

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG EPPENDORF**

Institut für Immunologie des Zentrums für Diagnostik

Institutsleiter: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

## **Die Bedeutung von Interleukin-6 für die Immunantwort gegen**

***Listeria monocytogenes***

### **Dissertation**

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

vorgelegt von:

Isabell Yan  
aus Wuxi

Hamburg 2015

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 30.10.2015**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Christian Krebs**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:**

## I. Inhaltsverzeichnis

<b>I. Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>1. Zielsetzung und Fragestellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Einleitung .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....</b>	<b>2</b>
2.1.1. Die angeborene Immunantwort gegen <i>L. monocytogenes</i> .....	3
2.1.2. Die erworbene Immunantwort gegen <i>L. monocytogenes</i> .....	4
<b>2.2. <i>Salmonella enterica</i> Serovar Typhimurium .....</b>	<b>4</b>
<b>2.3. Interleukin-6 .....</b>	<b>5</b>
2.3.1. Die IL-6-Rezeptor-Signalkaskade .....	6
2.3.2. Therapeutische Ansätze zur IL-6 Blockade .....	8
<b>2.4. Die Funktion von IL-6 in der Immunantwort der Maus gegen         <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>2.5. Die Funktion von IL-6 in der Immunantwort der Maus gegen         <i>S. typhimurium</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>2.6. P2X7 .....</b>	<b>10</b>
<b>2.7. ADAM17 .....</b>	<b>11</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
<b>3.1. Materialien .....</b>	<b>13</b>
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. Bakterienstämme .....	15
3.1.5. Mäusestämme .....	16
3.1.6. Besondere Geräte und Materialien .....	17
3.1.7. Software .....	17
<b>3.2. Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.2.1. Tierexperimentelles Arbeiten .....	18
3.2.2. Bakterienkulturen und Infektion .....	18
3.2.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
3.2.2.2. <i>Salmonella typhimurium</i> .....	18
3.2.3. Isolierung von Leukozyten aus Milz, Lymphknoten, Leber und Darm .....	19
3.2.3.1. Organentnahme .....	19
3.2.3.2. Isolierung von Zellen aus der Milz .....	19
3.2.3.3. Isolierung von Leukozyten aus der Leber .....	20
3.2.3.4. Isolierung von Zellen aus Lymphknoten .....	20
3.2.3.5. Isolierung von Darmleukozyten - IEL und LPL .....	21

3.2.3.6. Zellzahlbestimmung .....	21
3.2.4. Extrazelluläre Antikörperfärbung .....	22
3.2.5. FoxP3-spezifische Antikörperfärbung .....	22
3.2.6. Intrazellulärer Nachweis von Zytokinen .....	22
3.2.6.1. <i>In vitro</i> Stimulation von Zellen .....	23
3.2.6.2. Intrazelluläre Antikörperfärbung .....	23
3.2.7. <i>In vitro</i> Stimulation mit NAD <sup>+</sup> und ATP .....	24
3.2.8. Durchflusszytometrische Charakterisierung von Leukozyten .....	24
3.2.9. Titerbestimmung von Listerien in Milzen und Lebern .....	25
3.2.10. Statistik .....	26
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. IL-6R<math>\alpha</math> Expression auf der Oberfläche verschiedener Immunzellen .....</b>	<b>27</b>
4.1.1. Veränderung der IL-6R $\alpha$ Expression nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	28
4.1.2. Beruht der Verlust des IL-6R $\alpha$ auf einer durch IL-6 verursachten Antikörperblockade oder Rezeptorinternalisierung? .....	30
4.1.3. Einfluss von P2X7 auf die IL-6R $\alpha$ Expression .....	32
4.1.3.1. <i>In vitro</i> Stimulation von Zellen mit NAD <sup>+</sup> und ATP .....	32
4.1.3.2. IL-6R $\alpha$ shedding in P2X7 <sup>-/-</sup> Mäusen nach ein <i>L. monocytogenes</i> Infektion .....	33
4.1.4. IL-6R $\alpha$ Expression nach der Infektion mit <i>S. typhimurium</i> .....	35
4.1.5. Einfluss von ADAM17 auf die Abspaltung von Oberflächenmolekülen .....	36
4.1.5.1. <i>In vitro</i> Stimulation mit NAD <sup>+</sup> und ATP .....	36
4.1.5.2. IL-6R $\alpha$ shedding in ADAM17 <sup>ex/ex</sup> Mäusen nach <i>L. monocytogenes</i> -Infektion .....	38
4.1.5.3. TNF $\alpha$ Expression in Wildtyp- und ADAM17 <sup>ex/ex</sup> Mäusen .....	40
<b>4.2. Einfluss des IL-6 auf die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung nach Infektion .....</b>	<b>43</b>
4.2.1. Frequenz der IL-17A produzierenden T-Zellen in Milz und Leber nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	43
4.2.2. Vergleich der IL-17A Produktion in Wildtyp-, IL-6 <sup>-/-</sup> und sgp130 <sup>tg</sup> Mäusen in Milz und Leber .....	45
4.2.3. Frequenz der IL-17A produzierenden T-Zellen in Darm nach der Infektion mit <i>S. typhimurium</i> .....	47
4.2.4. Vergleich der IL-17A Produktion im Darm von Wildtyp, IL-6 <sup>-/-</sup> und sgp130 <sup>tg</sup> Mäusen .....	49
<b>4.3. Die Rolle des IL-6 für die spezifische T-Zellantwort .....</b>	<b>52</b>
4.3.1. Die Änderung der Zellpopulationen nach der Infektion .....	52
4.3.2. Die spezifische T-Zellantwort gegen <i>L. monocytogenes</i> .....	54
<b>4.4. Titer .....</b>	<b>58</b>



<b>5. Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>5.1. Verlust der IL-6R<math>\alpha</math> Expression nach der Infektion mit         <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2. Ursachen der verminderten IL-6R<math>\alpha</math> Expression nach der Infektion         mit <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>61</b>
<b>5.3. Einfluss von P2X7 auf die Abspaltung von mIL-6R<math>\alpha</math> .....</b>	<b>62</b>
<b>5.4. Einfluss von ADAM17 auf die Abspaltung von mIL-6R<math>\alpha</math> .....</b>	<b>63</b>
<b>5.5. Korrelation zwischen der TNF<math>\alpha</math> Expression und der Kontrolle der         Listerieninfektion .....</b>	<b>65</b>
<b>5.6. Der Einfluss von IL-6 auf die spezifische T-Zellantwort gegen         <i>L. monocytogenes</i> .....</b>	<b>65</b>
<b>5.7. Bedeutung von IL-6 für die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung .....</b>	<b>66</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>68</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>70</b>
<b>II. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>iv</b>
<b>III. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>vi</b>
<b>IV. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>vii</b>
<b>V. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>x</b>
<b>VI. Danksagung .....</b>	<b>xi</b>
<b>VII. Publikation und Kongressbeiträge .....</b>	<b>xv</b>
<b>VIII. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>xvi</b>

## 1. Zielsetzung und Fragestellung

Als ein pro-inflammatorisches Zytokin ist das Akute-Phase-Protein Interleukin-6 (IL-6) ein wichtiger Mediator in der angeborenen Immunantwort gegen bakterielle Krankheitserreger. In der vorliegenden Arbeit sollten die Bedeutung von IL-6 und hier insbesondere die Rolle des klassischen und des Trans-IL-6-Signalwegs für die erworbene Immunantworten gegen bakterielle Pathogene analysiert werden.

Inflammatorischen Monozyten spielen eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes*. Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass diese Zellen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* eine deutlich verminderte Expression des membranständigen IL-6 Rezeptors- $\alpha$  (mIL-6R $\alpha$ ) aufweisen und daher wahrscheinlich nur noch über den Trans-Signalweg auf IL-6 reagieren. In der vorliegenden Studie sollte die Analyse der mIL-6R $\alpha$  Expression auf andere Zellen ausgedehnt werden. In Infektionsmodellen für *L. monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* sollte die mIL-6R $\alpha$  Expression auf verschiedenen T-Zellpopulationen untersucht werden. In einer nächsten Serie von Experimenten sollte dann der Mechanismus, der zur verminderten mIL-6R $\alpha$  Expression auf inflammatorischen Monozyten und T-Zellen führt, näher charakterisiert werden. Mithilfe von verschiedenen genmodifizierten Mäusen sollte in Zellkulturexperimenten *in vitro* aber auch in Infektionsmodellen *in vivo* die Beteiligung des Purinrezeptors P2X7 und der Protease ADAM17 an der Herunterregulation der mIL-6R $\alpha$  Expression geklärt werden.

Es ist bekannt, dass IL-6 eine essentielle Bedeutung in der Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen hat. Aufgrund der geleisteten Vorarbeiten stellte sich daher die Frage, in welchem Umfang die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung vom klassischen bzw. vom IL-6-Trans-Signalweg abhängig ist. Im zweiten Teil der Arbeit sollten daher im *L. monocytogenes*-Infektionsmodell IL-17A produzierende T-Zellen identifiziert werden. In den anschließenden Experimenten sollte dann geklärt werden, in welchem Umfang diese Zellen generell von IL-6 beeinflusst werden und falls eine IL-6-Wirkung auf die Differenzierung nachgewiesen werden kann, ob dieser Prozess vom klassischen oder vom Trans-Signalweg abhängig ist. Die Analysen werden in genmodifizierten Mäusen erfolgen, in denen entweder IL-6 komplett fehlte (IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse) oder in denen durch eine transgene Produktion eines löslichen gp130 Proteins nur der Trans-Signalweg blockiert war (sgp130<sup>tg</sup>). Die Ergebnisse aus dem *L. monocytogenes*-Modell sollten dann in einem Darminfektionsmodell für *S. typhimurium* bestätigt werden.

Schließlich werden in einer Reihe von Infektionsexperimenten getestet, ob IL-6 neben der T<sub>H</sub>17-Antwort auch die spezifische T<sub>H</sub>1 und CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* beeinflusst. Auch diese Experimente sollten in IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen und gegebenenfalls in sgp130<sup>tg</sup> Mäusen durchgeführt werden.

## 2. Einleitung

### 2.1. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* (Lm) wurden erstmals im Jahr 1926 von EGD Murray isoliert (Murray et al. 1926, Vázquez-Boland et al. 2001). Listerien sind gram-positive, bewegliche, nicht sporenbildende Stäbchenbakterien, die sich fakultativ anaerob vermehren. Die Beweglichkeit hängt von der peritrichen oder polaren Begeißelung ab, die temperaturabhängig ist. Listerien kommen im Darm von Tieren und Menschen vor. Sie lassen sich aus Wasser, Abfällen und pflanzlichen Materialien isolieren. Häufig befinden sie sich auch in Milch und Milchprodukten (Hahn et al. 2005).

Von allen Subtypen der Listerien verursacht *Listeria monocytogenes* als wichtigste humanpathogene Spezies lokale und systemische Infektionen bei Tieren und Menschen, v.a. bei Immunsupprimierten, Schwangeren und Neugeborenen. *L. monocytogenes* verursacht im Menschen eine Listeriose, die durch den Befall von Leber und Milz charakterisiert ist und auch mit einer Meningitis assoziiert sein kann. Die Listeriose ist durch Ampicillin gut therapierbar (Robert-Koch-Institut). Unbehandelt kann die Infektion durch eine hohe Bakteriämie im Blut auch zu einer Sepsis führen, die lebensbedrohlich ist. Besonders gefürchtet ist die Granulomatosis infantiseptica des Neugeborenen (Reiss et al. 1951). Schwangere haben ein erhöhtes Risiko, an einer Listeriose zu erkranken. Die Infektion kann eine Entzündung des Mutterkuchens (Plazentitis) verursachen und auch auf den Fötus durch diaplazentare Übertragung übergehen. Bei einer Infektion im ersten Trimenon stirbt der Fötus meist ab und es kommt zum Abort. Eine spätere Infektion im zweiten oder dritten Trimenon kann eine intrauterine Listeriose verursachen, welche zum Fruchttod und damit zum Spätabort führen kann oder eine Frühgeburt induzieren kann (Stauber et al. 2007).

Die Listeriose ist in Deutschland seit 2001 sowohl bei Menschen, als auch bei Tieren eine meldepflichtige Krankheit (Infektionsschutzgesetz §7, Verordnung über meldepflichtige Tierkrankheiten). In den Jahren 2001 bis 2009 wurden insgesamt 3092 humane Listeriosen an das RKI übermittelt, dies entspricht einer Inzidenz von 0,4 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner. Anteilig davon sind etwa 235 Neugeborenen-Listeriosen mit einer Inzidenzrate von 3,7 Erkrankungen pro 100.000 Neugeborener. Etwa 10% aller in Deutschland an das RKI übermittelten Listeriosen mit invasiven Verläufen enden tödlich (Robert-Koch-Institut, 2009).

Im Labor dienen die Listerien als eine relativ sichere und leicht kultivierbare Spezies von Erregern. Die Infektion von Nagetieren bietet ein exzellentes Modell zur Charakterisierung des Infektionsverlaufs und der Immunmechanismen zur Kontrolle der Infektion.

Die Infektion mit *L. monocytogenes* erfolgt normalerweise über kontaminierte Nahrungsmittel oder als Schmierinfektion bei Weichteilinfektionen. Nach oraler Aufnahme

dringt *L. monocytogenes* in Epithelzellen des Magen-Darm-Trakts ein. Dabei entstehen im Darm disseminierte Granulome (Listeriome). Von diesen Listeriomen verteilt sich der Erreger über das Blut und besiedelt andere Organe wie Milz, Leber und auch das Gehirn (Hahn *et al.* 2005).

In Säugetieren infiziert *L. monocytogenes* Zellen und vermehrt sich im Zytoplasma der betroffenen Zellen. Zur Infektion von nicht-phagozytierenden Zellen verwendet *L. monocytogenes* Oberflächenproteine wie Internalin A und B (InlA und InlB), die an E-Cadherin bzw. die c-Met-Kinase auf Zielzellen binden und dadurch die Invasion in die Zelle ermöglichen. Nach diesem aktiven Eindringen in die Zelle aber auch nach einer Phagozytose liegt *L. monocytogenes* in einer membranumhüllten Vakuole vor. Um aus der Vakuole zu entkommen und dem Transport ins Lysosom zu entgehen, sezernieren Listerien das Hämolysin Lysteriolysin-O (LLO), welches die Vakuolenmembran permeabilisiert und es den Listerien erlaubt ins Zytoplasma einzudringen. In diesem geschützten Umfeld vermehren sich die Listerien. Listerien können aus infizierten Zellen direkt in Nachbarzellen eindringen ohne dabei im Kontakt mit dem Extrazellulärraum zu treten. Durch das Protein ActA (*Actin-assembly-inducing-protein*) induziert *L. monocytogenes* die Aktin-Polymerisation und kann sich dadurch in den Zellen bewegen. Die Aktinpolymerisation kann zu Ausstülpungen der Plasmamembran führen, an deren Spitze sich Listerien befinden. Diese Ausstülpungen können in Nachbarzellen eindringen und sich zu einer Vakuole in der Nachbarzelle abschnüren. Durch LLO und Phospholipasen sind Listerien in der Lage, die sie umgebende Doppelmembran zu lysieren und wieder ins Zytoplasma zu gelangen. (Pamer *et al.* 2004).

### **2.1.1. Die angeborene Immunantwort gegen *L. monocytogenes***

Die Infektion mit *L. monocytogenes* bewirkt eine Endzündungsreaktion und eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Die Erkennung von *L. monocytogenes* erfolgt unter anderem über Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR = *Toll-like receptors*), die konservierte Bestandteile von *L. monocytogenes* binden. In der Zelle kann *L. monocytogenes* über NOD-ähnliche Rezeptoren (NLR = *NOD-like receptor*) wahrgenommen werden (Medzhitov *et al.* 1997). Die Erkennung führt zu einer Entzündungsreaktion, die durch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, wie Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) gekennzeichnet ist (Unanue *et al.* 1997). Die Erkennung führt aber auch zur Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Für *L. monocytogenes* sind insbesondere inflammatorische Monozyten und Makrophagen von Bedeutung (Shi *et al.* 2011). In diesen Phagozyten aktivieren Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und TNF $\alpha$  synergistisch antibakterielle Effektormechanismen (Pamer *et al.* 1993).

### 2.1.2. Die erworbene Immunantwort gegen *L. monocytogenes*

Durch die intrazelluläre Lebensweise werden Listerienproteine über den MHC Klasse-I-Weg prozessiert und präsentiert. Als Folge induzieren Listerien eine  $CD8^+$  T-Zellantwort. Studien haben gezeigt, dass die  $CD8^+$  T-Zellantwort insbesondere gegen von *L. monocytogenes* sezernierte Bakterienproteine, wie z.B. LLO, gerichtet ist. Die Aktivierung von  $CD8^+$  T-Zellen führt zu deren Reifung zu zytotoxischen T-Zellen, die dann infizierte Zellen töten können und die Listerien für Phagozyten zugänglich machen. (Cossart et al. 2002). Neben den  $CD8^+$  T-Zellen werden auch Listerien-spezifische  $CD4^+$  T-Zellen generiert, die zu  $T_H1$ -Zellen differenzieren. Diese Zellen produzieren große Menge von  $T_H1$ -Zytokinen, wie z.B.  $IFN\gamma$ , und tragen so zur Kontrolle von *L. monocytogenes* bei (Hsieh et al. 1993). Die T-Zellantwort ist entscheidend für die Eradikation von *L. monocytogenes* aus dem Organismus. Außerdem ist sie für den verbesserten Schutz bei einer erneuten Infektion verantwortlich.

### 2.2. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium

*Salmonella enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*, SL) ist ein bewegliches, gram-negatives Bakterium und gehört zur Gruppe B der Subspezies I der *Salmonella enterica* Spezies. Die bisher bekannten 1.500 Untergruppen der Subspezies I werden meist in Serovare unterschieden und mit Eigennamen versehen. Die Serovare werden auf Basis von O-(Oberflächen-) und H-(Geißel-) Antigenen nach dem White-Kauffmann Schema unterteilt. Neben *S. enteritidis* ist *S. typhimurium* eines der häufigsten Serovare, welches sowohl bei Menschen, als auch bei Tieren eine Gastroenteritis hervorrufen kann (Robert-Koch-Institut 2008).

Im Jahr 2008 wurden gemäß der Meldepflicht in Deutschland 45.401 Salmonellosen gemeldet, wobei ca. 20% durch *S. enteritidis* und *S. typhimurium* verursacht wurden. Die Infektion erfolgt hauptsächlich durch kontaminierte Nahrungsmittel (bei *S. typhimurium* vor allem über Rindfleisch und wird somit als klassische Lebensmittelinfektion bezeichnet). Sehr oft werden auch direkte oder indirekte Übertragungen von Mensch zu Mensch beschrieben, die hauptsächlich als Hospitalinfektion bei gefährdeten Personengruppen oder unter hygienisch mangelhaften Bedingungen auftreten (Robert-Koch-Institut 2008).

Die Inkubationszeit von *S. typhimurium* beträgt wenige Stunden bis Tage. Klinisch werden Symptome wie Diarrhö mit oder ohne Erbrechen, teilweise auch mit Fieberbeteiligung beschrieben. Eine systemische Infektion mit Beteiligung anderer Organe ist nur in 10-20% der Fälle zu beobachten (Robert-Koch-Institut 2008).

Sezernierte Proteine, die vor allem innerhalb von sogenannten Pathogenitäts-Inseln (PI) kodiert sind, entscheiden über die Virulenz von *S. typhimurium*. Es wurden mehrere

*Salmonella* Pathogenitäts-Inseln (SPI) beschrieben von denen besonders SPI-1 und SPI-2 eine wichtige Rolle in der Infektion spielen. Beide Inseln kodieren sowohl für Typ III Sekretionssysteme, als auch für Effektorproteine, welche über die Typ III Sekretionssystemen in die Wirtszelle eingeschleust werden (Dieye *et al.* 2009). SPI-1 ist für das Eindringen in nicht phagozytierende Zellen notwendig und ermöglicht es den Salmonellen den Darm zu verlassen. Im Gegensatz dazu ist SPI-2 nicht für das Eindringen der Bakterien in Zellen notwendig, aber er ist unerlässlich für das Überleben der Bakterien in der Wirtszelle. Es gibt auch die Möglichkeit, ohne ein funktionelles SPI-1 das Darmepithel zu durchdringen, wobei eine verzögerte Entzündungsreaktion verursacht wird. Dieser Weg wird dann als „alternativer Weg“ bezeichnet (Steele-Mortimer *et al.* 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Rahmen eines Colitis-Modells eine Infektion mit dem SL1344 Wildtyp-Stamm von *S. typhimurium* induziert. Erstmals wurde *S. typhimurium* (SL1344) im Jahr 1991 isoliert (Stocker *et al.* 1991).

### 2.3. Interleukin-6

Das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) besteht aus 184 Aminosäuren und ist 21-28 kDa groß. IL-6 ist das namensgebende Mitglied der Interleukin-6-Zytokinfamilie und ist ein zentraler Regulator von Entzündungsreaktionen des Organismus. Die Hauptproduzenten von IL-6 sind Makrophagen und Monozyten, aber auch B-Zellen, einige T-Zell-Subpopulationen, endotheliale und epitheliale Zellen, Fibroblasten und Mastzellen können IL-6 produzieren (Kishimoto *et al.* 1989, Nakane *et al.* 1992). IL-6 hat auf verschiedene Zellen des Körpers unterschiedliche Wirkungen. Diese Unterschiede beruhen auf der Form des Rezeptors und auf den durch IL-6 induzierten Signalwegen. Die Wirkung von IL-6 kann sowohl pro-, als auch anti-inflammatorisch sein (Scheller *et al.* 2011).

IL-6 als ein pro-inflammatorisches Zytokin spielt im angeborenen Immunsystem eine wichtige Rolle. IL-6 steuert z.B. die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und ist in der Lage Akute-Phase-Proteine, wie Serum Amyloid-A (SAA), zu induzieren (Scheller *et al.* 2011). Auch im adaptiven Immunsystem hat das Zytokin eine wichtige Funktion. IL-6 beeinflusst nicht nur die B-Zell-Differenzierung (frühere Bezeichnung von IL-6: B-Zell-differenzierender Faktor), sondern ist auch essentiell für die T<sub>H</sub>17-Differenzierung (Jones *et al.* 2005).

IL-6 als ein anti-inflammatorisches Zytokin kann regenerative Prozesse wie die Leberregeneration kontrollieren. Grivennikov *et al.* zeigten, dass IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse während der Behandlung mit DSS (Dextransulfat Natrium) deutlich höhere Entzündungsparameter aufwiesen als Wildtyp-Mäuse (Grivennikov *et al.* 2009). Außerdem wurden Geweberegenerative Effekte von IL-6 in einem *Citrobacter rodentium*-Infektionsmodell belegt (Dann *et al.* 2008).

IL-6 hat aber auch vom Immunsystem unabhängige Funktionen. Es steigert die Sekretion von Kortisol, Somatotropin, Glukagon und Adrenalin und ist außerdem auch in neuronalen Prozessen involviert (*Scheller et al.* 2011). Weiterhin kann IL-6 den Fett- und Insulinstoffwechsel (*Carey and Febbraio* 2004) und durch seine Osteoklasten-aktivierende Wirkung auch den Knochenumbau beeinflussen (*Tamura et al.* 1993).

### 2.3.1. Die IL-6-Rezeptor-Signalkaskade

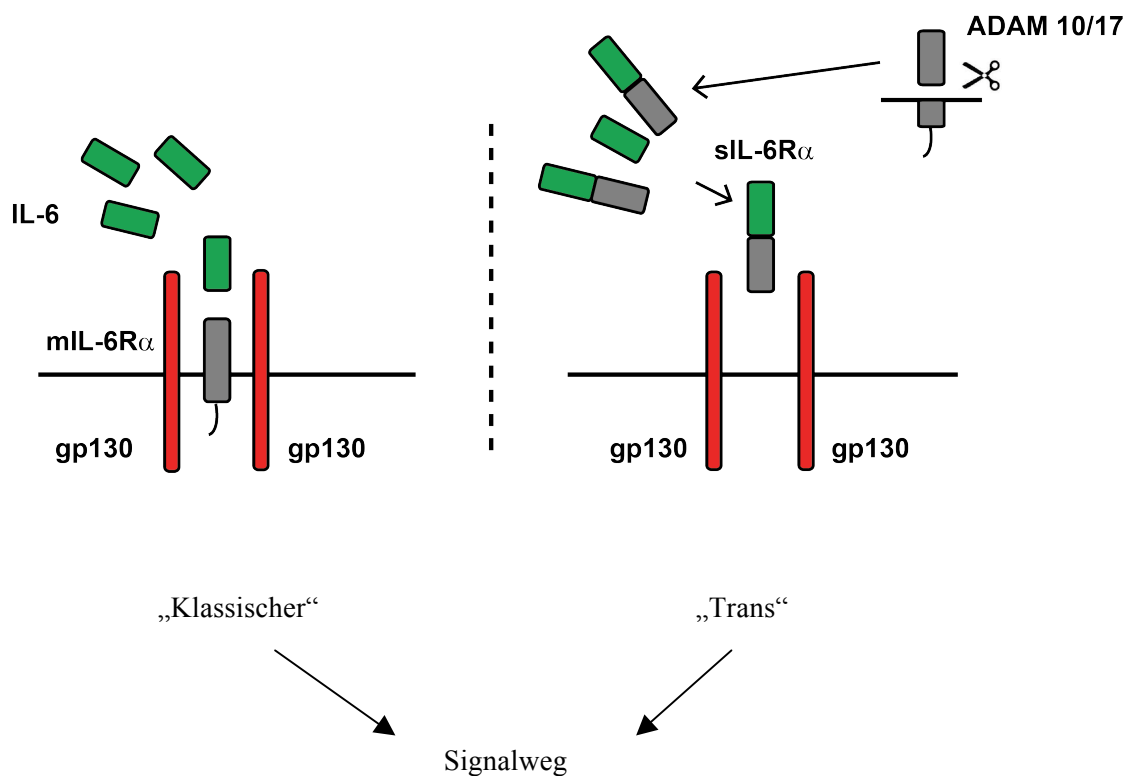
Der IL-6-Rezeptor (IL-6R) besteht aus zwei Untereinheiten: dem Glykoprotein 130 (gp130 oder CD130) und der membrangebundenen IL-6-Rezeptor  $\alpha$  Untereinheit (IL-6R $\alpha$  oder CD126). Auf ruhenden Zellen liegt das gp130 als inaktives Dimer vor (*Scheller et al.* 2011). Gp130 wird ubiquitär exprimiert und ist auch eine wichtige Komponente von anderen Zytokinrezeptoren, wie z.B. des IL-11-Rezeptors, des Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF) Rezeptors, oder des Oncostatin-M-Rezeptors (*Taga et al.* 1997).

Nach der Bindung des IL-6 an den membranständigen IL-6R $\alpha$  (mIL-6R $\alpha$ ), werden die gp130 Moleküle rekrutiert und der klassische IL-6 Signalweg wird aktiviert. Über die zytoplasmatische Domäne von gp130 wird das IL-6-Signal in das Zellinnere weitergeleitet. Intrazellulär ist gp130 mit Janus-Kinasen (JAK) assoziiert, die sich bei Bindung von IL-6 gegenseitig an Tyrosinresten phosphorylieren und dadurch aktivieren. Diese Kinasen phosphorylieren und aktivieren dann STAT3 aber auch STAT1 (*Heinrich et al.* 2003). Die STAT-Moleküle bilden dann Dimere, die in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktoren die Transkription IL-6-abhängiger Gene induzieren. (*Leonard and O'Shea*, 1998).

Im Gegensatz zu gp130, welches ubiquitär exprimiert wird, ist die Expression des membranständigen IL-6R $\alpha$  auf wenige Zelltypen, wie Hepatozyten, Makrophagen und bestimmte T-Zellsubpopulationen, beschränkt (*Rose-John et al.* 2006). Aber auch Zellen ohne einen membranständigen IL-6R $\alpha$  können auf IL-6 reagieren. Dies geschieht über einen alternativen Signalweg der als IL-6-Trans-Signalweg bezeichnet wird. Neben der membranständigen Form liegt der IL-6R $\alpha$  auch als lösliches Protein (sIL-6R $\alpha$ ) vor. IL-6 kann auch mit dem sIL-6R $\alpha$  einen Komplex bilden und dieser Komplex ist dann in der Lage an membranständiges gp130 zu binden und den IL-6-Signalweg zu aktivieren. Der lösliche IL-6R $\alpha$  kann sowohl durch proteolytische Spaltung (Shedding) als auch durch ein alternatives Splicen der mRNA generiert werden. Der letztere Mechanismus ist für den humanen, nicht aber für den murinen IL-6R $\alpha$  beschrieben (*Müllberg et al.* 1993, *Scheller et al.* 2011).

Normalerweise hat der Mensch eine IL-6 Serumkonzentration von 1-5 pg/ml, aber eine viel höhere Konzentration von sIL-6R $\alpha$  (50-100 ng/ml). Außerdem existiert eine lösliche Form von gp130 (sgp130) die mit etwa 100-200 ng/ml im Serum vorliegt. Freies IL-6 bindet an

sIL-6R $\alpha$  und dieser Komplex bindet an gp130 und wird dadurch neutralisiert. Somit fungieren sIL-6R $\alpha$  und gp130 als ein Puffersystem für sezernierte IL-6-Moleküle. Deswegen kann IL-6 nur wirken, wenn seine Serumkonzentration die von sIL-6R $\alpha$  und gp130 übersteigt. Auch der IL-6-Trans-Signalweg ist nur möglich, wenn die Serumkonzentration des IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Komplexes die des gp130 übersteigt, was wahrscheinlich nur nach einer verstärkten Abspaltung des mIL-6R $\alpha$  stattfindet. Dieser Mechanismus könnte die IL-6 Antwort auf ein lokales Geschehen begrenzen und daher eine systemische Reaktion verhindern (Rabe et al. 2008, Jostock et al. 2001).



**Abbildung 1: Klassischer IL-6 Signalweg vs. IL-6-Trans-Signalweg.** Dargestellt werden hier die beiden IL-6 Signalkaskaden. Bindet IL-6 an den membranständigen IL-6R $\alpha$ , der auf bestimmten Zellpopulationen wie Makrophagen/Monozyten, Granulozyten, T-Zellen und Hepatozyten zu finden ist, kann der klassische Signalweg aktiviert werden. Alternativ bindet IL-6 an den löslichen IL-6R $\alpha$ . Der Komplex aus IL-6 und sIL-6R $\alpha$  kann dann auch Zellen aktivieren, die gp130 aber keinen membranständigen IL-6R $\alpha$  tragen (Trans-Signalweg). Die Generierung vom sIL-6R $\alpha$  findet in der Maus durch proteolytische Abspaltung durch die Metalloproteasen der ADAM Familie statt (nach Scheller et al. 2011).

Zusammengefasst werden über den klassischen Signalweg spezifisch nur Zellen mit einem membranständigen IL-6R $\alpha$  durch IL-6 aktiviert, während über den Trans-Signalweg alle



gp130-exprimierenden Zellen des Organismus beeinflusst werden können. Dadurch erweitert der IL-6-Trans-Signalweg sowohl die pro-, als auch die anti-inflammatorischen Effekte, die durch IL-6 hervorgerufen werden.

### **2.3.2. Therapeutische Ansätze zur IL-6 Blockade**

Durch seine vielfältigen Funktionen ist IL-6 an der Pathogenese verschiedener Krankheiten beteiligt. Dies gilt insbesondere für chronisch inflammatorische Krankheiten, wie der rheumatoide Arthritis (RA) (*Scheller et al.* 2011). Die Serumkonzentration von IL-6 ist bei Patienten mit RA deutlich erhöht, und diese Erhöhung korreliert mit den klinischen Zeichen der Krankheitsaktivität (*Hashizume and Mihara* 2011). Deshalb wird IL-6 schon seit Jahren als Angriffspunkt für immunmodulatorische Therapien diskutiert. Basierend auf den unterschiedlichen IL-6 Signalwegen wurden verschiedene therapeutische Ansätze entwickelt.

Die AMBITION Studie zeigte, dass Tocilizumab (Actemra®), ein monoklonaler Antikörper gegen den IL-6R $\alpha$ , eine effizientere Therapie der RA darstellte, als die Monotherapie mit Methotrexat, welches zurzeit als Mittel der ersten Wahl bei der RA eingesetzt wird (*Jones et al.* 2010). Für Tocilizumab wurden aber auch unerwünschte Nebenwirkungen beschrieben, wie eine erhöhte Infektanfälligkeit und eine Neutropenie (*Jones G et al.* 2010).

Das Problem bei dieser Therapie sowie bei vielen anderen immunmodulatorischen Therapien besteht darin, dass durch die globale Blockade der IL-6 Signalkaskade auch die erwünschten anti-inflammatorischen Funktionen sowie die gegenüber Infektionen protektiven Funktionen von IL-6 verhindert werden (*Danilenko und Wang* 2012). Die durch die Blockade entstandene verminderte Rekrutierung der Neutrophilen könnte eine mögliche Erklärung der unerwünschten Nebenwirkungen sein. Deshalb wäre eine gezieltere Blockade von Vorteil.

Die Anwendung von löslichem gp130 Fusionsprotein (sgp130Fc) stellt hier eine spezifische Therapiemöglichkeit dar. Sgp130Fc ist ein Fusionsprotein, bei dem die extrazelluläre Domäne des gp130 Rezeptors mit dem Fc-Teil des IgG fusioniert ist. Dieses Protein kann IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Komplex binden und neutralisieren, interagiert aber nicht mit der Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R $\alpha$ . Somit kann sgp130Fc den IL-6-Trans-Signalweg selektiv blockieren (*Jones et al.* 2011).

Mausmodelle zeigen regenerative und protektive Funktionen von IL-6 in der Leber (*Malchow et al.* 2011) und im Darm (*Becker et al.* 2004, *Grivennikov et al.* 2009), die durch den klassischen IL-6 Signalweg hervorgerufen werden und nicht durch eine Blockade des Trans-Signalwegs inhibiert werden. *Mitsuyama et al.* belegten, dass bei vielen Autoimmunerkrankungen bei Menschen nicht nur das Serum IL-6, sondern auch das Serum sIL-6R $\alpha$  erhöht ist. Diese Erhöhung korreliert auch mit dem Entzündungswert CRP positiv,

ein Hinweis darauf, dass in diesen Individuen der IL-6-Trans-Signalweg eine negative Rolle spielt (*Mitsuyama et al.* 1995). Der Einsatz von sgp130Fc könnte in dieser Situation die pro-inflammatorischen Funktionen von IL-6 verhindern, aber gleichzeitig die erwünschten Wirkungen erhalten (*Rose-John et al.* 2007).

Zurzeit befindet sich das sgp130Fc in der präklinischen Phase (*Rose-John et al.* 2007) und sollte bald in die klinische Phase als ein neuer Therapieansatz im Menschen übergehen. Inwiefern die Anwendung von sgp130Fc zu systemischen Nebenwirkungen führen kann, ist bisher noch nicht bekannt.

#### **2.4. Die Funktion von IL-6 in der Immunantwort der Maus gegen *L. monocytogenes***

Als ein pro-inflammatorisches Zytokin ist IL-6 neben TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  einer der wichtigsten Mediatoren in der *L. monocytogenes*-Infektion (*Liu et al.* 1995). Eine erhöhte IL-6 Serumkonzentration wurde während der Primärinfektion mit *L. monocytogenes* beobachtet, aber nicht während der Sekundärinfektion, was bedeutet, dass dort die Immunantwort weitgehend unabhängig von IL-6 ist (*Liu et al.* 1995). Bezüglich der Listerienlast zeigten IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse eine deutlich eingeschränkte Bakterienkontrolle (*Kopf et al.* 1994). Die Infektion dieser Mäuse mit einer letalen Dosis von *L. monocytogenes* führte zu einer deutlichen Induktion einer Lebernekrose mit erhöhten Konzentrationen von Serumtransaminasen. Mäuse, die mit monoklonalen Antikörpern (mAb) gegen TNF $\alpha$  und IL-6 behandelt wurden, wiesen Anzeichen einer Apoptose der Hepatozyten auf. Diese von *Miura et al.* publizierten Ergebnisse bestätigten, dass TNF $\alpha$  und IL-6 eine wichtige Bedeutung während einer Infektion mit *L. monocytogenes* haben (*Miura et al.* 2000).

Hauptproduzenten von IL-6 während der Listerieninfektion sind Makrophagen und inflammatorischen Monozyten. Oft wird aber auch diskutiert, dass T-Zellen die Fähigkeit besitzen IL-6 zu produzieren (*Saunders et al.* 1993). T-Zellen haben, wie bereits beschrieben, eine zentrale Funktion in der Eradikation von *L. monocytogenes* und tragen entscheidend zum verbesserten Schutz bei einer Re-Infektion bei. Unklar ist aber ob IL-6 eine Bedeutung für die Generierung und die Funktion dieser T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* hat.

#### **2.5. Die Funktion von IL-6 in der Immunantwort der Maus gegen *S. typhimurium***

IL-6 hat wahrscheinlich eine protektive Rolle in der Infektion mit *S. typhimurium*. Es liegen aber keine relevanten Daten für Mausinfektionsmodelle für *S. typhimurium* vor. Interessanterweise wurde die Funktion von IL-6 für die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen in IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen in einem *S. typhimurium*-Colitis-Modell untersucht. T<sub>H</sub>17-Zellen sind eine

Subpopulation aus  $CD4^+$  T-Zellen, die eine Rolle in der Immunantwort gegen extrazelluläre Krankheitserreger, aber auch bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen spielen. Nach Aktivierung reifen naive  $CD4^+$  T-Zellen in Anwesenheit von TGF $\beta$  und IL-6 zu  $T_H17$ -Zellen. (Bettelli et al. 2008).

Im *S. typhimurium*-Modell führt die orale Gabe des Erregers bei den Mäusen zu einer akuten inflammatorischen Colitis, die von Aktivierung und Akkumulation von  $T_H17$ -Zellen begleitet wird (Raffatellu et al. 2009). IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen in diesem Modell keine Akkumulation von  $T_H17$ -Zellen. Auch Wildtyp-Mäuse, welche 24 Stunden nach der Infektion mit neutralisierenden anti-IL-6-Antikörpern behandelt wurden, zeigten eine deutliche Reduktion von der IL-17A Produktion. Dies deutet darauf hin, dass die Differenzierung von  $T_H17$ -Zellen während der Infektion mit *S. typhimurium* abhängig von IL-6 ist. Insgesamt zeigten diese Daten, dass nach einer *S. typhimurium*-Infektion IL-6 essentiell für eine  $T_H17$ -Zelldifferenzierung ist (Geddes et al. 2011).

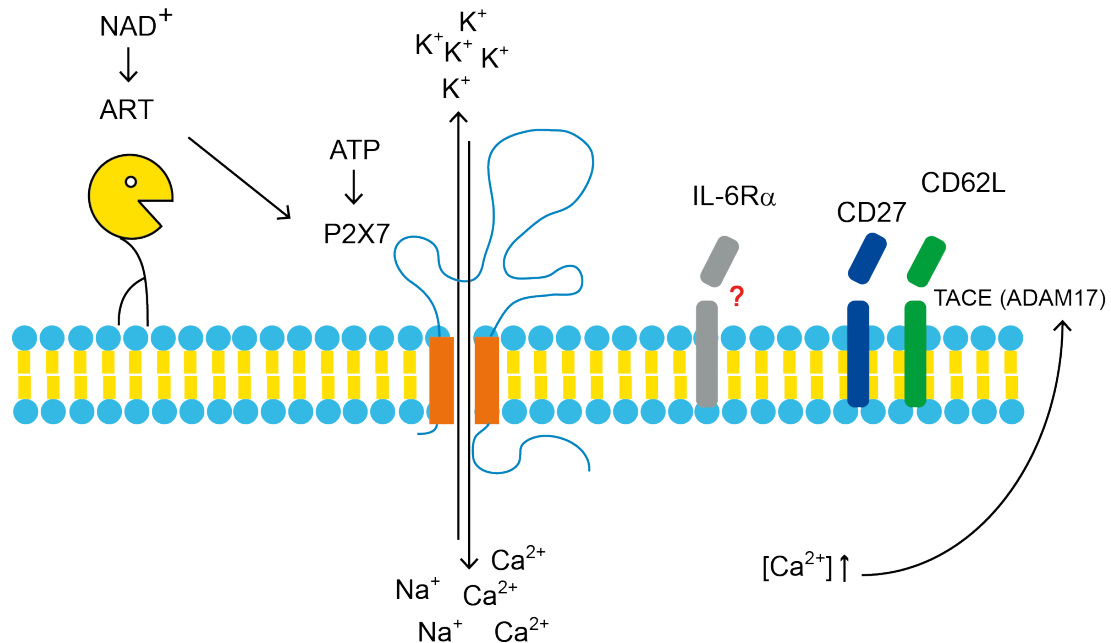
## 2.6. P2X7

Purin-Nukleotide wie ATP, die bei Entzündungsreaktionen und Gewebszerstörung freigesetzt werden, können verschiedene Purin-Rezeptoren aktivieren und Zellfunktionen dadurch beeinflussen (Haag et al. 2007). Zu der Familie P2X gehört der purinerge Rezeptor P2X7, welcher ein ligandengesteuerter Ionenkanal ist und von T-Zellen exprimiert wird. Die Aktivierung von P2X7 kann direkt durch ATP oder indirekt durch NAD<sup>+</sup> über eine ADP-Ribosyl-Transferase (ART) induziert werden und führt zu einem Einstrom von Ca<sup>2+</sup> und Na<sup>+</sup> und einem Ausstrom von K<sup>+</sup>. Die erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration ermöglicht die Aktivierung von Metalloproteasen wie ADAM10 oder ADAM17 (TACE), welche Proteine wie CD27 oder CD62L von der Zelloberfläche abspalten können (Jiang et al. 2009, Faria et al. 2010). Bei anhaltender Stimulation kann P2X7 auch die Apoptose der Zellen induzieren (Seman et al. 2003, Adriouch et al. 2008, Heiss et al. 2008, Scheuplein et al. 2009, Schwarz et al. 2009).

Neben den T-Zellen ist P2X7 auch auf den Makrophagen zu finden. Hier ist P2X7 an der Aktivierung des Inflammasoms beteiligt und hat dadurch eine wichtige Bedeutung bei der Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-18 im Rahmen von Infektionen (Ferrari et al. 2006, Dinarello et al. 2007).

P2X7 kann NLRP3 (NLR family, pyrin domain containing 3) aktivieren, die genaue Signalkaskade ist hierbei aber noch unklar. Der durch P2X7 induzierte Ca<sup>2+</sup> Influx könnte für die Aktivierung der NLRP3 verantwortlich sein. Über die Aktivierung von Pannexinen könnte P2X7 aber auch den Einstrom anderer Substanzen ermöglichen, die dann zu einer Aktivierung von NLRP3 führen. NLRP3-Proteine aktivieren dann Caspase-1, die pro-IL-1 $\beta$  zu aktivem IL-1 $\beta$  spaltet. Weiterhin stimuliert NLRP3 die Freisetzung des aktivem

IL-1 $\beta$  im entzündeten Gewebe. IL-1 $\beta$  hat dann verschiedene Funktionen, z.B. die vermehrte Produktion von Akute-Phase-Proteinen (Ghiringhelli *et al.* 2009, Ferrari *et al.* 2006, Kanneganti *et al.* 2007).



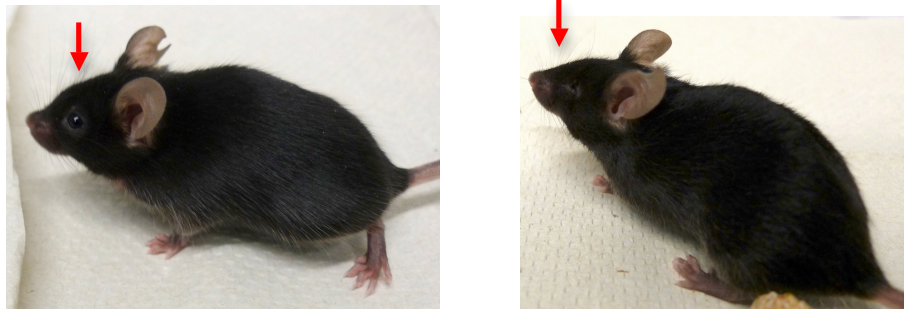
**Abbildung 2: P2X7-Signalweg.** P2X7 kann entweder direkt durch ATP oder indirekt über einen ART2-abhängigen Weg durch NAD<sup>+</sup> aktiviert werden. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Öffnung des Kationkanals. Es kommt zu einem Einstrom von Na<sup>+</sup> und Ca<sup>2+</sup> und einem Ausstrom von K<sup>+</sup>. Die erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bedingt die Aktivierung der Metalloprotease ADAM17 (TACE), die in der Lage ist, verschiedene Proteine wie CD27 und CD62L von der Zelloberfläche zu spalten.

In Mäusen ist P2X7 auf verschiedenen T-Zellen exprimiert, der *in vitro* über ATP aktiviert wird und die Induktion von Metalloproteasen wie ADAM 17 herbeiführt. Diese kann dann Oberflächenmoleküle wie IL-6R $\alpha$ , CD27 und L-Selektin (CD62L) abspalten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L zwar *in vitro* über einen P2X7 induzierten Mechanismus von der Oberfläche abgespalten werden konnten, aber nach der Infektion mit *L. monocytogenes* sowohl einen Verlust von IL-6R $\alpha$  in den Wildtyp-Mäusen als auch in den P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden konnte. Das bedeutet, dass der Verlust von IL-6R $\alpha$  während der Infektion über einen P2X7-unabhängigen Mechanismus vermittelt wird.

## 2.7. ADAM17

ADAM17 (*a disintegrin and metalloprotease 17*) ist ein 70 kDa großes Protein, das zur ADAM-Proteinfamilie gehört. Diese Protease kommt fast ubiquitär vor und zeigt eine sehr hohe Expression während Entzündungsreaktionen und Tumorgenese (Chalaris *et al.* 2010).

ADAM17 wird auch als TACE (*TNF $\alpha$  converting enzyme*) bezeichnet, weil sie die Fähigkeit besitzt, eine lösliche Form von TNF $\alpha$  durch dessen Abspaltung von der Oberfläche zu generieren (Roy *et al.* 1997). Weitere potentielle Moleküle, die durch TACE von der Oberfläche gespalten werden, sind z.B. L-Selektin (CD62L) oder der EGF-R (Epidermal Growth Factor-Receptor) (Chalaris *et al.* 2010, Le Gall *et al.* 2010).



**Abbildung 3: Phänotypischer Vergleich zwischen Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen.** Das linke Foto zeigt ein acht Wochen altes Wildtyp-Weibchen und das rechte Foto im Vergleich ein neun Wochen altes ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Weibchen. Der rote Pfeil deutet auf das Auge hin, welches bei der ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Maus eine deutliche Fehlentwicklung zeigt. Diese Störung führt zur Blindheit der ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Mäuse. Zusätzlich zeigt die ADAM17<sup>ex/ex</sup>-Maus auch ein struppiges Fell, eine Hinweis auf einen generell reduzierten Allgemeinzustand.

Um die Funktion von ADAM17 besser untersuchen zu können, wurde von unserem Kooperationspartner ein neues Mausmodell entwickelt. Da das vollständige Fehlen von ADAM17 nicht mit dem Leben vereinbar ist, wurde eine Mauslinie entwickelt, die eine deutlich reduzierte ADAM17-Expression und Aktivität aufweist. Diese Mäuse werden als ADAM17<sup>ex/ex</sup> bezeichnet. In Zuchten finden sich deutlich weniger ADAM17<sup>ex/ex</sup> Tiere als nach den Mendelschen Gesetzen erwartet werden kann. Die vorhandenen hypomorphen ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse sind dann zwar lebensfähig, zeigen jedoch im Vergleich zu Kontrolltieren einen deutlichen Phänotyp. Aufgrund der Einschränkung des EGF-R-Signalwegs, die auf einer mangelnden Abspaltung des EGF-R beruht, zeigen ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse Defekte in Augen, Haut und Haaren (Chalaris *et al.* 2010). Obgleich es bezüglich des Gewichtes oder der Größe keine bemerkbaren Unterschiede zu den Wildtyp-Mäusen festgestellt werden kann, zeigen die Mäuse ein krankhaftes Erscheinungsbild. ADAM17<sup>ex/ex</sup> Tiere bieten ein Modell zur Analyse der Abspaltung von IL-6R $\alpha$  *in vitro* und *in vivo*.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Feinchemikalien und Reagenzien

Bacto Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Brefeldin A (BFA)	Sigma (Steinheim)
Desoxyribonuklease I (DNase)	Sigma (Steinheim)
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA (Paschingen)
Fix-Permeabilization Buffer	eBioscience (Frankfurt)
10×Permeabilization Buffer	eBioscience (Frankfurt)
Gentamycin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Ionomycin	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Kollagenase D	Roche (Grenzach-Whylen)
Kollagenase VIII	Sigma (Steinheim)
Peptid	
Listeriolysin O <sub>189-201</sub> (WNEKYAQAYPNVS)	JPT (Berlin)
Ovalbumin <sub>257-264</sub> (SIINFEKL)	JPT (Berlin)
Normales Rattenserum (NRS)	Immuno Research (Baltimore)
Pacific Orange Succinimidyl Ester	GIBCO Invitrogen (Karlsruhe)
Easycoll Separationslösung	Biochrom AG (Berlin)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma (Steinheim)
Saponin	Sigma (Steinheim)
Streptomycin	Sigma (Steinheim)
Tryptic Soy Broth (TSB)	BD (Heidelberg)

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

### 3.1.2. Puffer und Medien

PBS (phosphatgepufferte Salzlösung)		Sigma (Steinheim)
2 % BSA	10 g bovines Serumalbumin in 500 ml sterilem PBS	
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 L-Glutamin 50 µg/ml Gentamycin 50 µM β-Mercaptoethanol	Gibco (Karlsruhe)
Saponinpuffer	0,1% BSA 0,3 % Saponin in PBS	Sigma (Steinheim)
TSB-Agar	15 g Tryptic Soy Broth 10 g Agar in 500 ml Aqua destillata	BD Bacto (Heidelberg) BD Bacto (Heidelberg)

### 3.1.3. Antikörper für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper**

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	PerCP	BD Pharmingen (Heidelberg)
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	V450	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	APC-Cy7	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms CD8a	53-6.7	PerCP	BioLegend (Fell)
$\alpha$ -ms CD8a	53-6.7	PE-Cy7	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms CD44	IM7	APC	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms CD44	IM7	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
$\alpha$ -ms CD62L	MEL-14	APC-Cy7	BioLegend (Fell)
$\alpha$ -ms IL-6R $\alpha$	D7715A7	PE	BioLegend (Fell)
$\alpha$ -ms CD27	LG.3A10	PerCP	BioLegend (Fell)
$\alpha$ -ms ART2.2	R8A106	APC	AG Nolte (Hamburg)
$\alpha$ -ms $\gamma\delta$ TCR	GL3	FITC	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms Ly6C	AL-21	FITC	BD Pharmingen (Heidelberg)
$\alpha$ -ms Gr1	RB6-8C5	V450	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms CD11b	M1/70	PerCP	BioLegend
$\alpha$ -ms F4/80	BM8	APC	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms IL-6	MP5-20F3	PE	BioLegend (Fell)
$\alpha$ -ms IL-17A	eBio17B7	PE	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms TNF $\alpha$	MP6-XT22	PE-Cy7	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms IFN $\gamma$	XMG1.2	APC	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms FoxP3	FJK-16S	FITC	eBioscience (Frankfurt)
$\alpha$ -ms CD16/CD32	2.4G2	-	BioXCell (New Hampshire, USA)

**Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen**

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller
$\alpha$ -ms IL-4	BVD4-1D11	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
IgG1K	eBRG1	PE	eBioscience (Frankfurt)

### 3.1.4. Bakterienstämme

- *Listeria monocytogenes*, Stamm EGD (LmEGD) (Murray et al. 1926)

Bereitgestellt von Prof. Stefan H.E. Kaufmann,  
Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin.

- *Listeria monocytogenes*, Stamm OVA (LmOVA) (Foulds et al. 2002)

Bereitgestellt von Dr. Hao Shen,  
University of Pennsylvania, Philadelphia.

- *Salmonella typhimurium*, Stamm SL1344 (Stocker et al. 1981)

Bereitgestellt von Prof. Stefan H.E. Kaufmann,  
Max-Planck Institut für Infektionsbiologie, Berlin.



- Hitze getötete Listerien (HKL: heat-killed listeria)

Eine Übernachtskultur von LmEGD (siehe Kapitel 3.2.2.1.) wurde zweimal mit PBS gewaschen und dann bei 80 °C für 30 Minuten inaktiviert. Die Inaktivierung wurde durch eine Ausplattierung auf TSB-Agarplatten überprüft. Die Konzentration der Bakterien wurde dann photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2.2.). Die Bakteriensuspension wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### 3.1.5. Mäusstämme

- C57BL/6J Wildtyp-Maus

Jackson, Bar Harbour

- P2X7 Knock-out-Maus (P2X7<sup>-/-</sup>) (Solle et al. 2001)

Zucht des Instituts für Immunologie, Universitätsklinikum Eppendorf, Hamburg.

- IL-6 Knock-out-Maus (IL-6<sup>-/-</sup>) (Kopf et al. 1994)

Zur Verfügung gestellt von Prof. Gisa Tiegs und Dr. Annette Erhardt,  
Institut für experimentelle Immunologie und Hepatologie, Universitätsklinikum  
Eppendorf, Hamburg.

- Hypomorphe ADAM17 Maus (ADAM17<sup>ex/ex</sup>) (Chalaris et al. 2010)

Zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Rose-John und Dr. Athena Chalaris,  
Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

- sgp130Fc Transgene Maus (sgp130<sup>tg</sup>) (Rabe et al. 2008)

Zur Verfügung gestellt von Prof. Stefan Rose-John und Dr. Björn Rabe,  
Institut für Biochemie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

### **3.1.6. Besondere Geräte und Materialien**

BD FACS Canto II

BD (Heidelberg)

Für die Experimente wurden Standardlaborgeräte verwendet. Die Labormaterialien (z.B. Plastikpipetten, Reaktionsröhrchen und Petrischalen) stammten von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhäusen), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

### **3.1.7. Software**

FACS Diva Software

BD (Heidelberg)

GraphPad Prism Version 4.0

GraphPad Software (La Jolla, USA)

Adobe Illustrator CS5

Adobe (Kalifornien, USA)

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. Tierexperimentelles Arbeiten

Alle Tierversuche dieser Doktorarbeit fanden im Rahmen eines von der Behörde für Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg (Amt für Verbraucherschutz – Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen) genehmigten Projekts statt. Für die von mir selbst durchgeführten Eingriffe lag eine Ausnahmegenehmigung (§9 Abs.1 Satz 4 TierSchG) vor.

### 3.2.2. Bakterienkulturen und Infektion

#### 3.2.2.1. *Listeria monocytogenes*

Für eine systemische Infektion bekamen die Mäuse *Listeria monocytogenes* der Stämme LmEGD und LmOVA appliziert. Für beide Stämme waren Bakterienstocks mit bekannter Konzentration im Labor vorhanden ( $5 \times 10^8$  LmEGD/ml und  $3 \times 10^8$  LmOVA/ml). Aliquots dieser Stocks wurden bei -80 °C gelagert. Zur Infektion wurden Aliquots aufgetaut und mit sterilem PBS entsprechend verdünnt.

Zur Herstellung der Listerienstocks wurden 100 ml TSB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und die Kultur über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde in zwei 50 ml Reaktionsröhrchen 5 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden mit 10 ml PBS resuspendiert, vereinigt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 ml 10% Glycerol resuspendiert. Aliquots mit je 100 µl Suspension wurden im -80 °C Tiefkühler gelagert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mäuse entweder mit  $2 \times 10^4$  LmEGD/200 µl oder mit  $1 \times 10^5$  LmOVA/200 µl intravenös behandelt. Die Konzentration der Bakterien in der Injektionssuspension wurde immer kontrolliert. Hierzu wurden drei Verdünnungsstufen der Suspension auf TSB-Agar Platten ausplattiert, die Platten 48 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend die Kolonien ausgezählt.

#### 3.2.2.2. *Salmonella typhimurium*

Die Induktion einer Kolitis in Mäusen erfolgte durch eine Infektion mit *Salmonella typhimurium* des Stamms SL1344. Ein Bakterienstock mit einer Konzentration von  $4,5 \times 10^8$  SL1344/ml lag bei -80 °C vor. Für die intravenöse Infektion wurden die Bakterien auf eine Konzentration  $2 \times 10^4$  SL1344/200 µl eingestellt und verabreicht. Für orale Infektionen wurden frische Kulturen mit einem Aliquot angeimpft. Die Kultur erfolgt in 100 ml Hochsalzmedium (67 ml LB-Medium plus 33 ml 1M NaCl Lösung) in einem 500 ml Kolben ohne Schütteln bei 37 °C. Die Kultur in Hochsalzmedium ohne Schütteln ähnelt entfernt dem Darmmilieu und dient zur Induktion von Virulenzgenen, welche Salmonellen zum

Eindringen in die Darmmukosa benötigen. Die Salmonellen wurden wie im Abschnitt zu den Listerien beschrieben, gewaschen und das Pellet in 5 ml PBS resuspendiert. Die Bestimmung der Bakterienkonzentration erfolgte über eine Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer. Zuerst wurde eine Küvette mit 800 µl PBS als Leerwert gemessen. Die Messung der Bakterienkonzentration erfolgte in vier sukzessiven 1:5 Verdünnungen. Der gemessene Wert wurde anschließend mit dem Verdünnungsfaktor  $10^9$ /ml multipliziert. Aus Erfahrungswerten ist bekannt, dass eine OD<sub>600</sub> von 1 einer Bakterienkonzentration von  $1 \times 10^9$ /ml entspricht.

Für die Infektion wurde die Suspension dann mit PBS auf eine Konzentration von  $5 \times 10^{10}$  SL1344/ml verdünnt. In dem hier verwendeten Infektionsmodell wurden die Mäuse einen Tag vor der Infektion mit Streptomycin behandelt. Die Mäuse erhielten 200 µl einer Streptomycinlösung (20 mg/ml) über eine Magensonde. Die Salmonelleninfektion erfolgte dann ebenfalls mit einer Magensonde mit  $1 \times 10^{10}$  SL1344/200 µl. Auch hier wurde zur Kontrolle eine Verdünnungsreihe des Bakterieninokulums auf LB-Streptomycin-Agar-Platten ausplattiert, die Platten 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend die Kolonien ausgezählt.

### **3.2.3. Isolierung von Leukozyten aus Milz, Lymphknoten, Leber und Darm**

#### **3.2.3.1. Organentnahme**

Die Mäuse wurden zuerst mit einer Gasmischung aus 80% CO<sub>2</sub> und 20% O<sub>2</sub> betäubt und anschließend durch die Einleitung von reinem CO<sub>2</sub> sowie durch Genickbruch getötet. Die Maus wurde auf einem Styroporblock fixiert und das Bauchfell mit 70% Ethanol desinfiziert. Haut und Peritoneum wurden aufgeschnitten und die Bauchhöhle eröffnet. Milz und Leber wurden entnommen und von den Restgeweben befreit. Die Leber wurde vor der Entnahme mit 5ml PBS durch die Pfortader perfundiert. Die Organe wurden sofort in ein mit PBS gefülltes Reaktionsröhrchen überführt und auf dem Eis gelagert.

Die inguinalen-, axillären-, Triceps-, poplitären-, submandibulären- und paraaortalen-Lymphknoten wurden entnommen und in RPMI komplett auf Eis aufbewahrt.

Der Dünndarm wurde 5 mm distal des Magens und proximal des Caecums herausgeschnitten und die Peyersche Plaques entfernt. Der Darm wurde mithilfe einer Knopfschere längs aufgeschnitten und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Der saubere Darm wurde in einer 250 ml Flasche, die 20 ml RPMI komplett enthielt, überführt und die Flasche auf Eis gestellt.

#### **3.2.3.2. Isolierung von Zellen aus der Milz**

Die Milz wurde zuerst mit 5ml PBS auf einem Ø200 µm Metallsieb platziert. Noch anhängendes Gewebe wurde entfernt. Die Milz wurde mit einem Spritzenstempel durch das

Sieb gedrückt und das Sieb mit 10 ml PBS nachgespült. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale aufgefangen, in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt und anschließend 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Erythrozyten im Pellet lysiert. Hierzu wurden das Zellpellet mit 2 ml Erythrozytenlysepuffer 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde das Gefäß mit eiskaltem PBS aufgefüllt, die Zellsuspension durch einem Ø70 µm Sieb (Cell strainer) in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und im Anschluss bei 1100 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 2 ml PBS resuspendiert und auf Eis gestellt.

#### 3.2.3.3. Isolierung von Leukozyten aus der Leber

Die Leber wurde zuerst in 20 ml PBS auf einem Ø200 µm Metallsieb platziert. Die Gallenblase wurde entfernt. Die Leber wurde mit einem Spritzenstempel durch das Sieb gedrückt und das Sieb mit 25 ml PBS gespült. Die Zellsuspension wurde in einer Petrischale aufgefangen und durch einem Ø70 µm Sieb in ein 50 ml Reaktionsröhrchen filtriert, anschließend 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Leukozyten wurden mit einem Dichtegradienten von den Hepatozyten und Erythrozyten getrennt. Die Trennung erfolgt durch einen zweistufigen Percollgradienten (40% und 70% Percoll in RPMI komplett). Das Zellpellet wurde in 5 ml 40% Easycoll resuspendiert. In ein Reaktionsröhrchen wurden 3 ml 70% Easycoll vorgelegt und diese dann vorsichtig mit der Zellsuspension in 40% Easycoll überschichtet. Der Gradient erfolgte durch eine 20-minütige Zentrifugation mit 1600 rpm. Das Auslaufen der Zentrifuge erfolgte ohne Abbremsen, um eine Vermischung der beiden Phasen zu verhindern. Die Hepatozyten mit einer geringen Dichte sammelten sich in einer Schicht über der 40% Easycollschicht und wurden vorsichtig entfernt. Die Leukozyten fanden sich im Grenzbereich zwischen den beiden Easycollschichten. Diese Schicht wurde großzügig vom Pellet abgenommen in ein neues Reaktionsröhrchen überführt. Das Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Erythrozyten, wie für die Milz beschrieben, lysiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in 300-500 µl PBS aufgenommen und auf Eis aufbewahrt.

#### 3.2.3.4. Isolierung von Zellen aus Lymphknoten

Die entnommenen Lymphknoten wurden mit zwei Pinzetten in kleinen Stücken zerrissen, um der Zellverlust durch sofortiges Zerdrücken zu verhindern. Die zerkleinerten Lymphknoten wurden durch ein Ø200 µm Metallsieb gedrückt, das Sieb mit 1 ml RPMI komplett gespült und die Zellsuspension durch ein Ø70 µm Sieb in ein 15 ml Reaktionsröhrchen filtriert. Es erfolgte anschließend eine 5-minütige Zentrifugation bei 1100 rpm und das Pellet wurde in 1 ml RPMI komplett resuspendiert.

#### 3.2.3.5. Isolierung von Darmleukozyten - IEL und LPL

Zur Isolierung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) erfolgte zuerst eine 30-minütige Inkubation des Darms bei 37 °C im Wasserbad. Die Inkubation erfolgte unter Rühren mit einem Rührfisch. Nach der Inkubation wurde die Flasche zusätzlich noch zehnmal per Hand geschüttelt. Durch das Rühren und Schütteln wird das relativ empfindliche Epithel abgelöst und die lose im Epithel sitzenden IEL ins Medium freigesetzt. Der Überstand der Därme wurde durch ein 200 µm Metallsieb in eine Petrischale überführt. Der Darm wurde anschließend zweimal mit 10 ml PBS nachgespült und geschüttelt und die Suspension ebenfalls über das Metallsieb filtriert. Die 40 ml Zellsuspension wurde dann über einem 70 µm Cell strainer in einem 50 ml Reaktionsröhrchen gefiltert, bei 1100 rpm 5 Minuten zentrifugiert und das Pellet auf Eis gestellt.

Die Isolierung der Lamina propria Lymphozyten (LPL) erfolgte durch einen Verdau. Hierzu wurde der Darm nach der Isolierung der IEL in kleine Fragmente zerschnitten und diese zurück in die Flasche gegeben. Die Darmfragmente wurden anschließend für 45 Minuten mit 20 ml RPMI ohne β-Mercaptoethanol, mit 5 mg/ml Collagenase VIII, 5 mg/ml Collagenase D und 1 µM DNase im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Flasche wurde erneut geschüttelt und die Suspension durch ein 200 µm Metallsieb in einer Petrischale gefiltert. Nach zweimaligem Nachspülen und Schütteln des Darmes mit 10 ml PBS wurde die gesammelte Zellsuspension über ein 70 µm Cell strainer in einem 50 ml Reaktionsröhrchen überführt und abzentrifugiert.

Zur Trennung der Leukozyten von den anderen Zellpopulationen erfolgte sowohl für die IEL- als auch für die LPL-Suspension eine Dichtegradienten-Zentrifugation. IEL und LPL wurden jeweils in 5 ml 40% Easycoll resuspendiert und mit dieser Suspension eine 70% Easycoll-Lösung (3 ml) überschichtet. Der Gradient erfolgte durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 1600 rpm ohne Bremse. Die obere Schicht wurde entfernt und die restliche Suspension vom Pellet abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt. Das Pellet wurde verworfen. Die Zellsuspension wurde mit PBS aufgefüllt und im Anschluss zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen im Pellet auf Eis aufbewahrt.

#### 3.2.3.6. Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. 10 µl Zellsuspension wurden mit 90 µl Trypanblau-Lösung verdünnt (1:10). Trypanblau ist nicht membrangängig. Daher werden tote, aber nicht lebende Zellen blau gefärbt und können beim Zählen ausgeschlossen werden. 10 µl der Lösung wurden auf die Zählkammer aufgetragen und die lebenden Leukozyten in mehreren Quadranten der Kammer unter einem Lichtmikroskop gezählt. Für die Berechnung der Gesamtzellzahl diente folgende Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwerte der Zellen pro Quadrant} \times 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4 (\text{Kammerfaktor})$$

#### **3.2.4. Extrazelluläre Antikörperfärbung**

Um die Oberflächenmoleküle einer Zellpopulation zu analysieren, wurden diese mit fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt. Die Zellkonzentration wurde auf  $2 \times 10^6$  Zellen/100  $\mu$ l eingestellt. Um eine unspezifische Antikörperbindung zu blockieren wurden die Zellen mit 1  $\mu$ l normalem Rattenserum (NRS) und 0,5  $\mu$ l Fc-Block (anti-CD16/CD32 mAb) 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Antikörper und des lebend-tot Farbstoffes Pacific-orange (Pac-O). Die Zellen wurden 20 Minuten lang im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100  $\mu$ l PBS für die Analyse im Durchflusszytometer resuspendiert.

#### **3.2.5. FoxP3-spezifische Antikörperfärbung**

FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Maus exklusiv von regulatorischen T-Zellen exprimiert wird. Aufgrund der intranukleären Lokalisation von FoxP3 wurde ein besonderes Färbeprotokoll verwendet. Da durch die in diesem Protokoll durchgeführten häufigen Waschgänge mit einem Permeabilisationspuffer relativ viele Zellen verlorengehen, wurden  $3-5 \times 10^6$  Zellen pro Ansatz verwendet. Zuerst wurde eine extrazelluläre Färbung nach Kapitel 3.2.4 durchgeführt, um die gewünschten Oberflächenmoleküle zu markieren. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen fixiert. Die Fixation beinhaltete eine 1-stündige Inkubation der Zellen mit 200  $\mu$ l Fix/Perm Lösung unter Lichtausschluss bei 4 °C im Kühlschrank. Die Fix/Perm Lösung wurde jeweils frisch angesetzt und bestand aus einer 1:4-Verdünnung aus Fix/Perm-Konzentrat und Fix/Perm-Verdünnungspuffer. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS/0,2% BSA gewaschen.

Für die intranukleäre Färbung wurden die Zellen mit dem Permeabilisationspuffer gewaschen. Dieser Puffer wurde aus dem 10 $\times$  Konzentrat mit ddH<sub>2</sub>O angesetzt. Es folgte das Blocken der unspezifischen Bindung von Antikörpern mit 50  $\mu$ l Permeabilisationspuffer + normalem Rattenserum für 10 Minuten bei 4°C unter Lichtausschluss. Zu den Zellen wurde der anti-FoxP3 mAb in 50  $\mu$ l im Permeabilisationspuffer gegeben. Diese Suspension wurde für 30 Minuten bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend mit dem Permeabilisationspuffer gewaschen. Zuletzt wurde das Zellpellet mit 200  $\mu$ l PBS/0,2% BSA resuspendiert und im Durchflusszytometer analysiert.

#### **3.2.6. Intrazellulärer Nachweis von Zytokinen**

Die intrazelluläre Zytokinfärbung (ICS) dient der Bestimmung des Zytokinprofils verschiedener Zellpopulationen mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie. Sie erlaubt eine direkte Zuordnung von Zytokinen zu definierten Zellpopulationen und die parallele Bestimmung von mehreren Zytokinen pro Zelle.

Da T-Zellen normalerweise nur nach einer Stimulation Zytokine produzieren, wurden die Zellen entweder polyklonal oder antigen-spezifisch stimuliert und anschließend extra- und nach einer Fixation intrazellulär mit monoklonalen Antikörpern gefärbt.

#### 3.2.6.1. *In vitro* Stimulation von Zellen

Im Rahmen von Infektionen werden pathogen-spezifische T-Zellen aktiviert. Die T-Zellen erkennen hierbei Peptide der Pathogene, die mit Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Proteinen auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritische Zellen (DCs), Makrophagen oder B-Zellen, präsentiert werden. Die Aktivierung führt zur Proliferation der T-Zellen und zur Differenzierung in Effektorzellen, die pro-inflammatorische Zytokine wie IL-17A, IFN $\gamma$  oder TNF $\alpha$  produzieren.

*In vitro* können diese T-Zellen dann entweder polyklonal oder antigen-spezifisch zur Zytokinproduktion stimuliert werden. Die polyklonale Stimulation erfolgte durch eine Kombination von Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) und Ionomycin. PMA ist ein Phorbolster, welcher die Proteinkinase C aktiviert. Dies führt zu einer dauerhaften T-Zell-Aktivierung. Ionomycin ist ein Ca<sup>2+</sup>-Ionophor des Bakteriums *Streptomyces globatus*, das in der Lage ist Calciumionen durch biologische Membran zu transportieren. Es erhöht dadurch die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration. Die Kombination aus PMA und Ionomycin imitieren somit das T-Zell-Rezeptorsignal.

Um die Zellen *in vitro* spezifisch zur Zytokinproduktion zu stimulieren, wurden die immun-dominanten Peptide OVA<sub>257-264</sub> für CD8<sup>+</sup> und LLO<sub>189-201</sub> für CD4<sup>+</sup> T-Zellen verwendet.

Für die Stimulation wurden 2×10<sup>6</sup> Zellen in 1 ml RPMI komplett aufgenommen. Die Stimulation erfolgte mit 10 nM PMA und 1  $\mu$ M Ionomycin im Brutschrank für 4 Stunden bei 37 °C. Die Stimulation für eine spezifische Immunantwort erfolgte durch eine Zugabe von 10<sup>-6</sup> M OVA<sub>257-264</sub> und 10<sup>-5</sup> M LLO<sub>189-201</sub>. Nach 30 Minuten wurde 1  $\mu$ M Brefeldin A, ein Lacton Antibiotikum, das von Pilzen wie *Eupenicillium brefeldianum* synthetisiert wird, hinzugegeben. Brefeldin A inhibiert den Golgi-Vesikel-Transport und führt zur Anreicherung von normalerweise sezernierten Zytokinen. Zur Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Stimulation inkubiert. Nach 4 Stunden wurden alle Ansätze gewaschen.

#### 3.2.6.2. Intrazelluläre Antikörperfärbung

Nach der Stimulation erfolgte zuerst die extrazelluläre Färbung der Zellen. Nach der 20-minütigen Färbung auf Eis unter Lichtausschluss wurden die Zellen gewaschen und mit 200  $\mu$ l PBS/2% PFA (Paraformaldehyd) fixiert. Die Fixation dauerte 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Zellen wurden anschließend mit PBS/0,2% BSA gewaschen. Die fixierten Zellen wurden dann 5 Minuten mit 20  $\mu$ l Saponinpuffer und NRS bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zellmembran durchlässig zu machen, damit intrazelluläre Moleküle für Antikörper zugänglich werden. Danach erfolgte die eigentliche



Färbung der Zytokine, indem der Zellsuspension 20 µl Antikörperlösung (Saponinpuffer + Antikörper) hinzugefügt wurde. Nach einer weiteren 15-minütigen Inkubation wurden die Zellen mit PBS/0,2% BSA gewaschen und bei 4 °C bis zur Analyse im Durchflusszytometer gelagert.

### **3.2.7. *In vitro* Stimulation mit NAD<sup>+</sup> und ATP**

Um zu prüfen, ob die Abspaltung des IL-6Rα von P2X7 abhängig ist, wurden Lymphknotenzellen *in vitro* stimuliert. Pro Maus wurden die Lymphknotenzellen in vier verschiedenen Ansätzen inkubiert. Je ein Ansatz ohne Stimuli wurde entweder auf Eis oder im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die restlichen Ansätze wurden entweder mit 50 µM NAD<sup>+</sup> oder mit 300 µM ATP bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Da inflammatorische Monozyten weniger empfindlich gegenüber ATP sind, wurden zur Analyse dieser Zellen die Milzzellen mit 3 mM ATP für 2 Stunden bei 37 °C *in vitro* inkubiert.

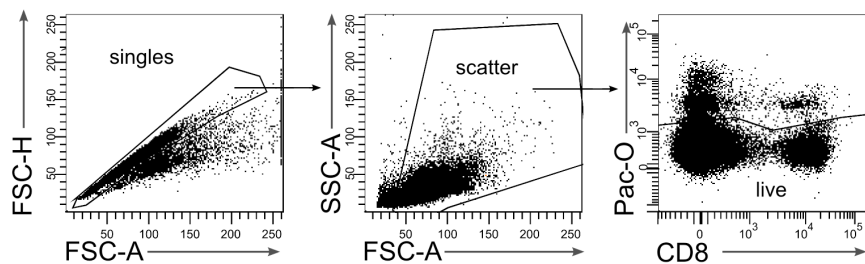
Nach der Stimulation folgte das Waschen der Zellen und die anschließende extrazelluläre Oberflächenfärbung inklusive lebend-tot-Farbstoff. Hier wurden neben dem IL-6Rα Protein weitere potentielle Substrate für membranständige Proteasen ("Sheddase") untersucht. Zu diesen Molekülen gehörten z.B. CD27 und CD62L.

### **3.2.8. Durchflusszytometrische Charakterisierung von Leukozyten**

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren, in dem Zellen im Durchfluss durch einen Laser bestrahlt werden und dann sowohl das Streulicht als auch verschiedene Fluoreszenzen für individuelle Zellen gemessen werden. Anhand des Streulichts werden Eigenschaften wie Größe und Granularität bestimmt. Die Messung der Fluoreszenz erlaubt z.B. den Nachweis der Bindung von Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern. Für jede Zelle werden die verschiedenen Parameter erfasst, die dann in verschiedenen Diagrammen dargestellt werden. In dieser Arbeit wurden hierfür zweidimensionale Dot-Blots verwendet, in denen jeder Punkt eine Zelle repräsentiert (Abb. 4).

Nach einer Messung der Zellen im Durchflusszytometer (hier FACS Canto II) erfolgte die Analyse mit der Diva Software nach dem folgenden Schema (Beispiel in Abb. 4). Zuerst wurden anhand des FSC-A/FSC-H-Profiles die singulären Zellen bestimmt. FSC (Forward Scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts und korreliert direkt mit der Größe der Zellen. FSC-A und FSC-H sind zwei Methoden zur Berechnung des FSC, die eine lineare Korrelation zueinander aufweisen. Zellen, die nicht in dieses Profil passen, sind z.B. Doubletten oder Zelltrümmer. Im FSC-A/FSC-H-Blot werden daher nur Ereignisse ausgewählt, die ein lineares FSC-A/FSC-H Verhältnis zeigen (singles). Im nächsten Schritt wird der SSC (Side Scatter) verwendet mit dem die Lichtbrechung im Winkel vom 90° gemessen wird. Der SSC ist ein Maß für die Granularität von Zellen. Im FSC-A/SSC-A-Blot

können daher verschiedene Leukozytenpopulationen ausgewählt werden bzw. Erythrozyten und Zelltrümmer ausgeschlossen werden. Zum Ausschluss von toten Zellen wurde schließlich eine Pacific-Orange (Pac-O)-Färbung verwendet. Pacific Orange Succinimidyl Ester bindet an Proteine auf der Oberfläche der Zellen. In toten Zellen sind auch Plasmaproteine für den Ester zugänglich, tote Zellen binden daher deutlich mehr Pacific Orange und zeigen eine stärkere Fluoreszenz. Diese Zellen werden ebenfalls ausgeschlossen (live). Schließlich werden die Fluoreszenzen der gebundenen Antikörper gemessen (im Beispiel  $CD8^+$  T-Zellen).



**Abbildung 4: Analysestrategie.** Aus allen Ereignissen wurden zuerst mithilfe von FSC-H und FSC-A die singulären Zellen ausgewählt. Aus den singulären Zellen wurden dann mit FSC-A und SSC-A die Leukozyten eingegrenzt. Anhand der Pacific-orange (Pac-O)-Färbung konnten schließlich die lebenden Zellen von den toten Zellen getrennt werden.

### 3.2.9. Titerbestimmung von Listerien in Milzen und Lebern

Für die Titerbestimmung wurden Flüssigkeitsbeutel (Whirl-Pak, Nasco) mit 1 ml PBS/0,05% Triton-X100 gefüllt. Triton-X100 ist ein Detergenz, das in der eingesetzten Konzentration zur Auflösung der Zellmembran führt, Listerien aber nicht schädigt. Milz und Leber oder Teile der Organe wurden steril entnommen und in die Beutel gegeben. Die Organe wurden in den Beuteln zu einer Suspension zerdrückt. Die Zellsuspensionen wurden dann in einer 24-well-Platte jeweils 1:10 in drei sukzessiven Verdünnungsstufen verdünnt, wobei immer 100 µl zu 900 µl PBS/0,05% Triton-X100 gegeben wurden.

Von jeder Verdünnungsstufe wurde 50 µl auf einer TSB-Agar Platte ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 48 Stunden. Anschließend wurden die Listerienkolonien gezählt.

Für die Berechnung der CFU (Colony Forming Units = Anzahl der Bakterien die Kolonien bilden) wurden nur Platten mit 10 bis 200 Kolonien berücksichtigt, um Ungenauigkeiten zu minimieren. Die hier verwendeten Verdünnungsstufen (1:200; 1:2000; 1:20000; 1:200000) ergaben ein Detektionslimit von 200 CFU pro Organ bzw. Organteil.

### **3.2.10. Statistik**

In den durchgeführten Experimenten wurden zwei bis vier Gruppen mit jeweils drei bis sieben Tieren pro Gruppe miteinander verglichen. Tiere pro Gruppe wurden jeweils individuell gemessen. Ergebnisse der FACS-Analysen wurden entweder mit einem Student's t Test (zwei Gruppen), oder mit einem One-Way ANOVA mit anschließendem Bonferroni Post-Test (mehr als zwei Gruppen) auf Signifikanz getestet. Die Ergebnisse der Titerbestimmung wurden in eine logarithmische Skala übertragen und diese Werte dann mit dem Student's t Test überprüft. Als signifikant wurden Unterschiede mit einem p-Wert von  $<0,05$  bezeichnet: \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ .

Für die FACS-Analysen wurden die Ergebnisse in Balkendiagrammen dargestellt, in denen jeweils das arithmetische Mittel  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben wurde. Die Ergebnisse der Titerbestimmung wurden als Scatter Plots mit dem Median auf einer logarithmischen Skala dargestellt.

Die statistische Berechnung sowie die graphische Darstellung erfolgten mit Graphpad Prism.

## 4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der Funktion von IL-6 in der Immunantwort nach einer Infektion der Maus mit *L. monocytogenes* und *S. typhimurium* untersucht. Im ersten Teil der Arbeit wurde die IL-6R $\alpha$  Expression auf der Zelloberfläche von Immunzellen aus gesunden und infizierten Mäusen charakterisiert. Weiterhin wurden Mechanismen der Regulation des Rezeptors nach der Infektion analysiert. Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit der Bedeutung verschiedener IL-6-Signalwege in der spezifischen T-Zellantwort gegenüber *L. monocytogenes*- und *S. typhimurium*-Infektion. In diesem Zusammenhang wurde auch die Rolle dieser Signalwege für die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung untersucht.

### 4.1. IL-6R $\alpha$ Expression auf der Oberfläche verschiedener Immunzellen

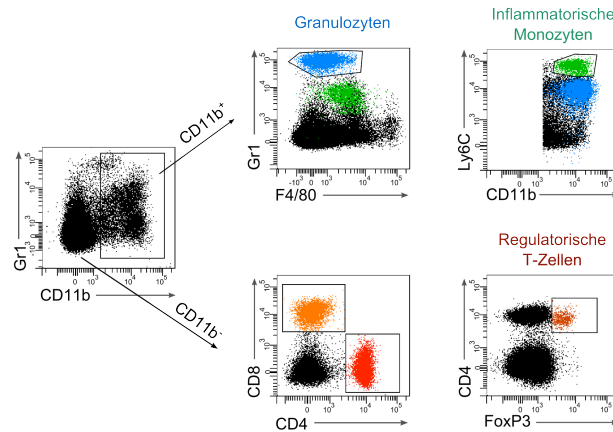
Während das Glykoprotein 130 (gp130) ubiquitär exprimiert ist, ist die IL-6R $\alpha$  Expression nur auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt. Für den IL-6R $\alpha$  ist eine Expression auf Hepatozyten und verschiedene Immunzellen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sollten für die *L. monocytogenes*-Infektion relevanten Immunzellen, insbesondere auch unterschiedliche T-Zellsubpopulationen auf die oberflächliche IL-6R $\alpha$  Expression untersucht werden. Für die Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden zuerst nicht-infizierte C57BL/6 Mäuse verwendet. Nach der Herstellung von Einzelzellsuspensionen der Milzzellen wurden die Zellen extrazellulär mit folgenden Antikörpern markiert:

**Tabelle 3: Fluorochrom-markierte Antikörper I**

Antigen	AK (Klon)	Fluorochrom
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	PerCP
$\alpha$ -ms CD8	53-6.7	PE-Cy7
$\alpha$ -ms FoxP3	FJK-16S	FITC
$\alpha$ -ms CD11b	M1/70	PerCP
$\alpha$ -ms Ly6C	AL-21	FITC
$\alpha$ -ms Gr1	RB6-8C5	V450
$\alpha$ -ms F4/80	BM8	APC
$\alpha$ -ms IL-6R $\alpha$	D7715A7	PE
$\alpha$ -ms IgG1K	eBRG1	PE (Isotyp)
Pac-O		Pacific Orange

In den ersten Schritten der Auswertung erfolgte die Definition von lebenden Einzelzellen nach dem in Kapitel 3.2.8, Abb. 3 angegebenen Schema. Aus den lebenden Zellen wurden die CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen von den CD11b<sup>-</sup> lymphoiden Zellen getrennt (Abb. 5). Unter den CD11b<sup>-</sup> Zellen und Zellen mit niedriger CD11b Expression konnten die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert werden. Durch die intrazelluläre Färbung des Transkriptionsfaktors FoxP3 wurden die FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestimmt.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass sowohl Zellen der myeloiden Zellreihe, als auch die untersuchten T-Zellpopulationen IL-6R $\alpha$  auf der Zelloberfläche exprimierten. Abbildung 6 zeigte eine hohe IL-6R $\alpha$  Expression auf inflammatorischen Monozyten sowie CD4 $^{+}$  und FoxP3 $^{+}$  T-Zellen. Granulozyten und CD8 $^{+}$  T-Zellen wiesen eine niedrige Expression des Rezeptors auf.



**Abbildung 5: Gating Strategie.** Mithilfe des myeloiden Marker CD11b konnten die myeloiden Zellen von den nicht-myeloiden Zellen getrennt werden. Die CD11b $^{+}$ Gr1 $^{high}$ F4/80 $^{low}$  Zellen wurden als Granulozyten definiert und aus den restlichen CD11b $^{+}$  Zellen wurden die CD11b $^{+}$ Ly6C $^{high}$ F4/80 $^{intermediate}$  inflammatorischen Monozyten dargestellt. Die CD11b $^{-}$  Zellen wurden in CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen unterteilt. Aus den CD4 $^{+}$  T-Zellen wurden die FoxP3 $^{+}$  T-Zellen ermittelt.

#### 4.1.1. Veränderung der IL-6R $\alpha$ Expression nach der Infektion mit

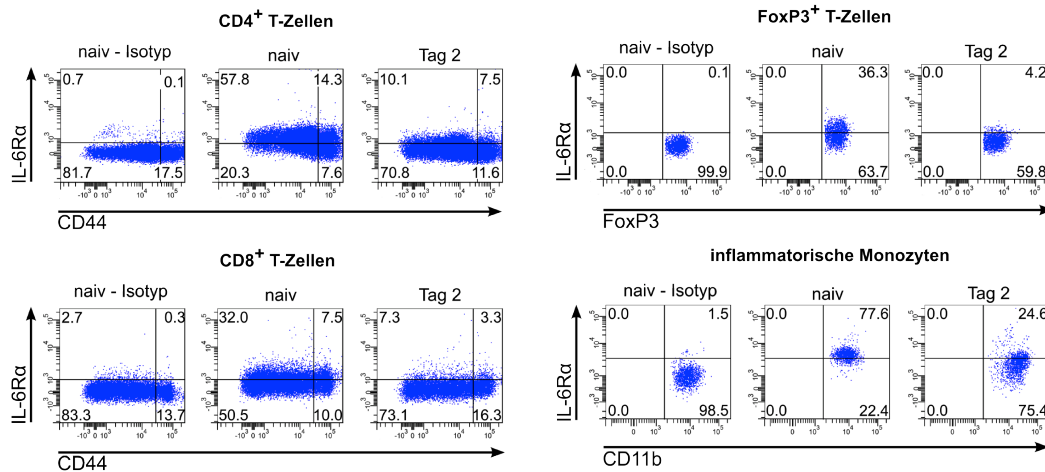
##### *L. monocytogenes*

Die Charakterisierung der IL-6R $\alpha$  Expression in nicht-infizierte Mäuse ergab, dass neben Monozyten und Granulozyten auch bestimmte T-Zellsubtypen IL-6R $\alpha$  auf der Zelloberfläche exprimieren. Dies bedeutet, dass diese Zellen durch IL-6-Signale über den klassischen Signalweg aktiviert werden können. Daraus ergibt sich die Frage, ob sich die Expression nach einer Infektion verändert.

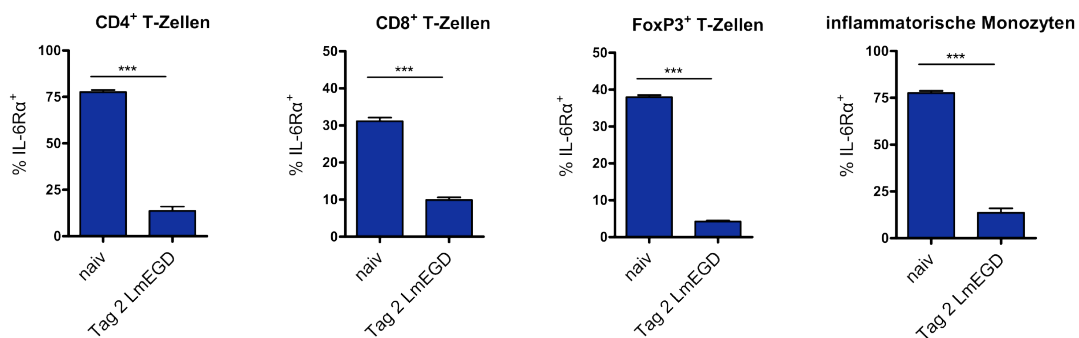
Für die Analyse wurden Wildtyp-Mäuse intravenös mit  $2 \times 10^4$  LmEGD infiziert. Am Tag 2 wurden die Milzen entnommen, die Zellen gereinigt und nach Tabelle 3 gefärbt. Schließlich wurden die Proben mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* konnte auf der Zelloberfläche von allen untersuchten Zellpopulationen eine deutlich verminderte IL-6R $\alpha$  Expression im Vergleich zu den Zellen nicht infizierter Tiere beobachtet werden. In Abbildung 6 werden exemplarisch Milzzellen in einer Punktwolke dargestellt. Abbildung 7 fasst die Ergebnisse zusammen. Die Darstellungen veranschaulichen, dass der Anteil der IL-6R $\alpha$  $^{+}$  CD4 $^{+}$  T-Zellen nach der Infektion von 72,1% auf 17,6% abnahmen. Die Frequenz der IL-6R $\alpha$  $^{+}$  Zellen

innerhalb der  $CD8^+$  T-Zellen sank von 39,5% auf 10,3% und innerhalb der  $FoxP3^+$  T-Zellen von 36,3% auf 4,2% im Vergleich zu Zellen der nicht-infizierten Tiere. Auch die inflammatorischen Monozyten zeigten nach der Infektion eine Abnahme der  $IL-6R\alpha^+$  Zellen auf etwa ein Drittel der Werte naiver Tiere.



**Abbildung 6: IL-6R $\alpha$  Expression.** Die Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$  wurden sowohl in den nicht-infizierten (den Kontrollen wurde PBS injiziert), als auch in den mit  $2 \times 10^4$  LmEGD infizierten Mäusen an Tag 2 analysiert. Die Milzzellen wurden isoliert und mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern markiert. Zur Definition der IL-6R $\alpha^+$  Zellen wurde eine Kontrollfärbung mit einem Isotyp-Antikörper durchgeführt. In den Blots sind jeweils nur die  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $FoxP3^+$  Zellen sowie die inflammatorischen Monozyten als Punktwolke dargestellt. Für die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen wurden durch eine CD44 Färbung zusätzlich der Aktivierungsstatus dargestellt, wobei Zellen mit niedriger CD44 Expression als naive T-Zellen angesehen werden können. Die Zahlen geben den %-Wert der Zellen in den Quadranten an. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.



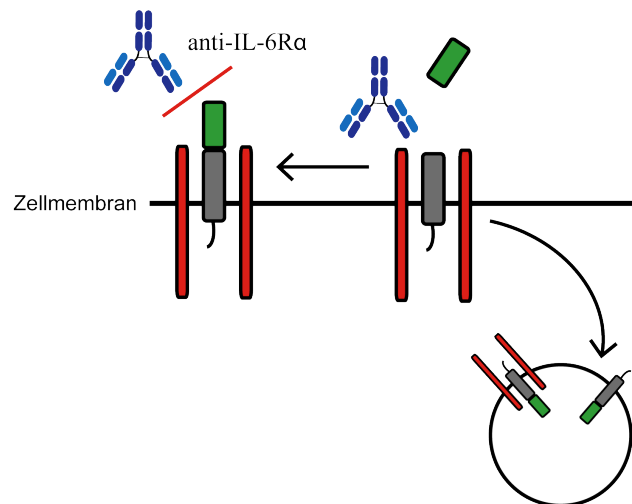
**Abbildung 7: Statische Darstellung der IL-6R $\alpha$  Expression.** Die Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$  auf  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $FoxP3^+$  T-Zellen sowie auf inflammatorischen Monozyten aus nicht-infizierten und infizierten Mäusen wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*\*\* $p < 0,001$ .

Zusammenfassend konnte ein deutlicher Verlust der membranständigen IL-6R $\alpha$  Expression sowohl in den untersuchten T-Lymphozyten als auch in den analysierten myeloiden Zellen an Tag 2 nach der Infektion mit *L. monocytogenes* beobachtet werden. Die Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$  auf Immunzellen der Leber sowie die Ergebnisse an Tag 8 der Infektion (Infektion mit  $1 \times 10^5$  LmOVA) werden hier nicht graphisch dargestellt, entsprachen aber den Verhältnissen in der Milz an Tag 2 der Infektion.

#### 4.1.2. Beruht der Verlust des IL-6R $\alpha$ auf einer durch IL-6 verursachten Antikörperblockade oder Rezeptorinternalisierung?

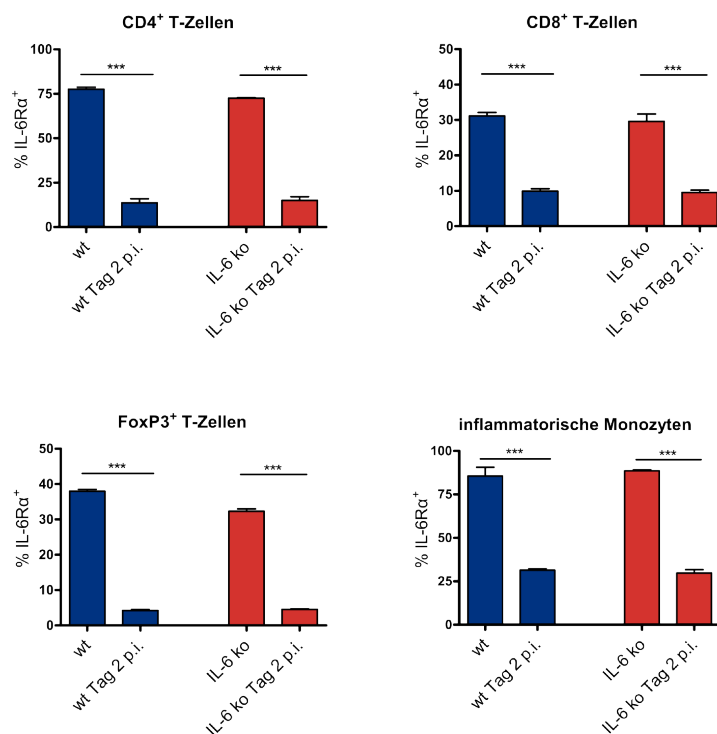
Unsere Beobachtung der verminderten IL-6R $\alpha$  Expression in der Infektion würde die Hypothese unterstützen, dass während der Infektion die Expression und die Abspaltung des IL-6R $\alpha$  verwendet werden, um die IL-6-Wirkung zu regulieren. Dies bedeutet auch, dass Zellen im Verlauf der Infektion in einem unterschiedlichen Ausmaß vom klassischen IL-6-Signalweg und IL-6-Trans-Signalweg abhängig sind. Die Ursachen für den Verlust des membranständigen IL-6R $\alpha$  nach der Infektion können variabel und multifaktoriell sein.

Unsere erste Arbeitshypothese beschäftigt sich mit der Frage, ob der Verlust des IL-6R $\alpha$  durch eine Rezeptorinternalisierung nach Bindung von IL-6 verursacht wird. Weiterhin besteht auch die Möglichkeit, dass IL-6 die Bindung des Antikörpers an den IL-6R $\alpha$  blockiert (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Rezeptorblockade oder Rezeptorinternalisierung durch IL-6.** Die Bindung von IL-6 an dem membranständigen IL-6R $\alpha$  blockiert die Rezeptorbindungsstelle für den Antikörper, daher kann IL-6R $\alpha$  durch die Antikörper nicht detektiert werden (links). Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die IL-6-Bindung an dem membranständigen IL-6R $\alpha$  eine Internalisierung des Rezeptors mit oder ohne gp130 verursacht (rechts).

Um diese Hypothesen zu prüfen, wurden Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse mit  $2 \times 10^4$  LmEGD infiziert. An Tag 2 wurden die Milzen entnommen und die IL-6R $\alpha$  Expression mithilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Eine IL-6R $\alpha$  Expression konnte sowohl in den nicht-infizierten Wildtyp- als auch in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden. Die Analyse ergab weiterhin sowohl auf Zellen von Wildtyp- als auch von IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen eine verminderte Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$  nach der LmEGD Infektion. Abbildung 9 zeigt die graphische Darstellung der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen aus den nicht-infizierten und infizierten Mäusen. Die Daten zeigten ein nahezu identisches Profil der IL-6R $\alpha$  Expression in den Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* für alle untersuchten Zellen. Der Verlust des Rezeptors in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen nach der Infektion bedeutet, dass die verminderte IL-6R $\alpha$  Expression nicht durch eine Antikörperblockade oder Rezeptorinternalisierung verursacht wurde. Somit ist die Ursache weitgehend IL-6 unabhängig.



**Abbildung 9: Vergleich der IL-6R $\alpha$  Oberflächenexpression in Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 2 nach Infektion mit *L. monocytogenes*.** Die membranständige Expression von IL-6R $\alpha$  wurde sowohl in den nicht-infizierten (als Kontrolle wurde PBS injiziert) als auch in den mit  $2 \times 10^4$  LmEGD infizierten Mäusen am Tag 2 analysiert. Die Analyse erfolgte nach dem in Abbildung 6 beschriebenen Schema. Der Anteil der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> Zellen, sowie der inflammatorischen Monozyten in den nicht-infizierten und infizierten Mäusen wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*\*\*p<0,001.



### 4.1.3. Einfluss von P2X7 auf die IL-6R $\alpha$ Expression

Der P2X7 Rezeptor kann entweder direkt durch ATP oder indirekt durch NAD<sup>+</sup> über einen ART-vermittelten Mechanismus aktiviert werden. Wird der Rezeptor aktiviert, so öffnen sich Kationkanäle und es kommt zu einem Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und K<sup>+</sup>-Ausstrom. Die erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration führt zu einer Konformationsänderung und Aktivierung der sogenannten „Sheddase“ ADAM 17 (TACE) und ADAM 10, die bestimmte Moleküle wie CD27 und CD62L proteolytisch von der Zelloberflächen abspalten können.

Die Hypothese lautete daher, dass der Verlust vom membranständigen IL-6R $\alpha$  nach der Infektion durch einen P2X7 vermittelten Mechanismus verursacht wird.

#### 4.1.3.1. *In vitro* Stimulation von Zellen mit NAD<sup>+</sup> und ATP

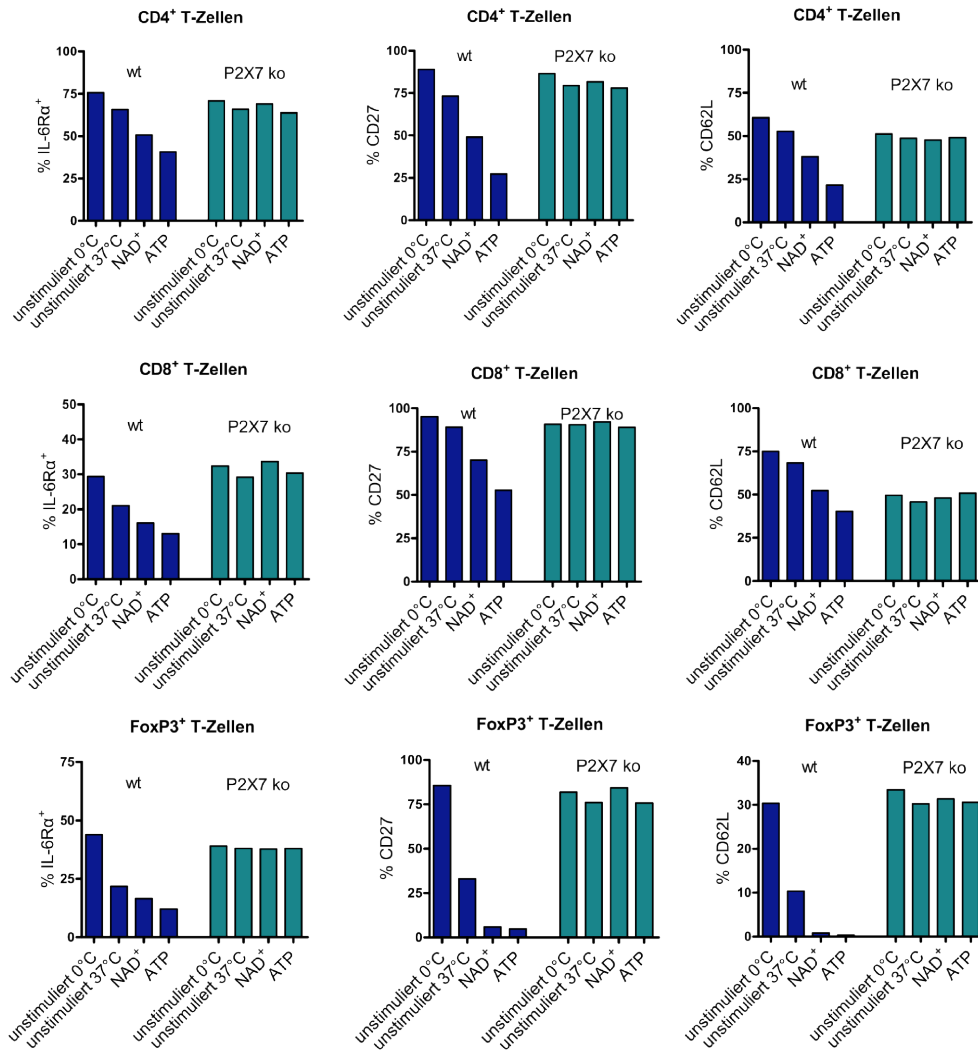
Zuerst wurde die Oberflächenexpression des IL-6R $\alpha$  nach einer Stimulation von Zellen mit NAD<sup>+</sup> und ATP *in vitro* analysiert. Lymphknoten aus Wildtyp und P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen wurden entnommen und daraus die Zellen nach Kapitel 3.2.3.4. isoliert. Die Zellen aus den beiden Gruppen von Mäusen wurden 30 Minuten stimuliert (vgl. Kapitel 3.2.7) und anschließend gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

**Tabelle 4: Fluorochrom-markierte Antikörper II**

Antigen	AK (Klon)	Fluorochrom
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	V450
$\alpha$ -ms CD8	53-6.7	PE-Cy7
$\alpha$ -ms FoxP3	FJK-16S	FITC
$\alpha$ -ms CD44	IM7	APC
$\alpha$ -ms CD62L	MEL-14	APC-Cy7
$\alpha$ -ms CD27	LG.3A10	PerCP
$\alpha$ -ms IL-6R $\alpha$	D7715A7	PE
$\alpha$ -ms IgG1K	eBRG1	PE (Isotyp)
Pac-O		Pacific Orange

Abbildung 10 zeigt die graphische Darstellung der *in vitro* Stimulation. Die Inkubation der Lymphknotenzellen ohne Stimulation bei 0 °C zeigten bei Wildtyp-Mäusen eine IL-6R $\alpha$  Expression von 75% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bereits bei der Erhöhung der Temperatur auf 37 °C konnte eine leichte Verminderung der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf 70% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Eine weitere Reduktion der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durch die Stimulation mit NAD<sup>+</sup> (50%) und ATP (40%) verursacht. Die CD27 Expression der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte eine Erniedrigung von 85% auf 75% bei einer Inkubation der Zellen bei 37 °C und weitere Verminderung nach Stimulation mit NAD<sup>+</sup> und ATP auf 50% bzw. 25%. Die CD62L Expression zeigte auch eine deutliche Verminderung nach Stimulation mit NAD<sup>+</sup> und ATP. Dieser Verlust von IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L unterblieb vollständig in den Zellen aus P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei den CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. In den inflammatorischen Monozyten konnte nach

einer Stimulation mit einer hohen ATP-Konzentration von 3 mM einen verminderten Anteil der IL-6Rα<sup>+</sup> Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die Verminderung von IL-6Rα, CD27 und CD62L durch einen P2X7-abhängigen Weg verursacht werden kann.

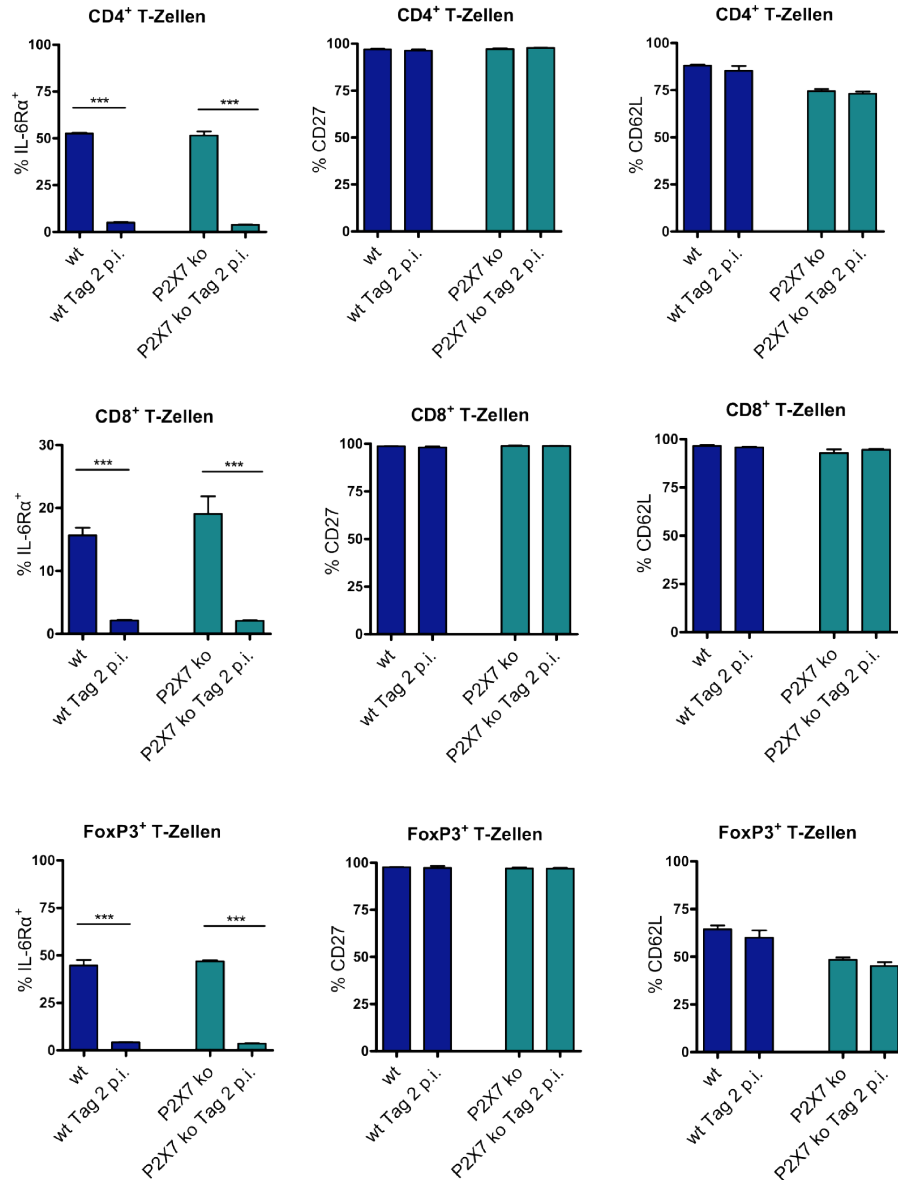


**Abbildung 10: In vitro Shedding.** Lymphknotenzellen von Wildtyp- und P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen wurden isoliert. Die Zellen wurden in vier Ansätzen aufgeteilt und jeweils bei 0°C, 37°C, bei 37°C mit 50 μM NAD<sup>+</sup> oder bei 37°C mit 300 μM ATP für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit fluorochrom-markierten Antikörpern markiert. Die Oberflächenexpression von IL-6Rα, CD27 und CD62L auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen aus Wildtyp- und P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen wird graphisch dargestellt. Dieses Experiment wurde mehrmals mit zwei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

#### 4.1.3.2. IL-6Rα shedding in P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen nach *L. monocytogenes* Infektion

Die *in vitro* Experimente zeigten eine P2X7-abhängige Verminderung der IL-6Rα<sup>+</sup> Zellen, welche eine mögliche Ursache für den Verlust der membranständigen IL-6Rα Expression

nach der Infektion sein könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Wildtyp- und P2X7<sup>-/-</sup> Mäuse mit LmEGD infiziert und an Tag 2 untersucht.



**Abbildung 11: IL-6Rα Expression in Wildtyp- und P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 2 nach der Infektion mit *L. monocytogenes*.** Die membranständige Expression von IL-6Rα wurden sowohl in den nicht-infizierten (als Kontrolle wurde PBS injiziert), als auch in den mit  $2 \times 10^4$  LmEGD infizierten Mäusen am Tag 2 analysiert. Die Milzzellen wurden isoliert und mit entsprechenden Antikörpern markiert. Die Expression von IL-6Rα auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen in den nicht-infizierten und infizierten Mäusen wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*\*\*p<0,001.

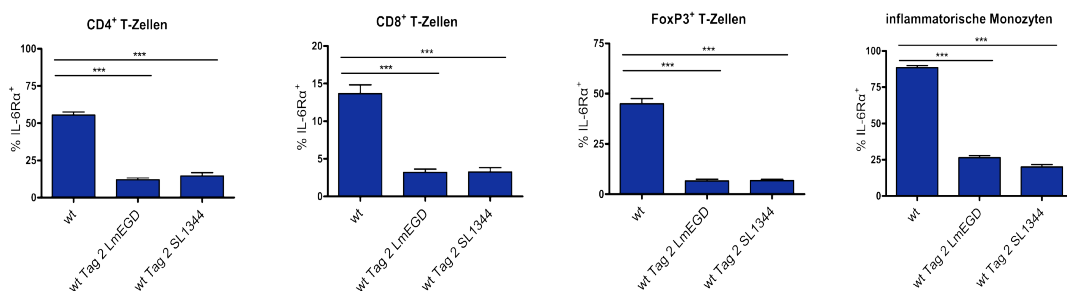
Sowohl Wildtyp- als auch P2X7<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach Kontrollbehandlung mit PBS eine ähnliche Expression des membranständigen IL-6Rα auf allen untersuchten Zellen. Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* wurde sowohl in den Wildtyp- als auch in den P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen eine Verminderung der IL-6Rα<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 50% auf 10% beobachtet.

Erstaunlicherweise zeigten Tiere beider Gruppen keine verminderte Expression von CD27 und CD62L nach der Infektion und es bestand auch keinen Unterschied im Anteil der CD27<sup>+</sup> und CD62L<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwischen den Wildtyp- und P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen. CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen zeigten im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen zwar Unterschiede im Expressionsprofil von IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L, die Veränderung der Expression dieser Moleküle entsprach aber der von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und auch hier verhielten sich Zellen aus Wildtyp- und P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen identisch. (Abbildung 11).

Die Ergebnisse aus den *in vivo* Experimente widersprachen den Erwartungen aus den *in vitro* Experimenten. Obwohl P2X7 *in vitro* ein deutlicher Induktor der IL-6R $\alpha$ -Abspaltung war, erfolgte der Verlust des IL-6R $\alpha$  nach der Infektion mit *L. monocytogenes* unabhängig von P2X7.

#### 4.1.4. IL-6R $\alpha$ Expression nach der Infektion mit *S. typhimurium*

*Listeria monocytogenes* besitzt ein Hämolysin, das als Listeriolysin-O (LLO) bezeichnet wird. Mithilfe von LLO können die Listerien Zellmembranen lysieren, was nach einer Phagozytose das Verlassen des Phagosoms und das Eindringen ins Zytoplasma ermöglicht (Pamer *et al.* 2004). Die entstandenen Poren könnten aber auch einen Calciumeinstrom verursachen und zu einer erhöhten Calciumkonzentration im Zytoplasma führen. Dieser erhöhte Calciumspiegel könnte dann ADAM17 (TACE) aktivieren und dadurch die Abspaltung von Oberflächenmolekülen verursachen. LLO würde über diesen Mechanismus eine P2X7-abhängige Aktivierung von ADAM17 imitieren. Um einen durch LLO-vermittelten Verlust von Oberflächen IL-6R $\alpha$  auszuschließen, wurden Mäuse mit *Salmonella typhimurium* infiziert und an Tag 2 die Expression untersucht. Für *S. typhimurium* ist kein Hämolysin beschrieben.



**Abbildung 12: IL-6R $\alpha$  Expression nach der Infektion mit *L. monocytogenes* und *S. typhimurium*.** Die Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$  wurden sowohl in den nicht-infizierten (als Kontrolle wurde PBS injiziert), als auch in den mit  $2 \times 10^4$  LmEGD oder  $2 \times 10^4$  SL1344 infizierten Wildtyp-Mäusen an Tag 2 analysiert. Die Milzzellen wurden isoliert und mit entsprechenden Antikörpern markiert. Die Expression von IL-6R $\alpha$  auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen sowie inflammatorischen Monozyten in den nicht-infizierten und infizierten Mäusen wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*\*\*p<0,001.

Abbildung 12 zeigt die Expression des IL-6R $\alpha$  an Tag 2 nach der Infektion mit *L. monocytogenes* oder *S. typhimurium* (Stamm SL1344). Im Vergleich zu den nicht-infizierten Mäusen zeigten die mit *L. monocytogenes* infizierten Mäuse eine Verminderung des Anteils der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von etwa 55% auf 13% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Auch die mit *S. typhimurium* infizierten Mäuse wiesen eine niedrigere IL-6R $\alpha$  Expression als die nicht-infizierten Mäuse auf. Ein Unterschied zwischen den mit LmEGD infizierten Mäusen und den mit SL1344 infizierten Mäusen konnte aber nicht beobachtet werden. Auch in den CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen sowie in inflammatorischen Monozyten wurde nach Infektion mit LmEGD und SL1344 ein ähnlicher Verlust der IL-6R $\alpha$  Expression festgestellt. Dies weist darauf hin, dass die verminderte IL-6R $\alpha$  Expression nach der Infektion mit *L. monocytogenes* keine listerien-spezifische bzw. LLO-spezifische Reaktion ist, sondern eher auf eine generelle Antwort auf eine bakterielle Infektion beruht.

#### 4.1.5. Einfluss von ADAM17 auf die Abspaltung von Oberflächenmolekülen

ADAM17 (*a disintegrin and metalloprotease 17*) ist eine Protease, die nach Aktivierung TNF $\alpha$  von der Oberfläche abspaltet. Die Protease wird daher auch als TACE (*TNF $\alpha$ -converting enzyme*) bezeichnet. Neben TNF $\alpha$  werden durch ADAM17 auch andere Proteine wie z.B. CD27 und CD62L von der Zelloberfläche abgespalten. Die Regulation von ADAM17 ist nur teilweise geklärt. Neben einer Vielzahl von deren Mechanismen kann ADAM17 auch über eine Stimulation von P2X7 und eine dadurch verursachte Erhöhung des intrazytoplasmatischen Calciumspiegels aktiviert werden.

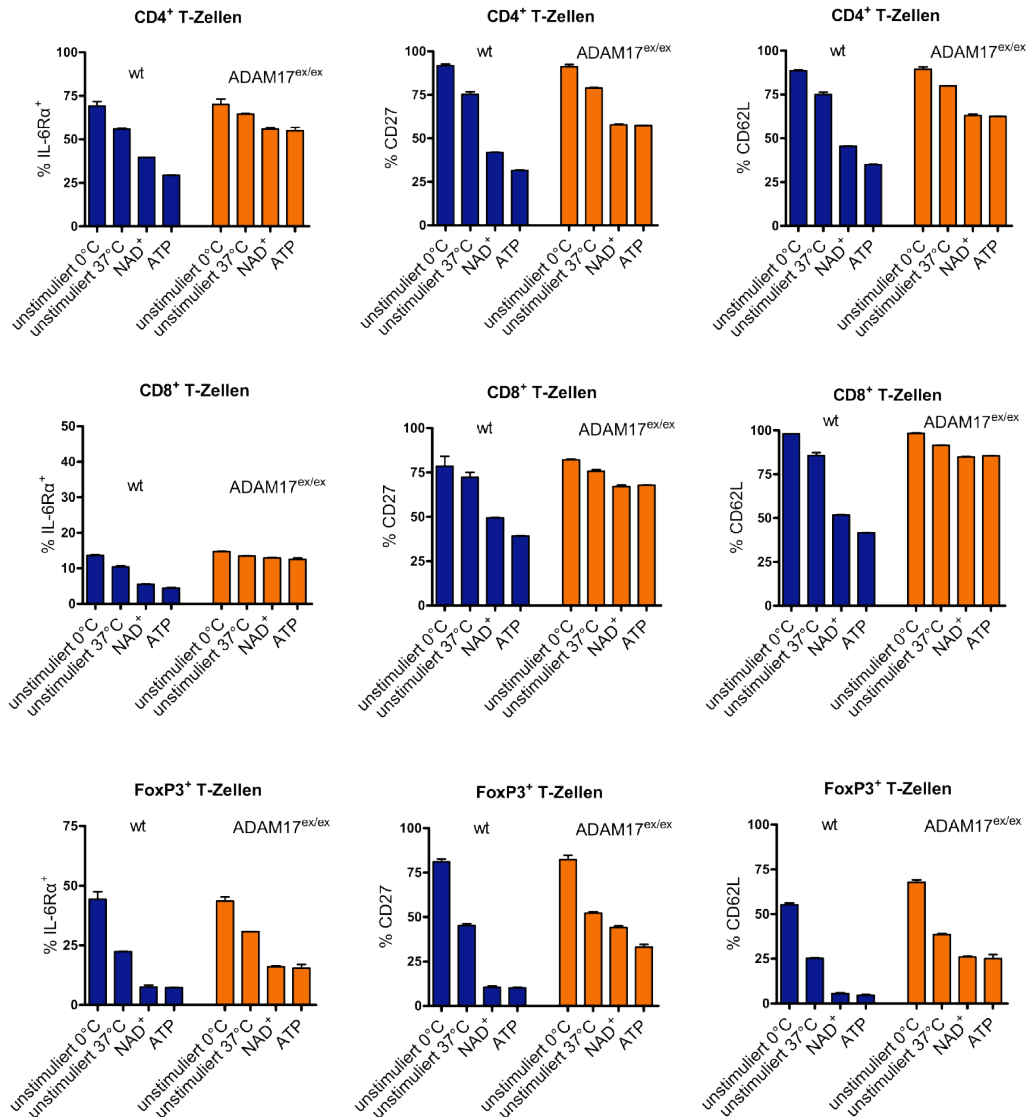
Um die Rolle von ADAM17 *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen, wurden hypomorphe ADAM17 Mäuse (ADAM17<sup>ex/ex</sup>) verwendet. Aufgrund einer Modifikation im *Adam17* Gen, zeigen ADAM17<sup>ex/ex</sup> Tiere eine deutlich verminderte Expression und Aktivität von ADAM17. In den folgenden Experimenten wurde die Veränderung der IL-6R $\alpha$  Expression in diesen Tieren in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Experimenten analysiert.

##### 4.1.5.1. *In vitro* Stimulation mit NAD<sup>+</sup> und ATP

In dem *in vitro* Test wurde die IL-6R $\alpha$  Expression nach Stimulation mit NAD<sup>+</sup> und ATP analysiert. Sowohl NAD<sup>+</sup> als auch ATP aktivieren P2X7 und führen zu einer Aktivierung von ADAM17. Während ATP direkt an P2X7 bindet, wird die Aktivierung von P2X7 durch NAD<sup>+</sup> durch das Enzym ART vermittelt, das sich auf der Oberfläche von T-Zellen befindet. Zuerst wurden Lymphknotenzellen von Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen isoliert und daraus eine Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit NAD<sup>+</sup> oder ATP für 30 Minuten bei 37 °C stimuliert und anschließend nach Tabelle 4 mit fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Abbildung 13 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse der *in vitro* Stimulation. Nach Inkubation ohne Stimulation bei 0 °C zeigten Zellen der Wildtyp-Mäuse eine IL-6R $\alpha$  Expression von 72,5% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bereits bei Erhöhung der Temperatur auf 37 °C

konnte eine Verminderung der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf 54,3% aller CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden. Eine weitere Verminderung der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte durch die Stimulation mit NAD<sup>+</sup> (42,3%) oder ATP (28,5%). Der Anteil der CD27<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen reduzierte sich von 95,2% auf 75% bei einer Inkubation der Zellen bei 37 °C und die Inkubation mit NAD<sup>+</sup> und ATP führte zu einer weiteren Reduktion auf 43,6% bzw. 27,1%.



**Abbildung 13: In vitro Shedding.** Lymphknotenzellen von Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen wurden isoliert, in jeweils vier Ansätzen aufgeteilt und jeweils bei 0°C, 37°C, bei 37°C mit 50  $\mu$ M NAD<sup>+</sup> oder bei 37°C mit 300  $\mu$ M ATP für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt. Die Oberflächenexpression von IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen in Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen wird graphisch dargestellt. Dieses Experiment wurde mehrmals mit zwei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

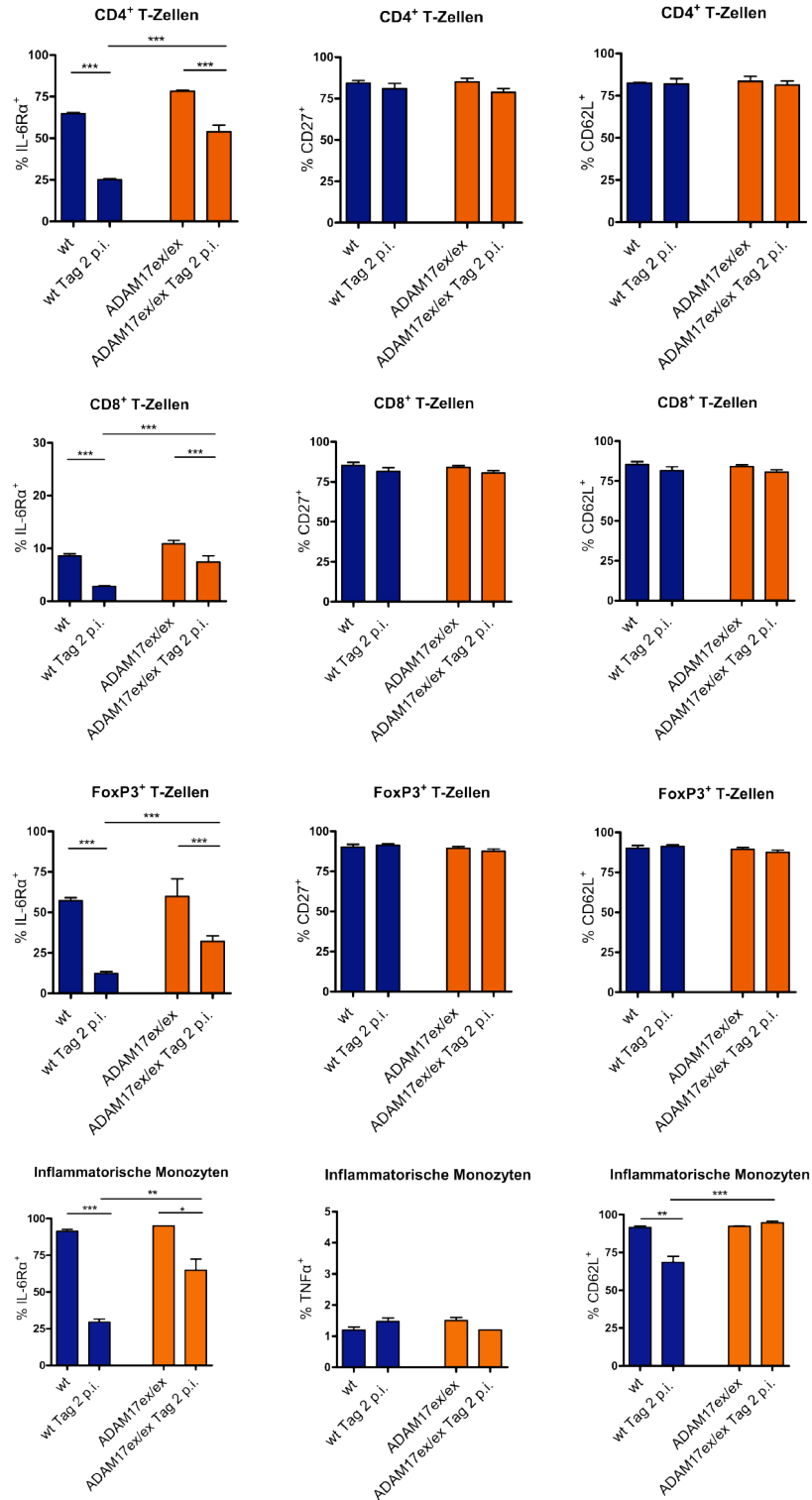
Die CD62L Expression zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion nach Stimulation mit NAD<sup>+</sup> und ATP. In den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen konnte eine Verminderung der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>

T-Zellen von 73,5% auf 69,2% nach Inkubation bei 37 °C beobachtet werden. Eine weitere Verminderung der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde durch NAD<sup>+</sup> (54,3%) und ATP (53,7%) verursacht. Auch die CD27<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen und die CD62L<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine ähnliche Abnahme nach NAD<sup>+</sup> und ATP Stimulation. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen wiesen die ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen aber eine deutlich geringere Abspaltung der untersuchten Oberflächenproteine auf. Ähnliche Ergebnisse wurden in den CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass der Verlust der IL-6R $\alpha$  Expression nach NAD<sup>+</sup> oder ATP Stimulation *in vitro* durch einen ADAM17-abhängigen Mechanismus verursacht wird.

#### 4.1.5.2. IL-6R $\alpha$ shedding in ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen nach *L. monocytogenes*-Infektion

Die *in vitro* Experimente zeigten eine ADAM17-abhängige Verminderung der IL-6R $\alpha$  Expression. ADAM17 könnte daher auch in unseren Infektionsmodellen für die Abspaltung von IL-6R $\alpha$  verantwortlich sein. Um diese Hypothese zu unterstützen, wurden Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen mit LmEGD infiziert und an Tag 2 untersucht.

Die graphische Zusammenfassung der Ergebnisse (Abbildung 14) veranschaulicht, dass durchschnittlich 70% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen von naiven Wildtyp-Mäusen den IL-6R $\alpha$  auf der Zelloberfläche besaßen, während naive ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse eine höhere Expressionsrate des IL-6R $\alpha$  von etwa 77% der CD4<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen. Im Infektionsverlauf veränderte sich diese Expression signifikant. An Tag 2 nach der Infektion mit *L. monocytogenes* fiel der Anteil der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf durchschnittlich 25% in den Wildtyp-Mäusen. In den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen konnte ein Abfall der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 77% auf 50% beobachtet werden, der im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen weniger stark ausgeprägt war. Der IL-6R $\alpha$  wurde in den nicht-infizierten Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen auf durchschnittlich 10% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Der Anteil der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen verringerte sich während der Infektion bei den Wildtyp-Mäusen auf 3,2% und bei den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen auf 7,8%. Die FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen zeigten einen durchschnittlichen Anteil von 60,2% IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen in den Wildtyp-Mäusen und einen Anteil von 62,4% IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen in den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen. Während der Infektion verringerten sich die IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen in den Wildtyp-Mäusen auf etwa 15,0%, während in den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen eine Verminderung der IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen um den Faktor 0,5 auf 33,4% beobachtet wurde. Sowohl in den nicht-infizierten Wildtyp- als auch in den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen waren durchschnittlich 90,0% der inflammatorischen Monozyten IL-6R $\alpha$ -positiv. Die infizierten Wildtyp-Mäuse zeigten eine deutliche Verminderung des Anteils an IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen auf ca. 26,3%, während die infizierten ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse einen geringeren Verlust dieser IL-6R $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen auf 68,5% aufwiesen.



**Abbildung 14: IL-6Rα Expression in Wildtyp und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen am Tag 2 nach der Infektion mit *L. monocytogenes*.** Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse wurden entweder mit  $2 \times 10^4$  LmEGD infiziert oder mit PBS behandelt und an Tag 2 analysiert. Die Milzzellen wurden isoliert und mit entsprechenden Antikörpern markiert. Die Expression von IL-6Rα, CD27 und CD62L wurde auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen und Expression von IL-6Rα, TNFα und CD62L auf inflammatorischen Monozyten analysiert und ist graphisch für die nicht-infizierten und infizierten Mäuse dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



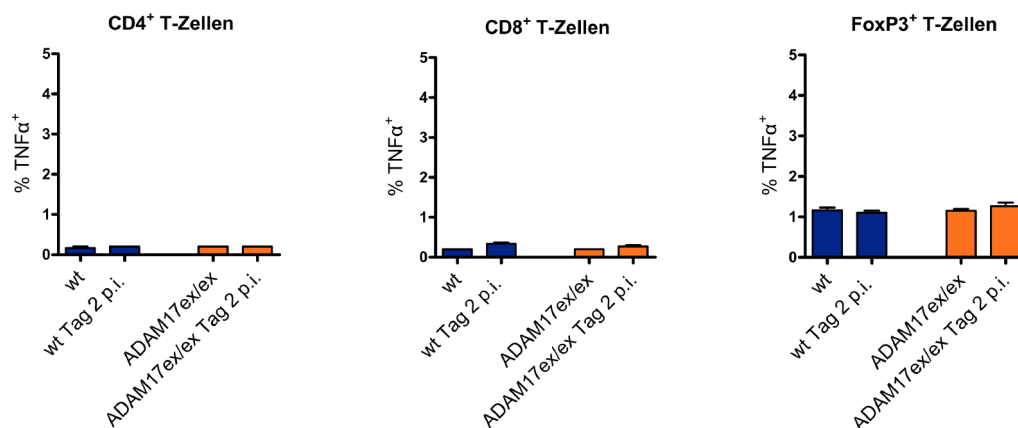
Die Oberflächenexpression von CD27 und CD62L in den untersuchten Zellpopulationen zeigten keinen relevanten Unterschied sowohl zwischen den Wildtyp- und den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen als auch zwischen den nicht-infizierten und infizierten Tieren. Lediglich für CD62L wurde in inflammatorischen Monozyten nach Infektion eine leichte Abnahme in Wildtyp-Mäusen beobachtet, die aber in ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen ausblieb.

Die Ergebnisse aus dem *in vivo* Versuch unterstützten nur teilweise die Beobachtungen aus dem *in vitro* Experiment. Sie zeigten, dass der Verlust des IL-6R $\alpha$  nach der Infektion mit *L. monocytogenes* zumindest teilweise durch einen ADAM17-abhängigen Mechanismus vermittelt wird. *In vitro* induzierte die Aktivierung von P2X7 durch NAD<sup>+</sup> und ATP ein ADAM17-abhängiges Shedding von CD62L, CD27 und IL-6R $\alpha$ . *In vivo* schien dieser Mechanismus aber keine Rolle zu spielen, da wir unabhängig von der ADAM17-Expression kein Shedding von CD27 und CD62L auf T-Zellen beobachteten, d.h. dass *in vivo* wahrscheinlich keine Aktivierung von ADAM17 über P2X7 stattgefunden hat.

#### 4.1.5.3. TNF $\alpha$ Expression in Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen

ADAM17 wird auch als *Tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme* (TACE) bezeichnet, weil die proteolytische Spaltung des pro-TNF $\alpha$  in seiner löslichen Form durch ADAM17 katalysiert werden kann (Black 2002).

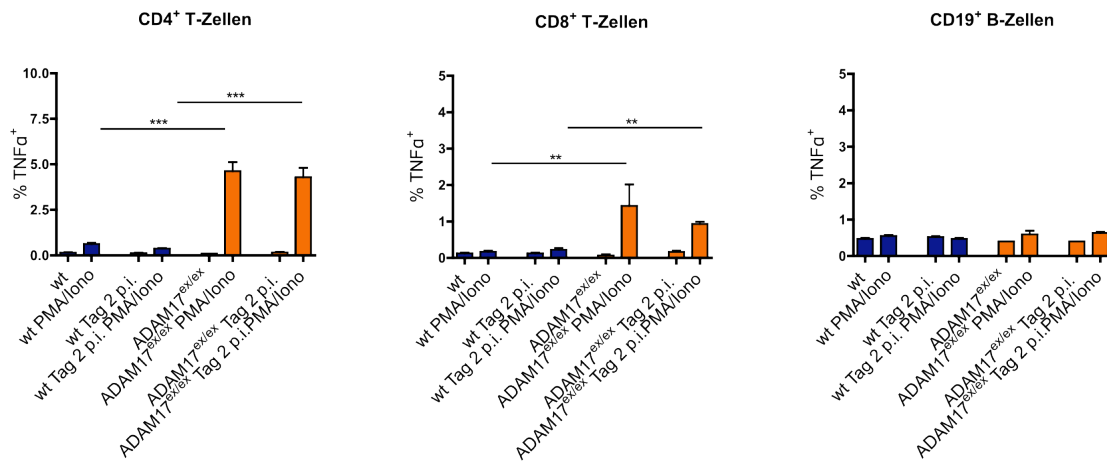
Da ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse nur eine Restaktivität von etwa 5% der normalen ADAM17 Aktivität haben, besteht die Möglichkeit einer verminderten Spaltung von TNF $\alpha$  und als Folge einer Anreicherung von Oberflächen-TNF $\alpha$  auf aktivierten Zellen.



**Abbildung 15: Oberflächen-TNF $\alpha$  Expression in Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen.** Die Oberflächenexpression von TNF $\alpha$  wurde in naiven und mit *L. monocytogenes* infizierten Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen analysiert. Die Milzzellen wurden isoliert und mit entsprechenden Antikörpern markiert. Die Expression von TNF $\alpha$  auf CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

Abbildung 15 zeigte eine sehr geringe Expressionsrate von TNF $\alpha$  auf der Oberfläche von CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$  und FoxP3 $^{+}$  T-Zellen. Es wurden keine Unterschiede sowohl zwischen den Wildtyp- und den ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäusen als auch zwischen den nicht-infizierten und infizierten Mäusen festgestellt. Das Fehlen von membranständigem TNF $\alpha$  könnte durch die Restaktivität von ADAM17 in ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäusen oder durch eine Spaltung durch eine andere Protease, aber auch durch eine geringe Produktion von TNF $\alpha$  in den untersuchten Zellen erklärt werden.

Im Folgenden Ansatz wurden daher Milzzellen aus Wildtyp- und ADAM 17 $^{ex/ex}$  Mäusen isoliert und *in vitro* vier Stunden lang mit PMA/Ionomycin stimuliert und anschließend extrazellulär nachgefärbt. Dieser Stimulus sollte zumindest in einem Teil der CD4 $^{+}$  und CD8 $^{+}$  T-Zellen zur Induktion von TNF $\alpha$  führen.



**Abbildung 16: Oberflächen-TNF $\alpha$  Expression von Wildtyp- und ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäusen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin.** Milzzellen von Wildtyp- und ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäusen (*L. monocytogenes* infiziert und nicht-infiziert) wurden isoliert und mit 10 nM PMA und 1  $\mu$ M Ionomycin bei 37 °C für vier Stunden stimuliert. Die Zellen wurden nach der Stimulation ohne vorherige Permeabilisation mit entsprechenden Antikörpern markiert. Die Oberflächenexpression von TNF $\alpha$  auf CD4 $^{+}$ , CD8 $^{+}$  T-Zellen und CD19 $^{+}$  B-Zellen wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.

Abbildung 16 veranschaulicht, dass durchschnittlich 5% der CD4 $^{+}$  T-Zellen in den ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäusen TNF $\alpha$  auf der Oberfläche exprimierten. Weiterhin zeigten die Zellen aus naiven und infizierten Tieren ein ähnliches Expressionsmuster. Im Vergleich dazu konnte bei CD4 $^{+}$  T-Zellen aus den Wildtyp-Mäusen kaum TNF $\alpha$  auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Auch CD8 $^{+}$  T-Zellen zeigten eine Expressionsrate von 1% bei den ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäusen, während CD8 $^{+}$  T-Zellen der Wildtyp-Mäuse nur die Expressionsrate

der nichtstimulierten Kontrollen zeigten. Bei den B-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen allen vier Gruppen beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Stimulation zeigten, dass Zellen aus ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse eine eingeschränkte Fähigkeit besitzen TNF $\alpha$  von der Zelloberfläche zu spalten.

## 4.2. Einfluss des IL-6 auf die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung nach Infektion

Vor einigen Jahren wurden T<sub>H</sub>17-Zellen als eigenständige Th-Subpopulation identifiziert, die sich sowohl in der Differenzierung als auch in ihren Funktionen von den T<sub>H</sub>1- und T<sub>H</sub>2-Zellen unterscheidet (Harrington *et al.* 2005). T<sub>H</sub>17-Zellen zeichnen sich durch die Produktion von IL-17A und IL-17F aus. Eine weitere Quelle der IL-17A Produktion sind  $\gamma\delta$ T-Zellen. T<sub>H</sub>17-Zellen sind in ihrer Differenzierung von IL-23 abhängig, daher zeigen IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse eine deutlich verminderte Anzahl von dieser T-Zellen. Als Folge sind IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse in Autoimmunmodellen wie der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) oder der Kollagen-induzierten Arthritis (Langrish *et al.* 2005) geschützt.

Neben IL-23 ist die Differenzierung von T<sub>H</sub>17-Zellen aus naiven T-Zellen von weiteren Faktoren abhängig. Für die Differenzierung der T<sub>H</sub>17-Zellen wurden dem *Transforming-Growth Factor*  $\beta$  (TGF $\beta$ ) und IL-6 essentielle Funktionen zugeschrieben. TGF $\beta$  ist aber auch entscheidend für die Differenzierung von induzierbaren regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen). Dies bedeutet, dass IL-6 (und wahrscheinlich noch weitere inflammatorische Zytokine) eine wichtige Rolle für das Gleichgewicht zwischen den pro-inflammatorischen T<sub>H</sub>17-Zellen und den anti-inflammatorischen regulatorischen T-Zellen spielt (Mangan *et al.* 2006).

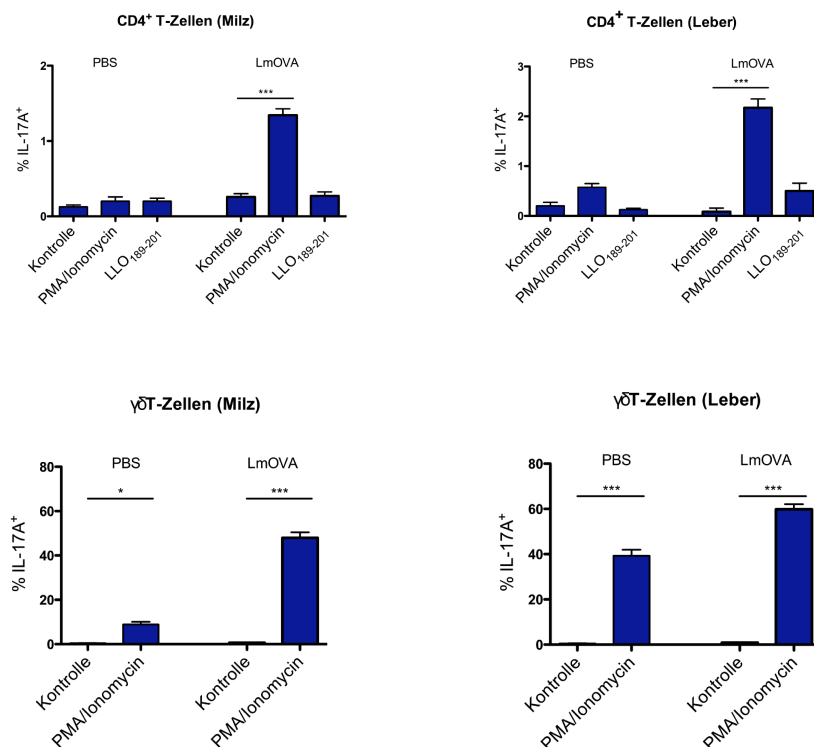
### 4.2.1. Frequenz der IL-17A produzierenden T-Zellen in Milz und Leber nach der Infektion mit *L. monocytogenes*

Um die Rolle von IL-6 für die IL-17A Differenzierung nach der Infektion mit *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurde zuerst die Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen in Wildtyp-Mäusen analysiert. Mäuse wurden entweder als Kontrolltiere mit PBS behandelt oder mit  $1 \times 10^5$  LmOVA infiziert. An Tag 8 wurden die Milz- und Leberzellen isoliert und polyklonal mit PMA plus Ionomycin oder spezifisch mit dem LLO<sub>189-201</sub>-Peptid stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern markiert:

**Tabelle 5: Fluorochrom-markierte Antikörper III**

Antigen	AK (Klon)	Fluorochrom
<b>extrazellulär</b>		
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	PerCP
$\alpha$ -ms CD8	53-6.7	PE-Cy7
$\alpha$ -ms $\gamma\delta$ TCR	GL3	FITC
Pac-O		Pacific Orange
<b>intrazellulär</b>		
$\alpha$ -ms IL-17A	eBio17B7	PE
$\alpha$ -ms TNF $\alpha$	MP6-XT22	PE-Cy7
$\alpha$ -ms IFN $\gamma$	XMG1.2	APC

In den naiven Kontrolltieren führte die Stimulation mit PMA und Ionomycin nur zu einem leichten Anstieg an IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (etwa 0,3%) im Vergleich zu nicht-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Die spezifische Stimulation mit LLO<sub>189-201</sub> hatte, wie zu erwarten, keine Auswirkung auf die Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* konnte eine signifikante Erhöhung der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen bis zu 1,5 % nach Stimulation mit PMA und Ionomycin beobachtet werden. Die spezifische Stimulation mit LLO<sub>189-201</sub> führte aber im Vergleich zu den Kontrollen keiner nennenswerten IL-17A Induktion.



**Abbildung 17 Anteil an IL-17A produzierenden T-Zellen in Wildtyp-Mäusen nach Infektion mit LmOVA.** Wildtyp-Mäusen wurden mit PBS oder mit  $1 \times 10^5$  LmOVA behandelt. Milz- und Leberzellen wurden an Tag 8 isoliert und mit 10 nM PMA und 1  $\mu$ M Ionomycin oder spezifisch mit  $10^{-5}$  M LLO<sub>189-201</sub> bei 37°C für vier Stunden stimuliert. Die Zellen wurden nach der Stimulation mit entsprechenden Antikörpern extra- und intrazellulär markiert. Die Frequenz der IL-17A produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und γδT-Zellen in der Milz und Leber wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

In CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus naiven Mäusen führte die Stimulation mit PMA und Ionomycin im Vergleich zu den Kontrollen ohne Stimulation zu einem Anstieg der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 0,2% auf 0,7%. Nach Infektion stieg die Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen jedoch nach PMA und Ionomycin Behandlung von 0,2% auf 2,1% an. In beiden Gruppen konnten

aber keinen Unterschied zwischen Kontrolle und der Stimulation mit LLO<sub>189-201</sub> beobachtet werden.

Die  $\gamma\delta$ T-Zellen nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin zeigten im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich höhere Frequenzen von IL-17A<sup>+</sup> Zellen. In der Milz stieg in naiven Mäusen der Anteil von IL-17A<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T-Zellen von 10,1% auf 42,3% an. In der naiven Leber befand sich bereits eine Frequenz von 39,5% IL-17A<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T-Zellen. Diese Frequenz erhöhte sich während der Infektion auf 59,4%.

Zusammenfassend veranschaulicht Abbildung 17, dass sowohl die CD4<sup>+</sup> T-Zellen als auch die  $\gamma\delta$ T-Zellen IL-17A produzieren können und beide Zellpopulationen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* eine deutlich erhöhte Frequenz an IL-17A<sup>+</sup> Zellen zeigten.

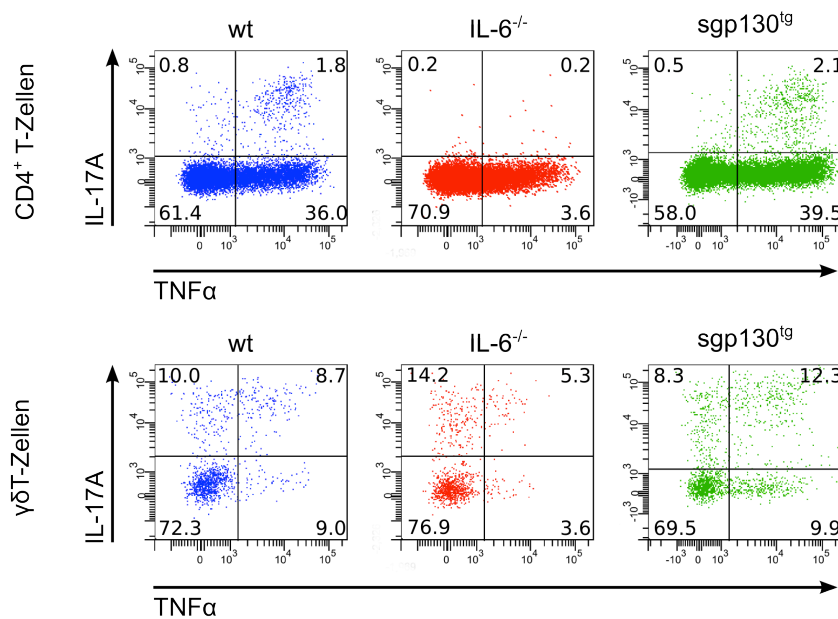
#### 4.2.2. Vergleich der IL-17A Produktion in Wildtyp-, IL-6<sup>-/-</sup> und sgp130<sup>tg</sup> Mäusen in Milz und Leber

Da IL-6 eine essentielle Rolle bei der T<sub>H</sub>17-Differenzierung spielt, ergibt sich die Frage, ob und in welchem Umfang die Entwicklung von IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen in IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen beeinträchtigt ist. IL-6 kann sowohl über den membranständigen IL-6R $\alpha$  erkannt werden (klassischer Signalweg) oder an den löslichen sIL-6R $\alpha$  binden. Der IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Komplex ist dann in der Lage an gp130 auf der Zelloberfläche zu binden und dadurch auch ein IL-6-Signal zu vermitteln (IL-6-Trans-Signalweg). Zur Unterscheidung zwischen den IL-6-Signalwegen wurden sgp130<sup>tg</sup> Mäuse verwendet, die ein lösliches gp130 Protein (sgp130) Transgen tragen. Dieses sgp130 besitzt die Fähigkeit den IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Komplex aufzufangen und diesen somit zu neutralisieren, es beeinträchtigt aber nicht den klassischen IL-6-Signalweg. Im Gegensatz zu IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen mit einer globalen Blockade des IL-6-Signalwegs ist in den sgp130<sup>tg</sup> Mäusen selektiv der IL-6-Trans-Signalweg unterbunden.

Wildtyp-, IL-6<sup>-/-</sup> und sgp130<sup>tg</sup> Mäusen wurden mit PBS oder mit  $1 \times 10^5$  LmOVA behandelt und an Tag 8 analysiert. Beispiele für die Analyse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Abbildung 19 fasst die statistische Analyse der IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen in den verschiedenen Mausgruppen zusammen. Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* konnte im Gegensatz zu den mit PBS behandelten Kontrolltieren ein Anstieg der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen durchschnittlich von 0,2% auf 2,4% beobachtet werden. Die IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach der Infektion im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nur einen Anteil von 0,8% der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen, was etwa einem Drittel der Frequenz der Wildtyp-Mäuse entsprach. Bei den sgp130<sup>tg</sup> Mäusen konnte nach der Infektion ein Anstieg der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 0,4% auf 2,5% beobachtet werden. IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen fanden sich hier daher in einer zu den Wildtyp-Mäusen vergleichbaren Frequenz.

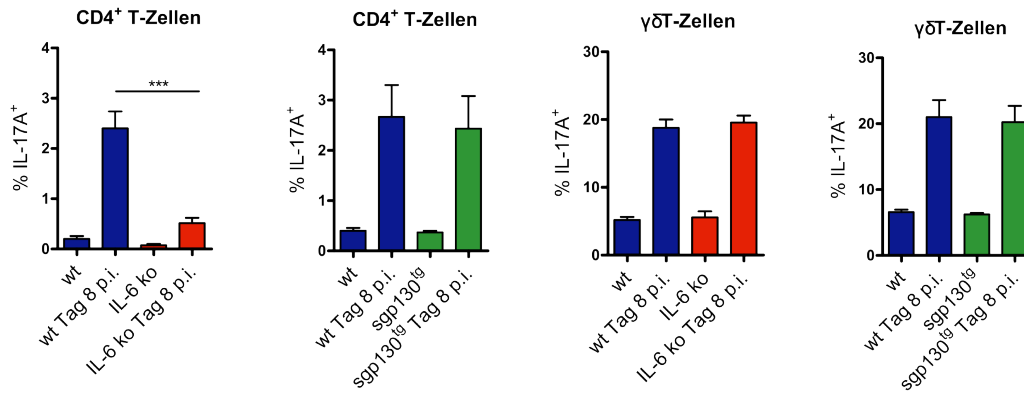
Die  $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten in allen untersuchten Gruppen eine höhere IL-17A-Produktion als die  $CD4^+$  T-Zellen. Durchschnittlich konnte bei den Wildtyp-Mäusen ein Anteil der  $IL-17A^+$   $\gamma\delta$ T-Zellen von 6,7% beobachtet werden, welcher sich während des Infektionsverlaufs auf knapp 20% erhöhte. Auch die  $IL-6^{-/-}$  Mäuse zeigten einen Anstieg der  $IL-17A^+$   $\gamma\delta$ T-Zellen von 7,2% auf 20,4% nach der Infektion. Ein ähnlicher Verlauf eines Anstiegs von 7,6% auf 19,8% konnte schließlich bei den  $sgp130^{tg}$  Mäusen beobachtet werden. In der Leber ergaben sich sowohl für die  $CD4^+$  T-Zellen als auch für die  $\gamma\delta$ T-Zellen in allen Mausgruppen ähnliche IL-17A-Expressionsprofile wie in der Milz (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 18: Frequenz der  $IL-17A^+$  T-Zellen ( $CD4^+$  und  $\gamma\delta$ T-Zellen) in Wildtyp-,  $IL-6^{-/-}$  und  $sgp130^{tg}$  Mäusen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* in der Milz.** Die Frequenz der  $IL-17A^+$  T-Zellen wurde sowohl in den nicht-infizierten (den Kontrollen wurde PBS injiziert) als auch in den mit  $1 \times 10^5$  LmOVA infizierten Mäusen an Tag 8 analysiert. Die Milzzellen wurden isoliert, mit PMA/Ionomycin stimuliert und mit entsprechenden Antikörpern markiert. In den Blots sind beispielhaft jeweils nur die  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$ T-Zellen aus den infizierten Tieren nach der Stimulation als Punktwolke dargestellt. Die Zahlen geben den %-Wert der Zellen in den Quadranten an. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Es handelt sich hier um zwei Versuchsreihen (wt vs.  $IL-6^{-/-}$  und wt vs.  $sgp130^{tg}$ ).

Insgesamt weisen die Ergebnisse darauf hin, dass IL-6 eine wichtige Rolle bei der  $T_H17$ -Differenzierung nach der Infektion mit *L. monocytogenes* spielt. Der signifikant verminderte Anstieg von  $IL-17A^+$   $CD4^+$  T-Zellen in den  $IL-6^{-/-}$  Mäusen und die zu den Wildtyp vergleichbare Frequenz der  $IL-17A^+$   $CD4^+$  T-Zellen in den  $sgp130^{tg}$  Mäusen deutet darauf hin, dass der Einfluss von IL-6 auf die  $T_H17$ -Differenzierung nur vom klassischen, aber nicht

vom IL-6-Trans-Signalweg abhängig ist. Die ähnlichen Frequenzen der IL-17A<sup>+</sup>  $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen als auch in den sgp130<sup>tg</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren zeigen, dass die IL-17A-Produktion der  $\gamma\delta$ T-Zellen weitgehend IL-6 unabhängig ist.



**Abbildung 19: Statistische Darstellung der Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz.** Die Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zellen aus nicht-infizierten und infizierten Mäusen nach *in vitro* Stimulation mit PMA/Ionomycin wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Es handelt sich hier um zwei Versuchsreihen (wt vs. IL-6<sup>-/-</sup> und wt vs. sgp130<sup>tg</sup>). Diese Experimente wurden mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*\*\*p<0,001.

#### 4.2.3. Frequenz der IL-17A produzierenden T-Zellen im Darm nach der Infektion mit *S. typhimurium*

Das darmassoziierte lymphatische System (gut associated lymphoid tissue, GALT) gehört zu dem mukosalen Immunsystem und spielt bei der Abwehr gegen pathogene Keime eine wichtige Rolle. Dieses Immunsystem kann in zwei Einheiten aufgeteilt werden. Die erste Einheit umfasst lymphatische Gewebe, z.B. die Peyersche Plaques, und ist wichtig für den initialen Kontakt mit Antigenen und der Induktion der Immunantwort. Die zweite Einheit ist verantwortlich für "Effektorfunktionen" im Darmgewebe. Hierzu gehören die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und die Lamina propria Lymphozyten (LPL) (Brandtzaeg *et al.* 2008). Das Darmepithel besitzt im Gegensatz zu sekundären lymphatischen Organen wie Milz oder Lymphknoten eine deutlich anders zusammengesetzte T-Zellpopulation. Die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) sind hauptsächlich CD8<sup>+</sup> (> 80%). Im Gegensatz zu konventionellen CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die ein CD8-Heterodimer aus einer  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette (CD8 $\alpha\beta$ ) auf der Oberfläche tragen, besitzt die Mehrheit der CD8<sup>+</sup> IEL ein CD8-Homodimer aus zwei  $\alpha$ -Ketten (CD8 $\alpha\alpha$ ). Außerdem ist ein großer Teil der CD8<sup>+</sup> IEL auch  $\gamma\delta$ TZR-positiv (Ishikawa *et al.* 2007). Diese CD8<sup>+</sup> T-Zellen werden auch als

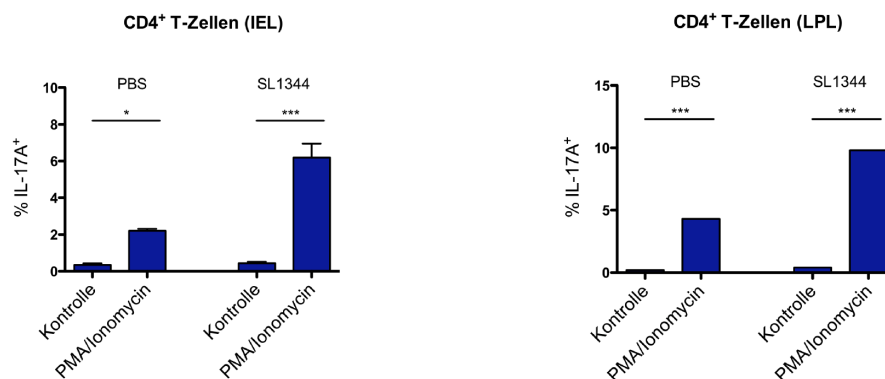


unkonventionelle T-Zellen bezeichnet. Die genaue Funktion dieser  $\gamma\delta$ T-Zellen ist jedoch noch unklar. Nur 5-10% der IEL sind CD4-positiv. Die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen in der Lamina propria entspricht eher der Zusammensetzung der T-Zellpopulationen in sekundären lymphatischen Organen. Interessanterweise besitzen IEL und LPL eine deutlich höhere Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen als Milz und Leber und bieten daher eine bessere Möglichkeit zur Analyse der IL-17A produzierenden Zellen. (Mayuzumi et al. 2010).

Um die IL-17A Differenzierung nach einer Infektion zu untersuchen, wurden Mäuse oral mit Streptomycin behandelt und erhielten einen Tag später entweder PBS (Kontrolltiere) oder  $1 \times 10^{10}$  Salmonellen des SL1344-Stamms. Durch die Gabe von Streptomycin entsteht eine Nische für die Streptomycin-resistenten Salmonellen, die sich daraufhin im Darm vermehren können und eine schwere Entzündung hervorrufen. An Tag 3 wurden die IEL und LPL isoliert und nach *in vitro* Stimulation mit entsprechenden Antikörpern (siehe Tabelle 5) markiert.

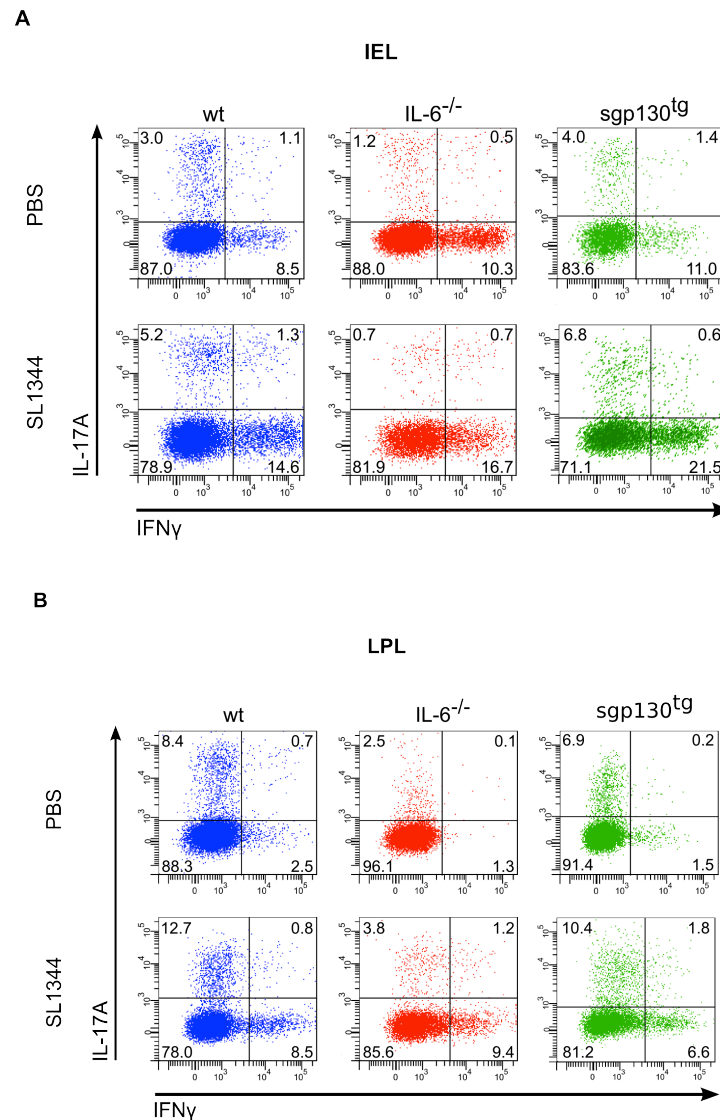
Die IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen der IEL zeigten bei den PBS-Mäusen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin eine Frequenz von 2,4%, die nach der Infektion mit *S. typhimurium* auf knapp 6,0% anstieg. Bei den LPL konnte eine deutlich höhere Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu den IEL beobachtet werden. Der Anteil der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte im Infektionsverlauf einen Anstieg um den Faktor 2 von 4,8% auf 9,8%.

Insgesamt veranschaulicht Abbildung 20, dass im Darm deutlich höhere Frequenzen an IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen als in der Milz vorliegen und dass die *S. typhimurium*-Infektion zu einem weiteren Anstieg dieser Frequenzen führt.



**Abbildung 20: Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in IEL und LPL von Wildtyp-Mäusen nach einer Infektion mit SL1344.** Wildtyp-Mäuse wurden oral mit 4 mg Streptomycin pro Maus behandelt und nach einem Tag oral mit PBS behandelt oder mit  $1 \times 10^{10}$  SL1344 infiziert. An Tag 3 nach der Infektion wurden IEL und LPL isoliert und mit 10 nM PMA und 1  $\mu$ M Ionomycin bei 37 °C für vier Stunden stimuliert. Die Zellen wurden nach der Stimulation mit entsprechenden Antikörpern extra- und intrazellulär markiert. Die Frequenz der IL-17A produzierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den IEL und LPL ist graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. \*p<0,05, \*\*\*p<0,001.

#### 4.2.4. Vergleich der IL-17A Produktion im Darm von Wildtyp, IL-6<sup>-/-</sup> und sgp130<sup>tg</sup> Mäusen

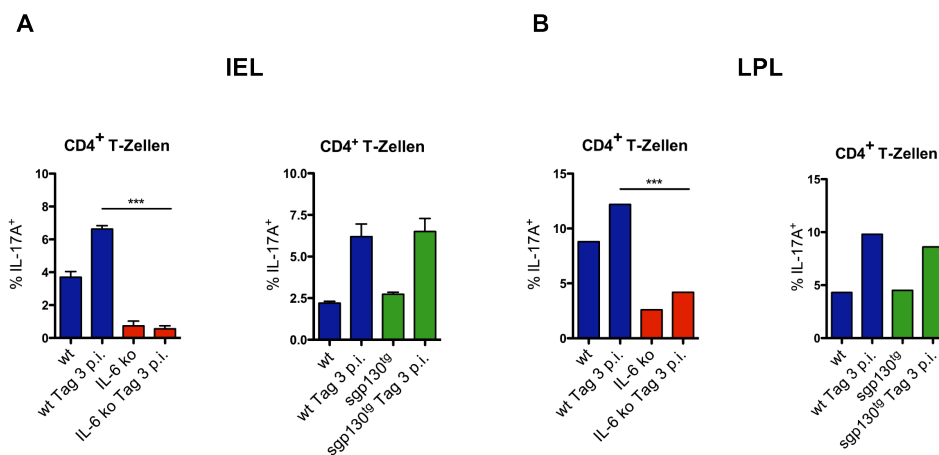


**Abbildung 21: Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm von Wildtyp-, IL-6<sup>-/-</sup> und sgp130<sup>tg</sup> Mäusen nach der Infektion mit *S. typhimurium*.** Die Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen wurden sowohl in den nicht-infizierten (die Kontrollen wurden mit PBS behandelt) als auch in den mit  $1 \times 10^{10}$  SL1344 infizierten Mäusen an Tag 3 analysiert. Ein Tag vor der Infektion erhielten die Mäuse 4 mg Streptomycin pro Maus über eine gastrale Injektion. Die IEL und LPL wurden isoliert, mit PMA/Ionomycin stimuliert und mit entsprechenden Antikörpern markiert. In den Blots sind beispielhaft jeweils nur CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus den nicht-infizierten und infizierten Tieren nach der Stimulation als Punktwolke dargestellt. (A: IEL, B: LPL) Die Zahlen geben den %-Wert der Zellen in den Quadranten an. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Es handelt sich hier um zwei Versuchsreihen (wt vs. IL-6<sup>-/-</sup> und wt vs. sgp130<sup>tg</sup>).

Nachdem gezeigt wurden, dass die Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Darm von Wildtyp-Mäusen nach Infektion mit SL1344 signifikant anstieg, wurde untersucht, ob diese

IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Darms ebenfalls von IL-6 abhängig waren und welche Bedeutung der IL-6-Trans-Signalweg für diese Zellen hatte. Hierfür wurden Wildtyp-, IL-6<sup>-/-</sup> und sgp130<sup>tg</sup> Mäusen mit PBS oder mit 1×10<sup>10</sup> SL1344 durch eine Magensonde behandelt und an Tag 3 analysiert. Am Tag vor der Infektion wurden die Mäuse mit Streptomycin behandelt, um eine Nische für die Salmonellen zu schaffen.

Abbildung 22 stellt die statistische Analyse der IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen in den verschiedenen Mausgruppen dar. Nach der Infektion mit *S. typhimurium* konnte im Gegensatz zu den mit PBS behandelten Kontrolltieren ein Anstieg der Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den IEL durchschnittlich von 3,8% auf 7,5% beobachtet werden. Die IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten innerhalb der IEL unabhängig von der Infektion nur einen Anteil von 1,0% an IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Bei den sgp130<sup>tg</sup> Mäusen konnte nach der Infektion ein Anstieg der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 2,6% auf 6,8% beobachtet werden. Die Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen entsprach also der der Wildtyp-Mäuse.



**Abbildung 22: Statistische Darstellung der Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> T-Zellen aus IEL (A) und LPL (B) des Darms.** Die Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus nicht-infizierten und infizierten Mäusen nach der Stimulation mit PMA/Ionomycin wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Es handelt sich hier um zwei Versuchsreihen (wt vs. IL-6<sup>-/-</sup> und wt vs. sgp130<sup>tg</sup>). \*\*\*p<0,001

Die LPL zeigten generell eine erhöhte Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach der Infektion stieg der Anteil im Durchschnitt von 8,9% auf 12,1% in den Wildtyp-Tieren. Im Gegensatz dazu konnte bei den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen nur ein geringer Anstieg von 3,3% auf 4,5% beobachtet werden. Im Vergleich zwischen Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen konnte sowohl zwischen den PBS-Tieren als auch zwischen den infizierten Tieren ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen zeigten die sgp130<sup>tg</sup>

Mäuse ein ähnliches IL-17A-Profil. Die Frequenz der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen stieg von 4,8% auf 8,9% nach der Infektion mit *S. typhimurium*.

Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die zuvor aus Milz und Leber gewonnenen Daten und deuten darauf hin, dass die T<sub>H</sub>17-Differenzierung in IEL und LPL des Darms sowohl im gesunden Zustand als auch nach Infektion mit *S. typhimurium* abhängig von IL-6 ist. Die verminderte Frequenz von IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen und das ähnliche Profil für IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den sgp130<sup>tg</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp bestätigt die Arbeitshypothese, dass der Einfluss des IL-6 auf die T<sub>H</sub>17 - Differenzierung weitgehend von dem klassischen IL-6-Signalweg abhängig ist.

### 4.3. Die Rolle des IL-6 für die spezifische T-Zellantwort

IL-6 spielt eine Rolle in der angeborenen Immunantwort gegen *L. monocytogenes* und in der Differenzierung der T<sub>H</sub>17-Zellen. Entscheidend für die Kontrolle von *L. monocytogenes* sind aber T<sub>H</sub>1-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In diesem Teil wurde daher untersucht, welchen Einfluss IL-6 auf die spezifische T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* hat.

#### 4.3.1. Die Änderung der Zellpopulationen nach der Infektion

Die Infektion der Maus mit *L. monocytogenes* führt zu einer Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit einer deutlichen Vergrößerung der beiden T-Zellpopulationen in den infizierten Organen einhergeht. Im ersten Satz an Experimenten wurde daher die Zahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Leber von infizierten Mäusen ermittelt. Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit  $1 \times 10^5$  LmOVA infiziert und an Tag 8 Milz- und Leberzellen mit folgenden Antikörpern markiert und analysiert:

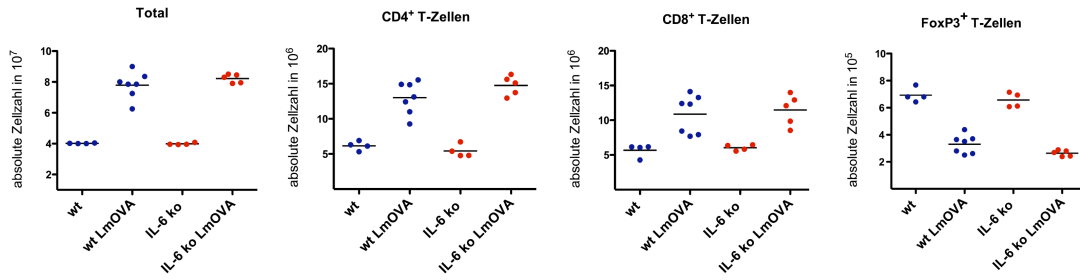
**Tabelle 6: Fluorochrom-markierte Antikörper IV**

Antigen	AK (Klon)	Fluorochrom
<b>extrazellulär</b>		
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	PerCP
$\alpha$ -ms CD8	53-6.7	PE-Cy7
$\alpha$ -ms FoxP3	FJK-16S	FITC
Pac-O		Pacific Orange

Abbildungen 23 und 24 veranschaulichen die Zellzahlen der verschiedenen T-Zellpopulationen nach der Infektion mit *L. monocytogenes*. Abbildung 23 stellte die absoluten Zellzahlen der Milz sowohl in den Wildtyp- als auch in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen mit und ohne Infektion dar. Die mit PBS behandelten Kontrolltieren hatten in beiden Mausgruppen etwa  $4 \times 10^7$  Milzzellen. Im Infektionsverlauf stieg die Zellzahl in den Wildtyp-Tieren durchschnittlich auf  $7,8 \times 10^7$  und in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen auf  $8,1 \times 10^7$  Zellen an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen konnte nicht festgestellt werden.

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen stiegen in den Wildtyp-Mäusen von  $6,2 \times 10^6$  auf  $13,2 \times 10^6$  Zellen an. Die IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten einen ähnlichen Anstieg von  $5,3 \times 10^6$  auf  $15 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz. Auch für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte ein ähnlicher Anstieg der Zellzahl sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden. Ein Unterschied zwischen den Mausgruppen bestand ebenfalls nicht.

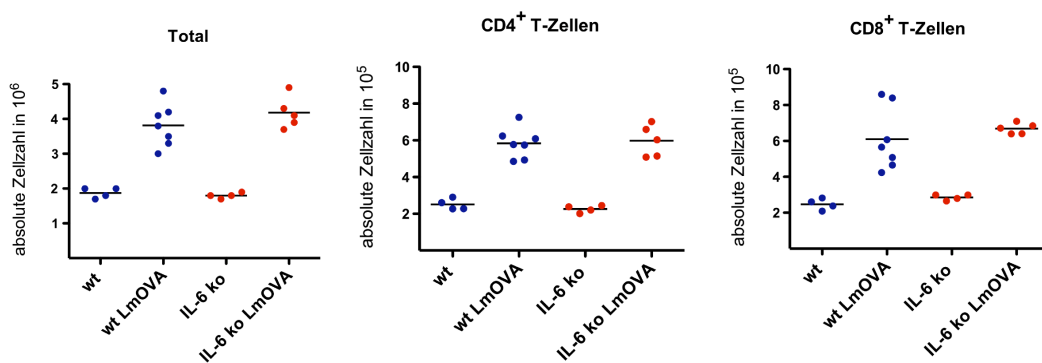
Im Gegensatz zu den konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich für die CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nach der Infektion eine Abnahme der Zellzahl von etwa  $7 \times 10^5$  auf  $3,5 \times 10^5$  in den Wildtyp-Mäusen. Eine vergleichbare Reduktion der FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen war auch in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* zu beobachten.



**Abbildung 23** Totale Zellzahl und Zellzahlen der T-Zellpopulationen in der Milz nach Infektion mit LmOVA. Die totale Zellzahl und die Zellzahlen für CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen wurden sowohl in nicht-infizierten (den Kontrollen wurde PBS injiziert) als auch in mit  $1 \times 10^5$  LmOVA infizierten Mäusen an Tag 8 bestimmt. Die Milzzellen wurden isoliert mit entsprechenden Antikörpern markiert. Die Zellzahlen werden hier graphisch dargestellt. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

Die Zellzahlen in der Leber wurden in Abbildung 24 zusammengefasst. Im Vergleich zur Milz konnten aus der Leber nur eine deutlich geringere Zahl an Leukozyten isoliert werden. Aber auch in der Leber konnte für beiden Mausgruppen einen Anstieg der Leukozytenzahl nach der Infektion mit *L. monocytogenes* von durchschnittlich  $2 \times 10^6$  auf  $4 \times 10^6$  Zellen festgestellt werden. Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte nicht beobachtet werden.

Die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten sowohl in den Wildtyp-Mäusen als auch in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen etwa eine Verdreifachung in ihrer Anzahl von durchschnittlich  $2 \times 10^5$  auf  $6 \times 10^5$  Zellen nach der Infektion.



**Abbildung 24** Totale Zellzahl und Zellzahlen der T-Zellpopulationen in der Leber nach Infektion mit LmOVA. Die totale Zellzahl und die Zellzahlen für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden sowohl in nicht-infizierten (den Kontrollen wurde PBS injiziert) als auch in mit  $1 \times 10^5$  LmOVA infizierten Mäusen an Tag 8 bestimmt. Die Leberzellen wurden isoliert mit entsprechenden Antikörpern markiert. Die Zellzahlen werden hier graphisch dargestellt. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Infektion mit *L. monocytogenes* eine Akkumulation von Immunzellen einschließlich der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der späten Phase der Immunantwort verursacht. Der direkte Vergleich zwischen den beiden Mausgruppen ergab, dass IL-6 scheinbar keinen Einfluss auf diese Akkumulation hatte. Auch die Anzahl der FoxP3<sup>+</sup> T-Zellen verminderte sich in beiden Mausgruppen im Verlauf der Infektion ähnlich. Dies ist interessant, da IL-6 als Kontrollelement in der Reifung von T-Zellen zu T<sub>H</sub>17-Zellen versus FoxP3-Zellen beschrieben wurde. Scheinbar können andere Faktoren diese Funktion von IL-6 während der *L. monocytogenes*-Infektion ersetzen.

#### 4.3.2. Die spezifische T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes*

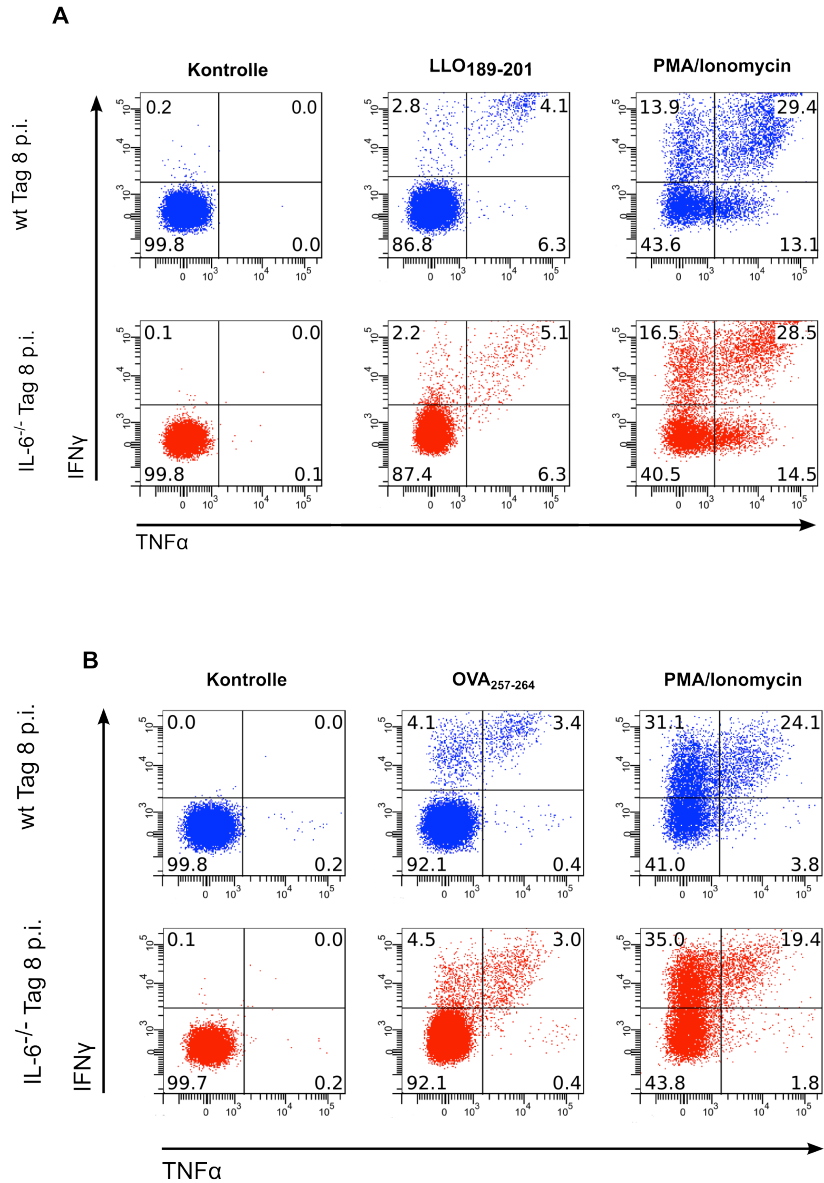
Um die gegen *L. monocytogenes* gerichtete T-Zellantwort näher zu untersuchen, wurde die Anzahl der listerien-spezifischen T-Zellen ermittelt. Hierzu wurden Zellen der infizierten Mäuse mit immundominanten Listerienpeptiden stimuliert. In diesen Zellen wurden dann mit intrazellulärer Zytokinfärbung TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  gemessen. Da auf die immundominanten Peptide nur T-Zellen reagieren sollten, die im Verlauf der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* entstanden sind, erlaubt die Bestimmung der Anzahl dieser Zellen direkte Aussagen zur Stärke der T-Zellantwort. Zur Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde das Peptid LLO<sub>189-201</sub> verwendet. Für Mäuse auf dem C57BL/6-Hintergrund wurde bisher kein immundominantes Peptid für CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben. Daher wurden für diese Experimente Ovalbumin-rekombinante Listerien (LmOVA) verwendet. Ovalbumin enthält ein immundominantes Epitop (OVA<sub>257-264</sub>) für CD8<sup>+</sup> T-Zellen in C57BL/6 Mäusen. Die Ermittlung der OVA<sub>257-264</sub>-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erlaubt daher Aussagen zur Stärke der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort. Zusätzlich wurden die T-Zellen polyklonal mit PMA/Ionomycin stimuliert, um ein generelles Differenzierungsprofil der T-Zellen zu bestimmen.

Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen wurden mit  $1 \times 10^5$  LmOVA infiziert und an Tag 8 analysiert. Die Milz- und Leberzellen wurden isoliert und 4 Stunden mit PMA/Ionomycin oder den Peptiden *in vitro* stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit folgenden Antikörpern markiert und analysiert:

**Tabelle 7 Fluorochrom-markierte Antikörper V**

Antigen	AK (Klon)	Fluorochrom
<b>extrazellulär</b>		
$\alpha$ -ms CD4	RM4-5	PerCP
$\alpha$ -ms CD8	53-6.7	PE-Cy7
Pac-O		Pacific Orange
<b>intrazellulär</b>		
$\alpha$ -ms TNF $\alpha$	MP6-XT22	PE-Cy7
$\alpha$ -ms IFN $\gamma$	XMG1.2	APC

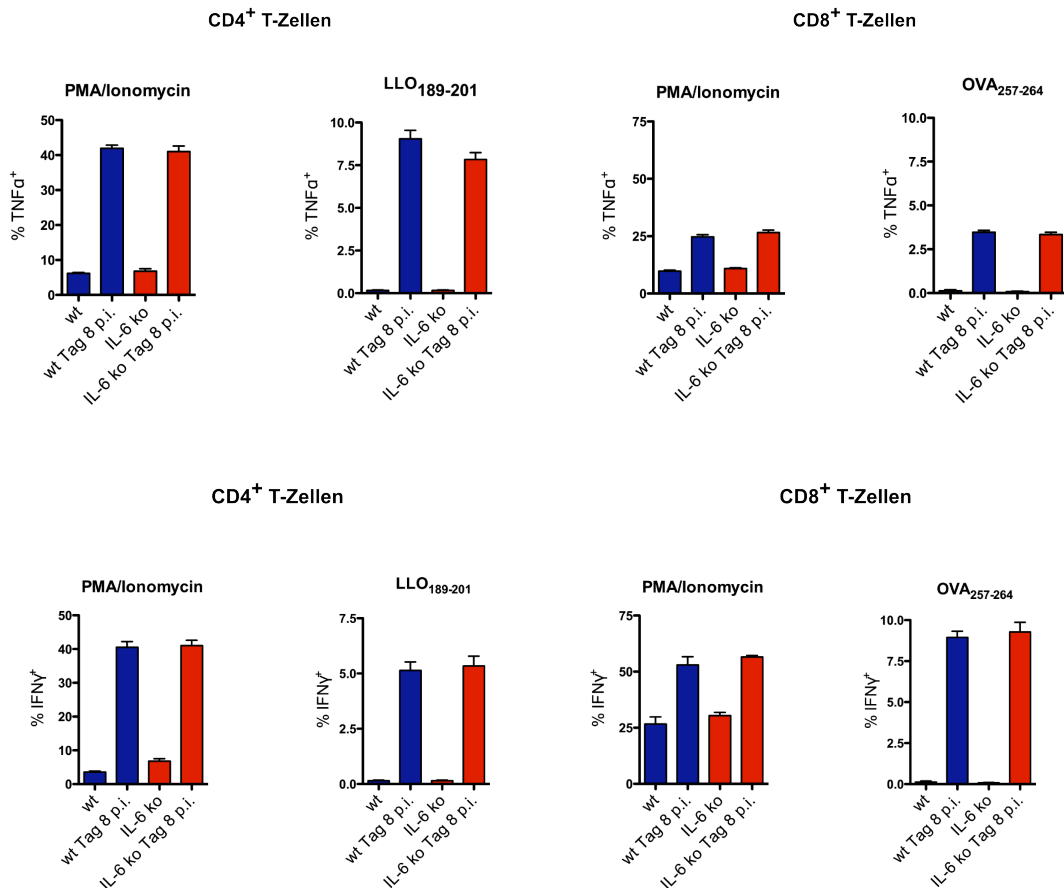
Die Ergebnisse für die Milz wurden beispielhaft in Abbildung 25 als Blots veranschaulicht. Die statistischen Darstellungen des Zytokinprofils von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden in Abbildung 26 zusammengefasst.



**Abbildung 25: Expressionsprofil von TNFα und IFNγ in T-Zellen nach Infektion mit *L. monocytogenes* (LmOVA).** Die Frequenzen der TNFα<sup>+</sup> und IFNγ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> (Abb. 24A) und CD8<sup>+</sup> (Abb. 24B) T-Zellen wurden sowohl in nicht-infizierten (den Kontrollen wurde PBS injiziert) als auch in mit 1×10<sup>5</sup> LmOVA infizierten Mäusen an Tag 8 analysiert. Die Milzzellen wurden isoliert, mit PMA/Ionomycin oder mit den Peptiden stimuliert und mit entsprechenden Antikörpern markiert. Für die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde das Peptid LLO<sub>189-201</sub> und für die Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen das Peptid OVA<sub>257-264</sub> verwendet. In den Blots sind jeweils die T-Zellen aus den nicht-infizierten und infizierten Tieren nach der Stimulation als Punktwolke (A: CD4, B: CD8) dargestellt. Die Zahlen geben den %-Wert der Zellen in den Quadranten an. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.



Nach der *in vitro* Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen einen Anstieg der TNFα<sup>+</sup> T-Zellen von durchschnittlich 8% in naiven Tieren auf 40% in den infizierten Tieren. Dieser Anstieg war in den Wildtyp- und den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen vergleichbar. Nach der spezifischen Stimulation mit LLO<sub>189-201</sub> konnten in naiven Tieren keine CD4<sup>+</sup> TNFα<sup>+</sup> T-Zellen (0,2%) nachgewiesen werden. An Tag 8 nach Infektion fanden sich aber etwa 9% dieser Zellen in den Wildtyp-Mäusen. Die IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten mit etwa 8% eine ähnliche Antwort, ein signifikanter Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen konnte nicht festgestellt werden. Die Frequenz der CD4<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup> T-Zellen stieg nach *in vitro* Stimulation mit PMA/Ionomycin im Infektionsverlauf in beiden Mausgruppen durchschnittlich von 4% auf 40% an. Nach Stimulation mit LLO<sub>189-201</sub> fanden sich wieder nur in den infizierten Mäusen IFNγ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese lagen sowohl in den Wildtyp- als auch in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen in vergleichbarem Verhältnis vor.



**Abbildung 26: Statistik des Expressionsprofils von TNFα und IFNγ nach Infektion mit *L. monocytogenes* (LmOVA).** Die Frequenz von TNFα<sup>+</sup> und IFNγ<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus nicht-infizierten und infizierten Mäusen nach Stimulation mit PMA/Ionomycin oder nach Stimulation mit LLO<sub>189-201</sub> für die CD4<sup>+</sup> und für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit OVA<sub>257-264</sub> wird graphisch dargestellt. Für jede Gruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Dieses Experiment wurde mehrmals mit mindestens drei Mäusen pro Gruppe durchgeführt.

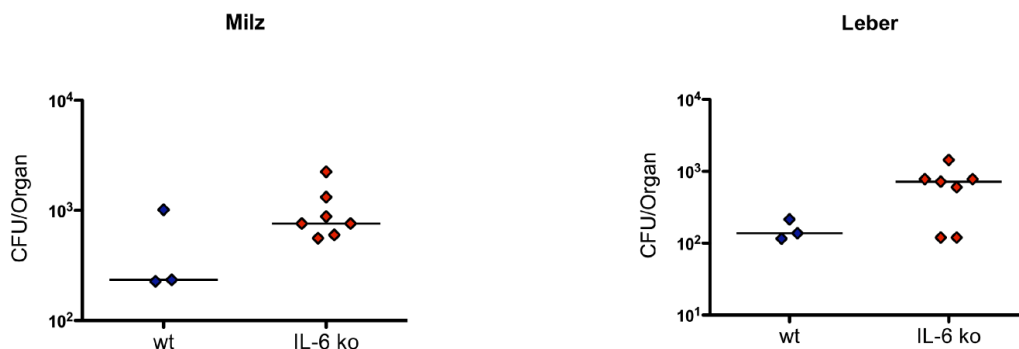
Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus infizierten Mäusen zeigten nach *in vitro* Stimulation mit PMA/Ionomycin etwa 32% an CD8<sup>+</sup> TNFα<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber etwa 10% dieser Zellen in naiven Mäusen. Für CD8<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup> T-Zellen ergab sich ein Anstieg von 25% auf 52% in diesen Tieren. Die Stimulation mit OVA<sub>257-264</sub> führte zu etwa 4,2% an CD8<sup>+</sup> TNFα<sup>+</sup> T-Zellen und 8,3% an CD8<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup> T-Zellen in infizierten Wildtyp-Mäusen. In beiden Stimulationsansätzen entsprachen die Frequenzen der CD8<sup>+</sup> TNFα<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> IFNγ<sup>+</sup> T-Zellen der IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen denen der Wildtyp-Mäuse, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Ergebnisse der *in vitro* Stimulation mit PMA/Ionomycin zeigten in den infizierten Tieren eine Erhöhung der Frequenz der TNFα<sup>+</sup> T-Zellen und IFNγ<sup>+</sup> T-Zellen sowohl für die CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Nach einer Stimulation mit immundominanten Peptiden waren nur in infizierten Tieren Zytokin-positive CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisbar. Insgesamt ergab sich aber für T-Zellen aus Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse ein sehr ähnliches Zytokinprofil. Dies bedeutet, dass die Regulation der spezifischen T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* weitgehend IL-6 unabhängig ist.

#### 4.4. Titer

Das *L. monocytogenes*-Infektionsmodell erlaubt neben der detaillierten Analyse der angeborenen und erworbenen Immunantwort auch den direkten Nachweis der Funktionalität dieser Antworten durch die Bestimmung der Bakterienlast in Milz und Leber der Maus. Im Rahmen der Studien zur Funktion von IL-6 in der erworbenen Immunantwort und für ADAM17 in der frühen Phase der Infektion wurden daher auch die Bakterientiter in infizierten IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen und in ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen bestimmt.

Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mit  $1 \times 10^5$  LmOVA intravenös infiziert. An Tag 8 wurden Suspensionen von Milz und Leber in Verdünnungsreihen auf TSB-Agarplatten ausgestrichen, nach 48 Stunden die Bakterienkolonien ausgezählt und die Bakterienzahl pro Organ berechnet. Abbildung 27 zeigt die Listerienlast der Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse. In beiden Gruppen fanden sich noch Tiere mit Listerien in Milz oder Leber. Generell war die Bakterienlast mit Werten um oder unter  $10^3$  relativ niedrig. Die IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten eine tendenziell höhere Listerienlast. Da die Streuung bei den beiden Mausgruppen relativ groß war, konnte daher kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Die insgesamt relativ niedrigen Werte zeigen, dass sowohl Wildtyp- als auch IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse die Infektion zu diesem Zeitpunkt kontrollieren konnten. Zusammenfassend deutet die Ergebnisse darauf hin, dass IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse zumindest in der späten Phase der Infektion keine wesentlichen Einschränkungen in der Listerienbekämpfung aufweisen.

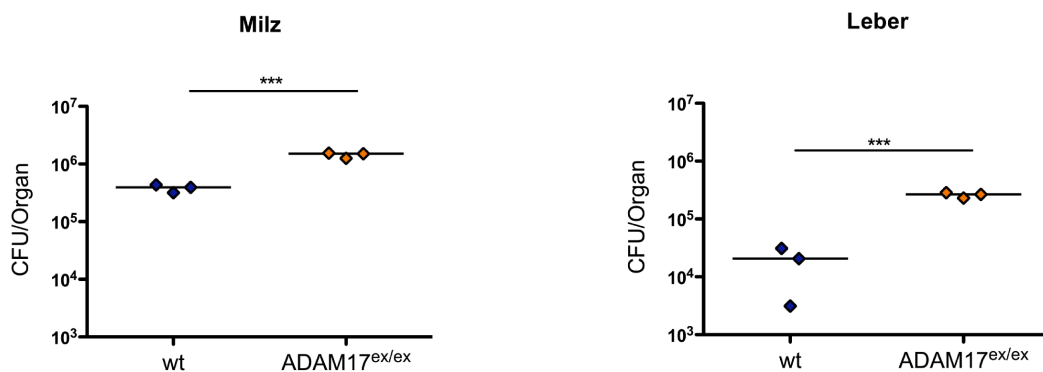


**Abbildung 27: Listerientiter in Milz und Leber von Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes* (LmOVA).** Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse wurden intravenös mit  $1 \times 10^5$  LmOVA infiziert, die Organentnahme erfolgte an Tag 8 nach der Infektion. Milz und Leber wurden als Gewebesuspensionen für 48h bei 37 °C auf TSB-Agarplatten inkubiert, anschließend wurden die Listerienkolonien ausgezählt. Die Listerienlast ist in colony forming units (CFU) pro Organ graphisch dargestellt. Für jede Mausgruppe ist das arithmetische Mittel angegeben. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Die Funktion von ADAM17 wurde in dieser Arbeit nur zu frühen Zeitpunkten der Listerieninfektion untersucht. Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse wurden mit  $2 \times 10^4$  LmEGD

intravenös infiziert und dann die Listerienlast in Milz und Leber bereits an Tag 2 der Infektion ermittelt. Abbildung 28 stellt die Titer der Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen dar. In den Milzen von Wildtyp-Mäusen fanden sich an Tag 2 nach der Infektion etwa  $5 \times 10^5$  Bakterien. ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse zeigten doppelt so hohe Titer von etwa  $1 \times 10^6$  Listerien pro Organ. Auch in der Leber konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mausgruppen beobachtet werden. Während die Wildtyp-Mäuse Titer von etwa  $3 \times 10^4$  Listerien pro Organ aufwiesen, fanden sich in den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse eine Zehnerpotenz höhere Titer von etwa  $3 \times 10^5$  Listerien pro Organ.

Die signifikanten Unterschiede in den Titern zwischen den beiden Mausgruppen in der Milz und besonders in der Leber weisen darauf hin, dass die verminderte Expression von ADAM17 zu einem deutlichen Anstieg in der Suszeptibilität der Tiere führt.



**Abbildung 28** Listerientiter in Milz und Leber von Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* (LmEGD). Wildtyp- und ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse wurden intravenös mit  $2 \times 10^4$  LmEGD infiziert, die Organentnahme erfolgte an Tag 2 nach der Infektion. Milz und Leber wurden als Gewebesuspensionen für 48 Stunden bei 37 °C auf TSB-Agarplatten inkubiert. Die Listerienkolonien wurden ausgezählt und sind als colony forming units (CFU) pro Organ graphisch dargestellt. Für jede Mausgruppe ist das arithmetische Mittel mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Das Experiment wurde einmal durchgeführt. \*\*\*p<0,001.

## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte von IL-6 und der IL-6R-Signaltransduktion in antibakteriellen Immunantworten untersucht. Die Analysen fanden in der Maus im *L. monocytogenes*-Infektionsmodell und z.T. auch in einem *S. typhimurium*-Infektionsmodell statt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Expression des membranständigen IL-6R $\alpha$  (mIL-6R $\alpha$ ) auf verschiedenen Leukozytenpopulationen im Verlauf der Infektion untersucht. Weiterhin wurde versucht die Mechanismen der Abspaltung (Shedding) dieses Rezeptors im Verlauf der Infektion zu ermitteln. Insbesondere wurde die Funktion von ADAM17 in diesem Prozess untersucht.

Im zweiten Teil wurde die Wirkung des IL-6 auf die T-Zellantwort im Verlauf der Bakterieninfektion charakterisiert. Schwerpunkte waren hierbei der Einfluss von IL-6 auf die spezifische T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* und die Bedeutung von IL-6 für die Differenzierung von T-Zellen zu T<sub>H</sub>17-Zellen im Verlauf der *L. monocytogenes*- und *S. typhimurium*-Infektion.

In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse und die Konsequenzen dieser Ergebnisse für das Verständnis der Funktion von IL-6 und IL-6R $\alpha$  diskutiert.

### 5.1. Verlust der IL-6R $\alpha$ Expression nach der Infektion mit *L. monocytogenes*

Eine Expression von mIL-6R $\alpha$  wurde für Hepatozyten und verschiedene Leukozyten beschrieben (Scheller *et al.* 2011). Unsere Ergebnisse bestätigten diese Befunde für verschiedene Leukozytenpopulationen. Wir fanden eine relativ hohe Expression auf inflammatorischen Monozyten und konventionellen CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Von den FoxP3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen exprimierte nur ein Teil den mIL-6R $\alpha$ . Auch für die CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergab sich nur eine mäßige mIL-6R $\alpha$  Expression. Neutrophile Granulozyten und B-Zellen trugen schließlich kaum mIL-6R $\alpha$  auf ihrer Oberfläche (für B-Zellen nicht in dieser Arbeit gezeigt).

Interessanterweise führte die Infektion mit *L. monocytogenes* zu einer deutlichen Veränderung der mIL-6R $\alpha$  Expression. Alle untersuchten Zellpopulationen zeigten eine verminderte mIL-6R $\alpha$  Expression an Tag 2 der Infektion (Abb.6 und Abb.7). Für T-Zellen war diese Verminderung unabhängig vom Differenzierungsgrad, sowohl Zellen mit einem naiven Phänotyp (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>) als auch aktivierte T-Zellen (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) zeigten eine Reduktion des mIL-6R $\alpha$ .

Aus diesem Phänomen ergeben sich interessante Konsequenzen. Durch den Verlust der Oberflächenexpression des IL-6R $\alpha$  können die Zellen nicht mehr direkt auf IL-6 reagieren. Sie sind aber immer noch in der Lage IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Komplexe über den IL-6-Trans-

Signalweg wahrzunehmen. Normalerweise liegt der IL-6 Serumspiegel im gesunden Menschen bei 1-5pg/ml und der Spiegel der sIL-6R $\alpha$  bei 50-100ng/ml (*Rabe et al.* 2008, *Jostock et al.* 2001). Für die Maus wurden von uns etwas niedrigere Konzentrationen des sIL-6R $\alpha$  bestimmt (*Hoge et al.* 2012). Eine Konsequenz des konstitutiv im Serum vorliegenden sIL-6R $\alpha$  wäre, dass eine Freisetzung von IL-6 zu einer andauernden und eventuell sogar systemischen Reaktion auf IL-6 durch den IL-6-Trans-Signalweg führt. Der Organismus verhindert diese potentiell gefährliche Reaktion durch das konstitutive Vorhandensein von löslichem gp130 (sgp130). Im gesunden Menschen hat sgp130 einen Serumspiegel von 100-150ng/ml und ist dadurch in der Lage IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Komplexe zu neutralisieren und den IL-6-Trans-Signalweg zu unterdrücken. IL-6, sIL-6R $\alpha$  und sgp130 bilden daher ein Puffersystem, welches durch Konzentrationsänderungen der drei Moleküle reguliert werden kann (*Rabe et al.* 2008). Der Verlust des mIL-6R $\alpha$  von der Oberfläche hat deshalb zwei prinzipielle Konsequenzen. Einerseits verlieren die Zellen die Fähigkeit direkt auf IL-6 zu reagieren, andererseits kann die Abspaltung des IL-6R $\alpha$  dazu führen, dass lokal die Konzentration des sIL-6R $\alpha$  ansteigt. Zusammen mit der Produktion von IL-6 können IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Konzentrationen entstehen, welche die Pufferkapazität des sgp130 übersteigen. Lokal könnte dann der IL-6-Trans-Signalweg aktiviert werden. Letztendlich führt die Abspaltung des mIL-6R $\alpha$  daher nicht zu einem generellen Verlust der IL-6-Wirkung, sondern zu einem veränderten Wirkungsprofil von IL-6, da neben den mIL-6R $\alpha$ -positiven Zellen nun lokal auch mIL-6R $\alpha$ -negative Zellen auf IL-6 reagieren.

## **5.2. Ursachen der verminderten IL-6R $\alpha$ Expression nach der Infektion mit**

### ***L. monocytogenes***

Ursachen für den Verlust der IL-6R $\alpha$  Expression nach der Infektion mit *L. monocytogenes* können vielfältig sein. Eine mögliche Erklärung wäre aber auch, dass IL-6 mit dem Nachweis des mIL-6R $\alpha$  interferiert, das Fehlen des IL-6R $\alpha$  wäre daher ein Messartefakt. Die Bindung von IL-6 an den mIL-6R $\alpha$  könnte z.B. die Bindung des anti-IL-6R $\alpha$ -Antikörpers blockieren. Andererseits könnte IL-6 eine Internalisierung des Rezeptors initiieren. Eine verminderte IL-6R $\alpha$  Expression sowohl in den Wildtyp- als auch in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen in allen untersuchten Zellpopulationen (Abb.9) weisen aber eher darauf hin, dass der Verlust der IL-6R $\alpha$  Expression durch einen anderen Mechanismus, wahrscheinlich die proteolytische Abspaltung verursacht wird. Für eine Abspaltung sprechen auch Ergebnisse aus *in vitro* Stimulationsexperimenten, in denen ein Anstieg der sIL-6R $\alpha$  Konzentration im Kulturmedium gemessen wurde (Ergebnisse unserer Kooperationspartner). Nach einer *L. monocytogenes*-Infektion kann auch ein Anstieg der Serumkonzentration von sIL-6R $\alpha$

nachgewiesen werden, dieser Anstieg ist aber nur sehr gering und erreicht nicht das Signifikanzlevel (Hoge *et al.* 2012).

Interessanterweise wurde eine von IL-6-abhängige Reduktion des mIL-6R $\alpha$  nach einer Behandlung von Mäusen mit LPS beobachtet. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, zeigten die IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse in den untersuchten T-Zellpopulationen keine signifikant verminderte IL-6R $\alpha$  Expression nach der Behandlung mit LPS (unveröffentlichtes Ergebnis der Arbeitsgruppe Mittrücker). Dieses Ergebnis würde für eine Internalisierung oder eine Blockade des Rezeptors sprechen. Im LPS Ansatz erfolgte die Messung eine Stunde nach der Behandlung. Zu diesem Zeitpunkt sollten sehr hohe Serumspiegel von IL-6 vorliegen. Im *L. monocytogenes*-Modell steigen die Serumkonzentrationen für IL-6 zwar an, es wird jedoch mit deutlich niedrigeren Konzentrationen gerechnet und daher einer geringeren Wirkung des IL-6 auf den Nachweis des IL-6R $\alpha$ .

Die Abspaltung des mIL-6R $\alpha$  könnte auch direkt von den Listerien verursacht werden. Listerien besitzen das Hämolyysin Listeriolysin O (LLO), welches in der Lage ist Poren in Zellmembranen zu bilden. Die Poren ermöglichen es Ionen, z.B. Ca<sup>2+</sup> in die Zellen einzuströmen und dadurch den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Spiegel zu erhöhen. Die erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentration kann Metalloproteasen wie ADAM17 (TACE) aktivieren und dies führt zu einer Abspaltung verschiedener Oberflächenmolekülen, unter anderem auch IL-6R $\alpha$ . *S. typhimurium* besitzt nach dem aktuellen Forschungsstand keine Hämolyseine oder ähnliche Proteine, die Poren in der Membran verursachen können. Nach der Infektion mit *L. monocytogenes* und *S. typhimurium* konnte aber in beiden Mausgruppen eine verminderte IL-6R $\alpha$  Expression beobachtet werden (Abb.12). Dies widerlegt die vorherige Vermutung und deutet darauf hin, dass der Abspaltung des IL-6R $\alpha$  keine listerien-spezifische Ursache zugrunde liegt. Dieses Ergebnis deutet auch darauf hin, dass die Abspaltung des mIL-6R $\alpha$  eine Reaktion auf Infektionen und generell auf Entzündungsprozesse ist.

### 5.3. Einfluss von P2X7 auf die Abspaltung von mIL-6R $\alpha$

Als Auslöser der Abspaltung von IL-6R $\alpha$  wurden verschiedene Mechanismen beschrieben. Einerseits können körpereigene Mediatoren wie Akute-Phase-Proteine (CRP, SAA), Entzündungszytokine oder andere Stressfaktoren das sogenannte „Shedding“ verursachen. Andere Auslöser sind die Stimulation des T-Zellrezeptors oder von TLR. Ein Teil dieser Signalwege kann *in vitro* durch eine Stimulation mit PMA oder Ionomycin imitiert werden. Bekannte Zellstresssignale sind die extrazellulären Nukleotide ATP und NAD<sup>+</sup>, die direkt (ATP) oder indirekt (NAD<sup>+</sup>) P2X7 stimulieren und dadurch Sheddase aktivieren. In dieser Arbeit wurde daher analysiert, ob die Abspaltung des IL-6R $\alpha$  von der Zelloberfläche nach der Infektion mit *L. monocytogenes* durch einen P2X7-induzierten Signalweg verursacht wird. *In vitro* induzierten NAD<sup>+</sup> und ATP das Shedding von IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L in

verschiedenen Milzzellsubpopulationen von Wildtyp-Mäusen, aber nicht in Zellen von P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb.10). Dieser Unterschied zeigt, dass die verminderte Oberflächenexpression von IL-6Rα durch einen P2X7-abhängigen Signalweg verursacht werden kann. *In vivo* konnte aber eine verminderte Oberflächenexpression von IL-6Rα nach Infektion mit *L. monocytogenes* sowohl in den Wildtyp- als auch in den P2X7<sup>-/-</sup> Mäusen beobachtet werden (Abb.11). Die verminderte Expression ist daher in diesem Kontext unabhängig von P2X7.

In T-Zellen könnte die Stimulation über den TZR für das IL-6Rα-Shedding verantwortlich sein. Dagegen spricht aber der frühe Zeitpunkt. An Tag 2 der Infektion sollte nur ein sehr kleiner Anteil der T-Zellen spezifisch für *L. monocytogenes* sein und deshalb über den TZR stimuliert werden. Es wäre interessant zu sehen, wie die Expression an Tag 8 der Antwort aussieht. Erstaunlicherweise konnte bei T-Zellen nur eine verminderte IL-6Rα Expression, aber keine verminderte Expression von CD62L und CD27 in den Mäusen beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Abspaltung des IL-6Rα ein relativ spezifisches Ereignis war und nicht auf einer breiten Sheddase-Aktivität beruhte.

Insgesamt kann nachgewiesen werden, dass die Abspaltung des IL-6Rα auf allen untersuchten Zellen stattfindet, die auslösenden Signale konnten aber für unsere Infektionsmodelle nicht identifiziert werden. Die umfassende Wirkung deutet auf einen löslichen Faktor hin. Zur Identifizierung dieser Faktoren sollte untersucht werden, ob Serum infizierter Tiere in der Lage ist das Shedding zu induzieren. Falls dies der Fall wäre, könnte durch eine Fraktionierung oder durch neutralisierende Antikörper versucht werden, die Faktoren im Serum zu identifizieren.

#### **5.4. Einfluss von ADAM17 auf die Abspaltung von mIL-6Rα**

Eine zentrale Frage ist, welche Protease für die Abspaltung des mIL-6Rα verantwortlich ist. Der wahrscheinlichste Kandidat ist die Protease ADAM17 (Chalaris et al. 2010), aber auch andere Sheddasen, z.B. ADAM10, könnten an der Abspaltung beteiligt sein. Die gemeinsame Funktion dieser ADAM-Moleküle ist die Abspaltung von Proteinen von der Zelloberfläche, die verschiedenen Proteasen unterscheiden sich aber in ihrer Spezifität und ihrem Expressionsmuster auf unterschiedlichen Zellpopulationen (Blobel 2005).

Die Aktivierung von P2X7 durch ATP oder NAD<sup>+</sup> führt zu der Induktion von ADAM17 (Le Gall et al. 2009), eine Aktivierung von weiteren ADAM-Protease kann aber nicht ausgeschlossen werden. Unsere Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten zeigen, dass die Verminderung der IL-6Rα *in vitro* über einen P2X7-abhängigen Mechanismus verursacht werden kann, was eine Funktion von ADAM17 nahelegt. Diese Aussage kann aber nicht auf die Situation *in vivo* übertragen werden, da in unserem *L. monocytogenes*-Modell P2X7 keine Auswirkung auf die IL-6Rα Abspaltung hat. Um die Bedeutung von ADAM17 gezielt



zu analysieren, wurden daher ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse *in vitro* und im Infektionsmodell *in vivo* verwendet. Diese Mäuse wurden von unseren Kooperationspartner aus Kiel zur Verfügung gestellt (Chalaris *et al.* 2010). Aufgrund eines induzierten genetischen Defekts haben ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse nur eine 5%ige Aktivität der Protease. Diese Restaktivität erlaubt das Überleben der Mäuse im Gegensatz zu komplett ADAM17-defizienten Mäusen, die nicht überlebensfähig sind (Information von Athena Chalaris und Stefan Rose-John). *In vitro* induzierten NAD<sup>+</sup> und ATP eine Abspaltung von IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L in allen untersuchten Milzzellpopulationen aus Wildtyp-Mäusen. Auch in den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen konnte eine verminderte Expression von IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L nach diesen Stimuli beobachtet werden. Im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen war der Verlust der Expression dieser Proteine aber deutlich geringer (Abb.13). *In vivo* zeigten sowohl Wildtyp-Mäuse als auch ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäuse eine verminderte Expression von IL-6R $\alpha$  nach der Infektion mit *L. monocytogenes*. Auch hier war der Verlust von IL-6R $\alpha$  in den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen deutlich geringer (Abb.14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ADAM17 eine wichtige Rolle bei der Abspaltung von Oberflächenmolekülen spielt und dieses Molekül zur Erklärung der verminderten Expression von IL-6R $\alpha$  nach der Infektion mit *L. monocytogenes* beiträgt. Eine Aussage zur Bedeutung von ADAM17 für die Abspaltung von CD62L ist in unserem Infektionsmodell nur eingeschränkt möglich, da wir selbst in Wildtyp-Tieren kaum Abspaltung von CD62L beobachten konnten. Lediglich bei den inflammatorischen Monozyten konnte in Wildtyp-Tieren eine moderate Reduktion von CD62L festgestellt werden, diese wurde aber in den ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen aufgehoben.

Sowohl für IL-6R $\alpha$ , CD27 und CD62L *in vitro* als auch für IL-6R $\alpha$  *in vivo* zeigen Zellen der ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen noch eine partielle Abspaltung. Das in diesen Zellen noch vorhandene Shedding könnte durch zwei möglichen Mechanismen erklärt werden. Einerseits könnte die ADAM17-Restaktivität für die noch stattfindende Abspaltung der Proteine verantwortlich sein. Andererseits könnte es sein, dass ADAM17 nicht die einzige Protease ist, die für die Abspaltung der untersuchten Proteine von Bedeutung ist. Es wäre möglich, dass weitere Moleküle wie ADAM10 oder andere Proteasen, die bisher noch nicht in diesem Zusammenhang beschrieben wurden, involviert sind. Um diesen Sachverhalt zu klären, könnten Zellen zusätzlich mit spezifischen ADAM-Inhibitoren behandelt werden. Um gezielt die Funktion von ADAM17 (oder auch anderen ADAM-Proteasen) zu untersuchen, könnten Mäuse mit zellspezifischer ADAM17-Defizienz (wie z.B. ADAM17<sup>flox/flox</sup>  $\times$  CD4<sup>Cre</sup> Mäuse) verwendet werden. Durch die Gewebe- oder Zell-spezifische Defizienz sind die Mäuse lebensfähig, die Analysen würden sich aber nur auf die jeweils betroffenen Zellpopulationen beschränken. Beide Ansätze werden zurzeit in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Athena Chalaris und Stefan Rose-John verfolgt.

### 5.5. Korrelation zwischen der TNF $\alpha$ Expression und der Kontrolle der Listerieninfektion

ADAM17 wird auch als *TNF $\alpha$  converting enzyme* (TACE) genannt, da die Protease zuerst für die Spaltung von membranständigem TNF $\alpha$  zu löslichem TNF $\alpha$  beschrieben wurde (Mohan *et al.* 2002). Nach einer 4-stündigen Stimulation mit PMA/Ionomycin konnten wir eine deutlich erhöhte membranständige TNF $\alpha$  (mTNF $\alpha$ ) Expression auf Zellen von ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen im Vergleich zu Zellen aus Wildtyp-Mäusen beobachten (Abb.16). Dieses Ergebnis entspricht der Erwartung, dass durch die verminderte ADAM17 (TACE)-Aktivität die Mäuse nur begrenzt in der Lage sind, mTNF $\alpha$  in lösliches TNF $\alpha$  umzuwandeln. TNF $\alpha$  gehört zu den Zytokinen, welche während der Immunantwort gegen *L. monocytogenes* von Leukozyten sezerniert werden. Zudem ist TNF $\alpha$  essentiell für eine effektive Listerienbekämpfung (Barber *et al.* 2005). Eine verminderte Abspaltung von mTNF $\alpha$  in den ADAM<sup>ex/ex</sup> Mäusen könnte daher auch Auswirkungen auf die Kontrolle der Listerien haben. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese beobachteten wir an Tag 2 nach der Infektion einen signifikant erhöhten Listerientiter in der Milz und Leber von infizierten ADAM17<sup>ex/ex</sup> Mäusen im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen (Abb.28). Die verminderte Expression von ADAM17 führte daher zu einem deutlichen Anstieg in der Suszeptibilität der Tiere. Dies würde bedeuten, dass TNF $\alpha$  zumindest z.T. in einer löslichen Form vorliegen muss, um eine schützende Wirkung zu haben. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass ADAM17 andere Prozesse beeinflusst, die für eine effektive Kontrolle der Listerien notwendig sind.

### 5.6. Der Einfluss von IL-6 auf die spezifische T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes*

Während einer Infektion kann IL-6 sowohl durch den klassischen als auch durch den Trans-Signalweg eine Signalkaskade aktivieren, und verschiedene Mechanismen der Immunantwort beeinflussen. Die Arbeit von Hoge *et al.* zeigt, dass in der Infektion mit *L. monocytogenes* nur der klassische IL-6-Signalweg, aber nicht der IL-6-Trans-Signalweg, eine wichtige Rolle für die frühe Phase der Bakterienbekämpfung spielte. Diese Daten zeigen, dass IL-6 die angeborene Immunantwort beeinflussen kann. Daraus ergibt sich die Frage, ob IL-6 auch eine Rolle in der T-Zellantwort gegen das Bakterium spielt und falls ja, über welchen Signalweg die Funktion von IL-6 vermittelt wird.

Um die adaptive Immunantwort zu untersuchen, wurden Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse mit LmOVA infiziert und an Tag 8 die T-Zellantwort analysiert. Die Infektion führte sowohl in den Wildtyp- als auch in den IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen zu einer deutlichen Zunahme von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In den infizierten Tieren war außerdem eine Abnahme der Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen zu beobachten, auch hier verhielten sich Wildtyp- und IL-6<sup>-/-</sup> Tiere

ähnlich (Abb. 23). Um die Stärke der spezifischen Antwort zu untersuchen, wurden T-Zellen aus den infizierten Mäusen mit immundominanten Peptiden aus LmOVA stimuliert und dann die Anzahl an  $\text{IFN}\gamma^+$  und  $\text{TNF}\alpha^+$  Zellen bestimmt. In diesem Ansatz fanden sich vergleichbare Zahlen an  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen in Wildtyp- und  $\text{IL-6}^{-/-}$  Mäusen, die auf die Stimulation mit einer Produktion von Zytokinen reagiert. Dies bedeutet, dass Wildtyp- und  $\text{IL-6}^{-/-}$  Tiere in der Lage waren ähnlich starke T-Zellantworten zu generieren. Schließlich wurden  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{CD8}^+$  und  $\gamma\delta\text{T}$ -Zellen polyklonal mit PMA/Ionomycin stimuliert, um das generelle Zytokinprofil dieser Zellen in der Infektion zu untersuchen. Auch in diesem Ansatz ergaben sich für die  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und  $\text{IL-6}^{-/-}$  Tieren (Abb. 24, Abb. 25).

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass das Fehlen von IL-6 in dem verwendeten Infektionsmodell keine Auswirkungen auf die Entstehung der  $\text{CD8}^+$  T-Zellantwort und der  $\text{CD4}^+$   $\text{T}_\text{H}1$ -Zellantwort hatte. Auch die regulatorischen T-Zellen wurden nicht beeinflusst. Interleukin-6 ist ein zentraler Faktor, der die Entscheidung zwischen einer Entwicklung zu regulatorischen T-Zellen und  $\text{T}_\text{H}17$ -Zellen steuert (Kimura *et al.* 2010). In unserem Infektionsmodell scheint es daher weitere Faktoren zu geben, die diese Funktion von IL-6 ersetzen können.

### 5.7. Bedeutung von IL-6 für die $\text{T}_\text{H}17$ -Zelldifferenzierung

IL-6 hat eine zentrale Rolle in der  $\text{T}_\text{H}17$ -Zelldifferenzierung (Ivanov *et al.* 2006). Deshalb wurde auch die Fähigkeit von T-Zellen zur IL-17A Expression während der Infektion von Wildtyp-,  $\text{IL-6}^{-/-}$  und  $\text{sgp130}^{\text{tg}}$  Mäusen mit *L. monocytogenes* und *S. typhimurium* untersucht. In naiven  $\text{IL-6}^{-/-}$  Mäusen zeigten sich im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen deutlich niedrigere Frequenzen an  $\text{IL-17A}^+$   $\text{CD4}^+$  T-Zellen in Milz und Leber. An Tag 8 nach der Infektion mit LmOVA war die Frequenz dieser Zellen in Wildtyp-Mäusen erhöht, die Frequenz der Zellen in  $\text{IL-6}^{-/-}$  Mäusen blieb aber niedrig (Abb. 17). Somit unterstützen unsere Beobachtung die publizierten Daten. In naiven Tieren war ein relativ hoher Anteil der  $\gamma\delta\text{T}$ -Zellen in Milz und Leber in der Lage IL-17A zu produzieren. Auch der Anteil der  $\text{IL-17A}^+$   $\gamma\delta\text{T}$ -Zellen stieg nach der Infektion weiter an. Interessanterweise war die IL-17A Produktion durch  $\gamma\delta\text{T}$ -Zellen weitgehend unabhängig von IL-6, sowohl naive als auch infizierte  $\text{IL-6}^{-/-}$  Mäuse zeigten zu den Wildtyp-Mäusen vergleichbare Frequenzen an  $\text{IL-17A}^+$   $\gamma\delta\text{T}$ -Zellen (Abb. 17). Auch dieses Ergebnis bestätigt publizierte Beobachtungen (Mills *et al.* 2008).

Da die IL-17A Produktion durch T-Zellen von IL-6 abhängig ist, stellt sich die Frage welcher IL-6-Signaltransduktionsweg für diese Zellen von Bedeutung ist. Um dies zu analysieren, wurden zusätzlich zu den oben erwähnten Mausgruppen  $\text{sgp130}^{\text{tg}}$  Mäuse untersucht, bei denen selektiv der IL-6-Trans-Signalweg blockiert war. Unsere Daten zeigten, dass die IL-17A Produktion durch  $\text{CD4}^+$  T-Zellen in den  $\text{sgp130}^{\text{tg}}$  Mäusen

vergleichbar zur IL-17A Produktion in Wildtyp-Mäusen war (Abb.18). Dies bedeutet, dass der IL-6-Trans-Signalweg keine Rolle für die T<sub>H</sub>17-Differenzierung spielt und dieser Prozess daher strikt von dem klassischen IL-6-Signalweg abhängig ist.

Diese Ergebnisse konnten wir für das Immunsystem des Darms im Rahmen der *S. typhimurium*-Infektion bestätigen. Im Epithel und der Lamina propria des Dünndarms von Wildtyp-Mäusen fanden sich relativ hohe Frequenz an IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach der *S. typhimurium*-Infektion stieg dieser Anteil noch weiter an. IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse, nicht aber sgp130tg Mäuse, zeigten im Gegensatz dazu eine deutliche Reduktion der IL-17A<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb.19, Abb.20).

Zusammenfassend weisen die Daten darauf hin, dass die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung sowohl in der Milz und Leber während der Infektion mit *L. monocytogenes* als auch im infizierten Darm mit *S. typhimurium* alleine vom klassischen IL-6-Signalweg abhängig ist. Diese Aussage beruht aber nur auf indirekten Ergebnissen, da wir in Experimenten nur die komplette IL-6 Wirkung oder selektiv den Trans-Signalweg blockiert haben. Wichtig wären weitere Experimente, in denen in den Infektionsmodellen spezifisch der klassische IL-6-Signalweg gehemmt wird. Eine Möglichkeit wäre z.B. die Verwendung von Mäusen, in denen nur auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen der membranständige IL-6Rα fehlt. Dieser Ansatz wird zurzeit im Labor durch Infektionsexperimente von IL-6Rα<sup>flox/flox</sup> × CD4<sup>cre</sup> Mäusen verfolgt.

## 6. Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) spielt als ein pro-inflammatorisches Zytokin eine wichtige Rolle in der Immunantwort gegen Krankheitserreger. In der vorliegenden Dissertation wurde die Funktion von IL-6 in der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* untersucht.

Inflammatorische Monozyten tragen den IL-6-Rezeptor- $\alpha$  auf der Zelloberfläche und können deshalb über den klassischen IL-6-Signalweg aktiviert werden (Hoge *et al.* 2012). Neben den inflammatorischen Monozyten konnten in der Arbeit verschiedene T-Zellsubpopulationen ( $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $FoxP3^+$  T-Zellen) identifiziert werden, die ebenfalls den IL-6R $\alpha$  auf der Zelloberfläche exprimieren. Die IL-6R $\alpha$  Expression verminderte sich aber in der frühen Phase der Listerien-Infektion auf allen untersuchten Zellen, so dass diese Zellen wahrscheinlich nur noch durch Komplexe aus IL-6 und einer löslichen Form des IL-6R $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) über den Trans-Signalweg aktiviert werden können. Der Mechanismus, der zu einer verminderten mIL-6R $\alpha$  Expression führt, wurde in der Arbeit analysiert. Eine ebenfalls verminderte mIL-6R $\alpha$  Expression in *L. monocytogenes*-infizierten IL-6 $^{-/-}$  Mäusen schloss aus, dass die Reduktion durch eine Rezeptorinternalisierung oder eine Blockade der Antikörperbindung durch IL-6 verursacht wurde. Weiterhin zeigte sich auch in der Infektion mit *S. typhimurium* eine Verminderung der mIL-6R $\alpha$  Expression, es handelte sich daher um einen generellen Mechanismus und nicht um eine Listerien-spezifische Reaktion. In *in vitro* Experimenten konnte eine Verminderung der mIL-6R $\alpha$  Expression durch eine Stimulation mit  $NAD^+$  und ATP in einem P2X7-abhängigen Prozess induziert werden. Dieser Mechanismus konnte aber in Infektionsexperimenten nicht bestätigt werden, da auch in infizierten P2X7 $^{-/-}$  Mäuse alle untersuchten Zellen eine verminderte mIL-6R $\alpha$  Expression aufwiesen. Dies bedeutet, dass die Stimulation von P2X7 zwar zu einer Verminderung der mIL-6R $\alpha$  Expression führen kann, dieser Prozess in unserem Infektionsmodell aber keine Rolle spielt. Für die Abspaltung des mIL-6R $\alpha$  von der Oberfläche wird ADAM17 als entscheidende Protease postuliert. Um die Rolle von ADAM17 in unseren Modellen zu charakterisieren, wurden Mäuse mit einer verminderten ADAM17 Expression (ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäuse) verwendet. Sowohl nach Stimulation *in vitro* als auch in der Infektion *in vivo* zeigten Zellen der ADAM17 $^{ex/ex}$  Mäuse zwar eine Verminderung der IL-6R $\alpha$  Expression, diese war aber deutlich geringer ausgeprägt als auf Zellen von Wildtyp-Mäusen. Die Abspaltung von mIL-6R $\alpha$  durch ADAM17 scheint daher entscheidend für die Verminderung der mIL-6R $\alpha$  Expression zu sein. Die Ergebnisse können aber eine Beteiligung von anderen ADAM-Proteasen nicht ausschließen.

IL-6 spielt eine wichtige Rolle bei der  $T_H17$ - Zelldifferenzierung. In der vorliegenden Arbeit konnte in unseren Infektionsmodellen für *L. monocytogenes* und *S. typhimurium* bestätigt

werden, dass IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse eine verminderte Anzahl von IL-17A-positiven T-Zellen haben. Diese Reduktion wurde aber nicht in sgp130<sup>tg</sup> Mäusen beobachtet. Dies bedeutet, dass für die T<sub>H</sub>17-Zelldifferenzierung in erster Linie der klassische IL-6-Signalweg wichtig ist und der IL-6-Trans-Signalweg nur eine untergeordnete Rolle spielt. Sowohl die T<sub>H</sub>1-Antwort als auch die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* waren von IL-6 unabhängig.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass der IL-6Rα im Verlauf von Infektionen auf verschiedenen Zellen dynamisch reguliert wird und dass vor allem der klassische Signalweg für die Differenzierung von T-Zellen von Bedeutung ist. Eine gezielte Intervention des klassischen oder des Trans-Signalwegs könnte daher neue therapeutische Strategien zur gezielteren Behandlung von Infektion oder entzündlichen Erkrankungen eröffnen.

## 7. Summary

The inflammatory cytokine Interleukin-6 (IL-6) plays a critical role in the regulation of immune responses to pathogens. The function of IL-6 in the innate and adaptive immune response to *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* was the central focus of this thesis.

Inflammatory monocytes express the IL-6 receptor  $\alpha$  on their surfaces indicating that these cells can respond to IL-6 by the classical IL-6 signaling pathway (Hoge *et al.* 2012). In the current study, IL-6R $\alpha$  expression could be detected on the surface of cells from different T-cell subsets (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and FoxP3<sup>+</sup> T cells). However, surface IL-6R $\alpha$  (mIL-6R $\alpha$ ) was rapidly lost from all analyzed cell populations during the early stage of listeria-infection. Consequently, these cells can only respond to IL-6 via trans-signaling, i.e. the recognition of a complex of IL-6 and the soluble IL-6R $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) by gp130 on the cell surface. The mechanism which causes shedding of mIL-6R $\alpha$  was further analyzed in the project. Reduction of mIL-6R $\alpha$  was also observed in infected IL-6<sup>-/-</sup> mice, excluding that the loss of mIL-6R $\alpha$  was caused by receptor internalization or antibody blockade by IL-6. Furthermore, the infection with *S. typhimurium* also resulted in reduced expression of mIL-6R $\alpha$ , indicating that mIL-6R $\alpha$  shedding represented a general response to infection and not a listeria-specific reaction. *In vitro*, we observed mIL-6R $\alpha$  shedding after stimulation of cells with NAD<sup>+</sup> and ATP in a P2X7-dependent process. However, this observation could not be confirmed *in vivo*, since in P2X7<sup>-/-</sup> mice, cells of all analyzed populations exhibited reduced expression of mIL-6R $\alpha$  following *L. monocytogenes* infection. Thus, although stimulation of P2X7 can cause shedding of mIL-6R $\alpha$ , this process appears to play no substantial role in our infection model. ADAM17 has been postulated as the main protease responsible for mIL-6R $\alpha$  shedding. To characterize the role of ADAM17 in our infection model, we used mice with highly impaired ADAM17 expression (ADAM17<sup>ex/ex</sup> mice). Both in response to stimulation *in vitro* and following listeria-infection of mice, cells from ADAM17<sup>ex/ex</sup> mice showed a reduction of IL-6R $\alpha$  expression, but this reduction was significantly less pronounced than that observed on cells of wildtype mice. Therefore, ADAM17 seems to have a crucial role in the mIL-6R $\alpha$  shedding. However, our results cannot exclude the involvement of other ADAM proteases in this process.

IL-6 plays an important role in T<sub>H</sub>17-cell differentiation. In this thesis, we could confirm this function for IL-6 in our infection models for *L. monocytogenes* and *S. typhimurium*. In both models we detected reduced numbers of IL-17A<sup>+</sup> cells in IL-6<sup>-/-</sup> mice. However, this reduction was not observed in sgp130<sup>tg</sup> mice. Therefore, T<sub>H</sub>17-cell differentiation depends on classical IL-6 signaling and the IL-6 trans-signaling only plays a minor role in this

process. In contrast to T<sub>H</sub>17-cell differentiation, both the T<sub>H</sub>1 and the CD8<sup>+</sup> T-cell responses to *L. monocytogenes* were independent of IL-6.

In summary, our results demonstrate that surface expression of IL-6R $\alpha$  is highly dynamic during *L. monocytogenes* and *S. typhimurium* infection suggesting a role for both classical IL-6 signaling and IL-6 trans-signaling during different stages of infection. Furthermore, classical IL-6 signaling seems to be especially important for T-cell differentiation. Modification of only one of the two signaling pathways could therefore open new therapeutic strategies for a targeted treatment of infections or inflammatory diseases.



## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassischer IL-6 Signalweg vs. IL-6-Trans-Signalweg .....	7
Abbildung 2: P2X7-Signalweg. ....	11
Abbildung 3: Phänotypischer Vergleich zwischen Wildtyp- und ADAM17 <sup>ex/ex</sup> Mäusen. ....	12
Abbildung 4: Analysestrategie. ....	25
Abbildung 5: Gating Strategie. ....	28
Abbildung 6: IL-6R $\alpha$ Expression. ....	29
Abbildung 7: Statische Darstellung der IL-6R $\alpha$ Expression. ....	29
Abbildung 8: Rezeptorblockade oder Rezeptorinternalisierung durch IL-6. ....	30
Abbildung 9: Vergleich der IL-6R $\alpha$ Oberflächenexpression in Wildtyp- und IL-6 <sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 2 nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> . ....	31
Abbildung 10: <i>In vitro</i> Shedding. ....	33
Abbildung 11: IL-6R $\alpha$ -Expression in Wildtyp- und P2X7 <sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 2 nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> . ....	34
Abbildung 12: IL-6R $\alpha$ Expression nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> und <i>S. typhimurium</i> . ....	35
Abbildung 13: <i>In vitro</i> Shedding. ....	37
Abbildung 14: IL-6R $\alpha$ Expression in Wildtyp und ADAM17 <sup>ex/ex</sup> Mäusen am Tag 2 nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> . ....	39
Abbildung 15: Oberflächen-TNF $\alpha$ Expression in Wildtyp- und ADAM17 <sup>ex/ex</sup> Mäusen. ....	40
Abbildung 16: Oberflächen-TNF $\alpha$ Expression von Wildtyp- und ADAM17 <sup>ex/ex</sup> Mäusen nach Stimulation mit PMA und Ionomycin. ....	41
Abbildung 17: Anteil an IL-17A produzierenden T-Zellen in Wildtyp-Mäusen nach Infektion mit LmOVA. ....	44
Abbildung 18: Frequenz der IL-17A <sup>+</sup> T-Zellen (CD4 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Zellen) in Wildtyp-, IL-6 <sup>-/-</sup> und sgp130 <sup>tg</sup> Mäusen nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> in der Milz. ....	46
Abbildung 19: Statistische Darstellung der Frequenz von IL-17A <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Zellen in der Milz. ....	47

Abbildung 20: Frequenz der IL-17A <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen in IEL und LPL von Wildtyp-Mäusen nach einer Infektion mit SL1344. ....	48
Abbildung 21: Frequenz der IL-17A <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T-Zellen im Darm von Wildtyp-, IL-6 <sup>-/-</sup> und sgp130 <sup>tg</sup> Mäusen nach der Infektion mit <i>S. typhimurium</i> . ....	49
Abbildung 22: Statistische Darstellung der Frequenz von IL-17A <sup>+</sup> T-Zellen aus IEL (A) und LPL (B) des Darms. ....	50
Abbildung 23: Totale Zellzahl und Zellzahlen der T-Zellpopulationen in der Milz nach Infektion mit LmOVA. ....	53
Abbildung 24: Totale Zellzahl und Zellzahlen der T-Zellpopulationen in der Leber nach Infektion mit LmOVA. ....	53
Abbildung 25: Expressionsprofil von TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ in T-Zellen nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> (LmOVA). ....	55
Abbildung 26: Statistik des Expressionsprofils von TNF $\alpha$ und IFN $\gamma$ nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> (LmOVA). ....	56
Abbildung 27: Listerientiter in Milz und Leber von Wildtyp- und IL-6 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> (LmOVA). ....	58
Abbildung 28: Listerientiter in Milz und Leber von Wildtyp- und ADAM17 <sup>ex/ex</sup> Mäusen nach der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> (LmEGD). ....	59

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Fluorochrom-markierten Antikörper.....	15
Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Isotypkontrollen.....	15
Tabelle 3: Fluorochrom-markierte Antikörper I .....	27
Tabelle 4: Fluorochrom-markierte Antikörper II .....	32
Tabelle 5: Fluorochrom-markierte Antikörper III.....	43
Tabelle 6: Fluorochrom-markierte Antikörper IV .....	52
Tabelle 7: Fluorochrom-markierte Antikörper V .....	54

## IV. Abkürzungsverzeichnis

-/-	defizient
ActA	<i>Actin-assembly-inducing-protein</i>
ADAM	<i>a disintegrin and metalloprotease</i>
CFU	Kolonien formenden Einheiten ( <i>Colony Forming Units</i> )
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
DSS	Dextransulfat Sodium
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EGF-R	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer ( <i>fluorescence activated cellsorting</i> )
FCS	Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FSC	Vorwärtsscatter ( <i>foreward scatter</i> )
GALT	Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe ( <i>gut associated lymphoid tissue</i> )
gp	Glykoprotein
HKL	hitzegetötete Listerien ( <i>heat-killed listeria</i> )
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6-Rezeptor
IL-6R $\alpha$	IL-6-Rezeptor $\alpha$ Kette
Inl	Internalin
JAK	Janus-Kinase
ko	knock-out
LIF	Leukämie inhibierender Faktor ( <i>leukemia inhibitory factor</i> )
LLO	Listeriolysin O
LmEGD	<i>Listeria monocytogenes</i> , Stamm EGD
LPL	Lamina propria Lymphozyten

LPS	Lipopolysaccharide
m	membranständig
mAK	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure ( <i>messenger ribonucleic acid</i> )
NOD	Nukleotid-bindende Oligodimerisierungsdomäne ( <i>nucleotide-binding oligodimerization-domain</i> )
NLRP	NOD-like receptors, pyrin domain containing
NRS	natives Rattenserum
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PI	Pathogenitäts-Inseln
p.i.	post infectionem
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
RA	Rheumatoide Arthritis
s	löslich ( <i>soluble</i> )
SAA	Serumamyloid A
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
sgp130Fc	lösliches gp130Fc-Fusionsprotein
SPI	<i>Salmonella</i> Pathogenitäts-Inseln
SSC	Seitwärtsscatter ( <i>sideward scatter</i> )
TACE	TNF $\alpha$ konvertierendes Enzym ( <i>TNF<math>\alpha</math> converting enzyme</i> )
tg	transgen
TGF $\beta$	Transforming growth factor $\beta$

T <sub>h</sub> -Zellen	T-Helfer-Zellen
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
TSB	Tryptic Soy Broth
T-Zellen	T-Lymphozyten
TZR	T-Zellrezeptor
wt	Wildtyp

## V. Literaturverzeichnis

- 1) Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J.* 22(3):861-9.
- 2) Barber EM, Fazzari M, Pollard JW. (2005) Th1 cytokines are essential for placental immunity to *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 2005 Oct;73(10):6322-31.
- 3) 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.* 2004 Oct;21(4):491-501.
- 4) Bettelli E, Korn T, Oukka M, Kuchroo VK. (2008) Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature.* 2008 Jun 19;453(7198):1051-7. doi: 10.1038/nature07036. Review.
- 5) Black RA. (2002) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Jan;34(1):1-5. Review.
- 6) Blobel CP. (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jan;6(1):32-43. Review.
- 7) Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW. (2008) Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* 2008 Jan;1(1):31-7. doi: 10.1038/mi.2007.9.
- 8) Carey AL, Febbraio MA (2004) Interleukin-6 and insulin sensitivity: friend or foe? *Diabetologia.* 47(7):1135-1142.
- 9) Cossart P. (2002) Molecular and cellular basis of the infection by *Listeria monocytogenes*: an overview. *Int J Med Microbiol.* 2002 Feb;291(6-7):401-9. Review.
- 10) Danilenko DM, Wang H (2012) The Yin and Yan of Immunomodulatory Biologics: Assessing the Delicate Balance between Benefit and Risk. *Toxicol Pathol.*
- 11) Dann SM, Spehlmann ME, Hammond DC, Iimura M, Hase K, Choi LJ, Hanson E, Eckmann L. (2008) IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6816-26.
- 12) Dieye Y, Ameiss K, Mellata M, Curtiss R 3rd. (2009) The Salmonella Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol.* 2009 Jan 6;9:3. doi: 10.1186/1471-2180-9-3.

- 13) Dinarello CA. (2007) A signal for the caspase-1 inflammasome free of TLR. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):383-5.
- 14) Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 006. 176:3877- 3883.
- 15) Foulds, K. E.; Zenewicz, L. A.; Shedlock, D. J.; Jiang, J.; Troy, A. E. und Shen, H. (2002): Cutting edge: CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses, *J.Immunol.* (Band 168), Nr. 4, Seite 1528-1532.
- 16) Geddes K, Rubino SJ, Magalhaes JG, Streutker C, Le Bourhis L, Cho JH, Robertson SJ, Kim CJ, Kaul R, Philpott DJ, Girardin SE. (2011) Identification of an innate T helper type 17 response to intestinal bacterial pathogens. *Nat Med.* 2011 Jun 12;17(7):837-44. doi: 10.1038/nm.2391.
- 17) Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini JL, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Génin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, André F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NM, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L. (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009 Oct;15(10):1170-8. doi: 10.1038/nm.2028. Epub 2009 Sep 20.
- 18) 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.
- 19) Haag F, Adriouch S, Braß A, Jung C, Möller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, Koch-Nolte F. (2011) Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal.* 2007 Mar;3(1-2):71-81. doi: 10.1007/s11302-006-9038-7. Epub 2007 Jan 9.
- 20) Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann (2005) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* (Springer-Lehrbuch).
- 21) Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1123-32. Epub 2005 Oct 2.
- 22) Hashizume M, Mihara M. (2011) The roles of interleukin-6 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis.* 2011;2011:765624. doi: 10.1155/2011/765624. Epub 2011 May 26.



- 23) 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.
- 24) Heiss K, Jänner N, Mähnß B, Schumacher V, Koch-Nolte F, Haag F, Mittrücker H-W (2008) High Sensitivity of Intestinal CD8<sup>+</sup> T Cells to Nucleotides Indicates P2X7 as a Regulator for Intestinal T Cell Response. *The Journal of Immunology*. 181: 3861-3869.
- 25) Hoge J, Yan I, Jänner N, Schumacher V, Chalaris A, Steinmetz OM, Engel DR, Scheller J, Rose-John S, Mittrücker HW. (2012) IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *J Immunol*. 2013 Jan 15;190(2):703-11. doi: 10.4049/jimmunol.1201044. Epub 2012 Dec 12.
- 26) Hoiseth SK, Stocker BA (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are nonvirulent and effective as live vaccines. *Nature*. 291(5812):238-9.
- 27) Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, O'Garra A, Murphy KM. (1993) Development of T<sub>H1</sub> CD4<sup>+</sup> T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*. 1993 Apr 23;260(5107):547-9.
- 28) Ishikawa A, Yoshida H, Metoki N, Toki T, Imaizumi T, Matsumiya T, Yamashita K, Taima K, Satoh K. (2007) Edaravone inhibits the expression of vascular endothelial growth factor in human astrocytes exposed to hypoxia. *Neurosci Res*. 2007 Dec;59(4):406-12. Epub 2007 Aug 17.
- 29) Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, Tadokoro CE, Lepelletier A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR. (2007) The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17<sup>+</sup> T helper cells. *Cell*. 2006 Sep 22;126(6):1121-33.
- 30) Jostock T, Mülberg 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.
- 31) 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 Dis*. 69(1):88-96.
- 32) Jones SA. (2005) Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3463-8. Review.
- 33) 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.

- 34) Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P, Núñez G. (2007) Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):433-43. Epub 2007 Apr 12.
- 35) Kimura A, Kishimoto T. (2010) IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010 Jul;40(7):1830-5. doi: 10.1002/eji.201040391. Review.
- 36) Kishimoto (1989) The biology of interleukin-6. *Blood*. 74(1):1-10.
- 37) 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.
- 38) Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*. 2005 Jan 17;201(2):233-40.
- 39) Le Gall SM, Bobé P, Reiss K, Horiuchi K, Niu XD, Lundell D, Gibb DR, Conrad D, Saftig P, Blobel CP. (2009) ADAMs 10 and 17 represent differentially regulated components of a general shedding machinery for membrane proteins such as transforming growth factor alpha, L-selectin, and tumor necrosis factor alpha. *Mol Biol Cell*. 2009 Mar;20(6):1785-94. doi: 10.1091/mbc.E08-11-1135. Epub 2009 Jan 21.
- 40) Le Gall SM, Maretzky T, Issuree PD, Niu XD, Reiss K, Saftig P, Khokha R, Lundell D, Blobel CP. (2010) ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site. *J Cell Sci*. 2010 Nov 15;123(Pt 22):3913-22. doi: 10.1242/jcs.069997. Epub 2010 Oct 27.
- 41) Leonard WJ, O'Shea JJ (1998) Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 16(1):293-322.
- 42) 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.
- 43) Malchow S, Thaïss W, Jänner N, Waetzig GH, Gewiese-Rabsch J, Garbers C, Yamamoto K, Rose-John S, Scheller J. (2011) Essential role of neutrophil mobilization in concanavalin A-induced hepatitis is based on classic IL-6 signaling but not on IL-6 trans-signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Mar;1812(3):290-301. doi: 10.1016/j.bbadis.2010.11.009. Epub 2010 Dec 2.
- 44) 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.

- 45) Mayuzumi H, Inagaki-Ohara K, Uyttenhove C, Okamoto Y, Matsuzaki G. (2010) Interleukin-17A is required to suppress invasion of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to enteric mucosa. *Immunology*. 2010 Nov;131(3):377-85. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03310.x.
- 46) Medzhitov R, Janeway CA Jr. (1997) Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb;9(1):4-9. Review.
- 47) Mills KH. (2008) Induction, function and regulation of IL-17-producing T cells. *Eur J Immunol*. 2008 Oct;38(10):2636-49. doi: 10.1002/eji.200838535.
- 48) 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*. 1995 Jan;36(1):45-9.
- 49) Miura T, Nishikawa S, Sasaki S, Yamada K, Hasegawa S, Mizuki D, Mizuki M, Hatayama I, Sekikawa K, Tagawa Y, Iwakura Y, Nakane A. (2000) Roles of endogenous cytokines in liver apoptosis of mice in lethal *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000 Aug;28(4):335-41.
- 50) 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.
- 51) 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.
- 52) 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):523-8.
- 53) Pamer EG.(1993) Cellular immunity to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol*. 1993 Aug;5(4):492-6. Review.
- 54) Pamer (2004) Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol*. 4(10):812-823.
- 55) Rabe B, Chalaris A, May U, Waetzig GH, Seegert D, Williams AS, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. (2008) Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1021-8. Epub 2007 Nov 7.
- 56) Raffatellu M, George MD, Akiyama Y, Hornsby MJ, Nuccio SP, Paixao TA, Butler BP, Chu H, Santos RL, Berger T, Mak TW, Tsolis RM, Bevins CL, Solnick JV, Dandekar S, Bäuml AJ. (2009) Lipocalin-2 resistance confers an advantage to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium for growth and survival in the inflamed

- intestine. Cell Host Microbe. 2009 May 8;5(5):476-86. doi: 10.1016/j.chom.2009.03.011.
- 57) 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.
- 58) Robert-Koch-Institut, epidermiologisches Bulletin 2009
- 59) Robert-Koch-Institut, Infektionskrankheit, *Listeria monocytogenes*, 2012.
- 60) Robert-Koch-Institut, Infektionskrankheit, *Salmonella typhimurium*, 2008.
- 61) 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.
- 62) Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Gratzinger 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.
- 63) Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F (2009) NAD<sup>+</sup> and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. J Immunol. 182(5):2898-908.
- 64) Schwarz N, Fliegert R, Adriouch S, Seman M, Guse AH, Haag F, Koch-Nolte F. (2009) Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. Purinergic Signal. 2009 Jun;5(2):139-49. doi: 10.1007/s11302-009-9135-5. Epub 2009 Mar 3.
- 65) Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. Immunity. 19(4):571-82.
- 66) Saunders BM, Liu Z, Zhan Y, Cheers C. (1993) Interleukin-6 production during chronic experimental infection. Immunol Cell Biol. 1993 Aug;71 ( Pt 4):275-80.
- 67) 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.
- 68) 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.
- 69) Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA. (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X(7) receptors. J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1):125-32.

- 70) Stauber, M. et al.: Gynäkologie und Geburtshilfe. Thieme, Stuttgart 2007
- 71) Steele-Mortimer O, Brumell JH, Knodler LA, Méresse S, Lopez A, Finlay BB. The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2002 Jan;4(1):43-54.
- 72) Taga T, Kishimoto T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:797-819. Review.
- 73) 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.
- 74) Unanue ER.(1997) Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev.* 1997 Aug;158:11-25. Review.
- 75) 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.

## VI. Danksagung

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Hans-Willi Mittrücker. Er hat mir die Bearbeitung dieses Promotionsthemas überlassen und stand mir von Anfang an als hervorragender Betreuer zur Verfügung und bei Fragen und Unklarheiten nahm er sich stets Zeit für mich genommen.

Die Durchführung meiner Dissertation in der AG Mittrücker/Institut für Immunologie war eine sehr gute Erfahrung und auch eine sehr schöne Zeit für mich – vielen Dank an euch und das ganze IFI für die Unterstützung und auch die schöne Zeit im Labor und Pausenraum. Insbesondere bedanke ich mich bei Valéa. Sie hat mir die Laborarbeit beigebracht und war von Anfang an stets geduldig (auch wenn ich Fehler gemacht habe), hilfsbereit und stand mir bei aufwendigen Versuchen praktisch zur Seite. Außerdem bedanke mich bei Steffi, die mich oft bei den Aufreinigungen unterstützt hat.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Rose-John, Dr. Athena Chalaris, Jeanette Schwarz und Dr. Björn Rabe, durch welche ich die Möglichkeit hatte, mit ADAM17<sup>ex/ex</sup> und spg130<sup>tg</sup> Mäusen zu arbeiten sowie Prof. Tiegs und Dr. Erhardt, die die IL-6<sup>-/-</sup> zur Verfügung stellten.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die immer für mich da sind und mir während der Arbeit an der Promotion seelischen Beistand geleistet haben. Ein riesengroßer Dank gilt auch Karsten, Kim, Katharina und Katharina, die mich sowohl in guten als auch in schlechten Zeiten immer motiviert und unterstützt haben.

## VII. Publikation und Kongressbeiträge

- 09/2012      **Posterpräsentation in „3rd European Congress of Immunology“ in Glasgow**
- 12/2012      **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. J Immunol. 2013 Jan 15;190(2):703-11. doi: 10.4049/jimmunol.1201044. Epub 2012 Dec 12.
- 12/2013      **MAP kinase induced TNF $\alpha$  shedding is independent of cytoplasmic phosphorylation or furin cleavage of ADAM17.** Jeanette Schwarz; Claudia Broder; Ansgard Helmstetter; Stefanie Schmidt; Isabell Yan; Miryam Müller; Dirk Schmidt-Arras; Christoph Becker-Pauly; Friedrich Koch-Nolte; Hans-Willi Mittrücker; Björn Rabe; Stefan Rose-John; Athena Chalaris. Biochim Biophys Acta. 2013 Dec;1833(12):3355-67. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.10.005. Epub 2013 Oct 14.
- 02/2014      **Stat3 programs Th17-specific regulatory T cells to control glomerulonephritis.** Kluger, M.A., Luig, M., Wegscheid, C., Görke, B., Paust, H.J., Yan, I., Mittrücker, H.W., Hagl, B., Renner, E.D., Wiech, T., Stahl, R.A.K., Panzer, U., Steinmetz, O.M. J Am Soc Nephrol. 2014 Jun;25(6):1291-302. doi: 10.1681/ASN.2013080904. Epub 2014 Feb 7.
- 02/2015      **Inflammation Induced IL-6 Acts as a Natural Brake on Macrophages and Limits Glomerulonephritis.** Luig, M., Kluger, M.A., Goerke, B., Meyer, M., Nosko, A., Yan, I., Scheller, J., Mittrücker, H.-W., Rose-John, S., Stahl, R.A.K., Panzer, U., Steinmetz, O.M. J Am Soc Nephrol. 2015 Feb 5. pii: ASN.2014060620.
- 2015      **ADAM17 controls IL-6 signaling by cleavage of the murine IL-6R $\alpha$  from the cell surface of leukocytes during inflammatory responses.** Isabell Yan, Jeanette Schwarz, Karsten Lücke, Valea Schumacher, Neele Schumacher, Björn Rabe, Paul Saftig, Marjo Donners, Stefan Rose-John, Hans-Willi Mittrücker and Athena Chalaris. submitted

## VIII. 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.

Unterschrift: .....