, IL-22, IL-23, LIF, OSM, CNTF in CT-1 (Razpredelnica 1) (61). Čeprav prisotnosti citokinov nismo objektivno ovrednotili, lahko sklepamo, da so bili v celičnem mediju prisotni vsaj nekateri izmed naštetih citokinov. V preteklosti so namreč na primer že dokazali, da primarne človeške mišične cevčice lahko izločajo LIF (62). Tudi sprememba v okviru aktivnosti fosfataz bi lahko na več ravneh posegla v aktivnost signalne poti JAK/STAT3. Po vezavi IL-6 na IL-6R $\alpha$  pride do fosforilacije

tirozinskih ostankov na tirozinski kinazi JAK in znotrajceličnem področju receptorske podenote gp130, kar privede do fosforilacije STAT3 na Tyr<sup>705</sup>. Omenjeni fosfotirozinski ostanki pa so tarča proteinske fosfataze SHP2 (angl. *SH homology containing tyrosine phosphatase 2*) (28), ki z defosforilacijo ključnih tirozinskih ostankov deluje kot negativni regulator signalne poti JAK/STAT3. Če se aktivnost SHP2 zmanjša, bi zato tudi ob nespremenjenem delovanju IL-6 na ravni vezave na receptor lahko pričakovali povečano raven pSTAT3.

Poleg fosfataz so na ravni receptorja gp130 in tirozinske kinaze JAK pomembni negativni regulatorji tudi pripadniki družine zaviralcev citokinov (SOCS; angl *suppressor of cytokine signaling*) (28), ki z vezavo na fosfotirozinske ostanke zmanjšajo aktivnost kinaze JAK. Na aktivnost JAK/STAT3 pa vplivajo tudi druge signalne poti (Slika 17). Dimerizacijo STAT3 na primer zmanjšuje aktivirana kinaza ERK1/2, translokacijo v jedro in aktivacijo genov pa proteinski inhibitorji aktiviranih STAT (PIAS; angl. *protein inhibitors of activated STAT*) (25) (Slika 17). Ker med inkubacijo v odsotnost seruma prihaja do velikih sprememb v aktivnosti ERK1/2 v mišičnih cevčicah (63), lahko sklepamo, da je kinza ERK1/2 tudi neposredno in neodvisno od IL-6 vplivala na aktivnost poti JAK/STAT3. Kot sem že omenila, pa si dejstva, da pri tretiranju s tocilizumabom ni prišlo do večjega zmanjšanja bazalne fosforilacije STAT3, ne moramo razložiti s promiskuitetno vezavo IL-6 na kakšen drug citokinski receptor. Iz teh podatkov bi lahko sklepali, da bazalna fosforilacija STAT3 v primarnih človeških mišičnih cevčicah ni izključno odraz aktivacije z endogenim IL-6, saj nanjo vplivajo tudi drugi citokini in morebitne spremembe v aktivnosti fosfataz in različnih drugih negativnih regulatorjev, medtem ko je močna aktivacija (povečanje fosforilacije) STAT3 pri tretiranju z rhIL-6 (50 ng/mL) zagotovo posledica specifične vezave IL-6 na IL6R $\alpha$ .

### Slika 17. Signalna pot JAK/STAT3 in njena regulacija.

Signalno pot JAK/STAT3 poleg IL-6 prek svojih receptorjev aktivirajo tudi drugi predstavniki družine gp130 in različni drugi citokini. Obenem na aktivnost JAK/STAT3 vpliva tudi aktivnost fosfataz (npr. SHP2), ki defosforilirajo ključne tirozinske ostanke kinaze JAK in drugih signalnih molekul. Aktivnost kinaze JAK zmanjšajo tudi zaviralci citokinov SOCS. Poleg tega dimerizacija STAT3 zmanjšuje kinaza ERK1/2, translokacijo v jedro in aktivacijo genov pa proteinski inhibitorji aktiviranih STAT (PIAS).



V podganjih (L6) mišičnih celicah je pri tretiranju z rhIL-6 prišlo do hitre in skokovite aktivacije signalne poti JAK/STAT3, ki je dosegla vrh po 30 minutah. Podobna rezultate smo v predhodnih raziskavah dobili tudi v kulturi človeških mišičnih celic (53). Rezultati so skladni tudi s poskusi na primarnih nevronih miši, ki so jih Park in sodelavci tretirali z IL-6 v kombinaciji s topno obliko IL-6R $\alpha$  v različnih časovnih intervalih. S specifično imunodetekcijo so ugotovili, da je fosforilacija STAT3 najučinkovitejša po 30 minutah. V primeru daljšega tretiranja (1 do 4 ure) z IL-6 in topno obliko IL-6R (sIL-6R) pa je bila fosforilacija manj izrazita (64). Enako časovno dinamiko odziva na IL-6 so opazili tudi Lee in sodelavci, ki so pri stimulaciji človeških celic kolorektalnega raka z IL-6 maksimalni signal pSTAT3 izmerili po 30 minutah (65). Zaključimo lahko torej, da gre pri odzivu signalne poti JAK/STAT3 med izpostavitvijo IL-6 za biološko konzervativen odgovor, ki se po svoji hitrosti in časovni dinamiki le malo razlikuje tako med različnimi vrstami celic kot tudi med različnimi vrstami (species).

Povsem drugačen pa je bil odziv na ravni signalne poti ERK1/2, kjer smo povečanje fosforilacije ERK1/2 pod vplivom rhIL-6 opazili le pri podganjih (L6) mišičnih celicah, ki smo jih izpostavili rhIL-6 za 30 ali 60 minut. Na prvi pogled je rezultat nekoliko presenetljiv, saj je aktivacija signalne poti Ras/Raf/MEK/ERK1/2 eden od temeljnih dogodkov pri

aktivaciji receptorja za IL-6 (1). Poleg tega se primarne človeške mišične cevčice in podganje celice L6 po svojem odzivu na ravni STAT3 niso bistveno razlikovale po medsebojnih značilnostih. Verjetno lahko razlog za opažene razlike bolj kot v bioloških posebnostih testiranih celic iščemo v časovnem intervalu izpostavljenosti rhIL-6. Poskusi na mišičnih cevčicah L6 so namreč pokazali aktivacijo kinaze ERK1/2 le pri izpostavitvah daljših od 15 minut, v primeru poskusov na človeških mišičnih cevčicah smo celice z rhIL-6 tretirali le 15 minut. Najverjetnejši vzrok, da nismo opazili povečane fosforilacije ERK1/2 z rhIL-6 v človeških mišičnih cevčicah je torej prekratka inkubacija z IL-6. Razmišljanje v tej smeri podpirajo tudi rezultati študije na človeških gladkomišičnih celicah aorte, pri katerih so izmerili povečanje fosforilacije ERK1/2 po najmanj 1-urni izpostavitvi IL-6 (66). Na podlagi naših rezultatov in omenjenih študij v drugih laboratorijih lahko povzamemo, da se časovno okno za aktivacijo različnih znotrajceličnih signalnih poti pod vplivom IL-6 razlikuje.

Tocilizumab na fosforilacijo ERK1/2 v človeških mišičnih cevčicah ni vplival niti v bazalnih pogojih niti pod vplivom rhIL-6, čeprav bi zaradi povezave med signalnim receptorskim kompleksom IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130 in aktivacijo signalne poti ERK1/2 zmanjšanje fosforilacije, vsaj v manjši meri, lahko pričakovali. Tako pričakovanja podpirajo tudi rezultati raziskave na celicah ledvičnega karcinoma, pri katerih so Oguro in sodelavci dokazali, da tocilizumab inhibira fosforilacijo tako STAT3 kot tudi ERK1/2 (37). Čeprav je povezava med delovanjem IL-6 in ERK1/2 nesporna, bi naša opažanja lahko razložili z obstojem številnih drugih (relativno) pomembnejših aktivatorjev (npr. rastnih dejavnikov, drugi citokinov) kaskade fosforilacij Ras/Raf/MEK, ki privede do povečanja aktivnosti kinaze ERK1/2. Pri bolj celostnem pogledu na delovanje signalne poti Ras/Raf/MEK/ERK1/2, namreč hitro postane očitno, da z IL-6 posredovana aktivacija predstavlja le manjši segment v globalni regulaciji te signalne poti. Ker je imel v bazalnih razmerah tocilizumab le marginalen vpliv že na signalno pot JAK/STAT3, torej glede na kompleksnost signalne poti Ras/Raf/MEK/ERK1/2 ni preveč presenetljivo, da pri izpostavitvi tocilizumabu nismo opazili zmanjšanja fosforilacije ERK1/2. Poleg kompleksnosti uravnavanja delovanja ERK1/2 lahko razloge iščemo tudi v času izpostavitve IL-6. Kratka (15-minutna) tretiranja smo namreč izbrali, ker v tem časovnem oknu doseže vrh odziv na ravni fosforilacije STAT3. Če pa bi želeli bolj natančno opredeliti, v kakšni meri tocilizumab zmanjša aktivacijo ERK1/2 v

človeških mišičnih celicah, bi bilo potrebno podaljšati časovni interval izpostavljenosti rhIL-6 vsaj na 30 minut.

Čeprav je tocilizumab v kulturah primarnih človeških mišičnih cevčic konsistentno preprečil povečanje fosforilacije STAT3 pod vplivom rhIL-6, pa so se med celicami različnih donorjev jasno pokazale razlike v bazalni fosforilaciji STAT3 in še posebej pri odzivu na rhIL-6. Razlog za različno odzivnost človeških mišičnih celic na rhIL-6 in tocilizumab je v biološki variabilnosti, ki je poleg manjše dostopnosti in počasnejše rasti ena glavnih slabosti človeških primarnih kultur. Gledano na splošno biološko variabilnost pogojujeta genska variabilnost in dejavniki okolja. Genska variabilnost vključuje razlike v zaporedju nukleotidov (polimorfizmi, mutacije), ki se odražajo v različni odzivnosti na farmakoterapijo in različni nagnjenosti k razvoju določenih bolezni (67). Dejavniki okolja, kot so starost, bolezni, druga zdravila, hrana, telesna aktivnost, kajenje in stres pa še dodatno povečajo razlike med donorji. Seveda pa ne smemo pozabiti, da so človeške primarne kulture kljub nekaterim pomanjkljivostim med bolj primernimi modeli za preučevanje molekularnobioloških lastnosti skeletne mišice *in vitro*, saj so rezultati pridobljeni na teh celicah najbolj primerljivi z dejanskim stanjem v organizmu. Odzivi primarnih človeških celic se namreč v mnogočem razlikujejo od mišičnih celic različnih živalskih celičnih linij (63,68). Dodatna prednost dela s človeškimi mišičnimi celicami pa je ta, da v tem modelu lahko preučujemo delovanje humaniziranih protiteles in različnih drugih učinkovin, ki so specifično usmerjene proti človeškim beljakovinam ali nukleinskim kislinam (npr. različne male interferenčne RNA). Pri preučevanju tovrstnih učinkovin lahko namreč vrstna specifičnost predstavlja nepremostljivo oviro za uporabo živalskih celičnih linij.

Učinkovitost tocilizumaba, humaniziranega monoklonskega protitelesa proti IL-6R $\alpha$ , v podganjih mišičnih celicah bi nam močno olajšala raziskovalno delo pri preučevanju molekularnih mehanizmov delovanja IL-6, saj so celice L6 mnogo lažje dostopne in jih je lažje gojiti od primarnih človeških mišičnih celic. V podganjih celicah L6 je na primer rekombinantni humani IL-6 (rhIL-6), kljub nizki stopnji homologije (42 %) med podganjim in človeškim IL-6 (56), močno aktiviral signalno pot JAK/STAT3. Naš rezultat je skladen s predhodnimi raziskavami (69). V nasprotju s humanim rekombinantnim IL-6 pa tocilizumab v podganjih (L6) mišičnih celicah ni imel učinka fosforilacijo STAT3. Učinkov tocilizumaba v

kulti podganjih mišičnih celic po nam dostopnih podatkih do sedaj še niso preučevali, vendar smo o možni učinkovitosti tocilizumaba sklepali na podlagi dejstva, da podganji receptor IL-6R $\alpha$ , v primerjavi z IL-6 (42 %), kaže večjo stopnjo homologije (>50 %) s človeškim IL-6R $\alpha$ . Kljub neučinkovitosti tocilizumaba proti mišjemu IL-6R $\alpha$  so razmišljanje v tej smeri podpirali tudi rezultati imunohistokemične raziskave, ki je pokazala navzkrižno reaktivnost med tocilizumabom in nekaterimi podganjimi tkivi (70). Mišji in podganji IL-6R $\alpha$  sta si zelo podobna, vendar bi že manjše razlike v področju, ki je homologno epitopu na človeškem IL-6R $\alpha$ , lahko pojasnile razliko v reaktivnosti tocilizumaba. Nenazadnje pa so tudi protitelesa proti TNF- $\alpha$  (etanercept in infliksimab) učinkovita tako pri človeku kot pri podgani (71,72).

Ob odsotnosti učinkov tocilizumaba v podganjih celicah smo zato sprva podvomili v biološko aktivnost uporabljenega tocilizumaba. Njegova neučinkovitost bi lahko bila na primer posledica neprimernega shranjevanja. Da bi preverili to možnost, smo za poskus na podganjih in človeških mišičnih cevčicah uporabili tocilizumab iz iste viale. Ker je tocilizumab deloval le v poskusu s človeškimi mišičnimi cevčicami, lahko z veliko gotovostjo trdimo, da tocilizumab nima izražene afinitete do podganjega IL-6R $\alpha$ , oziroma je njegova afiniteta tako nizka, da je kljub uporabljeni visoki koncentraciji neučinkovit pri zaviranju delovanja IL-6. Medtem ko je bila množinska koncentracija IL-6 približno 2,4 nmol/L, je bila namreč najvišja uporabljeni koncentracija tocilizumaba približno 676 nmol/L. Ob takšnem prebitku protitelesa in ob relativno šibkem izražanju IL-6R $\alpha$  (neobjavljena opažanja v našem laboratoriju), bi namreč tudi ob nizki afiniteti do podganjega IL-6R $\alpha$  lahko pričakovali vsaj manjši zaviralni učinek. V človeških mišičnih cevčicah je bil na primer učinek tocilizumaba maksimalno izražen že pri 10-krat nižji koncentraciji (t.j. 67,6 nmol/L). Gledano v celoti so naši rezultati povsem skladni s poskusi na podganjih limfocitih T, pri katerih tocilizumab ni preprečil delovanja IL-6 (73). Neučinkovitost tocilizumaba je najverjetneje posledica razlik v aminokislinskem zaporedju v področju, ki je homologno epitopu na človeškem IL-6R $\alpha$  (73). Zaključimo lahko torej, da je tocilizumb kot zaviralec delovanja IL-6 v podganjih mišičnih cevčicah povsem neučinkovit. Poleg tega lahko sklepamo, da je pozitivna imunohistokemična reakcija tocilizumaba z nekaterimi podganjimi tkivi, bodisi odraz funkcijsko nepomembne

vezave na podganji IL-6R $\alpha$  ali zgolj lažno pozitivna reakcija zaradi vezave na kakšen drug (neprepoznan) antigen.

Homogenizacija celičnih lizatov je rutinski postopek, ki spreminja eksperimentalno delo celičnih laboratorijskih rezultatov. Kljub temu ni samoumevno, da je postopek vedno povsem primeren in da so na takšen način pridobljeni rezultati pravilni, še posebej, če zaradi izgub beljakovin v sedimentu izvajamo analize na nereprezentativnem vzorcu beljakovin. Naši poskusi so na primer pokazali, da je standardni postopek homogenizacije lizatov celic manj primeren za izolacijo aktina, ki je pomembna in pogosto uporabljen endogena kontrola pri analizi izražanja beljakovin z odtisom western. Večja uspešnost izolacije signalnih beljakovin (STAT3 in ERK1/2) in glikolitičnega encima GAPDH je verjetno izhajala predvsem iz dejstva, da za razliko od aktina ne tvorijo slabše topnih filamentoznih struktur. Aktin je namreč citoskeletna beljakovina, ki sestavlja mikrofilamente, in se zaradi globularne strukture koloidno raztopljanja v vodi. Kljub poskusom izboljšanja protokola, se je izolacija aktina samo še dodatno poslabšala. Vzroki zato so lahko različni, na primer tvorba agregatov zaradi slabe topnosti v homogenizacijskem pufru. Poleg tega je nizka temperatura inkubacije, ki je bila s stališča ohranitve beljakovinske strukture in preprečevanja proteolitičnih sprememb nujno potrebna, lahko še povečala težnjo po agregaciji in izobarjanju aktina, ki je zato v veliki meri ostal v sedimentu. Zaradi težav v zvezi s ponovljivostjo in uspešnostjo izolacije aktina smo kot endogeno kontrolo raje uporabili GAPDH, pri katerem podobnih težav nismo opazili. Zaradi morebitnih nepredvidenih vplivov na izražanje GAPDH smo kot dodatno kontrolu uporabili še celokupni STAT3 in barvanje z barvilom Ponceau S. Zaključimo lahko, da z uporabljenim postopkom priprave vzorcev skupaj z uporabo več različnih kontrol nanosa vzorcev na gel in prenosa vzorcev na membrano, nismo vnesli sistematične napake, ki bi bistveno vplivala na interpretacijo naših rezultatov.

Naša študija je bila v celoti narejena na skeletnomišičnih celicah v kulturi, kar je omogočilo izvajanje poskusov v dobro opredeljenih eksperimentalnih razmerah. Čeprav je kultura mišičnih cevčic pogosto uporabljen model za preučevanje delovanja skeletne mišice *in vitro*, pa je vendarle potrebno izpostaviti, da so mišične cevčice nezrela razvojna oblika mišičnega vlakna, ki po svojih fenotipskih značilnostih ni istovetna z zrelim mišičnim vlaknom. To pomanjkljivost bi lahko zaobšli tako, da bi raziskavo nadgradili s poskusi na

izoliranih mišičnih vlaknih človeka ali izolirani skeletni mišici podgane. Podobno kot v našem modelu pa tudi v tem primeru ne bi mogli v analizo vključiti sistemskih dejavnikov, ki pomembno vplivajo in sooblikujejo dogajanje v skeletni mišici. Poleg tega s takšnimi poskusmi ne bi mogli ovrednotiti kroničnih učinkov spremenjenega signaliziranja IL-6. Pri bolnikih s kronično povišano ravnjo IL-6 pride namreč do dinamičnih sprememb tudi na ravni drugih regulatorjev signalne poti JAK/STAT3 (npr. SOCS, SHP2), zato je na podlagi akutnih poskusov v celičnih kulturah ali izoliranih organih nemogoče napovedovati, kakšne učinke bi imel tocilizumab v teh razmerah. Kompleksnejša in fiziološko najbolj relevantna ocena vpliva tocilizumaba na skeletno mišico bi zato bila mogoča samo v poskusu pri človeku, ki bi za analizo signalnih poti morala vključevati tudi mišično biopsijo.

Kljub pomanjkljivostim oziroma omejitvam našega pristopa lahko na podlagi naših rezultatov naredimo nekaj previdnih ekstrapolacij. V poskusih na človeških mišičnih cevčicah smo na primer inhibicijski učinek tocilizumaba na fosforilacijo STAT3 opazili pri stimulaciji z IL-6, ne pa tudi v bazalnih razmerah. Ker je v mirovanju izražanje IL-6 v skeletni mišici tudi *in vivo* relativno nizko, bi na podlagi naših rezultatov lahko morda sklepali, da tocilizumab nima pomembnih neugodnih učinkov na skeletno mišico v mirovanju. Po drugi strani pa smo pokazali, da pri akutnem povišanju koncentracije IL-6 tocilizumab prepreči povečanje fosforilacije STAT3. Na podlagi tega lahko predvidevamo, da bi bili pri akutnem povečanju nastajanja IL-6 v skeletni mišici učinki tocilizumaba tudi *in vivo* bistveno bolj izraženi. Tocilizumab bi na primer lahko zavrl učinke IL-6 med telesnim naporom, ko njegova koncentracija skokovito naraste v skeletni mišici in v plazmi (do 100-krat).

Na koncu se moramo še vprašati, kakšen bi lahko bile fiziološke posledice zaviranja delovanja IL-6 v skeletni mišici. Serrano in sodelavci so na primer pokazali, da je pri miših z izbitim genom za IL-6 (IL-6<sup>-/-</sup>) prizadeta mišična hipertrofija, kar so pripisali predvsem okrnjeni proliferaciji mioblastov. Tudi pri tretiranju mišičnih celic C2C12 z AG490, specifičnim inhibitorjem signalne poti STAT3, so opazili zmanjšano celično proliferacijo (42). Na podlagi tega bi lahko sklepali, da tocilizumab pri človeku lahko zmanjša mišično regeneracijo ali hipertrofijo. Vendar odgovor ni tako enoznačen, kot se zdi na prvi pogled. White in sodelavci so namreč dokazali, da odsotnost IL-6 kljub nenormalnim spremembam v zunajceličnem matrikuisu in zmanjšanemu izražanju MyoD, ki je specifičen kazalec

proliferacije mioblastov, ne prepreči hipertrofije mišičnih vlaken (74). Poleg tega je pri IL-6 -/- miših obseg mišične hipertrofije normalen, čeprav pride v odsotnosti IL-6 do motenj v najzgodnejših fazah hipetrofičnega odgovora (52). Seveda pri tovrstnem razmišljjanju o možnih učinkih tocilizumaba ne smemo pozabiti, da tocilizumaba ne prejemajo zdravi ljudje, temveč bolniki z vnetnimi revmatološkimi boleznimi, pri katerih je izločanje IL-6 že zaradi osnovne bolezni iztirjeno. Čeprav se pri bolnikih, ki prejemajo tocilizumab, lahko pojavijo presnovni odkloni (npr. hipertrigliceridemija, hiperholesterolemija) (36), pa v takšnih razmerah verjetno kljub vsemu tudi s stališča presnove skeletne mišice prevladajo pozitivne posledice zaviranja (nenormalnega) delovanja IL-6 (75). Podobno kompleksno razmerje med IL-6 in tocilizumabom zato lahko pričakujemo tudi na ravni mišične regeneracije in/ali hipertrofije. Povzamemo lahko torej, da bi tocilizumab lahko pomembno vplival na določene fiziološke procese v skeletni mišici, vendar bi za dokončno opredelitev in ovrednotenje tovrstnih učinkov morali narediti študijo pri človeku.

## 9 Sklep

- 1.Ugotovili smo, da tocilizumab v kulturi primarnih mišičnih cevčic popolnoma prepreči z rhIL-6 sproženo povečanje fosforilacije STAT3 (Tyr<sup>705</sup>), s čemer smo potrdili prvo hipotezo.
- 2.Po 15 minut izpostavljenosti rhIL-6 v kulturi primarnih mišičnih cevčic nismo opazili povečanja fosforilacije ERK1/2, zato ne moramo opredeliti vpliva tocilizumaba na signalno pot ERK1/2 med inkubacijo z rhIL-6.
- 3.Ugotovili smo, da se tocilizumab ne veže na podganji receptor IL-6Ra oziroma da je morebitna vezava funkcijsko nepomembna. Rezultati torej ne podpirajo naše tretje hipoteze in zaključimo lahko, da kultura podganjih skeletnomišičnih cevčic ni primerna za preučevanje molekularnih mehanizmov IL-6 s tocilizumabom.

Kljub temu, da nismo zaznali sprememb fosforilacije ERK1/2 pod vplivom IL-6 in/ali tocilizumaba, puščamo drugo hipotezo odprto. V podganjih (L6) mišičnih cevčicah smo namreč opazili povečanje fosforilacije ERK1/2 šele po 30- ali 60-minutni izpostavitvi rhIL-6.

Najverjetnejši vzrok, da nismo opazili vpliva rhIL-6 in/ali tocilizumaba na fosforilacijo ERK1/2, je torej prekratka inkubacija z IL-6. Za dokončno opredelitev teze, ali (in v kakšni meri) tocilizumab vpliva na aktivacijo ERK1/2, bodo na človeških mišičnih celicah potrebni dodatni poskusi z daljšimi inkubacijskimi časi.

## 10 Literatura

1. Jawa RS, Anillo S, Huntoon K, Baumann H, Kulaylat M. Analytic review: Interleukin-6 in surgery, trauma, and critical care: part I: basic science. *J Intensive Care Med.* 2011 Feb;26(1):3–12.
2. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2012 Jun;23(3):85–97.
3. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* 2010 May 1;22(5):347–52.
4. Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, et al. B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J Exp Med.* 1988 Mar 1;167(3):1253–8.
5. Tsujinaka T, Fujita J, Ebisui C, Yano M, Kominami E, Suzuki K, et al. Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice. *J Clin Invest.* 1996 Jan 1;97(1):244–9.
6. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Aug;8(8):457–65.
7. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscle as an Endocrine Organ: Focus on Muscle-Derived Interleukin-6. *Physiol Rev.* 2008 Oct 1;88(4):1379–406.
8. Febbraio MA, Pedersen BK. Contraction-induced myokine production and release: is skeletal muscle an endocrine organ? *Exerc Sport Sci Rev.* 2005 Jul;33(3):114–9.
9. Pedersen BK, Åkerström TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol.* 2007 Sep 1;103(3):1093–8.
10. Friedland JS, Suputtamongkol Y, Remick DG, Chaowagul W, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Prolonged elevation of interleukin-8 and interleukin-6 concentrations in plasma and of leukocyte interleukin-8 mRNA levels during septicemic and localized *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Infect. Immun.* 1992 Jun;60(6):2402–8.

11. Prelovsek O, Mars T, Jevsek M, Podbregar M, Grubic Z. High dexamethasone concentration prevents stimulatory effects of TNF- $\alpha$  and LPS on IL-6 secretion from the precursors of human muscle regeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Dec 1;291(6):R1651–R1656.
12. Terry CF, Loukaci V, Green FR. Cooperative Influence of Genetic Polymorphisms on Interleukin 6 Transcriptional Regulation. *J. Biol. Chem.* 2000 Jun 16;275(24):18138–44.
13. Libermann TA, Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor. *Mol Cell Biol.* 1990 May;10(5):2327–34.
14. Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol.* 2000 Oct 1;528(1):157–63.
15. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 2002 Sep 1;16(11):1335–47.
16. Pedersen BK. Muscular interleukin-6 and its role as an energy sensor. *Med Sci Sports Exerc.* 2012 Mar;44(3):392–6.
17. Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J Physiol.* 1998 May 1;508(3):949–53.
18. Fiedler B, Wollert KC. Interference of antihypertrophic molecules and signaling pathways with the Ca<sup>2+</sup>–calcineurin–NFAT cascade in cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 2004 Aug 15;63(3):450–7.
19. Hemish J, Nakaya N, Mittal V, Enikolopov G. Nitric Oxide Activates Diverse Signaling Pathways to Regulate Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 2003 Oct 24;278(43):42321–9.
20. Pilz RB, Broderick KE. Role of cyclic GMP in gene regulation. *Front. Biosci.* 2005;10:1239–68.
21. Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, et al. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science.* 1993 Jun 18;260(5115):1808–10.
22. Bravo J, Heath JK. Receptor recognition by gp130 cytokines. *The EMBO Journal.* 2000 Jun 1;19(11):2399–411.
23. Dekkers PEP, Juffermans NP, Hove T ten, Jonge E de, Deventer SJH van, Poll T van der. Endotoxin Down-Regulates Monocyte and Granulocyte Interleukin-6 Receptors without Influencing gp130 Expression in Humans. *J Infect Dis.* 2000 Mar 1;181(3):1055–61.

24. Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 1997;15:797–819.
25. Ernst M, Jenkins BJ. Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130. *Trends in Genetics.* 2004 Jan;20(1):23–32.
26. Levy DE, Lee C. What does Stat3 do? *J Clin Invest.* 2002 May 1;109(9):1143–8.
27. Xu Y, Ikegami M, Wang Y, Matsuzaki Y, Whitsett JA. Gene expression and biological processes influenced by deletion of Stat3 in pulmonary type II epithelial cells. *BMC Genomics.* 2007 Dec 10;8:455.
28. Nicholson SE, Metcalf D, Sprigg NS, Columbus R, Walker F, Silva A, et al. Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-5 is a potential negative regulator of epidermal growth factor signaling. *PNAS.* 2005 Feb 15;102(7):2328–33.
29. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1999;71(3-4):479–500.
30. Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 1999 Jan;79(1):143–80.
31. Benziane B, Chibalin AV. Frontiers: Skeletal muscle sodium pump regulation: a translocation paradigm. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2008 Sep 1;295(3):E553–E558.
32. Kotova O, Al-Khalili L, Talia S, Hooke C, Fedorova OV, Bagrov AY, et al. Cardiotonic Steroids Stimulate Glycogen Synthesis in Human Skeletal Muscle Cells via a Src- and ERK1/2-dependent Mechanism. *J. Biol. Chem.* 2006 Jul 21;281(29):20085–94.
33. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. *Ann. Rheum. Dis.* 1993 Mar;52(3):232–4.
34. Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, Takeuchi T, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum.* 2004 Jun;50(6):1761–9.
35. Genovese MC, McKay JD, Nasonov EL, Mysler EF, da Silva NA, Alecock E, et al. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab reduces disease activity in rheumatoid arthritis with inadequate response to disease-modifying antirheumatic drugs: The tocilizumab in combination with traditional disease-modifying antirheumatic drug therapy study. *Arthritis & Rheumatism.* 2008;58(10):2968–80.
36. Febbraio MA, Rose-John S, Pedersen BK. Is interleukin-6 receptor blockade the Holy Grail for inflammatory diseases? *Clin. Pharmacol. Ther.* 2010 Apr;87(4):396–8.

37. Oguro T, Ishibashi K, Sugino T, Hashimoto K, Tomita S, Takahashi N, et al. Humanised antihuman IL-6R antibody with interferon inhibits renal cell carcinoma cell growth in vitro and in vivo through suppressed SOCS3 expression. *Eur. J. Cancer.* 2012 Dec 26;
38. Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.* 2010 May 1;22(5):347–52.
39. Chargeé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol. Rev.* 2004 Jan;84(1):209–38.
40. Austin L, Bower J, Kurek J, Vakakis N. Effects of leukaemia inhibitory factor and other cytokines on murine and human myoblast proliferation. *J. Neurol. Sci.* 1992 Oct;112(1-2):185–91.
41. Al-Khalili L, Bouzakri K, Glund S, Lönnqvist F, Koistinen HA, Krook A. Signaling specificity of interleukin-6 action on glucose and lipid metabolism in skeletal muscle. *Mol. Endocrinol.* 2006 Dec;20(12):3364–75.
42. Serrano AL, Baeza-Raja B, Perdiguero E, Jardí M, Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. *Cell Metab.* 2008 Jan;7(1):33–44.
43. Tisdale MJ. Cancer cachexia. *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2010 Mar;26(2):146–51.
44. Weigert C, Hennige AM, Lehmann R, Brodbeck K, Baumgartner F, Schaüble M, et al. Direct Cross-talk of Interleukin-6 and Insulin Signal Transduction via Insulin Receptor Substrate-1 in Skeletal Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 2006 Mar 17;281(11):7060–7.
45. Penkowa M, Keller C, Keller P, Jauffred S, Pedersen BK. Immunohistochemical detection of interleukin-6 in human skeletal muscle fibers following exercise. *FASEB J* [Internet]. 2003 Sep 4 [cited 2012 Oct 23]; Available from: <http://www.fasebj.org/content/early/2003/11/04/fj.03-0311fje>
46. Gabay C, Smith MF, Eidlen D, Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) is an acute-phase protein. *J. Clin. Invest.* 1997 Jun 15;99(12):2930–40.
47. Petersen AMW, Pedersen BK. The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol.* 2005 Apr 1;98(4):1154–62.
48. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *J Clin Invest.* 1998 Oct 1;102(7):1369–76.
49. Morley JE, Baumgartner RN, Roubenoff R, Mayer J, Nair KS. Sarcopenia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 2001 Apr;137(4):231–43.

50. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 2002 Dec;51(12):3391–9.
51. Senn JJ, Klover PJ, Nowak IA, Mooney RA. Interleukin-6 Induces Cellular Insulin Resistance in Hepatocytes. *Diabetes*. 2002 Dec 1;51(12):3391–9.
52. Washington TA, White JP, Davis JM, Wilson LB, Lowe LL, Sato S, et al. Skeletal muscle mass recovery from atrophy in IL-6 knockout mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011 Aug;202(4):657–69.
53. Molekularni mehanizmi signaliziranja IL-6 pri regeneraciji človeške skeletne ... - Katarina Gros - Google Books [Internet]. [cited 2013 Apr 6]. Available from: <http://books.google.si/books?id=Nr1fMwEACAAJ&dq=inauthor:%22Katarina+Gros%22&hl=en&sa=X&ei=XIBgUaOeJIil4ASmjYGQBg&ved=0CCsQ6AEwAA>
54. Pirkmajer S, Filipovic D, Mars T, Mis K, Grubic Z. HIF-1alpha response to hypoxia is functionally separated from the glucocorticoid stress response in the in vitro regenerating human skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010 Dec;299(6):R1693–1700.
55. Bannur SV, Kulgod SV, Metkar SS, Mahajan SK, Sainis JK. Protein Determination by Ponceau S Using Digital Color Image Analysis of Protein Spots on Nitrocellulose Membranes. *Analytical Biochemistry*. 1999 Feb 15;267(2):382–9.
56. St-Laurent G, Archambault D. Molecular cloning, phylogenetic analysis and expression of beluga whale (*Delphinapterus leucas*) interleukin 6. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000 Jan 31;73(1):31–44.
57. Betts BC, Angelo ETS, Kennedy M, Young JW. Anti-IL6-receptor-alpha (tocilizumab) does not inhibit human monocyte-derived dendritic cell maturation or alloreactive T-cell responses. *Blood*. 2011 Nov 10;118(19):5340–3.
58. Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, et al. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5426–34.
59. Mihara M, Kasutani K, Okazaki M, Nakamura A, Kawai S, Sugimoto M, et al. Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mIL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family. *International Immunopharmacology*. 2005 Nov;5(12):1731–40.
60. McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, et al. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J. Immunol.* 2010 Jun 15;184(12):7219–28.

61. O'Shea JJ, Steward-Tharp SM, Laurence A, Watford WT, Wei L, Adamson AS, et al. Signal transduction and Th17 cell differentiation. *Microbes and Infection*. 2009 Apr;11(5):599–611.
62. Broholm C, Laye MJ, Brandt C, Vadalaletty R, Pilegaard H, Pedersen BK, et al. LIF is a contraction-induced myokine stimulating human myocyte proliferation. *J. Appl. Physiol.* 2011 Jul;111(1):251–9.
63. Pirkmajer S, Chibalin AV. Serum starvation: caveat emptor. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 2011 Aug;301(2):C272–279.
64. Park KW, Nozell SE, Benveniste EN. Protective Role of STAT3 in NMDA and Glutamate-Induced Neuronal Death: Negative Regulatory Effect of SOCS3. *PLoS One* [Internet]. 2012 Nov 30 [cited 2013 Jan 13];7(11). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3511325/>
65. Lee MJ, Lee J-K, Choi JW, Lee C-S, Sim JH, Cho C-H, et al. Interleukin-6 Induces S100A9 Expression in Colonic Epithelial Cells through STAT3 Activation in Experimental Ulcerative Colitis. *PLoS One* [Internet]. 2012 Sep 4 [cited 2013 Jan 13];7(9). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3433486/>
66. Li L, Zhang K, Cai X-J, Feng M, Zhang Y, Zhang M. Adiponectin upregulates prolyl-4-hydroxylase  $\alpha$ 1 expression in interleukin 6-stimulated human aortic smooth muscle cells by regulating ERK 1/2 and Sp1. *PLoS ONE*. 2011;6(7):e22819.
67. Čelhar Teja, Ferk Polonca, Mlinarič-Raščan Irena. Genetska raznolikost kot osnova uporabnosti farmakogenomike v klinični praksi. *Farmacevtski vestnik* [Internet]. 2007;58(4). Available from: <http://www.dlib.si/details/URN:NBN:SI:DOC-3LBR8K30/>
68. Gajsek N, Jevsek M, Mars T, Mis K, Pirkmajer S, Breclj J, et al. Synaptogenetic mechanisms controlling postsynaptic differentiation of the neuromuscular junction are nerve-dependent in human and nerve-independent in mouse C2C12 muscle cultures. *Chem. Biol. Interact.* 2008 Sep 25;175(1-3):50–7.
69. Moran DM, Mayes N, Koniaris LG, Cahill PA, McKillop IH. Interleukin-6 inhibits cell proliferation in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2005 Apr;25(2):445–57.
70. Paul C. Brown. Pharmacology review(s), Application number 125276 [Internet]. Center for drug evaluation and research; 2009. Available from: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2010/125276s000PharmR.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2010/125276s000PharmR.pdf)
71. Chio C-C, Chang C-H, Wang C-C, Cheong C-U, Chao C-M, Cheng B-C, et al. Etanercept attenuates traumatic brain injury in rats by reducing early microglial expression of tumor necrosis factor-alpha. *BMC Neuroscience*. 2013 Mar 15;14(1):33.

72. Onda A, Murata Y, Rydevik B, Larsson K, Kikuchi S, Olmarker K. Infliximab attenuates immunoreactivity of brain-derived neurotrophic factor in a rat model of herniated nucleus pulposus. *Spine*. 2004 Sep 1;29(17):1857–61.
73. Okazaki M, Yamada Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Mihara M. Characterization of anti-mouse interleukin-6 receptor antibody. *Immunol. Lett.* 2002 Dec 3;84(3):231–40.
74. White JP, Reecy JM, Washington TA, Sato S, Le ME, Davis JM, et al. Overload-induced skeletal muscle extracellular matrix remodelling and myofibre growth in mice lacking IL-6. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009 Dec;197(4):321–32.
75. Schultz O, Oberhauser F, Saech J, Rubbert-Roth A, Hahn M, Krone W, et al. Effects of inhibition of interleukin-6 signalling on insulin sensitivity and lipoprotein (a) levels in human subjects with rheumatoid diseases. *PLoS ONE*. 2010;5(12):e14328.

---

1 [http://meddic.jp/interleukin-6\\_receptor](http://meddic.jp/interleukin-6_receptor), 15.10.2012

2 [http://www.nature.com/emboj/journal/v16/n5/fig\\_tab/7590092a\\_F4.html](http://www.nature.com/emboj/journal/v16/n5/fig_tab/7590092a_F4.html), 21.10.2012

3 [http://www.roche.com/media/media\\_releases/med-cor-2010-01-11.htm](http://www.roche.com/media/media_releases/med-cor-2010-01-11.htm), 25.10.2012

4 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016561471100112X>, 21.4.2013

5 <http://blog.labplanet.com/2011/01/03/electrophoresis/>, 15.10.2012

6 <http://www.abcam.com/index.html?pageconfig=resource&rid=13045>, 15.10.2012

7 [http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Ponceau\\_S.svg&page=1](http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=File:Ponceau_S.svg&page=1), 15.10.2012

8 <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/sl/GELifeSciences/products/detection-methods/>, 15.10.2012