# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF

Institut für Immunologie des Zentrums für Diagnostik

Institutsleiter: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

# Die Bedeutung des Trans-Signalweges von Interleukin-6 für die angeborene Immunantwort auf *Listeria monocytogenes*

#### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Judith Hoge aus Hamburg

Hamburg 2012

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 15.11.2013
Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.
Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker
Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Ulf Panzer
Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. Holger Rohde

I. INHALTSVERZEICHNIS	i
1. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1. Das Immunsystem	2
2.1.1. Die angeborene Immunantwort	2
2.1.2. Die adaptive Immunantwort	3
2.2. Das Listeria monocytogenes-Infektionsmodell	3
2.2.1. Listeria monocytogenes	3
2.2.2. Zellen des angeborenen Immunsystems während der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.2.3. Die Inflammatorischen Monozyten	6
2.3. Interleukin-6	6
2.3.1. Der Interleukin-6-Rezeptor	7
2.3.2. Klassischer Signalweg und Trans-Signalweg von IL-6	8
2.3.3. Einfluss von IL-6 auf Zell-Interaktionen	9
2.3.4. Bedeutung von IL-6 für die Entstehung von Krankheiten	10
2.3.5. IL-6 während der Infektion mit Listeria monocytogenes in der Maus	10
2.4. sgp130 – Bezug zur klinischen Medizin	11
3. MATERIAL UND METHODEN	13
3.1. Materialien	13
3.1.1. Feinchemikalien und Reagenzien	13
3.1.2. Puffer und Medien	14
3.1.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie	15
3.1.4. ELISA	15
3.1.5. Molekularbiologische Reagenzien	16
3.1.6. Primer	16
3.1.7. IL-6-Inhibitoren	17
3.1.8. Bakterienstämme	17
3.1.9. Mausstämme	17
3.1.10. Besondere Geräte und Materialien	18
3.1.11. Software	18
3.2. Methoden	19
3.2.1. Tierexperimentelles Arbeiten	19
3.2.2. Bakterienkultur und Infektion	19

3.2.3. Behandlung von Versuchsmäusen mit $\alpha$ -IL-6 mAk oder sgp130-Fc	19
3.2.4. Bestimmung von Endotoxinkonzentrationen	20
3.2.5. Isolierung von Leukozyten aus Milz und Leber	21
3.2.5.1. Organentnahme	21
3.2.5.2. Gewebeverdau	21
3.2.5.3. Aufreinigung von Milzzellen	21
3.2.5.4. Aufreinigung von Leberzellen	22
3.2.6. Extrazelluläre Färbung von Zellen	22
3.2.7. Intrazelluläre Zytokinfärbung	23
3.2.7.1. Stimulation von Milzzellen	23
3.2.7.2. Intrazelluläre Färbung von Milzzellen	23
3.2.8. Durchflusszytometrische Charakterisierung und Analyse von Leukozyten	24
3.2.9. Bestimmung von Listerientitern in Milzen und Lebern	25
3.2.10. Serum-ELISA	26
3.2.11. Molekularbiologische Methoden	27
3.2.11.1. Isolation von RNA mittels Trizol Reagenz	27
3.2.11.2. Bestimmung von Konzentration und Qualität der isolierten RNA	28
3.2.11.3. cDNA-Synthese	29
3.2.11.4. Durchführung der qRT-PCR	29
3.2.11.5. Auswertung der qRT-PCR	30
3.2.12. Schmelzkurvenanalyse	32
3.2.13. Statistik	33
4. ERGEBNISSE	34
4.1. Die angeborene Immunantwort auf <i>Listeria monocytogenes</i> in Wildtyp-Mäusen	34
4.1.1. Charakterisierung von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten	34
4.1.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten Wildtyp-Mäusen	36
4.1.3. Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6Rα in <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten Wildtyp-Mäusen	37
4.1.4. mRNA-Expression von IL-6 und Akute-Phase-Proteinen in Listeria monocytogenes infizierten Wildtyp-Mäusen	38
4.1.5. Produktion von IL-6 und TNF-α durch restimulierte Granulozyten und Inflammatorische Monozyten aus <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten Wildytp-Mäusen	40
4.1.6. Expression des IL-6Rα auf Granulozyten und Inflammatorischen	
Monozyten in <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten Wildtyp-Mäusen	43

4.2. Die angeborene Immunantwort auf <i>Listeria monocytogenes</i> in CCR2 <sup>KO</sup> -Mäusen	46
4.2.1. Listerientiter in Milzen und Lebern von CCR2 <sup>KO</sup> -Mäusen	46
4.2.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten CCR2 <sup>KO</sup> -Mäusen	47
4.2.3. Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6Rα in <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten CCR2 <sup>KO</sup> -Mäusen	49
4.3. Die angeborene Immunantwort in <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten Wildtyp-Mäusen nach der Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130Fc	50
4.3.1. Listerientiter nach Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	52
4.3.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten nach Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	53
4.3.3. mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren nach Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	54
4.3.4. Serumkonzentrationen von IL-6 nach Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	59
4.4. Die angeborene Immunantwort auf Listeria monocytogenes in IL-6 <sup>KO</sup> -und sgp130FcTg Mäusen	60
4.4.1. Listerientiter in IL-6 <sup>KO</sup> - und sgp130Fc <sup>Tg</sup> -Mäusen	60
4.4.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in <i>Listeria monocytogenes</i> infizierten IL-6 <sup>KO</sup> - und sgp130Fc <sup>Tg</sup> -Mäusen	61
5. DISKUSSION	63
5.1. Granulozyten und Inflammatorische Monozyten während der frühen Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	63
5.2. Restimulation von Milzzellen und Zytokinproduktion in vitro	65
5.3. Produktion von IL-6 während der Infektion mit  Listeria monocytogenes	67
5.4. Der IL-6Rα während der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	67
5.5. Inflammatorische Monozyten als Quelle für IL-6 und sIL-6Rα während der Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	71
5.6. Anwendung von α-IL-6 mAk und sgp130-Fc für die Analyse des IL-6-Signals während der frühen Listerieninfektion	72
5.6.1. Einfluss von α-IL-6 mAk und sgp130-Fc auf die Listerienlast	72
5.6.2. Einfluss von α-IL-6 mAk und sgp130-Fc auf die Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten	73
5.6.3. Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6Rα nach Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Listerieninfektion	74
5.6.4. Einfluss von α-IL-6 mAk und sgp130-Fc auf die mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren	74
5.7. Schlussfolgerungen in Bezug zur klinischen Medizin	76

6. ZU	JSAMMENFASSUNG77
7. SU	JMMARY78
II.	ABBILDUNGSVERZEICHNISv
III.	TABELLENVERZEICHNISvi
IV.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNISvii
V.	LITERATURVERZEICHNIS x
VI.	DANKSAGUNGxviii
VII.	LEBENSLAUFxix
VIII.	PUBLIKATIONENxx
IX.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNGxxi

# 1. ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNG

Interleukin-6 (IL-6) ist als pro-inflammatorisches Zytokin ein wichtiger Mediator während der frühen Immunantwort auf bakterielle Krankheitserreger. Am Beispiel des *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodells sollte in der vorliegenden Arbeit die Bedeutung insbesondere des Trans-Signalweges von IL-6 für die angeborene Immunantwort auf Bakterien untersucht werden.

Aus anderen Arbeiten war bereits bekannt, dass Granulozyten und Inflammatorische Monozyten während der frühen Infektion zur Listerienabwehr beitragen. Diese Beobachtung galt es zunächst an dem vorliegenden Infektionsmodell zu überprüfen. Milz- und Leberzellen sollten dafür durchflusszytometrisch analysiert und die Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten während der Listerieninfektion quantitativ bestimmt werden. Anschließend war es Aufgabe, durch die *in vitro-*Stimulation von Milzzellen zu untersuchen, ob diese Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in der Lage sind, IL-6 zu produzieren. Zudem sollte *in vivo* die Produktion von IL-6 im Organgewebe (mittels qRT-PCR) und seine Konzentration im Serum (mittels ELISA) in nicht-infizierten und in infizierten Tieren erfasst werden.

Zur Beantwortung der Frage, ob IL-6 über den klassischen Signalweg auf Granulozyten und Inflammatorische Monozyten einwirken kann, sollte durchflusszytometrisch die Expression des IL-6-Rezeptors auf diesen Zellen analysiert werden. Ebenso galt es zu untersuchen, ob der lösliche IL-6R $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) im Serum vorhanden ist, da sIL-6R $\alpha$  eine Voraussetzung des Trans-Signalweges von IL-6 ist. Zudem war es das Ziel zu ermitteln, ob die Listerieninfektion einen Stimulus für die Abspaltung des IL-6R $\alpha$  von der Zelloberfläche darstellt und mit veränderten sIL-6R $\alpha$ -Konzentrationen im Serum einhergeht.

In CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen ist die Emigration von Inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark im Falle einer Infektion eingeschränkt und die periphere Monozytenzahl somit vermindert. Die Messung der IL-6- und sIL-6Rα-Konzentrationen im Serum dieser Mäuse versprach daher einen Hinweis zu geben, inwieweit die Inflammatorischen Monozyten als Quelle von IL-6 und sIL-6Rα von Bedeutung sind.

Schließlich ging es um die direkte Beeinflussung der beiden Signalwege von IL-6 im Infektionsverlauf: in C57BL/6-Mäusen sollte entweder das gesamte IL-6-Signal oder spezifisch der Trans-Signalweg von IL-6 blockiert werden. Anschließend sollten die behandelten Mäuse mit *L. monocytogenes* infiziert werden. Ziel war es, den Einfluss der unterschiedlichen Blockademechanismen auf die Listerienabwehr anhand der Listerientiter in Milz und Leber, durch die durchflusszytometrische Analyse und die Quantifizierung der mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren aufzuzeigen.

#### 2. EINLEITUNG

# 2.1. Das Immunsystem

Eine Entzündung ist keine Krankheit, sondern deren Konsequenz und ermöglicht als solche dem Körper die Bekämpfung von Gewebeverletzungen und Infektionen. Sie ist effektiv, wenn sie einen erfolgreichen und normalen Heilungsprozess einleitet (Jones SA et al. 2011). Entzündliche Reaktionen werden durch das Immunsystem reguliert – einem lebenswichtigen Bestandteil des menschlichen Körpers, das sich als großes Netzwerk von der makroskopisch sichtbaren Organebene, über die zelluläre bis hin zur biochemischen Ebene erstreckt. Es schützt den Organismus vor Krankheitserregern wie Bakterien, Viren und Pilzen und vor toxischen Einflüssen. Auch bei der Eindämmung von körpereigenen Krankheitsprozessen, wie zum Beispiel Tumorerkrankungen, spielt es eine wichtige Rolle. Zudem steht es in ständiger wechselseitiger Beziehung zum Hormonsystem und zum Energiestoffwechsel. In diesem großen Netzwerk herrscht ein empfindliches Gleichgewicht. Ist die Immunantwort ausgeprägt oder gegen den Organismus selbst gerichtet, Autoimmunerkrankungen, chronische Entzündungsprozesse oder Allergien die Folge sein. Für die Entwicklung neuer Therapieoptionen für akut- oder chronisch-entzündliche Erkrankungen sowie Tumorerkrankungen ist daher das Verständnis des Immunsystems und der zellulären Mechanismen von Entzündung und Regeneration von eminenter Bedeutung.

# 2.1.1. Die angeborene Immunantwort

Durchdringen Krankheitserreger die chemischen und mechanischen Barrieren des Körpers, treffen sie in einem Organismus zunächst auf die angeborene Immunabwehr, die aus humoralen und zellulären Komponenten besteht und eine Entzündungsreaktion bewirkt.

Zu den humoralen Komponenten gehören unter anderem die Chemokine und Zytokine. Chemokine sind Proteine, die von verschiedenen Zellen sezerniert werden und über einen Konzentrationsgradienten Zellen mit den entsprechenden Rezeptoren an den Ort der Entzündung locken. Zytokine sind Signalproteine, die andere Zellen rezeptorabhängig aktivieren können.

Zellen des angeborenen Immunsystems sind die Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und Dendritischen Zellen (DC), die alle aus einer gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle aus dem Knochenmark hervorgehen. Die genannten Zelltypen bilden als Fresszellen (Phagozyten) die erste Abwehrfront gegen eindringende Krankheitserreger. Sie besitzen zudem verschiedene Rezeptoren, durch die sie eindringende Mikroorganismen anhand ihrer molekularen Struktur erkennen können (pattern recognition receptors, PRR): die Toll-ähnlichen Rezeptoren (toll-like receptors, TLR) sowie die intrazellulären NOD-Rezeptoren (nucleotide-binding oligodimerization-domain). Im Vergleich zur

adaptiven Immunantwort besitzt die angeborene Immunantwort in der Erkennung von Krankheitserregern allerdings eine begrenzte Spezifität.

#### 2.1.2. Die adaptive Immunantwort

Das adaptive Immunsystem wird im Laufe der Entzündung aktiviert und ermöglicht die spezifische Immunantwort auf ein Pathogen. Es umfasst die Zellen der lymphatischen Zelllinie, zu der die T-Zellen, B-Zellen und die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) gehören. Durch die hochspezifischen Rezeptoren auf den T- und B-Zellen können Krankheitserreger gezielt erkannt und anschließend unschädlich gemacht werden. Immunreaktionen werden durch das Zusammenspiel der verschieden T<sub>Helfer</sub>-Zell-Subtypen, die T<sub>H</sub>1 und T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 sowie die regulatorischen T Zellen (T<sub>regs</sub>) induziert und reguliert. Für das so genannte immunologische Gedächtnis spielen neben den Gedächtnis-T-Zellen auch die Gedächtnis-B-Zellen sowie die Antikörper-produzierenden Plasmazellen eine wichtige Rolle.

# 2.2. Das Listeria monocytogenes-Infektionsmodell

In der vorliegenden Dissertation sollte vor allem das angeborene Immunsystem anlaysiert werden, wobei die Bedeutung des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) den Themenschwerpunkt bildet. Mithilfe des *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodells galt es den Einfluss des IL-6-Signals insbesondere auf die neutrophilen Granulozyten und eine Subpopulation der Makrophagen, die "Inflammatorischen Monozyten" zu untersuchen. Im Folgenden werden zunächst die Eigenschaften von *L. monocytogenes* erläutert und anschließend die Charakteristika der Granuloyzten und Inflammatorischen Monozyten vorgestellt. Struktur und Signaleigenschaften von IL-6 werden im nächsten Kapitel genau beschrieben.

#### 2.2.1. Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes ist ein gram-positives (gram<sup>+</sup>), nicht-sporenbildendes, fakultativ intrazelluläres Bakterium. Es verursacht im Menschen die Listeriose und wurde 1926 erstmalig isoliert (Murray et al. 1926, Vázquez-Boland et al. 2001). Im Menschen treten durch L. monocytogenes bedingte Erkrankungen vor allem bei Schwangeren auf sowie bei, durch Krankheit oder medikamentöse Therapie, Immunsupprimierten. Obwohl das Bakterium meist durch den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel übertragen wird, ruft es nicht in erster Linie Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes hervor, sondern verursacht systemisch-invasive Erkrankungen, wie Septikämien, Meningoenzephalitiden, Chorioamnitiden und in der Folge Totgeburten (Krüll und Suttorp 2005). Besonders gefürchtet ist die Granulomatosis infantisepetica des Neugeborenen (Reiss et al. 1951).

Auch in der Maus verläuft der normale Infektionsweg via Gastrointestinaltrakt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Listerien allerdings intravenös appliziert um eine systemische Infektion und Replikation des Erregers in Milz und Leber zu provozieren (Shi *et al.* 2011). Dabei wurde der Listerienstamm EGD (LmEGD) verwendet, der nach seinem Erstbeschreiber, Everitt George Dunne Murray, benannt ist.

L. monocytogenes hat verschiedene Mechanismen entwickelt, mit deren Hilfe es Zellen infizieren kann. An nicht-phagozytäre Zellen kann es binden und so seine eigene Internalisierung bewirken. Das Internalin A der Listerien interagiert zum Beispiel mit dem epithelialen Cadherin (E-Cadherin) und bewirkt dadurch die Aufnahme des Bakteriums in epitheliale Zellen (Gaillard et al. 1991). In Leberzellen (Hepatozyten) gelangt L. monocytogenes durch sein Oberflächenprotein Internalin B, welches an die Rezeptortyrosinkinase Met bindet, deren eigentlicher Ligand der hepatozelluläre Wachstumsfaktor (HGF) ist (Shen et al. 2000).

Im Gegensatz dazu wird die Internalisierung von *L. monocytogenes* in professionellen Phagozyten durch die Wirtszelle eingeleitet. Die Makrophagen besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren, die direkt an Bestandteile von Bakterien oder an bakterien-assoziiertes Opsonin binden (Shen *et al.* 2010, Underhill und Ozinsky 2002). *L. monocytogenes* wird unter anderem durch das Komplement 3 (C3bi) opsoniert und anschließend über den C-Rezeptor 3 (CR3) von Makrophagen erkannt und phagozytiert (Drevets und Campbell 1991).

Intrazellulär befinden sich die Listerien zunächst in Phagosomen. Durch die Fusion mit einem Lysosom würde der Erreger enzymatisch und durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies verdaut werden. Doch *L. monocytogenes* kann sich diesem Vorgang entziehen indem es das Hemolysin Listeriolysin O (LLO) sezerniert, wodurch das Phagosom aufgelöst wird und die Listerien in das Zytoplasma gelangen (Gaillard *et al.* 1986, Vázquez-Boland *et al.* 2001). Im Zytoplasma vermehrt sich der Erreger und infiziert anschließend weitere Zellen. Zu diesem Zwecke besitzt *L. monocytogenes* weitere Virulenzfaktoren: es besitzt zum Beispiel eine bakterielle Hexose-Phosphat Translokase (Hpt), welche ihm die Aufnahme des Energieträgers Glukose-6-Phosphat sichert (Chico-Calero *et al.* 2002). Für die Fortbewegung innerhalb der Wirtszelle verfügt *L. monocytogenes* über eine Aktinpolymerase (ActA). Sie ermöglicht dem Erreger auch die Infektion von Nachbarzellen, denn durch sie kann er sich auf die Zellmembran zubewegen, diese ausstülpen und durch Bildung einer sekundären Vakuole in die Nachbarzelle gelangen, ohne dabei im Extrazellulärraum eine humorale Immunantwort auszulösen (Domann *et al.* 1992, Tilney und Portnoy 1989).

Die Infektion mit *L. monocytogenes* wird außerdem durch verschiedene extra- und intrazelluläre Rezeptoren detektiert. Bestandteile der bakteriellen Zellwand, wie zum Beispiel die Lipoteichonsäure (LTA), werden durch den TLR2 und das Flagellin, Bestandteil der Geißeln, durch den TLR5 erkannt (Kawai und Akira 2006). Sind Listerien innerhalb der Zelle in das Zytosoplasma gelangt, werden sie durch NOD-Rezeptoren erkannt (Corr und

O'Neill 2009). Trotz unterschiedlicher Lokalisation und Signalkaskade werden beide Rezeptortypen, TLR und NOD, während einer Infektion durch *L. monocytogenes* aktiviert und tragen durch synergistische Effekte zu einer adäquaten Immunantwort bei (Ishii *et al.* 2008). Beide Rezeportypen führen über ihre jeweilige Signalkaskade zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB (Nuklearer Faktor κB) (Creagh und O'Neill 2006, O'Riordan *et al.* 2002), der die vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel TNF-α (Corr und O'Neill 2009, Seki *et al.* 2002) bewirkt. Durch diese pro-inflammatorischen Signale werden weitere Makrophagen zur Beseitigung der Listerien aktiviert.

# 2.2.2. Zellen des angeborenen Immunsystems während der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes ist ein gut charakterisiertes und einfach zu kultivierendes Pathogen und das L. monocytogenes-Infektionsmodell ermöglicht die Analyse der angeborenen sowie der adaptiven Immunantwort auf bakterielle Krankheitserreger in der Maus. Die neutrophilen Granulozyten (im Folgenden nur als Granulozyten bezeichnet) und Makrophagen sowie Monozyten wurden bereits als wichtige Akteure der angeborenen Immunantwort erwähnt und ihre Funktion wird im Folgenden genauer erläutert.

Granulozyten und Makrophagen produzieren Oxidasen für die Abtötung mikrobieller Erreger sowie TNF-α als pro-inflammatorisches Zytokin und werden häufig zusammen an Infektionsherde rekrutiert (Shi *et al.* 2011). Granulozyten sind kurzlebige und enddifferenzierte Zellen, die bestimmte antimikrobielle Funktionen erfüllen. Auf sie treffen die Listerien bei einer Infektion zuerst. Am Entzündungsort vermindern die Granulozyten die Replikation von *L. monocytogenes* durch Phagozytose und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies sowie durch eine Vielzahl an antimikrobiellen Faktoren, die in ihren Granula enthalten sind (Segal 2005). Aktivierte Granulozyten können außerdem granuläre Proteine und Chromatin sezernieren, die zusammen extrazelluläre Netze bilden (NET, engl: *neutrophil extracelular traps*) und gram<sup>+</sup> sowie gram<sup>-</sup> Bakterien binden und unschädlich machen (Brinkmann *et al.* 2004). Zudem aktivieren sie durch die Sekretion von Typ-1 Zytokinen und Chemokinen weitere Immunzellen (Bennouna *et al.* 2003).

Die Makrophagen sind, im Vergleich zu den Granulozyten, langlebiger und können in einer Entzündungssituation in verschiedene Effektorpopulationen differenzieren. Sie fungieren nicht nur als Phagozyten sondern aktivieren als professionelle Antigen präsentierende Zellen (APC) die adaptive Immunantwort. Die Monozyten sind eine Vorstufe dieser gewebsständigen Makrophagen und befinden sich im Blut, im Knochenmark und in der Milz. Die murinen Monozyten können in zwei Subpopulationen eingeteilt werden: eine Subpopulation besitzt den CX3-Chemokin-Rezeptor 1 (CX3CR1) auf der Zelloberfläche und befindet sich im Inneren der Blutgefäße. Dieses sind die "patroullierenden Monozyten". Die

andere Subpopulation exprimiert weniger CX3CR1 und ist dafür CCR2<sup>+</sup> und Ly6C<sup>high</sup>. Diese Monozyten werden an die Entzündungsherde gelockt und daher als "Inflammatorische Monozyten" bezeichnet (Geissmann *et al.* 2003). In Depletionsversuchen konnte gezeigt werden, dass nicht die Granulozyten, sondern vor allem diese Inflammatorischen Monozyten für die Listerienabwehr zwingend notwendig sind (Shi *et al.* 2011).

# 2.2.3. Die Inflammatorischen Monozyten

Inflammatorische Monozyten tragen den CC-Rezeptor 2 (CCR2) auf der Zelloberfläche (Geissmann et al. 2003). Für diesen Rezeptor stellt das Chemokin C-C-Ligand 2 (CCL2) (syn: MCP-1) den Hauptliganden dar (Serbina et al. 2003b). CCL2 wird von unterschiedlichen Zelltypen produziert, darunter Makrophagen, Dendritische Zellen und endotheliale Zellen (Van Coillie et al. 1999). Seine konstante Produktion sorgt unter normalen Umständen für eine Homöostase in der Emigration von Inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark. Die Infektion mit L. monocytogenes bewirkt, über die Aktivierung von NF-κB, eine erhöhte CCL2-Produktion in der Milz und damit einhergehend erhöhte Serumspiegel von CCL2 (Serbina et al. 2003b, Serbina und Pamer 2006, Ueda et al. 1997). Mäuse, die den CCR2 nicht exprimieren, sind deutlich in ihrer Listerienkontrolle eingeschränkt, ebenso wie Mäuse mit verminderter CCL2-Produktion (Kurihara et al. 1997, Serbina et al. 2003a). Dies wird dadurch begründet, dass die Inflammatorischen Monozyten im Falle einer Infektion mit L. monocytogenes nur durch die CCR2-Aktivierung aus dem Knochenmark emigrieren können (Serbina und Pamer 2006). Es wurde zudem beobachtet, dass die eingewanderten Inflammatorischen Monozyten in der Milz (Serbina et al. 2003a) und in der Leber (Shi et al. 2010) listerieninfizierter Mäuse in spezielle Dendritische Zellen differenzieren können, die TNF-α und die induzierbare NO Synthase (iNOS) produzieren, die sogenannten TipDCs (Pamer 2004, Seki et al. 2002, Serbina et al. 2003a).

#### 2.3. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein glykosyliertes Protein mit einer Größe von 21-28 kDa und gehört zur IL-6-Zytokinfamilie. Weitere Zytokine der IL-6-Zytokinfamilie sind: IL-11, IL-27, IL-31, Leukämie-inhibierender Faktor (LIF), Onkostatin M (OSM), ziliärer neurotrophischer Faktor (CNTF), Cardiotropin-1 (CT-1), stimulierendes Neurotrophin-1/B-Zell stimulierender Faktor 3 (NNT-1/BSF-3) und Neuropoietin (NPN) (Scheller *et al.* 2011). Charakteristisch für diese Zytokine ist der strukturelle Aufbau aus vier α-Helices. Weiterhin binden diese Zytokine (mit Ausnahme von IL-31) an Rezeptoren, die mit dem Glykoprotein 130 (gp130) eine gemeinsame Rezeptoruntereinheit besitzen (Heinrich *et al.* 2003, Scheller *et al.* 2011). IL-6 wird hauptsächlich durch Makrophagen und Monozyten, B-Zellen, einigen T-Zell-Subtypen, endothelialen und epithelialen Zellen, Fibroblasten und Mastzellen produziert (Kishimoto 1989, Nakane *et al.* 1992).

# 2.3.1. Der Interleukin-6-Rezeptor

Damit IL-6 ein Signal provozieren kann, muss ein entsprechender Rezeptor auf der Zielzelle vorhanden sein. Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) besteht aus zwei Untereinheiten: dem oben erwähnten gp130 und der membrangebundenen IL-6-Rezeptor α Untereinheit (IL-6Rα; syn: CD126, gp80). Monozyten und Makrophagen, neutrophile Granulozyten, einige T-Zell-Subtypen und Hepatozyten exprimieren den IL-6Rα. Im Gegensatz dazu ist gp130 ubiquitär auf allen Zellen des Organismus zu finden (Rose-John *et al.* 2006). Der IL-6Rα ist ein transmembranäres Typ I Glykoprotein von 80 kDa. Gp130 ist ein 130-150 kDa großes Glykoprotein, mit sechs extrazellulären, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne (Scheller *et al.* 2011).

Das IL-6-Signal wird über die zytoplasmatische Domäne von gp130 an das Zellinnere weitergegeben. Intrazellulär ist gp130 mit JAK-Kinasen assoziiert, die sich bei Ligandenbindung gegenseitig an Tyrosinresten phosphorylieren und dadurch aktivieren. So wird die Phosphorylierung von STAT-Molekülen ermöglicht. Als Transkriptionsfaktoren bilden die STAT-Moleküle Dimere und gelangen so in den Zellkern, um dort die Transkription von IL-6 abhängigen Genen zu induzieren (Leonard und O'Shea 1998). Durch IL-6 wird hauptsächlich STAT3, aber auch STAT1 aktiviert (Heinrich *et al.* 2003).

Die Besonderheit des IL-6Rα ist, dass er in membrangebundener Form, aber auch als lösliches Molekül für das IL-6-Signal zur Verfügung steht. Der membrangebundene IL-6Rα wurde oben bereits beschrieben. Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6Rα) entsteht entweder durch alternatives Spleißen der prä-mRNA oder durch die proteolytische Abspaltung (shedding) der extrazellulären Domäne des IL-6Rα. In der Maus wurde bisher nur der letztgenannte Mechanismus beobachtet (Müllberg et al. 1993, Scheller et al. 2011). Die proteolytische Abspaltung des IL-6Rα wird katalysiert durch Zn²+-Metalloproteinasen der ADAM-Familie (a disintegrin and metalloproteinase), hauptsächlich durch ADAM 17. Dieses kann aktiviert werden durch den Phorbolester Phorbol-Myristat-Acetat (PMA), einem Aktivator der Proteinkinase C (PKC) (Müllberg et al. 1993, Scheller et al. 2011). Weitere Stimuli für die proteolytische Abspaltung sind die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α (Franchimont et al. 2005), die bakteriellen Toxine Streptolysin O und Hämolysin A (Walev et al. 1996), die Apoptose von neutrophilen Granulozyten (Chalaris et al. 2007) sowie das C reaktive Protein (CRP), ein Akute-Phase-Protein aus der Leber (Jones SA et al. 1999).

Aufgrund der Tatsache, dass der IL- $6R\alpha$  sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form vorkommt und gp130 ubiquitär und unabhängig von IL- $6R\alpha$  exprimiert wird, ergeben sich zwei unterschiedliche Signalwege für IL-6.

# 2.3.2. Klassischer Signalweg und Trans-Signalweg von IL-6

Auf ruhenden Zellen liegt die gp130-Untereinheit des IL-6-Rezeptors als inaktives Dimer vor (Tenhumberg *et al.* 2006). Für die Aktivierung von Zellen bindet IL-6 zuerst den membrangebundenen IL-6Rα, der dann an zwei benachbart liegende gp130-Moleküle assoziiert (Scheller *et al.* 2011). Dieser Aktivierungsmechanismus wird als "klassischer Signalweg" von IL-6 bezeichnet (**Abb. 1**). Bindet IL-6 jedoch schon im Extrazellulärraum an die gelöste Form des IL-6Rα (sIL-6Rα), kann der Komplex aus IL-6 und sIL-6Rα anschließend ebenfalls eine Zelle aktivieren, indem er das gp130 bindet (**Abb. 1**). Dieser Prozess wird als "Trans-Signalweg" von IL-6 bezeichnet (Rose-John und Heinrich 1994). Der sIL-6Rα blockiert IL-6 demnach nicht, sondern es fördert seine Funktion. Die Bindung

Der sIL-6Rα blockiert IL-6 demnach nicht, sondern es fördert seine Funktion. Die Bindung von IL-6 an den sIL-6Rα und den membrangebundenen IL-6Rα erfolgt dabei mit einer vergleichbaren Affinität (Scheller *et al.* 2011). Bezüglich der Funktion von IL-6 ist von großer Bedeutung, dass gp130 ubiquitär exprimiert wird.

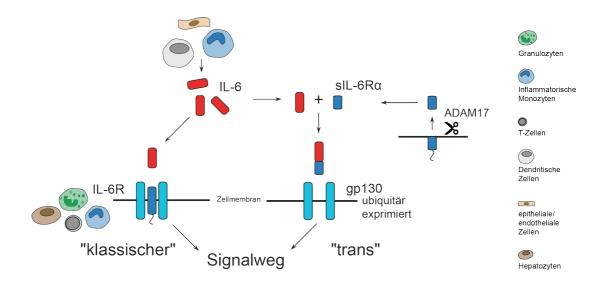


Abb. 1: Klassischer Signalweg und Trans-Signalweg von Interleukin-6 (IL-6) Als IL-6-produzierende Zellen gelten hauptsächlich Makrophagen/Monozyten, endotheliale/epitheliale Zellen sowie T-Zellen. Den IL-6R $\alpha$ -exprimieren vor allem die Makrophagen/Monozyten, Granulozyten, T-Zellen und die Hepatozyten. IL-6 kann seine spezifischen Zielzellen über den klassischen Signalweg aktivieren, indem es an den Komplex aus membrangebundenem IL-6R $\alpha$  und gp130 bindet. Alternativ bindet IL-6 im Extrazellularraum an den löslichen. Der Komplex aus IL-6 und sIL-6R $\alpha$  kann anschließend Zellen aktivieren, die nur gp130 exprimieren (Trans-Signalweg). Der sIL-6R $\alpha$  entsteht in der Maus hauptsächlich durch proteolytische Abspaltung durch die Metalloproteinase ADAM 17 (nach Scheller *et al.* 2011).

Zusammengefasst werden über den klassischen Signalweg die spezifischen Zielzellen von IL-6 aktiviert, während über den Trans-Signalweg alle gp130-exprimierenden Zellen des Organismus durch IL-6 beeinflusst werden können. Somit können von beiden IL-6-Signalwegen ganz unterschiedliche Effekte erwartet werden. Zudem erweitert sich durch den Trans-Signalweg die Anzahl und Vielfalt der Zielzellen von IL-6 erheblich (Rose-John *et al.* 2007).

#### 2.3.3. Einfluss von IL-6 auf Zell-Zell-Interaktionen

Auf zellulärer Ebene wirkt IL-6 sowohl aktivierend als auch supprimierend auf die verschiedenen Populationen des Immunsystems (Kishimoto 1989) und es ist schon lange als ein Induktor der Hämatopoese bekannt (Ikebuchi *et al.* 1987). In den Plasmazellen stimuliert es zudem die Produktion von Antikörpern (Hirano *et al.* 1985, Stumhofer *et al.* 2010).

Neben diesen allgemeinen Wirkungen von IL-6 konnten bereits einige Zell-Zell-Interaktionen spezifisch dem Trans-Signalweg von IL-6 zugeschrieben werden. So wurde beobachtet, dass IL-6 über den Trans-Signalweg während eines Entzündungsgeschehens den Übergang von angeborener zu erworbener Immunantwort vermittelt, wobei insbesondere die Granulozyten von Bedeutung zu sein scheinen (Scheller et al. 2011). Granulozyten exprimieren den CXCR2 und werden durch ihn an Entzündungsorte gelockt (Esche et al. 2005). Nach Erfüllung ihrer antimikrobiellen Funktionen gehen sie den programmierten Zelltod (Apoptose) ein. Von apoptotischen Granulozyten wird der IL-6Rα abgespalten (Chalaris et al. 2007), wodurch sIL-6Ra im Extrazellulärraum verfügbar wird und es zum Trans-Signalweg von IL-6 kommen kann. In der Folge vermindert der Trans-Signalweg in dem entzündeten Gewebe die Freisetzung von Granulozyten-rekrutierenden Chemokinen wie CXCL1 und CXCL2 und erhöht gleichzeitig die Expression von auf Monozyten wirkenden Chemokinen wie CCL2 (Hurst et al. 2001, Kaplanski et al. 2003). Erhöht wird außerdem die Expression von Lymphozyten-rekrutierenden Chemokinen wie CCL4, CCL5, CCL17 und CXCL10 (McLoughlin et al. 2005). Der Trans-Signalweg von IL-6 kann damit am Entzündungsort den Übergang von der frühen Antwort durch Granulozyten, zu einer Monozytenantwort und schließlich zu einer spezifischen T-Zell-Antwort vermitteln.

Bisher wurde das IL-6-Signal vor allem in den Lymphozyten untersucht. Insgesamt bewirkt IL-6 über die Aktivierung anti-apoptotischer Faktoren ein längeres Überleben von T-Zellen (Atreya *et al.* 2000). Naive T-Zellen tragen den IL-6Rα und nach einer Aktivierung differenzieren sie in Gegenwart von IL-6 und dem Transformierenden Wachstumfaktor β (*Transforming growth factor* β, TGF-β) zu T<sub>H</sub>17-Zellen. Diese sind eine Subpopulation der T-Zellen, deren erhöhtes Vorkommen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen des Menschen beobachtet wurde (Mangan *et al.* 2006). Für die Reifung der T<sub>H</sub>17-Zellen wurde spezifisch der Trans-Signalweg von IL-6 verantwortlich gemacht, entsprechend tragen differenzierte T<sub>H</sub>17-Zellen keinen IL-6Rα mehr (Jones GW *et al.* 2010). Ein spezifischer Effekt des Trans-Signalweges von IL-6 ist auch die verminderte Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (T<sub>regs</sub>). Dies Zellen zeigen anti-inflammatorische Wirkungen und regulieren Entzündungsvorgänge. Eine Hemmung ihrer Differenzierung erfolgt durch den Komplex aus IL-6 und sIL-6Rα nicht aber durch IL-6 alleine (Dominitzki *et al.* 2007).

Diese Beispiele veranschaulichen bereits, dass IL-6 über seine verschiedenen Signalwege jeweils spezifische Effekte hervorrufen und Entzündungsvorgänge sowohl aufrechterhalten als auch eindämmen kann.

# 2.3.4. Bedeutung von IL-6 für die Entstehung von Krankheiten

IL-6 ist in die Entwicklung von chronisch entzündlichen Erkrankungen im Menschen, wie der Rheumatoiden Arthritis, dem Asthma bronchiale und Morbus Crohn, involviert. Des Weiteren ist es mit dem Vorkommen von kardiovaskulären und atherosklerotischen Erkrankungen sowie mit der Entstehung und Progression von Tumorerkrankungen assoziiert (Garbers *et al.* 2011, Scheller *et al.* 2011). Im Rahmen einer Entzündung kann IL-6 eine sogenannte Akute-Phase-Antwort induzieren, die durch eine Leukozytose, Fieber, gesteigerte Kortikosteronproduktion und erhöhte Gefäßpermebealität gekennzeichnet ist. In der Leber induziert IL-6 gleichzeitig die Produktion von Akute-Phase-Proteinen. Dies sind systemisch wirksame Entzündungsmediatoren, zu denen neben dem C-reaktiven Protein auch das Haptoglobin und das Serumamyloid A (SAA) gehören (Kishimoto 1989).

IL-6 werden allerdings nicht nur pro- sondern auch anti-inflammatorische (Xing *et al.* 1998) und sogar regenerative Wirkungen (Cressman *et al.* 1996) zugeschrieben. Außerdem beeinflusst IL-6 den Fett- und Insulinstoffwechsel (Carey und Febbraio 2004) und durch seine Osteoklasten-aktivierende Wirkung auch den Knochenumbau (Tamura *et al.* 1993).

Insgesamt wird IL-6 und den durch IL-6 hervorgerufenen Effekten eine zentrale Bedeutung für das Immunsystem, den Metabolismus und die Regulation verschiedener Krankheitsprozesse zugeschrieben.

#### 2.3.5. IL-6 während der Infektion mit *Listeria monocytogenes* in der Maus

Schon seit längerem ist bekannt, dass die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$  während der Infektion mit *L. monocytogenes* vermehrt produziert werden (Havell und Sehgall 1991, Liu *et al.* 1992). Zudem zeigten Kopf *et al.* (1994), dass IL-6-defiziente Mäuse in ihrer Listerienkontrolle deutlich eingeschränkt sind. Unklar ist bisher, ob dem klassischen oder dem Trans-Signalweg von IL-6 eine besondere Rolle für die Immunantwort auf *L. monocytogene* beigemessen werden kann.

TNF- $\alpha$  wird während der Listerieninfektion unter anderem durch Inflammatorische Monozyten produziert (Serbina *et al.* 2003a). Die IL-6-Produktion geschieht in listerieninfizierten Mäusen vor allem durch Monozyten und Makrophagen, sowie T-Zellen (Liu und Cheers 1993). Ob insbesondere die Inflammatorischen Monozyten während der Listerieninfektion IL-6 produzieren, wurde bisher noch nicht untersucht. Die Granulozyten wurden bisher weder als IL-6- oder TNF- $\alpha$ -produzierende Zellen während der Infektion mit *L. monocytogenes* beschrieben.

# 2.4. sgp130 – Bezug zur klinischen Medizin

Die IL-6-Konzentration ist in Serum und Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis (RA) erhöht (Sack *et al.* 1993), wobei die RA nur eine unter vielen Erkrankungen des Menschen ist, in denen IL-6 akute und chronische Entzündungsvorgänge fördert. Deshalb gilt IL-6 schon lange als Angriffspunkt für die immunmodulatorische Therapie. Die AMBITION Studie belegte, dass Tocilizumab, ein monoklonaler Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor-α, als Therapeutikum für die RA geeignet und sich der Monotherapie mit Methotrexat sogar überlegen zeigt (Jones G *et al.* 2010). Doch wurden für Tocilizumab auch unerwünschte Wirkungen beschrieben, unter anderem eine erhöhte Infektanfälligkeit, Neutropenie und Erhöhung des Serumcholesterols (Jones G *et al.* 2010).

Ein generelles Problem der immunmodulatorischen Therapie ist, dass durch die globale Blockade von Zytokinen auch deren erwünschte Effekte verhindert und ernste Nebenwirkungen bedingt werden (Danilenko und Wang 2012). Daher gilt auch für die Neutralisierung von IL-6: je spezifischer eine Therapie gegen einen pathogenen Mechanismus gerichtet ist, desto vorteilhafter ist es für den behandelten Patienten.

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die durch IL-6 induzierten regenerativen Prozesse in der Leber (Cressmann *et al.* 1996) und im Darm (Becker *et al.* 2004, Grivennikov *et al.* 2009) durch den klassischen Signalweg vermittelt werden. Im Menschen wurden während entzündlicher Schübe verschiedener Autoimmunerkrankungen nicht nur die gesteigerte Produktion von IL-6, sondern auch eine erhöhte Serumkonzentrationen von sIL-6Rα gemessen (Mitsuyama *et al.* 1995, Keul *et al.* 1998). Die sIL-6Rα-Spiegel korrelierten dabei mit der CRP-Konzentration im Serum (Mitsuyama *et al.* 1995). Insgesamt deuten klinische Befunde und Tierexperimente darauf hin, dass der Trans-Signalweg von IL-6 akute Entzündungsschübe von Autoimmunerkrankungen fördert, während der klassische Signalweg eher regenerative Prozesse bewirkt. Die spezifische Blockade des Trans-Signalweges von IL-6 scheint daher einen sinnvollen neuen Therapieansatz darzustellen.

Es wurde bereits gezeigt, dass ein rekombinant hergestelltes sgp130Fc-Fusionsprotein (sgp130-Fc) nur den Trans-Signalweg von IL-6 inhibieren kann, während der klassische Signalweg und seine erwünschten Wirkungen weiterhin möglich sind (Rose-John *et al.* 2007). Sgp130-Fc gilt als spezifisch für den IL-6/sIL-6Rα-Komplex, da das Signal von anderen Zytokinen der IL-6-Familie erst bei einer 100- bis 1000-fach höheren Konzentration beeinflusst wird (Jostock *et al.* 2001). In verschiedenen Mausmodellen von humanen Erkrankungen wurde das sgp130-Fc bereits getestet, wobei sich ein positiver therapeutischer Effekt auf die Antigen-induzierte Arthritis, Inflammatorische Darmerkrankungen, Asthma und Kolon-assoziierte Tumore zeigte (Atreya *et al.* 2000, Becker *et al.* 2004, Doganci *et al.* 2005, Nowell *et al.* 2009, Scheller *et al.* 2011). Das sgp130-Fc befindet sich zurzeit in der

präklinischen Entwicklung und soll als neues Therapeutikum im Menschen zum Einsatz kommen (Rose-John *et al.* 2007).

Inwiefern die Anwendung von sgp130-Fc zu systemischen Nebenwirkungen führen und eine adäquate Immunantwort auf bakterielle Krankheitserreger einschränken könnte, ist bisher noch nicht bekannt. In der vorliegenden Dissertation galt es unter anderem auf diese Frage einzugehen, indem die Bedeutung des Trans-Signalweges von IL-6 für die angeborene Immunantwort auf *L. monocytogenes* in der Maus untersucht werden sollte.

# 3. MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1. Materialien

### 3.1.1. Feinchemikalien und Reagenzien

Bacto Agar

BD Bioscience (Heidelberg)

β-Mercaptoethanol

GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Bovines Serum Albumin (BSA)

Brefeldin A (BFA)

Desoxyribonuklease I (DNAse)

Fötales Kälberserum (FCS)

Serva (Heidelberg)

Sigma (Steinheim)

PAA (Paschingen)

Gentamycin GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Glutamin GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Ionomycin GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Kollagenase D Roche (Grenzach-Whylen)

Kollagenase VIII Sigma (Steinheim)

Natives Rattenserum (NRS)

Jackson Immuno Research (Baltimore)

Pacific Orange Succinimidyl Ester GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Percoll Seperationslösung Biochrom AG (Berlin)
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) Sigma (Steinheim)

RPMI 1640 Medium GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Saponin Sigma (Steinheim)

Streptavidin-HRP R&D Systems (Wiesbaden)

Triton X-100 Serva (Heidelberg)
Trypan blau Biochrom AG (Berlin)

Tryptic Soy Broth (TSB) BD (Heidelberg)

Alle Standardchemikalien stammen von Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe).

# 3.1.2. Puffer und Medien

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) Sigma (Steinheim)

1×Dulbeccos PBS (DPBS) GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

Erythrozytenlysepuffer 8,25 g NH<sub>4</sub>Cl

1,0 g KHCO<sub>3</sub> 0,037 g EDTA

in 1 l Aqua destillata

RPMI komplett RPMI 1640 (500 ml)

5% FCS

2 mM Glutamin

50 μg/ml Gentamycin

50  $\mu M$   $\beta$ -Mercaptoethanol

Saponinpuffer 0,1% BSA

0,3% Saponin

in PBS

TSB-Agar 15 g Tryptic Soy Broth

10 g Bacto Agar

500 ml Aqua destillata

TWEEN-Waschpuffer 0,05 % TWEEN-20 in PBS

# 3.1.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 1: Auflistung der verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper

Spezifi	Spezifität Klon		Fluorochrom	Hersteller			
α-ms	CD8α	53-6.7	PerCP	BD Pharmingen (Heidelberg)			
α-ms	Ly6C	AL-21	FITC	BD Pharmingen (Heidelberg)			
α-ms	TNF-α	MP6-XT22	PE-Cy7	BD Pharmingen (Heidelberg)			
α-ms	IL-6	MP5-20F3	PE	BioLegend (Fell)			
α-ms	IL-6Rα	D7715A7	PE	BioLegend (Fell)			
α-ms	CD11b	M1/70	PerCP	BioLegend (Fell)			
α-ms	CD4	RM4-5	APC	BioLegend (Fell)			
α-ms	CD11b	M1/70	PE	eBioscience (Frankfurt)			
α-ms	CD45	30-FII	AF700	eBioscience (Frankfurt)			
α-ms	F4/80	BM8	APC	eBioscience (Frankfurt)			
α-ms	Gr1	RB6-8C5	V450	eBioscience (Frankfurt)			
α-ms	CD8	53-6.7	PeCy7	eBioscience (Frankfurt)			
α-ms	CD19	eBio1D3	V450	eBioscience (Frankfurt)			
α-ms	CD16/CD23	2.4G2	-	BioXCell (New Hampshire, USA)			

Tab. 2: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen

Spezifität		Klon	Isotyp für	Fluorochrom	Hersteller
α-hu	CD45RA	HI100	IL-6R	PE	eBioscience (Frankfurt)
α-hu	CD154	24-31	IL-6	PE	Biolegend (Fell)
α-hu	CD39	eBioA1	TNF-α	PE-Cy7	eBioscience (Frankfurt)

# 3.1.4. ELISA

Alle Materialien stammen von R&D Systems (Wiesbaden).

Reagenzien und eingesetzte Konzentrationen:

# IL-6 ELISA (Mouse IL-6 DuoSet ELISA Development kit):

α-ms IL-6 polyklonaler Ak (Ratte) 2 μg/ml in PBS

biotinylierter α-ms IL-6 polyklonaler Ak (Ziege) 400 ng/ml in 1% BSA/PBS rekombinantes IL-6 (Maus) 1000 pg/ml bis 7,813 pg/ml

# sIL-6Rα ELISA:

 $\alpha$ -ms sIL-6R $\alpha$  α polyklonaler Ak (Ratte) 0,8 μg/ml in PBS

biotinylierter α-ms sIL-6Rα polyklonaler Ak (Ziege) 200 ng/ml in 1% BSA/PBS rekombinantes sIL-6Rα (Maus) 2000 pg/ml bis 15,625 pg/ml

# 3.1.5. Molekularbiologische Reagenzien

**DEPC** behandeltes Wasser GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) dNTP-Mix: 100 mM dTTP Lösung GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) 100 mM dATP Lösung 100 mM dCTP Lösung GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) 100 mM dGTP Lösung 5×Einzelstrang Puffer GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) HPLC-H<sub>2</sub>O für Chromatographie MERCK (Darmstadt) GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) 0,1 M DTT M-MLV Reverse Transkriptase GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) Random Primer GIBCO Invitrogen (Karlsruhe) **RNase OUT** GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

SYBR Green Jumpstart Tag ReadyMix Sigma (Steinheim)

Trizol Reagenz GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)

#### 3.1.6. Primer

Alle Primer stammen von Invitrogen (Karlsruhe).

Sie wurden in HPLC-H<sub>2</sub>O gelöst und als 100 μM Stocklösung bei –20°C gelagert.

Tab. 3: Primer für die quantitative real-time-PCR (qRT-PCR)

Name	Sequenz (in 5'-3'Richtung)								
188	vorwärts	CAG	GGC	CGG	TAC	AGT	GAA	AC	
	rückwärts	AGA	GGA	GCG	AGC	GAC	CAA	A	
CXCL1	vorwärts	GCA	CCC	AAA	CCG	AAG	TCA	TAG	
CHOLI	rückwärts	CAA	GGG	AGC	TTC	AGG	GTC	AA	
CXCL2	vorwärts	CAC	TGC	GCC	CAG	ACA	GAA		
011022	rückwärts	CAG	GGT	CAA	GGC	AAA	CTT	TTT	G
CCL2	vorwärts	GGC	TCA	GCC	AGA	TGC	AGT	TAA	
CCL <b>2</b>	rückwärts	CCT	ACT	CAT	TGG	GAT	CAT	CTT	GCT
IL-6	vorwärts	TGG	GAA	ATC	GTG	GAA	ATG	AGA	
12.0	rückwärts	AAG	TGC	ATC	ATC	GTT	GTT	CAT	ACA
TNF-α	vorwärts	AAA	TGG	CCT	CCC	TCT	CAT	CAG	Т
11(1 0	rückwärts	GCT	TGT	ACA	AAT	TTT	GAG	AAG	
SAA	vorwärts	AGA	GGA	CAT	GAG	GAC	ACC	ATT	GCT
~	rückwärts	AGG	ACG	CTC	AGT	ATT	TGT	CAG	GCA
Haptoglobin	vorwärts	TAT	GGA	TGC	CAA	AGG	CAG	CTT	TCC
1 0	rückwärts	TCG	CTG	TGG	TTC	AGG	AAG	AGG	TTT

#### 3.1.7. IL-6-Inhibitoren

- anti-IL-6 monoklonaler Antikörper (α-IL-6 mAk, Klon: MP5-20F3) (Starnes et al. 1990)
- lösliches gp130-Fc-Fusionsprotein (sgp130-Fc) (Jostock et al. 2001)
   Die IL-6-Ihibitoren wurden zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Rose-John, vom Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- <u>Kontrollantikörper:</u> humanes γ-Immunglobulin (humIgG)
   Dianova/Jackson Immuno Research (Hamburg)

#### 3.1.8. Bakterienstämme

Listeria monocytogenes, Stamm EGD (LmEGD) (Murray et al. 1926)
 Bereitgestellt von Prof. Stefan H.E. Kaufmann,
 Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin.

#### 3.1.9. Mausstämme

- C57BL/6J Wildtyp-Maus
   Jackson (Bar Harbor, USA)
- <u>IL-6 Knockout-Maus (IL-6<sup>KO</sup>)</u> (Kopf et al. 1994)
- sgp130Fc Transgen-Maus (sgp130Fc<sup>Tg</sup>) (Rabe *et al.* 2008)
   Zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Rose-John und Dr. Nathalie Jänner,
   Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- <u>CCR2 Knockout-Maus (CCR2<sup>KO</sup>)</u> (Engel *et al.* 2008, Kuziel *et al.* 1997)
   Zur Verfügung gestellt von Dr. Daniel Engel,
   Institut für Molekularmedizin und Experimentelle Immunologie, Universität Bonn.

#### 3.1.10. Besondere Geräte und Materialien

Agilent Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies (Waldbronn)

BD FACS Canto II BD (Heidelberg)
LAL-Test QCL – 1000<sup>®</sup> Cambrex Lonza (Köln)

Nanodrop 2000c Spectrophotometer Thermo Scientific (Schwerte)
StepOne Plus Real Time PCR System Applied Biosystems (Darmstadt)

Thermocycler T3 Biometra (Goettingen)

Tecan Rainbow 96 Monochrom. Microplate Reader Tecan (Mainz)

Die Standard-Labormaterialen (z.B. Plastikpipetten, Reaktionsröhrchen und Petrischalen) stammen von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhausen), Nunc (Langenselbold), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

#### **3.1.11. Software**

FACS Diva Software BD (Heidelberg)

GraphPad Prim Version 4.0 GraphPad Software (La Jolla, USA)
StepOnePlus Software v2.0 Applied Biosystems (Darmstadt)

Adobe Illustrater CS5 Adobe (Kalifornien, USA)

#### 3.2. Methoden

# 3.2.1. Tierexperimentelles Arbeiten

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde die Tötung von Versuchsmäusen mit anschließender Organentnahme zu wissenschaftlichen Zwecken durchgeführt. Die Aufzucht und Haltung, die intravenöse und intraperitoneale Injektion sowie die Tötung der Mäuse erfolgten unter Einhaltung des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG). Eine Ausnahmegenehmigung zur Durchführung der genannten Eingriffe und Behandlungen wurde durch die Hamburger Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz (Fachabteilung Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) erteilt.

#### 3.2.2. Bakterienkultur und Infektion

Die Infektion der Mäuse erfolgte mit *Listeria monocytogenes* des Stammes EGD (LmEGD). Es lag ein Bakterienstock mit einer Konzentration von 1,6×10<sup>9</sup> LmEGD/ml vor. Für die Herstellung dieses Bakterienstocks wurden die Listerien zunächst über Nacht in 200 ml Tryptic Soy Broth-Agar (TSB-Agar) kultiviert. Nach zweimaligem Waschen mit sterilem PBS und der Zentrifugation über 10 min bei 3000 rpm, wurde das Bakterienpellet in 100 ml sterilem PBS + 10% Glycerin aufgenommen. Die Bakterienkonzentration wurde durch Ausplattierung einer Verdünnungsreihe dieses Stocks bestimmt und die Lagerung erfolgte bei -80°C.<sup>1</sup>

Für die Infektion wurde die Stocklösung schrittweise mit PBS auf eine Konzentration von 10<sup>5</sup> LmEGD/ml verdünnt. Die Mäuse wurden mit 2×10<sup>4</sup> LmEGD/200 μl infiziert. Die Infektion erfolgte intravenös in die laterale Schwanzvene. Zur Kontrolle der Infektionsdosis wurde das Inokulum in drei Verdünnungsschritten auf TSB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und nach 48 h wurden die sichtbaren Kolonien ausgezählt (Bock 2011, Mittrücker *et al.* 2000). Werden C57BL/6 Wildtyp-Mäuse intravenös mit LmEGD infiziert, liegt die Letalitätsdosis<sub>50</sub> (LD<sub>50</sub>; Dosis, bei der 50% der Mäuse im Laufe der Infektion sterben) bei ca. 10<sup>4</sup> Bakterien (Erfahrungswert der Arbeitsgruppe von Prof. Mittrücker).

#### 3.2.3. Behandlung von Versuchsmäusen mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc

Für die Neutralisierung von IL-6 wurde den Mäusen ein monoklonaler anti-IL-6 Antikörper ( $\alpha$ -IL-6 mAk, Klon: MP5-20F3) oder ein lösliches gp130Fc-Fusionsprotein (sgp130-Fc) intraperitoneal injiziert<sup>2</sup>. Als Kontrollantikörper diente humanes IgG (humIgG). Der  $\alpha$ -IL-6 mAk ist ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte, der das IL-6 aus der Maus bindet und

19

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Diese Arbeitsschritte wurden von Valéa Schumacher (Medizintechnische Assistentin) durchgeführt.

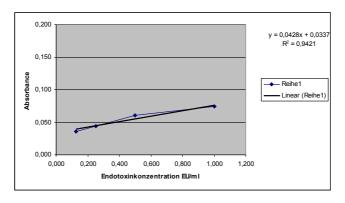
<sup>&</sup>lt;sup>2</sup> Der α-IL-6 mAk und das sgp130-Fc wurden von Prof. Stefan Rose-John (Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) zur Verfügung gestellt und die notwendigen Behandlungsdosen durch ihn vorgegeben.

somit antagonisiert (Starnes *et al.* 1990). Das chimäre sgp130Fc wurde aus dem extrazellulären Anteil zweier gp130-Proteinen und der Fc-Region von humanem γ-Immunglobulin 1 (IgG1) konstruiert (Jostock *et al.* 2001). Nach Mutationsanalysen wurde diese erste Konstruktion optimiert, wodurch sich die Affininität von sgp130Fc für den Rezeptor noch steigern ließ (Tenhumberg *et al.* 2008).

Der  $\alpha$ -IL-6 mAk lag in einer Konzentration von 1,42  $\mu$ g/ $\mu$ l in PBS vor und für eine Behandlungsdosis von 500  $\mu$ g/Maus (25 g/kg KG) wurden 350  $\mu$ l dieser Antikörperlösung verwendet. Das sgp130Fc-Fusionsprotein und das humane IgG wurden für die Behandlung auf 0,71  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt. Die Behandlungsdosis betrug jeweils 250  $\mu$ g (12,5 g/kg KG), in einem Volumen von 350  $\mu$ l.

# 3.2.4. Bestimmung von Endotoxinkonzentrationen

Mit dem chromogenen Limulus Amöbozyten Lysat-Test (LAL-Test) wurde untersucht, ob die Lösungen zur Behandlung der Versuchsmäuse mit Lipopoplysacchariden (LPS) (synonym: Endotoxin) verunreinigt waren. LPS ist ein Zellwandbestandteil gram Bakterien und würde in den Versuchsmäusen eine Immunantwort hervorrufen und so ihre Reaktion auf die Antikörperbehandlung und Infektion beeinflussen. Die Proben wurden gemäß Herstellerangaben mit LAL und chromogener Substratlösung inkubiert. Je nach Endotoxingehalt wurde eine enzymatische Farbreaktion ausgelöst, welche photometrisch bei 405-410 nm gemessen wurde. Die Optische Dichte (OD) korrelierte dabei direkt mit der Endotoxinkonzentration. Durch das Mitführen einer Endotoxin-Verdünnungsreihe ergab sich für die Absorption eine Standardkurve (Abb. 2) anhand derer die Endotoxinkonzentrationen in den Proben berechnet wurden.



**Abb. 2: Endotoxin-Standardkurve** Für den LAL-Test wurde der Endotoxingehalt in einer Standardreihe durch Absorptionsmessung bestimmt. Es wurden Endotoxin-Konzentrationen von 1, 0,5, 0,25 und 0,125 EU/ml gemessen. Unter Standardbedingungen ist die Absorption bei 405-410 nm linear in den Konzentrationsbereichen 0.1 bis 1.0 EU/ml Endotoxin. Dabei entspricht 1 Endotoxineinheit/ml (1 EU/ml) einer Konzentration von ca. 0.2 ng/ml.

#### 3.2.5. Isolierung von Leukozyten aus Milz und Leber

# 3.2.5.1. Organentnahme

Die Mäuse wurden mit einer Gasmischung aus 80% CO<sub>2</sub> und 20% O<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch Einleitung von reinem CO<sub>2</sub> sowie durch einen Genickbruch getötet. Das Bauchfell wurde mit Ethanol (70%) desinfiziert. Haut und Peritoneum wurden aufgeschnitten und die Bauchhöhle eröffnet, durch Entfernung des vorderen knöchernen Brustkorbes wurde das Herz zugänglich. Für die durchflusszytometrische Analyse wurden den Mäusen Milz und Leber entnommen. Die Leber wurde vor der Entnahme über die Pfortader mit 5 ml PBS perfundiert und Blutkoagel wurden abgespült. Milz und Leber wurden nach der Entnahme sofort auf Eis gelagert.

#### 3.2.5.2. Gewebeverdau

Die Milz bzw. Leber wurde zunächst mit der Schere zerkleinert und in eine Glasflasche mit 20 ml RPMI 1640 (versetzt mit 5% fötalem Kälberserum (FCS), 2 mM Glutamin und 50 µg/ml Gentamycin) transferiert. Nach Zugabe von jeweils 5 mg Kollagenase D und Kollagenase VIII sowie 200 U DNAse (entspricht 300 µg DNAse) erfolgte die Inkubation für 45 min bei  $37^{\circ}\text{C}$ , unter Rühren im Wasserbad.

Auf den Gewebeverdau wurde verzichtet, wenn die Leukozyten mit dem anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper (α-IL-6R Ak) gefärbt werden sollten, da die Inkubation bei 37°C zu einer Abspaltung des IL-6-Rezeptors von der Zelloberfläche führen kann.

#### 3.2.5.3. Aufreinigung von Milzzellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der gesamte Inhalt der Glasflasche in ein Ø200μm Metallsieb (Regenerierservice & Labortechnik Firma Franz, Berlin) geschüttet und das Organ zusätzlich mit einem Spritzenstempel durch das Sieb hindurch gedrückt. Anschließend wurde das Sieb mit 25 ml PBS gespült. Die entstandene Zellsuspension wurde in einer Petrischale aufgefangen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1100 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Auch die folgenden Zentrifugationsschritte erfolgten bei diesen Einstellungen.

Die Erythrozyten wurden durch die Inkubation mit Erythrozytenlysepuffer aus der Zellsuspension entfernt, hierfür wurde das Zellpellet mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion mit 12 ml eiskaltem PBS. Die Zellsuspension wurde anschließend durch ein feines Zellsieb, Porengröße 70 µm (Cell Strainer, BD), in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet mit 5 ml PBS resuspendiert und auf Eis gelagert.

#### 3.2.5.4. Aufreinigung von Leberzellen

Die Leber wurde durch ein Metallsieb filtriert. Die entstandene Zellsuspension wurde in einer Petrischale aufgefangen und nach Zugabe von 25 ml PBS über ein feines Zellsieb (Porengröße 70  $\mu$ m) in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die Trennung der Leberparenchymzellen von den Leberleukozyten erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung eines zweistufigen Percollgradienten (40% über 70% Percoll). Die Zentrifugation erfolgte für 20 min bei 1600 rpm ohne Abbremsung, um ein Vermischen der Phasen zu verhindern. Durch die Zentrifugation sammelten sich die Leberparenchymzellen in der obersten Schicht und wurden verworfen. Am Boden des Reaktionsgefäßes befanden sich die Erythrozyten, in der Interphase die Leukozyten. Beide Fraktionen wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gewaschen<sup>3</sup>. Anschließend erfolgte die Erylyse mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer, für 2 min bei Raumtemperatur. Gestoppt wurde die Reaktion mit 12 ml eiskaltem PBS. Nach einem weiteren Wasch-Schritt wurde das Gefäß gründlich abgetupft. Das Pellet wurde in dem Rücklauf des im Reaktionsgefäß enthaltenen PBS resuspendiert, wodurch sich ein Volumen von ca. 100 μl ergab. Das Volumen wurde je nach Bedarf durch Zugabe von PBS angepasst, um ein gleichmäßiges Volumen in allen Leberzellsuspensionen zu erhalten.

# 3.2.6. Extrazelluläre Färbung von Zellen

Für die extrazelluläre Färbung mit fluorochrom-markierten Antikörpern wurde zunächst die Leukozytenzahl in der Einzelzellsuspension ermittelt. Zur Zellzählung wurden die Zellsuspensionen aus Milzen und Lebern 1:10 in 0,5 w/v Trypanblaulösung verdünnt, um tote Zellen durch die Trypanblau-Anfärbung auszuschließen. Die Zählung erfolgte mithilfe einer Neubauer-Zählkammer, auf die 10 µl der angefärbten Zellsuspension gegeben wurden. Die vitalen Leukozyten wurden anschließend unter dem Mikroskop gezählt. Zur Berechnung der Zellkonzentration diente die Formel:

 $Mittelwert\ aus\ 2\ Quadranten\times 10^4\ (Kammerfaktor)\times 10\ (Verdünnungsfaktor)=Zellzahl/ml.$ 

Die Milzzellen wurden anschließend gewaschen und das Pellet mit entsprechend viel PBS versetzt, um eine Zellsuspension mit ca. 2×10<sup>6</sup> Zellen in 100 μl zu erhalten. Bei der Leber wurde die gesamte Zellsuspension verwendet, ebenfalls in einem Volumen von 100 μl PBS. Jeweils 100 μl der Zellsuspensionen von Milz und Leber wurden in FACS-Röhrchen (BD Falcon, 5 ml Polystyrene Tube) überführt. Unspezifische Antikörperbindungen wurden vermieden durch die fünfminütige Inkubation mit 1 μl nativem Rattenserum (NRS), 0,5 μl Fc-Block (anti-CD16/CD32 mAk) und 18,5 μl PBS bei Raumtemperatur.

22

<sup>&</sup>lt;sup>3</sup> Als "Waschen" wird auch im Folgenden das Auffüllen mit PBS und die anschließende Zentrifugation für 5 min bei 1100 rpm bezeichnet. Der Überstand des Zentrifugats wird verworfen und das Pellet weiterverwendet.

Es schloss sich die Färbung mit fluorochrom-markierten Antikörpern an. Die Auswahl der Antikörper erfolgte je nach Versuchsziel, die erforderliche Antikörpermenge wurde durch vorherige Titration bestimmt. Tote Zellen wurden durch Anfärbung mit 1,3μM Pacific Orange Succinimidyl Ester (PacO) von der Analyse ausgeschlossen. Der Antikörper-Cocktail wurde in einem Volumen von 100 μl PBS auf die Zellsuspension gegeben und für 20 min in Dunkelheit und auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Färbung heruntergewaschen und das Pellet mit 100 μl PBS resuspendiert. Bis zur Analyse wurde die Zellsuspension auf Eis lichtgeschützt gelagert.

# 3.2.7. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Zur Bestimmung der Zytokinproduktion wurden Milzzellen stimuliert, extrazellulär gefärbt und nach der Fixation und der Perforation der Zellmembran intrazellulär gefärbt. Aufgrund der geringen Zellausbeute aus der Leber wurden die intrazellulären Färbungen nur an Milzzellen vorgenommen.

# 3.2.7.1. Stimulation von Milzzellen

Durch verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) können körpereigene Zellen bakterielle Zellwandbestandteile erkennen. Im Falle von *L. monocytogenes* wird die Lipoteichonsäure durch den TLR2 und das Flagellin durch den TLR 5 erkannt (Kawai und Akira 2006). Diese Erkennung führt zu einer vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie zum Beispiel TNF-α (Corr und O'Neill 2009, Seki *et al.* 2002). Um die Milzzellen *in vitro* spezifisch zur Zytokinproduktion zu stimulieren wurden hitzegetötete Listerien (HKL) verwendet. Die HKL stammen aus einem Stock, der 1,6×10<sup>9</sup> LmEGD/ml enthält. Die Abtötung erfolgte bei 80°C für 30 min.

Für die Stimulation wurden von jeder Milz  $2\times10^6$  Zellen, in einem Volumen von  $100~\mu l$  PBS, eingesetzt. Die Zellsuspension wurde mit  $900~\mu l$  RPMI komplett und  $10~\mu l$  HKL versetzt und im Brutschrank für 6~h bei  $37^{\circ}$ C stimuliert. Während der letzten 4~h wurde  $10\mu g/m l$  Brefeldin A zur Inhibition des Golgi-Vesikel Transports hinzugegeben. Als Kontrolle wurde für jede Milz ebenfalls eine Inkubation ohne HKL durchgeführt. Nach 6~h wurden die Stimulationsansätze gewaschen.

# 3.2.7.2. Intrazelluläre Färbung von Milzzellen

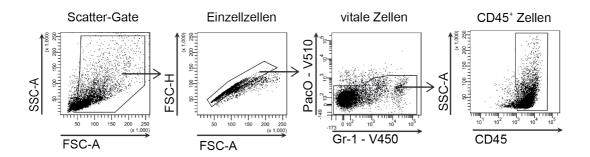
Nach der Stimulation erfolgte zunächst die extrazelluläre Färbung der Zellen, wie oben beschrieben. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Zellpellet mit 200 µl PBS + 2% PFA (Paraformaldehyd) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS + 0,2% BSA gewaschen. Dann wurden die unspezifischen Bindungen durch die zehnminütige Inkubation in Saponinpuffer + 0,2% natürlichem Rattenserum gesättigt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss. Saponin macht als mildes Detergenz die Zellmembran porös und sorgt so dafür, dass die intrazellulären

Strukturen für die Antikörper zugänglich werden. Anschließend erfolgte die eigentliche Antikörperfärbung mit den entsprechenden Antikörpern des Versuchs, die auch in Saponin-Puffer verdünnt wurden. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und entweder mit 100 µl PBS versetzt und im FACS analysiert oder mit 100 µl PBS + 1% PFA fixiert und bis zur Messung bei 4C° aufbewahrt (Bock 2011, Mittrücker *et al.* 2007).

# 3.2.8. Durchflusszytometrische Charakterisierung und Analyse von Leukozyten

Mittels Durchflusszytometrie werden Eigenschaften wie Größe, Granularität, Expression von Oberflächenmolekülen und auch die intrazelluläre Produktion von Proteinen, wie zum Beispiel Zytokinen, gemessen. Die Eigenschaften jeder einzelnen Zelle einer Zellsuspension werden erfasst und in elektronische Signale umgewandelt. Diese Daten werden zweidimensional in Punktwolken dargestellt und ermöglichen die qualitative, wie auch quantitative Analyse von Zellen bzw. Zellpopulationen.

Die gefärbten Einzelzellsuspensionen aus Milz und Leber wurden mit dem Gerät FACS Canto II analysiert. Je nach Versuchsziel wurden fluorochrom-gekoppelte Antikörper eingesetzt, die die interessierenden Zellbestandteile binden und markieren. Zunächst wurden, wie in Abb. 3 dargestellt, alle vorhandenen Zellen in einer Punktwolke angezeigt.



**Abb. 3: Eingrenzung von lebenden CD45**<sup>+</sup> **Zellen** Aussage über die Zellgröße gibt das Vorwärtsstreulicht (foreward scatter, FSC). Die Granularität von Zellen wird über das Seitwärtsstreulicht (sideward scatter, SSC) gemessen. Durch die Eingrenzung mithilfe dieser Parameter wurden Zelltrümmer und Verschmutzungen aus der Analyse ausgeschlossen. Bei einzelnen, rundförmigen Zellen sind FSC-H (FSC-height, Höhe des FSC-Signals) und FSC-A (FSC-area, Fläche des FSC-Signals) proportional zueinander, bei adhärierten Zellen ist FSC-A deutlich höher als FSC-H. Diese sog. Doubletten wurden aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die toten Zellen binden mehr Pacific Orange (PacO) (extra- und intrazellulär) und strahlen deutlich stärker in den V500-Kanal. Die vitalen Zellen konnten so gegen die toten Zellen abgegrenzt werden. Von diesen Zellen wurde nur die Population weiter analysiert, die deutlich CD45<sup>+</sup> war.

Über mehrere Schritte wurden die lebenden und CD45-positiven (CD45<sup>+</sup>) Zellen eingegrenzt; bei dieser Population handelt es sich um die gesamten Leukozyten (Abb. 3). Innerhalb der so isolierten Zellen wurden verschiedene Zellpopulationen eingegrenzt, insbesondere die Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten. Die Eingrenzung dieser Zellen wird im Ergebnisteil (Kap. 4.1.1, Abb. 9) erläutert.

Zur Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen wurde ihr jeweiliger prozentualer Anteil an den CD45<sup>+</sup> Zellen berechnet. Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen ermittelt,

basierend auf den Zellzahlen, die während der Organaufreinigung ermittelt wurden. Die Ergebnisse entsprachen den relativen Werten. Aufgrund der einfacheren Durchführbarkeit wurden deshalb in dieser Arbeit die relativen Werte für die Quantifizierung gewählt.

# 3.2.9. Bestimmung von Listerientitern in Milzen und Lebern

Die Bestimmung von Listerientitern in Milz und Leber diente dazu, den Grad der Listerieninfektion in den Mäusen zu quantifizieren. Das halbe Organ wurde in einen sterilen Flüssigprobenbeutel (Nasco WhirlPak, Roth) mit 2 ml 0,5% Triton X-100/PBS überführt. Triton X-100 führt als Detergenz zur Auflösung von Zellmembranen. So können intrazelluläre Bakterien aus der Zelle gelangen und extra- und intrazelluläre Listerien insgesamt quantifiziert werden.

Durch das Reiben mit einem Plastikspatel auf dem verschlossenen Flüssigprobenbeutel, wurde das Organ so lange gequetscht, bis eine homogene Zellsuspension vorlag. Von dieser wurden vier sukzessive 1:10 Verdünnungen, ebenfalls mit sterilem 0,5% Triton X-100/PBS, durchgeführt. Die vier Verdünnungsstufen wurden zu 50 µl auf TSB-Agar-Platten ausplattiert und für 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Listerienkolonien gezählt (Abb. 4).

Für die Berechnung der Kolonien formenden Einheiten (Colony Forming Units, CFU) wurden nur Koloniezahlen von 10 bis 250 berücksichtigt. Die nach obigem Schema erreichten Verdünnungsstufen der Zellsuspension (1:400, 1:4.000, 1:40.000 und 1:400.000), ließen ein minimales Detektionslimit von 400 CFU pro 2 ml Zellsuspension zu.



Abb. 4: TSB-Agarplatte mit Kolonien von *Listeria monocytogenes* Die Listerien wurden, nach dem Ausplattieren mit einer sterilen Impföse, für 48 h inkubiert und die gewachsenen Kolonien anschließend quantifiziert

#### 3.2.10. Serum-ELISA

Für die Serum-Analyse mittels ELISA wurde bei der Organentnahme sofort nach Eröffnung des Brustkorbes mit der Spritze aus den Herzkammern Blut entnommen. Das Blut wurde in spezielle Reaktionsgefäße (SST Tubes, BD Microtainer) überführt. Durch die Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm wurden die zellulären Bestandteile durch eine Gelschicht vom Serum getrennt. Das Serum wurde bis zur Analyse in Eppendorf-Tubes bei -80°C gelagert. Mittels Sandwich-ELISA wurde der Gehalt von IL-6 und löslichem IL-6-Rezeptor (sIL-6Rα) im Blut der Mäuse bestimmt.<sup>4</sup> Die Serumproben wurden in PBS + 1% BSA verdünnt (IL-6 1:10; sIL-6Rα 1:10 oder 1:100), um messbare Werte im Bereich der Standardreihe zu erhalten. Von Standards und Serumproben wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die Abfolge der Arbeitsschritte und die eingesetzten Puffer und Reagenzien waren in beiden ELISA-Untersuchungen (IL-6 und sIL-6Rα) gleich. Inkubiert wurde stets bei Raumtemperatur. Zunächst wurden die 96-Napf ELISA-Platten mit den entsprechend verdünnten Fänger-Antikörpern (50 μl/Napf) beschichtet und über Nacht inkubiert (α-IL-6 bzw. α-sIL-6Rα polyklonaler Antikörper). Nach der Inkubation wurde dreimal mit 300 μl Waschpuffer (PBS + 0,05% TWEEN-20) gewaschen. Die Inkubation mit 200ul μl PBS + 5% BSA pro Well für 1 h wurde durchgeführt, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Nach einem weiteren Waschschritt wurden die Serum-Proben bzw. die Standardreihe aufgetragen, jeweils in einem Volumen von 50 μl.

Nach zweistündiger Inkubation wurden die Platten gewaschen. Daraufhin wurden 50  $\mu$ l des jeweiligen Detektionsantikörpers (biotinylierter  $\alpha$ -IL-6 bzw.  $\alpha$ -sIL-6R $\alpha$  polyklonaler Antikörper) in die Näpfe pipettiert und erneut für 2h inkubiert. Der Detektionsantikörper wurde weggewaschen und die Näpfe wurden mit der an Streptavidin gekoppelten Peroxidase (Streptavidin-HRP) für 30 min in Dunkelheit inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Substratlösung (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin) hinzugegeben (50  $\mu$ l/Napf). Zum Stoppen der Farbreaktion wurden 1,8 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> hinzugeben. Die Farbreaktion wurde in dem ELISA-Lesegerät (Tecan Rainbow 96 Monochromatic Microplate Reader, Tecan, Mainz) bei 450 nm gemessen.

-

<sup>&</sup>lt;sup>4</sup> Die ELISA-Untersuchungen erfolgten im Rahmen der Kooperation mit Prof. Stefan Rose-John und Dr. Nathalie Jänner, am Institut für Biochemie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

# 3.2.11. Molekularbiologische Methoden

Aus Milzen und Lebern wurde Ribonukleinsäure (RNA) isoliert und diese in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben. So konnte anschließend über spezifische Primer die Expression bestimmter Zytokine und Chemokine durch die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR) analysiert werden.

#### 3.2.11.1. Isolation von RNA mittels Trizol Reagenz

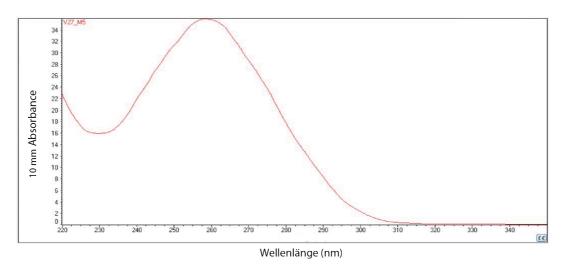
Milz bzw. Leber wurde entnommen und gleich nach der Entnahme wurde ein Teil des Organs (Milz: ca.  $\frac{1}{4}$ , Leber: ca  $3\times3\times3$  mm des Gewebes) in 300  $\mu$ l Trizol-Reagenz überführt und in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) schockgefroren. So wurde der Gewebeverdau durch Endonukleasen verhindert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Organe bei  $-80^{\circ}$ C gelagert.

Als erstes wurde das in 300 µl Trizol-Reagenz enthaltene Gewebestück mechanisch zerkleinert. Hierfür wurde eine 3 mm durchmessende Metallkugel (Tungsten Carbide Bead, Qiagen, Hilden) in das Eppendorf Tube gegeben und das Organ für 5 min bei einer Frequenz von 30/s im Tissue Lyser (Qiagen, Hilden) geschüttelt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten an der RNAse-freien Arbeitsbank unter dem Abzug, mit RNase-freien Materialien. Inkubiert wurde stets bei Raumtemperatur und alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Gewebesuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit zusätzlichen 700 µl Trizol-Reagenz für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion nach Cholmczynski und Sacchi (1987) durchgeführt: die Trizol-Gewebesuspension wurde mit 200 µl Chloroform versetzt und für 2,5 min inkubiert. Durch die Zentrifugation für 15 min bei 10600 rpm erfolgte die Auftrennung in verschiedene Phasen: Proteine und Lipide wurden denaturiert und sammelten sich in der Interphase, welche wässrige und organische Phase trennt. Die RNA sammelt sich in der wässrigen (oberen) Phase, die DNA in der organischen (unteren) Phenol-Phase. Die RNA wurde abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 500 μl Isopropanol hinzugegeben und die RNA durch 10-minütige Inkubation und Zentrifugation für 10 min bei 10600 rpm am Boden des Reaktionsgefäßes ausgefällt. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol und durch Zentrifugation 7 min bei 10500 rpm. gewaschen. Der Überstand wurde komplett entfernt und das Pellet an der Luft getrocknet. Zuletzt wurde das Pellet in 20 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst und als RNA-Stock bei -80°C gelagert.

#### 3.2.11.2. Bestimmung von Konzentration und Qualität der isolierten RNA

Die Konzentration der suspensierten RNA wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD) an einem Spektrophotometer (Nanodrop 2000c, Thermo Scientific, Schwerte) bei 260 nm bestimmt. Für die Messung wurde der RNA-Stock 1:10 mit  $H_2O$  verdünnt und 2  $\mu$ l davon auf das Messgerät aufgetragen. Für 1  $A_{260}$  Unit beträgt die spektrophotometrische Äquivalente 40  $\mu$ g/ml RNA.

Mit dem Nanodrop-Spektrophotometer lässt sich zusätzlich die Reinheit der isolierten RNA bestimmen, da die Absorption insgesamt in einem Wellenlängenspektrum von 220 nm bis 350 nm gemessen wird (**Abb. 5**). In diesem Bereich können Verunreinigungen durch Proteine, Phenol oder Kohlenhydrate die Absorptionsrate beeinflussen. Werden Absorptionsquotienten von  $A_{260/280}\sim2$  bzw.  $A_{260/230}\sim2,2$  erreicht, kann die isolierte RNA als rein angesehen werden. Diese Werte wurden bei der RNA-Aufreinigung in dieser Arbeit stets angestrebt.



**Abb. 5: Spektrophotometrische Messung der RNA** Exemplarisch wird die optischen Dichte von, aus Milz isolierter, RNA als Messkurve dargestellt. Für dieses Organ wurden folgende Messergebnisse erzielt: Konzentration<sub>RNA</sub> =1429 ng/ $\mu$ l; Absorptionsquotienten:  $A_{260/280}$  =2,01 und  $A_{260/230}$ =2,25. Die isolierte RNA aus diesem Organ kann also als rein angesehen werden.

Neben der Verunreinigung der RNA kann es zur Degradation in RNA-Fragmente kommen. Um zu überprüfen, ob eine Degradation der RNA bestand, wurden RNA-Proben mit dem Agilent Bioanalyzer 2100 (Fa. Agilent Technologies GmbH, Böblingen) untersucht.<sup>5</sup>

Der Grad der RNA-Degradation wurde anhand des RNA-Integritätsindexes (RIN) bestimmt. Für die cDNA-Synthese und qRT-PCR sollte der RIN >7 sein, was bei den untersuchten Proben der Fall war. Diese Untersuchung wurde nur exemplarisch für acht Proben durchgeführt, da nicht jede einzelne Probe untersucht werden konnte. Das Protokoll zur RNA-Synthese war jedoch bereits etabliert und wurde für jede RNA-Isolation verwendet,

\_

<sup>&</sup>lt;sup>5</sup> Diese Messung wurde durch Kristin Klätschke von der Core Facility Micro-Array-Analytik (Institut für Klinische Chemie, UKE) durchgeführt.

daher konnte in allen Experimenten von einem ausreichend hohen RIN-Wert ausgegangen werden.

#### 3.2.11.3. cDNA-Synthese

Für die Expressionsanalyse mittels qRT-PCR wurde die isolierte RNA in cDNA umgeschrieben. Alle Arbeitsschritte wurden an einem RNase-freien Arbeitsplatz durchgeführt. Zunächst wurde der RNA-stock mit DEPC-H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 100 ng/μl verdünnt, so war in allen RNA-Proben die gleiche Menge an RNA vorhanden. In dem ersten Syntheseschritt wurden 2 μl der verdünnten RNA mit dem Reaktionsansatz 1 (s.u.) versetzt und im Thermocycler T3 (Biometra, Goettingen) für 5 min bei 65°C inkubiert. Daraufhin wurde auf 4°C heruntergekühlt. Dann wurde der Reaktionsansatz 2 (s.u.) hinzugegeben und die Probe für 50 min bei 37°C und im Anschluss 15 min bei 70°C inkubiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Reaktionsansatz 1: Hexamer Primer 1:30 (1 μl)

dNTPs (1 μl)

DEPC-H<sub>2</sub>O (8 μl)

Reaktionsansatz 2: Einzelstrang-Puffer (4 μl)
0,1 M DTT (2 μl)
M-MLV RT (1 μl)

DEPC- $H_2O(1 \mu l)$ 

# 3.2.11.4. Durchführung der qRT-PCR

Die qRT-PCR wurde in RNase-freien 96-Napf-Platten durchgeführt. Für die Detektion und Quantifizierung wurde SYBR Green (SYBR Green Jumpstart Tag ReadyMix, Sigma, Steinheim) verwendet. Neben einem unspezifischen Farbstoff, der sich in DNA-Doppelstränge einlagert, sind in diesem Reagenz auch die Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und eine Desoxyribonukleinsäure-Polymerase (DNA-Polymerase) enthalten. Für die qRT-PCR wurden 1,5 µl cDNA mit dem Reaktionsansatz (s.u.) versetzt.

Reaktionsansatz für die qRT-PCR:

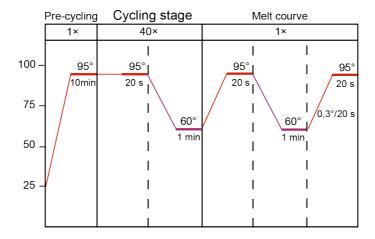
SYBR Green (6,25 µl)

1 μM vorwärts Primer (1,25 μl)

1 μM rückwärts Primer (1,25 μl)

HPLC-  $H_2O$  (2,25 µl)

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Anschließend wurde die 96-Napf-Platte mit einer Klebefolie verschlossen, kurz auf dem Vortexer geschüttelt und für 90 sec bei 1200 rpm zentrifugiert. Für die Messung wurde das PCR-Gerät StepOne Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Der Zyklenablauf der PCR-Reaktion ist in **Abb.** 6 dargestellt.



**Abb. 6:** Reaktionszyklen der qRT-PCR Durch den *Pre-Cycling*-Schritt wird zunächst die DNA-Polymerase aktiviert, die zuvor durch den JumpStart Taq Antikörper blockiert war. Es folgen 40 Zyklen, in denen die Temperatur zwischen 95°C und 60°C Abwechselt. Im Anschluss an die eigentliche PCR findet die Schmelzkurvenanalyse statt, durch die Fehlamplifikate aufgezeigt werden können. Abbildung nach Applied Biosystems, Darmstadt.

# 3.2.11.5. Auswertung der qRT-PCR

Der unspezifische Farbstoff SYBR-Green lagert sich in DNA-Doppelstränge ein und gibt ein fluoreszierendes Signal ab (Abb. 7). Dieses Fluoreszenzsignal ist daher umso stärker, je mehr DNA gebildet wird. Zu Beginn der qRT-PCR liegt wenig cDNA vor, welche mit dNTPs und der Polymerase reagieren könnte. Nach einigen Zyklen sind die Reaktionsbedingungen optimal, es kommt zu einem exponentiellen Anstieg der Menge an cDNA und damit des Fluoreszenzsignals. Schließlich ist der Reaktionsansatz aufgebraucht und die inzwischen große Menge an cDNA kann nicht mehr vervielfacht werden, das Plateau ist erreicht.

Die Zyklenzahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal deutlich vom Hintergrundsignal abhebt und ansteigt, wird als Ct-Wert bezeichnet (Abb. 7). Zu diesem Zeitpunkt ist in jedem Reaktionsansatz gleich viel neugebildete cDNA enthalten. Je mehr das Zielgen exprimiert wird, desto niedriger ist also der Ct-Wert. Der Ct-Wert ist alleine allerdings noch nicht aussagekräftig, er muss erst noch für jedes Organ normiert werden. Die Normierung geschieht durch die Relation zu einem Ct-Wert für ein aktivierungsunabhängiges Genprodukt, ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen. In dieser Arbeit wurde hierfür die ribosomale 18S-RNA verwendet. Die Durchführung der qRT-PCR für 18S erfolgte wie oben beschrieben, allerdings mit 1:500 verdünnter cDNA im Reaktionsansatz.

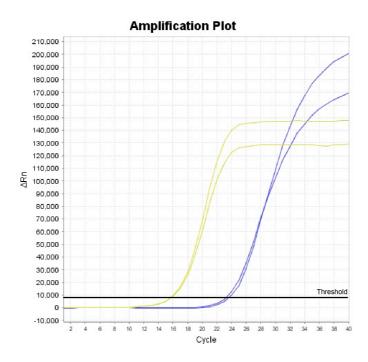
Aus  $Ct_{18S}$  und  $Ct_{Zielgen}$  wurde der  $\Delta Ct$ -Wert wie folgt berechnet:

$$\Delta Ct = Ct_{Zielgen} - Ct_{18S}$$

Um zu quantifizieren, ob es in den kranken bzw. behandelten Tieren zu einer vermehrten oder verminderten zytokinspezifischen mRNA-Produktion kommt, wurden die entsprechenden  $\Delta$ Ct-Werte in Relation zu den  $\Delta$ Ct-Werten gesunder und unbehandelter Tiere gesetzt:

$$Relative\ Expression = 2^{\ (\Delta Ct(unbehandelt)\ -\ \Delta Ct(behandelt))} = 2^{\Delta \Delta Ct}$$

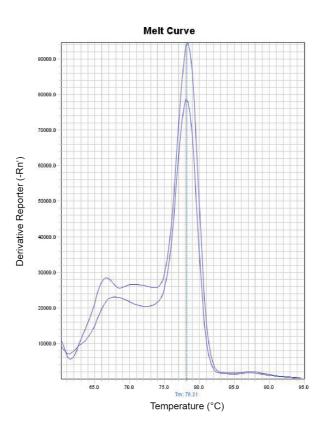
In dieser Arbeit wurde die Expression von Chemokinen bzw. Zytokinen stets als Relative Expression dargestellt.



**Abb. 7: Amplifikationskurve der qRT-PCR** In der Amplifikationskurve wird während der Messung angezeigt, um wieviel das Fluoreszenzsignal mit steigender Zyklenzahl zunimmt ( $\Delta$ Rn). Der Zyklus, in dem sich das Fluorseszenzsignal deutlich vom Hintergrund abhebt und einen Schwellenwert (Threshold) überschreitet, stellt den Ct-Wert dar. Exemplarisch ist hier die Messung von cDNA aus einer Milz gezeigt. Der Ct-Wert liegt hier für IL-6 (blau) bei ~23 und für 18S (gelb) bei ~16.

#### 3.2.12. Schmelzkurvenanalyse

Die qRT-PCR ist eine sehr sensitive Methode zur Quantifizierung von cDNA. Da es aber auch zu Fehlamplifikationen kommen kann, ist sie nicht immer spezifisch. Daher schließt sich an jede PCR eine Schmelzkurvenanalyse an. Wenn die spezifische Schmelztemperatur einer DNA-Fraktion erreicht ist, trennen sich die DNA-Stränge auf und das Fluoreszenzsignal nimmt ab. Bei einer Auftrennung spezifischer Segmente sollte nur ein Maximum auftreten (Abb. 8).



**Abb. 8: Schmelzkurvenanalyse** Die DNA aus den Reaktionsprodukten der qRT-PCR wurde um 0,3°C/s von 60°C auf 95°C erhitzt. Mit der zunehmenden Temperatur wird die gebildete DNA wieder aufgetrennt und das SYBR-Green allmählich freigesetzt. Bei einer bestimmten Temperatur kommt es zu einem maximalen Fluoreszenzabfall, dies ist die Schmelztemperatur, die spezifisch für ein DNA-Produkt ist. Die Schmelzkurve wird hier graphisch als Ableitung des Fluoreszenzsignals dargestellt, das Maximum der Kurve zeigt damit die Schmelztemperatur an. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine DNA-Probe aus der Milz, in der die mRNA-Expression von IL-6 gemessen wurde. Die Schmelztemperatur des IL-6 Genprodukts liegt bei ca. 78°C und es findet sich kein weiteres Maximum. Dies spricht dafür, dass nur die IL-6 cDNA vervielfältigt wurde.

#### 3.2.13. Statistik

In den verschiedenen Experimenten wurden stets drei bis vier Gruppen von jeweils fünf bis sieben Tieren untersucht und die ermittelten Werte miteinander verglichen. Bei den Listerientitern, der FACS-Analyse und der qRT-PCR wurden die Ergebnisse aus Milz und Leber getrennt anaylsiert und keine Vergleiche der Organe untereinander durchgeführt.

Die Werte für die Listerientiter, FACS-Analyse, ELISA-Messungen und qRT-PCR wurden logarithmiert und anschließend mit einer One-way ANOVA und dem Bonferroni Multiple post hoc Test auf Signifikanz getestet. Beim Vergleich von nur zwei Gruppen wurde der exakte Mann-Whitney-Test der logarithmierten Werte angewendet. Als signifikant wurden Unterschiede mit einem p-Wert von <0.05 bezeichnet: \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0.001.

Die Ergebnisse der Listerientiter und der qRT-PCR wurden graphisch als Scatter Plot dargestellt und für jede Gruppe wurde der Median angezeigt. Als Balkendiagramme wurden die Ergebnisse aus der durchflusszytometrischen-Analyse und den ELISA-Messungen veranschaulicht, es ist jeweils das arithmetische Mittel ± Standardabweichung (SD) angegeben.

Im Text beschriebene Ergebnisse verstehen sich als gerundete Durchschnittswerte der verschiedenen untersuchten Gruppen und die statistischen Analysen und Berechnungen beziehen sich ebenfalls auf diese Mittelwerte.

Für die Analyse der Korrelation zwischen relativer mRNA-Expression und Listerientitern wurden die jeweiligen Werte logarithmiert und als Punktwolke dargestellt. Durch die Punktwolke wurde eine lineare Gerade gelegt. Je nach Möglichkeit wurden der Korrelationskoeffizient r sowie der zugehörige p-Wert ermittelt.

Für die statistische Analyse wurde die Software GraphPad Prim Version 4.0 (La Jolla, USA) verwendet. Die graphischen Darstellungen wurden ebenfalls mit diesem Programm erstellt und anschließend mit Adobe Illustrater CS5 (Kalifornien, USA) bearbeitet. Die Abbildungen, in denen Punktwolken der durchflusszytometrischen Analyse enthalten sind, wurden nach einem Protokoll von Weber und Fehse (2009) erstellt.

#### 4. ERGEBNISSE

# 4.1. Die angeborene Immunantwort auf *Listeria monocytogenes* in Wildtyp-Mäusen

In der vorliegenden Arbeit wurde die angeborene Immunantwort auf *L. monocytogenes* untersucht. Als Zellen des angeborenen Immunsystems konnten die Granulozyten und die Inflammatorischen Monozyten in gesunden und infizierten Mäusen bestimmt und quantifiziert werden. Zudem wurde die Produktion von IL-6 und weiteren Entzündungsmediatoren sowie die Expression des IL-6-Rezeptors während der frühen Listerieninfektion analysiert.

#### 4.1.1. Charakterisierung von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten

Die Analyse der angeborenen Immunantwort auf L. monocytogenes wurde sowohl in nichtinfizierten Mäusen, denen als Kontrolle steriles PBS injiziert worden war, als auch in infizierten Wildtyp-Mäusen an d1, d2 und d3 post infectionem (p.i.) durchgeführt. Die Infektion erfolgte intravenös mit  $2\times10^4$  Listerien. Nach der Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Zellen extrazellulär mit folgenden Antikörpern markiert:

Antigen	Ak (Klon)	Fluorochrom
CD45	30-FII	AF700
CD11b	M1/70	PE
F4/80	BM8	APC
Gr-1	RB6-8C5	V450
Ly6C	AL-21	FITC
CD8α	53-6.7	PerCP
CD4	RM4-5	PE-Cy7
PacO		Pacific Orange

Aus der schrittweise eingegrenzten Population der lebenden CD45<sup>+</sup>-Zellen (Gesamt-Leukozyten) (vgl. Kap. 3.2.8, **Abb. 3**) konnten in einem nächsten Schritt die CD11b<sup>+</sup> (myeloiden) Zellen und die CD11b<sup>-</sup> (lymphoiden) Zellen identifiziert werden (**Abb. 9**). Unter den CD11b<sup>-</sup> Zellen und Zellen mit niedriger CD11b Expression befinden sich die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (**Abb. 9**), sowie auch B-Zellen und Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen). Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt allerdings auf den CD11b<sup>+</sup> Zellen und als Bestandteil dieser Zellpopulation konnten die Granulozyten als CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>high</sup> Ly6C<sup>int</sup> F4/80<sup>neg</sup> und die Inflammatorischen Monozyten als CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> Ly6C<sup>high</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup> definiert werden (**Abb. 9**).

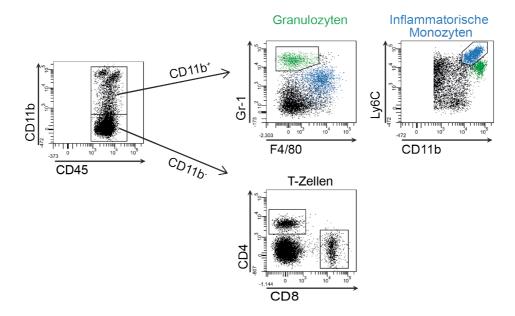


Abb. 9: Eingrenzung von Inflammatorischen Monozyten und Granulozyten Die Zellen aus Milz und Leber wurden mit den folgenden fluorochrom-markierten Antikörpern angefärbt: anti-CD45 mAk (30-FII), anti-CD11b mAk (M1/70), anti-Gr-1 mAk (RB6-8C5), anti-Ly6C mAk (AL-21), anti-F4/80 mAK (BM8) sowie anti-CD8α mAk ( (53-6.7) und anti-CD4 mAk ( (RM4-5). Mithilfe der Größen- und Granularitätsanalyse durch Vorwärts- und Seitwärts-Streulicht (FSC und SSC), sowie durch die Färbung mit PacO, wurden bereits die toten Zellen ausgeschlossen und die CD45<sup>+</sup>-Zellen identifiziert, welche die Gesamtpopulation der Leukozyten darstellen (vgl. Kap. 3.2.8.). Aus den CD11b+ Zellen (den myeloiden Leukozyten) wurden sodann die Granulozyten isoliert, sie wurden als CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>high</sup>Gr-1<sup>high</sup>Ly6C<sup>int</sup>F4/80<sup>low</sup> definiert. Anschließend wurden unter den Zellen, die nicht zu den Granulozyten gehörten, die Inflammatorischen Monozyten eingegrenzt. Sie stellten sich CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup>F4/80<sup>+</sup>Gr-1<sup>low</sup> dar. Der prozentuale Anteil der Inflammatorischen Monozyten und der neutrophilen Granulozyten an den CD45<sup>+</sup> wurde berechnet und beschreibt das Maß der Akkumulation der genannten Zelltypen. Unter den CD11b<sup>-</sup> Zellen wurden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen dargestellt, jedoch nicht genauer charakterisiert.

Die Expression von CD11b und Ly6C veränderte sich im Infektionsverlauf leicht, weshalb die Eingrenzung je nach Infektionsstatus etwas angepasst wurde. Die Eingrenzung und Quantifizierung von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten erfolgte in allen folgenden Experimenten auf die hier beschriebene Weise.

Neben den Granulozyten und den Inflammatorischen Monozyten konnte unter den CD11b<sup>+</sup> Zellen eine Population definiert werden, die sich F4/80<sup>high</sup> oder F4/80<sup>+</sup> und Ly6C<sup>inter</sup>Gr-1<sup>inter</sup> darstellte und wahrscheinlich Dendritische Zellen und weitere Makrophagen-Subtypen enthält.

### 4.1.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in *Listeria monocytogenes* infizierten Wildtyp-Mäusen

Die Granulozyten und die Inflammatorischen Monozyten wurden durch die oben dargestellte Eingrenzungs-Strategie eindeutig charakterisiert. Sie waren schon in den nicht-infizierten Organen als Zellpopulationen erkennbar. Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* zeigte sich an d1 bis d3 eine Zunahme der jeweiligen Zellzahlen und somit eine Akkumulation dieser Zellpopulationen sowohl in der Milz als auch in der Leber (**Abb. 10**).

In den nicht-infizierten Mäusen lag der prozentuale Anteil der Inflammatorischen Monozyten an den CD45<sup>+</sup>-Zellen in der Milz bei durchschnittlich 0,9%. An d1 p.i. erhöhte er sich um den Faktor 3,9 auf ca. 3,2% (p<0,001). An d3 p.i. lag die Monozytenfrequenz, im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren um den Faktor 4,5 erhöht, bei ca. 3,8% (p<0,001).

Der Anteil der Granulozyten an den CD45<sup>+</sup>-Zellen betrug in der Milz der nicht-infizierten Tiere durchschnittlich 4,0% und wurde durch die Infektion ebenfalls signifikant erhöht. Der paarweise Vergleich zeigte an d1 p.i eine signifikante Erhöhung der Granulozyten um den Faktor 2,6 auf durchschnittlich 10,9%. An d3 fand im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren eine Erhöhung um den Faktor 2,9 auf ca. 11,7% statt.

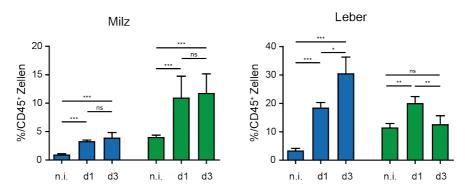


Abb. 10: Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten während der frühen Infektion mit *Listeria monocytogenes* C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden intravenös mit 2×10<sup>4</sup> Listerien infiziert, zur Kontrolle diente PBS (nicht-infizierte Mäuse, n.i.). Milzen und Lebern von nicht-infizierten und infizierten Mäusen (d1 und d3 p.i.) wurden entnommen und aus den Organen wurden Einzelzellsuspensionen für die durchflusszytometrische Analyse aufgereinigt. Die Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyzten wurde anhand der in Abb. 9 vorgestellten Eingrenzungs-Strategie ermittelt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Inflammatorischen Monozyten (blau) und Granulozyten (grün) an der Gesamtzahl der CD45<sup>+</sup> Zellen aus Milz und Leber. Die Graphen stellen für jede Gruppe (n=5) das arithmetische Mittel ± SD dar. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Repräsentativ werden hier die Daten aus einem von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. In mehreren Vorversuchen wurde eine Zellakkumulation in der gleichen Größenordung ermittelt (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt).

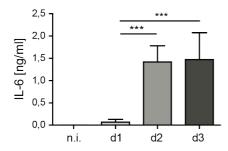
In der Leber lag die Frequenz der Inflammatorischen Monozyten und Granulozyten insgesamt etwas höher. Der Anteil der Inflammatorischen Monozyten an den CD45<sup>+</sup> Zellen betrug hier in den nicht-infizierten Tieren durchschnittlich 3,3% und erhöhte sich an d1 p.i. um den Faktor 5,8 auf ca. 18,4% (p<0,001). An d3 p.i. stieg die Monozytenfrequenz noch einmal an, im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren um den Faktor 9,5 auf durchschnittlich 30,4%.

Der Anteil der Granulozyten an den CD45<sup>+</sup>-Zellen in den Lebern der nicht-infizierten Tiere lag bei durchschnittlich 11,4% und war nach der Infektion ebenfalls signifikant erhöht. Es zeigte sich an d1 p.i eine Erhöhung der Granulozytenfrequenz um den Faktor 1,8 auf 19,9% (p<0,01). An d3 p.i. lag die Frequenz mit ca. 12,5% schon wieder auf dem Niveau der nicht-infizierten Tiere.

Zusammengefasst bewirkte die intravenöse Listerieninfektion beim Vergleich zu den Werten nicht-infizierter Tieren eine deutliche Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in Milz und Leber. Ihr Anteil an den CD45<sup>+</sup>-Zellen lag in der Leber insgesamt höher als in der Milz. Eine maximale Populationsgröße erreichten die Inflammatorischen Monozyten an d3 und die Granulozyten an d1 p.i.

### 4.1.3. Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R $\alpha$ in Listeria monocytogenes infizierten Wildtyp-Mäusen

IL-6 spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsvorgängen und bakteriellen Infektionen. Dies gilt auch für die frühe Infektion mit L. monocytogenes in der Maus (Kopf et al. 1994). Der (sIL-6R $\alpha$ ) ist ebenfalls IL-6-Rezeptor im Serum detektierbar. Autoimmunerkrankungen im Menschen korreliert die sIL-6R\alpha-Konzentration mit der CRP-Konzentration im Serum, sie steigt also mit dem Entzündungsgrad an (Mitsuyama et al. 1995). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Listerieninfektion auf die Konzentration von IL-6 und sIL-6Rα im Serum mittels ELISA untersucht. Für IL-6 ist ein Konzentrationsanstieg während der Listerieninfektion bereits publiziert (Nakane et al. 1992). Die Untersuchung des sIL-6Rα im Serum sollte im Besonderen einen Hinweis darauf geben, ob es durch L. monocytogenes zu einer vermehrten Abspaltung des IL-6Rα kommt und diese durch erhöhte sIL-6Rα-Serumspiegel messbar wird.



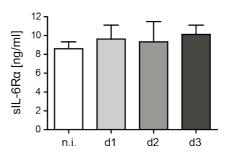


Abb. 11: Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R $\alpha$  im Serum während der frühen Infektion mit Listeria monocytogenes C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden intravenös mit  $2\times10^4$  Listerien infiziert, zur Kontrolle diente PBS (nicht-infiziert). Mittels ELISA wurden die Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R $\alpha$  im Serum der nicht-infizierten und infizierten Mäuse (d1, d2 und d3 p.i.) bestimmt. Der sIL-6R $\alpha$ -ELISA wurde sowohl mit 1:10 als auch mit 1:100 verdünnten Seren durchgeführt, um sicher zu gehen, dass die Werte in einem günstigen Messbereich liegen. Für beide Verdünnungsstufen wurden vergleichbare Werte errechnet. Dargestellt ist das arithmetische Mittel  $\pm$  SD pro Gruppe (n=5). \*\*\*p<0,001. Die Graphik stellt repräsentativ die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente dar.

Im Serum von nicht-infizierten Mäusen war kein IL-6 detektierbar, aber im Laufe der Infektion stiegen die Serumspiegel signifikant an (Abb. 11). Im Mittel lag das Serum-IL-6 an

d1 p.i. bei 0,07 ng/ml. An d2 p.i. stieg es um den Faktor 18,7 auf durchschnittlich 1,4 ng/ml an. An d3 p.i. blieb das Serum-IL-6 mit ca. 1,5 ng/ml auf dem Niveau von d2 p.i.

Die sIL-6Rα-Serumkonzentration lag sowohl in den nicht-infizierten als auch in den infizierten Tieren bei durchschnittlich 8 bis 10 ng/ml (**Abb. 11**). Die Werte waren in den infizierten im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren durchschnittlich nur um den Faktor 1,1 erhöht, der Effekt der Infektion kann als signifikant bezeichnet werden (p=0,4420).

Ein infektionsbedingter Anstieg in der Serum-Konzentration war also bei IL-6, nicht aber bei sIL-6R $\alpha$  zu beobachten.

### 4.1.4. mRNA-Expression von IL-6 und Akute-Phase-Proteinen in *Listeria monocytogenes* infizierten Wildtyp-Mäusen

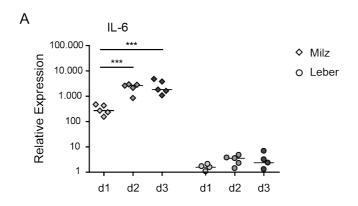
Die Produktion von IL-6 in nicht-infizierten und listerieninfizierten Tieren wurde sowohl durch die Serum-Analyse als auch durch die Untersuchung der mRNA-Expression für IL-6 in den Milzen und Lebern analysiert und quantifiziert. Aufgrund der Spezifität der qRT-PCR und der Reproduktivität in den bisher gezeigten Ergebnissen, wurde diese Analyse nur einmal durchgeführt (Abb. 12 A). Die ermittelten Werte geben die mRNA-Expression in den infizierten Tieren in Relation zu nicht-infizierten Tieren an (relative Expression).

In der Milz wurde die mRNA von IL-6 an d1 p.i. im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren durchschnittlich 300-mal höher exprimiert. An d2 p.i. war die relative Expression von IL-6 im Vergleich zu d1 p.i. um den Faktor 7,2 erhöht, die mRNA-Expression lag somit ca. 2300-mal höher als in den nicht-infizierten Tieren. An d3 p.i. lag die relative Expression ungefähr auf dem gleichen Niveau wie an d2 p.i, sie war hier 2600-mal höher als in den unbehandelten Tieren. In der Leber wurde die IL-6-mRNA in den infizierten Tieren in Relation zu den nicht-infizierten Tieren durchschnittlich nur 2,5-mal höher exprimiert. Der Effekt der Infektion war hier nicht signifikant (p=0,1466).

Als systemisch verfügbares, pro-inflammatorisches Zytokin ist IL-6 einer der Stimuli, welche die Produktion von Akute-Phase-Proteinen, wie Serumamyloid-A (SAA) und Haptoglobin, in der Leber bewirken (Kopf *et al.*1994, Jensen und Whitehead 1998). Da IL-6 im Rahmen der Immunreaktion auf *L. monocytogenes* erhöht war, konnte auch eine erhöhte Produktion von SAA und Haptoglobin in der Leber erwartet werden.

Die qRT-PCR zeigte einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression von SAA in der Leber im Laufe der Infektion (Abb. 12 B). An d1 p.i. war die mRNA-Expression von SAA im Mittel 90-mal höher als in den nicht-infizierten Tieren. An d2 p.i. lag die mRNA-Expression für SAA durchschnittlich 12000-mal höher als in den nicht-infizierten Tieren und blieb an d3 p.i. mit einer ca. 13000-fach erhöhten Expression ungefähr auf dem gleichen Niveau. Die mRNA-Expression von Haptoglobin war in den infizierten Mäusen insgesamt ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 12 B). Sie lag an d1 p.i. mit einer nur 4-fachen Erhöhung noch auf dem Niveau der nicht-infizierten Mäuse, doch an d2 p.i. kam es zu einer

durchschnittlich 270-fachen und an d3 p.i. zu einer 170-fachen Expression der HaptoglobinmRNA. Die mRNA-Expression für Haptoglobin an d2 p.i. stellte somit das Maximum dar.



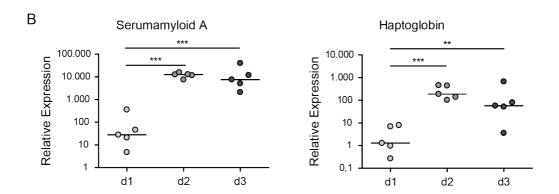


Abb. 12: mRNA-Expression von IL-6 und Akute-Phase-Proteinen während der frühen Infektion mit Listeria monocytogenes C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden intravenös mit  $2\times10^4$  Listerien infiziert, zur Kontrolle diente PBS (nicht-infiziert). Milzen und Lebern von nicht-infizierten und infizierten Mäusen (d1, d2 und d3 p.i.) wurden entnommen und aus den Organen wurde RNA isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR. Für die Berechnung der relativen mRNA-Expression wurde für jedes Organ der Ct-Wert des Zielgens ermittelt und gegen den Ct-Wert eines aktivierungsunabhängigen Gens (18S-mRNA) normalisiert ( $\Delta$ Ct-Wert). Die  $\Delta$ Ct-Werte der infizierten Tiere wurden von den  $\Delta$ Ct-Werten der gesunden Tiere subtrahiert ( $\Delta$ Ct). Die Relative Expression ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) gibt an, um welchen Faktor sich die mRNA-Expression in gesunden Mäusen von der in infizierten Mäusen unterscheidet. Dargestellt ist hier die mRNA Expression von IL-6 (A) in Milz und Leber sowie von Serumamyloid A und Haptoglobin in der Leber (B). Für jede Gruppe (n=5) wurde der Median angegeben. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Die Messung wurde für ein Experiment durchgeführt.

Insgesamt wurde durch die qRT-PCR beobachtet, dass die mRNA-Expression für IL-6 in den Milzen schon an d1 p.i. stark anstieg und ihr Maximum an d2 p.i. erreichte. In der Leber ist IL-6 mitverantwortlich für die Induktion der Akute-Phase-Proteine SAA und Haptoglobin. Ihre mRNA-Expression war an d1 p.i. nahezu unverändert, an d2 und d3 p.i. allerdings ebenfalls stark erhöht.

# 4.1.5. Produktion von IL-6 und TNF-α durch restimulierte Granulozyten und Inflammatorische Monozyten aus *Listeria monocytogenes* infizierten Wildytp-Mäusen

Während der frühen Infektion mit L. monocytogenes wurde eine massive Rekrutierung von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten beobachtet. In der gleichen Infektionphase findet eine Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, insbesondere IL-6 und TNF- $\alpha$ , statt (Akira et~al. 1990). Entsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit erhöhte IL-6-Konzentrationen nach der Listerieninfektion im Serum (Abb. 11) gemessen. Des Weiteren sollte untersucht werden, inwieweit speziell die als Granulozyten und Inflammatorische Monozyten definierten Zellen in der Lage sind, auf die Restimulation mit hitzegetöteten Listerien (HKL) mit der Produktion von IL-6 zu reagieren. Das Färbeschema für die extraund intrazelluläre Markierung mit Antikörpern nach der Restimulation wird in Tab. 5 dargestellt. Für die intrazelluläre Anfärbung von TNF- $\alpha$  und IL-6 wurde jeweils eine Isotypkontrolle durchgeführt, um die IL-6 $^+$  und TNF- $\alpha$  $^+$  Zellen korrekt zu definieren.

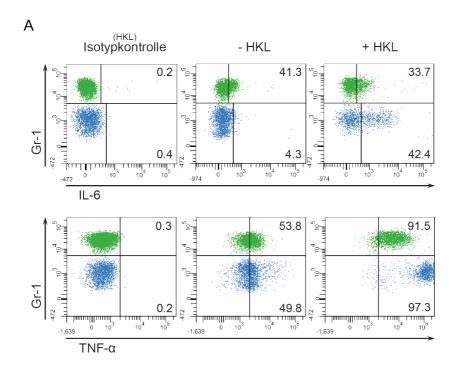
Tab. 5: Fluorochrom-markierte Antikörper II

	Antigen	Ak (Klon)	Fluorochrom
1. Extrazelluläre	CD45	30-FII	AF700
Färbung	CD11b	M1/70	PerCP
	Gr-1	RB6-8C5	V450
	Ly6C	AL-21	FITC
	PacO		V510
2. Intrazelluläre	TNF-α	MP6-XT22	PE-Cy7
Färbung	IL-6	MP5-20F3	PE

Durch die Zytokinfärbung konnte gezeigt werden, dass sowohl die Granulozyten als auch die Inflammatorischen Monozyten TNF- $\alpha$  produzieren (**Abb. 13 A**). In beiden Zelltypen fand eine TNF- $\alpha$ -Produktion auch schon in den Inkubationsansätzen ohne HKL statt. Durch die Stimulation mit HKL konnte die Produktion von TNF- $\alpha$  allerdings deutlich gesteigert werden. Dies zeigte sich in den Inflammatorischen Monozyten nicht nur durch eine höhere Anzahl TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen, sondern auch durch einen Anstieg des mittleren Fluoreszenz Index (MFI) der einzelnen Zellen (**Abb. 13 C**). In **Abb. 13 B** werden die Werte aus den Tieren der verschiedenen Infektionszeitpunkte zusammengefasst. Durchschnittlich waren 58% der Inflammatorischen Monozyten TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. Durch die Stimulation mit HKL stieg der Anteil der TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Monozyten auf im Mittel 90%. Die Granulozyten waren durchschnittlich ohne HKL zu ca. 48% und mit HKL-Stimulation zu 90% TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>. In den Granulozyten war die leichte Tendenz zu erkennen, dass ihre Fähigkeit zur TNF- $\alpha$ -Produktion mit fortschreitendem Infektionszeitpunkt abnimmt. Doch insgesamt veränderte sich der prozentuale Anteil der TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen an den Zellpopulationen nicht in Abhängigkeit vom Zeitpunkt nach der Infektion.

In den Inflammatorischen Monozyten konnte durch die Restimulation mit HKL auch die Produktion von IL-6 induziert werden (**Abb. 13 A/B**). In dem Stimulationsansatz ohne HKL waren durchschnittlich 7% und mit HKL ca. 37% der Monozyten IL-6<sup>+</sup>. Die Granulozyten zeigten ohne HKL an d2 p.i. einen IL-6<sup>+</sup> Anteil von 35%, mit HKL lag dieser im Durchschnitt bei 25%, die Inkubation mit HKL schien für die Granulozyten somit keinen spezifischen Stimulus zur IL-6-Produktion darzustellen (**Abb. 13 A/B**). Allerdings waren bei der IL-6-Produktion relativ große Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion zu beobachten: die Population der IL-6<sup>+</sup> Granulozyten sank in beiden Stimulationsansätzen von durchschnittlich 42% in den nicht-infizierten Tieren auf 10% an d3 p.i.

Zusammengefasst zeigte die durchflusszytometrische Analyse der mit HKL restimulierten Milzzellen, dass die Inflammatorischen Monozyten IL-6 und TNF- $\alpha$  und die Granulozyten TNF- $\alpha$  spezifisch produzieren können.



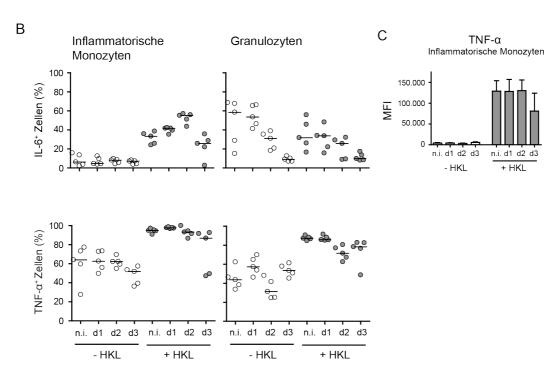


Abb. 13: Produktion von IL-6 und TNF- $\alpha$  durch Inflammatorische Monozyten und Granulozyten nach Restimulation C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden intravenös mit  $2\times10^4$  Listerien infiziert, zur Kontrolle diente PBS (nicht-infizierte Mäuse). Die Milzen der nicht-infizierten und infizierten Mäuse (d1, d2 und d3 p.i.) wurde entnommen und zu einer Einzelzelllsuspension aufgereinigt. Diese wurde für 6 h mit oder ohne Zugabe von hitzegetöteten Listerien (HKL) inkubiert. Die Produktion von IL-6 und TNF- $\alpha$  wurde durch intrazelluläre Färbung bestimmt. Die Fähigkeit zur TNF- $\alpha$ -Produktion nach Restimulation war schon in Vorversuchen nachgewiesen worden, daher diente die TNF- $\alpha$  Färbung als Positivkontrolle. A) Die Zytokinproduktion durch Granulozyten (grün) und Inflammatorische Monozyten (blau) wird repräsentativ für eine Milz in Punktwolken dargestellt. Die Isotypkontrolle (links) zeigt keine positiven Zellen. B) Die Produktion von IL-6 (oben) und TNF- $\alpha$  (unten) wird pro Gruppe (n=5) in einer Scatter-Plot-Graphik gezeigt. Für jede Gruppe ist der Median dargestellt. C) Dargestellt ist hier der Mittlere Fluoreszenz Index (MFI) für TNF- $\alpha$  der Inflammatorischen Monozyten, mit und ohne Restimulation mit HKL.

### 4.1.6. Expression des IL-6Rα auf Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in *Listeria monocytogenes* infizierten Wildtyp-Mäusen

Für den klassischen Signalweg von IL-6 muss der IL-6-Rezeptor, bestehend aus gp130 und IL6R $\alpha$ , auf den Membranen der Zielzellen vorhanden sein. Ob dieser von den Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten exprimiert wird, wurde in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch untersucht. Das zu diesem Zweck verwendete Färbeschema wird in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Fluorochrom-markierte Antikörper III

	Antigen	Klon	Fluorochrom
Markierung von	CD45	30-FII	AF700
Granulozyten/	CD11b	M1/70	PerCP
Inflammatorischen	F4/80	BM8	APC
Monozyten	Gr-1	RB6-8C5	V450
	Ly6C	AL-21	FITC
	IL6Rα	D7715A7	PE
	PacO		V500
Markierung von	CD45	30-FII	AF700
T-Zellen	CD11b	M1/70	PerCP
	CD4	RM4-5	APC
	CD19	eBio1D3	V450
	Ly6C	AL-21	FITC
	CD8α	53-6.7	PE-Cy7
	IL6Rα	D7715A7	PE
	PacO		V500

Die durchflusszytometrische Analyse der IL-6R-Expression fand für Milz- und Leberzellen aus nicht-infizierten sowie aus d1- und d2-infizierten Mäusen statt. In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass sowohl Inflammatorische Monozyten, als auch Granulozyten und CD4<sup>+</sup> Zellen<sup>6</sup> IL-6Rα auf der Zelloberfläche exprimierten (**Abb. 14**). Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich diese Expression je nach Infektionsstatus der Mäuse veränderte.

In **Abb. 14 A** werden exemplarisch Milzzellen in einer Punktwolke dargestellt. Die statistische Darstellung (**Abb. 14 B**) veranschaulicht, dass durchschnittlich 84,0% der Inflammatorischen Monozyten von nicht-infizierten Mäusen den IL-6R $\alpha$  auf der Zelloberfäche besitzen. Im Infektionsverlauf veränderte sich diese Expression allerdings signifikant. An d1 p.i. fiel der Anteil der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Monozyten im Mittel um den Faktor 0,2 auf durchschnittlich 65,8% und an d2 p.i. ein weiteres Mal um den Faktor 0,3, auf 43,5%.

Der IL-6R $\alpha$  wurde außerdem auf durchschnittlich 19,9% der Granulozyten aus nichtinfizierten Mäusen exprimiert, auch hier verminderte sich der Anteil der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen im Infektionsverlauf signifikant. Die IL-6R $\alpha$ -Expression an d1 p.i. war im Vergleich zu den

-

<sup>&</sup>lt;sup>6</sup> Diese T-Zellpopulation wurde in den Experimenten nicht näher charakterisiert.

nicht-infizierten Tieren im Mittel um den Faktor 0,3 auf ca. 13,0% verringert. An d2 p.i. wurde IL-6R $\alpha$  mit ca. 7,1% im Vergleich zu d1 p.i. um den Faktor 0,4 geringer exprimiert.

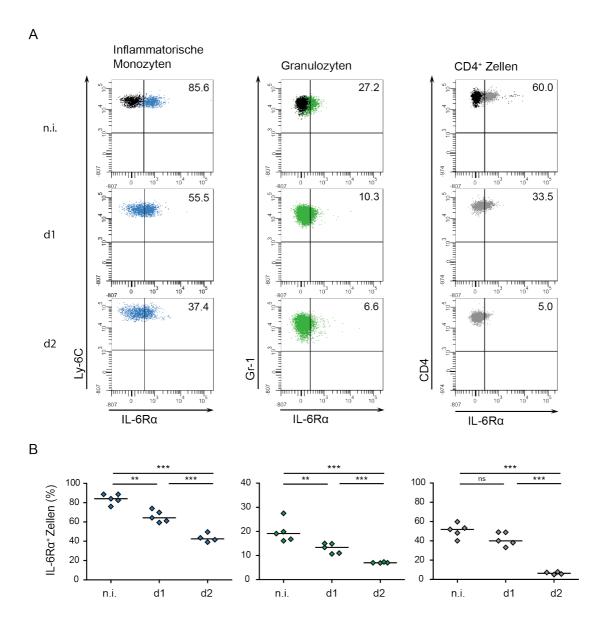


Abb. 14: Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$  während der Infektion mit Listeria monocytogenes C57BL/6 Wildtyp-Mäuse wurden intravenös mit  $2\times10^4$  Listerien infiziert, zur Kontrolle diente PBS (nichtinfizierte Mäuse, n.i.). Die Milzen von nicht-infizierten und d1- bzw. d2-infizierten Mäusen (n=5) wurden entnommen und zu Einzelzellsuspensionen für die durchflusszytometrische Analyse aufgereinigt. Repräsentativ wird hier das Ergebnis von einem aus zwei unabhängigen Experimenten dargstellt. Defintionsgemäß wurden alle Zellen, deren IL-6R $\alpha$ -Signal über das des Isotyps hinausging, als IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> bezeichnet. A) Die Expression von IL-6R $\alpha$  auf der Oberfläche von Inflammatorischen Monozyten, Granulozyten und CD4<sup>+</sup>-Zellen, in nichtinfizierten und infizierten Mäusen, wird als Punktwolke dargestellt. Die Isotypkontrolle ist in schwarz dargestellt. B) Statistische Darstellung der IL-6R $\alpha$ -Oberflächenexpression der jeweiligen Zellpopulation. Für jede Gruppe von Mäusen ist der Median dargestellt. (Aus der Gruppe der d2-infizierten Mäuse musste ein Tier aus der Analyse ausgeschlossen werden, da die intravenöse Infektion nicht erfolgreich war.) \*\*p<0,01,\*\*\*p<0,001.

Auch unter den CD4<sup>+</sup> Lymphozyten verringerte sich der Anteil der IL- $6R\alpha^+$  Zellen im Laufe der Infektion signifikant. In den nicht-infizierten Tieren waren durchschnittlich 50,7% der CD4<sup>+</sup>-Zellen IL- $6R\alpha^+$ . Die IL- $6R\alpha$ -Expression an d1 p.i. war mit ca. 41,8%, im Vergleich zu den nicht-infizierten Tieren, im Mittel um den Faktor 0,2 verringert. An d2 lag die IL- $6R\alpha^-$ 

Expression bei ca. 6,4% und war somit im Vergleich zu d1 p.i. im Mittel um den Faktor 0,8 geringer exprimiert.

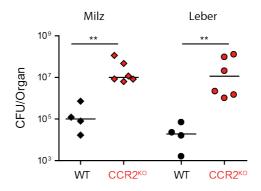
Insgesamt konnte auf den Granulozyten, Inflammatorischen Monozyten und  $CD4^+$ -Zellen die Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$  Expression nachgewiesen werden. Die Inflammatorischen Monozyten zeigten in der durchflusszytometrischen Analyse die höchste Expressionsrate für IL-6R $\alpha$ . Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich die Expressionsrate von membrangebundenem IL-6R $\alpha$  im Laufe der Infektion auf allen Zelltypen verminderte. Die IL-6R $\alpha$ -Expression der Zellen in der Leber wird hier nicht graphisch dargestellt, sie entsprach aber den beobachteten Verhältnissen in der Milz.

### 4.2. Die angeborene Immunantwort auf *Listeria monocytogenes* in CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen

Es konnte gezeigt werden, dass Inflammatorische Monozyten IL-6Rα auf der Zelloberfläche exprimieren und nach der Restimulation mit HKL IL-6 produzieren (vgl. Kap. 4.1.5 und Kap. 4.1.6). Die Inflammatorischen Monozyten werden unter anderem durch die Expression von CCR2 charakterisiert. CCR2 ist ein Chemokinrezeptor, der CCL2 und weitere CCLs bindet und für die Inflammatorischen Monozyten von großer Bedeutung ist, da sie im Falle einer Infektion mit *L. monocytogenes* durch seine Aktivierung aus dem Knochenmark emigrieren können (Serbina und Pamer 2006). In CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen ist die Mobilisierung von Inflammatorischen Monozyten an den Ort eines Entzündungsgeschehens und die Kontrolle der Listerieninfektion folglich eingeschränkt (Kurihara *et al.*1997). Um zu ergründen, inwieweit die peripheren Inflammatorischen Monozyten eine Quelle für das systemisch verfügbare IL-6 und sIL-6Rα im Serum darstellen, wurden Wildtyp- und CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse mit 2×10<sup>4</sup> LmEGD infiziert und an d3 p.i. analysiert. Zunächst wurde die erhöhte Suszeptibilität der CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse gegenüber *L. monocytogenes* sowie die verminderte Akkumulation von Inflammatorischen Monozyten in Milz und Leber überprüft. Anschließend wurden Serumanalysen mittels ELISA durchgeführt.

#### 4.2.1. Listerientiter in Milzen und Lebern von CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen

Die Untersuchung der Listerientiter in Milz und Leber bestätigte, dass die CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse deutlich in ihrer Listerienkontrolle beeinträchtigt sind (**Abb. 15**).



**Abb. 15: Listerientiter in Wildtyp- und CCR2**<sup>KO</sup>-**Mäusen** C57BL/6 Wildtyp- und CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse wurden intravenös mit 2×10<sup>4</sup> Listerien infiziert. Milzen und Lebern wurden an d3 p.i. entnommen und als Gewebesuspensionen für 48 h bei 37°C auf TSB-Agarplatten inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Listerienkolonien quantifiziert. Die Listerienlast ist in colony forming units (CFU) pro Organ dargestellt. Für jede Mausgruppe (WT n=4, CCR2<sup>KO</sup> n=6) ist der Median angegeben. Für den paarweisen Vergleich der unterschiedlichen Mausstämme wurde der Mann Whitney Test angewendet. \*\* p<0,01. Die Daten stehen repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

So lagen die Listerientiter in der Milz der Wildtyp-Tiere im Mittel bei ca. 2×10<sup>5</sup> CFU/Organ und in der Leber bei ca. 3×10<sup>4</sup> CFU/Organ. Im Gegensatz dazu waren die Listerientiter in den CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen stark erhöht. Durchschnittlich lagen sie in der Milz bei

3×10<sup>7</sup> CFU/Organ und in der Leber bei 4×10<sup>7</sup> CFU/Organ. Somit war in der Milz als auch in der Leber der Unterschied zwischen den Wildtyp- und den CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen in der Höhe der Listerientiter signifikant (p=0,0095).

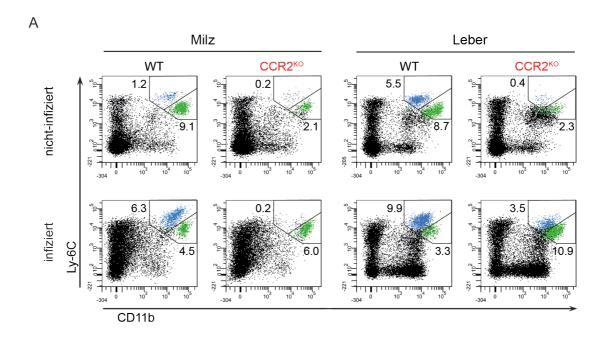
## 4.2.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in *Listeria monocytogenes* infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen

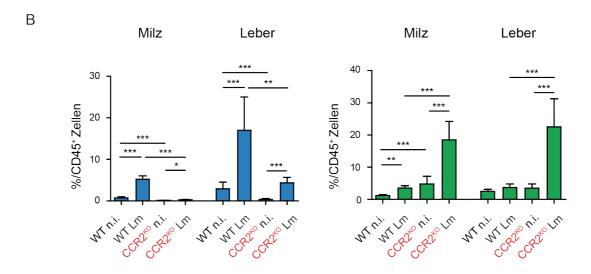
In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich eine verminderte Frequenz der Inflammatorischen Monozyten in Milzen und Lebern der CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse (**Abb. 16**). Bereits in den nicht-infizierten Tieren fanden sich im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren verminderte Monozytenzahlen, in den infizierten Tieren wurde dieser Unterschied noch deutlicher.

Bei den nicht-infizierten Wildtyp-Mäusen betrug die Frequenz der Inflammatorischen Monozyten in der Milz ca. 0,8% und in der Leber ca. 2,9% der CD45<sup>+</sup>-Zellen. In der Milz der nicht-infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse machten die Monozyten dagegen nur ca. 0,1% und in der Leber ca. 0,4% der CD45<sup>+</sup>-Zellen aus. In den infizierten Wildtyp-Tieren erhöhte sich der Anteil der Inflammatorischen Monozyten in der Milz auf ca. 5,2% und in der Leber auf ca. 17,0%. In den CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen war ebenfalls ein Anstieg der Monozytenfrequenz zu beobachten, er fiel aber deutlich geringer aus. In der Milz der infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse lagen die Frequenzen der Inflammatorischen Monozyten bei durchschnittlich 0,3% und in der Leber bei ca. 4,3%.

Neben der vergleichsweise geringen Frequenz der Inflammatorischen Monozyten in Milz und Leber der infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse, war hier eine erhöhte Granulozytenfrequenz zu beobachten. In der Milz der nicht-infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse lag der Anteil der Granulozyten bei ca. 4,3%, er stieg in den infizierten Tieren auf ca. 18,5% an. In der Leber bestand ein ähnlich großer Unterschied von durchschnittlich 3,5% Granulozyten in den nicht-infizierten und 22,5% in den infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Tieren. In den Wildtyp-Tieren fanden sich andere Verhältnisse. Hier betrug der Anteil der Granulozyten an den CD45<sup>+</sup>-Zellen in der Milz ca. 1,2% bzw. 2,5% in der Leber der nicht-infizierten Tiere. In den infizierten Wildtyp-Tieren lag die Granulozytenfrequenz in der Milz bei durchschnittlich 4,2% und in der Leber bei ca.3,7%.

Die durchflusszytometrische Analyse bestätigte somit die Beobachtung, dass CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse bei der Mobilisierung von Inflammatorischen Monozyten an Infektionsherde eingeschränkt sind. Die Granulozytenfrequenzen waren dagegen in Milz und Leber dieser Tiere, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, erhöht.





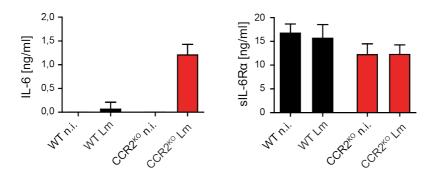
**Abb. 16:** Eingeschränkte Mobilisierung von Inflammatorischen Monozyten in CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen C57BL/6 Wildtyp- und CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse wurden intravenös mit 2×10<sup>4</sup> Listerien infiziert. Milzen und Lebern wurden an d3 p.i. entnommen und aus ihnen Einzelzellsuspensionen hergestellt. **A)** In den Punktwolken ist die gesamte CD45<sup>+</sup> Zellpopulation angezeigt. In den Regionen sind die Inflammatorische Monozyten (blau) und Granulozyten (grün) eingegrenzt und der jeweilige prozentuale Anteil an den CD45<sup>+</sup>-Zellen wiedergegeben. **B)** Statistische Darstellung des prozentualen Anteils der Inflammatorischen Monozyten (blau) und Granulozyten (grün) an den CD45<sup>+</sup>-Zellen in infizierten (Lm) und nicht-infizierten (n.i.) Mäusen. Die Graphen stellen das jeweilige arithmetische Mittel ± SD der einzelnen Gruppen (n=5) dar. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Die Daten stehen repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

### 4.2.3. Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R $\alpha$ in *Listeria monocytogenes* infizierten CCR2 $^{\rm KO}$ -Mäusen

Ob die deutlich verringerte Frequenz der Inflammatorischen Monozyten in den Organen der  $CCR2^{KO}$ -Mäuse einen Einfluss auf die systemischen Spiegel von IL-6 und sIL-6R $\alpha$  besitzt, wurde mittels Serum-ELISA untersucht.

Die IL-6-Serumkonzentration in den nicht-infizierten Wildtyp- und CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen war nicht detektierbar (**Abb. 17**). Bei den infizierten Wildtyp-Tieren lagen die Werte im Mittel bei 0,1 ng/ml. Die höchsten IL-6-Serumwerte wurden in den CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen gemessen, hier betrugen sie durchschnittlich 1,2 ng/ml.

Die sIL-6Rα-Serumkonzentration lag in den nicht-infizierten Wildtyp-Tieren bei durchschnittlich 17 ng/ml. Mit ca. 16 ng/ml blieb sie hier an d3 p.i. ungefähr auf dem gleichen Niveau (Abb. 17). In den CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen wurde sowohl in den nicht-infizierten als auch in den infizierten Tieren eine Serumkonzentration von durchschnittlich 12 ng/ml detektiert. Somit lag die sIL-6Rα-Serumkonzentration in den nicht-infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen um 30% niedriger als in den nicht-infizierten Wildtyp-Mäusen. In den infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen war der sIL-6Rα-Serumspiegel im Vergleich zu den infizierten Wildtyp-Mäusen um 20% verringert.



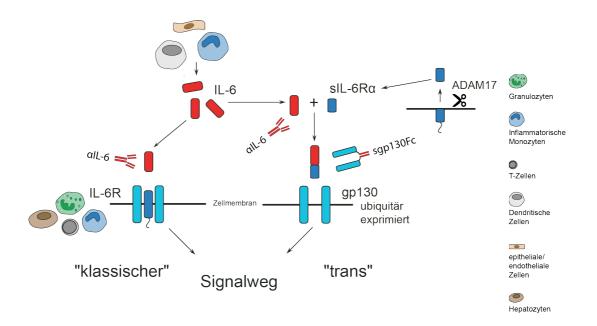
**Abb. 17: Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R\alpha in Wildtyp- und CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen C57BL/6 Wildtyp und CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse wurden intravenös mit 2\times10^4 Listerien infiziert, zur Kontrolle diente PBS (nichtinfiziert). Mittels ELISA wurde der Gehalt von IL-6 und sIL-6R\alpha im Serum der nicht-infizierten (n.i.) und infizierten Mäuse (Lm, d3 p.i) bestimmt. Angegeben ist das arithmetische Mittel \pm SD pro Gruppe (n=5). Die Graphik stellt repräsentativ die Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente dar.** 

Die vergleichende Serum-Analyse der Wildtyp- und  $CCR2^{KO}$ -Mäuse ergab die höchsten IL-6-Spiegel im Serum der infizierten  $CCR2^{KO}$ -Mäuse. Auf die sIL-6R $\alpha$ -Serumspiegel hatte die Infektion keinen Einfluss, allerdings enthielt das Serum der  $CCR2^{KO}$ -Mäuse weniger sIL-6R $\alpha$  als das der Wildtyp-Mäuse.

# 4.3. Die angeborene Immunantwort in *Listeria monocytogenes* infizierten Wildtyp-Mäusen nach der Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130Fc

In Kap. 4.1 wurde durch verschiedene Untersuchungen dargestellt, dass IL-6 während der frühen Infektion mit L. monocytogenes vermehrt produziert wird. Die Inflammatorischen Monozyten wurden zudem als IL-6-produzierende Zellen identifiziert. Der membrangebundene IL-6R $\alpha$  ließ sich auf den Zelloberflächen von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten nachweisen. Der lösliche IL-6R $\alpha$  war im Serum gesunder und infizierter Versuchsmäuse messbar. Somit sind während der frühen Infektion mit L. monocytogenes die Voraussetzungen sowohl für den klassischen Signalweg, als auch für den Trans-Signalweg von IL-6 gegeben.

Ob einer dieser beiden Signalwege während der frühen Immunantwort auf die Listerien überwiegt oder sie spezifisch beeinflusst, wurde untersucht, indem Wildtyp-Mäuse mit dem α-IL-6 monoklonalen Antikörper (α-IL-6 mAk) oder dem sgp130Fc-Fusionsprotein (sgp130-Fc) behandelt und 24 h später mit LmEGD infiziert wurden (Infektionsdosis: 2×10<sup>4</sup>). Der α-IL-6 mAk bindet das freie IL-6 und inhibiert sowohl den klassischen Signalweg, als auch den Trans-Signalweg (**Abb. 18**). Das sgp130Fc hingegen lässt den klassischen Signalweg weitgehend unbeeinflusst und blockiert nur den Trans-Signalweg von IL-6 (**Abb. 18**).



**Abb. 18:** Spezifische Blockade des Trans-Signalweges von IL-6 IL-6 wird von den dargestellten Zellpopulationen sezerniert und kann entweder über den klassischen Signalweg oder über den Trans-Signalweg auf die Zielzellen einwirken (nach Scheller *et al.* 2011). Durch neutralisierende monoklonale Antikörper gegen IL-6 (α-IL-6 mAk) werden beide Signalwege von IL-6 blockiert. Durch das sgp130-Fc-Fusionsprotein ist es möglich, den Trans-Signalweg spezifisch zu hemmen, indem der Komplex aus IL-6 und sIL-6Rα gebunden wird.

Da das sgp130-Fc Fusionsprotein aus humanem IgG hergestellt wurde (Jostock *et al.* 2001), wurde als Kontrollantikörper ebenfalls humanes γ-globulin G (humIgG) gewählt. Als weitere

Kontrolle wurde eine Gruppe mitgeführt, die statt der IL-6-Inhibitoren und Infektion jeweils nur steriles PBS erhielt.

Die Antikörperlösungen wurden auf Verunreinigung mit Lipopolysacchariden (LPS, syn. Endotoxin) untersucht, da diese eine zusätzliche Immunreaktion auslösen und mit den Effekten von Inhibitoren und Infektion interferieren könnten. Die gemessenen Endotoxinkonzentrationen sind in **Tab.** 7 dargestellt. Sie wurden durch den chromogenen Limulus Amöbozyten Lysat-Test (LAL-Test) ermittelt. 1 EU/ml entspricht ca. 0,2 ng/ml Endotoxin. Das sgp130Fc-Fusionsprotein war bereits getestet worden.<sup>7</sup> Es wurden Konzentrationsbereiche für LPS gemessen, die in den Versuchsmäusen in der Regel keine Immunreaktion hervorrufen. Die minimale pyrogene Dosis von LPS liegt bei 500 ng/kg, dies entspricht ca. 10 ng pro Maus (Copeland *et al.*2005). Die mediane letale Dosis (LD 50) liegt bei ca. 250 μg pro Maus (McCallum und Berry 1972).

Tab. 7: Endotoxinkonzentration

Probe	LPS [EU/ml]	LPS [ng/ml]	durch Behandlung appliziert (ng)
α-IL-6 mAk	34.4	6.9	2,4
humIgG	27.9	5.6	0,1
steriles PBS	nicht detektierbar		

Diese Blockade-Experimente wurden insgesamt viermal durchgeführt, bei zwei Experimenten fand eine durchflusszytometrische Analyse der inflammatorischen Zellen statt. Die Ergebnisse konnten dabei konstant reproduziert werden. Im Folgenden wird eines der Experimente exemplarisch dargestellt.

<sup>7</sup> Getestet am Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

\_

### 4.3.1. Listerientiter nach Behandlung mit $\alpha$ -IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Der Infektionsstatus der unterschiedlich behandelten Mäuse wurde anhand der Listerientiter an d3 p.i. in Milz und Leber bestimmt (Abb. 19). Die Listerientiter in der Milz der Kontrolltiere betrugen durchschnittlich  $5\times10^5$  CFU/Organ. Im Vergleich hierzu lagen sie in der  $\alpha$ -IL-6 mAk-behandelten Gruppe mit ca.  $1\times10^6$  CFU/Organ im Mittel 2,3-mal höher. In der sgp130Fc-behandelten Gruppe betrug die Listerienlast durchschnittlich  $6\times10^5$  CFU/Organ und befand sich somit ungefähr auf dem Niveau der Titer in der Kontrollgruppe. In der Leber wurden bei den Tieren, die mit humIgG behandelt wurden, durchschnittlich  $1\times10^5$  CFU/Organ und in der sgp130Fc-Gruppe  $3\times10^5$  CFU/Organ gemessen. In der  $\alpha$ -IL-6 mAk-Gruppe waren die Listerientiter im Vergleich zur Kontrollgruppe sowie zur sgp130Fc-behandelten Gruppe jeweils im Mittel um den Faktor 15 erhöht (p<0,001).

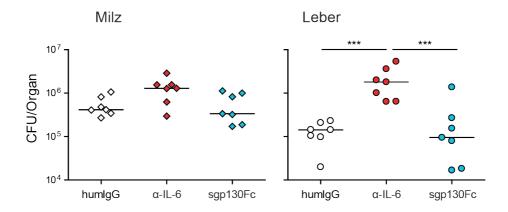


Abb. 19: Listerientiter nach der Behandlung mit  $\alpha$ -IL-6 mAk und sgp130-Fc C57BL/6 Wildtyp-Mäusen wurde der  $\alpha$ -IL-6 mAk (25 g/kg KG) oder das sgp130Fc-Fusionsprotein (12,5 g/kg KG) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle diente humanes IgG (12,5 g/kg KG). 24 h später erfolgte die intravenöse Infektion mit  $2 \times 10^4$  Listerien. Milzen und Lebern wurden an d3 p.i. entnommen und als Gewebesuspensionen für 48 h bei 37°C auf TSB-Agarplatten inkubiert. Anschließend wurden die gebildeten Listerienkolonien quantifiziert. Die Listerienlast ist in colony forming units (CFU) pro Organ dargestellt. Für jede Mausgruppe (n=7) ist der Median angegeben. \*\*\*p<0,001. Die Daten stehen repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

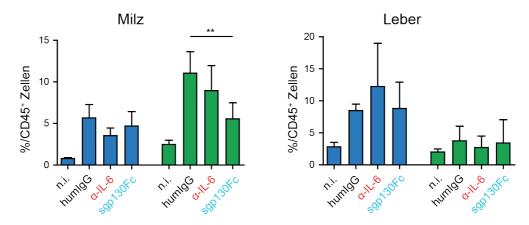
Zusammengefasst wurde beobachtet, dass die Blockade von IL-6 durch den  $\alpha$ -IL-6 mAk im Vergleich zur Kontrollgruppe (humIgG) in Milzen und Lebern zu stark erhöhten Listerientitern führte. Die spezifische Blockade des Trans-Signalweges von IL-6 bewirkte dagegen keine erhöhten Listerientiter.

# 4.3.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten nach Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Durchflusszytometrisch wurde die Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in Milz und Leber der IL-6-Signal-blockierten und listerieninfizierten Tiere analysiert (Abb. 20).

Im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrolltieren wurden in allen infizierten Gruppen signifikant erhöhte Frequenzen für die Inflammatorischen Monozyten gemessen. Zwischen den unterschiedlich vorbehandelten Gruppen gab es bei den Monozytenzahlen keine signifikanten Unterschiede, sie lagen in der Milz bei durchschnittlich 4,6% und in der Leber bei durchschnittlich 9,8% der CD45<sup>+</sup> Zellen.

Die Granulozytenfrequenzen waren in den Lebern der infizierten Tiere leicht und in den Milzen signifikant erhöht. In der Leber waren zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen keine signifikant unterschiedlichen Granulozytenzahlen zu beobachten, sie lagen in allen Gruppen bei durchschnittlich 3,3%. In der Milz dagegen zeigten sich in Abhängigkeit von der Behandlung Unterschiede: der Anteil der Granulozyten an den CD45<sup>+</sup> Zellen lag in der humIgG-Gruppe bei ca. 11,0%. Im Vergleich dazu war die Granulozytenfrequenz in den α-IL-6 mAk-behandelten Tieren um den Faktor 0,2 auf durchschnittlich 8,9% verringert. In den sgp130-Fc behandelten Tieren lag die Frequenz der Granulozyten mit durchschnittlich 5,6% um ca. 50% niedriger als in der humIgG-Gruppe (p<0,01).



**Abb. 20:** Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten nach Behandlung mit α-IL-6 mAk und sgp130-Fc und Listerieninfektion C57BL/6 Wildtyp-Mäusen wurde der α-IL-6 mAk (25 g/kg KG) oder das sgp130Fc-Fusionsprotein (12,5 g/kg KG) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle diente humanes IgG (12,5 g/kg KG). Nach 24 h erfolgte die intravenöse Infektion mit 2×10<sup>4</sup> Listerien. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt in beiden Fällen nur PBS (nicht-infiziert, n.i.). Milzen und Lebern wurden an d3 p.i. entnommen und aus den Organen wurden Einzelzellsuspensionen für die durchflusszytometrische Analyse hergestellt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Granulozyten (grün) und Inflammatorischen Monozyten (blau) an der Gesamtzahl der CD45<sup>+</sup> Zellen aus Milz und Leber. Die Graphen stellen das jeweilige arithmetische Mittel ± SD dar (unbehandelt: n=5, behandelt und infiziert: n=7). Signifikante Unterschiede wurden nur für die unterschiedlich behandelten und infizierten Gruppen angezeigt. \*\*p<0,01. Repräsentativ werden hier die Daten aus einem von vier unabhängigen Experimenten gezeigt.

Ein signifikanter Effekt der unterschiedlichen Antikörperbehandlung auf die infektionsbedingte Zellakkumulation konnte also nur für die Granulozyten in der Milz nachgewiesen werden. Ihre Frequenz war in der sgp130-Fc-behandelten Gruppe im Vergleich zur humIgG- und α-IL-6 mAk-behandelten Gruppe deutlich geringer.

### 4.3.3. mRNA-Expression von Entzündungsmediatoren nach Behandlung mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Während eines Entzündungsgeschehens oder einer Infektion spielen pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine eine wichtige Rolle. Durch die qRT-PCR wurde untersucht, ob die Behandlung mit dem α-IL-6 mAk oder dem sgp130-Fc-Fusionsprotein einen Einfluss auf die mRNA Expression von CXCL1, CXCL2, CCL2, IL-6, TNF-α, sowie Serumamyloid A (SAA) und Haptoglobin hat (**Abb. 21**). Die ermittelten Werte geben die mRNA-Expression in den immunisierten und infizierten Tieren in Relation zu nicht-behandelten und nichtinfizierten Tieren (unbehandelte Gruppe) wieder.

CXCL1 und CXCL2 sind Chemokine, die von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert werden. Über den CXCR2 wirken sie aktivierend sowie chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten (Esche *et al.* 2005). In der Milz kam es im Vergleich zur unbehandelten Gruppe durch die Infektion durchschnittlich zu einer 260-fachen Zunahme der mRNA-Expression von CXCL1. Es zeigten sich zudem signifikante Unterschiede zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen. Die relative Expression in den α-IL-6 mAk-behandelten Tieren lag im Vergleich zur humIgG-Gruppe im Mittel 2,9-mal höher. Im Vergleich zur sgp130-Fc-behandelten Gruppe lag die relative Expression in den α-IL-6 mAk-behandelten Tieren 7,1-mal höher, dieser Unterschied war signifikant (p<0,01). Die humIgG-Gruppe und die sgp130-behandelten Tiere lagen somit ungefähr auf dem gleichen Niveau. In der Leber lag die CXCL1-mRNA-Expression durchschnittlich 30-mal höher als in den unbehandelten Tieren, die unterschiedlichen Behandlungen hatten hier keinen signifikanten Effekt (Abb. 21 A).

Bei CXCL2 kam es in der Milz der infizierten und behandelten Tiere durchschnittlich zu einer 2400-fachen Zunahme der mRNA-Expression und die unterschiedliche Antikörperbehandlung bewirkte signifkante Unterschiede. In der Milz der α-IL-6 mAkbehandelten Tiere lag die relative Expression im Vergleich zur humIgG-Gruppe ca. 3,5-mal höher. Im Vergleich zur sgp130-Fc-behandelten Gruppe war die relative Expression in den α-IL-6 mAk-behandelten Tieren 15,3-mal höher, dieser Unterschied war signifikant (p<0,001). In der humIgG-Gruppe war die relative Expression von CXCL2 im Vergleich zu den sgp130-behandelten Tieren 4,3-fach erhöht, dieser Unterschied war ebenfalls signifikant (p<0,05). In der Leber war die mRNA-Expression für CXCL2 im Vergleich zu den unbehandelten Tieren durchschnittlich 19-fach erhöht, der Effekt der Antikörperbehandlung hierauf war nicht signifikant (Abb. 21 A).

CCL2 (MCP-1) ist ein Chemokin, das an den CCR2 bindet. CCR2 befindet sich unter anderem auf Inflammatorischen Monozyten und vermittelt, im Falle einer Infektion, die Emigration von Inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark (Serbina und Pamer 2006). Die Expression der CCL2-mRNA lag in der Milz durchschnittlich 840-mal höher als in den unbehandelten Tieren, wobei die unterschiedliche Antikörperbehandlung einen signifikanten Effekt auf diese relative Expression hatte. In der Milz der α-IL-6 mAkbehandelten Tiere lag die relative Expression von CCL2 im Vergleich zur humIgG-Gruppe im Mittel 1,5-mal höher. Im Vergleich zur sgp130-Fc-behandelten Gruppe lag die relative Expression in den α-IL-6 mAk-behandelten Tieren 7,1-mal höher, dieser Unterschied war signifikant (p<0,05). In der Leber lag die mRNA-Expression von CCL2 durchschnittlich 44-mal höher als in den unbehandelten Tieren, auch hier besaß die unterschiedliche Antikörperbehandlung einen signifikanten Effekt. Im Vergleich zur humIgG-Gruppe lag die relative Expression von CCL2 in der Leber der α-IL-6 mAk-behandelten Tieren im Mittel 4,7-mal (p<0,01) und im Vergleich zur sgp130-Fc-behandelten Gruppe 3,5-mal höher (p<0,05) (Abb. 21 A).

Zusätzlich wurde in Milz und Leber die mRNA-Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$  analysiert (**Abb. 21 B**). Die mRNA-Expression von IL-6 lag in der Milz durchschnittlich 770-mal und in der Leber 20-mal höher als in den unbehandelten Mäusen. Nur in der Leber zeigten sich zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen signifikante Unterschiede. Hier lag die relative Expression der IL-6-mRNA in den  $\alpha$ -IL-6 mAk-behandelten Tieren im Mittel 10,8-mal höher als in der humIgG-Gruppe (p<0,05). Im Vergleich zur sgp130-Fc-behandelten Gruppe war die relative Expression in den  $\alpha$ -IL-6 mAk-behandelten Tieren 11,6-mal höher (p<0,01). Die Kontrollgruppe und die sgp130-behandelten Tieren lagen somit ungefähr auf dem gleichen Niveau.

Die TNF- $\alpha$ -mRNA wurde in den mit Antikörpern behandelten und infizierten Tieren in Milz und Leber durchschnittlich 20-mal höher exprimiert als in den unbehandelten Tieren. Ein signifikanter Effekt der unterschiedlichen Antikörperbehandlung wurde in der Leber nicht beobachtet. In der Milz zeigte sich zwar in der  $\alpha$ -IL-6 mAk-Gruppe im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen eine höhere Expression der TNF- $\alpha$ -mRNA, doch der Behandlungseffekt war auch hier nicht signifikant (p=0,0526).

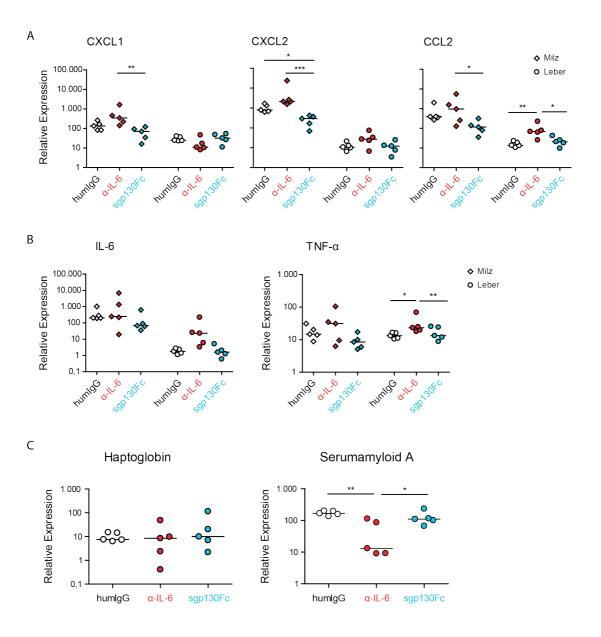


Abb. 21: mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren nach Behandlung mit α-IL-6 mAk und sgp130-Fc und Listerieninfektion C57BL/6 Wildtyp-Mäusen wurde der α-IL-6 mAk (25 g/kg KG) oder das sgp130Fc-Fusionsprotein (12,5 g/kg KG) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle diente humanes IgG (12,5 g/kg KG). Nach 24 h erfolgte die intravenöse Infektion mit  $2\times10^4$  Listerien. Eine nicht infizierte Kontrollgruppe erhielt in beiden Fällen nur PBS. Milzen und Lebern wurden an d3 p.i. entnommen und aus den Organen wurde RNA isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA erfolgte die Analyse mittels qRT-PCR. Für die Berechnung der relativen mRNA-Expression wurde für jedes Organ der Ct-Wert des Zielgens ermittelt und gegen den Ct-Wert eines aktivierungsunabhängigen Gens (18S-RNA) normalisiert (ΔCt-Wert). Die ΔCt-Werte der infizierten Tiere wurden von den ΔCt-Werten der gesunden Tiere subtrahiert (ΔΔCt). Die Relative Expression ( $2^{\Delta\Delta Ct}$ ) gibt an, um welchen Faktor sich die mRNA-Expression in gesunden Mäusen von der in infizierten Mäusen unterscheidet. Dargestellt ist hier die mRNA Expression der Chemokine CXCL1, CXCL2 und CCL2 (A), sowie von IL-6 und TNF-α in Milz und Leber (B). Serumamyloid A und Haptoglobin (C) werden nur in der Leber produziert. Für jede Gruppe (n=5) wurde der Median angegeben. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001. Die Daten stehen repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

Die mRNA-Expression des Akute-Phase-Proteins Haptoglobin wurde in der Leber der infizierten Mäuse durchschnittlich 20-mal höher exprimiert als in den unbehandelten Tieren. Hier hatte die Antikörperbehandlung auf die relative Expression keinen signifikanten Einfluss (Abb. 21 C).

Auf die infektionsbedingt erhöhte mRNA-Expression von SAA hingegen besaß die unterschiedliche Antikörperbehandlung einen signifikanten Effekt (Abb. 21 C). SAA wurde in der humIgG-Gruppe durchschnittlich 170-mal, in der α-IL-6 mAk-behandelten Gruppe 50-mal und in der sgp130-Fc behandelten Gruppe ca. 130-mal stärker exprimiert als in der vollständig unbehandelten Gruppe. Die humIgG- und die sgp130-behandelten Tieren lagen somit ungefähr auf dem gleichen Niveau und im Vergleich zu beiden Gruppen betrug die relative Expression der SAA-mRNA in der α-IL-6 mAk-behandelten Gruppe im Mittel um 80% niedrigere Werte, diese Unterschiede waren jeweils signifikant.

Durch eine Regressionsanalyse wurde zusätzlich untersucht, ob die mRNA-Expression der oben aufgezeigten Entzündungsmediatoren mit der Höhe der Listerientiter (Listerienlast) in Milzen und Lebern korrelierte (**Abb. 22**). Im Folgenden werden nur die mRNA-Expressionen beschrieben, für die, nach der graphischen Darstellung in einer Punktwolke die Regressionsanalyse geeignet erschien. Für CCL2 konnte in der Leber eine hohe Korrelation zwischen Listerienlast und mRNA-Expression gezeigt werden (r=0,830 p<0,0001). In der Milz streuten die Werte dagegen unsystematisch um eine steigende Gerade (r=0,382 p=0,1601) (**Abb. 22 A**). CXCL1 korrelierte nur in der Milz mit der Listerienlast (r=0,682 p=0,0051). Die mRNA-Expression von CXCL2 stieg mit zunehmender Listerienlast sowohl in der Milz (r=0,705 p=0,0033) als auch in der Leber (r=0,759 p=0,001) (**Abb. 22 A**). Obwohl IL-6 in der Leber weniger stark exprimiert wurde als in der Milz, korrelierte die mRNA-Expression hier stark mit der Listerienlast (r=0,824 p=0,0003), in der Milz hingegen nicht (r=0,159 p=0,5719). TNF-α zeigte eine positive Korrelation mit der Listerienlast in der Leber (r=0,603 p=0,0172) (**Abb. 22 B**). Die Werte für die mRNA-Expression von SAA und Haptoglobin zeigten keine Korrelation mit der Listerienlast (**Abb. 22 C**).

Durch die Analyse der relativen mRNA-Expression wurde insgesamt gezeigt, dass die beiden IL-6-Inhibitoren, α-IL-6 mAk und sgp130-Fc, unterschiedliche Auswirkungen auf die Produktion von Entzündungsmediatoren und Zytokinen haben, die während der Listerieninfektion und Entzündung eine Rolle spielen. In einigen Fällen wurde dabei eine Korrelation zwischen der Höhe der Listerienlast und der mRNA-Expression beobachtet.

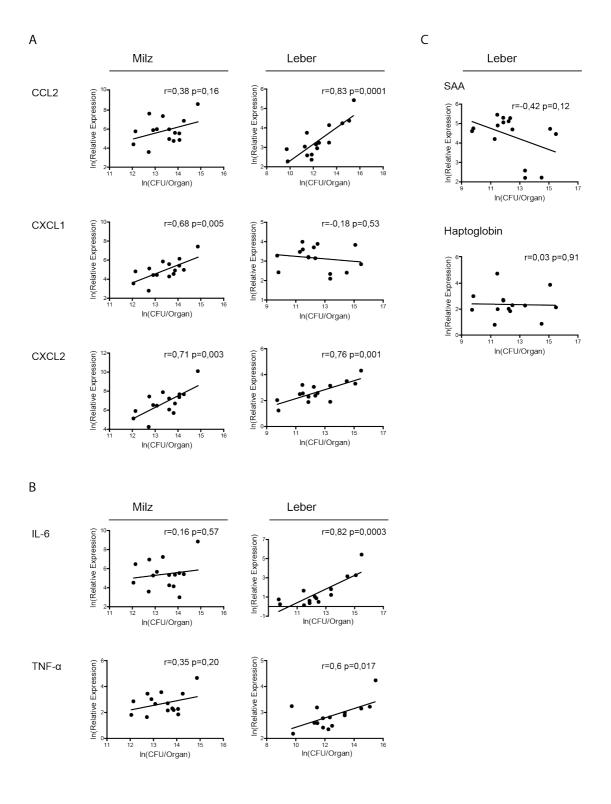


Abb. 22: Korrelation zwischen Listerienlast und mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren Dargestellt ist hier die Listerienlast (CFU/Organ) gegen die relative mRNA-Expression der verschiedenen Chemokine (A), Zytokine (B) und Akute-Phase-Proteine (C). Die Werte wurden für die Analyse sowie für die graphische Darstellung logarithmiert (ln). Als Maß für die Korrelation wird jeweils der Korrelationskoeffizient r und der zugehörige p-Wert angegeben. Als signifikant gilt eine Korrelation mit einem p<0,05.

### 4.3.4. Serumkonzentrationen von IL-6 nach Behandlung mit $\alpha$ -IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Mittels ELISA-Messungen wurde die Menge an systemisch verfügbarem IL-6 in den Seren der unterschiedlich behandelten Mäuse bestimmt (Abb. 23).

In den unbehandelten und nicht-infizierten Mäusen war kein IL-6 im Serum detektierbar. Die humIgG-Gruppe wies IL-6-Serumkonzentrationen von durchschnittlich 0,07 ng/ml auf. Die IL-6-Konzentrationen in den Seren der Tiere, die mit α-IL-6 mAk behandelt wurden, lagen bei ca. 0,3 ng/ml, bei den sgp130-Fc-behandelten Tieren betrugen sie 0,6 ng/ml. Im paarweisen Vergleich zeigte sich, dass das Serum-IL-6 in den α-IL-6 mAk-behandelten Mäusen im Vergleich zur humIgG-Gruppe um den Faktor 3,9 erhöht war. In den sgp130-Fc-behandelten Mäusen lag das Serum-IL-6 im Gegensatz zur humIgG-Gruppe um den Faktor 11,7 höher, dieser Unterschied war signifikant (p<0,001).

Insgesamt zeigten sich also in den mit IL-6-Inhibitoren behandelten und infizierten Mäusen höhere IL-6-Serum-Spiegel als in der Kontrollgruppe. Dieser Effekt war bei den sgp130-Fcbehandelten Mäusen am größten.

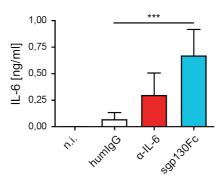


Abb. 23: Serumkonzentrationen von IL-6 nach der Behandlung mit  $\alpha$ -IL-6 mAk und sgp130-Fc und Listerieninfektion C57BL/6 Wildtyp-Mäusen wurde der  $\alpha$ -IL-6 mAk (25 g/kg KG) oder das sgp130Fc-Fusionsprotein (12,5 g/kg KG) intraperitoneal injiziert. Als Kontrolle diente humanes IgG (12,5 g/kg KG). Nach 24 h erfolgte die intravenöse Infektion mit  $2 \times 10^4$  Listerien. Eine weitere Kontrollgruppe erhielt in beiden Fällen nur PBS (nicht-infiziert, n.i.). An d3 p.i. wurde den Mäusen *post mortem* Blut abgenommen. Die Konzentration von IL-6 in den Seren wurde durch ELISA ermittelt. Die Graphen stellen das arithemitische Mittel  $\pm$  SD dar (nicht-infiziert: n=5, behandelt und behandelt und infiziert: n=7). Die Daten stehen repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

# 4.4. Die angeborene Immunantwort auf Listeria monocytogenes in $IL-6^{KO}$ - und sgp130FcTg Mäusen

Um zwischen dem klassischen Signalweg und dem Trans-Signalweg von IL-6 während des Infektionsgeschehens zu differenzieren, wurden in den bisher dargestellten Experimenten (Kap. 4.3) entweder beide Signalwege mit einem α-IL-6 mAk oder der Trans-Signalweg spezifisch mit einem sgp130Fc-Fusionsprotein inhibiert. In einem weiteren Versuch wurden keine Inhibitoren verwendet, sondern IL-6<sup>KO</sup>- und sgp130<sup>Tg</sup>-Mäuse mit *L. monocytogenes* infiziert. Diese Versuchsmäuse stellen Äquivalente zur IL-6-Blockade mit α-IL-6 mAk oder sgp130-Fc dar: in den IL-6<sup>KO</sup>-Mäusen wird kein IL-6 exprimiert (Kopf *et al.* 1994), es kommt daher weder zur klassischen Signalübertragung durch IL-6 noch zu dem Trans-Signalweg von IL-6. Die sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Mäuse exprimieren das sgp130Fc-Fusionsprotein konstitutiv in der Leber, sgp130Fc liegt daher konstant im Serum und im Gewebe vor. In diesen Mäusen wird konstitutiv der Trans-Signalweg von IL-6 verhindert (Rabe *et al.* 2008).

#### 4.4.1. Listerientiter in IL-6<sup>KO</sup>- und sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Mäusen

An d3 nach der Infektion mit *L. monocytogenes* betrugen die Listerientiter in der Milz der Wildtyp-Mäuse durchschnittlich  $2\times10^5$  CFU/Organ (**Abb. 24**). In den IL-6<sup>KO</sup>-Mäusen lagen sie im Vergleich dazu um den Faktor 3,9 höher, bei ca.  $5\times10^5$  CFU/Organ. Am niedrigsten fielen die Listerientiter in der Milz der sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Gruppe aus, hier betrugen die sie durchschnittlich  $3\times10^4$  CFU/Organ. In der Leber lagen die Listerientiter in den Wildtyp-Tieren bei durchschnittlich  $4\times10^4$  CFU/Organ und in den IL-6<sup>KO</sup>-Mäusen bei  $7\times10^5$  CFU/Organ. Die niedrigsten Listerientiter wurden auch in der Leber in den sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Mäusen gemessen und lagen hier bei durchschnittlich  $3\times10^3$  CFU/Organ.

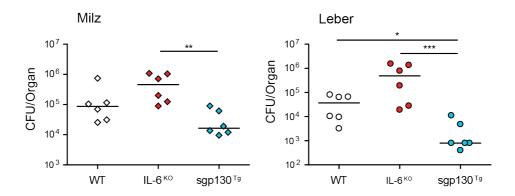


Abb. 24: Listerientiter in Wildtyp-, IL-6<sup>KO</sup>- und sgp130<sup>Tg</sup>-Mäusen C57BL/6 Wildtyp-, IL-6<sup>KO</sup>- und sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Mäuse (n=6) wurden intravenös mit 2×10<sup>4</sup> Listerien infiziert, die Organentnahme erfolgte an d3 p.i. Milzen und Lebern wurden als Gewebesuspensionen für 48 h bei 37°C auf TSB-Agarplatten inkubiert, anschließend wurden die Listerienkolonien quantifiziert. Die Listerienlast ist in colony forming units (CFU) pro Organ dargstellt. Für jede Mausgruppe ist der Median angegeben. \*p<0,05; \*\*p<0,1, \*\*\*p<0,01. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Diese hier erzielten Ergebnisse entsprechen somit weitgehend dem Experiment aus Kap. 4.3.1. Die komplette Neutralisierung von IL-6 führte auch hier zu den höchsten Listerientitern in Milz und Leber. Eine Abweichung stellt die Beobachtung dar, dass die Listerientiter der sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Mäusen sogar niedriger als die der Wildtyp-Tiere waren.

### 4.4.2. Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in *Listeria monocytogenes* infizierten IL-6<sup>KO</sup>- und sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Mäusen

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in **Abb. 25** dargestellt. In der Milz der Wildtyp-Tiere wurde eine durchschnittliche Granulozytenfrequenz von ca. 4,8% gemessen und in den IL-6<sup>KO</sup>-Tieren lag sie mit ca. 5,5% ungefähr auf dem gleichen Niveau. In den sgp130<sup>Tg</sup>-Tieren war die Granulozytenzahl mit ca. 3,3% im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren durchschnittlich um den Faktor 0,3 und im Vergleich zu den IL-6<sup>KO</sup>-Tieren um den Faktor 0,4 verringert, letzterer Unterschied war signifikant (p<0,01). In der Leber der Wildtyp-Tiere betrug der Anteil der Granulozyten an den CD45<sup>+</sup> Zellen durchschnittlich 6,2%. Im Vergleich dazu lag ihr Anteil in den IL-6<sup>KO</sup>-Tieren mit ca. 3,1% um die Hälfte (p<0,05) und in den sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Tieren mit ca. 5,2% um den Faktor 0,2 niedriger.

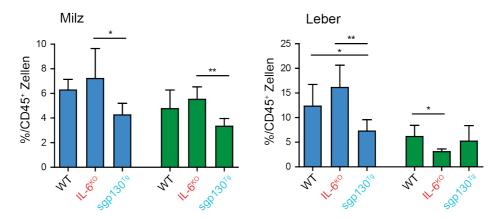


Abb. 25: Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in listerieninfizierten Wildtyp-,  $IL-6^{KO}$ - und  $sgp130^{Tg}$ -Mäusen C57BL/6 Wildtyp-,  $IL-6^{KO}$ - und  $sgp130^{Tg}$ -Mäusen C57BL/6 Wildtyp-,  $IL-6^{KO}$ - und  $sgp130^{Tg}$ -Mäuse (n=6) wurden intravenös mit  $2\times10^3$  Listerien infiziert, die Organentnahme erfolgte an Tag 3 p.i. Die Akkumulation von Inflammatorischen Monozyten (blau) und Granulozyten (grün) in Milz und Leber ist als prozentualer Anteil an den  $CD45^+$  Zellen berechnet und dargestellt. Die Graphen stellen das arithmetische  $\pm$  SD dar. \*p<0,05; \*\*p<0,01. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Bei den Frequenzen der Inflammatorischen Monozyten konnten ebenfalls, je nach Mausstamm, signifikante Unterschiede in der Zellakkumulation festgestellt werden. In der Milz der Wildtyp-Tiere betrug der Anteil der Inflammatorischen Monozyten ca. 6,3%. In den IL-6<sup>KO</sup>-Tieren lagen die Monozytenfrequenzen bei durchschnittlich 7,2% und damit um den Faktor 1,6 höher als in der sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Gruppe, wo im Mittel 4,3% Inflammatorische Monozyten gemessen wurden (p<0,05). Auch in der Leber war die Frequenz der Inflammatorischen Monozyten in der IL-6<sup>KO</sup>-Gruppe am höchsten (ca. 16,1%) während in

der Wildtyp-Gruppe durchschnittlich 12,3% Monozyten gemessen wurden. In den sgp130<sup>Tg</sup>-Tieren war die Frequenz der Inflammatorischen Monozyten mit ca. 7,3% im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren um den Faktor 0,4 (p<0,05) und im Vergleich zu den IL-6<sup>KO</sup>-Tieren um den Faktor 0,6 (p<0,01) verringert.

Zusammengefasst lagen die Frequenzen der Inflammatorischen Monozyten in der Milz und in der Leber der infizierten IL-6<sup>KO</sup>-Tiere am höchsten. Die Granulozytenakkumulation war in der Milzen der sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Tiere geringer ausgeprägt als in denen der anderen beiden Gruppen. Dies entspricht der Beobachtung, dass in den sgp130Fc-behandelten Mäusen weniger Granuloyzten in der Milz akkumulierten (vergl. Kap. 4.3.2).

#### 5. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden die Immunmechanismen analysiert, die während der Infektion mit *Listeria monocytogenes* durch Interleukin-6 (IL-6) ausgelöst werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden Zellpopulationen untersucht, die in der angeborenen Immunantwort auf *L. monocytogenes* von Bedeutung sind. Zudem wurde die Expression von IL-6 und dem löslichen sowie membrangebundenen IL-6Rα analysiert. Es zeigte sich, dass sowohl der klassische Signalweg als auch der Trans-Signalweg in der angeborenen Immunantwort gegen *L. monocytogenes* möglich sind.

Im zweiten Abschnitt wurde untersucht, welche Rolle im Besonderen die Inflammatorischen Monozyten für das IL-6-Signal spielen, indem IL-6 und sIL-6R $\alpha$  im Serum infizierter und nicht-infizierter CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse bestimmt wurde.

Im dritten Abschnitt wurde der Frage nachgegangen, ob die unterschiedlichen Blockaden von IL-6 die frühe Immunantwort gegen *L. monocytogenes* beeinflussen und ob beiden Signalwegen spezifische Effekte zugeordnet werden können.

In der folgenden Diskussion wird zunächst auf die Zellpopulationen und Entzündungsmediatoren eingegangen, die für die Listerienkontrolle von Bedeutung sind. Insbesondere wird diskutiert, welche Zellpopulationen während der Infektion Quellen für IL-6 und sIL-6Rα darstellen könnten. Anschließend wird analysiert, ob dem klassischen Signalweg oder dem Trans-Signalweg von IL-6 eine besondere Bedeutung für die Kontrolle der Listerieninfektion beigemessen werden kann und welche Konsequenzen daraus entstehen

# 5.1. Granulozyten und Inflammatorische Monozyten während der frühen Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Einwanderung von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten in die Leber und Milz quantifiziert. Für die Aufreinigung und Färbung wurde ein Protokoll von Eric Pamer verwendet (siehe Shi *et al.* 2010 und Russel *et al.* 1998), wodurch die Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten reproduzierbar charakterisiert und gegeneinander abgegrenzt werden konnten. Unschärfen in der Eingrenzung könnten durch die Gr-1-Markierung mit dem anti-Gr-1 mAk (Klon: RB6-8C5) entstanden sein, durch den die Granulozyten als CD11bhighF4/80lowGr-1high definiert wurden (Abb. 9). Denn der anti-Gr-1 mAk bindet ein Epitop, das sich auf Ly6G-, aber auch auf Ly6C-Proteinen befindet. Granulozyten sind Ly6G+Ly6Cint, während Inflammatorische Monozyten Ly6G-Ly6Chigh sind (Shi *et al.* 2011). Beide Zellpopulationen exprimieren also, in unterschiedlichem Maße, Ly6C und so wird durch die oben beschriebene Färbung auch ein Teil der Monozyten in die Granulozytenpopulation eingeschlossen.

Insgesamt variierte die Expression der Oberflächenmarker auf den Zellen der gesunden und der infizierten Tieren je nach Zeitpunkt: der Mittlere Fluoreszenz Index (MFI) für Ly6C und CD11b stieg auf den Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten an d2 und d3 p.i. leicht an (Daten in dieser Arbeit nicht gezeigt). Für eine korrekte Definition der Zellpopulationen wurden die Eingrenzungen zu den genannten Zeitpunkten daher angepasst. Durch Drevets *et al.* (2010) wurde beschrieben, dass die CD11b<sup>+</sup>Ly6C<sup>high</sup> Monozyten während einer Listerieninfektion die Expression von Oberflächenmolekülen wie CD115 und CD121b, je nach Höhe der Infektionsdosis und Reifestatus, regulieren. Möglicherweise ist auch die Expression von Ly6C und CD11b, das unter anderem als Zelladhäsionsmolekül dient, reifungsabhängig.

Nach der erfolgreichen Charakterisierung bzw. Eingrenzung von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten konnte durch die durchflusszytometrische Analyse insgesamt bestätigt werden, dass diese Zellpopulationen während der Infektion mit L. monocytogenes in Milz und Leber akkumulieren (Abb. 10) und für die Kontrolle der Listerieninfektion eine Bedeutung zu haben scheinen. Shi et al. (2010) beschrieben nach der i.v.-Infektion mit 1×10<sup>4</sup> Listerien in der Leber einen Anstieg der Inflammatorischen Monozyten von ~1-3% auf ~30% der CD45<sup>+</sup> Zellen und dieser Größenordnung entsprachen auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Granulozyten und Inflammatorische Monozyten exprimieren als myeloide Zellen CD11b (Abb. 9) und die Frequenz der CD11b<sup>+</sup> Zellen, die weder als Granulozyten noch als Inflammatorische Monozyten definiert wurden, blieb in den Milzen gesunder und infizierter Tieren relativ konstant (Daten in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass der Anstieg der CD11b<sup>+</sup> Zellen insgesamt durch Granulozyten und Inflammatorische Monozyten bedingt war. In der Leber hingegen stieg nach der Infektion zusätzlich der Anteil der übrigen CD11b<sup>+</sup> Zellen an. Vermutlich befinden sich unter diesen Zellen NK-Zellen oder aber weitere Makrophagen- und Monozyten-Subpopulationen. Des Weiteren fiel bei der durchflusszytometrischen Analyse eine Population auf, die F4/80 in variierender Höhe auf der Oberfläche besaß. F4/80 wird von Zellen der angeborenen Immunantwort, wie gewebsständigen Makrophagen und DCs, exprimiert. Diese Population scheint ebenfalls eine Rolle bei der Listerienbekämpfung zu spielen, für eine genauere Differenzierung wären allerdings weitere Experimente mit Einsatz weiterer Antikörper nötig gewesen.

CCR2 ist ein Chemokinrezeptor, der sich auf den Inflammatorischen Monozyten befindet und ihre Emigration aus dem Knochenmark vermittelt. Er ist daher für die Kontrolle der Listerieninfektion essentiell (Serbina und Pamer 2006). Während der Analyse der CCR2<sup>KO</sup>-Tiere in der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass in Milzen und Lebern tatsächlich die Population der Inflammatorischen Monozyten vermindert war (**Abb. 16**). Entsprechend wurden hier, im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren, massiv erhöhte Listerientiter gemessen

(Abb. 15). Interessanterweise akkumulierten in den Organen der infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Tiere deutlich mehr Granulozyten als in den infizierten Wildtyp-Tieren (Abb. 16 B), was als gegenregulatorischer Mechanismus gedeutet werden könnte. Die hohen Listerientiter weisen allerdings darauf hin, dass die Granulozyten die verminderte Monozytenakkumulation nicht zu kompensieren vermögen. Um den Einfluss der Granulozyten auf die Listerienkontrolle zu untersuchen, hätte man vergleichend Mäuse analysieren müssen, in denen die Granulozyten depletiert sind. So führten Shi *et al.* (2011) Versuche mit Mäusen durch, in denen CCR2<sup>+</sup>-Zellen und Granulozyten jeweils spezifisch depletiert wurden und zeigten, dass die Depletion der Ly6G<sup>+</sup>Ly6G<sup>inter</sup> Granulozyten die Überlebensrate von listerieninfizierten Mäusen nicht beeinflusste. Mit diesem Ergebnis korreliert die Beobachtung der vorliegenden Arbeit, dass die Behandlung mit sgp130-Fc eine deutliche Verminderung der Granulozytenzahl in der Milz bewirkte, die Listerientiter der gleichen Gruppe allerdings nicht höher lagen als in der Kontrollgruppe (humIgG) (Abb. 20 und Abb. 21). Auch dies ist ein Hinweis darauf, dass die Granulozyten für die Listerienkontrolle (in der Milz) verzichtbar sind.

#### 5.2. Restimulation von Milzzellen und Zytokinproduktion in vitro

IL-6 wird von verschiedenen Zellen produziert, darunter sind Makrophagen und Monozyten, B-Zellen, einige T-Zell-Subtypen, endotheliale und epitheliale Zellen, Fibroblasten und Mastzellen (Kishimoto 1989). IL-6 sowie TNF-α (und auch IL-1) werden während der frühen Infektion mit L. monocytogenes vermehrt produziert und tragen Bakterienkontrolle bei, sind dabei aber teilweise redundant (Nakane et al. 1992, Kopf et al. 1994, Liu et al. 1995). Die Produktion von IL-6 und TNF-α kann durch die Aktivierung von TLRs stimuliert werden. Dementsprechend zeigten Mäuse, denen das Gen für IRAK-M, einem negativen Regulator des TLR-Signals fehlt, nach der Restimulation mit L. monocytogenes oder anderen mikrobiellen Bestandteilen, eine vermehrte Produktion von IL-6 und TNF-α (Kobayashi *et al.* 2002).

Die intrazelluläre Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse ist eine sensitive Methode, um die Zytokinproduktion durch einzelne Zellpopulationen nachzuweisen. Sie bringt allerdings auch Nachteile mit sich, die zu Ungenauigkeiten der Messergebnisse führen können: insbesondere infizierte Monozyten, aber auch Granulozyten, bleiben stärker an Reaktionsgefäßen haften. Zusätzlich gehen durch den Stress, den die Stimulation bei 37°C auslöst, bereits Zellen die Apoptose ein und sind für die Analyse verloren. So zeigten sich in den Stimulationsansätzen im Vergleich zur direkten Färbung deutlich weniger Zellen in Milzen und Lebern (vergl. Abb. 10 und Abb. 13 B). Zudem hängt die *in vitro* induzierte Zytokinproduktion von der Art der Restimulation ab. Die Restimulation von Makrophagen mit lebenden Listerien führt beispielsweise zu einer weitaus höheren Produktion von TNF-α, als mit hitzegetöteten Listerien (HKL) (Zhan und

Cheers 1995). Für IL-6 wurde diesbezüglich noch kein Unterschied beobachtet. Es ist also möglich, dass durch den Verlust von Zellen und die Restimulation mit HKL Ergebnisse zur Zytokinexpression erzielt wurden, die nicht den realen Verhältnissen entsprechen.

In der vorliegenden Arbeit zeigten die als Inflammatorische Monozyten und Granulozyten definierten Zellen in der durchflusszytometrischen Analyse die Fähigkeit zur TNF-α-Produktion (Abb. 13). Ein Teil der jeweiligen Zellpopulation wies schon in den Stimulationsansätzen ohne HKL eine geringe TNF-α-Produktion auf (Abb. 13 A/B). Dies könnte bedeuten, dass bereits die Inkubation über 6h bei 37°C die Zellen so stark stimuliert, dass sie TNF-α produzieren, oder aber sie produzieren auch in Ruhe TNF-α. In beiden Zellpopulationen stieg der Anteil der TNF-α<sup>+</sup> Zellen durch die Restimulation mit HKL jedoch deutlich an. Bei den Inflammatorischen Monozyten erhöhte sich nicht nur die Anzahl der TNF-α<sup>+</sup> Zellen, sondern auch die TNF-α-Expression pro Zelle, was durch den deutlich gesteigerten MFI veranschaulicht wurde (Abb. 13 C). Die Listerien, bzw. HKL, können in den Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten also spezifisch die Produktion von TNF-α induzieren.

In den Inflammatorischen Monozyten konnte durch die Restimulation mit HKL auch die Produktion von IL-6 induziert werden (Abb. 13 A/B), für die Granulozyten schienen die HKL dagegen keinen spezifischen Stimulus zur IL-6-Produktion darzustellen. Im Vergleich zur Isotypkontrolle waren die Granulozyten zwar IL-6<sup>+</sup>, allerdings lag der Anteil der IL-6<sup>+</sup> Zellen hier nicht höher als in dem Stimulationsansatz ohne HKL. Es handelte sich daher wahrscheinlich um ein Färbeartefakt, denn in der Literatur sind Granulozyten nicht als IL-6-produzierende Zellen beschrieben. Möglich wäre, dass die Granulozyten durch die Sekretion von TNF-α zumindest indirekt die IL-6-Produktion in Inflammatorischen Monoyzyten und Makrophagen induzieren. Allerdings wurde beschrieben, dass IL-6 während der Listerieninfekion unabhängig von TNF-α produziert wird (Nakane *et al.* 1992, Havell und Sehgal 1991).

Zusammengefasst bestätigte die durchflusszytometrische Analyse der restimulierten Zellen, dass die Inflammatorischen Monozyten IL-6 und TNF- $\alpha$  und die Granulozyten TNF- $\alpha$  als Reaktion auf HKL spezifisch produzieren können. Ob sie dies auch *in vivo* während der Listerieninfektion tun und in welcher Relation sie zu den systemisch bzw. lokal erhöhten Zytokinspiegeln beitragen, lässt sich durch die Restimulation mit HKL alleine nicht festlegen.

# 5.3. Produktion von IL-6 während der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* wurde eine erhöhte Produktion von IL-6 in Milz und Leber durch die qRT-PCR und im Serum durch den ELISA nachgewiesen (Abb. 11 und Abb. 12 A). In der Milz stieg die IL-6 mRNA-Expression schon an d1 p.i. an und erreichte ein Maximum an d2 p.i. Eine Tendenz zum Abfall der IL-6-Expression war an d3 p.i. erkennbar. Sehr wahrscheinlich ist, dass Milz und Leber nicht die einzigen Gewebe waren, in denen IL-6 während der Listerieninfektion produziert wurde, der hier messbare Produktionsanstieg aber zu der erhöhten IL-6-Konzentration im Serum beitrug. Da in der vorliegenden Arbeit die frühe Immunantwort gegen *L. monocytogenes* untersucht wurde, fanden Messungen zu späteren Zeitpunkten nicht statt. Allerdings zeigten Liu *et al.* (1992), dass die IL-6-Konzentration im Serum während der frühen Listerieninfektion (bei einer Infektionsdosis von 10<sup>4</sup> Listerien) mit dem Grad der Gewebeinfiltration korreliert, das Maximum an d2 und d3 p.i. erreicht und anschließend langsam wieder absinkt, bis an Tag 14 kein IL-6 mehr im Serum detektierbar ist.

Das systemisch verfügbare IL-6 kann in der Leber eine Akute-Phase-Anwort und somit die Produktion der Akute-Phase-Proteine Serumamyloid A (SAA) und Haptoglobin induzieren (Kishimoto 1989). Die erhöhte mRNA Expression von SAA und Haptoglobin erfolgte in der vorliegenden Arbeit zeitlich versetzt zu IL-6, mit einem deutlichen Anstieg an d2 und d3 p.i. (Abb. 12 B). Dies macht den kausalen Zusammenhang möglich, dass IL-6 als spezifische Reaktion auf die intravenöse Infektion mit *L. monocytogenes* eine Akute-Phase-Antwort hervorruft.

### 5.4. Der IL-6Ra während der Infektion mit Listeria monocytogenes

Der IL-6-Rezeptorkomplex besteht aus dem ubiquitär auf Zelloberflächen vorhandenen gp130 und dem IL-6R $\alpha$ , der nur von Hepatozyten, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und einigen T-Zell-Subtypen exprimiert wird (Rose-John *et al.* 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte der IL-6R $\alpha$  durch die durchflusszytometrische Analyse auf den Membranen der als Inflammatorische Monozyten und Granulozyten definierten sowie auf einer nicht näher klassifizierten Untergruppe von CD4<sup>+</sup> Zellen, nachgewiesen werden (Abb. 14). Für die durchflusszytometrische Analyse der IL-6R $\alpha$ -Expression wurde der anti-Maus IL-6R $\alpha$  Ak (Klon: D7715A7) verwendet. Die IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen konnten deutlich von der Isotypkontrolle abgegrenzt werden (Abb. 14 A), obwohl das Fluoreszenzsignal insgesamt nicht sehr hell war. Ein stärkeres Signal hätte eventuell eine präzisere Analyse ermöglicht, jedoch war dies der einzige Antikörper, der für die Färbung in Frage kam. Wie hoch die tatsächliche IL-6R $\alpha$ -Expressionsrate der Zellen liegt, lässt sich durchflusszytometrisch nicht mit Sicherheit bestimmen, da Temperaturschwankungen und mechanischer Stress schon Stimuli für die

Abspaltung von IL-6Rα darstellen können. Insbesondere Granulozyten haben eine kurze Lebensspanne und sterben nach Aktivierung schnell durch Apoptose, *in vivo* und *in vitro*. Die Induktion der Apoptose führt in diesen Zellen zur IL-6Rα-Abspaltung (Scheller *et al.*2011). Um ein möglichst genaues Abbild der Situation *in vivo* zu erhalten, fand die Aufreinigung der Zellen für die IL-6Rα-Färbung daher besonders schonend, ohne den Gewebeverdau und durchgehend auf Eis statt.

Aufgrund der nachgewiesenen IL-6R $\alpha$ -Expression auf den Granulozyten, Inflammatorischen Monozyten und den CD4<sup>+</sup> Zellen lässt sich zunächst schließen, dass in diesen Zelltypen der klassische Signalweg von IL-6 möglich ist. Zusätzlich wurde beobachtet, dass die definierten Zellen den membrangebundenen IL-6R $\alpha$  im Laufe der Infektion verlieren (**Abb. 14**). Die Mechanismen, die möglicherweise zum Verlust des IL-6R $\alpha$  geführt haben, und die Konsequenz für den Infektionsverlauf sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

Einen Mechanismus, der die Verminderung der IL-6Rα-Expression auf Zelloberflächen bewirkt, stellt die bereits erwähnte proteolytische Abspaltung von IL-6Rα dar, welche über verschiedene Wege stimuliert werden kann. In humanen Granulozyten sowie in Monozyten und Makrophagen wurde beobachtet, dass die proteolytische Abspaltung durch das Akute-Phase-Protein CRP ausgelöst wird (Jones SA et al. 1999, Atreya et al. 2000). Unklar ist bisher, über welchen Mechanismus das CRP diese Abspaltung von IL-6Rα bewirkt. IL-6Rα ist ein Substrat der Metalloproteinase ADAM 17. Wird ADAM 17 inhibiert, findet jedoch nur eine leichte Verminderung der CRP-induzierten Abspaltung statt (Jones SA et al. 1999). Dies lässt den Schluss zu, dass das CRP, neben der ADAM 17-Induktion, über weitere Mechanismen verfügen muss, die zur proteolytischen Abspaltung von IL-6Ra führen. Als äquivalent zum humanen CRP, dessen Produktion in der Leber auch durch IL-6 stimuliert wird (Ganapathi et al. 1988), gilt in der Maus das SAA. Die erhöhte mRNA-Expression von SAA während der Listerieninfektion wurde in der vorliegenden Arbeit durch die qRT-PCR festgestellt (Abb. 12 B) und es ist möglich, dass es als Akute-Phase-Protein in der Maus ebenfalls über einen unbekannten Mechanismus die Abspaltung von IL-6Ra induziert.

In den Granulozyten kann ADAM 17 zudem durch die Caspasen-induzierte Apoptose aktiviert werden und anschließend die Abspaltung von IL-6Rα bewirken. Eine Depletion der Granulozyten in einem Peritonitismodell führte dementsprechend zu verminderten Konzentrationen von sIL-6Rα und es akkumulierten weniger mononukleäre Zellen im entzündeten Gewebe (Chalaris *et al.* 2007). Auch durch bakterielle porenformende Toxine kann die IL-6Rα-Abspaltung induziert werden (Walev *et al.* 1996). *L. monocytogenes* besitzt mit LLO ebenfalls ein porenbildendes Toxin, das als Stimulus fungieren kann.

Es erschien zudem möglich, dass die IL-6R $\alpha$ -Abspaltung während der Listerieninfektion vom Aktivierungszustand einer Zelle abhängt. Um dies zu überprüfen wurde die Relation der

IL-6Rα-Expression zur Expression von Aktivierungsmarkern wie CD44 und CD62L auf T-Zell-Oberflächen untersucht (Yan *et al.* 2011, nicht-veröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe Prof. Mittrücker). Während IL-6Rα an d2 nach der Listerieninfektion auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, im Vergleich zu nicht-infizierten Tieren, um durchschnittlich 50% weniger exprimiert wurde, blieben CD44 und CD62L weitgehend unverändert auf den Zelloberflächen erhalten. Es konnte hier also kein Zusammenhang festgestellt werden. Gleichzeitig war ART2, das wie CD62L ein Substrat der Metalloproteinase ADAM 17 ist (Kahl *et al.* 2000), während der Infektion konstant auf den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen vorhanden, was einen Hinweis darauf darstellt, dass die Listerieninfektion kein Aktivator von ADAM 17 ist.

Grundsätzlich erscheint es also möglich, dass die Infektion mit L. monocytogenes in den analysierten Zellen die proteolytische Abspaltung von IL-6R $\alpha$  induziert. Der zugrunde liegende Mechanismus konnte allerdings noch nicht identifiziert werden. Es ist möglich dass die Metalloproteinase ADAM17 hierbei eine Rolle spielt, insbesondere aufgrund der letztgenannten Beobachtungen erscheint dies aber eher unwahrscheinlich.

Die Abspaltung von IL-6Rα könnte, wenn sie denn im Rahmen der Listerieninfektion erfolgt, für die angeborene Immunantwort auf L. monocytogenes von besonderer Bedeutung sein. So wurde beobachtet, dass durch die IL-6Rα-Abspaltung von Granulozyten, die während eines akuten Entzündungsgeschehens zuerst in das Gewebe einwandern und bald darauf die Apoptose eingehen, der Trans-Signalweg von IL-6 in diesem Gewebe ermöglicht wird (Hurst et al. 2001). Dadurch bewirken die Granulozyten die Veränderung des im Gewebe herrschenden Chemokin-Profils und gewährleisten so den Übergang von der granulozytären zur mononukleären Entzündungsphase. Monozyten und Makrophagen beseitigen die Granulozyten und induzieren gleichzeitig eine spezifische T-Zell-Antwort. Diese Abfolge in der Zell-Zell-Interaktion wurde von Hurst et al. (2001) beispielsweise in einem Modell der akuten bakteriellen Peritonitis gezeigt. Dass die Granulozyten auch während der Infektion mit L. monocytogenes diejenige Zellpopulation sind, die den Übergang von der granulozytären zur mononukleären Phase bedingt, kann aus der vorliegenden Arbeit allerdings nicht gefolgert werden. Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass die ursprüngliche IL-6Rα Expressionsrate auf den Granulozyten vor der Organaufreinigung höher lag (s.o.), verloren die anderen untersuchten Zellpopulationen zeitgleich und in gleichem Maße den IL-6Rα von der Oberfläche (Abb. 14). Zudem wurde durch die Inhibition des Trans-Signals durch sgp130-Fc im Vergleich zur Kontrollgruppe weder eine deutlich verminderte Expression von CCL2, noch eine geringere Monozytenfrequenz in Milz und Leber detektiert (siehe Abb. 20 und Abb. 21 A). Auch schien die sgp130-Fc-behandelte Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe in der Listerienkontrolle nicht eingeschränkt gewesen zu sein (Abb. 19), was bei einer verminderten Einwanderung von Monozyten wahrscheinlich der Fall gewesen wäre.

Möglicherweise ist nicht die proteolytische Abspaltung, sondern ein anderer Mechanismus die Ursache für die verminderte Expression von IL-6Rα während der Infektion mit *L. monocytogenes*. Gegen eine proteolytischen Abspaltung könnte sprechen, dass das systemisch verfügbare sIL-6Rα im Serum der infizierten Mäuse nicht deutlich anstieg, obwohl sich die IL-6Rα-Expression auf den Membranen der verschiedenen Zelltypen verringerte (**Abb. 11**). Hierfür sind verschiedene Gründe denkbar: die genannten Zelltypen tragen entweder nicht zu den Serum-Spiegeln von sIL-6Rα bei oder die Konzentrationen liegen mit ca. 10 ng/ml insgesamt so hoch, dass geringe Unterschiede nicht messbar sind. Vielleicht entsteht auch nur lokal in den listerieninfinfizierten Geweben eine erhöhte Konzentration von sIL-6Rα, die nicht im Zusammenhang mit den systemischen sIL-6Rα-Spiegeln steht.

Neben der proteolytischen Abspaltung könnte auch die Herunterregulierung des Rezeptorkomplexes der Grund für die verminderte Expression des IL-6Ra, während der Listerieninfektion, sein. Durch in vitro-Studien wurde gezeigt, dass der gesamte Signalkomplex aus IL-6 und IL-6Rα/gp130 nach der Bindung von IL-6 durch die exprimierende Zelle internalisiert wird (Dittrich et al. 1994). Zu späteren Zeitpunkten nach der Inkubation mit IL-6 bleibt die IL-6Ra-Expressionsrate konstant bei 50% der Anfangsmenge. Dieser Prozess wird durch Dileucin-ähnliche-Motive (dileucin-like-motifs) auf der zytoplasmatischen Seite von gp130 induziert und verhindert eine zu lange und starke Wirkung von IL-6 (Dittrich et al. 1994). Es ist denkbar, dass dieser Prozess auch bei der Infektion mit L. monocytogenes auftritt. Die durchflusszytometrische Analyse in der vorliegenden Arbeit zeigte, dass sich die IL-6Rα-Expression auf Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten und CD4<sup>+</sup>-Zellen ebenfalls um durchschnittlich 50% verminderte (Abb. 14). Messungen an d8 p.i. konnten zudem zeigen, dass sie sich auf diesen Zellen im Laufe der Infektion wieder normalisierte (Yan et al. 2011, nicht-veröffentlichte Ergebnisse Arbeitsgruppe Prof. Mittrücker). Um die intrazelluläre Menge an IL-6/IL-6Rα/gp130 und einen eventuellen Zusammenhang mit der Produktion von IL-6 festzustellen, wären weitere Experimente mit durchflusszytometrischen Analysen nötig. Interessant wäre dabei ebenfalls zu sehen, ob eine Internalisierung beim Trans-Signalweg gleichermaßen wie beim klassischen Signalweg von IL-6 auftritt.

# 5.5. Inflammatorische Monozyten als Quelle für IL-6 und sIL-6Ra während der Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Dass Monozyten und Makrophagen in der Lage sind, IL-6 zu produzieren wurde oben bereits dargestellt (Kap. 5.2). Der zelluläre Ursprung von sIL-6Rα wurde durch McFarland-Mancini *et al.* (2010) untersucht. Sie nutzten in konditionalen knock-out Mäusen das Cre/loxP-System, um das Gen für IL-6Rα in bestimmten Zellen auszuschalten. Wurde die IL-6Rα-Expression nur in den Hepatozyten ausgeschaltet, führte dies nach einer induzierten Gewebeschädigung, im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen, zu einer um 32% geringeren Serumkonzentration von sIL-6Rα. Wurde das Gen in Makrophagen und Granulozyten ausgeschaltet, verminderte sich die Konzentration um 60%. Diese Zelltypen stellen zusammen also die Hauptquelle von sIL-6Rα im Serum dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde in CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen untersucht, ob die Inflammatorischen Monozyten der peripheren Gewebe eine Quelle von IL-6 und sIL-6Rα während der Listerieninfektion darstellen. In CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen sind die Monozyten während einer Entzündung unfähig, das Knochenmark zu verlassen (Serbina und Pamer 2006). In der durchflusszytometrischen Analyse ließ sich dementsprechend die verminderte Frequenz von Inflammatorischen Monozyten in Milz und Leber feststellen – bei gleichzeitig stark erhöhten Listerientitern in beiden Organen (Abb. 15 und Abb. 16). Infolgedessen wurde analysiert, ob CCR2<sup>+</sup>Ly6C<sup>+</sup> Inflammatorischen die peripheren Monozyten maßgeblich Konzentrationen von IL-6- und sIL-6Rα im Serum beeinflussen. Es zeigte sich zum einen, dass die IL-6-Konzentration im Serum der infizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse deutlich höher lag, als in den infizierten Wildtyp-Tieren (Abb. 17). Dies ist am ehesten durch die hohen Listerientiter und den somit gravierenderen Entzündungsstatus der CCR2KO-Mäuse zu erklären, da die IL-6-Konzentration im Serum, wie bereits erwähnt wurde, mit dem Grad der Gewebeinfiltration durch Listerien korreliert (Liu et al. 1992). In den nicht-infizierten Tieren war IL-6 nicht detektierbar, deshalb konnte hier kein Vergleich der beiden Mausstämme vorgenommen werden. Die geringere periphere Monozytenfrequenz verminderte also nicht die IL-6-Produktion insgesamt. Nicht ausgeschlossen werden kann, dass es zu einer gegenregulatorischen Steigerung der IL-6-Produktion durch die noch vorhandenen Inflammatorischen Monozyten oder andere Zellen kam.

Die Serumkonzentration von sIL-6R $\alpha$  lag in den CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen niedriger als in den Wildtyp-Tieren (**Abb. 17**). Die Infektion zeigte auch hier keinen Einfluss auf den sIL-6R $\alpha$ -Gehalt im Serum, wohl aber die fehlende Expression von CCR2 in den KO-Mäusen. Die peripheren Inflammatorischen Monozyten kommen somit als Quelle des sIL-6R $\alpha$  im Serum in Frage. Es kann allerdings auch hier eine gegenregulatorische Internalisierung (s. Kap. 5.4) des IL-6R $\alpha$  aufgrund der stärkeren Listerieninfiltration eine Rolle spielen, wodurch der

IL-6R $\alpha$  in geringerem Maße auf der Zelloberfläche exprimiert und folglich weniger abgespalten werden konnte.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die peripheren Inflammatorischen Monozyten während der Listerieninfektion zu der erhöhten IL-6-Produktion in der Peripherie beitragen, aber nicht die einzigen IL-6-produzierenden Zellen sind. Zudem können sie eine Quelle für den sIL-6R $\alpha$  darstellen und somit für das Trans-Signal von IL-6 eine besondere Rolle spielen. Wie bereits ausführlich beschrieben, gelangen die Inflammatorischen Monozyten in den  $CCR2^{KO}$ -Mäusen während der Listerieninfektion nicht aus dem Knochenmark. Ob diese Zellen trotzdem zur Zytokinproduktion stimuliert werden und ob schon im Knochenmark eine Abspaltung des IL-6R $\alpha$  stattfinden könnte, müsste durch weitere Experimente aufgeklärt werden.

# 5.6. Anwendung von $\alpha$ -IL-6 mAk und sgp130-Fc für die Analyse des IL-6-Signals während der frühen Listerieninfektion

Zur Analyse des klassischen Signalweges und des Trans-Signalweges von IL-6 wurden die Versuchmäuse mit dem α-IL-6 mAk oder dem sgp130-Fc behandelt und anschließend mit L. monocytogenes infiziert. Die Mengen der Inhibitoren, die für eine effiziente IL-6-Blockade nötig sind, entstammten Erfahrungswerten der Kooperationspartner von der Universität Kiel.<sup>8</sup> Von dem α-IL-6 mAk wurden 25 g/kg KG und von dem sgp130-Fc 12,5 g/kg KG eingesetzt. Der α-IL-6 mAk (MP5-20F3) ist ein monoklonaler Antikörper aus der Ratte (Starnes et al. 1990). Das chimäre sgp130Fc wurde aus den extrazellulären Anteilen zweier gp130-Proteine und der Fc-Region von humanem IgG1 konstruiert (Jostock et al. 2001). Da insbesondere die Wirkung des sgp130-Fc untersucht werden sollte, wurde als Kontrollantikörper humanes IgG in äquivalenter Dosis eingesetzt. Als weitere Kontrolle wurde eine Gruppe unbehandelter, nicht-infizierter Tiere mitgeführt. Als passenden Kontrollantikörper für den α-IL-6 mAk hätte man zusätzlich eine Gruppe untersuchen können, die ein IgG aus der Ratte in äquivalenter Dosis erhält. Des Weiteren hätte man jeweils eine Gruppe mitführen können, die nur infiziert oder nur behandelt wird. Denn es ist möglich, dass die zur Behandlung eingesetzten Moleküle selbst eine Immunreaktion auslösen, welche von der stärkeren Immunantwort auf die Listerieninfektion überdeckt wird. Da eine noch größere Zahl an Versuchstieren im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht zu bewältigen gewesen wäre, wurde sich auf die oben beschriebenen Gruppen beschränkt.

#### 5.6.1. Einfluss von α-IL-6 mAk und sgp130-Fc auf die Listerienlast

Die Listerientiter in Milz und Leber ermöglichten zu zeigen, ob und wie sehr die Listerienkontrolle in den unterschiedlich behandelten Mäusen eingeschränkt ist. In IL-6<sup>KO</sup>-Mäusen sind nach der Listerieninfektion signifikant erhöhte Listerientiter in Milzen

-

<sup>&</sup>lt;sup>8</sup> Prof. Stefan Rose-John, Institut für Biochemie, Christian-Albrechts Universität zu Kiel.

und Lebern zu beobachten (Kopf *et al.* 1994). Dementsprechend waren auch in der vorliegenden Arbeit die Mäuse, die mit α-IL-6 mAk behandelt wurden, in der Kontrolle der Listerieninfektion am stärksten beeinträchtigt (**Abb. 19**). Die Frage, welchen Einfluss die spezifische Blockade des Trans-Signalweges auf die Listerienlast hat, wurde bisher noch nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit lag die Gruppe, die mit sgp130-Fc behandelt wurde, mit der Höhe Listerientiter auf dem Niveau der Kontrollgruppe (humIgG). In der Leber, dem hauptsächlichen Zielorgan von IL-6, waren die Unterschiede besonders stark ausgeprägt, eventuell weil hier der inhibitorische Effekt des α-IL-6 mAk am größten ist. Das Ergebnis der Blockade-Experimente wurde durch die Analyse der Listerientiter in Milz und Leber der IL-6<sup>KO</sup>- und sgp130<sup>Tg</sup>-Tieren bestätigt (**Abb. 24**). Der Trans-Signalweg scheint demnach für die Listerienkontrolle nicht entscheidend zu sein, während die komplette Blockade von IL-6 die Immunantwort auf *L. monocytogenes* beeinträchtigt.

Interessanterweise lag die Listerienlast in den sgp130<sup>Tg</sup> -Tieren sogar niedriger als in den Wildtyp-Tieren. Dies ist eine Tendenz, die auch in einem der Blockade-Experimente zu sehen war, allerdings können die durch Neutralisierung und Genmutation erzielten Effekte nur bedingt miteinander verglichen werden. Beides könnte sich unterschiedlich stark auf die Immunantwort auswirken, zudem entwickeln KO- bzw. Tg-Mäuse häufig Mechanismen zum Ausgleich veränderter Genprodukte. Die klinische Situation wird eher durch die Applikation der IL-6-Inhibitoren widergespiegelt. Dies ist daher das geeignetere Modell, um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob der jeweilige Blockademechanismus einen unterschiedlichen Effekt auf die Immunabwehr haben könnte.

# 5.6.2. Einfluss von $\alpha$ -IL-6 mAk und sgp130-Fc auf die Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten

Die Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorische Monozyten wurde in den α-IL-6 mAk- oder sgp130-Fc-behandelten und listerieninfizierten Mäusen durch die durchflusszytometrische Analyse bestimmt (Abb. 20). In Leber und Milz war die Größe der Monozytenpopulationen im Vergleich zu den nicht-infizierten und nicht-behandelten Tieren erhöht, zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen gab es keine Unterschiede. Die Granulozytenzahl war nur in den Milzen der infizierten Tiere signifikant erhöht und hier wurden zwischen den unterschiedlich behandelten Tieren Unterschiede beobachtet: im Vergleich zur humIgG-Gruppe waren die Granulozytenzahlen in den α-IL-6 mAkbehandelten Tieren vermindert und in den sgp130-Fc-behandelten Tieren sogar signifikant vermindert. Eine verminderte Granulozytenfrequenz wurde auch in den Milzen der infizierten sgp130-Fc<sup>Tg</sup>-Tieren ermittelt (Abb. 25). Der Trans-Signalweg von IL-6 scheint demnach eine Rolle für die infektionsbedingte Akkumulation von Granulozyten in der Milz zu spielen. Welche genauen Mechanismen dem zugrunde liegen könnten, ließ sich im Rahmen dieser Arbeit nicht hinreichend erklären.

# 5.6.3. Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R $\alpha$ nach Behandlung mit $\alpha$ -IL-6 mAk oder sgp130-Fc und Listerieninfektion

Das IL-6 im Serum der listerieninfizierten Mäuse war in der α-IL-6mAk-Gruppe im Vergleich zur humIgG-Gruppe erhöht, in der sgp130Fc-Gruppe wurden sogar signifikant höhere Konzentrationen gemessen. Im Serum der nicht-infizierten Mäuse war kein IL-6 detektierbar (Abb. 23). Diese erhöhten IL-6-Konzentrationen könnten Ausdruck einer stärkeren infektionsbedingten Entzündung sein, müssten in dem Falle allerdings die Listerientiter der unterschiedlich behandelten Mäuse widerspiegeln, was nicht der Fall war (vergl. Abb. 19). Ein anderer Grund könnte sein, dass das IL-6 durch α-IL-6 mAk und sgp130-Fc im Serum festgehalten wird und dadurch nur scheinbar höhere Konzentrationen im Serum gemessen werden. Dies wurde für Tiere, die mit IL-6-neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden, bereits beschrieben (Heremans *et al.* 1992, Dalrymple *et al.* 1995) und als "Chaperoning" bezeichnet. Für sgp130Fc ist bisher kein Chaperoning von IL-6 beschrieben worden, es ist jedoch wahrscheinlich, dass dies auch hier der Grund für die erhöhte IL-6-Konzentration war.

## 5.6.4. Einfluss von $\alpha$ -IL-6 mAk und sgp130-Fc auf die mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren

Die qRT-PCR ist eine sehr sensitive Methode zur Bestimmung der mRNA-Expression verschiedener Proteine. Im Unterschied zu den ELISA-Messungen des Serums wird hier nicht die systemische Konzentration eines Entzündungsmediators im Serum, sondern seine Produktion im entzündeten Gewebe quantifiziert.

In der Tendenz war die IL-6-Produktion in Milzen und Lebern der Tiere am höchsten, die vor der Infektion mit  $\alpha$ -IL-6 mAk behandelt wurden, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (**Abb. 21 B**). Auch für TNF- $\alpha$  zeigte sich als Tendenz die höchste Expression in den  $\alpha$ -IL-6 mAk-behandelten Tieren. Eine signifikante Korrelation der Höhe der mRNA-Expression von IL-6 und TNF- $\alpha$  mit der Höhe der Listerientiter, ließ sich in dieser Arbeit in der Leber feststellen (**Abb. 22 B**). Die vermehrte IL-6- und TNF- $\alpha$ -Produktion könnte demnach (zumindest in der Leber) durch die höheren Listerientiter in der  $\alpha$ -IL-6 mAk-Gruppe erklärt werden (vgl. Kap. 5.3). Die listerienbedingte Produktion von IL-6 geschieht unabhängig von TNF- $\alpha$  (Havell und Sehgal 1991), allerdings wurde beobachtet, dass die Applikation von rekombinantem IL-6 in listerieninfizierten, kultivierten Milzzellen zu einer erhöhten Produktion von TNF- $\alpha$  führte (Liu *et al.* 1995). Eventuell hätten die TNF- $\alpha$ -Spiegel in der  $\alpha$ -IL-6 mAk-behandelten Gruppe aufgrund der erhöhten Listerieninfiltration noch höher gelegen, durch die IL-6-Blockade fielen sie aber niedriger aus.

TNF-α und IL-6 induzieren Akute-Phase-Proteine in den Hepatozyten (vergl. Kap. 5.3). IL-6<sup>KO</sup>-Mäuse, die mit Listerien infiziert werden, zeigen eine eingeschränkte Produktion von SAA und Haptoglobin (Kopf *et al.* 1994). Eine 100-mal geringere mRNA-Expression für

SAA wurde von Kopf et al. (1994) auch bei der chemisch induzierten Gewebeschädigung beobachtet, nicht aber bei der Injektion von LPS. Die durch IL-6 vermittelte Akute-Phase-Antwort erfolgt also spezifisch als Reaktion auf die intravenöse Infektion mit L. monocytogenes. Da Hepatozyten den IL-6Rα exprimieren, wird die Akute-Phase-Antwort wahrscheinlich durch den klassischen IL-6-Signalweg hervorgerufen (Rose-John et al. 2006). In gewebespezifischen KO-Mäusen, in denen das Gen für IL-6Rα nur in den Hepatozyten ausgeschaltet wurde, fiel die Produktion der Akute-Phase-Proteine Haptoglobin und SAA, nach einer induzierten Gewebeschädigung, entsprechend gering aus (McFarland-Mancini et al. 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde nach der kompletten Blockade des IL-6-Signalweges mit dem α-IL-6 mAk und der Listerieninfektion eine 10-mal geringere mRNA-Expression von SAA gemessen, als in der humIgG- und der sgp130-Fc-Gruppe. Die mRNA-Expression für Haptoglobin lag dagegen in allen Gruppen auf dem gleichen Niveau. Die Behandlung mit sgp130Fc hatte dagegen keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von SAA und Haptoglobin. Die durch IL-6 ausgelöste Akute-Phase-Antwort auf eine Infektion mit L. monocytogenes, insbesondere die SAA-Produktion, scheint also ebenfalls vom klassischen IL-6-Signal abhängig zu sein und kann allein durch den Trans-Signalweg nicht ausgelöst werden.

Die Chemokine CXCL1 und CXCL2 wirken chemotaktisch auf Granulozyten (Esche et al. 2005). Sie wurden in den Milzen der sgp130-Fc-behandelten Gruppe weniger stark produziert als in denen der humIgG- und in der α-IL-6 mAk-Gruppe. Diese Beobachtung könnte ein Grund für die verminderte Granulozytenfrequenz in den Milzen der sgp130-Fcbehandelten Tiere sein. Allerdings konnte insgesamt zwischen der Produktion von CXCL1 und CXCL2 und den akkumulierten Granulozyten in der Milz keine Relation bewiesen werden (vergl. Abb. 20 und Abb. 21 A). Das Chemokin CCL2 bewirkt insbesondere die Mobilisierung von Inflammatorischen Monozyten (Serbina et al. 2003b). Der Trans-Signalweg von IL-6 soll in Entzündungssituationen verantwortlich für den Übergang von der granulozytären zur mononukleären Phase sein (vgl. Kap. 5.4), wobei auch die vermehrte Produktion von CCL2 eine Rolle spielt (Hurst et al. 2001, Kaplanski et al. 2003). Anhand eines air pouch-Modells der akuten Entzündung in der Maus wurde gezeigt, dass die Injektion eines IL-6/sIL-6Rα-Fusionsproteins (Hyper-IL-6) über das Trans-Signal von IL-6 zu einer erhöhten CCL2-Expression und damit zu einer vermehrten Invasion von Monozyten führt. In sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Tieren war diese CCL2-Produktion und Monozyten-Invasion entsprechend eingeschränkt (Rabe et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein direkter Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen IL-6-Blockademechanismen, der folgenden infektionsbedingten CCL2-Produktion und der Rekrutierung von Monozyten beobachtet werden: die Mausgruppe, die vor der Infektion mit sgp130-Fc behandelt wurde, zeigte zwar eine geringere CCL2-Produktion als die α-IL-6 mAk-Gruppe, aber sie lag immer

noch auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Am stärksten wurde CCL2 in der Gruppe exprimiert, die den  $\alpha$ -IL-6 mAk erhielt und insbesondere in der Milz war der Unterschied signifikant. Doch die vermehrte Produktion des Chemokins zeigte auch keine Relation zu den akkumulierten Monozyten in Milz und Leber. Während der Listerieninfektion scheint der Trans-Signalweg also nicht essenziell für die CCL2-vermittelte Monozytenrekrutierung zu sein.

Im Gegensatz zur SAA-Produktion kann die Induktion von IL-6, TNF-α, CXCL1, CXCL2 und CCL2 also nicht spezifisch einem der Signalwege von IL-6 zugeordnet werden. Eine teilweise signifikante Korrelation der jeweiligen mRNA-Expression mit der Höhe der Listerientiter zeigte sich in der Regressionsanalyse (**Abb. 22**). Für IL-6 und TNF-α wurde diese Korrelation ebenfalls durch vorangegangene Arbeiten beschrieben (s.o.) und es ist wahrscheinlich, dass auch die Produktion der untersuchten Chemokine vom Grad der Listerieninfektion abhängt.

### 5.7. Schlussfolgerungen in Bezug zur klinischen Medizin

Monoklonale Antikörper, wie zum Beispiel der anti-IL-6Rα-mAk Tocilizumab, werden in der Klinik zur Therapie chronisch-entzündlicher Erkrankungen eingesetzt. Als immunmodulatorische Medikamente neutralisieren sie Zytokine und verhindern ihre zellspezifischen Wirkungen. So entstehen neben therapeutischen Effekten jedoch auch systemische unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wozu die erhöhte Anfälligkeit für verschiedene Krankheitserreger gehört (Jones G *et al.* 2010). Das sgp130-Fc-Fusionsprotein befindet sich zurzeit als neues Immuntherapeutikum in der präklinischen Entwicklung (Rose-John *et al.* 2007). Es hemmt nicht das gesamte IL-6-Signal, sondern spezifisch den Trans-Signalweg von IL-6 (vergl. Kap. 2.4).

Die Erkenntnisse aus experimentellen Mausmodellen sind prinzipiell nicht ohne weiteres auf die Immunprozesse im Menschen übertragbar. Trotzdem bietet die vorliegende Arbeit einen ersten Hinweis darauf, dass das sgp130-Fc die schützende Immunantwort auf *L. monocytogenes* nicht einschränkt. Da *L. monocytogenes* als opportunistischer Krankheitserreger vor allem für immunsupprimierte Menschen gefährlich werden kann (Krüll und Suttorp 2005) könnten die erarbeiteten Ergebnisse somit auch von klinischer Relevanz sein.

Für die weitere Charakterisierung der Wirkungen des sgp130-Fc wäre es wichtig, die Bedeutung des IL-6 Trans-Signalweges auch für die Abwehr weiterer bakterieller sowie viraler und fungaler Krankheitserreger zu untersuchen.

#### 6. ZUSAMMENFASSUNG

Interleukin-6 (IL-6) ist als pro-inflammatorisches Zytokin von Bedeutung für die Regulation der angeborenen Immunantwort gegen *L. monocytogenes*. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob hierfür insbesondere der Trans-Signalweg von IL-6 eine Rolle spielt.

wichtige Akteure der angeborenen Immunantwort wurden Granulozyten  $(Gr-1^{high} Lv6C^{int}F4/80^{neg})$ und sogenannte Inflammatorische Monozyten (Ly6C<sup>high</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup>) analysiert. Die intravenöse Listerieninfektion bewirkte eine Akkumulation dieser Zellpopulationen in Milz und Leber an d1 bis d3 p.i. Als Reaktion auf die Restimulation mit hitzegetöteten Listerien in vitro, produzierten die Inflammatorischen Monozyten IL-6, die Granulozyten allerdings nicht. Die Serum-Spiegel sowie die mRNA-Expression von IL-6 stiegen im Rahmen der Listerieninfektion an. Die Inflammatorischen Monozyten scheinen allerdings nur für einen Teil dieser erhöhten IL-6-Produktion verantwortlich zu sein, denn in den listerieninfizierten CCR2<sup>KO</sup>-Mäusen wurden, trotz der verminderten Monozytenzahl in den infizierten Geweben, ebenfalls deutlich erhöhte IL-6-Serum-Spiegel gemessen. Durch den Nachweis des IL-6-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten konnte bestätigt werden, dass das klassische Signal von IL-6 in diesen Zellen prinzipiell möglich ist. Die IL-6Rα-Expression verminderte sich allerdings im Laufe der Infektion. Welcher Mechanismus dem zugrunde lag, konnte durch diese Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die Präsenz von löslichem IL-6Rα ist eine Voraussetzung für den Trans-Signalweg von IL-6. Der sIL-6Rα war im Serum der Versuchsmäuse vorhanden, wurde durch die Infektion allerdings nicht messbar beeinflusst. Interessanterweise enthielt das Serum der CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse weniger sIL-6Rα als das der Wildtyp-Mäuse, was auf die Monozyten als Quelle von sIL-6Rα hindeutete.

Die Blockade des gesamten IL-6-Signals durch  $\alpha$ -IL-6 mAk, bewirkte in den infizierten Tieren eine deutlich erhöhte Listerienlast. Die spezifische Blockade des Trans-Signalweges von IL-6, durch das sgp130-Fc-Fusionsprotein, erzeugte dagegen keine erhöhten Titer. Dieses Ergebnis bestätigte sich in IL-6<sup>KO</sup>- und sgp130Fc<sup>Tg</sup>-Mäusen. Dass die beiden IL-6-Inhibitoren,  $\alpha$ -IL-6 mAk und sgp130-Fc, unterschiedliche Auswirkungen auf die Listerienabwehr haben, zeigte sich zudem durch eine verminderte Granulozytenfrequenz in der Milz der sgp130-Fc-behandelten Gruppe. Auch in der mRNA-Expression wichtiger proinflammatorischer Proteine wurden behandlungs- und infektionsbedingte Unterschiede aufgezeigt.

Die vorliegende Arbeit konnte insgesamt die Voraussetzungen, die während der Listerieninfektion für das IL-6-Signal gegeben sind, weiter aufklären. Zudem wurde deutlich gemacht, dass nur der klassische Signalweg von IL-6 für die Immunantwort auf *L. monocytogenes* von Bedeutung ist, nicht aber der Trans-Signalweg.

### 7. SUMMARY

Interleukin-6 (IL-6) is a pro-inflammatory Cytokine and plays an important role in the regulation of the innate immune response to *Listeria monocytogenes*. In the course of this dissertation it was investigated if especially the trans-signaling of IL-6 is implied in this process.

As important components of the innate immune response to *L. monocytogenes* granulocytes (Gr-1<sup>high</sup> Ly6C<sup>int</sup> F4/80<sup>neg</sup>) and so-called inflammatory monocytes (Ly6C<sup>high</sup> F4/80<sup>+</sup> Gr-1<sup>low</sup>) were analyzed. Intravenous infection led to an accumulation of these populations in spleen and liver at d1 to d3 p.i. As a reaction to restimulation *in vitro* with HKL, the inflammatory monocytes produced IL-6 while the granulocytes did not. In addition, serum levels and mRNA-expression of IL-6 increased in the course of infection. However, the inflammatory monocytes were only partially responsible for the increased appearance of IL-6, as in infected CCR2<sup>KO</sup> mice elevated serum levels were measured despite a reduced number of inflammatory monocytes in infiltrated tissues.

Through the detection of the IL-6-receptor on the surfaces of granulocytes and inflammatory moncytes it was proved that principally the classical signal of IL-6 can be induced in these cells. Interestingly, the expression of IL-6R $\alpha$  decreases in the course of infection. The underlying mechanisms could not be identified through this work. The presence of soluble IL-6R $\alpha$  is a pre-condition for IL-6 trans-signaling. The sIL-6R $\alpha$  was present in the serum of the examined mice, though the infection with *L. monocytogenes* did not have any impact on it. Instead, the serum of CCR2<sup>KO</sup> contained less sIL-6R $\alpha$  than the serum of wildtype mice, which points to the inflammatory monocytes as a possible source of IL-6R $\alpha$ .

The global blockade of IL-6 through an  $\alpha$ -IL-6 mAb lead to a clearly higher listerial burden in the infected animals. In contrast, specific blockade of IL-6 trans-signaling through sgp130-Fc did not cause any increased titers compared to humIgG-treated mice. These results were confirmed in the analysis of IL-6<sup>KO</sup>- and sgp130Fc<sup>Tg</sup>-mice. Thus, both treatments,  $\alpha$ -IL-6 mAb and sgp130-Fc, had different effects on the control of listerial infection, which was also shown by a diminished number of granulocytes in the spleen of sgp130-Fc-treated mice. The mRNA-expression of relevant pro-inflammatory cytokines was also influenced by the treatment with different IL-6-inhibitors and the successive infection.

This present work could help to define the conditions existing for IL-6-signaling during the infection with *L. monocytogenes*. Additionally, it was shown that the classical signaling but not the trans-signaling of IL-6 contributes to the innate immune response during listerial infection.

## II. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1:	Klassischer Signalweg und Trans-Signalweg von Interleukin-6 (IL-6)	8
Abb. 2:	Endotoxin-Standardkurve	20
Abb. 3:	Eingrenzung von lebenden CD45 <sup>+</sup> Zellen	24
Abb. 4:	TSB-Agarplatte mit Kolonien von Listeria monocytogenes	25
Abb. 5:	Spektrophotometrische Messung der RNA	28
Abb. 6:	Reaktionszyklen der qRT-PCR	30
Abb. 7:	Amplifikationskurve der qRT-PCR	31
Abb. 8:	Schmelzkurvenanalyse	32
Abb. 9:	Eingrenzung von Inflammatorischen Monozyten und Granulozyten	35
Abb. 10:	Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten während der frühen Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	36
Abb. 11:	Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6Rα während der frühen Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	37
Abb. 12:	mRNA-Expression von IL-6 und Akute-Phase-Proteinen während der frühen Infektion mit <i>Listeria monocytogene</i>	39
Abb. 13:	Produktion von IL-6 und TNF-α durch Inflammatorische Monozyten und Granulozyten nach Restimulation	42
Abb. 14:	Oberflächenexpression von IL-6Rα während der Infektion mit  Listeria monocytogenes	44
Abb. 15:	Listerientiter in Wildtyp- und CCR2 <sup>KO</sup> -Mäusen	46
Abb. 16:	Eingeschränkte Mobilisierung von Inflammatorischen Monozyten in CCR2 <sup>KO</sup> -Mäusen.	48
Abb. 17:	Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R $\alpha$ in Wildtyp- und CCR2 $^{KO}$ -Mäusen	49
Abb. 18:	Spezifische Blockade des Trans-Signalweges von IL-6	50
Abb. 19:	Listerientiter nach der Behandlung mit α-IL-6 mAk und sgp130-Fc	52
Abb. 20:	Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten nach Behandlung mit $\alpha\text{-IL-6}$ mAk und sgp130-Fc und	
	Listerieninfektion	53

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 21:	mRNA-Expression verschiedener Entzündungsmediatoren nach	
	Behandlung mit α-IL-6 mAk und sgp130-Fc und Listerieninfektion	. 56
Abb. 22:	Korrelation zwischen Listerienlast und mRNA-Expression	
	verschiedener Entzündungsmediatoren	. 58
Abb. 23:	Serumkonzentration von IL-6 nach der Behandlung mit $\alpha$ -IL-6 mAk	
	und sgp130-Fc und Listerieninfektion	. 59
Abb. 24:	Listerientiter in Wildtyp-, und IL-6 <sup>KO</sup> - und sgp130 <sup>Tg</sup> -Mäusen	. 60
Abb. 25:	Akkumulation von Granulozyten und Inflammatorischen Monozyten	
	in listerieninfizierten IL-6 <sup>KO</sup> - und sgp130 <sup>Tg</sup> -Mäusen	. 61
III. TA	BELLENVERZEICHNIS	
Tab. 3:	Auflistung der verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper	. 15
Tab. 4:	Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen	. 15
Tab. 3:	Primer für die quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	. 16
Tab. 4:	Fluorochrom-markierte Antikörper I	. 34
Tab. 5:	Fluorochrom-markierte Antikörper II	. 40
Tab. 6:	Fluorochrom-markierte Antikörper III	. 43

### IV. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAM ein Disintegrin und Metalloprotease (a disintegrin and metalloprotease)

α-IL-6 mAk anti-IL-6 monoklonaler Antikörper

Ak Antikörper

APC antigenpräsentierende Zellen (antigen presenting cells)

BFA Brefeldin A

BSA Bovines Serum Albumin

BSF-3 B-Zell-stimulierender Faktor 3

CCL Chemokin (C-C Motiv) Ligand

CXCL Chemokin (C-X-C Motiv) Ligand

CD Unterscheidungsgruppen (Cluster of differentiation)

cDNA komplementäre DNA (complementary DNA)

CED Chronisch entzündliche Darmerkrankung

CFU Kolonien formenden Einheiten (Colony Forming Units)

CNTF ziliärer neurotrophischer Faktor (ciliary neurotrophic factor)

CT-1 Cardiotropin-1

DC Dendritische Zellen (dendritic cells)

DNA Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)

dNTP Desoxyribonukleosidtriphosphat

FACS Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (fluorescence activated cellsorter)

FCS Fötales Kälberserum (fetal calf serum)

FSC Vorwärtsscatter (foreward scatter)

G-CSF Granulozyten-Colonie stimulierender Faktor

gp Glykoprotein

HGF hepatozellulärer Wachstumsfaktor (hepatocellular growth factor)

HKL hitzegetötete Listerien (heat-killed listeria)

humIgG humanes Immunglobulin G

IEL intraepitheliale Lymphozyten

IFN-γ Interferon-γ

IL Interleukin

IL-6R IL-6-Rezeptor

IL-6Rα IL-6-Rezeptor alpha Kette

#### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

KG Köpergewicht

KO knock out

LAL Limulus Amöbozyten Lysat

LD Letalitätsdosis

LIF Leukämie inhibierender Faktor (leukemia inhibitory factor)

LLO Listeriolysin O

LmEGD Listeria monocytogenes, Stamm EGD

LPS Lipopolysaccharide

LTA Lipoteichonsäure (lipoteichonacid)

mAK monoklonaler Antikörper

mb membrangebunden (membrane bound)

MCP-1 Monozyten chemotaktisches Protein-1

Mpl Metalloprotease

mRNA Boten-RNA (messenger RNA)

n.i. nicht infiziert

NET neutrophile extrazelluläre Fallen (neutrophil extracellular traps)

NF-κB Nuklearer Faktor κB

NK-Zellen Natürliche Killerzellen

NNT-1 stimulierendes Neurotrophin-1

NOD Nukleotid-bindende Oligodimerisierungsdomäne

(nucleotide-binding oligodimerization-domain)

NPN Neuropoietin

NRS natives Rattenserum

OD optische Dichte

OSM Oncostatin M

p.i. post infectionem

PBS phosphatgepufferte Salzlösung

PCR Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)

PFA Paraformaldehyd

PKC Proteinkinase C

PMA Phorbol-Myristat-Acetat

PRR Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors)

#### ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

qRT-PCR quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR)

RA Rheumatoide Arthritis

RIN RNA-Integritätsindex

RNA Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)

s löslich (soluble)

SAA Serumamyloid A

SD Standardabweichung (standard deviation)

sgp130-Fc lösliches gp130-Fc-Fusionsprotein

SSC Seitwärtsscatter (sideward scatter)

TGF- $\beta$  Transforming growth factor  $\beta$ 

T<sub>H</sub>-Zellen T-Helfer-Zellen

TipDC TNF-α- und induzierbare NO Synthase produzierende DC

TLR Toll-like-Rezeptor

TNF-α Tumornekrosefaktor-α

T<sub>reg</sub> regulatorische T-Zellen

TSB Tryptic Soy Broth

T-Zellen T-Lymphozyten

TZR T-Zellrezeptor

WT Wildtyp

#### V. LITERATURVERZEICHNIS

- Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T (1990) Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL1 and TNF). FASEB J. 4(11):2860-2867.
- Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF (2000) Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. Nat Med. 6(5):583-588.
- Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF (2004) TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. Immunity. 21(4):491-501.
- Bennouna S, Bliss SK, Curiel TJ, Denkers EY (2003) Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. J Immunol. 171(11):6052-6058.
- Bock M (2011) Die Rolle des Purinrezeptors P2X7 bei der Regulation von T-Zellen. Medizinische Dissertation. Medizinische Fakultät der Universität Hamburg.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science. 303(5663):1532-1535.
- Carey AL, Febbraio MA (2004) Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? Diabetologia. 47(7):1135-1142.
- Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J (2007) Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. Blood. 110(6):1748-1755.
- Chico-Calero I, Suárez M, González-Zorn B, Scortti M, Slaghuis J, Goebel W, Vázquez-Boland JA; European Listeria Genome Consortium (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracelllar proliferation of *Listeria*. Proc Natl Acad Sci USA. 99(1):431-436.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 162(1):156-9.

- Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D; Inflammation and the Host Response to Injury Investigators (2005) Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. Clin Diagn Lab Immunol. 12(1):60-67.
- Corr SA, O'Neill LA (2009) L. monocytogenes infection in the face of innate immunity. Cell Microbiol. 11(5):703-709.
- Creagh EM, O'Neill LA (2006) TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. Trends Immunol. 27(8):352-357.
- Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R (1996) Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. 274(5291):1379-1383.
- Dalrymple SA, Lucian LA, Slattery R, McNeil T, Aud DM, Fuchino S, Lee F, Murray R. (1995) Interleukin-6-Deficient Mice Are Highly Susceptible to *Listeria monocytogenes* Infection: Correlation with Inefficient Neutrophilia. Infect Immun. 63(6):2262–2268.
- Danilenko DM, Wang H (2012) The Yin and Yan of Immunomodulatory Biologics: Assessing the Delicate Balance between Benefit and Risk. Toxicol Pathol. 40(2):272-87.
- Dittrich E, Rose-John S, Gerhartz C, Müllberg J, Stoyan T, Yasukawa K, Heinrich PC, Graeve L (1994) Identification of a Region within the Cytoplasmic Domain of the Interleukin-6 (IL-6) Signal Transducer gp130 Important for Ligand-induced Endocytosis of the IL-6 Receptor. J Biol Chem. 269(29):19014-19020.
- Doganci A, Sauer K, Karwot R, Finotto S. Pathological role of IL-6 in the experimental allergic bronchial asthma in mice (2005) Clin Rev Allergy Immunol. 28(3):257-270.
- Domann E, Wehland J, Rohde M, Pistor S, Hartl M, Goebel W, Leimeister-Wächter M, Wuenscher M, Chakraborty T (1992) A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. EMBO J. 11(5):1981-1990.
- Dominitzki S, Fantini MC, Neufert C, Nikolaev A, Galle PR, Scheller J, Monteleone G, Rose-John S, Neurath MF, Becker C (2007) Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL6R abrogates the induction of FoxP3 in naïve CD4+ CD25 T cells. J Immunol. 179(4):2041-2045.
- Drevets DA, Campbell PA (1991) Roles of complement and complement receptor type 3 in phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by inflammatory mouse peritoneal macrophages. Inf Immun. 59(8):2645-2652.
- Drevets DA, Schawang JE, Mandava VK, Dillon MJ, Leenen PJ (2010) Severe *Listeria monocytogenes* Infection Induces Development of Monocytes with Distinct Phenotypic and Functional Features. J Immunol. 185(4):2432-2441.

- Engel DR, Maurer J, Tittel AP, Weisheit C, Cavlar T, Schumak B, Limmer A, van Rooijen N, Trautwein C, Tacke F, Kurts C (2008) CCR2 mediates homeostatic and inflammatory release of Gr1(high) monocytes from the bone marrow, but is dispensable for bladder infiltration in bacterial urinary tract infection. J Immunol. 181(8):5579-5586.
- Esche C, Stellato C, Beck LA (2005). Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. J Invest Dermatol. 125(4):615-628.
- Franchimont N, Lambert C, Huynen P, Ribbens C, Relic B, Chariot A, Bours V, Piette J, Merville MP, Malaise M (2005) Interleukin-6 receptor shedding is enhanced by Interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha and is partially mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme in osteoblast-like cells. Arthritis Rheum. 52(1):84-93.
- Gaillard JL, Berche P, Sansonetti P (1986)Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. Infect Immun. 52(1):50-55.
- Gaillard JL, Berche P, Frehel C, Gouin E, Cossart P (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. Cell. 65(7):1127-1141.
- Ganapathi MK, May LT, Schultz D, Brabenec A, Weinstein J, Sehgal PB, Kushner I (1988) Role of interleukin-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 157(1):271-277.
- Garbers C, Thaiss W, Jones GW, Waetzig GH, Lorenzen I, Guilhot F, Lissilaa R, Ferlin WG, Grötzinger J, Jones SA, Rose-John S, Scheller J (2011) Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130) which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. J Biol Chem. 286(50):42959-42970.
- Geissmann F, Jung S, Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. Immunity. 19(1):71-82.
- Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M (2009) IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. Cancer Cell. 15(2):103-113.
- Havell EA, Sehgal PB (1991) Tumor necrosis factor-independent IL-6 production during murine listeriosis. J Immunol. 146(2):756-761.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. Biochem J. 374(Pt 1):1-20.
- Heremans H, Dillen C, Put W, Van Damme J, Billiau A (1992) Protective effect of antiinterleukin (IL)-6 antibody against endotoxin, associated with paradoxically increased IL-6 levels. Eur J Immunol. 22(9):2395–2401.

- Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, Nakajima K, Pyun KH, Kishimoto T (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). Proc Natl Acad Sci U S A. 82(16):5490-5494.
- Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA (2001) Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. Immunity. 14(6):705-714.
- Ikebuchi K, Wong GG, Clark SC, Ihle JN, Hirai Y, Ogawa M. Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors (1987) Proc Natl Acad Sci U S A. 84(24):9035-9039.
- Ishii KJ, Koyama S, Nakagawa A, Coban C, Akira S (2008) Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. Cell Host Microbe. 3(6):352-363.
- Jensen LE, Whitehead AS (1998) Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. Biochem J. 334(Pt 3):489-503.
- Jones G, Sebba A, Gu J, Lowenstein MB, Calvo A, Gomez-Reino JJ, Siri DA, Tomsic M, Alecock E, Woodworth T, Genovese MC (2010) Comparison of tocilizumab monotherapy versus methotrexate monotherapy in patients with moderate to severe rheumatoid arthritis: the AMBITION study. Ann Rheum Diss. 69(1):88-96.
- Jones GW, McLoughlin RM, Hammond VJ, Parker CR, Williams JD, Malhotra R, Scheller J, Williams AS, Rose-John S, Topley N, Jones SA (2010) Loss of CD4+ Tcell IL6r expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells. J Immunol. 184(4):2130-2139.
- Jones SA, Novick D, Horiuchi S, Yamamoto N, Szalai AJ, Fuller GM (1999) C-reactive Protein: A Physiological Activator of Interleukin 6 Receptor Shedding. J Exp Med. 189(3):599-604.
- Jones SA, Scheller J, Rose-John S (2011) Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. J Clin Invest. 121(9):3375-3383.
- Jostock T, Müllberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S (2001) Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. Eur J Biochem. 268(1):160-167.
- Kahl S, Nissen M, Girisch R, Duffy T, Leiter EH, Haag F, Koch-Nolte F (2000) Metalloprotease-mediated shedding of enzymatically active mouse ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 upon T cell activation. 165(8):4463-4469.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C (2003) IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. Trends Immunol. 24(1):25-29.
- Kawai Z, Akira S (2006) TLR Signaling. Cell Death Differ. 13(5):816-825.
- Keul R, Heinrich PC, Müller-newen G, Muller K, Woo P (1998) A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis. Cytokine. 10(9):729-734.

- Kishimoto (1989) The biology of interleukin-6. Blood. 74(1):1-10.
- Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA (2002) IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell. 110(2):191-202.
- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. Nature. 368(6469):339-342.
- Krüll M, Suttorp N (2005) In: Harrisons Innere Medizin. M. Dietel, N. Suttorp, M. Zeitz (Hrsg. dt. Ausgabe). 16. Auflage. Bd. 1. ABW Wissenschaftsverlag, Berlin. 898-899.
- Kurihara T, Warr G, Loy J, Bravo R (1997) Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor. J Exp Med. 186(10):1757-1762.
- Kuziel WA, Morgan SJ, Dawson TC, Griffin S, Smithies O, Ley K, Maeda N (1997) Severe reduction in leukocyte adhesion and monocyte extravasation in mice deficient in CC chemokine receptor 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(22):12053-12058.
- Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol. 16(1):293-322.
- Liu Z, Simpson RJ, Cheers C (1992) Recombinant Interleukin-6 Protects Mice against Bacterial Experimental Infection. Infect Immun. 60(10):4402-4406.
- Liu Z, Cheers C (1993) The Cellular Source of Interleukin-6 during *Listeria* infection. Infect Immun. 61(6):2626-2631.
- Liu Z, Simpson RJ, Cheers C (1995) Interaction of interleukin-6, tumour necrosis factor and interleukin-1 during Listeria infection. Immunology. 85(4):562-7.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT (2006) Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. Nature. 441(7090):231-234.
- McCallum RE und Berry LJ (1972) Mouse liver fructose-1,6-diphosphatase and glucose-6-phosphatase activities after endotoxin poisoning. Infect Immun. 6(5):883-885.
- McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer CA, Kozma SC, Drew AF (2010) Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6receptor. J Immunol. 184(12):7219-7228.
- McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley N, Jones SA (2005) IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(27):9589-9594.
- Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, Harada K, Tateishi H, Nishiyama T, Tanikawa K (1995) Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. Gut. 36(1):45-49.
- Mittrücker HW, Köhler A, Kaufmann SH (2000) Substantial in vivo proliferation of CD4+ and CD8+ T lymphocytes during secondary *Listeria monocytogenes* infection. Eur J Immunol.30(4):1053-1059.

- Mittrücker HW, Steinhoff U, Köhler A, Krause M, Lazar D, Mex P, Miekley D, Kaufmann SH (2007) Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(30):12434-12439.
- Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S (1993) The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. Eur J Immunol. 23(2):473-480.
- Murray EGD, Webb RA, Swann MRB (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). J Pathol Bacteriol. 29(4):407-439.
- Nakane A, Numata A, Minagawa T (1992) Endogenous Tumor Necrosis Factor, Interleukin-6, and Gamma Interferon Levels during *Listeria monocytogenes* Infection in Mice. Inf Immun. 60(2):523-528.
- Nowell MA, Williams AS, Carty SA, Scheller J, Hayes AJ, Jones GW, Richards PJ, Slinn S, Ernst M, Jenkins BJ, Topley N, Rose-John S, Jones SA (2009) Therapeutic targeting of IL-6 trans-signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. J Immunol. 182(1):613-622.
- O'Riordan M, Yi CH, Gonzales R, Lee KD, Portnoy DA (2002) Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(21):13861-13866.
- Pamer (2004) Immune responses to *Listeria monocytogenes*. Nat Rev Immunol. 4(10):812-823.
- Rabe B, Chalaris A, May U, Waetzig GH, Seegert D, Williams AS, Jones SA, Rose-John S, Scheller J (2007) Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. Blood. 111(3):12021-12028.
- Reiss HJ, Potel J, Krebs A (1951) Granulomatosis infantiseptica; a general infection of infants and the newborn characterized by the presence of miliary granuloma. Z Gesamte Inn Med. 6(15-16):451-457.
- Rose-John S und Heinrich PC (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. Biochem J. 300(Pt 2):281-290.
- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. J Leukoc Biol. 80(2):227-236.
- Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grötzinger J, Seegert D (2007) The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. Expert Opin Ther Targets. 11(5):613-624.
- Russell JQ, Morrissette GJ, Weidner M, Vyas C, Aleman-Hoey D, Budd RC (1998) Liver damage preferentially results from CD8(+) T cells triggered by high affinity peptide antigens. J Exp Med. 188(6):1147-1157.
- Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F (1993) Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int. 13(2):45-51.

- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S (2011) The pro- and antiinflammatory properties of cytokine interleukin-6. Biochem Biophys Acta. 1813(5):878-888.
- Segal AW (2005) How neutrophils kill microbes. Annu Rev Immunol. 23:197-223.
- Seki E, Tsutsui H, Tsuji NM, Hayashi N, Adachi K, Nakano H, Futatsugi-Yumikura S, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Fujimoto J, Nakanishi K (2002) Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependant proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *L. monocytogenes* in mice. J Immunol. 169(7):3863-3868.
- Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG (2003) TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. Immunity. 19(1):59-70.
- Serbina NV, Kuziel W, Flavell R, Akira S, Rollins B, Pamer EG (2003) Sequential MyD88-independent and -dependent activation of innate immune responses to intracellular bacterial infection. Immunity. 19(6):891-901.
- Serbina NV, Pamer EG (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. Nat Immunol. 7(3):311-317.
- Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K (2000) InIB-dependent internalization of Listeria is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. Cell. 103(3):501-510.
- Shen Y, Kawamura I, Nomura T, Tsuchiya K, Hara H, Dewamitta SR, Sakai S, Qu H, Daim S, Yamamoto T, Mitsuyama M (2010) Toll-like receptor 2- and MyD88-dependent phosphatidylinositol 3-kinase and Rac1 activation facilitates the phagocytosis of *Listeria monocytogenes* by murine macrophages. Infect Immun. 78(6):2857-2867.
- Shi C, Velázquez P, Hohl TM, Leiner I, Dustin ML, Pamer EG (2010) Monocyte Trafficking to Hepatic Sites of Bacterial Infection Is Chemokine Independent and Directed by Focal Intercellular Adhesion Molecule-1 Expression. J Immunol. 184(11):6266-6274.
- Shi C, Hohl TM, Leiner I, Equinda MJ, Fan X, Pamer EG (2011) Ly6G<sup>+</sup> Neutrophils Are Dispensable for Defense against Systemic *Listeria monocytogenes* Infection. J Immunol. 187(10):5293-5298.
- Starnes HF Jr, Pearce MK, Tewari A, Yim JH, Zou JC, Abrams JS (1990) Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal Escherichia coli infection and lethal tumor necrosis factor-alpha challenge in mice. J Immunol 145(12):4185-4191.
- Stumhofer JS, Tait ED, Quinn WJ 3rd, Hosken N, Spudy B, Goenka R, Fielding CA, O'Hara AC, Chen Y, Jones ML, Saris CJ, Rose-John S, Cua DJ, Jones SA, Elloso MM, Grötzinger J, Cancro MP, Levin SD, Hunter CA (2010) A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling. Nature Immunol. 11(12):1119-1128.
- Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, et al. (1993) Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(24):11924-11928.

- Tenhumberg S, Schuster B, Zhu L, Kovaleva M, Scheller J, Kallen KJ, Rose-John S (2006) gp130 dimerization in the absence of ligand: performed cytokine receptor complexes. Biochem Biophys Res Commun. 346(3):649-657.
- Tenhumberg S, Waetzig GH, Chalaris A, Rabe B, Seegert D, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J (2008) Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130. J Biol Chem. 283(40):27200-27207.
- Tilney LG, Portnoy DA (1989) Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. J Cell Biol. 109(4 Pt 1):1597-1608.
- Ueda A, Ishigatsubo Y, Okubo T, Yoshimura T (1997) Transriptional regulation of the human monocyte chomattractant protein-1 gene. Cooperation of two NF-kappaB sites and NF-kappaB/Rel subunit specifity. J Biol Chem. 272(49):31092-31099.
- Underhill DM, Ozinsky A (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. Annu Rev Immunol. 20:825-852.
- Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G (1999) The MCP/eotaxin subfamily of CC Chemokines. Cytokine Growth Factor Rev. 10(1):61-86.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J (2001) Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev. 14(3):584-640.
- Walev I, Vollmer P, Palmer M, Bhakdi S, Rose-John S (1996) Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A. 93(15):7882-7887.
- Weber K, Fehse B (2009) Diva-Fit: A step-by-step manual for generating high-resolution graphs and histogram overlays of flow cytometry data obtained with FACSDiva software. Cell Ther Transplant. 1(4):1-4.
- Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK (1998) IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. J Clin Invest. 101(2):311-320.
- Zhan Y, Cheers C (1995) Differential Induction of Macrophage-Derived Cytokines by Live and Dead Intracellular Bacteria In Vitro. Inf Immun. 63(2):720–723.

#### VI. DANKSAGUNG

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker. Er hat mir die Bearbeitung dieses Promotionsthemas überlassen und stand mir dabei von Anfang an als hervorragender Betreuer, mit einer immer offenen Bürotür, zur Verfügung.

Dass ich meine Dissertation in der AG Mittrücker durchführen konnte, betrachte ich als großen Glücksfall – vielen Dank an euch und das ganze "IFI-Land", für die Unterstützung und die schöne Arbeits- aber auch Pausenatmosphäre. Besonders verbunden bin ich Valéa, sie hat mir die Laborarbeit erst beigebracht (und blieb dabei erstaunlich geduldig), hatte während des ganzen Jahres ein offenes Ohr für meine Fragen und bei den Aufreinigungen der aufwendigeren Versuche stand sie mir auch praktisch zur Seite. Ganz herzlich danke ich Timo für die immer gute Beratung am FACS-Gerät und das Korrekturlesen. Für die Einweisung in die molekularbiologischen Methoden und ihren Einfallsreichtum bei jeder Art von Problemen danke ich insbesondere Steffi.

Außerdem danke ich Dr. Nathalie Jänner, besonders für die Möglichkeit, die ELISA-Untersuchung an der Universität Kiel durchführen zu können und für die Bereitstellung der Versuchsmäuse. Mein Dank gilt weiterhin Prof. Dr. Rose-John, durch den ich die Möglichkeit bekam, die IL-6-Inhibitoren in meinen Versuchen anzuwenden sowie Dr. Daniel Engel, der die CCR2<sup>KO</sup>-Mäuse zur Verfügung stellte.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da sind, mir mein Studium ermöglichen und mir während der Arbeit an der Promotion (nicht nur) durch das Korrekturlesen aus Nicht-Naturwissenschaftler-Sicht sehr geholfen haben. Ein riesengroßer Dank gilt außerdem Yönna, Michi und meinen großartigen Freunden; darunter Tim, der mich in die Kunst des Formatierens einwies.

## VII. LEBENSLAUF

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

#### VIII. PUBLIKATIONEN

#### **Originalarbeit:**

"IL-6 controls the innate immune response against Listeria monocytogenes via classical IL-6 signaling"

**Hoge J**, Yan I, Jänner N, Schumacher V, Chalaris A, Steinmetz OM, Engel DR, Scheller J, Rose-John S, Mittrücker HW (2013).

The Journal of Immunology. 2013 Jan 15;190(2):703-11. Epub 2012 Dec 12.

#### Posterpräsentation:

2011 Joint Annual Meeting SIICA-DGfI, Riccione, Italien:

"IL-6 signaling and trans-signaling in the immune response against bacterial pathogens" **Hoge J**, Jänner N, Schumacher V, Hünemörder S, Rose-John S, Mittrücker HW.

### IX. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Interschrift.	
Ontorsommer.	