

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Institut für Immunologie
Martinistraße 52
20246 Hamburg

SS 2017

Dissertation

**Einfluss von IL-6 auf die angeborene
Immunantwort der Maus gegen
*Listeria monocytogenes***

vorgelegt von
Karsten Lücke

Dissertation

zum Erlangen des naturwissenschaftlichen Doktorgrades (Dr.
rer. nat) eingereicht am Fachbereich Chemie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg
Juni 2017

Betreut durch Prof. Dr. Mittrücker

1. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfram Brune

Datum der Disputation: 18.08.17

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom Januar 2014 bis Juni 2017 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Mitrücker am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Abstract	3
3 Einleitung	5
3.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
3.1.1 Biologie	5
3.1.2 Pathogenese	5
3.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Kontrolle von <i>L. monocytogenes</i>	9
3.2.1 Typ 1 und Typ 2 Makrophagen	11
3.3 Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Immunantwort gegen <i>L. monocytogenes</i>	13
3.4 Interleukin-6	16
3.4.1 Biologische Funktion von IL-6	17
3.4.2 Der IL-6 Rezeptor	18
3.4.3 IL-6 Signaltransduktion	19
4 Fragestellung	22
5 Material & Methoden	23
5.1 Materialien	23
5.1.1 Antikörperliste	23
5.1.2 Puffer und Lösungen	24
5.1.3 Feinchemikalien	25
5.1.4 Kits	27
5.1.5 Kunststoffmaterialien	27
5.1.6 Geräte und Software	27
5.2 Mauslinien	28
5.3 Tierexperimentelles Arbeiten	28

5.4	Krankheitsmodelle	29
5.4.1	Verwendete Bakterienstämme	29
5.4.2	Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	29
5.5	Zellisolation	29
5.5.1	Organentnahme und Zellisolation: Peritoneallavage	29
5.5.2	Organentnahme und Zellisolation: Milz	30
5.5.3	Organentnahme und Zellisolation: Leber	30
5.5.4	Organentnahme und Zellisolation: Knochenmark	30
5.5.5	Zellzählung	31
5.6	Zellkultur	31
5.6.1	BMDM-Kultur	31
5.7	Quantitative Echtzeit-PCR	32
5.7.1	RNA-Isolation aus Gewebe	32
5.7.2	cDNA-Synthese	32
5.7.3	Quantitative Echtzeit-PCR	32
5.8	Immunhistochemie	33
5.8.1	Entnahme und Einbettung der Organe	33
5.8.2	Immunhistochemische Färbung	33
5.8.3	Analyse der immunhistochemischen Färbung	35
5.9	Durchflusszytometrie	35
5.9.1	Phagozytose-Assay	35
5.9.2	<i>In vitro</i> Stimulation	36
5.9.3	Immunfluoreszenzfärbung: Extrazelluläre Färbung	36
5.9.4	Immunfluoreszenzfärbung: Intrazelluläre Färbung	37
5.9.5	Durchflusszytometrische Analyse	37
5.10	RNA-Sequenzierung	39
5.10.1	Isolation von Zellen	39
5.10.2	RNA-Isolation	39
5.10.3	RNA-Sequenzierung	40
5.11	Statistik	40
6	Ergebnisse	41
6.1	Listerienkontrolle in <i>Il6ra^{fl/fl} × LysM^{Cre+} (Il6ra^{ΔMyel})</i> Mäusen	41
6.2	Einfluss von IL-6 auf die Distribution myeloider Zellen	42
6.2.1	Akkumulation myeloider Zellen in infizierten <i>Il6ra^{ΔMyel}</i> Mäusen	42

6.2.2	Chemotaxis Index von inflammatorischen Monozyten infizierter <i>Il6ra</i> ^{ΔMyel} Mäuse	44
6.2.3	Immunhistochemische Färbung von Organen infizierter Mäuse	45
6.3	Phänotypische Charakterisierung myeloider Zellen	47
6.3.1	Menge an mRNA proinflammatorischer Moleküle in myeloiden Zellen	47
6.3.2	Expression von Oberflächenmolekülen auf myeloiden Zellen	49
6.3.3	Unvoreingenommene Populationsanalyse	52
6.3.4	Zytokinexpression myeloider Zellen	58
6.3.5	Einfluss von IL-6 auf die M1 und M2 Polarisierung	62
6.3.6	Transkriptomanalyse inflammatorischer Monozyten	64
6.3.6.1	REViGO-Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten	66
6.4	Einfluss von Interleukin- (IL-)6 auf die Phagozytoseaktivität von inflammato- rischen Monozyten	69
6.4.1	Einfluss von IL-6 auf die <i>in vitro</i> Phagozytoseaktivität	69
6.4.2	Einfluss von IL-6 auf die <i>in vivo</i> Phagozytoseaktivität	71
7	Diskussion	76
7.1	IL-6 ist essentiell für die Listerienkontrolle durch myeloide Zellen	77
7.2	IL-6 hat keinen Einfluss auf die Verteilung und Motilität von myeloiden Zellen	77
7.3	IL-6 beeinflusst die Differenzierung und die Aktivierung inflammatorischer Monozyten	79
7.4	Klassische IL-6 Signaltransduktion ist ein entscheidender Faktor für die Pha- gozytoseaktivität inflammatorischer Monozyten	85
7.5	Zusammenfassung	86
8	Ausblick	88
9	Literaturverzeichnis	89
10	Anhang	103
10.1	Sicherheit und Entsorgung	103
10.2	Publikationsliste	104
10.2.1	Veröffentlichungen	104
10.2.2	Kongressbeiträge	104
10.2.3	Veröffentlichungen im Peer-Review Prozess	104
10.3	RNA-Sequenzierung: Differenziell exprimierte Gene	105

11 Danksagung	109
12 Eidesstattliche Versicherung	110

Abbildungsverzeichnis

3.1	Schematische Darstellung der intrazellulären Lebensweise von <i>L. monocytogenes</i>	6
3.2	Schematische Darstellung der Monozytenreifung während der Infektion mit <i>L. monocytogenes</i>	9
3.3	Schematische Darstellung der Polarisierung von Makrophagen	12
3.4	Kristallstruktur von Interleukin-6	16
3.5	Schematische Darstellung der verschiedenen IL-6 Signalwege	19
5.1	Eingrenzung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten	38
6.1	Listerientiter von <i>Il6ra</i> ^{ΔMyel} Mäusen d2 p.i.	42
6.2	Akkumulation myeloider Zellen in infizierten <i>Il6ra</i> ^{ΔMyel} Mäusen	43
6.3	Chemotaxis Index von inflammatorischen Monozyten infizierter <i>Il6ra</i> ^{ΔMyel} Mäuse	45
6.4	Immunhistochemische Färbung von Organen infizierter Mäuse	46
6.5	mRNA-Menge proinflammatorischer Moleküle in Leberlysaten	48
6.6	Beispieldaten der Expression von Oberflächenmolekülen	50
6.7	MFI von Oberflächenmolekülen	51
6.8	<i>t-distributed stochastic neighbor embedding</i> (t-SNE)-Analyse aus infizierten Lebern	53
6.9	t-SNE-Analyse aus infizierten Milzen	54
6.10	t-SNE-Analyse aus infizierten Lebern	55
6.11	t-SNE-Analyse aus infizierten Milzen	57
6.12	Beispieldaten zytokinproduzierender Monozyten	59
6.13	Prozentuale Anteile zytokinproduzierender Monozyten	60
6.14	MFI zytokinproduzierender Monozyten	61
6.15	Einfluss von IL-6 auf die Expression von M1 und M2 charakteristischen Oberflächenproteinen	63
6.16	Clustering der statistisch signifikant differenziell exprimierten Gene	65

6.17	REViGO Analyse der <i>GO-terms</i> der Kategorie: <i>molecular function</i>	66
6.18	REViGO Analyse der <i>GO-terms</i> der Kategorie: <i>biological processes</i>	68
6.19	Einfluss von IL-6 auf die <i>in vitro</i> Phagozytoseaktivität	70
6.20	Einfluss von IL-6 auf die <i>in vivo</i> Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten	72
6.21	Einfluss von IL-6 auf die <i>in vivo</i> Phagozytoseaktivität von inflammatorischen Monozyten	74

Tabellenverzeichnis

5.1	Liste der verwendeten Antikörper	23
5.2	PCR-Programm für cDNA-Synthese	32
5.3	PCR-Programm für die quantitative Echtzeit-PCR	33
10.1	H- und P- Sätze der verwendeten Stoffe	103
10.2	Rohdaten der RNA-Sequenzierung	108

Abkürzungsverzeichnis

ACK Ammoniumchlorid-Kalium

ActA *actin assembly-inducing protein*

ADAM *a disintegrin and metalloproteinase*

ADPR Adenosindiphosphoribose

BMDM Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*)

BSA bovines Serumalbumin

cADPR zyklische Adenosindiphosphoribose

CCR2 C-C Chemokinrezeptor Type 2

CD62L L-Selektin

CDH1 E-Cadherin

CFSE 5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester

CNTF *ciliary neurotrophic factor*

CX3CR1 CX3C Chemokin Rezeptor 1

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

FACS *fluorescence-activated cell sorting*

FPR Formylpeptidrezeptor

FSC *forward scatter*

GO-terms *gene ontology terms*

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HGF *hepatocyte growth factor*

HRP *horseradish peroxidase*

IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Medium

IFN γ Interferon- γ

IL- Interleukin-

IL-4R α Interleukin-4 Rezeptor α -Untereinheit

IL-6R α Interleukin-6 Rezeptor α -Untereinheit

***Il6ra* ^{Δ Myel} *Il6ra*^{fl/fl} \times *LysM*^{Cre+}**

InIA Internalin A

InIB Internalin B

iNOS induzierbare NO-Synthase

i.v. intravenös

JAK Januskinase

L. monocytogenes *Listeria monocytogenes*

LB *lysogeny broth*

LIF *leukemia inhibitory factor*

LLO Listeriolysin O

log2FC log2-fold-change

LPS Lipopolysaccharid

LTA Lipoteichonsäure

M-CSF *macrophage colony-stimulating factor*

MAPK mitogenaktivierten Proteinkinase

MET Tyrosinproteinkinase Met

MFI *mean fluorescence intensity*

MHC *major histocompatibility complex*

MMR1 *macrophage mannose receptor*

MyD88 *myeloid differentiation primary-response protein 88*

NAADP *Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat*

NAD *Nicotinamidadenindinukleotid*

NADP *Nicotinamidadenindinukleotidphosphat*

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

NPN *Neuropoietin*

PacO *pacific orange succinimidyl ester*

pAdj *bereinigten P*

PBMC *peripheral blood mononuclear cell*

PBS *phosphate buffered saline*

PBS-T *phosphate buffered saline Tween-20*

PFA *Paraformaldehyd*

PI3K *Phosphatidylinositol 3-Kinase*

PRR *pattern recognition receptor*

REVIGO *Reduce + Visualize Gene Ontology*

RPM *Umdrehungen pro Minute*

SIRP α *signal regulatory protein α*

SSC *side scatter*

STAT *signal transducer and activator of transcription*

t-SNE *t-distributed stochastic neighbor embedding*

TGF β *transforming growth factor β*

TipDC *tumor-necrosis factor and inducible nitric-oxide synthase-producing dendritic cell*

TLR Toll-like Rezeptor

TNF α Tumornekrosefaktor α

TSB *tryptic soy broth*

1 Zusammenfassung

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches essentielle Funktionen im Immunsystem hat. Es reguliert verschiedene Prozesse sowohl der angeborenen Immunität, einschließlich der Differenzierung und Rekrutierung myeloider Zellen, als auch der adaptiven Immunität, wo es essentiell für die Inhibition der Reifung regulatorischer T-Zellen und die Induktion von T_H17-Zellen ist. *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) ist ein Umweltbakterium, welches auch Menschen infiziert und eine Listeriose verursachen kann. Risikogruppen sind immunsupprimierte Personen und Schwangere. In Immunsupprimierten führt die Listerieninfektion zu schweren Krankheitssymptomen mit einer Mortalität von bis zu 30%. In Schwangeren kann *L. monocytogenes* den Fötus infizieren. Folgen sind Fehlgeburten oder lebensbedrohliche Infektionen des Neugeborenen. *L. monocytogenes* ist auch in der Lage Nagetiere zu infizieren und daher ist die Infektion von Mäusen mit *L. monocytogenes* ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung sowohl des angeborenen Immunsystems als auch von T_H1 und CD8 T-Zellantworten.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von IL-6 in der angeborenen Immunantwort der Maus gegen *L. monocytogenes* untersucht. Dafür wurden *Il6ra^{fl/fl} × LysM^{Cre+} (Il6ra^{ΔMyel})* Mäuse mit Listerien infiziert und die frühe Immunantwort analysiert. In diesen Tieren exprimieren die myeloiden Zellen keine Interleukin-6 Rezeptor α -Untereinheit (IL-6R α), was dazu führt, dass in diesen Zellen keine klassische IL-6 Signaltransduktion möglich ist. In diesen Mäusen war die Kontrolle der Bakterien bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion eingeschränkt. Die Akkumulation von myeloiden Zellen in Milz und Leber, den Zielorganen von *L. monocytogenes*, war unbeeinflusst. Des Weiteren zeigten die IL-6R α -defizienten inflammatorischen Monozyten, die entscheidend für die frühe Listerien-Kontrolle sind, einen stärker aktivierten Phänotyp und eine erhöhte Zytokinproduktion im Vergleich zu Zellen aus den Kontrolltieren, wodurch die eingeschränkte Listerienkontrolle nicht erklärt werden kann. Inflammatorische Monozyten von infizierten *Il6ra^{ΔMyel}* Mäusen exprimierten jedoch signifikant weniger CD38 auf ihrer Oberfläche. Die ADP-Ribose-Hydrolase CD38 ist essentiell für die Kontrolle von *L. monocytogenes* durch das angeborene Immunsystem und könnte zumindest teilweise den Phänotyp der *Il6ra^{ΔMyel}* Mäuse erklären. Eine weitere Beobachtung war, dass myeloide Zellen aus *Il6ra^{ΔMyel}* Mäusen in ihrer Fähigkeit zu phagozytieren eingeschränkt

waren, was essentiell für die Kontrolle von spezifischen Erregern ist.

Zusammenfassend konnten wir eindeutig zeigen, dass die klassische IL-6 Signaltransduktion in der Kontrolle von *L. monocytogenes* durch die angeborene Immunantwort der Maus eine wichtige Rolle spielt. Der exakte molekulare Mechanismus konnte noch nicht identifiziert werden, die verminderte CD38-Expression und die eingeschränkte Phagozytoseaktivität der IL-6R α -defizienten inflammatorischen Monozyten könnten aber zumindest zum Teil für diesen Defekt verantwortlich sein.

2 Abstract

IL-6 is a pleiotropic cytokine, which plays an essential role in the immune system. It regulates various processes of innate immunity including the differentiation and recruitment of myeloid cells, as well as of adaptive immunity, where it is essential for the repression of regulatory T cell maturation and the induction of T_H17 cells.

Listeria monocytogenes is an environmental bacterium, which can infect humans and in rare cases cause listeriosis. Risk groups are immunosuppressed patients and pregnant women. In immunosuppressed individuals, listeria can cause severe disease with a mortality rate of up to 30%. In pregnant women, listeria can infect the fetus resulting in miscarriage or life threatening infection of the newborn. Listeria also infect rodents and infection of mice with *L. monocytogenes* is a well-established model for the analysis of innate as well as adaptive T_H1 and CD8 T-cell responses.

In this thesis, the influence of IL-6 on the innate immune response of the mouse against *L. monocytogenes* was analysed. Therefore, *Il6ra*^{fl/fl} × *LysM*^{Cre+} (*Il6ra*^{ΔMyel}) mice were infected with listeria and the quality of the early immune response was characterized. In these animals, myeloid cells do not express the IL-6 receptor, which abrogates classical IL-6 signalling on these cells. Control of bacteria was diminished by the removal of classical IL-6 signalling during the early phase of infection. The accumulation of myeloid cells in target organs was not affected. Cells showed a more pronounced inflammatory phenotype and the cytokine production of cells from *Il6ra*^{ΔMyel} mice was increased. These factors can therefore be excluded as the cause of impaired listeria clearance.

Myeloid cells of *Il6ra*^{ΔMyel} mice, however, expressed significantly less CD38. The ADP ribose hydrolase CD38 is essential for the control of *L. monocytogenes* by the innate immune response and low CD38 expression could therefore be responsible for the defective listeria control.

Furthermore, we could demonstrate that myeloid cells from *Il6ra*^{ΔMyel} mice showed impaired phagocytosis, which is crucial for clearance of specific pathogens.

In conclusion, we could demonstrate, that classical IL-6 signalling plays an important role in innate immunity for the control of *L. monocytogenes*. The exact molecular mechanism,

however, remains unidentified but might involve low CD38 expression on and impaired phagocytosis by myeloid cells.

3 Einleitung

3.1 *Listeria monocytogenes*

3.1.1 Biologie

Listeria monocytogenes (*L. monocytogenes*) ist ein gram-positives, nicht-sporenbildendes und fakultativ anaerobes Bakterium, das zum Stamm der *Firmicutes* gehört. *L. monocytogenes* ist stäbchenförmig und 0,4-0,5 μM groß. Seine Motilität wird über Flagellen erzeugt. Die Zellwand von *L. monocytogenes* besteht aus Peptidoglycan, diversen Kohlenwasserstoffen, Teichon- und Lipoteichonsäure (LTA), welches als amphipatisches Molekül eine ähnliche Rolle wie Lipopolysaccharid (LPS) in gram-negativen Bakterien übernimmt [1]. Das komplette Genom von *L. monocytogenes* besteht aus 2853 proteinkodierenden Genen [2]. Listerien kommen sowohl in der Umwelt, wie zum Beispiel in Böden oder Gewässern, als auch in kontaminierten Lebensmitteln [3], als auch in der Darmflora von bis zu 5% der gesunden Bevölkerung vor [4].

3.1.2 Pathogenese

L. monocytogenes ist ein humanpathogener Erreger und Verursacher der Krankheit Listeriose. Die Listeriose ist eine sehr seltene Krankheit, führt jedoch in bis zu 30% der Fälle zum Tode [4]. Häufigste Ansteckungsart ist der Verzehr von kontaminierten Lebensmitteln [3]. Risikogruppen sind Patienten, die Immunmodulatoren wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor α (TNF α)-Blocker nehmen, und schwangere Frauen. Da Listerien plazentagängig sind, können sie den Fötus infizieren. Folgen sind Aborte oder lebensbedrohliche Infektionen des Neugeborenen [5]. Nach der Aufnahme über die Nahrung dringen die Listerien in das Darmepithel ein. Von dort aus können sie in die Blutbahn übergehen und in den gesamten Organismus disseminieren. Wichtige Zielorgane sind Milz und Leber, und in den Risikogruppen Gehirn und Plazenta. *L. monocytogenes* entgeht dem humoralen Immunsystem, indem es Zellen infiziert und intrazellulär proliferiert. Primäre Zielzellen sind phagozytische Zellen und Epithelzellen in den Zielorganen.

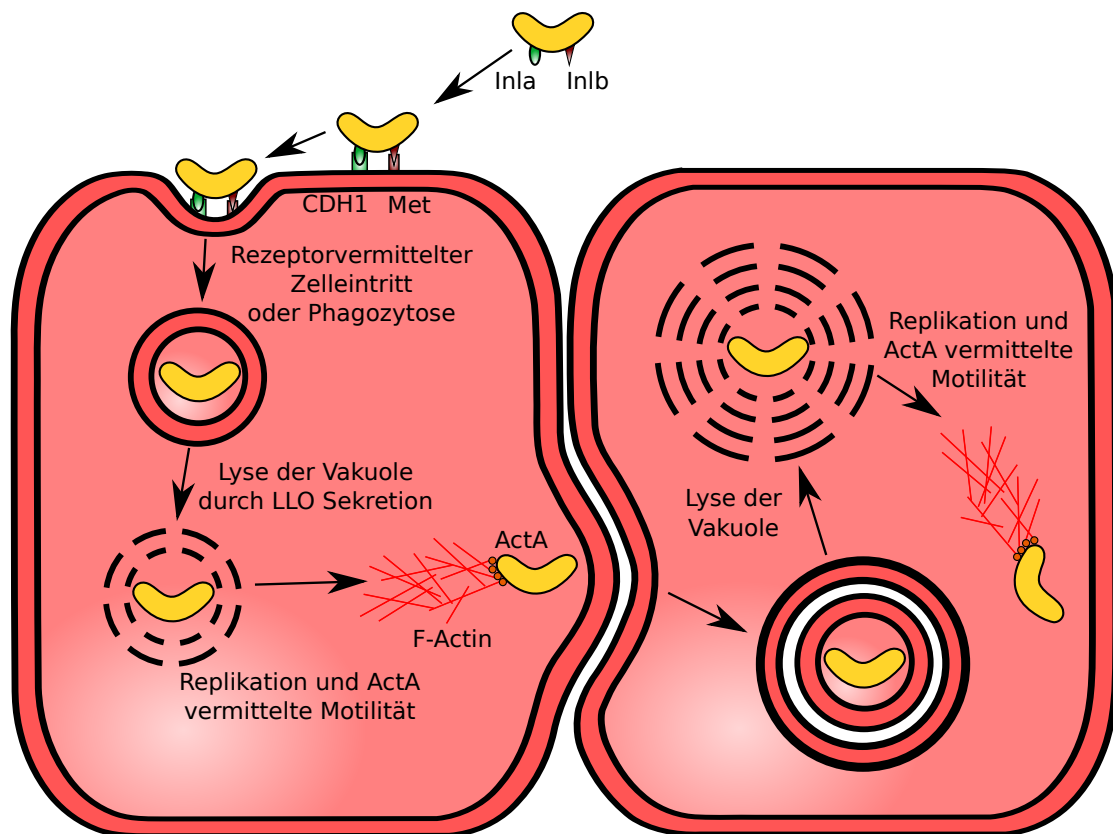


Abbildung 3.1: **Schematische Darstellung der intrazellulären Lebensweise von *L. monocytogenes***

L. monocytogenes dringt initial in die Wirtszellen durch Phagozytose oder mithilfe seiner Oberflächenproteine Internalin A (InlA) oder Internalin B (InlB) ein. InlA und InlB binden an E-Cadherin (CDH1) beziehungsweise an die Tyrosinproteinkinase Met (MET) der Wirtszellen. Einmal eingedrungen sezernieren die Bakterien das Hämolyysin Listeriolysin O (LLO), welches die Vakuole lysiert und das Bakterium ins Zytosol entlässt, wo es sich repliziert. Hier nutzt *L. monocytogenes* die zelleigene Aktin-Maschinerie durch das bakterielle Protein *actin assembly-inducing protein* (ActA) zur Fortbewegung. Es verbreitet sich, indem es direkt in andere Zellen durch Doppelmembranvakuolenbildung eindringt. Dort beginnt der Zyklus dann erneut.

Zum initialen Eindringen in Zellen kann das Bakterium zwei verschiedene Oberflächenmoleküle, Internalin A (InlA) und Internalin B (InlB), verwenden. InlA ist ein kovalent mit der Bakterienzellwand verbundenes Molekül, welches an E-Cadherin (CDH1) von Epithelzellen

bindet [6]. CDH1 ist ein Adhäsionsmolekül, das an *Adherens Junctions* beteiligt ist. CDH1 bindet mit seinen intrazellulären Domänen an das Zytoskelett der Zelle und mit seinen extrazellulären Domänen an CDH1 Proteine von benachbarten Zellen, um so feste Zell-Zell Verbindungen zu erzeugen [7]. Die Interaktion von InlA mit der extrazellulären Domäne von CDH1 induziert Veränderungen des Zytoskeletts, welche essentiell für den Eintritt der Bakterien in die Zellen sind. Die Interaktion zwischen InlA und CDH1 ist auch für das Durchdringen der Bluthirnschranke notwendig. InlA bindet sehr gut an das humane CDH1, aber nur sehr schlecht an das Maus CDH1. Dies ist auch der Grund, warum Listerien im Menschen, aber nicht in der Maus, in der Lage sind das Gehirn zu befallen [8]. Mäuse sind deshalb im Vergleich zum Menschen auch relativ resistent gegenüber dem oralen Übertragungsweg. Durch die transgene Expression des humanen CDH1 in der Maus ist es jedoch möglich, den natürlichen Infektionsweg und die Infektion des Gehirns in einem Mausmodell zu betrachten [9].

InlB bindet an die Tyrosinproteinkinase Met (MET) der Wirtszelle. Der natürliche Ligand von MET ist der *hepatocyte growth factor* (HGF) [10]. Die Bindung von InlB an MET führt zur Aktivierung der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) und der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) [10]. Die Aktivierung dieser Kinasen führt, ähnlich dem Mechanismus der InlA mediierten Listerien-Aufnahme, zu Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts, welche die Vakuolenbildung und Internalisierung des Bakteriums bewirken.

Sobald *L. monocytogenes* in die Wirtszelle eingedrungen ist, sei es rezeptorvermittelt oder durch Phagozytose, sezerniert das Bakterium das Hämolysin Listeriolysin O (LLO) um aus der Vakuole zu entkommen und ins Zytoplasma einzudringen. LLO ist ein porenformendes Toxin, welches zu einer unter gram-positiven Bakterien weit verbreiteten Familie an Toxinen gehört [11]. *L. monocytogenes* ist jedoch der einzige Vertreter, der das porenformende Toxin innerhalb der Wirtszelle exprimiert. Da der Lebenszyklus der Listerien intrazellulär stattfindet, muss die Aktivität von LLO strikt reguliert werden, damit die Wirtszelle nicht vorzeitig zerstört wird. Dies geschieht auf zwei Arten. Zum einen liegt das pH-Optimum von LLO bei einem pH Wert von 5,5 [11]. Das bedeutet, dass LLO besonders aktiv in der angesäuerten Umgebung des Phagosoms, jedoch nicht in der pH neutralen Umgebung des Zytosols, ist. LLO formt Poren in Membranen, indem es mit anderen LLO Einheiten oligomerisiert und mit seinen β -Haarnadeln die Zellmembran durchdringt. Diese β -Haarnadeln denaturieren jedoch in einer pH-neutralen Umgebung, wodurch das Toxin im Zytosol automatisch deaktiviert wird [12]. Zum anderen verfügt LLO über eine PEST-Sequenz. PEST-Sequenzen sind Teile von Proteinen, in denen vermehrt die Aminosäuren Prolin (**P**), Glutamat (**E**), Serin (**S**) und Threonin (**T**) vorkommen. Proteine, die solche PEST-Sequenzen enthalten, werden rasch durch eine Ubiquitin-vermittelte Proteolyse vom Proteasom abgebaut [13]. Obgleich LLO

über ein derartiges Sequenzmotiv verfügt, wird es nicht über das Proteasom verdaut. Vermutlich wird jedoch die LLO-Produktion im Zytosol über die Sequenz kontrolliert, da Mutationen im PEST-Sequenzmotiv zu höheren LLO-Leveln im Zytosol führen, die zu einer Schädigung der Zelle führen könnten [14].

Einmal im Zytosol angekommen nutzt *L. monocytogenes* das zelleigene Aktin um sich durch das Zytosol zu bewegen und in benachbarte Zellen einzudringen [15]. Listerien sind in der Lage Aktin mittels des bakteriellen Oberflächenproteins *actin assembly-inducing protein* (ActA) direkt an der Bakterienoberfläche zu polymerisieren [16].

3.2 Die Rolle des angeborenen Immunsystems in der Kontrolle von *L. monocytogenes*

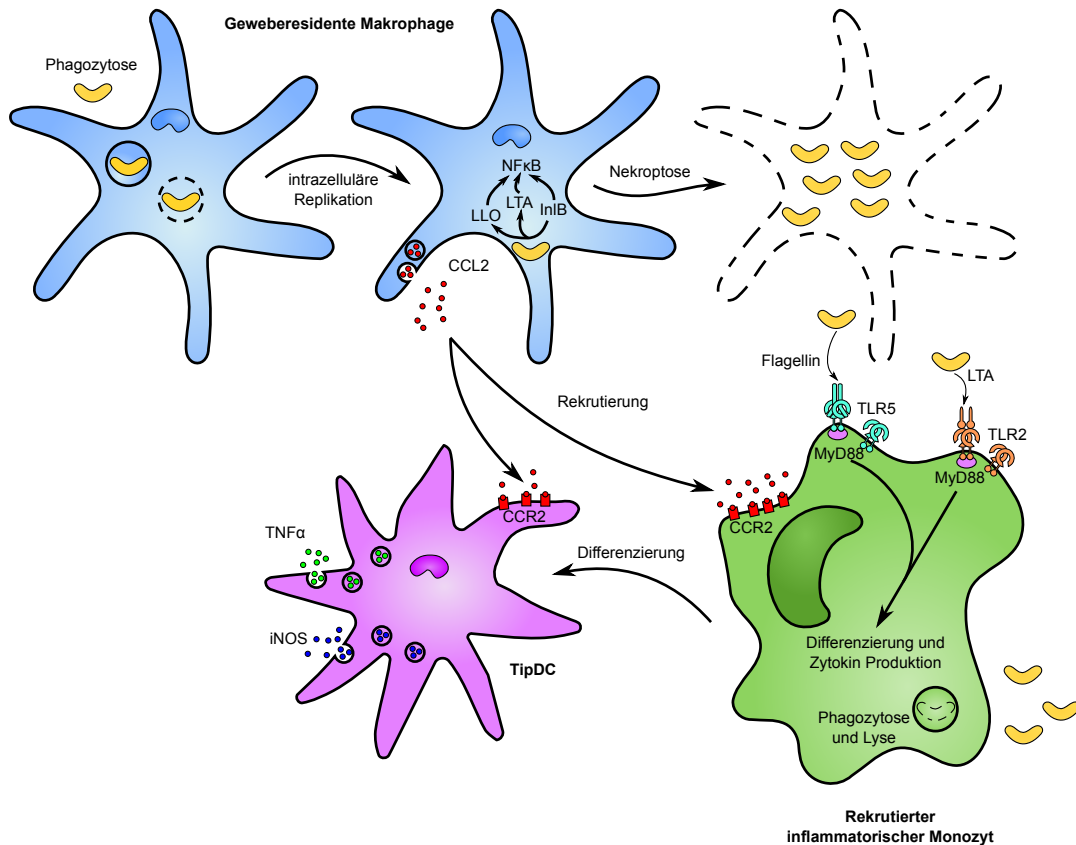


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Monozytenreifung während der Infektion mit *L. monocytogenes*

Nachdem die Listerien durch die Blutbahn in die peripheren Organe gelangen, werden sie dort von den geweberesidenten Makrophagen phagozytiert. Die Makrophagen erkennen die mikrobiellen Produkte, was den proinflammatorischen *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NFκB)-Signalweg und die Produktion von CCL2 induziert. Über CCL2 werden inflammatorische Monozyten im Knochenmark mobilisiert, die dann in die infizierten Organe wandern. In den infizierten Organen erkennen die Zellen über Toll-like Rezeptoren (TLRs) mikrobielle Produkte, welche nach der Nekroptose der gewebeständigen Makrophagen freigesetzt werden. Über den *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88)-Signalweg differenzieren diese Monozyten zu *tumor-necrosis factor and inducible nitric-oxide synthase-producing dendritic cells* (TipDCs), welche TNFα und die induzierbare NO-Synthase (iNOS) produzieren.

Nachdem *L. monocytogenes* nach der initialen Aufnahme über die Nahrung das Darmepithel überwunden hat und über die Blutbahn im gesamten Organismus disseminiert ist, dringt der Erreger, um der humoralen Antwort zu entgehen, in periphere Organe ein. Die Infektion erfolgt hier primär in den gewebeständigen Makrophagen, wie zum Beispiel in den leberresidenten Kupffer-Zellen, da diese als initiale Wächter fungieren und ankommende Pathogene abfangen und anfänglich kontrollieren [17]. Nach der Phagozytose wird das Phagosom durch das sezernierte LLO lysiert und die Listerien dringen in das Zytoplasma ein. Dort angekommen wird der Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF κ B) aktiviert, wodurch die Makrophagen aktiviert werden. Auslöser dieser Aktivierung sind zum einen die LTA der bakteriellen Zellwand [18], LLO [19] oder InlB [20].

Auch wird durch die Infektion der Makrophagen und die Sekretion von LLO die Produktion von CCL2 induziert [17]. CCL2, der Hauptligand des C-C Chemokinrezeptor Type 2 (CCR2), ist ein Chemokin, welches die Mobilisierung von Monozyten aus dem Knochenmark induziert [21]. CCL2 ist essentiell für die Mobilisierung von inflammatorischen Monozyten und die Kontrolle von *L. monocytogenes* in der frühen Phase der Immunantwort [22].

Die Infektion der gewebeständigen Makrophagen führt zu einem verfrühten nekroptotischen Tod der Makrophagen, insbesondere der Kupffer-Zellen in der Leber [23]. Durch die Nekroptose der Kupffer-Zellen gelangen wiederum Listerien und mikrobielle Produkte der Listerien in den extrazellulären Raum. Diese werden von den rekrutierten Monozyten mithilfe des Toll-like Rezeptor (TLR)2, welcher von Peptidoglycanen und LTA der Listerienzellwand aktiviert wird [24], und TLR5, welcher die Flagelline der Listerien bindet [25], erkannt. Die Aktivierung eines TLR führt zur Weiterleitung des Signals über *myeloid differentiation primary-response protein 88* (MyD88), welches als Adapterprotein von vielen TLRs essentiell für die Immunantwort gegen *L. monocytogenes* ist [24]. Der MyD88-Signalweg führt zur Aktivierung von inflammatorischen Zellen, ist für deren Rekrutierung jedoch nicht verantwortlich.

Die Nekroptose der geweberesidenten Makrophagen und das darauf folgende Freiwerden von Zytokinen, Chemokinen und bakterieller Moleküle sorgt für ein proinflammatorisches Milieu und für die Rekrutierung und Differenzierung von Zellen, die für die Kontrolle der Infektion zuständig sind [23].

Ein für die Klärung der Listerien wichtiger Zelltyp, in den die rekrutierten Monozyten differenzieren, ist die so genannte *tumor-necrosis factor and inducible nitric-oxide synthase-producing dendritic cell* (TipDC) [26]. TipDCs exprimieren CCR2 und werden somit durch CCL2 zum Entzündungsherd geführt und produzieren sowohl TNF α als auch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und tragen damit zur Kontrolle der Infektion bei. TNF α ist besonders in der frühen Phase der Antwort gegen *L. monocytogenes* von elementarer Bedeutung. Es wird

früh exprimiert und wirkt in dieser Phase durch einen T-Zell unabhängigen Mechanismus [27]. $\text{TNF}\alpha$ hat eine Vielzahl an Funktionen, die an der Klärung von Infektionen beteiligt sind. Zum einen induziert es die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel IL- 1β , IL-6 und Interferon- γ ($\text{IFN}\gamma$). Zum anderen ist $\text{TNF}\alpha$ ein wichtiger Aktivator von Makrophagen und Monozyten. $\text{TNF}\alpha$ induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies [28], die Produktion des inflammatorischen Lipids Prostaglandin E2 [29] und die positive Regulation der phagozytischen Aktivität [30]. Das von den TipDCs produzierte Enzym iNOS synthetisiert Stickstoffmonoxid. Stickstoffmonoxid ist ein bioaktives Molekül, welches aufgrund seiner geringen Größe effizient in Zellen eindringen kann und dort zur Apoptose führt [31], was im speziellen wichtig für die Klärung der ansonsten schwierig zu erreichenden intrazellulären Listerien ist.

Zusammen mit den rekrutierten phagozytierenden inflammatorischen Monozyten sorgen die TipDCs für die Beseitigung der Erreger. Während der Infektion werden basophile Granulozyten rekrutiert, welche große Mengen IL-4 produzieren. Monozyten erkennen IL-4 und differenzieren zu M2 Makrophagen, welche die zu Grunde gegangenen geweberesidenten Makrophagen ersetzen und entstandene Gewebeschäden reparieren [23]. Eine robuste angeborene Immunantwort, die hauptsächlich von Makrophagen und Monozyten mediiert wird, ist somit essentiell für die initiale Kontrolle der Infektion und Wundheilung des Gewebes.

3.2.1 Typ 1 und Typ 2 Makrophagen

Makrophagen lassen sich in zwei verschiedene Subtypen unterteilen. Die proinflammatorischen Typ 1 (M1) Makrophagen, auch klassisch-aktivierte Makrophagen genannt, stammen von inflammatorischen Monozyten ab. Das Zytokin, welches für die Differenzierung primär verantwortlich ist, ist $\text{IFN}\gamma$ [32]. $\text{IFN}\gamma$ wird hauptsächlich von $\text{T}_\text{H}1$ -Zellen produziert, jedoch sind auch NK-Zellen und Makrophagen in der Lage gerade in der frühen Phase der Immunantwort $\text{IFN}\gamma$ zu bilden. Die Aktivierung des $\text{IFN}\gamma$ -Signalwegs in inflammatorischen Monozyten sorgt für die Expression einer Reihe von Zytokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen [33]. $\text{IFN}\gamma$ als Stimulus allein ist nicht ausreichend für die Differenzierung der M1 Makrophagen, ein sekundäres Signal über sogenannte *pattern recognition receptor* (PRR) ist erforderlich [34]. Zu der Gruppe dieser Rezeptoren gehören die in Abschnitt 3.2 bereits erwähnten TLR2, welcher LPS und LTA erkennt, und TLR5, welcher Flagellin erkennt. Die Signalweiterleitung erfolgt unter anderem durch $\text{NF}\kappa\text{B}$ und MyD88, wodurch im Zusammenspiel mit $\text{IFN}\gamma$ die Differenzierung der M1 Makrophagen ausgelöst wird.

M1 Makrophagen haben einen überwiegend proinflammatorischen Phänotyp. Die Phagozytose von Pathogenen ist erhöht [35] und die Klärung von Bakterien über Stickstoffmonoxid-

Produktion wird induziert [36].

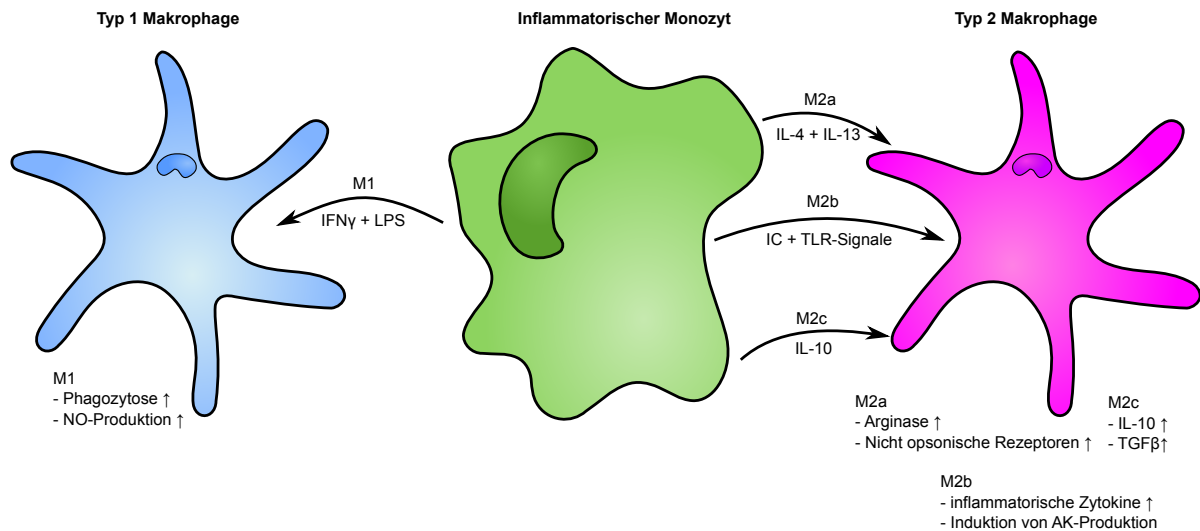


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Polarisierung von Makrophagen

Makrophagen können in zwei funktionell unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden. Die Differenzierung in proinflammatorische M1 Makrophagen erfolgt über die Stimulation durch TLR-Liganden und IFN γ , wodurch unter anderem Phagozytose und NO-Produktion induziert wird. Antiinflammatorische M2 Makrophagen lassen sich in drei Subtypen aufteilen. M2a Makrophagen, stimuliert durch IL-4 und IL-13, exprimieren Arginase und nicht opsonische Rezeptoren. M2b Makrophagen, stimuliert durch Immunkomplexe (IC) und TLR-Signale, induzieren die Antikörper-Produktion. M2c Makrophagen, stimuliert durch IL-10, exprimieren die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und *transforming growth factor* β (TGF β).

Typ 2 (M2) Makrophagen, auch alternativ-aktivierte Makrophagen genannt, unterscheiden sich aufgrund der für die Differenzierung verantwortlichen Zytokine und in ihren Funktionen von den M1 Makrophagen. Bei M2 Makrophagen kann zusätzlich noch zwischen drei Subtypen unterschieden werden.

Der erste Subtyp sind die so genannten M2a Makrophagen. Die Differenzierung wird hauptsächlich durch die Zytokine IL-4 [37] und IL-13 [38] vermittelt. Die identische Funktion von IL-4 und IL-13 im Zusammenhang mit der Differenzierung von Makrophagen ist auf eine gemeinsamen Rezeptoruntereinheit, der Interleukin-4 Rezeptor α -Untereinheit (IL-4R α), zurückzuführen [39]. Die Expression von IL-4R α wird unter anderem durch IL-6 induziert [40]. Da die IL-4R α -Untereinheit jeweils der signaltransduzierende Teil in den Rezeptoren von IL-4 und IL-13 ist, wird bei beiden Zytokinen der *signal transducer and activator of transcripti-*

on (STAT)6 Signalweg aktiviert. Ein Haupteffektor von M2a Makrophagen ist das Enzym Arginase. Das Substrat der Arginase ist die Aminosäure Arginin. iNOS benutzt das gleiche Substrat zur Produktion von Stickstoffmonoxid. Durch die Konkurrenz um Arginin verhindert die Arginase die Produktion von Stickstoffmonoxid. Zusätzlich unterstützt die Arginase direkt die Gewebereparatur, da die Umwandlung von Arginin zu L-Ornithin und Urea von dem Enzym katalysiert wird. Das so entstandene L-Ornithin wird zur Kollagenbiosynthese genutzt, welche eine Voraussetzung für das Einsetzen der Gewebereparatur ist [41]. Auch sind nicht opsonische Rezeptoren hochreguliert, welche für das Abklingen der Inflammation eine Rolle spielen, wie zum Beispiel der *macrophage mannose receptor* (MMR1). Dieser ist an der Erkennung, Phagozytose und Beseitigung von zirkulierenden proinflammatorischen Proteinen beteiligt [42].

Der zweite Subtyp wird M2b Makrophagen genannt. Die Differenzierung dieser Gruppe wird durch die gleichzeitige Aktivierung von TLRs und Erkennung von Immunkomplexen ausgelöst. Charakteristisch für M2b Makrophagen ist die erhöhte Produktion an proinflammatorischen Zytokinen und Induktion der Antikörperproduktion [43].

Der dritte Subtyp sind die M2c Makrophagen. Die Differenzierung dieser Gruppe wird durch IL-10 induziert. M2c Makrophagen produzieren unter anderem selbst IL-10, was auch von den anderen Subtypen in einem geringen Umfang gebildet wird, und *transforming growth factor* β (TGF β) [44]. M2c Makrophagen wirken aufgrund ihres Zytokinprofils immunsuppressiv.

M1 und M2 Makrophagen sind zwar funktionell stark unterschiedlich, dennoch sind die Übergänge, im Gegensatz zur Unterteilung von T-Zellen, fließend und die genaue Abgrenzung ist nicht immer eindeutig möglich.

3.3 Die Rolle des adaptiven Immunsystems in der Immunantwort gegen *L. monocytogenes*

Die adaptive Immunantwort besteht aus zwei Komponenten, zum einen der humorale, B-Zell vermittelte und zum anderen der zelluläre, T-Zell vermittelte Teil. Die humorale Antwort spielt aufgrund der Tatsache, dass Listerien einen intrazellulären Lebenszyklus aufweisen, eine untergeordnete Rolle in der Antwort gegen *L. monocytogenes*.

$\gamma\delta$ T-Zellen sind ein T-Zellsubtyp mit einem invarianten T-Zellrezeptor. $\gamma\delta$ T-Zellen sind in der frühen Phase der Infektion wichtig, indem sie als Antwort auf konservierte bakterielle Strukturen IFN γ produzieren und somit zur Aktivierung von proinflammatorischen Makrophagen beitragen [45].

Die zelluläre Immunantwort, welche für die Kontrolle der Listerieninfektion entscheidend ist, wird durch CD4⁺ und CD8⁺ αβ T-Zellen vermittelt. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen sind in der Lage über die Erkennung von Antigenen des Pathogens mithilfe des T-Zellrezeptors Zellen zu identifizieren, die von Listerien befallen wurden und diese zu lysieren. Die Lyse der infizierten Zellen ermöglicht den Makrophagen die Listerien zu phagozytieren und zu beseitigen. Zielzellen präsentieren dabei die Antigene über das Oberflächenmolekül *major histocompatibility complex* (MHC).

Es gibt zwei verschiedene Subtypen an listerienspezifischen CD8⁺ T-Zellen, die sich anhand der von ihnen erkannten MHC-Subtypen identifizieren lassen. Listerienspezifische CD8⁺ T-Zellen, die Antigene über MHC Ib erkennen und nur für das Immunsystem der Maus beschrieben wurden, erreichen ihre größte Verbreitung an Tag 5-6 nach der Infektion [46]. MHC Ib präsentiert N-formylierte bakterielle Peptide. Diese lipophilen Peptide dienen in bakteriellen Proteinen als Signalpeptide für die Lokalisation und werden innerhalb der Bakterien abgespalten und sezerniert [47]. Da die Peptide bereits innerhalb der Bakterien prozessiert werden, können sie direkt auf die MHC Ib Moleküle geladen und von diesen den T-Zellen präsentiert werden. Diese Peptide können auch gleichzeitig über die Aktivierung des Formylpeptidrezeptor (FPR) als Chemoattraktant von neutrophilen Granulozyten fungieren [48, 49]. Die über die Erkennung von MHC Ib aktivierten T-Zellen sind zytotoxisch und produzieren IFN γ [50]. Außerdem unterstützen sie dendritische Zellen darin T-Helferzellen zu primen [51]. MHC Ib spezifische CD8⁺ T-Zellen entstehen in einer frühen Phase der adaptiven Immunantwort und sind essentiell für die Kontrolle der Listerien während der Primärinfektion [52], tragen jedoch wenig zum immunologischen Gedächtnis und somit zur Kontrolle einer Sekundärinfektion bei [46]. Sie besitzen eine geringe Spezifität und können deshalb schneller expandieren, um früh auf pathogene Bakterien zu reagieren zu können. Zytotoxische T-Zellen, die spezifisch für konventionelles MHC Ia sind, erkennen über ihren Rezeptor Peptide von bakteriellen Proteinen, die über das Proteasom verdaut wurden. Viele sezernierte Virulenzfaktoren werden während bakterieller Infektionen von CD8⁺ T-Zellen erkannt, bei Listerien zählt vor allem LLO dazu [53]. Die Anzahl von MHC Ia spezifischen T-Zellen erreichen ihre Höchstwerte an Tag 8 der Listerieninfektion [54]. Nach der Erkennung bakterieller Peptide über den T-Zellrezeptor läuft die klonale Expansion der CD8⁺ T-Zellen antigenunabhängig ab [55].

Zusätzlich zur Stimulation über den T-Zellrezeptor ist eine Kostimulation essentiell für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen. CD8⁺ T-Zellantworten sind verringert, wenn Stimulation über CD28 [56] oder über weitere kostimulatorische Proteine wie 4-1BB [57] oder ICOS [58] verhindert wird.

Am CD8⁺ T-zellvermittelten Schutz gegen Listerien sind proinflammatorische Effektoren wie

zum Beispiel $\text{TNF}\alpha$, Perforin und $\text{IFN}\gamma$ beteiligt. Diese Mechanismen weisen jedoch Redundanzen auf und sind nicht alleine für den Schutz verantwortlich [59, 60]. Wahrscheinlich sind noch weitere unbekannte Mechanismen an der CD8^+ T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* beteiligt.

Die Bildung von CD8^+ Gedächtniszellen, die verantwortlich für die Beseitigung von Sekundärinfektionen ist, ist abhängig von der Unterstützung durch CD4^+ T-Helferzellen. Die Kinetik der T-Helferzellen ist gleich mit der Kinetik der CD8^+ T-Zellen, das heißt, die höchste Anzahl an T-Helferzellen ist an Tag 8 nach Infektion erreicht [61]. CD4^+ T-Helferzellen produzieren $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IFN}\gamma$, wodurch Makrophagen und Granulozyten rekrutiert und aktiviert werden, und unterstützen so die Immunantwort gegen *L. monocytogenes*. CD4^+ regulatorische T-Zellen hingegen sind in der Lage die Bildung von CD8^+ Gedächtniszellen zu unterdrücken [62].

3.4 Interleukin-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften aufweist. IL-6 ist Namensgeber einer eigenen Zytokinfamilie, zu der unter anderem IL-11, IL-27, IL-31, *leukemia inhibitory factor* (LIF), Neuropoietin (NPN) und *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) gehören [63]. Das Grundgerüst von IL-6 besteht aus vier Helices. Helix A und B verlaufen parallel in die gleiche Richtung, während Helix C und D gegenläufig ausgerichtet sind (siehe Abbildung 3.4) [64].

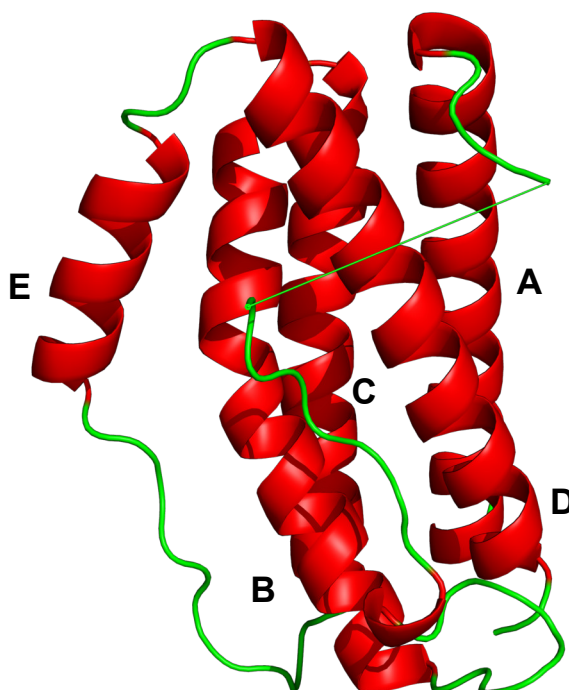


Abbildung 3.4: **Kristallstruktur von Interleukin-6**

Das Grundgerüst von IL-6 besteht aus vier Helices. Sowohl Helix A und B als auch Helix C und D verlaufen parallel in die gleiche Richtung, ermöglicht durch eine lange Schleife zwischen den Helices. Helix B und C sind durch eine kurze Schleife verbunden, durch die der Verlauf der Helices gegenläufig ist. Helix E ist eine kurze zusätzliche Helix in der zweiten Schleife [64].

IL-6 besteht aus 185 Aminosäuren. Die Struktur wird durch hydrophobe Wechselwirkung im Kern zusammengehalten. Die vier Haupthelices werden durch Wasserstoffbrückenbindun-

gen stabilisiert, eine zwischen Helix B und C und zwei zwischen Helix C und D. IL-6 wird hauptsächlich von Stroma- und Immunzellen, wie zum Beispiel Monozyten [65] oder CD4⁺ T-Zellen [66], produziert. Die IL-6-Expression wird in Makrophagen primär über IL-1 β und TNF α [67] induziert. IL-6 wird rasch als Reaktion auf Infektion und chronisch in Autoimmun- oder Tumorerkrankungen exprimiert. Das Serumlevel von IL-6 kann ausgehend von einem basalen Level von 1-5 pg/ml bis hin zum μ g/ml Bereich in Extremfällen ansteigen.

3.4.1 Biologische Funktion von IL-6

IL-6 wird im Verlauf von vielen Erkrankungen gebildet. Eine IL-6 Defizienz in Mausmodellen führt zur Suszeptibilität gegenüber verschiedener Infektionen mit viralen [68], bakteriellen [69] oder parasitären Erregern [70]. Wie viele Zytokine mit proinflammatorischen Eigenschaften ist IL-6 an der Pathogenese von vielen Krankheiten beteiligt. Dazu zählen zum Beispiel die juvenile Arthritis [71], die rheumatoide Arthritis [72] und Morbus Castleman [73]. In der angeborenen Immunantwort spielt IL-6 durch seine pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften eine wichtige Rolle. IL-6 ist wichtig für die Hämatopoese und Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten [74], was zu einem proinflammatorischen Milieu führt. IL-6 ist auch verantwortlich für den Übergang der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zur Rekrutierung von mononukleären Zellen im Laufe von Infektionen und Entzündungen [75]. IL-6 induziert die Expression des *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF)-Rezeptors und stimuliert dadurch die Differenzierung der rekrutierten Monozyten zu Makrophagen [76]. Eine IL-6 Defizienz in Mäusen führt jedoch zu verminderter Leberregeneration [77]. Des Weiteren induziert IL-6 auf Monozyten den IL-4R α , was zur alternativen Aktivierung von antiinflammatorischen Makrophagen führt [40].

IL-6 beeinflusst auch verschiedene Parameter der adaptiven Immunantwort. IL-6 defiziente Mäuse weisen eine niedrigere Antikörper-Produktion auf [78] und regulatorische B-Zellen werden durch IL-6 induziert [79]. Eine weitere Achse, wie IL-6 die humorale Immunantwort beeinflusst, ist über die Stimulation von T-follikulären Helferzellen (T_{FH}-Zellen). Diese Helferzellen befinden sich in B-Zellfollikeln und unterstützen dort B-Zell Proliferation und Klassenwechsel. IL-6 ist in der Lage T_{FH}-Zellen zu induzieren, indem es die Produktion von IL-21 fördert [80]. IL-6 ist außerdem entscheidend für die Differenzierung von T_H17-Zellen. Zusammen mit TGF β , welches in Abwesenheit von IL-6 die Differenzierung zu antiinflammatorischen regulatorischen T-Zellen veranlasst, induziert IL-6 über die Aktivierung von STAT3 die Expression von ROR γ t, des maßgeblichen Transkriptionsfaktors für T_H17-Zellen [81].

3.4.2 Der IL-6 Rezeptor

Der IL-6 Rezeptor Komplex besteht aus zwei verschiedenen Ketten. Die Interleukin-6 Rezeptor α -Untereinheit (IL-6R α)(CD126) ist ein 80 kDa großes Oberflächenprotein. Es ist in der Lage spezifisch IL-6 zu binden, besitzt jedoch selbst keine Möglichkeit intrazellulär Signale weiterzugeben. IL-6R α wird nur auf Hepatozyten und spezifischen Leukozytensubpopulationen exprimiert [82]. Bindet IL-6 an IL-6R α , so interagiert dieser Komplex mit einem gp130 Molekül. gp130 wird, im Gegensatz zu IL-6R α , ubiquitär exprimiert. gp130 dient auch als signalgebende Untereinheit für die anderen Zytokine der IL-6 Familie, wodurch die überlappende Wirkung der Zytokine erklärt werden kann. Der so entstandene gp130/IL-6/IL-6R α Komplex homodimerisiert mit einem weiteren Komplex und bildet so die hexamere signalgebende Struktur [83]. Die Dimerisierung führt zur intrazellulären Aktivierung der Januskinasen (JAKs). Durch die Aktivierung der Januskinasen wird gp130 phosphoryliert, wodurch die Bindung von STAT1 und STAT3 an den Rezeptor ermöglicht wird. Durch die Bindung werden STAT1 und STAT3 ebenfalls phosphoryliert, was zur Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren führt. Die Transkriptionsfaktor-Dimere wandern nach der Phosphorylierung in den Zellkern und induzieren dort die Expression von Effektormolekülen (siehe Abb. 3.5 **D**).

3.4.3 IL-6 Signaltransduktion

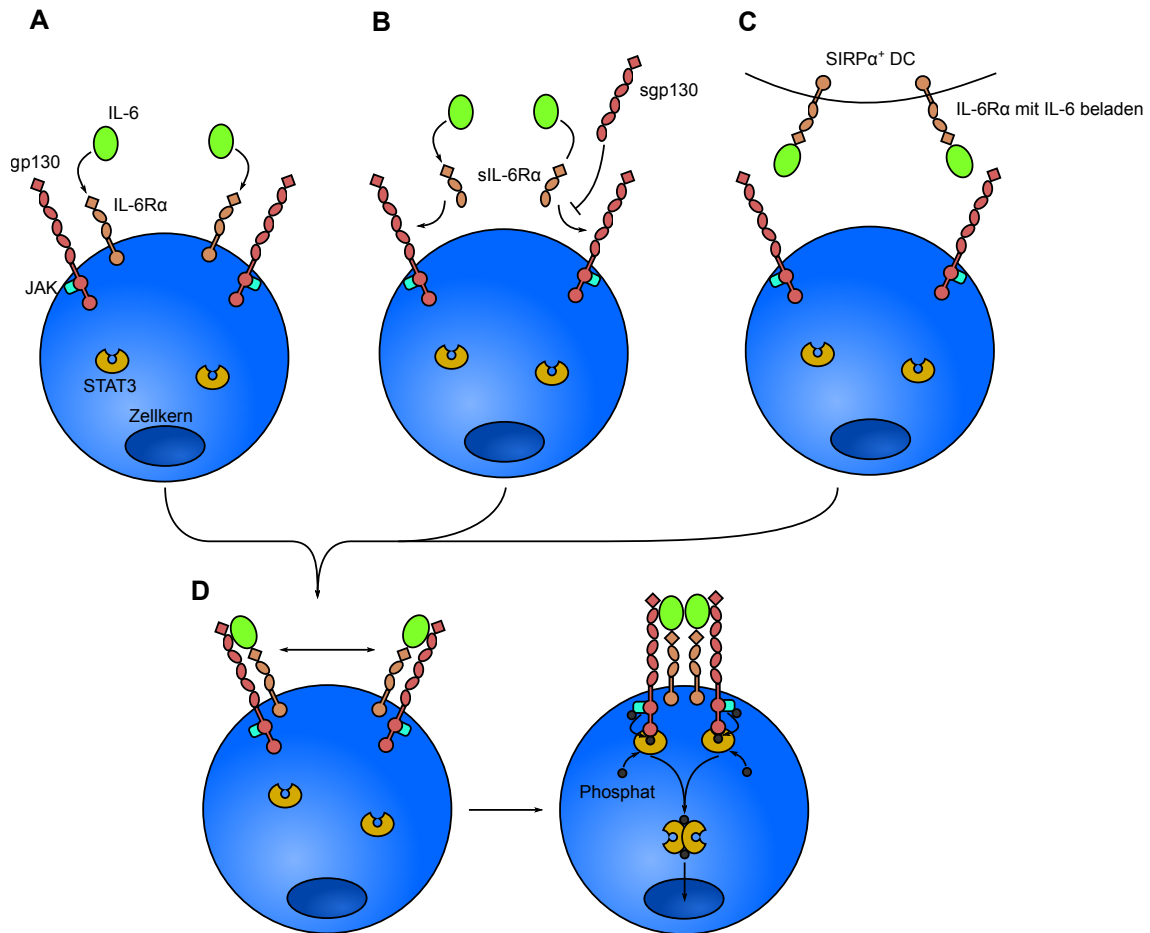


Abbildung 3.5: **Schematische Darstellung der verschiedenen IL-6 Signalwege**

(A) Klassische IL-6 Signaltransduktion: IL-6 bindet an den membranständigen IL-6R α , der daraufhin mit dem membranständigem gp130 dimerisiert. (B) Trans-Signaltransduktion: IL-6 bindet an den löslichen IL-6R α (sIL-6R α). Der IL-6/sIL-6R α /Komplex interagiert mit membranständigem gp130, was durch lösliches gp130 (sgp130) inhibiert werden kann. (C) Cluster-Signaltransduktion: *signal regulatory protein α* (SIRP α)⁺ dendritische Zellen präsentieren während der immunologischen Synapse mit IL-6 beladenen IL-6R α , der mit gp130 auf der T-Zelle interagiert. (D) Unabhängig vom aktivierten Signalweg multimerisieren zwei Rezeptorkomplexe zu dem hexameren Signalkomplex. JAK wird autophosphoryliert, was zur Phosphorylierung von gp130 führt. STAT3 bindet an das phosphorylierte gp130 und wird ebenfalls phosphoryliert, was zur Homodimerisierung und Translokation in den Zellkern führt, wodurch die Transkription von Zielgenen induziert wird.

Die Signalübertragung über die Bildung des hexameren Komplexes wird klassische IL-6 Signaltransduktion (Abb. 3.5 A) genannt. Aufgrund der limitierten Expression des IL-6R α ist die klassische IL-6 Signaltransduktion nur für wenige Zelltypen relevant. Die klassische IL-6 Signaltransduktion kontrolliert diverse Prozesse *in vivo*, wie zum Beispiel die Akute-Phase-Reaktion, Hämatopoese, Glukose-Metabolismus und Regulation des neuroendokrinen Systems [84].

Lösliche Versionen des IL-6R α (sIL-6R α) sind in ebenfalls in der Lage IL-6 im Serum zu binden. Diese IL-6/sIL-6R α Komplexe binden nun wiederum an membranständiges gp130 und lösen dort die Signalkaskade aus. Dadurch wird das Wirkspektrum von IL-6 auf alle somatischen Zellen des Organismus erweitert [85]. Dieser Signalweg wird Trans-Signaltransduktion genannt (Abb. 3.5 B). Durch die Erweiterung des Spektrums an rezeptiven Zellen unterscheidet sich die Wirkung der Trans- zur klassischen IL-6 Signaltransduktion [63].

Lösliches IL-6R α kann auf mehrere Arten erzeugt werden. Membranständiger IL-6R α kann durch extrazelluläre Proteasen der *a disintegrin and metalloproteinase* (ADAM)-Familie nahe der Zellmembran abgeschnitten werden, wodurch funktionales sIL-6R α entsteht. Das geschieht in der Maus während akuter Infektion vor allem durch ADAM17 [86], während im Menschen sowohl ADAM10 und ADAM17 verantwortlich sind [87]. Die proteolytische Abspaltung ist nicht alleinig für die Generierung von sIL-6R α verantwortlich. Im Menschen, jedoch nicht in der Maus, wurde eine alternative Spleißform der *Il6ra* mRNA beschrieben [88]. Bei dieser Spleißform ist die komplette Transmembranregion des IL-6R α entfernt, wodurch ein lösliches IL-6R α -Protein entsteht. Als dritte alternative Methode zur Generierung von sIL-6R α wurde die Lokalisierung von IL-6R α auf zirkulierenden Mikrovesikeln identifiziert [89]. IL-6R α auf diesen kleinen Vesikel könnte möglicherweise auch IL-6 binden und mit gp130 auf anderen Zellen eine Bindung eingehen, um somit Trans-Signaltransduktion auszulösen.

Lösliches IL-6R α wird auf einem basalen Level konstitutiv generiert, steigt aber während akuter Inflammation oder Infektion rapide an. Um Trans-Signaltransduktion auf den lokalen Inflammations- oder Infektionsherd zu begrenzen, wird eine lösliche Form von gp130 (sgp130) durch alternatives Spleißen generiert. sgp130 ist in der Lage IL-6/sIL-6R α Komplexe zu binden, bevor sie membranständiges gp130 aktivieren, und hemmt so die Trans-Signaltransduktion. Lösliches gp130 liegt in Homöostase im Überschuss gegenüber sIL-6R α vor, wodurch die Trans-Signaltransduktion inhibiert wird. Im Falle einer Infektion oder Inflammation wird weiteres sIL-6R α und IL-6 generiert. Im Bereich der Infektion oder Inflammation entsteht ein Überschuss an sIL-6R α /IL-6 Komplexen, welcher die Trans-Signaltransduktion auslöst [90].

Die dritte Variante der IL-6 Signaltransduktion ist die so genannte IL-6 Cluster-Signaltrans-

duktion (Abb. 3.5 C). Die *signal regulatory protein* α (SIRP α)-positiven dendritischen Zellen beladen endosomal IL-6R α Moleküle mit ihrem Liganden IL-6. Diese werden dann beladen an die Zelloberfläche transportiert. Bei der Bildung einer immunologischen Synapse mit antigenerkennenden T-Zellen präsentieren die SIRP α -positiven dendritischen Zellen den T-Zellen IL-6/IL-6R α Komplexe. Dadurch wird, gleichzeitig zur T-Zellrezeptorstimulation, ein gp130 Signal ausgelöst. Interessanterweise unterscheiden sich ausgelösten Effekte der gleichzeitig interagierenden Signalwege zu den Effekten, die von den Signalwegen unabhängig voneinander ausgelöst werden [91].

4 Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Analyse der durch IL-6 ausgelösten molekularen Mechanismen und des dafür verantwortlichen Signaltransduktionsweges, welche die angeborene Immunantwort gegen *L. monocytogenes* beeinflussen. Dafür wurde das $Il6ra^{fl/fl} \times LysM^{Cre+}$ ($Il6ra^{\Delta Myel}$) Mausmodell eingesetzt, bei dem die klassische, jedoch nicht die Trans-Signaltransduktion von IL-6 auf inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten deletiert ist. Verschiedene Parameter wurden nach Infektion dieser Mäuse untersucht.

1. Bakterienlast 2 Tage nach Infektion
2. Migrationsfähigkeit der myeloiden Zellen
3. Aktivierungsstatus der inflammatorischen Monozyten
4. Differenzierung der inflammatorischen Monozyten
5. Produktion proinflammatorischer Zytokine durch inflammatorische Monozyten
6. Phagozytoseaktivität der myeloiden Zellen

Die Analyse dieser Parameter sollte einen Überblick verschaffen, inwiefern die klassische IL-6 Signaltransduktion auf die frühe, durch myeloide Zellen vermittelte Immunantwort gegen *L. monocytogenes* wirkt.

5 Material & Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Antikörperliste

Spezifität	Fluorochrom	Klon
CD11b	PerCP	M1/70
CD11b	APC	M1/70
CD11b	PE-Cy7	M1/70
CD206	PerCP	C068C2
CD38	PE-Cy7	90
CD38	PE	90
CD44	PE-Cy7	IM7
CD62L	APC-Cy7	MEL-14
EGR2	PE	erongr2
F4/80	APC	BM8
F4/80	v450	BM8
F4/80	APC-Cy7	BM8
Gr1	APC-Cy7	RB6-8C5
Gr1	v450	RB6-8C5
IFN γ	v450	XMG1.2
IL-1b	APC	NJTEN3
IL-4R	PE	I015F8
IL-6	PE	MP5-20F3
IL-6R α	PE	D7715A7
Ly6C	FITC	AL-21
Ly6C	APC	HK1.4

Tabelle 5.1: Liste der verwendeten Antikörper

5.1.2 Puffer und Lösungen

Ammoniumchlorid-Kalium (ACK)-Lysepuffer

- 8,29 g NH_4Cl
- 1,0 g KHCO_3
- 0,037 g EDTA
- lösen in 1 l Aquadest

Saponinpuffer

- 135 ml *phosphate buffered saline* (PBS)
- 0,45 g Saponin
- 15 ml 1% bovines Serumalbumin (BSA) in PBS

Iscoe's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)-komplett

- 500 ml IMDM (1X) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 25 ml fötales Kälberserum (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 5 ml L-Glutamin (Stock: 200 mM) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 500 μl Gentamicin (Stock 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 500 μl β -Mercaptoethanol (Stock: 50 mM) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

Sörensen-Puffer

- 3 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
- 14,1 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
- Lösen in 1 l Aquadest (pH 7,2)

BMDM-Medium

- 50 ml fötales Kälberserum (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 25 ml Pferdeserum (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

- 5 ml HEPES (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 5 ml Na-Pyruvat (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 5 ml L-Glutamin(GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 500 μ l Gentamicin (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 500 μ l M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) (Stocklösung: 10 μ g/ml)
- auf 500 ml auffüllen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

FACS-Puffer

- 1,5 ml 0,25 M EDTA
- 15 ml 2% BSA
- 133,5 ml PBS

4%ige Formalinlösung

- 10 ml Formaldehyd 37%
- 82,5 ml Sörensen-Puffer

5.1.3 Feinchemikalien

- Rattenserum (StemCell, Vancouver, Kanada)
- bovines Serumalbumin (BSA) (SERVA, Heidelberg, Deutschland)
- *pacific orange succinimidyl ester* (PacO) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Easycoll (Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
- Brefeldin A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Saponin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Lipopolysaccharid (LPS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

- Paraformaldehyd (PFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Trypanblau (Biochrom, AG Berlin, Deutschland)
- *tryptic soy broth* (TSB) (BD, Heidelberg, Deutschland)
- Bacto Agar (BD, Heidelberg, Deutschland)
- *lysogeny broth* (LB) (BD, Heidelberg, Deutschland)
- 5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester (CFSE) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Protein Block, Serum Frei (X090930-8, Agilent, Santa Clara, CA)
- Antibody Diluent (S080981-2, Agilent, Santa Clara, CA)
- Ziegenserum (X090710-8, Agilent, Santa Clara, CA)
- EnVision+/HRP, Rabbit (K400311-2, Agilent, Santa Clara, CA)
- Liquid DAB+, 2-component system (K346811-2, Agilent, Santa Clara, CA)
- yellow-green fluorescent FluoSpheres[®] Carboxylate-Modified Microspheres, 0.5 μm (Thermo Fisher, Waltham, MA)
- Na-Pyruvat (100 mM) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) (1 M) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- L-Glutamin (200 mM) (GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) (Peprotech, Rocky Hill, NJ)
- IL-4 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- IL-6 (Stefan Rose-John, Kiel, Deutschland)
- IFN γ (ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland)
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)

Alle nicht weiter aufgeführten Standardchemikalien wurden von Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) oder Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

5.1.4 Kits

- NucleoSpin[®] RNA (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher, Waltham, MA)
- SYBR[®] Green JumpStart[™] Taq ReadyMix[™] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- Quiagen RNeasy Micro Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland)

5.1.5 Kunststoffmaterialien

Alle Kunststoffmaterialien wurden von BD (Heidelberg, Deutschland), Greiner (Kremsmünster, Deutschland) oder Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland) bezogen.

5.1.6 Geräte und Software

Geräte

- Heraeus Varifuge 3.0 RS (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- BD FACS Canto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)
- Heracell 150 Inkubator (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
- Countess Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
- Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
- StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
- Biometra T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Keyence Mikroskop BZ-9000 (Keyence, Osaka, Japan)

Software

- FACS Diva (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)
- Flowjo vX (Flowjo, Ashland, OR)
- GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA)
- Inkscape v0.92
- TeXstudio 2.12.0
- ImageJ 150 (NIH, Bethesda, MD)
- StepOnePlus™ Software v2.3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)
- REViGO (Rudjer Boskovic Institute, Zagreb, Kroatien) [92]

5.2 Mauslinien

C57BL/6J [93]

Jackson Labs

***Il6ra*^{flox} × *LysM*^{cre}** [94]

B6.SJL-*Il6ra*^{tm1.1Drew/J} × B6.129P2-*Lyz2*^{tm1(cre)lfo/J}

Zur Verfügung gestellt von Dr. Oliver Steinmetz

Institut für Nephrologie, Universitätsklinikum Eppendorf

Il6KO [78]

B6.129S2-*Il6*^{tm1Kopf/J}

Zur Verfügung gestellt von Prof. Gisa Tiegs und Dr. Anette Erhardt.

5.3 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.

Die Mäuse werden zuerst mit Carbogen (CO₂ und O₂) und dann mit reinem CO₂ behandelt, bis keine Atembewegungen mehr festzustellen sind. Danach wird die zervikale Dislokation angewendet um sicherzugehen, dass die Mäuse vor der Organentnahme tot sind. Vor der Organentnahme wird das Fell der Maus mit 70% Ethanol desinfiziert.

5.4 Krankheitsmodelle

5.4.1 Verwendete Bakterienstämme

Listeria monocytogenes, Stamm EGD (Lm) [95]

5.4.2 Infektion mit *L. monocytogenes*

Die Infektion mit *L. monocytogenes* erfolgt mit einer Dosis von 2×10^4 Listerien in 200 μ l sterilem PBS pro Maus (entspricht 1×10^5 Listerien/ml). Dafür wird ein Aliquot des Bakterienstocks, dessen Titer vorher bestimmt wurde, verwendet und auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Mäuse werden intravenös (i.v.) mit 200 μ l der Bakteriensuspension infiziert. Analyse der Mäuse erfolgt, wenn nicht anders angegeben, 2 Tage nach Infektion. Aus der Infektionslösung werden drei Verdünnungen in 1:10 Schritten hergestellt. 100 μ l jeder Verdünnung werden auf je einer TSB-Agarplatte ausgestrichen und für 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Kolonien auf den Platten ausgezählt und die tatsächliche Infektionsdosis errechnet.

5.5 Zellisolation

5.5.1 Organentnahme und Zellisolation: Peritoneallavage

Das Bauchfell der Maus wird vorsichtig angeschnitten, ohne das Peritoneum zu verletzen. Das Fell wird komplett vom Bauchraum entfernt. Mit einer Kanüle G1 auf einer 10 ml Spritze werden 6 ml IMDM-komplett (ohne Gentamicin bei *in vitro* Infektions- und Phagozytoseexperimenten) injiziert. Der Bauchraum wird leicht massiert und das Medium mit der gleichen Spritze wieder entnommen und in ein 15 ml Röhrchen gegeben. Der Vorgang wird einmal wiederholt. Das Röhrchen wird bei 1200 Umdrehungen pro Minute (RPM) für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 10 ml PBS resuspendiert und bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert.

5.5.2 Organentnahme und Zellisolation: Milz

Die Milz wird entnommen, vom Restgewebe befreit und in 5 ml PBS in einem 15 ml Röhrchen aufgenommen. Die Milz wird im PBS auf ein $\text{Ø}70 \mu\text{m}$ Zellsieb gegeben, das auf einem 50 ml Röhrchen steckt. Mit einem Spritzenstempel wird die Milz durch das Zellsieb gedrückt. Das Sieb wird anschließend mit 10 ml PBS gewaschen. Das Röhrchen wird bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 3 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wird mit 12 ml PBS gestoppt. Das Röhrchen wird erneut bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 5 ml resuspendiert. Die Zellen werden gezählt und auf die gewünschte Konzentration eingestellt

5.5.3 Organentnahme und Zellisolation: Leber

Die Leber wird entnommen und die Gallenblase wird entfernt. Die Leber wird in 20 ml PBS in einem 50 ml Röhrchen aufgenommen. Die Leber wird im PBS in ein $\text{Ø}200 \mu\text{M}$ Metallsieb, welches in einer Petrischale liegt, gegeben. Mit einem Spritzenstempel wird die Leber durch das Sieb gedrückt. Das Sieb wird mit 20 ml PBS gewaschen. Die so erhaltene Zellsuspension wird zurück in das 50 ml Röhrchen gegeben. Das Röhrchen wird bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 5 ml einer Mischung aus 40% Biocoll und 60% IMDM-komplett aufgenommen und in ein 15 ml Röhrchen übertragen. Das Röhrchen wird für 20 Minuten bei 1500 RPM ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 3 ml ACK-Lysepuffer aufgenommen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wird mit 12 ml PBS gestoppt. Der Inhalt wird über ein $\text{Ø}70 \mu\text{M}$ Zellsieb in ein 50 ml Röhrchen übertragen. Das Sieb wird mit 10 ml PBS gewaschen und die Suspension wird 5 Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert.

5.5.4 Organentnahme und Zellisolation: Knochenmark

Die Maus wird auf den Rücken gelegt und die Vorderpfoten mit Kanülen fixiert. Die Hinterläufe werden mit Ethanol benetzt. Das Fell und die Haut werden am Hüftgelenk umlaufend aufgeschnitten. Mit einer Pinzette wird das Fell über den Hinterlauf gezogen und entfernt. Die Muskeln werden am Hinterlauf bis auf den Knochen eingeschnitten. Mit einer Pinzette wird die Maus am Hüftgelenk fixiert und mit einer anderen Pinzette wird der Oberschenkel am Hüftgelenk von der Hüfte durch vorsichtiges Ziehen entfernt. Die Hinterpfote wird

abgeschnitten. Der so isolierte Hinterlauf wird in eine Petrischale mit PBS gegeben. Durch Überstreckung werden Unter- und Oberschenkel voneinander getrennt. Mit zwei Pinzetten werden die restlichen Muskeln von den Knochen entfernt. Mit einer großen Kanüle werden in den Boden eines 0,5 ml Reagiergefäßes drei Löcher gestochen. Der Gelenkkopf an einer Seite der Knochen wird entfernt und die Knochen werden mit der offenen Seite nach unten in das präparierte 0,5 ml Reagiergefäß gelegt. Das Reagiergefäß wird in ein 1,5 ml Reagiergefäß gelegt und bei 2000 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Das Knochenmark sammelt sich im 1,5 ml Reagiergefäß.

5.5.5 Zellzählung

Pro Probe werden in einer 96-Napf-Platte 90 μ l 1:10 in PBS verdünntes Trypanblau vorgelegt und mit 10 μ l der jeweiligen Suspension gemischt. 10 μ l dieser Mischung werden in eine Kammer der Counting Slides pipettiert. Die Auszählung erfolgt im Countess Automated Cell Counter.

5.6 Zellkultur

5.6.1 BMDM-Kultur

Nach der Isolation des Knochenmarks wird die Suspension mit 5 ml BMDM-Medium verdünnt. Die Zellkonzentration in der Suspension wird bestimmt und auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Je 10 ml Suspension werden in eine Petrischale gegeben. Die Schale wird bei 37 °C und 5% CO₂ für 4 Tage inkubiert. Danach werden zu jeder Petrischale 5 ml BMDM-Medium hinzugefügt und die Schalen werden für weitere 4 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wird von den Petrischalen der Überstand abgenommen und verworfen. In jede Schale werden 5 ml eiskaltes PBS gegeben und für 15 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die Zellen werden vorsichtig mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst und in ein 50 ml Röhrchen übertragen. Die Suspension wird für 5 Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 5 ml IMDM-komplett aufgenommen und die Zellkonzentration der Suspension bestimmt. In jeden Napf einer 24-Napf-Platte wird soviel Zellsuspension pipettiert, dass sich 5×10^5 Zellen darin befinden. Drei Stimulationsmedien werden vorbereitet.

- IMDM + IL-6 (1600 ng/ml)
- IMDM + IL-4 (400 ng/ml)

- IMDM + LPS (20 $\mu\text{g/ml}$) + IFN γ (400 ng/ml)

In jeden entsprechenden Napf werden 50 μl des Stimulationsmediums gegeben. Jeder Napf wird mit IMDM-komplett auf 1 ml aufgefüllt. Die Zellen werden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wird der Überstand abgenommen und jeder Napf dreimal mit PBS gewaschen. In jeden Napf wird 1 ml FACS-Puffer gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Suspension in jedem Napf 3 mal auf und ab pipettiert und dann in ein FACS-Röhrchen übertragen. Die Röhrchen werden für 5 Minuten bei 1200 RPM zentrifugiert und der Überstand wird verworfen.

5.7 Quantitative Echtzeit-PCR

5.7.1 RNA-Isolation aus Gewebe

Während der Organentnahme wird ein Teil des Organs entnommen und in einem 1,5 ml Reagiergefäß auf Trockeneis gelagert. Bis zur RNA-Isolation wird die Gewebeprobe bei -80°C aufbewahrt. Die RNA-Isolation erfolgt mit dem Nucleospin[®] RNA Kit von Macherey-Nagel. Die Konzentration wird am Nanodrop2000c photometrisch bestimmt.

5.7.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der isolierten mRNA in cDNA erfolgte mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. Die Synthese wurde im Biometra T3 Thermocycler mit dem in Tabelle 5.2 dargestellten Programm durchgeführt.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit [Min]	10	120	5	∞

Tabelle 5.2: PCR-Programm für cDNA-Synthese

5.7.3 Quantitative Echtzeit-PCR

20 ng der umgeschriebenen cDNA wurden für die Quantifizierung der verschiedenen mRNA Spezies und 0,04 ng für die Quantifizierung der Referenz-RNA (18S RNA) eingesetzt. Triplikate von jeder Probe wurden analysiert. Zur Quantifizierung im StepOnePlus[™] wurde der

SYBR[®] Green JumpStart[™] Taq ReadyMix[™] nach Herstellerangaben verwendet. Das in Tabelle 5.3 dargestellte Programm wurde verwendet.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	50	95	95	60
Zeit [Min]	2	10	0,25	1

Schritte 2 bis 4 werden dreißig mal wiederholt.

Tabelle 5.3: PCR-Programm für die quantitative Echtzeit-PCR

5.8 Immunhistochemie

5.8.1 Entnahme und Einbettung der Organe

Bei der Organentnahme wird ein Viertel der Milz und ein großer Leberlappen in ein Röhrchen mit 5 ml 4% Formalin-Lösung gegeben. Die Organe werden über Nacht im Kühlschrank zur Fixierung gelagert. Am nächsten Tag werden die Organe drei mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Organe werden in Paraffin eingebettet. Von jedem Block werden 3 μ M dicke Schnitte angefertigt.

5.8.2 Immunhistochemische Färbung

Zunächst werden die Schnitte drei mal für je 5 Minuten in einem Xylen Bad deparaffiniert. Danach folgt schrittweise die Rehydratation.

- 100% Ethanol: 5 Minuten
- 90% Ethanol: 2 Minuten
- 70% Ethanol: 2 Minuten
- 50% Ethanol: 2 Minuten
- ddH₂O: 5 Minuten

Danach werden endogene Peroxidasen blockiert. Dazu wird jeder Schnitt mit der Peroxidase-blocklösung bedeckt (3% H₂O₂ in Methanol). Die Schnitte werden für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation werden die Schnitte drei mal für 2 Minuten mit

phosphate buffered saline Tween-20 (PBS-T) gewaschen.

Danach erfolgt der Proteinblock. Die Schnitte werden getrocknet und mit einem DAKOPen umrandet. Die Schnitte werden mit Proteinblocklösung (Dako) bedeckt. Die Schnitte werden für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer feuchten dunklen Kammer inkubiert. Danach wird die Flüssigkeit von den Schnitten entfernt und diese mit PBS-T gewaschen.

Daraufhin wird der Primärantikörper hinzugegeben. Der F4/80 Antikörper (Klon BM8, Bio-Legend) wird 1:100 in Antibody-diluent (Dako) verdünnt. 100 μ l der Lösung wird pro Schnitt hinzugegeben. Die Schnitte werden für 90 Minuten in einer feuchten dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden die Schnitte drei mal für 2 Minuten mit PBS-T gewaschen.

Der Sekundärantikörper (Rabbit anti-rat IgG (H+L), *horseradish peroxidase* (HRP), Thermo-fischer) wird 1:200 in Antibody-diluent (Dako) verdünnt. 100 μ l der Lösung werden auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte werden 60 Minuten in einer feuchten dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin werden die Schnitte drei mal für je 2 Minuten mit PBS-T gewaschen.

Der Serumblock (2% Ziegen Serum in PBS) wird auf die Schnitte gegeben. Diese werden für 10 Minuten in einer dunklen feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wird der Tertiärantikörper hinzugefügt. Dafür werden 1-2 Tropfen von Dako EnVision (*labeled polymer HRP-conjugate anti-rabbit*) auf jeden Schnitt gegeben. Die Schnitte werden für 30 Minuten in einer feuchten dunklen Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Darauf folgt die Substratreaktion. Dafür wird eine DAB *working solution* vorbereitet (1 ml DAB + 20 μ l DAB Chromogen). Davon werden 100 μ l auf jeden Schnitt gegeben. Inkubation erfolgt unter Lichtausschluss, bis eine bräunliche Verfärbung erkennbar ist. Die Schnitte werden dreimal für 2 Minuten mit ddH₂O gewaschen.

Für die Gegenfärbung werden die Schnitte 1 Minute bei Raumtemperatur in Meyer's Hematoxylin Lösung inkubiert. Danach werden die Schnitte in ddH₂O gewaschen. Die Schnitte werden unter laufendem Leitungswasser für 1 Minute blau gefärbt. Die Schnitte werden mit ddH₂O gewaschen.

Daraufhin werden die Schnitte schrittweise dehydriert.

- in 50% Ethanol tauchen
- 70% Ethanol: 1 Minuten
- 90% Ethanol: 2 Minuten
- 100% Ethanol: 2 Minuten
- Xylen Bad: 3 × 4 Minuten

Auf jeden Schnitt werden 1-3 Tropfen Fixativ (Entellan) gegeben. Danach werden die Schnitte mit Deckgläsern bedeckt. Die Luftblasen werden entfernt und die Schnitte werden über Nacht getrocknet.

5.8.3 Analyse der immunhistochemischen Färbung

Die Schnitte werden im Keyence Mikroskop, Modell BZ-9000 mit einem Nikon - Plan Apo - 10×/0,45 Objektiv ausgewertet. Dazu werden von jedem Schnitt bis zu 15 Bilder gemacht. Jedes Bild sollte dabei einen anderen Bereich des Schnittes abbilden und dabei das ganze Bild füllen. Dabei ist darauf zu achten, dass keine Gefäße oder größeren Artefakte im Bildausschnitt zu sehen sind. Die Bilder werden in Farbe aufgenommen und danach in Graustufenbilder umgewandelt. Diese Graustufenbilder werden dann in binäre Schwarz-Weiß-Bilder konvertiert. Der Grenzwert für die Schwarz-Weiß Konversion wird dabei so gewählt, dass nur die bräunlich angefärbten, F4/80-positiven Zellen schwarz angefärbt werden, während der Rest der Fläche weiß wird. Mithilfe einer Software wird dann automatisch die schwarze Fläche berechnet, welche als Maß für den Anteil an F4/80 positiven Zellen gilt.

5.9 Durchflusszytometrie

5.9.1 Phagozytose-Assay

Für das Phagozytose-Assay wird ein Tag vor Analyse der Mäuse 5 ml LB-Medium in ein 15 ml Röhrchen vorgelegt. Ein Aliquot *L. monocytogenes* wird hinzugefügt und das Röhrchen wird bei 37 °C und 230 RPM über Nacht inkubiert. Am Tag der Analyse werden 5 µl CFSE (10 mM in DMSO, entspricht 10 µM) hinzu pipettiert. Das Röhrchen wird für eine Stunde bei 37 °C und 230 RPM inkubiert. Das Röhrchen wird mit PBS aufgefüllt und bei 3500 RPM für

10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Röhrchen wird wieder mit PBS aufgefüllt und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und der Vorgang noch einmal wiederholt. Das Pellet wird in 3 ml PBS resuspendiert. Die OD600 der Suspension wird gemessen. Dabei wird angenommen das eine OD600 von 1 einer Konzentration von 1×10^9 Listerien/ml entspricht. Die Suspension wird auf eine Konzentration von 5×10^8 Listerien/ml eingestellt. Nachdem die Einzelzellen isoliert wurden, werden jeweils 50 (bei Lavage und Leber) beziehungsweise 100 μ l der jeweiligen Zellsuspensionen in drei verschiedene FACS-Röhrchen vorgelegt. In zwei der drei Röhrchen werden 900 μ l IMDM-komplett (ohne Gentamicin) und 50 μ l der Bakteriensuspension hinzugefügt, das dritte wird bis zur Färbung im Kühlschrank aufbewahrt. Die anderen beiden Röhrchen werden für jeweils 5 beziehungsweise 60 Minuten im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation werden die Röhrchen mit PBS aufgefüllt und bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

5.9.2 *In vitro* Stimulation

Für die *in vitro* Stimulation werden 50 (bei Lavage und Leber) beziehungsweise 100 μ l (bei Milz) der Zellsuspension in FACS-Röhrchen vorgelegt. Es werden dann 900 μ l des entsprechenden Stimulationsmediums hinzugegeben. Für die nicht stimulierten Kontrolle wird IMDM-komplett verwendet. Für die LPS-Stimulation werden pro Ansatz 900 μ l IMDM-komplett mit 1 μ l LPS (Stock: 1 mg/ml, entspricht 1 μ g/ml) vorbereitet und auf die Zellsuspension gegeben. Die Suspension wird gut durchmischt und danach für 4 Stunden bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Für die intrazelluläre Zytokinfärbung werden nach 30 Minuten pro Probe 1 μ l Brefeldin A (Stock: 10 mg/ml, entspricht 10 μ g/ml) hinzugegeben. Danach werden die Suspensionen für 3 Stunden und 30 Minuten bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation werden die Röhrchen mit PBS aufgefüllt, bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand wird verworfen.

5.9.3 Immunfluoreszenzfärbung: Extrazelluläre Färbung

Nach der Isolation und Stimulation der Leukozyten werden in jedes Röhrchen 50 μ l Blocklösung (bestehend aus 50 μ l FACS-Puffer + 0,5 μ l α CD16/32 + 1 μ l Rattenserum) gegeben. Die Suspension wird für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation werden in jede Suspension 50 μ l des jeweiligen Antikörper-Mastermixes gegeben (bestehend aus 50 μ l FACS-Puffer und den jeweiligen Antikörpern in einer vorher austitrierten Menge) und die Zellen für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Röhrchen mit PBS aufgefüllt und

bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen im Rücklauf resuspendiert.

5.9.4 Immunfluoreszenzfärbung: Intrazelluläre Färbung

Nach der extrazellulären Färbung werden die Zellen in 200 μ l 2%igem PFA in PBS resuspendiert und für 5 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Röhren mit 0,2% BSA in PBS aufgefüllt und bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und in jedes Röhren werden 50 μ l Blocklösung (bestehend aus 50 μ l Saponinpuffer und 1 μ l Rattenserum) pipettiert. Die Suspension wird für 5 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. In jede Suspension wird 50 μ l des Antikörper-Mastermixes pipettiert (bestehend aus 50 μ l Saponinpuffer und den jeweiligen Antikörpern in einer vorher austitrierten Menge). Die Suspensionen werden für 20 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert. Jedes Röhren wird mit FACS-Puffer aufgefüllt und bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen im Rücklauf resuspendiert.

5.9.5 Durchflusszytometrische Analyse

Nach der Stimulation und Färbung werden die Zellen durchflusszytometrisch mit dem BD FACS Canto II analysiert. Dafür werden zuerst Zelltrümmer und andere Verunreinigungen, sowie Zelldoubletten durch die Analyse des Streulichts ausgegrenzt. Der *forward scatter* (FSC) ist dabei ein Maß für die Brechung des Lichtes und korreliert mit der Größe der Zellen. Der *side scatter* (SSC) misst die Brechung des Lichts im 90° Winkel und ist ein Maß für die Granularität der Zellen. Zuerst wird das FSC-A/SSC-A Verhältnis ausgewertet. Die Größe der Zellen wird dabei im Verhältnis zur Granularität gesetzt, wodurch es möglich ist die Leukozytenpopulation von Zelltrümmern und der Erythrozytenpopulation zu trennen. Danach wird das FSC-H/FSC-A Verhältnis ausgewertet. Singuläre Zellen weisen eine lineare Korrelation des FSC-H zum FSC-A auf, wodurch sich Zelldoubletten ausschließen lassen. Danach werden die toten Zellen durch die PacO Färbung identifiziert. Tote Zellen sind PacO-positiv und können dadurch ausgeschlossen werden.

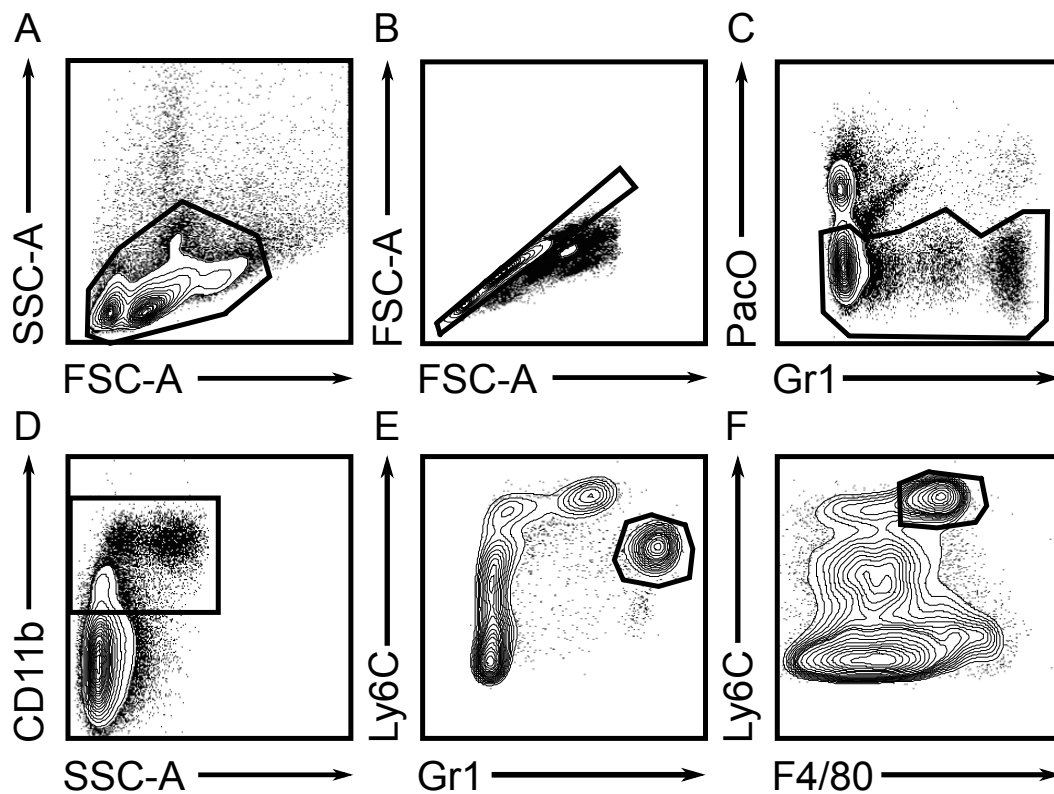


Abbildung 5.1: **Eingrenzung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten**

Dargestellt ist ein Beispiel für die Eingrenzung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten aus isolierten Leukozyten der Milz. Der erste Schritt zur Eingrenzung der Monozyten und neutrophilen Granulozyten beinhaltet die Isolation der Leukozyten im FSC-A/SSC-A Blot (A). Danach werden die Zelldubletten im FSC-H/FSC-H Blot (B) und die toten Zellen durch die PacO Färbung ausgeschlossen (C). CD11b wird als Marker für die myeloide Linie benutzt (D). Von den CD11b⁺ Zellen ausgehend, werden zunächst die neutrophilen Granulozyten als GR1^{high} und Ly6C^{int} definiert (E). Aus den restlichen Zellen werden die inflammatorischen Monozyten identifiziert, welche F4/80^{high} und Ly6C^{high} sind (F).

Um die neutrophilen Granulozyten und Monozyten im FACS zu analysieren, werden die Zellen mit Fluorochrom gekoppelten Antikörpern markiert. Hier wird zunächst ein Antikörper gegen CD11b verwendet. CD11b, auch Integrin α -M genannt, ist ein Zelladhäsionsmolekül, welches vornehmlich auf dendritischen Zellen, Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Ausgehen von den CD11b⁺ Zellen werden die neutrophilen Granulozyten identifiziert. Diese sind GR1^{high} und Ly6C^{int}. Gr1 ist ein GPI verankertes Pro-

tein, das hauptsächlich auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird. Ly6C ist ebenfalls ein GPI verankertes Protein, welches sowohl auf neutrophilen Granulozyten, als auch auf Monozyten und Makrophagen zu finden ist. Ausgehend von allen Zellen, die nicht dem neutrophilen Granulozyten Profil entsprechen, werden die inflammatorischen Monozyten identifiziert. Diese sind F4/80^{high}. F4/80 ist ein Mitglied der EGF-TM7 Familie ist und hauptsächlich auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, und Ly6C^{high}.

5.10 RNA-Sequenzierung

5.10.1 Isolation von Zellen

Inflammatorische Monozyten, definiert wie in Abbildung 5.1, wurden mittels FACS aus Milzen infizierter Mäuse isoliert. Dies wurde von der FACS Core Facility im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Verwendet wurde das Gerät BD FACSAriaTM Fusion.

5.10.2 RNA-Isolation

Die gesamte RNA der isolierten Zellen wurde mit dem Quiagen RNeasy Micro Kit isoliert. Die Zellen werden bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 75 μ l RLT Puffer (1 ml RLT Puffer + 10 μ l β -Mercaptoethanol) resuspendiert und 30 Sekunden durchmischt. Danach wird 75 μ l 70% Ethanol hinzugefügt. Die Suspension wird 10 mal auf und ab pipettiert und auf die Säule gegeben. Die Säule wird 1 Minute bei 10000 RPM zentrifugiert und anschließend wird 350 μ l RW1 Puffer auf die Säule gegeben. Die Säule wird erneut für 1 Minute bei 10000RPM zentrifugiert. In einem gesonderten Reagiergefäß werden pro Säule 10 μ l DNase Aliquot mit 70 μ l RDD Puffer vermischt und mittig auf den Filter der Säule gegeben. Die Säule wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit 350 μ l RW1 Puffer gewaschen. Die Säule wird für 1 Minute bei 10000 RPM zentrifugiert und anschließen in eine neue Hülse gesteckt. Danach wird 500 μ l RPE Puffer auf die Säule gegeben und wieder für 1 Minute bei 10000 RPM zentrifugiert. Die Säule wird erneut mit 500 μ l 80% Ethanol gewaschen und 2 Minuten bei 10000 RPM zentrifugiert. Danach wird die Säule für 5 Minuten bei 16000 RPM zentrifugiert um die Membran zu trocknen. Zum eluieren der RNA wird die Säule in ein neues Reagiergefäß gestellt und 23 μ l Wasser wird auf die Membran gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wird für 1 Minute bei 10000 RPM zentrifugiert. Das Eluat wird bis zur Verwendung auf Eis oder bei -20 °C gelagert.

5.10.3 RNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von Beijing Genomics Institute mit der BGISEQ-500 Plattform durchgeführt.

Die Auswertung wurde von Christian Casar (I. Medizinische und Poliklinik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Deutschland) durchgeführt.

5.11 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mittels der Software GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) durchgeführt.

In Experimenten, bei denen zwei Gruppen, deren Werte der parametrischen Verteilung entsprachen, mit einem untersuchten Parameter verglichen wurden, wurde der Student's-t-Test angewendet.

In Experimenten, bei denen zwei oder mehr Gruppen, deren Werte der parametrischen Verteilung entsprachen, mit zwei unabhängigen untersuchten Parametern verglichen wurden, wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*) (ANOVA) angewendet.

In Experimenten, bei denen zwei Gruppen, deren Werten der nicht parametrischen Verteilung entsprachen, mit einem untersuchten Parameter verglichen wurden, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet.

Die Signifikanzen wurden in den Abbildungen mit Sternchen annotiert (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant; * $\hat{=}$ $p < 0,05$; ** $\hat{=}$ $p < 0,01$; *** $\hat{=}$ $p < 0,001$).

6 Ergebnisse

6.1 Listerienkontrolle in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass die klassische IL-6 Signaltransduktion wichtig für die Kontrolle der Listerieninfektion in der frühen, angeborenen Phase des Immunsystems ist [69]. In unveröffentlichten Ergebnissen konnten wir zeigen, dass die klassische IL-6 Signaltransduktion die T-Zellantwort nicht beeinflusst. Um den Einfluss der klassischen IL-6 Signaltransduktion auf myeloide Zellen während der angeborenen Immunantwort der Mäuse gegen *L. monocytogenes* zu untersuchen, wurden *Il6ra*^{fl/fl} × *LysM*^{Cre+} (*Il6ra*^{ΔMyel}) und Littermate-Kontrollen mit Listerien infiziert und zwei Tage nach Infektion untersucht. Bei *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen ist der IL-6R α auf myeloiden Zellen deletiert, sodass sie nicht mehr von löslichem IL-6, jedoch von IL-6/sIL-6R α Komplexen aktiviert werden können. Um zu klären, ob die Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion einen Einfluss auf die Kontrolle der Listerieninfektion hat, wurden Organlysate der infizierten Tiere auf Agar-Platten ausplattiert und Listerienkolonien gezählt, um so die Bakterienlast in den Organen der infizierten Tiere zu bestimmen.

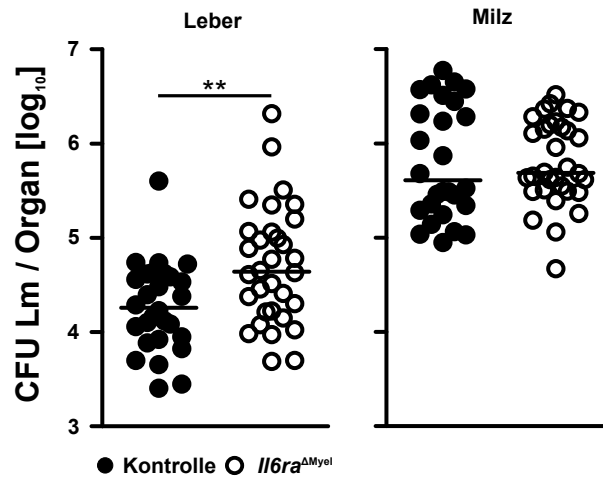


Abbildung 6.1: **Listerientiter von *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen d2 p.i.**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Zwei Tage nach der Infektion wurde die Bakterienlast in Leber und Milz bestimmt. Striche repräsentieren den Median. Signifikanzen wurden mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant; ** $\hat{=}$ $p < 0,01$). Die Daten wurden aus vier verschiedenen Experimenten zusammengefasst.

Die Bakterienlast in der Leber von *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen war im Vergleich zu den Littermate-Kontrollen signifikant um einen Faktor von 5 erhöht (siehe Abbildung 6.1). Die Bakterienlast in der Milz wies zwischen den Mausgruppen keinen Unterschied auf.

6.2 Einfluss von IL-6 auf die Distribution myeloider Zellen

Um zu untersuchen, ob die Verschlechterung der Bakterienkontrolle in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen dadurch verursacht wird, dass weniger myeloide Zellen, welche wichtig für die Kontrolle von Bakterieninfektionen sind, in Milz und Leber akkumulieren, wurden verschiedene Experimente durchgeführt.

6.2.1 Akkumulation myeloider Zellen in infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen

Leukozyten aus Milz und Leber von infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht. Neutrophile Granulozyten und inflammato-

rische Monozyten wurden über die Expression von CD11b, Ly6C und Gr1 definiert und die Distribution in den Organen über den prozentualen Anteil der jeweiligen Zellen an Gesamtleukozyten im Organ definiert.

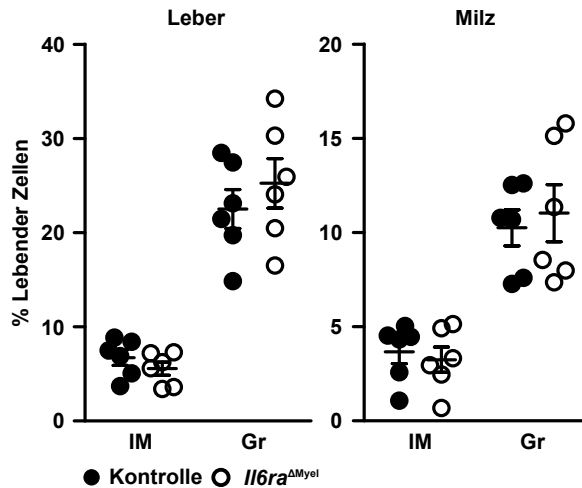


Abbildung 6.2: **Akkumulation myeloider Zellen in infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden zwei Tage nach Infektion analysiert. Die Leukozyten aus Leber und Milz wurden isoliert und Anteile von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl wurden bestimmt. Jede Versuchsgruppe beinhaltete 6 bis 7 Mäuse. Ein repräsentatives Ergebnis von mehreren Experimenten ist dargestellt. IM=inflammatorische Monozyten, Gr=neutrophile Granulozyten. Die Striche repräsentieren Mean \pm SEM. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's-t-Test bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant).

In der Leber von *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen lag der Anteil der neutrophilen Granulozyten an den Gesamtleukozyten bei 25-30% und der Anteil der inflammatorischen Monozyten bei 5% (siehe Abbildung 6.2). Auch in der Milz wurde kein Unterschied im Anteil der neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten an den Gesamtleukozyten zwischen den Mausgruppen festgestellt. Durchschnittlich lag der Anteil der inflammatorischen Monozyten bei 3% der lebenden Leukozyten, während der Anteil der neutrophilen Granulozyten bei 10% lag (siehe Abbildung 6.2).

6.2.2 Chemotaxis Index von inflammatorischen Monozyten infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse

Durch die durchflusszytometrische Analyse wurde kein Unterschied in der Verteilung von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten zwischen *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen festgestellt. Durch diese Untersuchung können jedoch nur Gesamtpopulationen in Organen analysiert werden. Möglicherweise finden die Zellen den Weg in die infizierten Organe, erreichen jedoch nicht den Infektionsherd, um dort die Infektion zu klären. Um zu untersuchen, ob inflammatorische Monozyten, der essentielle Zelltyp zur Klärung der Listerieninfektion, noch in der Lage sind den Infektionsherd zu erreichen, wurden Chemotaxis-Assays mit isolierten Leukozyten aus Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen durchgeführt. Bei Chemotaxis-Assays werden die Zellen in eine Kammer gegeben, die durch eine permeable Membran von einer darunter liegenden Kammer getrennt ist. In der unteren Kammer wird Medium mit einem Chemokin vorgelegt. Zellen in der oberen Kammer reagieren auf das Chemokin und migrieren in die untere Kammer. Migrierte Zellen werden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Es wird eine Ratio aus der Anzahl der Zellen in Kammern mit und ohne Chemokin gebildet. Dieser Wert wird als Chemotaxis-Index bezeichnet. Der Chemotaxis-Index dient als Maß für die Fähigkeit von Zellen zur Migration und ermöglicht den Vergleich von Zellen aus Littermate-Kontrollen zu Zellen aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen.

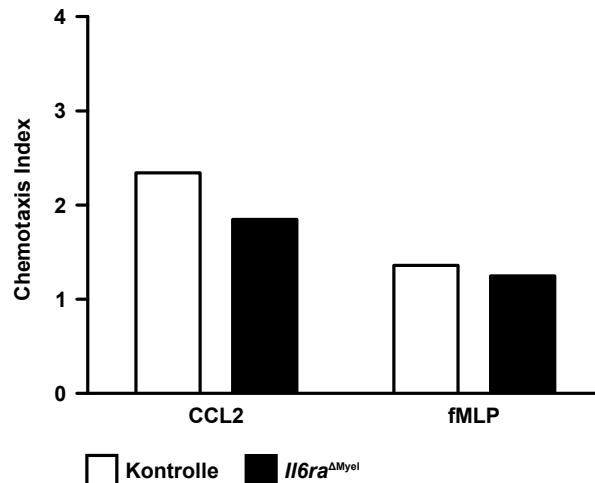


Abbildung 6.3: **Chemotaxis-Index von inflammatorischen Monozyten infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Der Chemotaxis-Index wurde mithilfe eines Transwellassays bestimmt. Zwei Tage nach Infektion wurden Leukozyten aus der Milz isoliert. In die oberen Kammern wurde 1×10^6 Zellen gegeben. Als Chemokine in den unteren Kammern wurden CCL2 ($0,15 \text{ ng}/\mu\text{l}$) und FMLP ($12,5 \text{ }\mu\text{M}$) verwendet. Ein repräsentatives Ergebnis von zwei ist dargestellt. Die Balken repräsentieren den Mean. Die Signifikanzen wurden mittels Student's-t-Test bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant).

Chemokin (C-C motif) Ligand 2 (CCL2) und FMLP dienen im Assay als Chemokine, welche hauptsächlich die Migration auf inflammatorischen Monozyten induzieren. Intakte CCL2-Signaltransduktion ist unabdingbar für die Antwort gegen Listerien [22]. FMLP ist ein Ligand für den Formylpeptidrezeptor (FPR), welcher bakterielle Peptide erkennt, die Formylmethionin enthalten, und so für Migration bei Infektion sorgt. Zwischen inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen wurde kein Unterschied festgestellt. Bei beiden Mausgruppen lag der Chemotaxis-Index gegenüber CCL2 bei 2 und gegenüber FMLP bei 1,5 (siehe Abbildung 6.3), was eine vergleichbare Fähigkeit zur Migration verdeutlicht.

6.2.3 Immunhistochemische Färbung von Organen infizierter Mäuse

Bei der Untersuchung mittels immunhistochemischer Färbung wurde F4/80 auf Paraffinschnitten von Lebern und Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Tiere und Littermate-Kontrollen gefärbt. F4/80 ist ein Mitglied der EGF-TM7 Familie. Es wird auf geweberesidenten Makrophagen

und inflammatorischen Monozyten, welche im Begriff sind zu geweberesidenten Makrophagen zu differenzieren, und zu einem geringeren Anteil auch auf neutrophilen Granulozyten exprimiert.

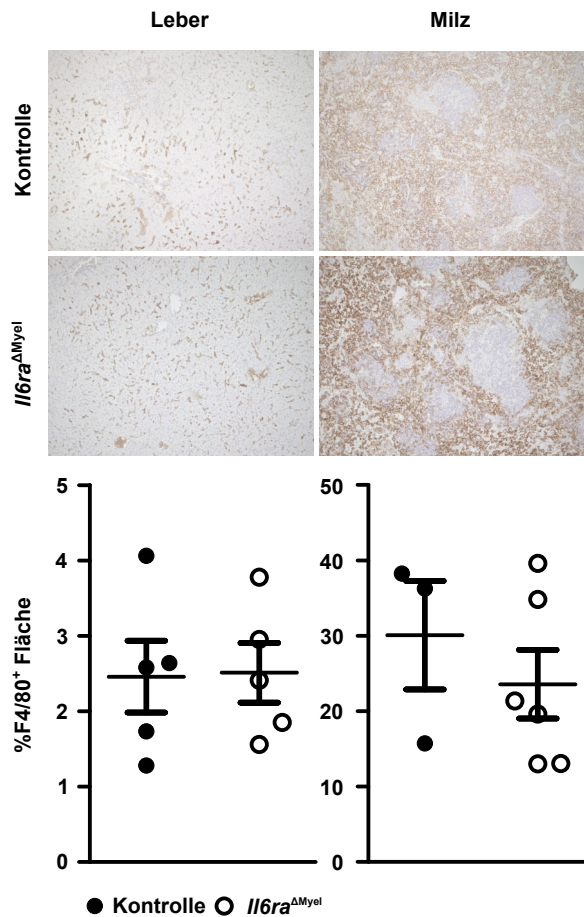


Abbildung 6.4: **Immunhistochemische Färbung von Organen infizierter Mäuse**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 *Listeria* infiziert. Die Analyse erfolgte an d3 p.i.. F4/80⁺ Zellen wurden mittels immunhistochemischer Färbung auf Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Schnitten von Milz und Leber angefärbt. Repräsentative Bilder sind dargestellt. Die statistische Analyse der F4/80⁺-Fläche wurde mit einer Bildbearbeitungssoftware (ImageJ) angefertigt. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse. Striche repräsentieren den Mean ± SEM. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's-t-Test bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant).

Die Akkumulation der inflammatorischen Monozyten wurde mittels immunhistochemischer Färbung bestimmt. Auf den repräsentativen Mikroskopbildern war eindeutig zu erkennen, dass die Dichte an F4/80⁺ Zellen in der Milz im Vergleich zur Leber wesentlich höher war, aber

dass zwischen den Mausgruppen weder in der Milz noch in der Leber Unterschiede in der Dichte der F4/80⁺-Zellen zu erkennen war (siehe Abbildung 6.4). Diese Beobachtung wurde durch die statistische Auswertung bestätigt. In der Leber war bei beiden Mausgruppen eine durchschnittliche F4/80⁺-Fläche von 2,5% zu erkennen, während sie in beiden Mausgruppen in der Milz bei 25-30% lag (siehe Abbildung 6.4). Da die immunhistochemische Untersuchung mittels F4/80 Färbung nicht nur inflammatorische Monozyten, sondern auch geweberesidente Makrophagen und neutrophile Granulozyten anfärbt, kann der Unterschied des prozentualen Anteils der positiven Zellen im Vergleich zur durchflusszytometrischen Analyse (siehe Abbildung 6.2) erklärt werden.

Da keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden, konnten wir abschließend zeigen, dass IL-6 keinen Einfluss auf die Migration von inflammatorischen Monozyten während der Infektion mit *L. monocytogenes* hatte.

6.3 Phänotypische Charakterisierung myeloider Zellen

Da IL-6 an der Differenzierung und Polarisierung von Monozyten zu Makrophagen beteiligt ist, besteht die Möglichkeit, dass die Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion auf myeloiden Zellen durch die Veränderung der Reifung von Makrophagen einen Einfluss auf die Kontrolle von *L. monocytogenes* hat.

6.3.1 Menge an mRNA proinflammatorischer Moleküle in myeloiden Zellen

Zunächst wurde die Menge an mRNA proinflammatorischer Moleküle in Leberlysaten naiver und infizierter *Ii6ra*^{ΔMyel}, *Ii6KO* und Littermate-Kontrollen mittels quantitativer Echtzeit-PCR untersucht. *Ii6KO* Tiere wurden in diesem Experiment als zusätzliche Kontrolle verwendet, um festzustellen, ob eventuelle Unterschiede durch klassische oder Trans-Signaltransduktion ausgelöst wurden. Durch die Untersuchung von Leberlysaten wurde die Menge an mRNA proinflammatorischer Proteine in allen Zellen des Organs untersucht. Die untersuchten Gene werden hauptsächlich von inflammatorischen Monozyten exprimiert, wodurch Veränderungen in diesen Zelltypen in der Analyse detektiert werden können.

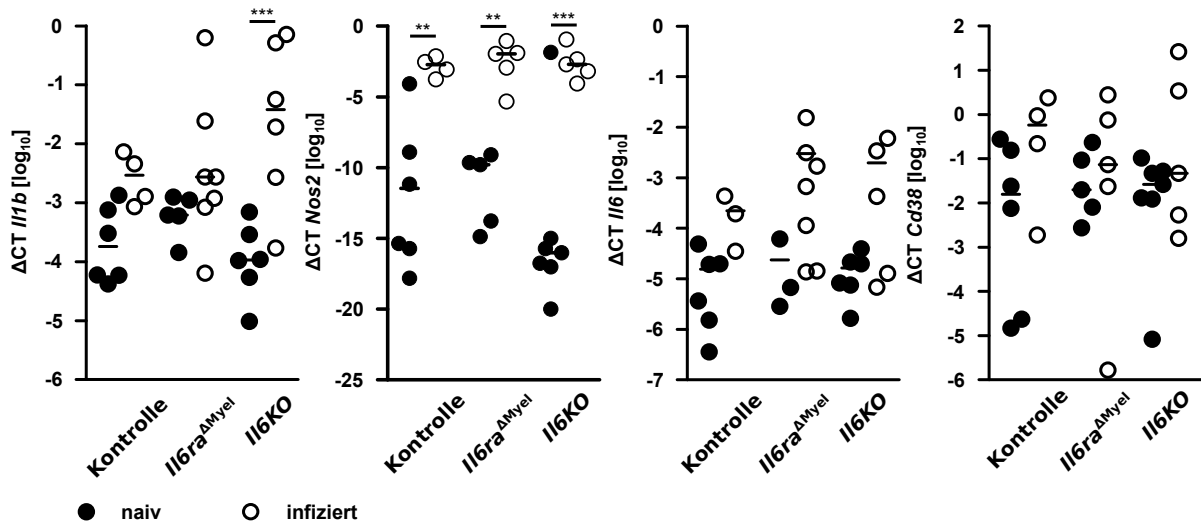


Abbildung 6.5: **mRNA-Menge proinflammatorischer Moleküle in Leberlysaten**

Il6KO, *Il6ra*^{ΔMyel} und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert oder naiv als Kontrollen analysiert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und mRNA aus der Leber isoliert. Die relativen mRNA-Mengen wurden mittels quantitativer Echtzeit-PCR bestimmt, auf 18S RNA normalisiert und als ΔCT dargestellt. Die relativen mRNA-Mengen von *Il1b*, *Nos2*, *Il6* und *Cd38* sind dargestellt. Die Gruppen beinhalteten jeweils 4-7 Mäuse. Striche repräsentieren den Median. Die Signifikanzen wurden nach logarithmischer Transformation mittels zweifaktorieller ANOVA bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant; ** $\hat{=}$ $p < 0,01$; *** $\hat{=}$ $p < 0,001$).

IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches essentiell für die Kontrolle der Listerien während der frühen Phase der Infektion ist. Die Menge an mRNA von *Il1b* wurde durch die Infektion induziert. Sie stieg von einem ΔCT -Wert von 10^{-4} auf 10^{-2} in Kontroll- und *Il6ra*^{ΔMyel} und sogar signifikant auf 10^{-1} in *Il6KO* Tieren an (siehe Abbildung 6.5). Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Menge an *Nos2* mRNA beobachtet. *Nos2* kodiert für die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche die Bildung von Stickstoffmonoxid aus L-Arginin katalysiert und damit zur Kontrolle von Bakterieninfektionen beiträgt. Der ΔCT -Wert erhöhte sich signifikant von 10^{-15} bis 10^{-10} im naiven Zustand auf 10^{-4} während der Infektion, signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden aufgrund der hohen Streuung der Werte jedoch nicht festgestellt (siehe Abbildung 6.5). Eine Erhöhung der mRNA-Menge wurde auch für *Il6*, welches als proinflammatorisches Zytokin eine essentielle Rolle in der Kontrolle von Bakterieninfektion einnimmt, festgestellt. Der ΔCT -Wert stieg von 10^{-5} im naiven Zustand auf $10^{-3,5}$ bis $10^{-2,5}$ an (siehe Abbildung 6.5). Der Anstieg war jedoch aufgrund der hohen Streu-

ung der Werte nicht signifikant und auch zwischen den Mausgruppen wurde kein Unterschied festgestellt. Die mRNA-Menge von CD38 hingegen war kaum von der Infektion beeinflusst. Defekte in der Expression von CD38 verschlechtern die Kontrolle der Listerieninfektion [96]. Der Δ CT-Wert lag bei allen Mausgruppen im naiven und im infizierten Zustand zwischen 10^{-2} und 10^0 . Signifikante Unterschiede zwischen den Mausgruppen oder Anstiege wurden nicht festgestellt (siehe Abbildung 6.5).

Die Menge an mRNA proinflammatorischer Moleküle war durch Defekte in der IL-6 Signaltransduktion nicht beeinflusst, sodass Unterschiede in der Kontrolle der Listerien dadurch nicht erklärt werden können.

6.3.2 Expression von Oberflächenmolekülen auf myeloiden Zellen

Die Expression verschiedener Oberflächenproteine, die auf aktivierten inflammatorischen Monozyten hochreguliert sind, Chemokinrezeptoren und Oberflächenproteine, welche charakteristisch für die Polarisierung inflammatorischer Monozyten sind, wurde auf inflammatorischen Monozyten aus Milzen und Lebern infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen mittels durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Veränderungen in der Expression dieser Moleküle stellen möglicherweise einen Bezug zu einer unterschiedlich regulierten Aktivität der inflammatorischen Monozyten her, welche einen Einfluss auf die Listerienkontrolle haben könnte.

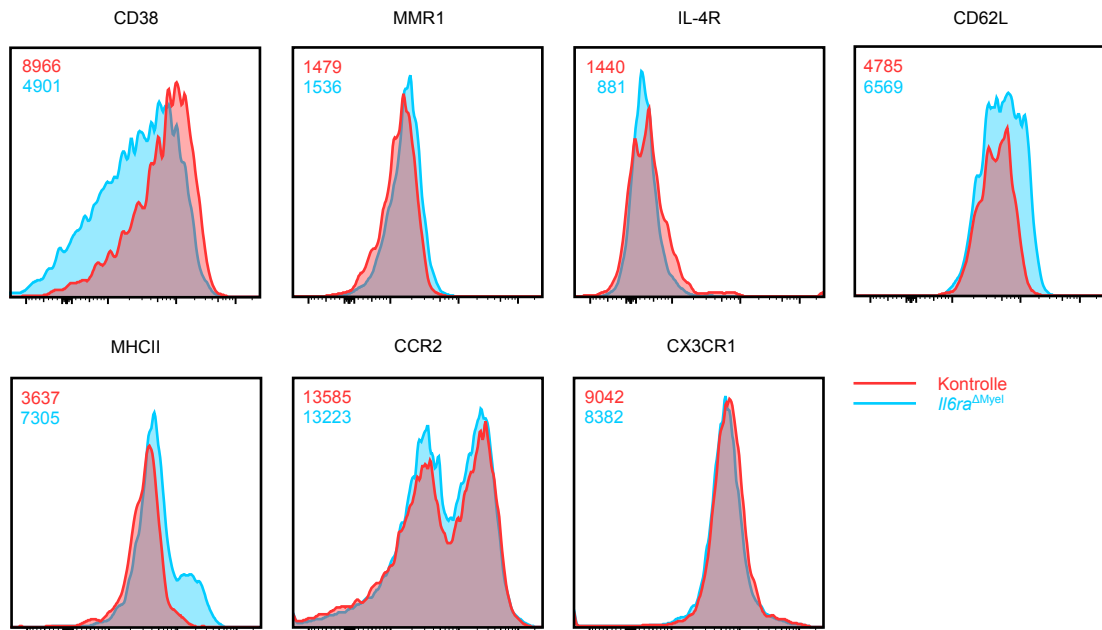


Abbildung 6.6: **Beispieldaten der Expression von Oberflächenmolekülen**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 >Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus Leber isoliert. Die Oberflächenexpression der Proteine auf inflammatorischen Monozyten (definiert als CD11b⁺, Ly6C⁺ und Gr1⁻) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse. Dargestellt sind beispielhafte Histogramme der Expressionstärken der untersuchten Oberflächenmoleküle. Die Zahlen repräsentieren die MFI-Werte. Rot=Littermate-Kontrollen, Blau=*Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse.

In Abbildung 6.6 sind die FACS-Daten der Expression von Oberflächenmolekülen beispielhaft für die Leber dargestellt. Die Expression von CD38, ein Oberflächenprotein essentiell für die Kontrolle von Bakterieninfektionen und charakteristisch für M1 Makrophagen, war in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu denen aus Kontrolltieren stark reduziert. Auch die Expression von IL-4R α , welcher auf M2 Makrophagen hochreguliert und essentiell für die Aktivierung dieses Makrophagen-Subtyps ist, war reduziert. Die Expression von MMR1, welcher ein Rezeptor ist, der von M2 Makrophagen für die Internalisierung und den Abbau inflammatorischer Zytokine verwendet wird, unterschied sich nicht zwischen Zellen aus Kontroll- und *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen. Auch die Expression von CCR2 und CX3C Chemokin Rezeptor 1 (CX3CR1), welche zu den Chemokinrezeptoren gehören und wichtig für die Migration inflammatorischer Monozyten sind, war zwischen Zellen aus Kontroll- und *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen gleich. Die Expression der Oberflächenproteine L-Selektin

(CD62L), ein Adhäsionsmolekül hochreguliert auf aktivierten Monozyten, und *major histocompatibility complex* (MHC) II jedoch war auf inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen erhöht.

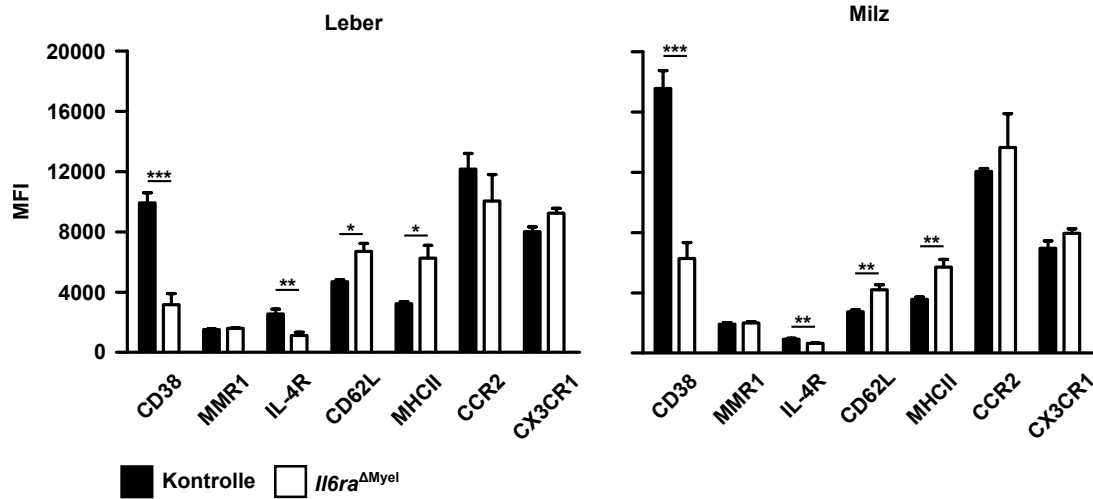


Abbildung 6.7: **MFI von Oberflächenmolekülen**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus Milz und Leber isoliert. Die Oberflächenexpression der Proteine auf inflammatorischen Monozyten (definiert als CD11b⁺, Ly6C⁺ und Gr1⁻) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Expressionstärke der Oberflächenmoleküle wurde über ihre jeweiligen MFI-Werte dargestellt. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse. Striche repräsentieren den Mean±SEM. Die Signifikanzen wurden mithilfe des Student's-t-Test bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant; * $\hat{=}$ p < 0,05; ** $\hat{=}$ p < 0,01; *** $\hat{=}$ p < 0,001).

Die statistische Auswertung bestätigte die in Abbildung 6.6 getätigten Beobachtungen. Die Expression von CD38 auf der Oberfläche von inflammatorischen Monozyten aus Lebern und Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Tiere war im Vergleich zu jenen aus Littermate-Kontrollen stark reduziert. Die MFI-Werte lagen bei 4000 und 9000 in der Leber und 6000 und 18000 in der Milz (siehe Abbildung 6.7). Auch war die Expression von IL-4Rα in den inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu jenen aus Littermate-Kontrollen signifikant reduziert. Die MFI-Werte lagen jeweils bei 1000 und 1500-2000 (siehe Abbildung 6.7). Die Expression von MMR1, CCR2 und CX3CR1 unterschied sich zwischen den Mausgruppen nicht. Die MFI-Werte lagen jeweils bei 2000, 11000 und 8000 (siehe Abbildung 6.7). Auch die signifikante Erhöhung der Expression von CD62L und MHCII wurde durch die statistische Auswertung bestätigt. Die MFI-Werte für beide Moleküle waren 4000 in Zellen aus

Littermate-Kontrollen, während sie bei inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} auf 6000 anstiegen (siehe Abbildung 6.7).

Viele Oberflächenmoleküle, deren Expression durch die Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion verändert wurde, sind charakteristisch für die Polarisation von Makrophagen. Die Expression von Chemokinrezeptoren war unverändert, was zu den Beobachtungen passt, dass die klassische IL-6 Signaltransduktion keinen Einfluss auf die Distribution von inflammatorischen Monozyten während der Infektion hatte (siehe Abschnitt 6.2). Die höhere Expression der Oberflächenmoleküle CD62L und MHC II, die besonders von aktivierten Makrophagen produziert werden, spricht für ein erhöhtes inflammatorischen Milieu in den *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu Littermate-Kontrollen.

6.3.3 Unvoreingenommene Populationsanalyse

Um Unterschiede in Zellpopulationen festzustellen, die durch übliche Auswertungsmethoden nicht erkannt wurden, wurde die so genannte *t-distributed stochastic neighbor embedding* (t-SNE) Methode angewendet. Dabei handelt es sich um eine Methode zur Dimensionsreduktion hochdimensionaler Daten. Wendet man diese auf FACS-Daten an, ergeben sich daraus zweidimensionale Plots, in denen Zellen in zueinander ähnlichen Gruppen zusammengefasst werden. Die Gruppierung erfolgt aufgrund aller untersuchten Antigene und Eigenschaften und Gruppen sind, in diesem Fall, zwischen Organen und Mausgruppen angeglichen. Auf Grund dessen ist man in der Lage unvoreingenommen Populationen zwischen Tiergruppen und Genotypen zu vergleichen. In diesem Experiment wurden nur CD11b⁺ Zellen analysiert und folgende Eigenschaften mit in die Analyse einbezogen.

- CCR2
- Ly6C
- Latex-Beads
- CX3CR1
- CD44
- CD11b
- Gr1

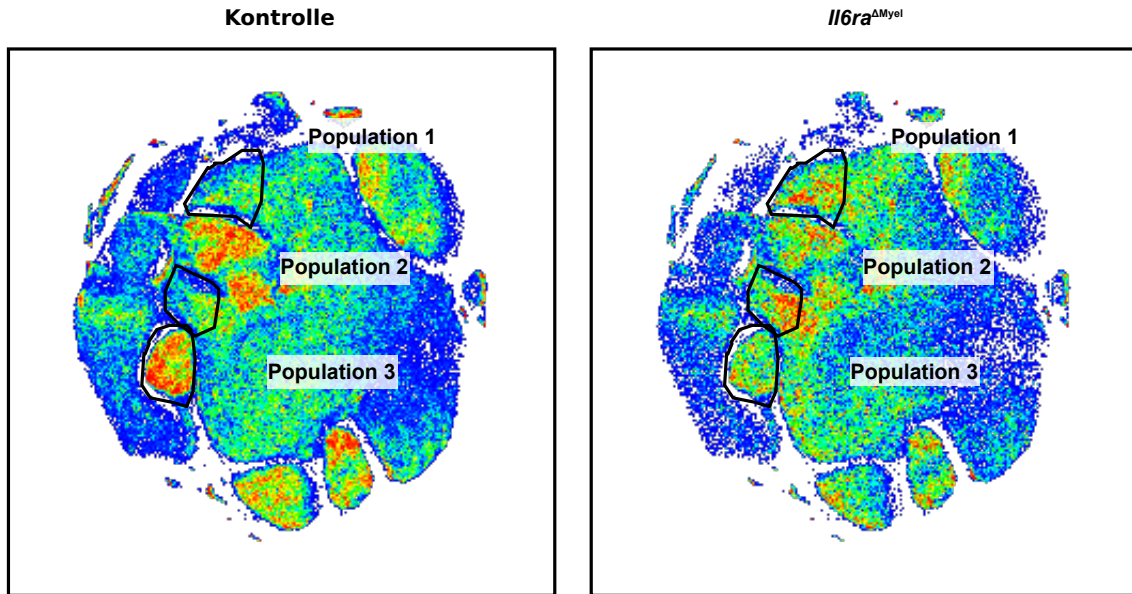


Abbildung 6.8: **t-SNE-Analyse aus infizierten Lebern**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listenien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus der Leber isoliert. Die Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen auf CD11b⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der t-SNE-Methode. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen in den jeweiligen generierten Gruppen. Blau=geringe Anzahl, Rot=hohe Anzahl. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse.

Drei Populationen wiesen im Vergleich zwischen Zellen aus den Lebern infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen Unterschiede auf. Populationen 1 und 2 gehörten zur gleichen Gruppe und waren in Kontrolltieren zu einem geringen Anteil vorhanden, während sie in *Il6ra*^{ΔMyel} hochreguliert waren. Population 3 war in Littermate-Kontrollen im Vergleich zu *Il6ra*^{ΔMyel} Tieren hochreguliert

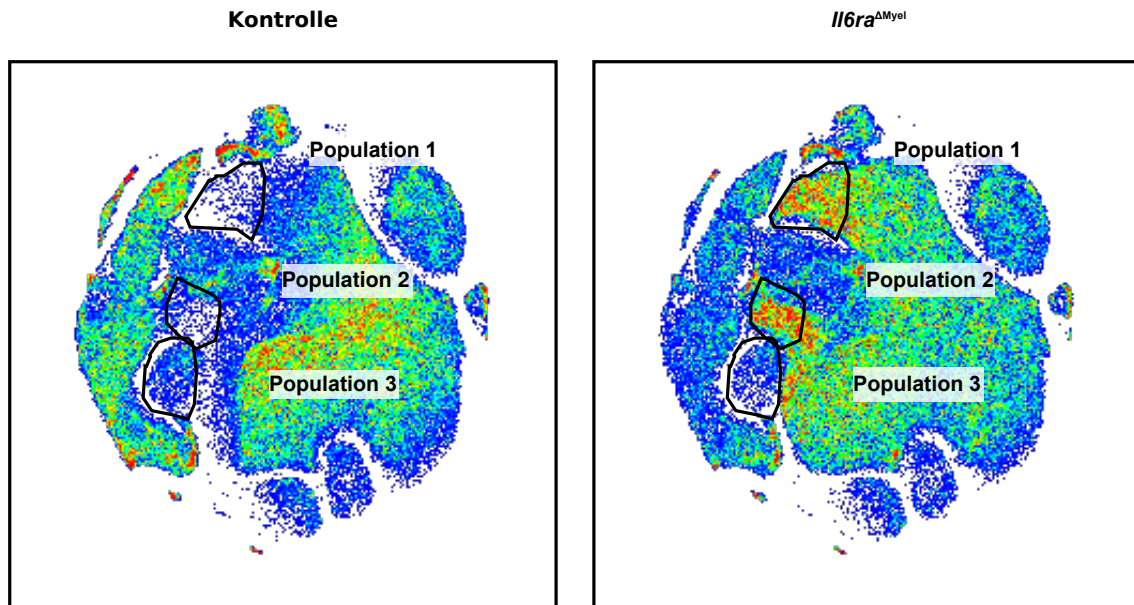


Abbildung 6.9: **t-SNE-Analyse aus infizierten Milzen**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus Milz isoliert. Die Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen auf CD11b⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der t-SNE-Methode. Dargestellt ist die Anzahl der Zellen in den jeweiligen generierten Gruppen. Blau=geringe Anzahl, Rot=hohe Anzahl. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse.

Die Unterschiede von Population 1 und 2 waren in der Milz zwischen *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen eindeutiger als in der Leber. Beide Populationen waren in Kontrolltieren so gut wie gar nicht vorhanden, während sie in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen deutlich zu erkennen waren. Unterschiede in Population 3 waren kaum zu erkennen.

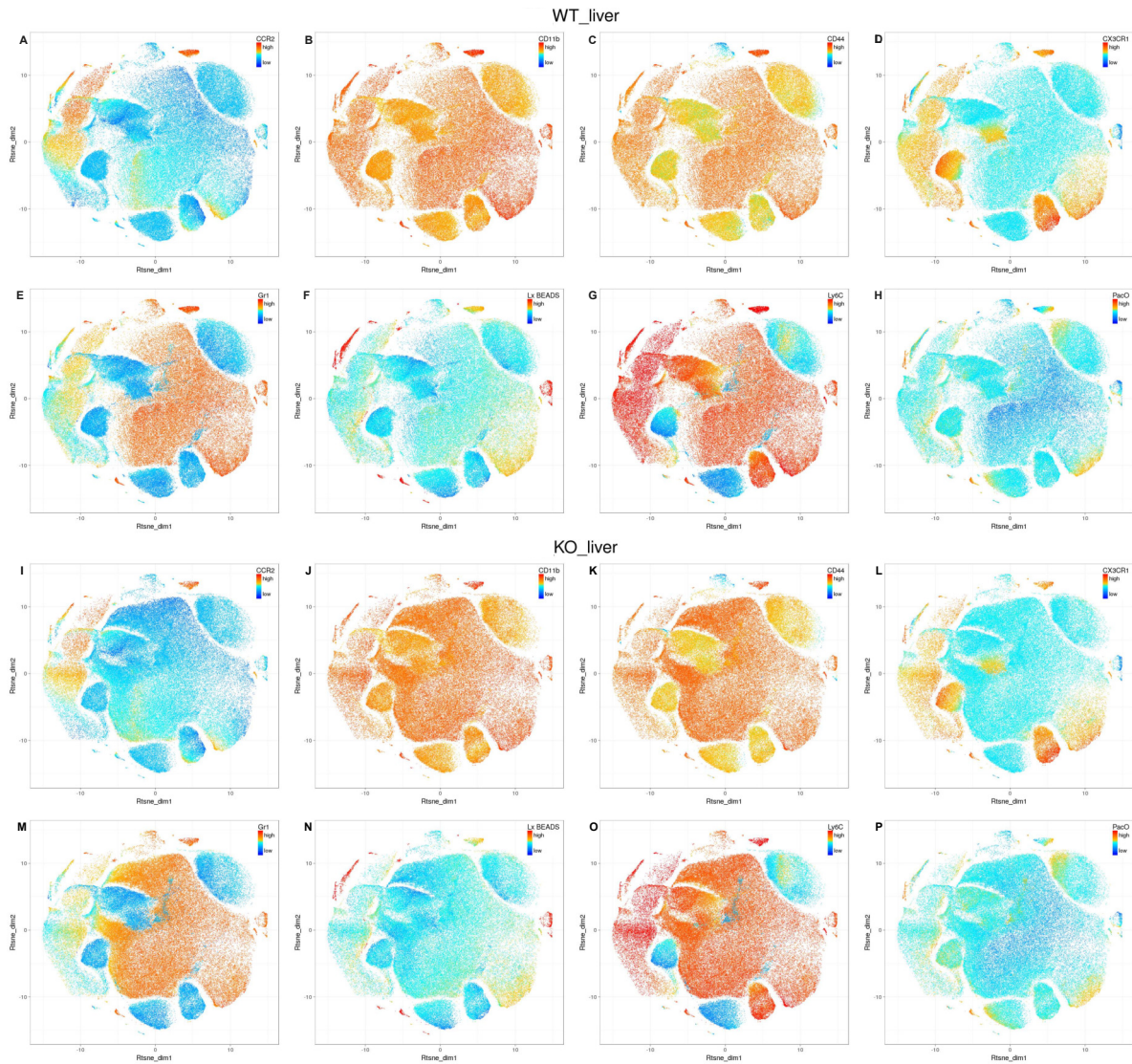


Abbildung 6.10: t-SNE-Analyse aus infizierten Lebern

Littermate-Kontrollen (A-H) und *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse (I-P) wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus der Leber isoliert. Die Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen auf CD11b⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der t-SNE-Methode. Dargestellt sind die MFI-Werte jeder untersuchten Eigenschaft. Blau=niedriger MFI-Wert, Rot=hoher MFI-Wert. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse.

In Abbildung 6.10 ist die Expression der untersuchten Antigene und Eigenschaften der CD11b⁺ Zellen aus der Leber, die bereits in Abschnitt 6.3.3 erwähnt wurden, dargestellt. Dabei sind Zellen, die einen hohen MFI-Wert für die jeweilige Eigenschaft aufweisen, in rot dargestellt,

während Zellen, die einen niedrigen MFI-Wert für die jeweilige Eigenschaft besitzen, in blau dargestellt sind. Auch hier ist zu erkennen, dass Population 1 und 2 in Lebern aus infizierten Littermate-Kontrollen im Vergleich zu *Il6ra*^{ΔMyel} kaum vorhanden waren. Diese Populationen exprimierten CD11b (Abbildung 6.10B,J), Gr1 (Abbildung 6.10E,M) und ein mittleres Maß an Ly6C (Abbildung 6.10G,O), was dem Profil der Granulozyten entspricht. Des Weiteren exprimierten sie ein hohes Maß an CD44 (Abbildung 6.10C,K), was für ihren inflammatorischen Phänotyp spricht. CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, welches in Zell-Zell Interaktionen involviert ist, und wird primär von aktivierten Zellen exprimiert. Die Populationen exprimierten kaum CCR2 (Abbildung 6.10A,I) und CX3CR1 (Abbildung 6.10D,L). Das bedeutet, dass diese Populationen über einen anderen Signaltransduktionsweg rekrutiert wurden. Auch waren diese Populationen negativ für die Fluoreszenz der Latex-Beads, was dafür spricht, dass diese Populationen wenig phagozytische Aktivität aufwiesen (siehe Abschnitt 6.4 für eine detaillierte Erläuterung der Analyse der Phagozytoseaktivität über die Injektion von fluoreszierenden Latex-Beads). Population 3, welche vermehrt in Lebern aus *Il6ra*^{ΔMyel}-Tieren vorhanden war, hingegen war Gr1⁻, Ly6C⁻ und exprimierte weniger CD11b als die neutrophilen Granulozyten. Vermutlich handelte es sich bei dieser Population um geweberesidente Makrophagen oder CD11b⁺ dendritische Zellen, die zwar CD11b exprimieren, jedoch in einem geringeren Maße als klassische myeloide Zellen. Diese Population exprimierte CX3CR1, jedoch kein CCR2. Auch war die Population negativ für die Fluoreszenz der Latex-Beads, sodass auch diese Population keine phagozytische Aktivität aufwies.

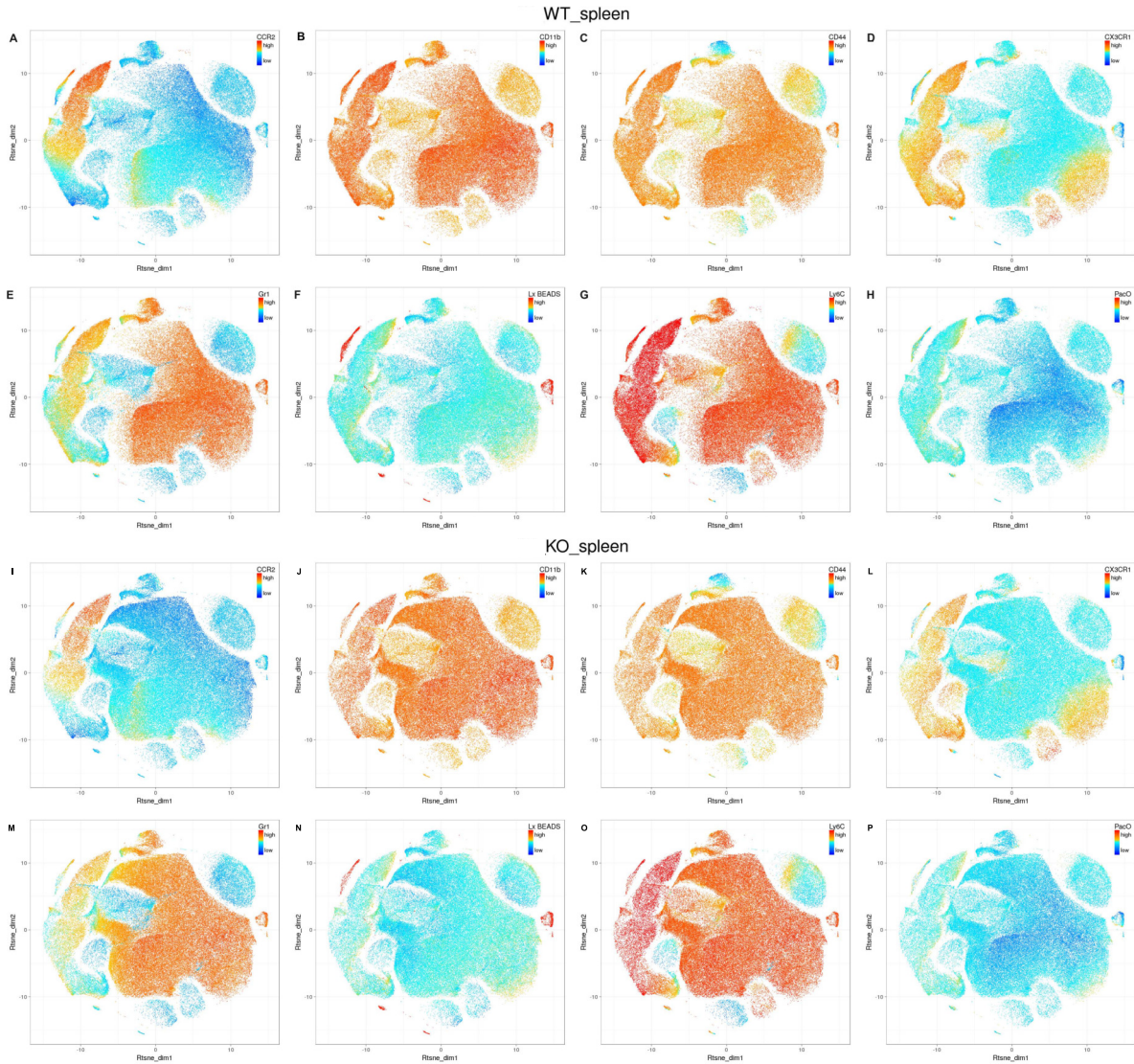


Abbildung 6.11: t-SNE-Analyse aus infizierten Milzen

Littermate-Kontrollen (A-H) und *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse (I-P) wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus der Milz isoliert. Die Analyse der Oberflächenexpression von Proteinen auf CD11b⁺ Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mithilfe der t-SNE-Methode. Dargestellt sind die MFI-Werte jeder untersuchten Eigenschaft. Blau=niedriger MFI-Wert, Rot=hoher MFI-Wert. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse

In Abbildung 6.11, in der die Eigenschaften der CD11b⁺ Zellen aus der Milz dargestellt sind, waren ähnliche Einflüsse der Deletion des klassischen IL-6 Signaltransduktionsweg auf myeloiden Zellen zu erkennen. Auch hier waren Population 1 und 2 in Lebern aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäu-

sen hochreguliert, welche dem Expressionsprofil der neutrophilen Granulozyten entsprechen, und Population 3, welche dem Expressionsprofil von CX3CR1⁺ gewebeständigen Makrophagen oder CX3CR1⁺ CD11b⁺ dendritischen Zellen entsprechen, war vermindert.

Die Ergebnisse deuten auf eine veränderte Differenzierung der Granulozyten, bei denen der klassische IL-6 Signaltransduktionsweg inhibiert ist, hin. Des Weiteren waren CD11b⁺ CX3CR1⁺ gewebeständige Makrophagen oder dendritische Zellen in Organen aus Littermate-Kontrollen hochreguliert, welche möglicherweise einen Einfluss auf die unterschiedliche Kontrolle der Listerieninfektion haben.

6.3.4 Zytokinexpression myeloider Zellen

Anschließend wurde die Expression inflammatorischer Zytokine von inflammatorischen Monozyten untersucht. Dafür wurden Zellen aus den Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen isoliert und *in vitro* mit LPS stimuliert. Die Zellen wurden intrazellulär gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Expression von TNF α und IL-6, zweier proinflammatorischer Zytokine, die charakteristisch für die antibakterielle Aktivität inflammatorischer Monozyten sind, wurde analysiert.

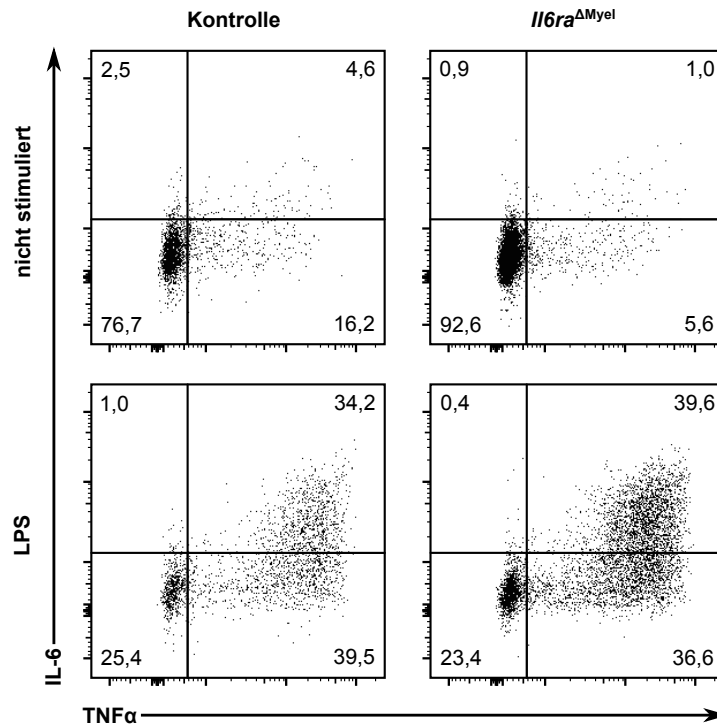


Abbildung 6.12: **Beispieldaten zytokinproduzierender Monozyten**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus Milz isoliert. Die Zellen wurden für 4 h mit LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert und der Golgi-Apparat mit Brefeldin A ($10 \mu\text{g/ml}$) blockiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die Anteile inflammatorischer Monozyten (CD11b^+ , Ly6C^+ und Gr1^-) positiv für intrazelluläres $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 sind dargestellt. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse.

In Abbildung 6.12 sind beispielhaft Daten der durchflusszytometrischen Analyse der Expression von IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ von inflammatorischen Monozyten aus infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Kontrolltieren nach Inkubation mit oder ohne LPS dargestellt. Die Expression beider Zytokine war in inflammatorischen Monozyten aus Kontrolltieren ohne Stimulation leicht erhöht, während die Expression nach der Stimulation mit LPS in den inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen leicht erhöht war.

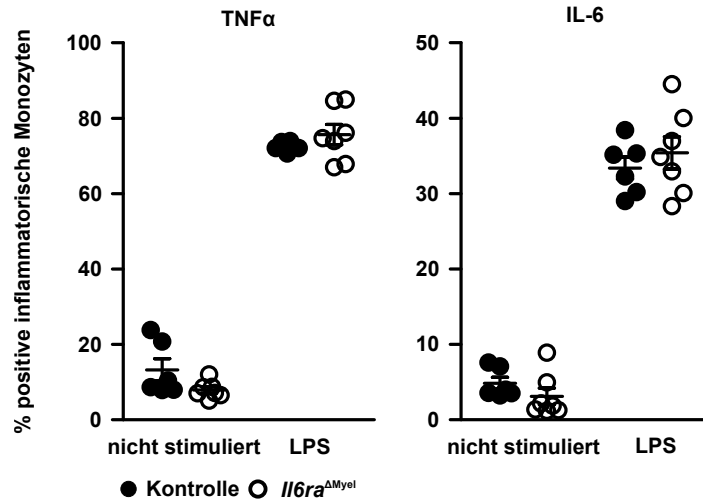


Abbildung 6.13: **Prozentuale Anteile zytokinproduzierender Monozyten**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus Milz isoliert. Die Zellen wurden für 4 h mit LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert und der Golgi-Apparat mit Brefeldin A ($10 \mu\text{g/ml}$) blockiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die prozentualen Anteile an inflammatorischer Monozyten (CD11b^+ , Ly6C^+ und Gr1^-) positiv für intrazelluläres $\text{TNF}\alpha$ und IL-6 sind dargestellt. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse. Striche repräsentieren den $\text{Mean} \pm \text{SEM}$. Die Signifikanzen innerhalb der Stimulationszustände wurden mithilfe des Student's-t-Test bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant).

Inflammatorische Monozyten aus Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen waren nach Inkubation mit LPS zu einem gleichen Anteil $\text{TNF}\alpha^+$ und IL-6^+ . Nicht stimulierte Zellen waren zu 10% $\text{TNF}\alpha^+$ und zu 5% IL-6^+ , während diese nach der Stimulation mit LPS zu 70% beziehungsweise 35% positiv für die Zytokine waren (siehe Abbildung 6.13).

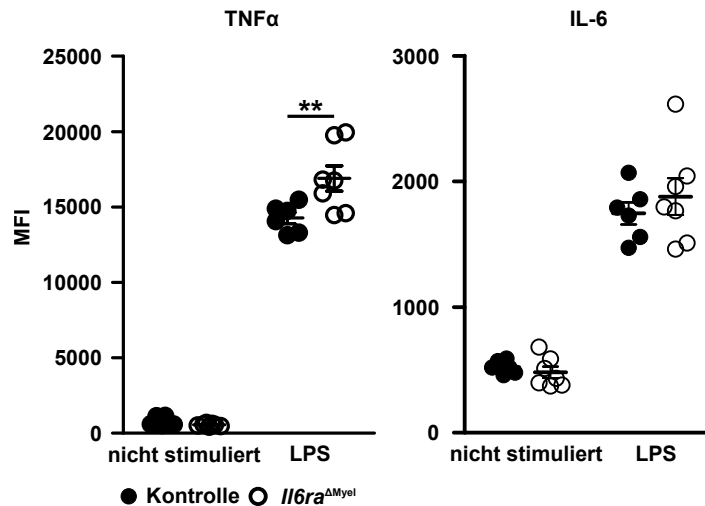


Abbildung 6.14: **MFI zytokinproduzierender Monozyten**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Die Mäuse wurden d2 p.i. analysiert und Zellen aus Milz und Leber isoliert. Die Zellen wurden für 4 h mit LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) stimuliert und der Golgi-Apparat mit Brefeldin A ($10 \mu\text{g/ml}$) blockiert. Die Analyse erfolgte mittels Durchflusszytometrie. MFI-Werte inflammatorischer Monozyten (CD11b^+ , Ly6C^+ und Gr1^-) für intrazelluläres TNF α und IL-6 sind dargestellt. Die Gruppen beinhalteten jeweils 5-7 Mäuse. Die Striche repräsentieren den $\text{Mean} \pm \text{SEM}$. Die Signifikanzen innerhalb der Stimulationszustände wurden mithilfe des Student's-t-Test bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant; ** $\hat{=}$ $p < 0,01$).

Während die prozentualen Anteile Zytokin-positiver Zellen zeigen, wie viele inflammatorische Monozyten Zytokine produzierten, kann man durch die Betrachtung der MFI-Werte der Zytokinfärbungen ein Maß für die Stärke der Zytokinproduktion erhalten. Betrachtet man die MFI-Werte der Zytokinproduktion inflammatorischer Monozyten aus infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen, so ist deutlich zu sehen, dass die MFI-Werte der TNF α -Expression in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen nach *in vitro* Stimulation im Vergleich zu Littermate-Kontrollen signifikant erhöht waren, von 15000 auf 17000. Auch für IL-6 war ein kleiner, jedoch nicht signifikanter, Anstieg in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu Littermate-Kontrollen zu erkennen (siehe Abbildung 6.14).

Dies bedeutet, dass es zwar keinen Unterschied zwischen *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen in der Anzahl Zytokin-produzierender inflammatorischer Monozyten gab, jedoch dass die inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen nach Stimulation pro Zelle eine erhöhte Menge an inflammatorischen Zytokinen produzieren.

6.3.5 Einfluss von IL-6 auf die M1 und M2 Polarisierung

In anderen Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass IL-6 Signaltransduktion einen Einfluss auf die Polarisierung von inflammatorischen Monozyten zu M1 oder M2 Makrophagen hat [40]. Wie in Abbildung 6.7 zu sehen ist, konnten auch innerhalb dieser Arbeit bereits Hinweise auf Polarisationsdefekte der inflammatorischen Monozyten beobachtet werden. Um festzustellen, ob es sich dabei um einen direkten Effekt ausgelöst durch die IL-6 Signaltransduktion handelt, oder ob es ein indirekter Effekt ist, wurden *in vitro* Experimente mit kultivierten Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*) (BMDM) aus naiven *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermatekontrollen durchgeführt. Die Zellen wurden, nach der Differenzierung zu Makrophagen, über Nacht unter polarisierenden Bedingungen mit oder ohne rekombinanten IL-6 inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert, um die Veränderungen der Polarisation durch die IL-6 Signaltransduktion festzustellen.

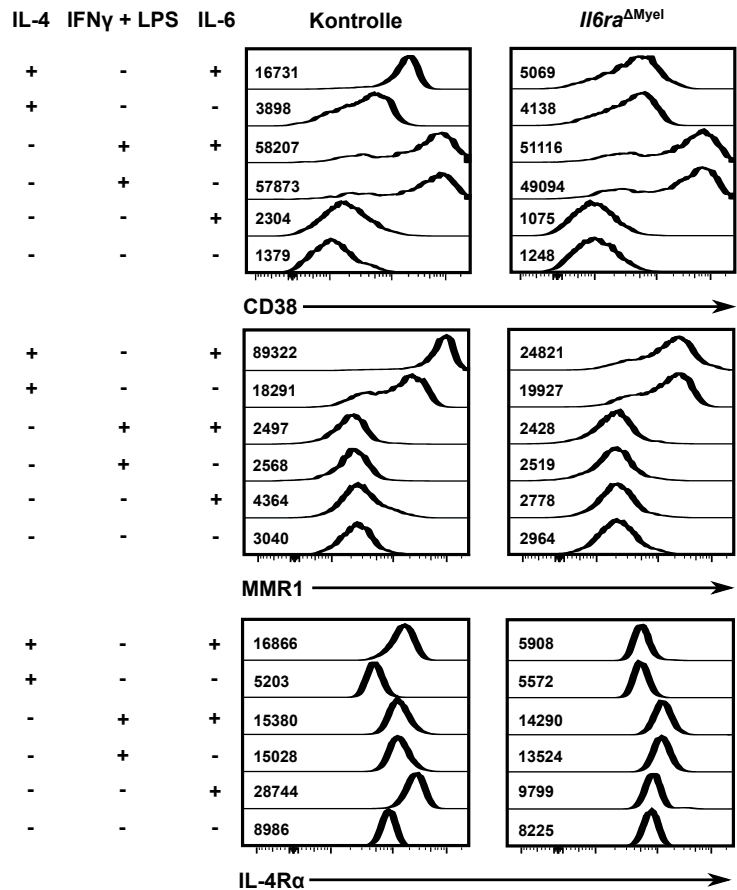


Abbildung 6.15: Einfluss von IL-6 auf die Expression von M1 und M2 charakteristischen Oberflächenproteinen

BMDM von *Il6ra* Δ Myel Mäusen und Littermate-Kontrollen wurden über Nacht mit IL-6 (160 ng/ml), IL-4 (40 ng/ml), LPS (2 μ g/ml) oder IFN γ (40 ng/ml) stimuliert. Die Oberflächenexpression von CD38, MMR1 und IL-4R α wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dargestellt sind Histogramme der jeweiligen Oberflächenfärbungen, Zahlen innerhalb der Histogramme repräsentieren die zugehörigen MFI-Werte. Ein repräsentatives Experiment von zwei ist dargestellt.

In BMDMs, die ohne IL-4, IFN γ oder LPS inkubiert wurden (M0 Polarisation), war weder in Zellen aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen noch aus Littermate-Kontrollen eine Induktion der CD38-Expression zu erkennen. Die Expression von CD38 stieg jedoch bei BMDMs, welche mit IFN γ + LPS stimuliert wurden (M1 Polarisation) sowohl in BMDMs aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen als auch aus Kontrolltieren stark an, wobei die Expression in Zellen aus Kontrolltieren stärker war (MFI 58000 und 50000). Zusätzliche Stimulation mit IL-6 hatte keinen Einfluss auf die Expression von CD38. Auch bei BMDMs aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen und Littermate-Kontrollen,

welche mit IL-4 stimuliert wurden (M2 Polarisation), war eine schwache Induktion der CD38-Expression, auf einen MFI-Wert von 5000, zu erkennen. Die Expression auf Zellen aus Kontrolltieren wurde durch die zusätzliche Inkubation mit IL-6 stark erhöht (auf einen MFI-Wert von 17000), jedoch war dieser Effekt auf BMDMs aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen nicht zu erkennen (siehe Abbildung 6.15).

Eine Expression von MMR1 war unter M0- und M1-Bedingungen weder in Zellen aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen noch aus Littermate-Kontrollen zu erkennen. Unter M2 Bedingungen wurde die Expression auf BMDMs aus beiden Mausgruppen stark induziert, auf einen MFI-Wert von 18000-20000. Nach der zusätzlichen Stimulation mit IL-6 jedoch stieg die Expression von MMR1 unter M2 Bedingungen auf Zellen aus Kontrolltieren stark an (MFI von 90000), während die Expression auf Zellen aus *Il6ra*^{ΔMyel} vergleichsweise schwach anstieg (MFI von 25000) (siehe Abbildung 6.15).

Die Expression von IL-4R α wurde unter M1-Bedingungen im Vergleich zu M0- oder M2-Bedingungen in BMDMs aus beiden Mausgruppen leicht erhöht, auf einen MFI-Wert von 15000. Die Inkubation mit IL-6 hatte unter M1-Bedingungen keinen Einfluss auf die Expression von IL-4R α . Unter M0- und M2-Bedingungen erhöhte sich die Expression von IL-4R α auf Zellen aus Kontrolltieren durch die zusätzliche Inkubation mit IL-6, auf einen MFI-Wert von 29000 unter M0- und 17000 unter M2-Bedingungen (siehe Abbildung 6.15).

Die Ergebnisse zeigen, dass die IL-6 Signaltransduktion einen direkten Einfluss auf die Polarisation von M2 Makrophagen hat. Die Expression von den M2 typischen Oberflächenproteinen MMR1 und IL-4R α wird durch IL-6 Signaltransduktion induziert, jedoch wird auch das proinflammatorische, für M1 Makrophagen typische, CD38 unter M2-Bedingungen durch IL-6 induziert.

6.3.6 Transkriptomanalyse inflammatorischer Monozyten

Durch die vorhergehenden Versuchen wurde gezeigt, dass fehlende klassische IL-6 Signaltransduktion auf inflammatorischen Monozyten einen Einfluss auf deren Differenzierung hat. In den Versuchen konnten jedoch nur ausgewählte und spezifische Aspekte der Monozytendifferenzierung untersucht werden. Um einen besseren Überblick über die Effekte der klassischen IL-6 Signaltransduktion zu erhalten, wurden Leukozyten aus Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen isoliert. Inflammatorische Monozyten (definiert als CD11b⁺, Ly6C⁺, Gr1⁻) wurden mittels FACS sortiert. Aus diesen Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RNA-Sequenzierung analysiert. Diese Analyse ermöglicht es quantitative Aussagen über Mengen an mRNA und dahergehend ein Vergleich der Mengen zwischen den Mausgruppen zu treffen, sodass dieser breite Ansatz einen Überblick über Einflüsse der

klassischen IL-6 Signaltransduktion auf die Differenzierung der inflammatorischen Monozyten ermöglicht. Die Rohdaten der RNA-Sequenzierung sind in Tabelle 10.2 zu sehen.

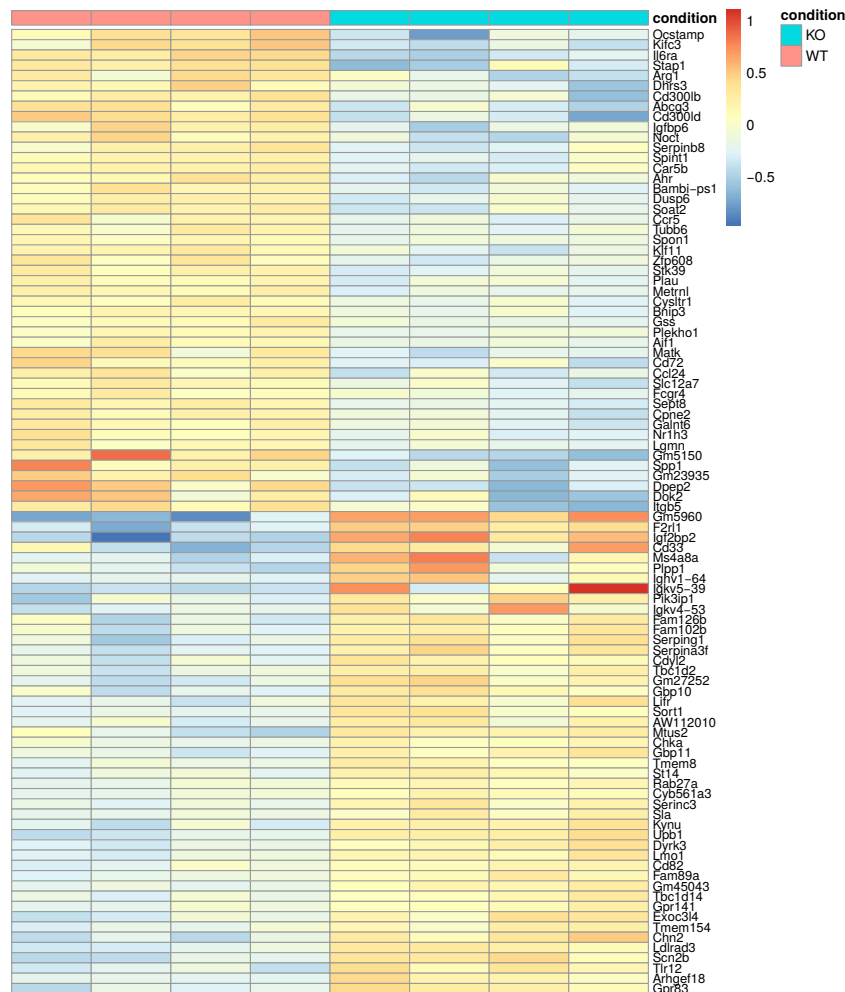


Abbildung 6.16: **Clustering der statistisch signifikant differenziell exprimierten Gene**

Il6ra^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen wurden mit 2×10^4 Listerien infiziert. An d2 p.i. wurden inflammatorische Monozyten (definiert als CD11b⁺, Iy6C⁺, Gr1⁻) aus der Milz mittels FACS sortiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, sequenziert und quantitativ analysiert. Differenzielle Expression wurde mit bioinformatischen Methoden bestimmt. Die Gruppen beinhalteten 4 Mäuse, welche individuell analysiert wurden. Rot/Blau=in *Il6ra*^{ΔMyel} Tieren im Vergleich zu Littermate-Kontrollen hochreguliert/herunterreguliert. Die Gruppierung erfolgte aufgrund der Veränderung in der mRNA-Menge.

Um zu überprüfen, ob die differenzielle Genexpression mit den Genotypen korreliert und somit die Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion auf inflammatorischen Monozyten

einen kohärenten Phänotyp zeigen, wurden die Mäuse aufgrund der veränderten Genexpression (angegeben als log₂-fold-change (log₂FC)-Wert) der statistisch signifikant differenziell exprimierten Gene gruppiert. *Il6ra*^{ΔMyel} und Littermate-Kontrollen wurden rein aufgrund der differenziell exprimierten Gene in zusammengehörende Gruppen sortiert. Das bedeutet, dass Genexpression innerhalb der Mausgruppen kohärent war und die Daten mit weiterführenden Analysen auswertbar sind.

6.3.6.1 REViGO-Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten

Reduce + Visualize Gene Ontology (REViGO) bezeichnet eine Methode zur Gruppierung und Visualisierung von Genen anhand ihrer Funktionen. Dabei werden die Funktionen der Gene in definierte Gruppen eingeteilt, die als *gene ontology terms (GO-terms)* bezeichnet werden [92]. Bei der Analyse mittels REViGO werden redundante *GO-terms* entfernt und die Daten aufgrund ihrer Ähnlichkeit und ihres log₂FC-Werts gruppiert und visualisiert. Dies ermöglicht einen unbeeinflussten Einblick auf den Einfluss, den die Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion auf molekulare Funktionen und Signaltransduktionspfade hat.



Abbildung 6.17: **REViGO Analyse der GO-terms der Kategorie: molecular function**

Il6ra^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen wurden mit 2×10^4 Listerien infiziert. An d2 p.i. wurden inflammatorische Monozyten (definiert als CD11b⁺, Ly6C⁺, Gr1⁻) aus der Milz mittels FACS sortiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, sequenziert und quantitativ analysiert. Die differenzielle Expression wurde mit bioinformatischen Methoden bestimmt. Die *GO-terms* der differenziell exprimierten Gene wurden mittels der REViGO Methode analysiert und anhand ihres log₂FC-Werts (positiv/negativ: in *Il6ra*^{ΔMyel} gegenüber Littermate hochreguliert/herunterreguliert) auf der X-Achse und ihrer thematischen Ähnlichkeit auf der Y-Achse aufgetragen. Die Größe der Kreise repräsentiert die Häufigkeit des *GO-terms*. Die Gruppen beinhalteten jeweils 4 Mäuse.

Die *GO-terms* der differenziell exprimierten Gene wurden aufgrund des log₂FC-Werts von links nach rechts aufgetragen (siehe Abbildung 6.3.6.1). Ein negativer Wert bedeutet, dass die Gene, die zu dem jeweiligen *GO-term* beigetragen haben, in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu Littermate-Kontrollen herunterreguliert sind, während ein positiver Wert das Gegenteil anzeigt. *GO-terms* der Kategorie *molecular function* wurden analysiert. Gene, die herunterreguliert wurden, besitzen die *GO-terms interleukin-6 receptor activity* und *interleukin-6 binding*, was dem Genotyp entspricht. Des Weiteren waren Gene mit den *GO-terms ciliary neurotrophic factor binding* und *exopeptidase activity* herunterreguliert. Gene, deren *GO-terms* die Bindung von RNA beschreiben (*poly(A) RNA binding* und *mRNA3'-UTR binding*) und Gene, welche die G-Proteinaktivität beeinflussen (*G-protein alpha/beta-subunit binding*, *heterotrimeric G-protein binding*), waren hochreguliert. Ein weiterer hochregulierter *GO-term* weist auf Gene mit Hydrolase Aktivität hin.

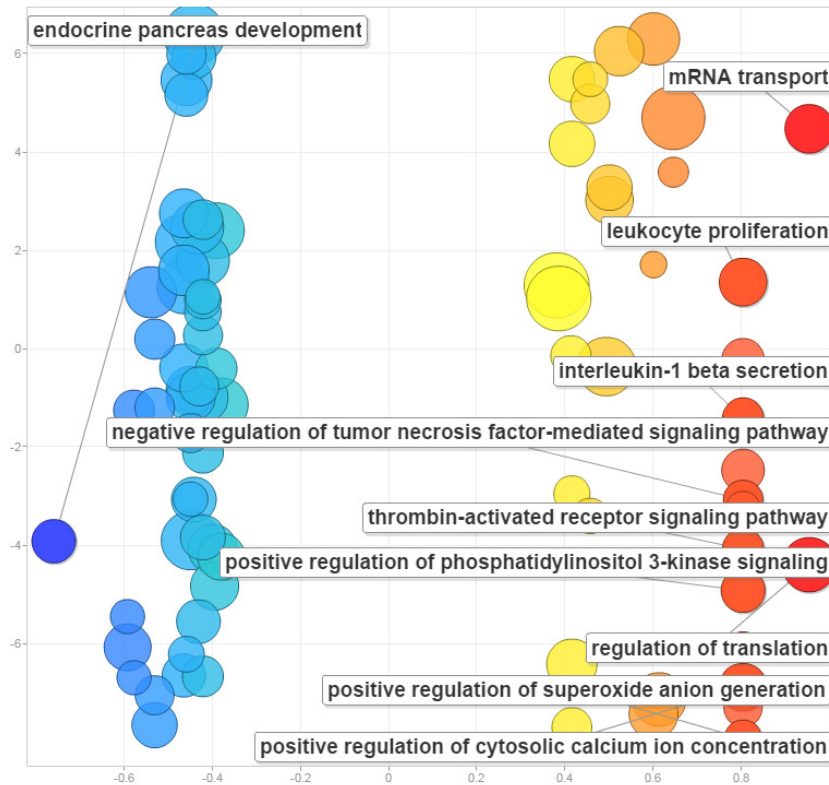


Abbildung 6.18: **REViGO Analyse der GO-terms der Kategorie: *biological processes***

Il6ra^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen wurden mit 2×10^4 Listerien infiziert. An d2 p.i. wurden inflammatorische Monozyten (definiert als CD11b⁺, Ly6C⁺, Gr1⁻) aus der Milz mittels FACS sortiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert, sequenziert und quantitativ analysiert. Die differenzielle Expression wurde mit bioinformatischen Methoden bestimmt. Die GO-terms der differenziell exprimierten Gene wurden mittels der REViGO Methode analysiert und anhand ihres log₂FC-Werts (positiv/negativ: in *Il6ra*^{ΔMyel} gegenüber Littermate hochreguliert/runterreguliert) auf der X-Achse und ihrer thematischen Ähnlichkeit auf der Y-Achse aufgetragen. Die Größe der Kreise repräsentiert die Häufigkeit des GO-terms. Die Gruppen beinhalteten jeweils 4 Mäuse

Die GO-terms der differenziell exprimierten Gene der Kategorie *biological processes* wurden analysiert und anhand des zugehörigen log₂FC-Werts von links nach rechts aufgetragen. In *Il6ra*^{ΔMyel}-Tieren im Vergleich zu Littermate-Kontrollen waren Gene des GO-term *endocrine pancreas development* deutlich herunterreguliert. Hochreguliert waren Gene deren GO-terms Translation (*mRNA transport*, *regulation of translation*) und Proliferation (*leukocyte proliferation*) beschreiben. Des Weiteren waren Gene, welche zu inflammatorischen GO-terms (*IL-1β secretion*, *positive regulation of superoxid anion generation*, *positive regulation*

of cytosolic calcium concentration, positive regulation of PI3k signaling, thrombin-activated receptor signaling pathway, negative regulation of TNF-mediated signaling pathway) zählen, in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu Littermate-Kontrollen hochreguliert.

Diese Beobachtungen zeigen, dass die Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion sowohl verschiedene inflammatorische Funktionen, als auch grundlegende Zellfunktionen, wie Proliferation, Translation und Signaltransduktion beeinflusst.

6.4 Einfluss von IL-6 auf die Phagozytoseaktivität von inflammatorischen Monozyten

Die Kontrolle von Listerien durch das angeborene Immunsystem der Maus ist in CD38KO stark eingeschränkt [96] und Phagozytoseaktivität wird teilweise durch CD38 kontrolliert [97]. Das könnte bedeuten, dass auch in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen die Phagozytose durch inflammatorische Monozyten mit niedriger CD38-Expression eingeschränkt sein könnte. Eine eingeschränkte Fähigkeit zur Phagozytose würde bedeuten, dass die inflammatorischen Monozyten nicht in der Lage sind pathogene Bakterien aufzunehmen und abzubauen und so die Infektion zu klären, wodurch die erhöhte Bakterienlast erklärt werden könnte.

6.4.1 Einfluss von IL-6 auf die *in vitro* Phagozytoseaktivität

Zunächst wurde der Einfluss von IL-6 auf die Phagozytoseaktivität *in vitro* getestet. Dafür wurden Listerien mit 5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester (CFSE) markiert. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Lage ist Zellmembranen zu durchdringen. Innerhalb von Zellen wird CFSE von zelleigenen Esterasen gespalten und verliert die Fähigkeit Zellmembranen zu durchdringen und färbt so permanent Zellen an. Aktivierte inflammatorische Monozyten (definiert als CD11b⁺, Gr1⁻, Ly6C⁺) wurden aus Milzen, Lebern und Peritoneallavages, welche einen besonders hohen Anteil an inflammatorischen Monozyten enthalten, von infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Kontrolltieren isoliert. Die Zellen wurden mit den CFSE-markierten Listerien inkubiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

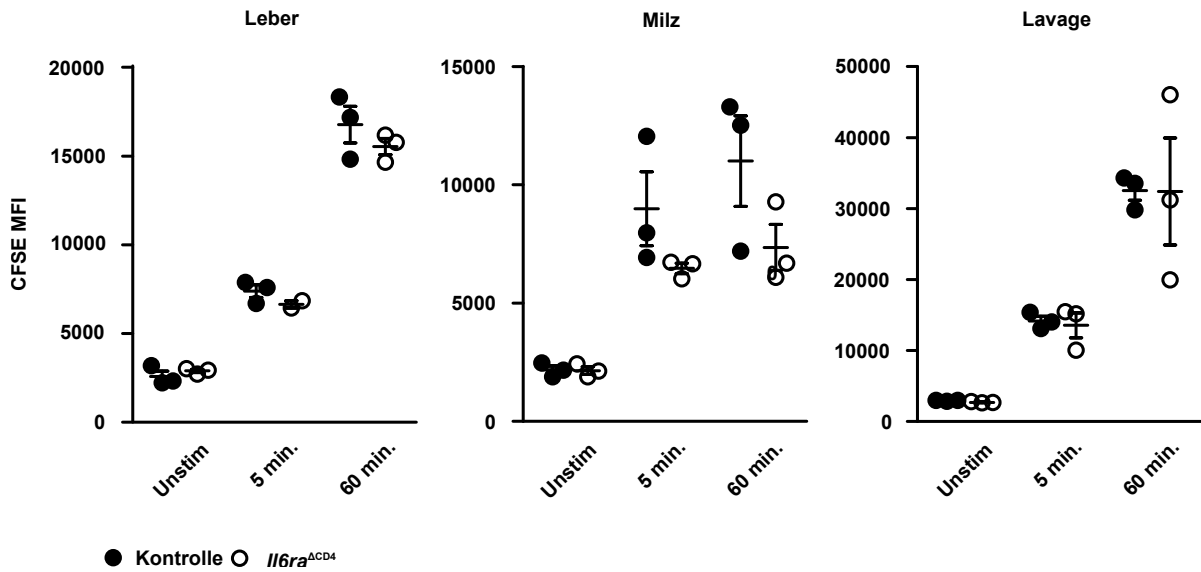


Abbildung 6.19: **Einfluss von IL-6 auf die *in vitro* Phagozytoseaktivität**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. Zellen aus Milz, Leber und Peritoneallavage wurden isoliert und *in vitro* mit einem Überschuss an CFSE-markierten Listerien für die angegebene Zeit inkubiert. Die Analyse der Aufnahme erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Inflammatorische Monozyten wurden als CD11b⁺, Ly6C⁺ und Gr1⁻ definiert und die CFSE-Fluoreszenz der Zellen wurde als Maß der aufgenommenen Listerien bestimmt. Die Gruppen beinhalteten jeweils 3 Mäuse. Die Striche repräsentieren den Mean ± SEM. Die Signifikanzen innerhalb der Zeitpunkte wurden mithilfe des Student's-t-Test bestimmt (keine Annotation ≙ nicht signifikant).

Nach der Inkubation mit den CFSE-markierten Listerien stiegen die MFI-Werte der inflammatorischen Monozyten mit zunehmender Inkubationszeit an. In inflammatorischen Monozyten der Leber erhöhten sich die Werte von 3000 ohne Inkubation auf 7500 nach 5 Minuten und 16000 nach 60 Minuten Inkubation. Ähnlich zum Anstieg der MFI-Werte in der Leber erhöhten sich die Werte in inflammatorischen Monozyten der Milz von 3000 auf 7500 nach 5 Minuten. Nach 60 Minuten wurde nur ein minimaler Anstieg beobachtet. Bei inflammatorischen Monozyten aus der Peritoneallavage steigen die MFI-Werte von 3000 ohne Inkubation auf 15000 nach 5 Minuten und 33000 nach 60 Minuten an. Unterschiede zwischen den Mausgruppen konnten jedoch nicht festgestellt werden.

6.4.2 Einfluss von IL-6 auf die *in vivo* Phagozytoseaktivität

Für die Bestimmung der *in vivo* Phagozytoseaktivität wäre es möglich, den bereits infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen kurz vor der Analyse eine hohe Dosis CFSE-markierter Listerien zu injizieren und die Aufnahme mittels Durchflusszytometrie direkt *ex vivo* zu bestimmen. Um ein verlässliches Signal zu erhalten wäre jedoch eine letale Listeriendosis nötig gewesen. Deshalb injizierten wir Fluorochrom-markierte Latex-Beads, welche unspezifisch von phagozytierenden Zellen aufgenommen werden und im Durchflusszytometer mithilfe der Fluoreszenz der Latex-Beads in den phagozytierenden Zellen nachgewiesen werden können [98]. Diese Latex-Beads wurden den infizierten Tieren kurz vor der Analyse i.v. gespritzt und Zellen aus Leber und Milz isoliert. Die Analyse der Granulozyten (CD11b⁺, Ly6C^{int}, Gr1⁺) und inflammatorischen Monozyten (CD11b⁺, Gr1⁻, Ly6C⁺) erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

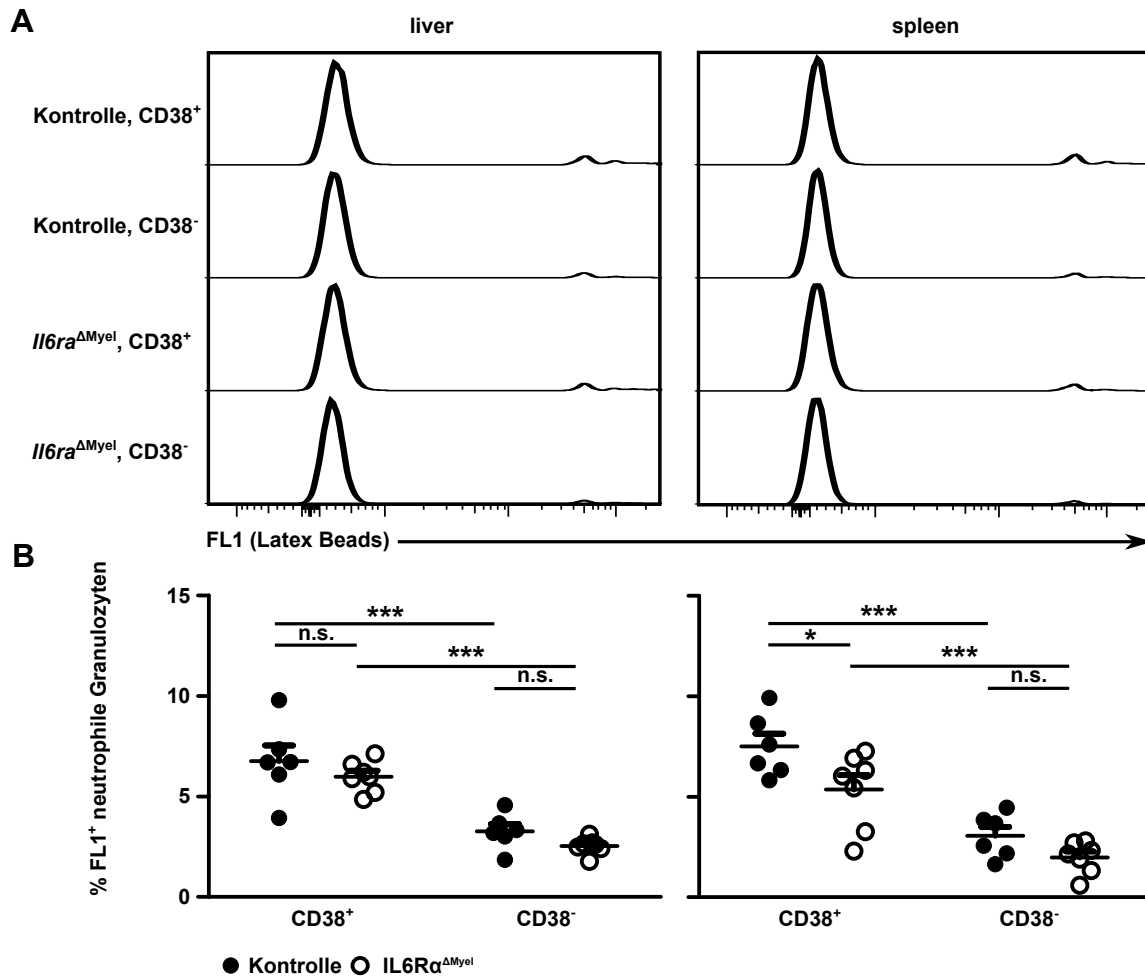


Abbildung 6.20: **Einfluss von IL-6 auf die *in vivo* Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. An d2 p.i. wurden den Mäusen i.v. 1:25 in PBS verdünnte yellow-green fluorescent FluoSpheres[®] Carboxylate-Modified Microspheres, $0,5 \mu\text{m}$ i.v. injiziert. Zellen aus Milz und Leber wurden 1 h nach Injektion isoliert und die Aufnahme der Beads durch die Granulozyten (definiert als CD11b^+ , Ly6C^{int} , Gr1^+) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Jede Versuchsgruppe beinhaltete 6 bis 7 Mäuse. Ein repräsentatives Experiment von zwei ist dargestellt. Die Striche repräsentieren $\text{Mean} \pm \text{SEM}$. Die Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant; * $\hat{=}$ $p < 0,05$; *** $\hat{=}$ $p < 0,001$).

Neutrophile Granulozyten aus Lebern und Milzen infizierter Littermate-Kontrollen waren in einem größeren Maße dazu in der Lage Latex-Beads aufzunehmen als jene aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen, jedoch war ein signifikanter Unterschied nur bei CD38^+ neutrophilen Granulozy-

ten der Milz zu beobachten (7,5% zu 6%). Zusätzlich zeigten innerhalb der Mausgruppen CD38⁺ neutrophile Granulozyten aus infizierten Mäuse eine signifikant erhöhte Aufnahme von Latex-Beads im Vergleich zu CD38⁻ neutrophilen Granulozyten (siehe Abbildung 6.20). Diese Beobachtungen zeigen eindeutig, dass Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion auf myeloiden Zellen die Phagozytoseaktivität von neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Auch die Expression von CD38 korreliert mit der Phagozytoseaktivität.

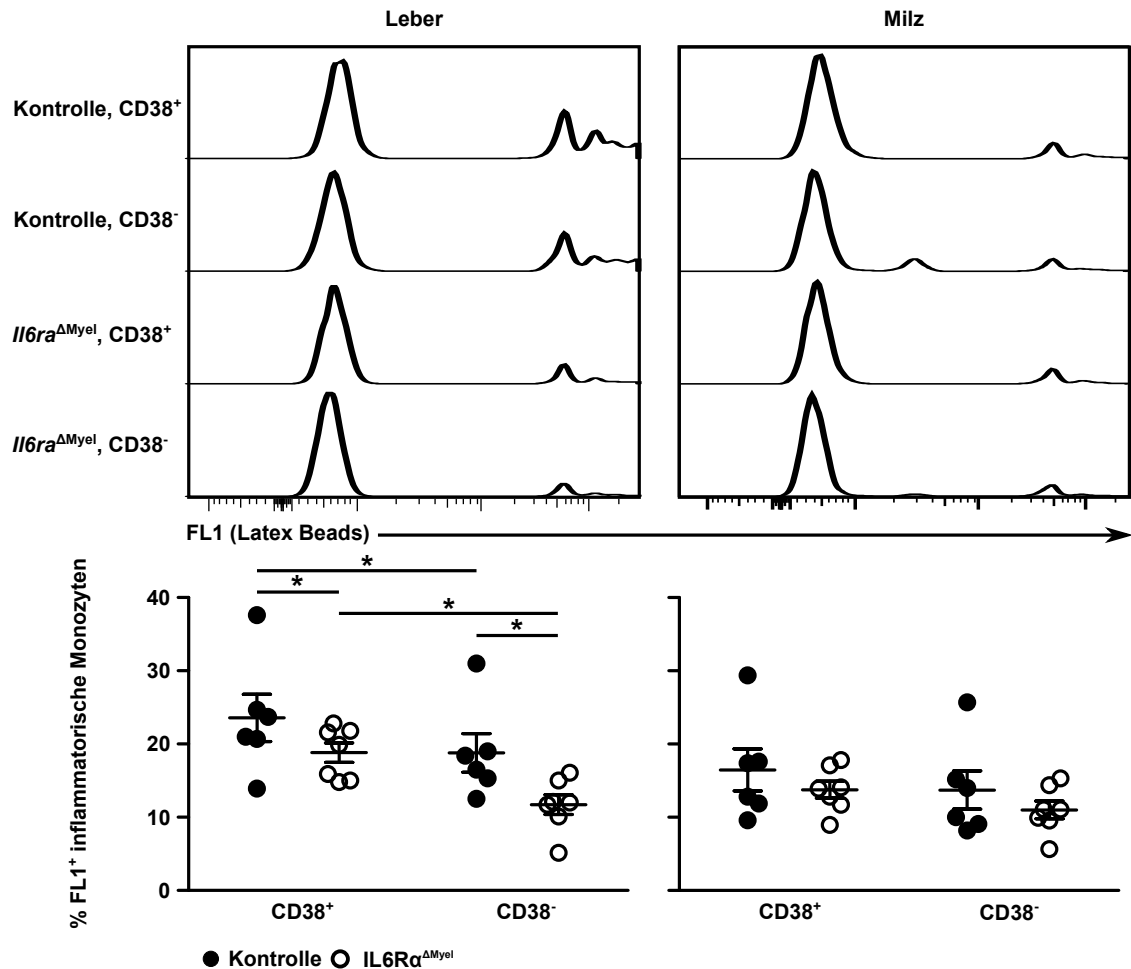


Abbildung 6.21: **Einfluss von IL-6 auf die *in vivo* Phagozytoseaktivität von inflammatorischen Monozyten**

Il6ra^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen wurden i.v. mit 2×10^4 Listerien infiziert. An d2 p.i. wurden den Mäusen i.v. 1:25 in PBS verdünnte yellow-green fluorescent FluoSpheres[®] Carboxylate-Modified Microspheres, $0,5 \mu\text{m}$ i.v. injiziert. Zellen aus Milz und Leber wurden 1 h nach Injektion isoliert und die Aufnahme der Beads durch die inflammatorischen Monozyten (definiert als CD11b⁺, Ly6C⁺, Gr1⁻) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Jede Versuchsgruppe beinhaltete 6 bis 7 Mäuse. Ein repräsentatives Experiment von zwei ist dargestellt. Die Striche repräsentieren Mean \pm SEM. Signifikanzen wurden mittels zweifaktorieller ANOVA bestimmt (keine Annotation $\hat{=}$ nicht signifikant; * $\hat{=}$ p < 0,05).

Auch CD38⁺ inflammatorische Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} und Littermate-Kontrollen zeigten eine erhöhte Aufnahme von Latex-Beads. In der Leber zeigten CD38⁺ (20% zu 25%) und CD38⁻ (10% zu 20%) inflammatorische Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen eine signifikant re-

duzierte Aufnahme von Latex-Beads im Vergleich zu den jeweiligen Zellen aus Kontrolltieren (siehe Abbildung 6.21). Eine ähnliche Verteilung war in inflammatorischen Monozyten aus der Milz zu erkennen (jeweils 11-12% zu 15-16%), die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Klar zu sehen ist jedoch, dass inflammatorische Monozyten durchschnittlich eine höhere Aufnahme der Latex-Beads als neutrophile Granulozyten zeigten (siehe Abbildung 6.20), wodurch ihre Rolle als wichtigster phagozytierender Zelltyp unterstützt wurde. Die Beobachtungen zeigen auch, dass CD38 die Phagozytoseaktivität positiv beeinflusst und dass neutrophile Granulozyten und inflammatorischen Monozyten, die Defekte in der klassischen IL-6 Signaltransduktion haben, eine schlechtere Phagozytoseaktivität aufweisen. Bereits in Abbildung 6.7 konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen signifikant weniger CD38 exprimieren. Ob die Verschlechterung der Phagozytoseaktivität von inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen jedoch durch das Fehlen von CD38 ausgelöst wird, oder ob es sich um unabhängige Effekte handelt, lässt sich aus den Daten nicht eindeutig schließen.

7 Diskussion

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften [63], welches in bakteriellen Infektionen eine wichtige Rolle spielt [99]. Die Signalübertragung von IL-6 erfolgt über den IL-6 Rezeptor. Dieser besteht aus der Interleukin-6 Rezeptor α -Untereinheit (IL-6R α), welche keine intrazelluläre Signalfunktion besitzt, und dem signalgebenden gp130 Rezeptor. Lösliches IL-6 bindet an ein membrangebundenes IL-6R α Molekül, welches daraufhin ein gp130 Molekül rekrutiert. Dieser IL-6/IL-6R α /gp130 Komplex homodimerisiert mit einem weiteren, gleich aufgebauten Komplex und bildet so den hexameren Signalkomplex [83]. Die Signaltransduktion über diesen Komplex wird klassische IL-6 Signaltransduktion genannt [63]. Die klassische IL-6 Signaltransduktion ist aufgrund der auf Leukozyten und Hepatozyten begrenzten Expression von IL-6R α auf diese Zelltypen beschränkt [82]. Lösliche IL-6R α Untereinheiten, produziert durch proteolytische Abspaltung oder alternatives Spleißen, sind auch in der Lage IL-6 zu binden. Diese löslichen Komplexe können wiederum membrangebundenes gp130 binden und die so genannte Trans-Signaltransduktion auslösen. Da gp130 ubiquitär exprimiert wird, wird das Wirkspektrum so auf alle somatischen Zellen erweitert [85]. Der dritte IL-6 Signalweg ist die kürzlich beschriebene IL-6 Cluster-Signaltransduktion. SIRP α^+ dendritische Zellen beladen intrazellulär membranständige IL-6R α Untereinheiten mit IL-6 und präsentieren diese Komplexe in der immunologischen Synapse den antigenerkennenden T-Zellen. Die gp130 Moleküle der T-Zellen sind daraufhin in der Lage die IL-6/IL-6R α Komplexe der dendritischen Zelle zu binden, wodurch ein IL-6 Signal in der T-Zelle ausgelöst wird [91]. In vorhergehenden Arbeiten konnten wir bereits zeigen, dass IL-6 während der Listerieninfektion eine entscheidende Rolle spielt [69]. Unklar war jedoch, für welche Zellen IL-6 während der Listerieninfektion essentiell ist und welcher IL-6 Signalweg für die Effekte verantwortlich ist.

7.1 IL-6 ist essentiell für die Listerienkontrolle durch myeloide Zellen

Da in unserer vorhergehenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass IL-6 in der frühen Phase der Infektion und deshalb vermutlich in der angeborenen Immunantwort wichtig ist [69], entschieden wir uns, uns auf die Zellen der myeloiden Linie zu konzentrieren. Um den Einfluss von IL-6 auf diese Zellen zu untersuchen, wurde das $Il6ra^{fl/fl} \times LysM^{Cre+}$ ($Il6ra^{\Delta Myel}$) Mausmodell verwendet. In diesen Mäusen fehlt Zellen, die LysM exprimieren, die membranständige IL-6R α Untereinheit. LysM wird von inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten exprimiert [100], was dazu führt, dass diese Zellpopulationen nicht mehr auf klassische aber immer noch auf Trans-Signaltransduktion reagieren. Die Kontrolle von Listerien hängt gerade in der frühen Phase stark von Zellen der myeloiden Linie ab, insbesondere von inflammatorischen M1 Makrophagen, welche aus inflammatorischen Monozyten differenzieren [22, 23, 26]. Neutrophile Granulozyten spielen in vielen bakteriellen Infektionsmodellen, wie zum Beispiel bei der Infektion mit *Citrobacter rodentium* oder *Clostridium difficile*, eine wichtige Rolle für die erfolgreiche Kontrolle der Bakterien [101, 102]. In der Kontrolle von Infektionen mit intrazellulären Bakterien, wie zum Beispiel *Salmonella typhimurium*, spielen neutrophile Granulozyten aber nur eine untergeordnete Rolle [103]. Auch bei der Kontrolle von *L. monocytogenes* ist die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten umstritten [104, 105]. Um zu analysieren, ob die Einschränkung der klassischen IL-6 Signaltransduktion in myeloiden Zellen einen Einfluss auf die Kontrolle der Listerieninfektion hat, wurden $Il6ra^{\Delta Myel}$ Mäuse und Kontrolltiere infiziert und die Bakterienlast zwei Tage nach Infektion in Milz und Leber, den Zielorganen der Listerien in der Maus [5], bestimmt. Dabei konnten wir zeigen, dass Mäuse, deren inflammatorische Monozyten und neutrophile Granulozyten nicht in der Lage sind die IL-6R α -Untereinheit zu exprimieren, stark in ihrer Fähigkeit die Listerieninfektion in der Leber zu kontrollieren eingeschränkt waren. Die Einschränkung der Listerienkontrolle war in den Milzen von $Il6ra^{\Delta Myel}$ Mäusen nicht zu beobachten.

7.2 IL-6 hat keinen Einfluss auf die Verteilung und Motilität von myeloiden Zellen

L. monocytogenes ist ein intrazelluläres Pathogen, welches in der etablierten Infektion weitgehend auf die Zielorgane beschränkt bleibt. Deshalb ist es für die Kontrolle der Infektion essentiell, dass bakteriozide Effektorzellen zu Infektionsherden in diesen Organen rekrutiert

und dort aktiviert werden. Für die Kontrolle von Listerien ist bekannt, dass das Chemokin CCL2 für die Mobilisierung von inflammatorischen Monozyten aus dem Knochenmark und die Rekrutierung in die Infektionsherde erforderlich ist [22]. Auch mikrobielle Bestandteile, wie zum Beispiel N-formylierte bakterielle Peptide, werden von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und wirken auf diese Zellen als Chemoattraktant. Diese Peptide aktivieren zum Beispiel in neutrophilen Granulozyten den FPR und induzieren dadurch die Mobilisierung der Zellen [48, 49].

Der Einfluss von IL-6 auf die Rekrutierung durch CCL2 und FMLP ist nicht eindeutig geklärt. IL-6 induziert in Myelomzellen [106] und in sowohl humanen *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) als auch in der promonozytischen U937 Zelllinie [107] die Produktion von CCL2. Auch kann IL-6 direkt als Chemokin fungieren, indem es die Zellmigration und Transmigration durch Endothelzellen von Monozyten stimuliert [108]. Ein direkter Einfluss von IL-6 auf die Rekrutierung durch CCL2 und FMLP während der Infektion wurde nicht beschrieben.

Um festzustellen, ob die eingeschränkte klassische IL-6 Signaltransduktion die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und inflammatorischen Monozyten in unserem Modell beeinflusst, wurden Mäuse mit Listerien infiziert und die relativen Anteile der inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten an der Gesamtleukozytenzahl in Leber und Milz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Der Anteil an inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten war sowohl in Lebern als auch in Milzen von *Il6ra*^{ΔMyel}- und Kontrollmäusen identisch.

Möglicherweise werden die inflammatorischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten zwar erfolgreich aus dem Knochenmark und der Zirkulation in Milz und Leber rekrutiert, finden aber nicht den Weg zum Infektionsherd innerhalb des Zielorgans. Um die Migration direkt zu analysieren, wurde ein Chemotaxis-Assay durchgeführt. In einem Transwell-Assay wurde die Migration von Zellen aus Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse und Littermate-Kontrollen in Richtung einer erhöhten CCL2 und FMLP Konzentration getestet. Als Maß der Migration wurde der Chemotaxis Index bestimmt. Die Migration von inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen war weder zu CCL2 noch zu FMLP eingeschränkt. Im gleichen Ansatz wurden auch die neutrophilen Granulozyten analysiert. Hierbei zeigte sich keine Migration dieser Zellen mit den verwendeten Chemokinen.

Schließlich wurden histologische Schnitte von Lebern und Milzen infizierter Tiere angefertigt und F4/80⁺ Zellen angefärbt. F4/80 ist auf inflammatorischen Monozyten und auf Makrophagen, welche aus diesen Zellen differenzierten, exprimiert. Zwischen *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen und Littermate-Kontrollen bestand kein Unterschied in der Anzahl von F4/80⁺ Zellen, was sich in

der statistischen Auswertung der F4/80⁺ Fläche bestätigte.

Dieses Ergebnis ist im Einklang mit Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe in Mäusen mit einem kompletten IL-6 Knockout. Auch dort wurden nur geringe Veränderungen in der Akkumulation von inflammatorischen Monozyten und Granulozyten in Milz und Leber festgestellt [69]. CCL2 wird von Endothelzellen nach Stimulation mit IL-6 sezerniert [109, 110]. Die Einschränkung der klassischen IL-6 Signaltransduktion auf myeloiden Zellen sollte keinen Effekt auf die IL-6 Wirkung auf diese Zellen haben. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass in unserem Infektionsmodell CCL2 unabhängig von IL-6 induziert wird. Die Rolle von IL-6 auf die Induktion des CCR2 wird nachfolgend diskutiert. Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass die eingeschränkte Listerienkontrolle in der Leber der *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse nicht auf einer verminderten Rekrutierung von myeloiden Zellen beruht.

7.3 IL-6 beeinflusst die Differenzierung und die Aktivierung inflammatorischer Monozyten

Die Differenzierung von inflammatorischen Monozyten wird von IL-6 auf verschiedene Arten beeinflusst. IL-6 fördert die Reifung von Monozyten hin zu Makrophagen, welche eine Voraussetzung für die Bildung des bakterioziden Phänotyps ist, durch die Induktion des M-CSF-Rezeptors [76]. Im Gegensatz dazu gibt es Hinweise, dass IL-6 die Expression der IL-4R α -Untereinheit fördert [40] und die Differenzierung von Monozyten zu antiinflammatorischen M2 Makrophagen induziert. IL-6 kann deshalb sowohl pro- als auch antiinflammatorisch auf die Differenzierung der Monozyten wirken. Das Ziel der folgenden Experimente war herauszufinden, ob die geringere Listerienkontrolle in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen durch eine veränderte Differenzierung der inflammatorischen Monozyten durch die Inhibition der klassischen IL-6 Signaltransduktion verursacht wurde.

Zunächst wurde die mRNA-Menge von Genen, die spezifisch von inflammatorischen Monozyten exprimiert werden, in Lebern von naiven und infizierten Tieren untersucht. IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches in einer pro-Form exprimiert und durch das Inflammasom zum aktiven Zytokin prozessiert wird. IL-1 β wird während der Listerieninfektion produziert [111] und ist an der Listerienkontrolle entscheidend beteiligt [112]. Die Expression der mRNA von IL-1 β wurde durch die Infektion induziert. Jedoch war die Menge an mRNA unabhängig von der klassischen IL-6 Signaltransduktion im Lebergewebe der infizierten Mäuse.

Auch die mRNA-Menge von iNOS, ein Enzym, welches essentiell für das Töten der Listerien

durch Phagozyten ist [26], war nach der Infektion mit *L. monocytogenes* in einem höheren Maße vorhanden. Die IL-6 Signaltransduktion hatte jedoch auch hier keinen Einfluss auf die Intensität der iNOS-Expression. Es gibt zwar Hinweise, dass die IL-6 Signaltransduktion eine iNOS-Produktion induzieren kann [113], jedoch beruhen diese Ergebnisse auf *in vitro* Analysen in Zelllinien. Die iNOS-Expression wird jedoch hauptsächlich durch TLR vermittelte Signale [114, 115], wie im Falle der Listerieninfektion über die Erkennung von LTA durch TLR2 oder Flagellin durch TLR5, induziert, die in unserem Mausmodell die fehlende IL-6 Signaltransduktion kompensieren können.

Die Transkription von IL-6 wurde nur geringfügig durch die Infektion induziert. Die Induktion der Expression in der Leber war nicht signifikant, was zu von uns veröffentlichten Ergebnissen passt [69]. Für die IL-6-Expression gibt es Hinweise, dass sie autoinduzierbar ist [116], dies jedoch hauptsächlich durch Trans-Signaltransduktion vermittelt wird. Die Trans-Signaltransduktion ist in *Il6ra*^{ΔMyel}, jedoch nicht in *Il6KO* Tieren vorhanden. IL-6 wird durch eine Vielzahl an anderen Signalen, wie zum Beispiel IFN γ , TNF α oder IL-1 β [117, 118, 119], während der Infektion induziert, die in der Lage sind das Fehlen der IL-6 Signaltransduktion zu kompensieren. Dass IL-6 mRNA auch in *Il6KO* Tieren detektiert wurden, obwohl das Gen in diesen Mäusen deletiert wurde, ist dadurch zu erklären, dass die verwendeten Primer die nicht deletierten Bereiche der mRNA erkennen, welche noch produziert werden.

Die mRNA-Menge von CD38, einer ADPR-Hydrolase, die essentiell für die Kontrolle von *L. monocytogenes* ist [96], wurde durch die Infektion nicht beeinflusst. CD38 wird von einer Vielzahl von Zellen, wie zum Beispiel von T-Zellen exprimiert, sodass eine Veränderung der CD38 mRNA-Transkription in myeloiden Zellen im gesamten Lebergewebe nicht detektierbar ist.

Neben der Transkription von Genen, die typischerweise von inflammatorischen Monozyten exprimiert werden, wurden Oberflächenproteine, die charakteristisch für die Differenzierung oder den inflammatorischen Phänotyp von inflammatorischen Monozyten sind, untersucht. MMR1 und IL-4R α sind Oberflächenmoleküle, welche typisch für antiinflammatorische M2 Makrophagen sind [120]. Die Expression von MMR1 wurde nicht durch das Fehlen der klassischen IL-6 Signaltransduktion beeinflusst, jedoch war die Expression des IL-4R α stark eingeschränkt. Dieses Ergebnis zum IL-4R α bestätigt kürzlich veröffentlichte Ergebnisse zur IL-6 Wirkung auf Monozyten [40]. Jedoch war auch die Expression von CD38, ein Molekül, welches charakteristisch für proinflammatorische M1 Makrophagen ist [120], durch das Fehlen der klassischen IL-6 Signaltransduktion stark inhibiert.

Eine weitere Beobachtung ist, dass die Oberflächenmoleküle CD62L und MHC II auf inflammatorischen Monozyten aus infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu Zellen aus Kon-

trollieren stärker exprimiert waren. Die Hochregulation dieser Moleküle suggeriert einen aktivierteren Phänotyp der inflammatorischen Monozyten, welcher mit einer verbesserten Bakterienkontrolle assoziiert ist [121, 122]. Da die Bakterienlast in *Il6ra*^{ΔMyel} Tieren erhöht war, war in diesen Tieren eine erhöhte inflammatorische Umgebung vorhanden. Dadurch ist ein erhöhter inflammatorischer Phänotyp der inflammatorischen Monozyten zu erwarten.

Die Oberflächenexpression der Chemokinrezeptoren CCR2 und CX3CR1 war zwischen den Mausgruppen identisch, was zu den vorherigen Beobachtung der unveränderten Migration der inflammatorischen Monozyten passen würde.

Um festzustellen, ob die veränderte Expression der Oberflächenmoleküle mit einer veränderten Differenzierung der Populationen einhergeht, wurde eine unvoreingenommene Populationsanalyse mithilfe der t-SNE Methode durchgeführt. Bei dieser Analyse handelt es sich um eine Dimensionsreduktion hochdimensionaler Daten. Dabei wurden drei Populationen identifiziert, die in unterschiedlichem Maße in infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} und Kontrollmäusen vorhanden war. Bei Populationen 1 und 2, die in *Il6ra*^{ΔMyel} Tieren expandiert waren, handelt es sich vermutlich um Granulozyten. Die Beteiligung von Granulozyten an der Kontrolle einer Listerieninfektion ist umstritten [104, 105]. Da *Il6ra*^{ΔMyel} Mäuse die Listerieninfektion schlechter kontrollieren können, sind diese Populationen möglicherweise nicht an der Kontrolle beteiligt. Eine nähere Aussage über die Zellen dieser Populationen, welche möglicherweise unreife oder apoptotische Granulozyten sind, ist erst nach weiteren Analysen von zusätzlichen Oberflächenproteinen möglich. Bei Population 3, welche in *Il6ra*^{ΔMyel} Tieren vermindert war, handelt es sich möglicherweise um dendritische Zellen oder gewebeständige Makrophagen, wie zum Beispiel Kupffer-Zellen in der Leber. Es wurde gezeigt, dass CX3CR1 eine wichtige Rolle bei der Induktion der Migration dendritischer Zellen in der Salmonelleninfektion spielt [123]. Ein ähnlicher Mechanismus könnte bei der Listerieninfektion eine Rolle spielen, was ein Faktor bei der verminderten Kontrolle der Infektion in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen sein könnte. Da diese Population in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen vermindert war, sind die Zellen dieser Population eventuell an der Kontrolle der Listerieninfektion beteiligt. Um die Population eindeutiger zu definieren, sind weitere Analysen notwendig.

In einer weiteren Serie von Analysen wurde untersucht, ob die Expression von TNF α und IL-6 von inflammatorischen Monozyten zwischen den Mausgruppen Unterschiede aufzeigte. Dazu wurden Leukozyten aus Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} und Kontrollmäusen mit LPS stimuliert. Die Zytokinproduktion war sowohl im Anteil der produzierenden inflammatorischen Monozyten als auch in der Produktionsstärke zwischen den Mausgruppen nahezu identisch mit einer Tendenz zur höheren Zytokinproduktion in Zellen von *Il6ra*^{ΔMyel} Tieren. Die erhöhte Produktion dieser inflammatorischen Zytokine, die wesentlich für die angeborene Immunantwort

gegen Listerien sind [26, 69], würde für eine verbesserte Fähigkeit zur Listerienkontrolle in *Il6ra*^{ΔMyel} Tieren sprechen. Diese Beobachtung kann, wie zuvor beschrieben, durch die verstärkt inflammatorische Umgebung, welche von der erhöhten Listerienlast verursacht wurde, erklärt werden.

Um zu klären, ob IL-6 einen direkten Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten zu M1 oder M2 Makrophagen hat, wurden Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow-derived macrophages*) (BMDM) unter M0, M1 und M2 polarisierenden Bedingungen inkubiert und zusätzlich mit IL-6 behandelt. Die CD38-Expression, die typisch für proinflammatorische M1 Makrophagen ist [120], war unter M0 Bedingungen nicht nachweisbar, wurde jedoch unter M1 Bedingungen, unabhängig von der IL-6 Behandlung, stark hochreguliert. Unter M2 Bedingungen war CD38 nicht auf der Oberfläche der Zellen zu finden. Wurden BMDM aus Kontrolltieren unter M2 Bedingungen mit IL-6 behandelt, so wurde auch in diesen Zellen die CD38-Expression induziert. Möglicherweise nehmen dadurch die normalerweise regenerativen M2 Makrophagen einen eher proinflammatorischen Phänotyp an und sind in der Lage die Beseitigung der Erreger zu unterstützen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass CD38 in M2 Makrophagen eine nicht bakteriozide Funktion hat. Die Expression des für M2 Makrophagen typischen MMR1 war unter M2 Bedingungen durch IL-6 induzierbar. Auch wurde die Expression des IL-4R α unter M0 und M2 Bedingungen in Kontrolltieren durch IL-6 induziert, was mit bereits publizierten Ergebnissen

übereinstimmt [40]. Die Beobachtungen dieser *in vitro* Versuche deuten auf eine essentielle Rolle von IL-6 in der Differenzierung von regenerativen M2 Makrophagen hin. Klassische IL-6 Signaltransduktion induziert das für die Listerienkontrolle essentielle CD38 [96] und wirkt über diesen Mechanismus möglicherweise auf die Bakterienlast während der Infektion.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob sich die beobachteten Veränderungen der Differenzierung der inflammatorischen Monozyten auch auf der Transkriptomebene widerspiegeln. Zu diesem Zweck wurden inflammatorische Monozyten aus Milzen infizierter *Il6ra*^{ΔMyel} und Kontrollmäuse mittels FACS isoliert und das Transkriptom der Zellen durch RNA-Sequenzierung analysiert. Aus der Anzahl der mRNA-Spezies wurde die Expressionsstärke der Gene ermittelt. Die Veränderung der Transkription im Vergleich zum Mittelwert aller Mäuse wurde berechnet und als log₂-fold-change (log₂FC)-Wert angegeben. Die Signifikanz der jeweiligen differenziellen Transkription wird über den bereinigten P (pAdj)-Wert angegeben. Alle Gene mit einem pAdj-Wert unter 0,1 gelten als signifikant differenziell transkribiert.

Um festzustellen, ob sich die Transkription innerhalb der Mausgruppen ähnelt und die Daten somit weiterverwendbar sind, wurden alle signifikant differenziell exprimierten Gene unvoreingenommen durch einen Clustering-Algorithmus in Gruppen eingeteilt. Dabei wurden

die Mäuse automatisch aufgrund der differentiellen Transkription in Kontroll- und *Il6ra*^{ΔMyel} Gruppen eingeteilt, was bedeutet, dass die Genexpression innerhalb der Mausgruppen kohärent war.

Für die Analyse der Veränderung des Transkriptom durch die Hemmung der klassischen IL-6 Signaltransduktion wurden die *gene ontology terms (GO-terms)* der differentiell transkribierten Gene analysiert. Bei den *GO-terms* handelt es sich um eine Zuordnung von Genen zu bestimmten Funktionen. Verschiedene Gene können mit den selben *GO-terms* beschrieben werden, da sie redundante Funktionen besitzen oder am selben Signaltransduktionsweg beteiligt sind [124]. Ist ein genereller Prozess durch die Hemmung der klassischen IL-6 Signaltransduktion gestört, so ist möglicherweise die Transkription mehrerer Gene mit eben diesem *GO-term* differentiell reguliert. Über die Analyse der *GO-terms* ist es somit möglich durch IL-6 regulierte Prozesse zu identifizieren. Ein Werkzeug zur Analyse und Visualisierung der *GO-terms* ist REViGO. Von diesem Programm werden redundante *GO-terms* entfernt und die verbliebenen anhand ihrer Häufigkeit, thematischen Ähnlichkeit und, in unserer Analyse, anhand des log₂FC-Wertes angeordnet [92].

GO-terms lassen sich in drei Kategorien aufteilen. In den folgenden Analysen wurden die *GO-terms* der Kategorien *molecular function* und *biological processes* analysiert. Die Auswertung der *GO-terms* Kategorie *cellular component* ist nicht dargestellt, da die Analyse keine relevanten Erkenntnisse erbrachte. In einem ersten Ansatz wurden die *GO-terms*, welche zur Kategorie *molecular function* gehören, mit REViGO analysiert und visualisiert. Die Kategorie *molecular function* beschreibt dabei die biochemische Aktivität eines Genprodukts, einschließlich der Interaktion mit extrazellulären Liganden und intrazellulären Strukturen [124]. In der REViGO-Analyse ist zu erkennen, dass in inflammatorische Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen Gene mit den *GO-terms*, die eine Interleukin-6 Rezeptoraktivität beschreiben, schwächer induziert waren. Dieses Ergebnis bestätigt die erfolgreiche Deletion des Rezeptors. Des Weiteren waren Gene, deren *GO-terms* die Bindung des *ciliary neurotrophic factor (CNTF)* beschreiben, vermindert. IL-6R α kann als α -Kette des CNTF Rezeptors dienen, sodass die Deletion von IL-6R α auch zur Reduktion der CNTF Aktivität führt [125]. Weiterhin waren Gene, welche mit dem *GO-terms exopeptidase activity* beschrieben werden, vermindert. Aktivierung von Dipeptidyl-Peptidasen, welche zu den Exopeptidasen gehören, führt zur Inhibition der Differenzierung von M1 Makrophagen [126]. Durch direkte Interaktion oder überlappende Effekte der verminderten klassischen IL-6 Signaltransduktion wird möglicherweise die Aktivität von den Peptidasen und somit die Differenzierung der Makrophagen beeinflusst. Verstärkt exprimiert waren Gene, deren *GO-terms* die Bindung von Proteinen an RNA beinhalten (*poly A RNA binding, mRNA 3'-UTR binding*). Proteine mit diesen *GO-terms* spielen eine

Rolle in der Regulation der Translation durch die Veränderung des mRNA-Metabolismus. Poly(A) bindende Proteine beeinflussen zum Beispiel die Poly-/Deadenylierung, den Export, die Überwachung, die Translation und die Degradation von mRNA [127]. Den 3'-UTR bindenden Proteinen wird eine ähnliche Funktion in der Aktivierung oder Repression der Translation und in der Lokalisierung der mRNA zugeschrieben [128]. Die Veränderungen in der Differenzierung sind möglicherweise eine Folge oder auch eine Ursache der veränderten Translationskontrolle. Die Veränderungen der RNA-Stabilität durch die Deletion des IL-6R α sind unerwartet und erfordern weitere Analysen. Des Weiteren waren Gene, deren *GO-terms* die Beeinflussung der G-Proteinaktivität beschreiben (*G-protein alpha/beta-subunit binding*, *heterotrimeric G-protein binding*), in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra* Δ Myel im Vergleich zu jenen aus Kontrollmäusen hochreguliert. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bilden die größte Familie an Proteinen im Genom von Säugetieren. Signale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind in fast allen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel in der Hormon- und Enzymsekretion und Proliferation, involviert und dadurch an vielen Prozessen der Immunantwort beteiligt [129]. Dies würde eine Verbindung zum veränderten Differenzierungsprofil in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen herstellen. Schließlich waren Gene, deren *GO-terms* die Hydrolaseaktivität von Kohlenstoff-Stickstoff Bindungen beschreiben, in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen hochreguliert. Hydrolasen spielen im Metabolismus von Zellen eine Rolle und werden von Monozyten zu vielen Zwecken produziert, zum Beispiel intrazellulär zum Verdau von Pathogenen im Lysosom oder extrazellulär zum Abbau von extrazellulärer Matrix. Auch diese Veränderungen sprechen für eine veränderte Differenzierung der inflammatorischen Monozyten.

Neben den *GO-terms* der Kategorie *molecular function* wurden auch die *GO-terms* der Kategorie *biological processes* analysiert. Die Kategorie der *biological processes* beschreibt die biologische Funktion zu der ein Genprodukt beiträgt [124]. Die *GO-terms* dieser Kategorie beschreiben zum Teil ähnliche oder auch überlappende Effekte wie die *GO-terms* der Kategorie *molecular function*. So waren Gene, welche für mRNA-Transport und Regulation der Translation wichtig sind, in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen hochreguliert. Zusätzlich waren Gene, deren *GO-terms* proinflammatorische Prozesse umfassen, hochreguliert. Gene, deren *GO-terms* die IL-1 β Sekretion, die Thrombin-aktivierte Rezeptorsignaltransduktion [130], die positive Regulation der PI3K-Signaltransduktion, die Regulation der cytosolischen Calcium Konzentration und die Superoxid Generation beinhalten, waren in inflammatorischen Monozyten aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen stärker exprimiert. Dieses proinflammatorische Expressionsprofil entspricht den vorherigen Beobachtungen, dass inflammatorische Monozyten aus *Il6ra* Δ Myel Mäusen mehr inflammatorische Oberflächenmoleküle und tenden-

ziell höhere Konzentrationen an inflammatorischen Zytokinen produzieren. Das Profil passt auch zum Ergebnis, dass IL-6 auf inflammatorischen Monozyten die Expression des IL-4R α und somit die Differenzierung von antiinflammatorischen Makrophagen induziert. Fällt diese Induktion weg, differenzieren inflammatorische Monozyten möglicherweise bevorzugt in den proinflammatorischen M1 Subtyp.

Da *Il6ra* Δ ^{Myel} Mäuse die Listerieninfektion schlechter kontrollieren, haben wir weniger Makrophagen und Monozyten des inflammatorischen M1 Subtyps, welcher zur Kontrolle der Infektion beiträgt, in diesen Mäusen erwartet. Alle Analysen deuten jedoch darauf hin, dass in *Il6ra* Δ ^{Myel} Mäusen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* sogar mehr M1 Makrophagen vorhanden sind. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte es sich, wie schon vorher vermutet, um einen sekundären Effekt handeln. *Il6ra* Δ ^{Myel} Mäuse sind schlechter in der Lage die Listerien zu kontrollieren, sodass die Entzündung in diesen Mäusen größer ist. Durch das erhöhte inflammatorische Milieu entstehen daraufhin vermehrt M1 Makrophagen. Zum anderen wäre es möglich, dass die strikte Unterteilung der Makrophagen in M1 Makrophagen, welche primär proinflammatorisch sind, und M2 Makrophagen, welche primär antiinflammatorisch sind, nicht auf die Listerieninfektion anwendbar ist. Es könnte sein, dass in der Listerieninfektion beide Subtypen zur Kontrolle der Erreger nötig sind.

7.4 Klassische IL-6 Signaltransduktion ist ein entscheidender Faktor für die Phagozytoseaktivität inflammatorischer Monozyten

Durch die phänotypische Charakterisierung konnte gezeigt werden, dass die Expression von CD38 auf inflammatorischen Monozyten während der Listerieninfektion durch die klassische IL-6 Signaltransduktion reguliert wird. Eine Hauptaufgabe von inflammatorischen Monozyten während der Infektion ist die Beseitigung von Pathogenen durch Phagozytose und anschließender Lyse der Erreger [35]. In anderen Arbeiten wurde nachgewiesen, dass CD38 die Phagozytoseaktivität von inflammatorischen Monozyten verstärkt [97]. Um zu testen, ob die niedrige CD38-Expression auch in unserem Modell mit einer verminderten Phagozytoseaktivität von inflammatorischen Monozyten assoziiert ist, wurden verschiedene Versuche mit markierten Listerien und Latex-Beads durchgeführt.

Zuerst wurde die Phagozytoseaktivität in *in vitro* Experimente mit CFSE-markierten Listerien

getestet. Durch die Markierung mit CFSE kann die Aufnahme von Listerien in Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. *Il6ra*^{ΔMyel} und Kontrolltiere wurden mit Listerien infiziert. Zwei Tage später wurden inflammatorische Monozyten aus Milzen, Lebern und Peritoneallavage isoliert und *in vitro* mit einem Überschuss an CFSE-markierten Listerien inkubiert. Jedoch konnte kein Unterschied in der Aufnahme von CFSE-markierten Listerien in inflammatorischen Monozyten zwischen den Mausgruppen festgestellt werden. Möglicherweise waren die Zellen durch die Infektion und Inkubation so stark stimuliert, dass die klassische IL-6 Signaltransduktion bei diesen Versuchsparametern keine Rolle spielte.

In einem alternativen Ansatz wurde daher ein *in vivo* Experiment mit Latex-Beads durchgeführt. Die Injektion der Latex-Beads wurde durchgeführt, da die *in vivo* Analyse der Phagozytoseaktivität mit CFSE-markierten Listerien eine letale Dosis von Listerien erfordert hätte. Infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} und Kontrolltieren wurden eine Stunde vor der Analyse fluoreszierende Latex-Beads injiziert. Diese Latex-Beads können *in vivo* von phagozytierenden Zellen aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden [98]. Inflammatorische Monozyten aus *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen nahmen signifikant weniger Latex-Beads auf als jene aus Kontrolltieren. Auch war in beiden Mausgruppen klar zu erkennen, dass CD38-negative inflammatorische Monozyten weniger Phagozytoseaktivität aufwiesen als CD38-positive Zellen. Dadurch kann eindeutig gezeigt werden, dass die klassische IL-6 Signaltransduktion eine wichtige Rolle in der Phagozytoseaktivität der inflammatorischen Monozyten spielt und möglicherweise eine Erklärung für die eingeschränkte Kontrolle der Listerieninfektion ist. Ob die Reduktion der Phagozytoseaktivität durch die eingeschränkte CD38-Expression aufgrund der fehlenden klassischen IL-6 Signaltransduktion verursacht wird oder ob es sich um zwei unabhängige Mechanismen handelt, konnte durch die vorliegenden Experimente nicht gezeigt werden.

7.5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die klassische IL-6 Signaltransduktion elementar für die Listerienkontrolle ist. Diese Wirkung beruhte weder auf einer verschlechterten Migration und Akkumulation noch auf einer verminderten Zytokinproduktion der inflammatorischen Monozyten. Die Ergebnisse, dass inflammatorische Monozyten aus infizierten *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen einen gesteigerten inflammatorischen Phänotyp aufweisen, unterstützen die bereits beschriebene Beobachtungen, dass IL-6 zur Differenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen beiträgt. Auf Grund dieser veränderten Differenzierung sollte man eine verbesserte Kontrolle der Listerieninfektion in *Il6ra*^{ΔMyel} Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren

erwarten. Die Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion führte jedoch zur Reduktion der CD38-Expression. CD38 ist essentiell für die Kontrolle der Listerien durch das angeborene Immunsystem. CD38 wird zwar als Marker von M1 Makrophagen beschrieben, wir konnten aber zeigen, dass IL-6 in der Lage ist die Expression von CD38 auch auf normalerweise antiinflammatorischen M2 Makrophagen zu induzieren, wodurch diese möglicherweise eine stärker proinflammatorische Rolle einnehmen können. Auch ist die Phagozytoseaktivität von IL-6R α -defizienten inflammatorischen Monozyten stark eingeschränkt. Insbesondere CD38-negativen Zellen zeigten eine verminderte Phagozytoseaktivität. Bisher ist unklar, ob diese beiden Beobachtungen in einem direkten Zusammenhang stehen oder unabhängig voneinander sind. Beide Mechanismen könnten die eingeschränkte Kontrolle der frühen Listerieninfektion in Folge der Deletion der klassischen IL-6 Signaltransduktion erklären.

8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Hinweise auf grundlegende Mechanismen des Einflusses der klassischen IL-6 Signaltransduktion auf die angeborene Immunantwort der Maus gegen *L. monocytogenes* gezeigt werden. Jedoch ist der exakte Mechanismus noch unklar. Die klassische IL-6 Signaltransduktion ist in der Differenzierung von M1 und M2 Makrophagen involviert. Die Differenzierung von regenerativen M2 Makrophagen wird durch IL-6 induziert. Jedoch scheinen diese durch IL-6 einen bakterioziden Phänotyp anzunehmen. Untersuchungen mit Mäusen, welche die Cre-Rekombinase spezifisch in differenzierten M1 oder M2 Makrophagen exprimieren, würden eine Einsicht in die Effekte der klassischen IL-6 Signaltransduktion in diesen Zelltypen geben. Zur Zeit existieren solche Mauslinien jedoch noch nicht [131]. CD38 ist nicht nur in der Phagozytose involviert [97], auch katalysiert CD38 die Umwandlung von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADP) zu ADPR, zyklische Adenosindiphosphoribose (cADPR) und Nicotinsäureadenindinukleotidphosphat (NAADP). Diese drei Metabolite dienen im Organismus als *second messenger* und erhöhen intrazelluläres Calcium [132, 133]. Die Calcium-Signaltransduktion über purinerge Rezeptoren ist in der Regulation von Infektionen und Inflammation involviert [134]. Um herauszufinden ob Verhinderung der klassischen IL-6 Signaltransduktion zu Defekten in der Calcium-Signaltransduktion führt, können diverse Experimente, wie zum Beispiel durchflusszytometrische Untersuchungen und mikroskopische Analysen lebender Zellen mit Calcium sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen, durchgeführt werden. Auch nachgeordnete Zielproteine von CD38, wie zum Beispiel der Calciumkanal TRPM2, können mit verschiedenen, bereits existenten, Mausmodellen auf ähnliche Phänotypen hin untersucht werden. Des Weiteren muss der direkte Einfluss von CD38 auf die Phagozytoseaktivität der inflammatorischen Monozyten geklärt werden, indem die Phagozytoseexperimente mit CD38KO Tieren durchgeführt werden. Durch diese Experimente könnten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden und die direkte Beziehung der klassischen IL-6 Signaltransduktion und CD38 zur frühen Immunantwort der Maus gegen *L. monocytogenes* aufgeklärt werden.

9 Literaturverzeichnis

- [1] F. Fiedler, "Biochemistry of the cell surface of *Listeria* strains: a locating general view.," *Infection*, vol. 16 Suppl 2, pp. S92–7, 1988.
- [2] P. Glaser, L. Frangeul, C. Buchrieser, C. Rusniok, A. Amend, F. Baquero, P. Berche, H. Bloecker, P. Brandt, T. Chakraborty, A. Charbit, F. Chetouani, E. Couvé, A. de Daruvar, P. Dehoux, E. Domann, G. Domínguez-Bernal, E. Duchaud, L. Durant, O. Dusurget, K. D. Entian, H. Fsihi, F. García-del Portillo, P. Garrido, L. Gautier, W. Goebel, N. Gómez-López, T. Hain, J. Hauf, D. Jackson, L. M. Jones, U. Kaerst, J. Kreft, M. Kuhn, F. Kunst, G. Kurapkat, E. Madueno, A. Maitournam, J. M. Vicente, E. Ng, H. Nedjari, G. Nordsiek, S. Novella, B. de Pablos, J. C. Pérez-Díaz, R. Purcell, B. Remmel, M. Rose, T. Schlueter, N. Simoes, A. Tierrez, J. A. Vázquez-Boland, H. Voss, J. Wehland, and P. Cossart, "Comparative genomics of *Listeria* species.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 294, pp. 849–52, oct 2001.
- [3] D. W. Fleming, S. L. Cochi, K. L. MacDonald, J. Brondum, P. S. Hayes, B. D. Plikaytis, M. B. Holmes, A. Audurier, C. V. Broome, and A. L. Reingold, "Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis.," *The New England journal of medicine*, vol. 312, pp. 404–7, feb 1985.
- [4] V. Ramaswamy, V. M. Cresence, J. S. Rejitha, M. U. Lekshmi, K. S. Dharsana, S. P. Prasad, and H. M. Vijila, "Listeria—review of epidemiology and pathogenesis.," *Journal of microbiology, immunology, and infection*, vol. 40, pp. 4–13, feb 2007.
- [5] J. A. Vázquez-Boland, M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González-Zorn, J. Wehland, and J. Kreft, "Listeria pathogenesis and molecular virulence determinants.," *Clinical microbiology reviews*, vol. 14, pp. 584–640, jul 2001.
- [6] J. Mengaud, H. Ohayon, P. Gounon, R. M. Mege, P. Cossart, Mege R-M, and P. Cossart, "E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells," *Cell*, vol. 84, pp. 923–932, mar 1996.
- [7] M. Perez-Moreno, C. Jamora, and E. Fuchs, "Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions.," *Cell*, vol. 112, pp. 535–48, feb 2003.
- [8] M. Lecuit, S. Dramsi, C. Gottardi, M. Fedor-Chaiken, B. Gumbiner, and P. Cossart, "A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*," *The EMBO journal*, vol. 18, pp. 3956–3963, jul 1999.

- [9] M. Lecuit, S. Vandormael-Pournin, J. Lefort, M. Huerre, P. Gounon, C. Dupuy, C. Babinet, and P. Cossart, "A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 292, pp. 1722–5, jun 2001.
- [10] Y. Shen, M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton, "InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase," *Cell*, vol. 103, pp. 501–510, oct 2000.
- [11] C. Geoffroy, J. L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche, "Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*," *Infection and Immunity*, vol. 55, pp. 1641–1646, jul 1987.
- [12] D. W. Schuerch, E. M. Wilson-Kubalek, and R. K. Tweten, "Molecular basis of listeriolysin O pH dependence.," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 12537–42, aug 2005.
- [13] S. Rogers, R. Wells, and M. Rechsteiner, "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis.," *Science*, vol. 234, pp. 364–368, oct 1986.
- [14] P. Schnupf, D. A. Portnoy, and A. L. Decatur, "Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: Role of the PEST-like sequence," *Cellular Microbiology*, vol. 8, pp. 353–364, feb 2006.
- [15] L. G. Tilney and D. A. Portnoy, "Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*," *Journal of Cell Biology*, vol. 109, pp. 1597–1608, oct 1989.
- [16] C. Kocks, E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart, "L. monocytogenes-induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein," *Cell*, vol. 68, pp. 521–531, feb 1992.
- [17] Y. Ebe, G. Hasegawa, H. Takatsuka, H. Umezu, M. Mitsuyama, M. Arakawa, N. Mukaida, and M. Naito, "The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice," *Pathology International*, vol. 49, pp. 519–532, jun 1999.
- [18] N. Hauf, W. Goebel, F. Fiedler, Z. Sokolovic, and M. Kuhn, "Listeria monocytogenes infection of P388D1 macrophages results in a biphasic NF-kappaB (RelA/p50) activation induced by lipoteichoic acid and bacterial phospholipases and mediated by IkappaBalpha and IkappaBbeta degradation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 17, pp. 9394–9399, 1997.
- [19] S. Kayal, A. Lilienbaum, C. Poyart, S. Memet, A. Israel, and P. Berche, "Listeriolysin O-dependent activation of endothelial cells during infection with *Listeria monocytogenes*: activation of NF-kappa B and upregulation of adhesion molecules and chemokines.," *Molecular microbiology*, vol. 31, pp. 1709–22, mar 1999.

- [20] A. Mansell, L. Braun, P. Cossart, and L. a. J. O'neill, "A novel function of InlB from *Listeria monocytogenes*: activation of NF- κ B in J774 macrophages," *Cellular Microbiology*, vol. 2, no. 2, pp. 127–136, 2000.
- [21] T. Yoshimura, E. A. Robinson, S. Tanaka, E. Appella, J. Kuratsu, and E. J. Leonard, "Purification and amino acid analysis of two human glioma-derived monocyte chemoattractants.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 169, pp. 1449–59, apr 1989.
- [22] T. Kurihara, G. Warr, J. Loy, and R. Bravo, "Defects in macrophage recruitment and host defense in mice lacking the CCR2 chemokine receptor.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 186, pp. 1757–62, nov 1997.
- [23] C. Blériot, T. Dupuis, G. Jouvion, G. Eberl, O. Disson, and M. Lecuit, "Liver-resident macrophage necroptosis orchestrates type 1 microbicidal inflammation and type-2-mediated tissue repair during bacterial infection.," *Immunity*, vol. 42, pp. 145–58, jan 2015.
- [24] E. Seki, H. Tsutsui, N. M. Tsuji, N. Hayashi, K. Adachi, H. Nakano, S. Futatsugi-Yumikura, O. Takeuchi, K. Hoshino, S. Akira, J. Fujimoto, and K. Nakanishi, "Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 169, pp. 3863–8, oct 2002.
- [25] F. Hayashi, K. D. Smith, A. Ozinsky, T. R. Hawn, E. C. Yi, D. R. Goodlett, J. K. Eng, S. Akira, D. M. Underhill, and A. Aderem, "The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5.," *Nature*, vol. 410, pp. 1099–103, apr 2001.
- [26] N. V. Serbina, T. P. Salazar-Mather, C. A. Biron, W. A. Kuziel, and E. G. Pamer, "TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection," *Immunity*, vol. 19, no. 1, pp. 59–70, 2003.
- [27] E. A. Havell, "Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 143, pp. 2894–9, nov 1989.
- [28] W. A. Phillips and J. A. Hamilton, "Phorbol ester-stimulated superoxide production by murine bone marrow-derived macrophages requires preexposure to cytokines.," *The Journal of Immunology*, vol. 142, pp. 2445 LP – 2449, apr 1989.
- [29] V. Lehmann, B. Benninghoff, and W. Dröge, "Tumor necrosis factor-induced activation of peritoneal macrophages is regulated by prostaglandin E2 and cAMP.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 141, pp. 587–91, jul 1988.
- [30] S. Michlewska, I. Dransfield, I. L. Megson, and A. G. Rossi, "Macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils is critically regulated by the opposing actions of pro-inflammatory and anti-inflammatory agents: key role for TNF-alpha.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 23, pp. 844–54, mar 2009.

- [31] G. Bauer, "Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis.," *Anticancer research*, vol. 20, no. 6B, pp. 4115–39, 2000.
- [32] C. F. Nathan, H. W. Murray, M. E. Wiebe, and B. Y. Rubin, "Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 158, pp. 670–89, sep 1983.
- [33] X. Hu and L. B. Ivashkiv, "Cross-regulation of signaling pathways by interferon-gamma: implications for immune responses and autoimmune diseases.," *Immunity*, vol. 31, pp. 539–50, oct 2009.
- [34] F. O. Martinez, S. Gordon, M. Locati, and A. Mantovani, "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 177, pp. 7303–11, nov 2006.
- [35] L. Maródi, S. Schreiber, D. C. Anderson, R. P. MacDermott, H. M. Korchak, and R. B. Johnston, "Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 91, pp. 2596–601, jun 1993.
- [36] G. R. Thomas, M. McCrossan, and M. E. Selkirk, "Cytostatic and cytotoxic effects of activated macrophages and nitric oxide donors on *Brugia malayi*.," *Infection and immunity*, vol. 65, pp. 2732–9, jul 1997.
- [37] M. Stein, S. Keshav, N. Harris, and S. Gordon, "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 176, pp. 287–92, jul 1992.
- [38] T. M. Doherty, R. Kastelein, S. Menon, S. Andrade, and R. L. Coffman, "Modulation of murine macrophage function by IL-13.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 151, pp. 7151–60, dec 1993.
- [39] R. E. Callard, D. J. Matthews, and L. Hibbert, "IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same?," *Immunology today*, vol. 17, pp. 108–10, mar 1996.
- [40] J. Mauer, B. Chaurasia, J. Goldau, M. C. Vogt, J. Ruud, K. D. Nguyen, S. Theurich, A. C. Hausen, J. Schmitz, H. S. Brönneke, E. Estevez, T. L. Allen, A. Mesaros, L. Partidge, M. A. Febbraio, A. Chawla, F. T. Wunderlich, and J. C. Brüning, "Signaling by IL-6 promotes alternative activation of macrophages to limit endotoxemia and obesity-associated resistance to insulin.," *Nature immunology*, vol. 15, pp. 423–30, may 2014.
- [41] M. Munder, "Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system," *British Journal of Pharmacology*, vol. 158, pp. 638–651, oct 2009.

- [42] S. J. Lee, S. Evers, D. Roeder, A. F. Parlow, J. Risteli, L. Risteli, Y. C. Lee, T. Feizi, H. Langen, and M. C. Nussenzweig, "Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 295, pp. 1898–901, mar 2002.
- [43] D. M. Mosser, "The many faces of macrophage activation.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 73, pp. 209–12, feb 2003.
- [44] A. Mantovani, A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi, and M. Locati, "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization," *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 12, pp. 677–686, 2004.
- [45] K. Hiromatsu, Y. Yoshikai, G. Matsuzaki, S. Ohga, K. Muramori, K. Matsumoto, J. A. Bluestone, and K. Nomoto, "A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with *Listeria monocytogenes* in mice," *J.Exp.Med.*, vol. 175, pp. 49–56, jan 1992.
- [46] K. M. Kerksiek, D. H. Busch, I. M. Pilip, S. E. Allen, and E. G. Pamer, "H2-M3-restricted T cells in bacterial infection: rapid primary but diminished memory responses.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 190, pp. 195–204, jul 1999.
- [47] K. F. Lindahl, V. M. Dabhi, R. Hovik, G. P. Smith, and C. R. Wang, "Presentation of N-formylated peptides by H2-M3.," *Biochemical Society transactions*, vol. 23, pp. 669–74, aug 1995.
- [48] E. L. Southgate, R. L. He, J.-L. Gao, P. M. Murphy, M. Nanamori, and R. D. Ye, "Identification of formyl peptides from *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* as potent chemoattractants for mouse neutrophils.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 181, pp. 1429–37, jul 2008.
- [49] M. Liu, K. Chen, T. Yoshimura, Y. Liu, W. Gong, A. Wang, J.-L. Gao, P. M. Murphy, and J. M. Wang, "Formylpeptide receptors are critical for rapid neutrophil mobilization in host defense against *Listeria monocytogenes*.," *Scientific reports*, vol. 2, p. 786, nov 2012.
- [50] H. Cho, H.-J. Choi, H. Xu, K. Felio, and C.-R. Wang, "Nonconventional CD8+ T cell responses to *Listeria* infection in mice lacking MHC class Ia and H2-M3.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 186, pp. 489–98, jan 2011.
- [51] M. T. Chow, S. Dhanji, J. Cross, P. Johnson, and H.-S. Teh, "H2-M3-restricted T cells participate in the priming of antigen-specific CD4+ T cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 177, pp. 5098–104, oct 2006.
- [52] H. Xu, T. Chun, H.-J. Choi, B. Wang, and C.-R. Wang, "Impaired response to *Listeria* in H2-M3-deficient mice reveals a nonredundant role of MHC class Ib-specific T cells in host defense.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 203, pp. 449–59, feb 2006.

- [53] M. S. Villanueva, A. J. Sijts, and E. G. Pamer, "Listeriolysin is processed efficiently into an MHC class I-associated epitope in *Listeria monocytogenes*-infected cells.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 155, pp. 5227–33, dec 1995.
- [54] D. H. Busch, I. M. Pilip, S. Vijh, and E. G. Pamer, "Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection.," *Immunity*, vol. 8, pp. 353–62, mar 1998.
- [55] P. Wong and E. G. Pamer, "Cutting edge: antigen-independent CD8 T cell proliferation.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 166, pp. 5864–8, may 2001.
- [56] H. W. Mittrücker, M. Kursar, A. Köhler, R. Hurwitz, and S. H. Kaufmann, "Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 167, pp. 5620–7, nov 2001.
- [57] D. J. Shedlock, J. K. Whitmire, J. Tan, A. S. MacDonald, R. Ahmed, and H. Shen, "Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 170, pp. 2053–63, feb 2003.
- [58] H.-W. Mittrücker, M. Kursar, A. Köhler, D. Yanagihara, S. K. Yoshinaga, and S. H. E. Kaufmann, "Inducible costimulator protein controls the protective T cell response against *Listeria monocytogenes*.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 169, pp. 5813–7, nov 2002.
- [59] D. W. White, V. P. Badovinac, G. Kollias, and J. T. Harty, "Cutting edge: antilisterial activity of CD8+ T cells derived from TNF-deficient and TNF/perforin double-deficient mice.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 165, pp. 5–9, jul 2000.
- [60] J. T. Harty and M. J. Bevan, "Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma.," *Immunity*, vol. 3, pp. 109–17, jul 1995.
- [61] M. Kursar, K. Bonhagen, A. Köhler, T. Kamradt, S. H. E. Kaufmann, and H.-W. Mittrücker, "Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 168, pp. 6382–7, jun 2002.
- [62] M. Kursar, A. Köhler, S. H. E. Kaufmann, and H.-W. Mittrücker, "Depletion of CD4+ T cells during immunization with nonviable *Listeria monocytogenes* causes enhanced CD8+ T cell-mediated protection against listeriosis.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 172, pp. 3167–72, mar 2004.
- [63] J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John, "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6.," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1813, pp. 878–88, may 2011.

- [64] W. Somers, M. Stahl, and J. S. Seehra, "1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling.," *The EMBO journal*, vol. 16, pp. 989–97, mar 1997.
- [65] G. Tosato and K. D. Jones, "Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes.," *Blood*, vol. 75, pp. 1305–10, mar 1990.
- [66] M. H. Sofi, W. Li, M. H. Kaplan, and C.-H. Chang, "Elevated IL-6 expression in CD4 T cells via PKC θ and NF-kappaB induces Th2 cytokine production.," *Molecular immunology*, vol. 46, pp. 1443–50, apr 2009.
- [67] T. Mori, T. Miyamoto, H. Yoshida, M. Asakawa, M. Kawasumi, T. Kobayashi, H. Morioka, K. Chiba, Y. Toyama, and A. Yoshimura, "IL-1 β and TNF α -initiated IL-6-STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis.," *International immunology*, vol. 23, pp. 701–12, nov 2011.
- [68] O. Dienz, J. G. Rud, S. M. Eaton, P. A. Lanthier, E. Burg, A. Drew, J. Bunn, B. T. Suratt, L. Haynes, and M. Rincon, "Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung.," *Mucosal immunology*, vol. 5, pp. 258–66, may 2012.
- [69] J. Hoge, I. Yan, N. Jänner, V. Schumacher, A. Chalaris, O. M. Steinmetz, D. R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John, and H.-W. Mittrücker, "IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 190, pp. 703–11, jan 2013.
- [70] K. A. Smith and R. M. Maizels, "IL-6 controls susceptibility to helminth infection by impeding Th2 responsiveness and altering the Treg phenotype in vivo.," *European journal of immunology*, vol. 44, pp. 150–61, jan 2014.
- [71] D. Fishman, G. Faulds, R. Jeffery, V. Mohamed-Ali, J. S. Yudkin, S. Humphries, and P. Woo, "The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis.," *The Journal of clinical investigation*, vol. 102, pp. 1369–76, oct 1998.
- [72] E. A. Stahl, S. Raychaudhuri, E. F. Remmers, G. Xie, S. Eyre, B. P. Thomson, Y. Li, F. A. S. Kurreeman, A. Zhernakova, A. Hinks, C. Guiducci, R. Chen, L. Alfredsson, C. I. Amos, K. G. Ardlie, BIRAC Consortium, A. Barton, J. Bowes, E. Brouwer, N. P. Burt, J. J. Catanese, J. Coblyn, M. J. H. Coenen, K. H. Costenbader, L. A. Criswell, J. B. A. Crusius, J. Cui, P. I. W. de Bakker, P. L. De Jager, B. Ding, P. Emery, E. Flynn, P. Harrison, L. J. Hocking, T. W. J. Huizinga, D. L. Kastner, X. Ke, A. T. Lee, X. Liu, P. Martin, A. W. Morgan, L. Padyukov, M. D. Posthumus, T. R. D. J. Radstake, D. M. Reid, M. Seielstad, M. F. Seldin, N. A. Shadick, S. Steer, P. P. Tak, W. Thomson, A. H. M. van der Helm-van Mil, I. E. van der Horst-Bruinsma, C. E. van der Schoot, P. L. C. M. van Riel, M. E. Weinblatt, A. G. Wilson, G. J. Wolbink, B. P. Wordsworth,

- YEAR Consortium, C. Wijmenga, E. W. Karlson, R. E. M. Toes, N. de Vries, A. B. Begovich, J. Worthington, K. A. Siminovitch, P. K. Gregersen, L. Klareskog, and R. M. Plenge, "Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci.," *Nature genetics*, vol. 42, pp. 508–14, jun 2010.
- [73] K. Yoshizaki, T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh, and T. Komori, "Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease.," *Blood*, vol. 74, pp. 1360–7, sep 1989.
- [74] F. Liu, J. Poursine-Laurent, H. Y. Wu, and D. C. Link, "Interleukin-6 and the granulocyte colony-stimulating factor receptor are major independent regulators of granulopoiesis in vivo but are not required for lineage commitment or terminal differentiation.," *Blood*, vol. 90, pp. 2583–90, oct 1997.
- [75] G. Kaplanski, V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, and C. Farnarier, "IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation.," *Trends in immunology*, vol. 24, pp. 25–9, jan 2003.
- [76] P. Chomarat, J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka, "IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages.," *Nature immunology*, vol. 1, pp. 510–4, dec 2000.
- [77] D. E. Cressman, L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli, and R. Taub, "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 274, pp. 1379–83, nov 1996.
- [78] M. Kopf, H. Baumann, G. Freer, M. Freudenberg, M. Lamers, T. Kishimoto, R. Zinkernagel, H. Bluethmann, and G. Köhler, "Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice.," *Nature*, vol. 368, pp. 339–42, mar 1994.
- [79] E. C. Rosser, K. Oleinika, S. Tonon, R. Doyle, A. Bosma, N. A. Carter, K. A. Harris, S. A. Jones, N. Klein, and C. Mauri, "Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production.," *Nature medicine*, vol. 20, pp. 1334–9, nov 2014.
- [80] O. Dienz, S. M. Eaton, J. P. Bond, W. Neveu, D. Moquin, R. Noubade, E. M. Briso, C. Charland, W. J. Leonard, G. Ciliberto, C. Teuscher, L. Haynes, and M. Rincon, "The induction of antibody production by IL-6 is indirectly mediated by IL-21 produced by CD4+ T cells.," *The Journal of experimental medicine*, vol. 206, pp. 69–78, jan 2009.
- [81] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, and V. K. Kuchroo, "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.," *Nature*, vol. 441, pp. 235–8, may 2006.
- [82] H.-H. Oberg, D. Wesch, S. Grüssel, S. Rose-John, and D. Kabelitz, "Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells.," *International immunology*, vol. 18, pp. 555–63, apr 2006.

- [83] M. J. Boulanger, D.-c. Chow, E. E. Brevnova, and K. C. Garcia, "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex.," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 300, pp. 2101–4, jun 2003.
- [84] B. Schöbitz, G. Pezeshki, T. Pohl, U. Hemmann, P. C. Heinrich, F. Holsboer, and J. M. Reul, "Soluble interleukin-6 (IL-6) receptor augments central effects of IL-6 in vivo.," *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 9, pp. 659–64, may 1995.
- [85] S. Rose-John and P. C. Heinrich, "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function.," *The Biochemical journal*, vol. 300 (Pt 2, pp. 281–90, jun 1994.
- [86] I. Yan, J. Schwarz, K. Lücke, N. Schumacher, V. Schumacher, S. Schmidt, B. Rabe, P. Saftig, M. Donners, S. Rose-John, H.-W. Mittrücker, and A. Chalaris, "ADAM17 controls IL-6 signaling by cleavage of the murine IL-6R α from the cell surface of leukocytes during inflammatory responses.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 99, pp. 749–60, may 2016.
- [87] P. Baran, R. Nitz, J. Grötzinger, J. Scheller, and C. Garbers, "Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling.," *The Journal of biological chemistry*, vol. 288, pp. 14756–68, may 2013.
- [88] J. Lust, K. a. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. a. Kyle, and N. J. Maihle, "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor.," *Cytokine*, vol. 4, pp. 96–100, mar 1992.
- [89] N. Schumacher, D. Meyer, A. Mauermann, J. Von Der Heyde, J. Wolf, J. Schwarz, K. Knittler, G. Murphy, M. Michalek, C. Garbers, J. W. Bartsch, S. Guo, B. Schacher, P. Eickholz, A. Chalaris, S. Rose-John, and B. Rabe, "Shedding of endogenous interleukin-6 receptor (IL-6R) is governed by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) proteases while a full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 290, no. 43, pp. 26059–26071, 2015.
- [90] T. Jostock, J. Müllberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath, and S. Rose-John, "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses.," *European journal of biochemistry*, vol. 268, pp. 160–7, jan 2001.
- [91] S. Heink, N. Yagev, C. Garbers, M. Herwerth, L. Aly, C. Gasperi, V. Husterer, A. L. Croxford, K. Möller-Hackbarth, H. S. Bartsch, K. Sotlar, S. Krebs, T. Regen, H. Blum, B. Hemmer, T. Misgeld, T. F. Wunderlich, J. Hidalgo, M. Oukka, S. Rose-John, M. Schmidt-Supprian, A. Waisman, and T. Korn, "Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells.," *Nature immunology*, vol. 18, pp. 74–85, jan 2017.

- [92] F. Supek, M. Bošnjak, N. Škunca, and T. Šmuc, “REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms.,” *PloS one*, vol. 6, no. 7, p. e21800, 2011.
- [93] W. S. Murray and C. C. Little, “The Genetics of Mammary Tumor Incidence in Mice,” *Genetics*, vol. 20, pp. 466–496, sep 1935.
- [94] M. Luig, M. a. Kluger, B. Goerke, M. Meyer, A. Nosko, I. Yan, J. Scheller, H.-w. Mittrücker, S. Rose-john, R. a. K. Stahl, U. Panzer, and O. M. Steinmetz, “Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN,” *Journal of the american society of nephrology*, pp. 1–11, 2015.
- [95] E. G. D. Murray, R. A. Webb, and M. B. R. Swann, “A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.),” *The Journal of Pathology and Bacteriology*, vol. 29, no. 4, pp. 407–439, 1926.
- [96] T. Lischke, K. Heesch, V. Schumacher, M. Schneider, F. Haag, F. Koch-Nolte, and H.-W. Mittrücker, “CD38 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes*.,” *Infection and immunity*, vol. 81, pp. 4091–9, nov 2013.
- [97] J. Kang, K.-H. H. Park, J.-J. J. Kim, E.-K. K. Jo, M.-K. K. Han, and U.-H. H. Kim, “The role of CD38 in Fc γ receptor (Fc γ R)-mediated phagocytosis in murine macrophages.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 287, pp. 14502–14, apr 2012.
- [98] F. Tacke, F. Ginhoux, C. Jakubzick, N. van Rooijen, M. Merad, and G. J. Randolph, “Immature monocytes acquire antigens from other cells in the bone marrow and present them to T cells after maturing in the periphery.,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 203, no. 3, pp. 583–97, 2006.
- [99] S. A. Dalrymple, L. A. Lucian, R. Slattery, T. McNeil, D. M. Aud, S. Fuchino, F. Lee, and R. Murray, “Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia.,” *Infection and immunity*, vol. 63, pp. 2262–8, jun 1995.
- [100] B. E. Clausen, C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Förster, “Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using *LysMcre* mice.,” *Transgenic research*, vol. 8, pp. 265–77, aug 1999.
- [101] S. L. Lebeis, B. Bommarius, C. a. Parkos, M. a. Sherman, and D. Kalman, “TLR signaling mediated by MyD88 is required for a protective innate immune response by neutrophils to *Citrobacter rodentium*.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 179, pp. 566–77, jul 2007.
- [102] M. Hasegawa, T. Yamazaki, N. Kamada, K. Tawaratsumida, Y.-G. Kim, G. Núñez, and N. Inohara, “Nucleotide-binding oligomerization domain 1 mediates recognition of *Clostridium difficile* and induces neutrophil recruitment and protection against the pathogen.,” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 186, pp. 4872–80, apr 2011.

- [103] C. Cheminay, D. Chakravorty, and M. Hensel, "Role of neutrophils in murine salmonellosis.," *Infection and immunity*, vol. 72, pp. 468–77, jan 2004.
- [104] C. Shi, T. M. Hohl, I. Leiner, M. J. Equinda, X. Fan, and E. G. Pamer, "Ly6G+ neutrophils are dispensable for defense against systemic *Listeria monocytogenes* infection.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 187, pp. 5293–8, nov 2011.
- [105] K. D. Carr, A. N. Sieve, M. Indramohan, T. J. Break, S. Lee, and R. E. Berg, "Specific depletion reveals a novel role for neutrophil-mediated protection in the liver during *Listeria monocytogenes* infection," *European Journal of Immunology*, vol. 41, pp. 2666–2676, sep 2011.
- [106] B. K. Arendt, A. Velazquez-Dones, R. C. Tschumper, K. G. Howell, S. M. Ansell, T. E. Witzig, and D. F. Jelinek, "Interleukin 6 induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in myeloma cells.," *Leukemia*, vol. 16, pp. 2142–7, oct 2002.
- [107] P. Biswas, F. Delfanti, S. Bernasconi, M. Mengozzi, M. Cota, N. Polentarutti, A. Mantovani, A. Lazzarin, S. Sozzani, and G. Poli, "Interleukin-6 induces monocyte chemotactic protein-1 in peripheral blood mononuclear cells and in the U937 cell line.," *Blood*, vol. 91, pp. 258–65, jan 1998.
- [108] T. Clahsen and F. Schaper, "Interleukin-6 acts in the fashion of a classical chemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 84, pp. 1521–9, dec 2008.
- [109] M. Romano, M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto, and a. Mantovani, "Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment.," *Immunity*, vol. 6, pp. 315–25, mar 1997.
- [110] S. M. Hurst, T. S. Wilkinson, R. M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G. M. Fuller, N. Topley, and S. a. Jones, "IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation.," *Immunity*, vol. 14, pp. 705–14, jun 2001.
- [111] K. Meixenberger, F. Pache, J. Eitel, B. Schmeck, S. Hippenstiel, H. Slevogt, P. N'Guessan, M. Witzel, M. G. Netea, T. Chakraborty, N. Suttorp, and B. Opitz, "*Listeria monocytogenes*-infected human peripheral blood mononuclear cells produce IL-1beta, depending on listeriolysin O and NLRP3.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 184, pp. 922–30, jan 2010.
- [112] R. Uchiyama, S. Yonehara, and H. Tsutsui, "Fas-mediated inflammatory response in *Listeria monocytogenes* infection.," *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, vol. 190, pp. 4245–54, apr 2013.

- [113] K. W. Kang, Y. Wagley, H. W. Kim, Y. R. Pokharel, Y. Y. Chung, I. Y. Chang, J. J. Kim, J. S. Moon, Y. K. Kim, S.-Y. Nah, H.-S. Kang, and J.-W. Oh, “Novel role of IL-6/SIL-6R signaling in the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in murine B16, metastatic melanoma clone F10.9, cells.,” *Free radical biology & medicine*, vol. 42, pp. 215–27, jan 2007.
- [114] T. Hosoi, S. Suzuki, J. Nomura, A. Ono, Y. Okuma, S. Akira, and Y. Nomura, “Bacterial DNA induced iNOS expression through MyD88-p38 MAP kinase in mouse primary cultured glial cells.,” *Brain research. Molecular brain research*, vol. 124, pp. 159–64, may 2004.
- [115] J. Y. Lee, C. A. Lowell, D. G. Lemay, H. S. Youn, S. H. Rhee, K. H. Sohn, B. Jang, J. Ye, J. H. Chung, and D. H. Hwang, “The regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase by Src-family tyrosine kinases mediated through MyD88-independent signaling pathways of Toll-like receptor 4.,” *Biochemical pharmacology*, vol. 70, pp. 1231–40, oct 2005.
- [116] N. Franchimont, S. Rydziel, and E. Canalis, “Interleukin 6 is autoregulated by transcriptional mechanisms in cultures of rat osteoblastic cells.,” *The Journal of clinical investigation*, vol. 100, pp. 1797–803, oct 1997.
- [117] L. Faggioli, M. Merola, J. Hiscott, A. Furia, R. Monese, M. Tovey, and M. Palmieri, “Molecular mechanisms regulating induction of interleukin-6 gene transcription by interferon-gamma.,” *European journal of immunology*, vol. 27, pp. 3022–30, nov 1997.
- [118] C. M. Cahill and J. T. Rogers, “Interleukin (IL) 1beta induction of IL-6 is mediated by a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent AKT/IkappaB kinase alpha pathway targeting activator protein-1.,” *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, pp. 25900–12, sep 2008.
- [119] Y. H. Zhang, J. X. Lin, and J. Vilcek, “Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence.,” *Molecular and cellular biology*, vol. 10, pp. 3818–23, jul 1990.
- [120] K. A. Jablonski, S. A. Amici, L. M. Webb, J. d. D. Ruiz-Rosado, P. G. Popovich, S. Partida-Sanchez, and M. Guerau-de Arellano, “Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages.,” *PloS one*, vol. 10, no. 12, p. e0145342, 2015.
- [121] J. Yang, L. Zhang, C. Yu, X.-F. Yang, and H. Wang, “Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases.,” *Biomarker research*, vol. 2, p. 1, jan 2014.
- [122] R. S. Kalupahana, P. Mastroeni, D. Maskell, and B. A. Blacklaws, “Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.,” *Immunology*, vol. 115, pp. 462–72, aug 2005.

- [123] C. Nicoletti, J. L. Arques, and E. Bertelli, "CX₃CR1 is critical for Salmonella-induced migration of dendritic cells into the intestinal lumen.," *Gut microbes*, vol. 1, no. 3, pp. 131–4, 2010.
- [124] M. Ashburner, C. A. Ball, J. A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J. M. Cherry, A. P. Davis, K. Dolinski, S. S. Dwight, J. T. Eppig, M. A. Harris, D. P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J. C. Matese, J. E. Richardson, M. Ringwald, G. M. Rubin, and G. Sherlock, "Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium.," *Nature genetics*, vol. 25, pp. 25–9, may 2000.
- [125] B. Schuster, M. Kovaleva, Y. Sun, P. Regenhard, V. Matthews, J. Grötzinger, S. Rose-John, and K. J. Kallen, "Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited: The interleukin-6 receptor can serve as an α -receptor for CNTF," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 11, pp. 9528–9535, 2003.
- [126] Y. Waumans, G. Vliegen, L. Maes, M. Rombouts, K. Declerck, P. Van Der Veken, W. Vanden Berghe, G. R. Y. De Meyer, D. Schrijvers, and I. De Meester, "The Dipeptidyl Peptidases 4, 8, and 9 in Mouse Monocytes and Macrophages: DPP8/9 Inhibition Attenuates M1 Macrophage Activation in Mice.," *Inflammation*, vol. 39, pp. 413–24, feb 2016.
- [127] D. J. Goss and F. E. Kleiman, "Poly(A) binding proteins: are they all created equal?," *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, vol. 4, no. 2, pp. 167–79, 2013.
- [128] E. Szostak and F. Gebauer, "Translational control by 3'-UTR-binding proteins.," *Briefings in functional genomics*, vol. 12, pp. 58–65, jan 2013.
- [129] R. T. Dorsam and J. S. Gutkind, "G-protein-coupled receptors and cancer.," *Nature reviews. Cancer*, vol. 7, pp. 79–94, feb 2007.
- [130] N. Lippuner, B. Morell, A. Schaffner, and D. J. Schaer, "Proteinase-activated receptors induce nonoxidative, antimicrobial peptides and increased antimicrobial activity in human mononuclear phagocytes.," *Journal of leukocyte biology*, vol. 81, pp. 465–73, feb 2007.
- [131] P. J. Murray and T. A. Wynn, "Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 89, pp. 557–563, apr 2011.
- [132] S. Partida-Sánchez, D. a. Cockayne, S. Monard, E. L. Jacobson, N. Oppenheimer, B. Garvy, K. Kusser, S. Goodrich, M. Howard, A. Harmsen, T. D. Randall, and F. E. Lund, "Cyclic ADP-ribose production by CD38 regulates intracellular calcium release, extracellular calcium influx and chemotaxis in neutrophils and is required for bacterial clearance in vivo.," *Nature medicine*, vol. 7, pp. 1209–16, nov 2001.
- [133] A. H. Guse, "Calcium mobilizing second messengers derived from NAD," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1854, pp. 1132–1137, sep 2015.

- [134] B. N. Desai and N. Leitinger, "Purinergic and calcium signaling in macrophage function and plasticity.," *Frontiers in immunology*, vol. 5, p. 580, 2014.

10 Anhang

10.1 Sicherheit und Entsorgung

Stoff	H-Sätze	P-Sätze
β-Mercaptoethanol	301 + 331-310-315-317-318-373-410	273-280-302 + 352-304 + 340-305 + 351 + 338-308 + 310
Brefeldin A	301	301 + 310
EDTA	319	305 + 351 + 338
Formaldehyd	301 + 331 + 331-314-317-335-341-350-370	201-260-280-301 + 310-330-303 + 361 + 353-304 + 340-310-305 + 351 + 338-308 + 310-403 + 233
Gentamicin	317-334	261-280-342 + 311
Ionomycin	302	
Lysogeny Broth	315-319-335	
Methanol	225-331-311-301-370	210-233-280-302 + 352-304 + 340-308 + 310-403 + 235
NH ₄ Cl	301-319	305 + 351 + 338
Paraformaldehyd	228-302-315-317-318-332-335-351	210-280-305 + 351 + 338
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat	315	
Saponin	319-335	261-305 + 351 + 338
Trypanblau	350	301-308 + 313
Tryptic Soy Broth	315-319	
Wasserstoffperoxid	271-302-314-332-335-412	210-220-260-280-305 + 351 + 338-370 + 378

Tabelle 10.1: **H- und P- Sätze der verwendeten Stoffe**

Es wurden keine Stoffe verwendet, die in der KMR verzeichnet sind.

Alle Medien, Verbrauchsmaterialien und Glasutensilien wurden bei 121 °C und 1 Bar Überdruck autoklaviert.

10.2 Publikationsliste

10.2.1 Veröffentlichungen

- Bergmann, J., Müller, M., Baumann, N., Reichert, M., Heneweer, C., Bolik, J., ... **Lücke, K.**, ... Schmidt-Arras, D. (2017). IL-6 trans-signaling is essential for the development of hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology* (Baltimore, Md.), 65(1), 89–103. <https://doi.org/10.1002/hep.28874>
- Yan, I., Schwarz, J., **Lücke, K.**, Schumacher, N., Schumacher, V., Schmidt, S., ... Chalaris, A. (2016). ADAM17 controls IL-6 signaling by cleavage of the murine IL-6R α from the cell surface of leukocytes during inflammatory responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 99(5), 749–60. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A0515-207R>
- Schneider, M., Schumacher, V., Lischke, T., **Lücke, K.**, Meyer-Schwesinger, C., Velden, J., ... Mittrücker, H.-W. W. (2015). CD38 is expressed on inflammatory cells of the intestine and promotes intestinal inflammation. *PLoS ONE*, 10(5), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126007>

10.2.2 Kongressbeiträge

- **Lücke, K.**, Yan, I., Ahrens, S., Steinmetz, O. M., Rose-John, S., & Mittrücker, H.-W. (2016). The role of IL-6 in the innate immune response against *Listeria monocytogenes*. In Annual Meeting German Society for Immunology. Hamburg.
- **Lücke, K.**, Jeanette, S., Yan, I., Schumacher, V., Rose-John, S., Chalaris, A., & Mittrücker, H.-W. (2015). The role of IL-6 in the adaptive immune response against *Listeria monocytogenes*. In European Congress of Immunology. Wien.
- **Lücke, K.**, Jeanette, S., Yan, I., Schumacher, V., Rose-John, S., Chalaris, A., & Mittrücker, H.-W. (2014). Unraveling the function of ADAM17 in IL-6 signaling . In Annual Meeting German Society for Immunology. Bonn.

10.2.3 Veröffentlichungen im Peer-Review Prozess

- **Lücke, K.**, Yan, I., Krohn, S., Volmari, A., Klinge, S., Schmid, J., ... Mittrücker, H.-W. (2017). Inflammatory monocytes are controlled by classical IL-6 signaling during *Listeria monocytogenes* infection. *European Journal of Immunology*.

10.3 RNA-Sequenzierung: Differenziell exprimierte Gene

Name	Log ₂ FoldChange	pAdj	Ensembl Gene ID
lysozyme 2	-4,5661	$0,00 \times 10^0$	ENSMUSG00000069516
lysozyme 1	3,5636	$1,18 \times 10^{253}$	ENSMUSG00000069515
predicted gene 5960	1,0857	$2,97 \times 10^{18}$	ENSMUSG00000099775
interleukin 6 receptor, alpha	-0,7595	$7,47 \times 10^{14}$	ENSMUSG00000027947
insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	0,9547	$2,75 \times 10^{12}$	ENSMUSG00000033581
coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	0,8046	$1,08 \times 10^{08}$	ENSMUSG00000021678
CD300 molecule like family member d	-0,6953	$5,46 \times 10^{07}$	ENSMUSG00000034641
predicted gene 5150	-0,7415	$9,37 \times 10^{07}$	ENSMUSG00000078780
dipeptidase 2	-0,7158	$5,52 \times 10^{06}$	ENSMUSG00000053687
septin 8	-0,4921	$7,60 \times 10^{06}$	ENSMUSG00000018398
meteorin, glial cell differentiation regulator-like	-0,4298	$1,02 \times 10^{05}$	ENSMUSG00000039208
low density lipoprotein receptor class A domain containing 3	0,5238	$1,03 \times 10^{05}$	ENSMUSG00000048058
sodium channel, voltage-gated, type II, beta	0,6017	$1,23 \times 10^{05}$	ENSMUSG00000070304
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3F	0,5360	$2,25 \times 10^{05}$	ENSMUSG00000066363
toll-like receptor 12	0,5378	$4,60 \times 10^{05}$	ENSMUSG00000062545
chimerin 2	0,6144	$7,91 \times 10^{05}$	ENSMUSG00000004633
ureidopropionase, beta	0,6468	$8,35 \times 10^{05}$	ENSMUSG00000033427
ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 3	-0,5393	$2,34 \times 10^{04}$	ENSMUSG00000029299
kynureninase (L-kynurenine hydro-lase)	0,5019	$2,34 \times 10^{04}$	ENSMUSG00000026866
kinesin family member C3	-0,5923	$2,46 \times 10^{04}$	ENSMUSG00000031788
serine/threonine kinase 39	-0,4493	$8,50 \times 10^{04}$	ENSMUSG00000027030
osteoclast stimulatory transmembrane protein	-0,5777	$2,26 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000027670
G protein-coupled receptor 83	0,5706	$2,95 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000031932
serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1	0,5102	$3,48 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000023224

Name	Log ₂ FoldChange	pAdj	Ensembl Gene ID
guanylate binding protein 11	0,4461	$3,48 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000092021
BMP and activin membrane-bound inhibitor, pseudogene (Xenopus laevis)	-0,4448	$3,73 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000081219
Kruppel-like factor 11	-0,4316	$3,75 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000020653
megakaryocyte-associated tyrosine kinase	-0,5206	$4,00 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000004933
dual specificity phosphatase 6	-0,3907	$4,15 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000019960
copine II	-0,4161	$4,15 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000034361
predicted gene 27252	0,5167	$4,18 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000098708
serine protease inhibitor, Kunitz type 1	-0,3952	$4,59 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000027315
immunoglobulin kappa variable 5-39	0,4100	$6,44 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000076569
rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18	0,4434	$6,93 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000004568
sortilin 1	0,4169	$6,97 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000068747
secreted phosphoprotein 1	-0,5309	$6,97 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000029304
serine incorporator 3	0,3670	$7,84 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000017707
leukemia inhibitory factor receptor	0,4412	$8,34 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000054263
signal transducing adaptor family member 1	-0,5121	$8,34 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000029254
predicted gene, 23935	-0,4976	$9,07 \times 10^{03}$	ENSMUSG00000076258
exocyst complex component 3-like 4	0,4532	$1,00 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000021280
dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	0,4949	$1,00 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000016526
chemokine (C-C motif) receptor 5	-0,3799	$1,14 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000079227
nocturnin	-0,4647	$1,36 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000023087
spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein	-0,2850	$1,44 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000038156
allograft inflammatory factor 1	-0,3202	$1,47 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000024397
legumain	-0,3555	$1,50 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000021190
zinc finger protein 608	-0,4232	$1,59 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000052713
CD72 antigen	-0,4571	$1,59 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000028459
pleckstrin homology domain containing, family O member 1	-0,2858	$1,59 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000015745
family with sequence similarity 102, member B	0,3993	$1,72 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000040339

Name	Log ₂ FoldChange	pAdj	Ensembl Gene ID
UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6	-0,4056	$1,83 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000037280
TBC1 domain family, member 2	0,3768	$2,03 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000039813
sterol O-acyltransferase 2	-0,4589	$2,09 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000023045
LIM domain only 1	0,4841	$2,23 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000036111
CD300 molecule like family member B	-0,4234	$3,14 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000063193
transmembrane protein 154	0,3646	$3,62 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000056498
docking protein 2	-0,4660	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000022102
integrin beta 5	-0,4660	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000022817
plasminogen activator, urokinase	-0,3280	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000021822
phospholipid phosphatase 1	0,4584	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000021759
src-like adaptor	0,3305	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000022372
nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3	-0,3748	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000002108
phosphoinositide-3-kinase interacting protein 1	0,4581	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000034614
cytochrome b561 family, member A3	0,2998	$3,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000034445
RAB27A, member RAS oncogene family	0,2856	$3,95 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000032202
family with sequence similarity 126, member B	0,4170	$3,98 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000038174
TBC1 domain family, member 14	0,3313	$4,13 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000029192
solute carrier family 12, member 7	-0,3724	$4,23 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000017756
guanylate-binding protein 10	0,4144	$4,42 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000105096
aryl-hydrocarbon receptor	-0,3993	$4,52 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000019256
CD33 antigen	0,4610	$4,52 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000004609
predicted gene 45043	0,4408	$4,52 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000109291
tubulin, beta 6 class V	-0,3323	$5,04 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000001473
immunoglobulin heavy variable 1-64	0,3605	$5,04 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000094088
dehydrogenase/reductase (SDR family) member 3	-0,4418	$5,33 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000066026
transmembrane protein 8 (five membrane-spanning domains)	0,3158	$5,48 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000024180
G protein-coupled receptor 141	0,2899	$5,72 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000053101
immunoglobulin kappa variable 4-53	0,3326	$6,20 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000095753

Name	Log ₂ FoldChange	pAdj	Ensembl Gene ID
expressed sequence AW112010	0,3540	$6,71 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000075010
chromodomain protein, Y chromosome-like 2	0,3870	$6,75 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000031758
BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	-0,3336	$7,08 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000078566
serine (or cysteine) peptidase inhi- bitor, clade B, member 8	-0,3905	$7,35 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000026315
family with sequence similarity 89, member A	0,3821	$7,72 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000043068
membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8A	0,4375	$7,76 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000024730
carbonic anhydrase 5b, mitochon- drial	-0,4342	$8,06 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000031373
suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)	0,3443	$8,17 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000031995
choline kinase alpha	0,2762	$8,61 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000024843
cysteinyl leukotriene receptor 1	-0,3174	$8,61 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000052821
Fc receptor, IgG, low affinity IV	-0,3082	$8,61 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000059089
CD82 antigen	0,3015	$8,96 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000027215
insulin-like growth factor binding protein 6	-0,4126	$9,54 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000023046
arginase, liver	-0,4215	$9,56 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000019987
glutathione synthetase	-0,3245	$9,67 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000027610
chemokine (C-C motif) ligand 24	-0,3794	$9,67 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000004814
microtubule associated tumor sup- pressor candidate 2	0,4245	$9,94 \times 10^{02}$	ENSMUSG00000029651

Tabelle 10.2: Rohdaten der RNA-Sequenzierung

11 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Professor Hans-Willi Mittrücker für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit erfolgreich zu beenden und somit den Dokortitel zu erlangen, danken. Ohne seine gute und lückenlose Betreuung wäre das nicht möglich gewesen.

Ich möchte mich auch bei dem Zweitgutachter dieser Arbeit, Professor Wolfram Brune, für die Betreuung während der Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Mittrücker bedanken. Die tolle Atmosphäre sorgte jeden Tag für eine gute Stimmung und dadurch sind gleichzeitig aus Kollegen Freunde geworden.

Besonders danken möchte ich meiner Lebenspartnerin Isabell Yan. Ohne ihre emotionale Unterstützung, die mir in einigen Tiefpunkten meines Lebens geholfen hat, wäre diese Abschlussarbeit nicht möglich gewesen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Günther und Gerda Lücke bedanken, die mir mein Studium durch ihre Unterstützung ermöglicht haben und stets ein offenes Ohr für meine Sorgen hatten.

12 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.