



**Die Bedeutung des gp130-Internalisierungsmotivs für
IL-6-vermittelte Signale und das Antigenpräsentationspotential
muriner Knochenmarksmakrophagen**

**Relevance of the gp130 internalization motif for IL-6 signaling
and antigen-presenting capacity of murine bone marrow-derived
macrophages**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Friederike Anna Christine Reinsberg

aus

Hildesheim

Würzburg 2021

Eingereicht am: 02.12.2021

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitz: Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou
Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

1. Betreuerin: PD Dr. rer. nat. Heike Hermanns

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas Geier

3. Betreuer: PD Dr. med. Niklas Beyersdorf

Tag des Promotionskolloquiums: 11.03.2022

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Meiner Großmutter Kati Goetz

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Interleukin-6-vermittelte Signale	1
1.1.1	Interleukin-6	1
1.1.2	Signaltransduktion	2
1.1.3	Intrazelluläre Signalwege	3
1.1.4	Regulierung	4
1.2	Regulierung IL-6-vermittelter Signale durch Endozytose des Glykoproteins 130 kDa	5
1.2.1	Das gp130-Internalisierungsmotiv	5
1.2.2	Die gp130 ^{LLAA} -Maus: ein <i>knock-in</i> -Modell zur Suppression der gp130- Endozytose	6
1.3	Murine Knochenmarksmakrophagen	6
1.3.1	Makrophagen	6
1.3.2	IL-6 in Makrophagen	6
1.3.3	Murine KM-M Φ : ein Primärzellkulturmodell	7
1.4	Zielsetzung	8
2	Material	10
2.1	Chemikalien	10
2.2	Kits	10
2.3	Verbrauchsmaterialien	11
2.4	Zellkultur: Nährmedien und Reagenzien	11
2.5	Stimulantien	12
2.6	Inhibitoren	12
2.7	Antikörper	12
2.7.1	Antikörper für die Durchflusszytometrie	12
2.7.2	Antikörper für Western Blot	13
2.8	Proteinmarker	13
2.9	Primer	13
2.10	Geräte	14
2.11	Mausstämme	14
2.12	Software	15
3	Methoden	16
3.1	Methoden der Zellbiologie	16
3.1.1	Isolation des murinen Knochenmarks	16
3.1.2	Kultivierung von KM-M Φ	16
3.1.3	Behandlung mit Stimulantien	16
3.1.4	Zelloberflächenfärbung	17
3.1.5	Durchflusszytometrie	18

3.2	Methoden der Proteinbiochemie	18
3.2.1	Herstellung der Zellysate	18
3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	18
3.2.3	Western Blot	19
3.2.4	Immundetektion	19
3.2.5	Quantifizierung	19
3.3	Methoden der Molekularbiologie	19
3.3.1	DNA-Isolation und Polymerase-Kettenreaktion	19
3.3.2	DNA-Detektion	20
3.4	Statistische Auswertung und Diagramme	20
4	Ergebnisse	21
4.1	M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen exprimieren mehr gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ	21
4.2	IL-6 induziert in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen eine stärkere STAT1- und STAT3-Phosphorylierung als in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ	22
4.3	IL-6-Signale induzieren in KM-M Φ aus WT-Mäusen nur eine kurzzeitige STAT1-Phosphorylierung	23
4.4	KM-M Φ aus gp130 ^{LLAA} -Mäusen exprimieren mehr gp130 auf der Zelloberfläche als KM-M Φ aus WT-Mäusen	23
4.5	Die IL-6-induzierte STAT1- und STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-M Φ aus WT- und gp130 ^{LLAA} -Mäusen	26
4.6	Hyper-IL-6 induziert die STAT1-Phosphorylierung in KM-M Φ aus gp130 ^{LLAA} -Mäusen stärker als in KM-M Φ aus WT-Mäusen	28
4.7	Die hyper-IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-M Φ aus WT- und gp130 ^{LLAA} -Mäusen	30
4.8	LPS induziert auf M-CSF ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen die gp130- und IL-6R α -Expression	30
4.9	LPS verändert die gp130-Expression auf M-CSF ausgereiften KM-M Φ aus gp130 ^{LLAA} -Mäusen nicht	32
4.10	KM-M Φ aus WT- und gp130 ^{LLAA} -Mäusen zeigen ein ähnliches MHCII- und CD86-Expressionsmuster	32
4.11	IFN- γ induziert, anders als LPS, sowohl in GM-CSF- als auch in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ die MHCII- und CD86-Expression	33
5	Diskussion	35
5.1	IL-6-vermittelte Signale in KM-M Φ	35
5.2	Relevanz des gp130-Internalisierungsmotivs für IL-6-vermittelte Signale	37
5.3	<i>Crosstalk</i> -Regulierung IL-6-vermittelter Signale durch LPS	38
5.4	Antigenpräsentation und Kostimulation durch KM-M Φ	40
5.5	Ausblick	41
6	Zusammenfassung	42

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Makrophagenreaktion auf einen bakteriellen Stimulus	2
1.2	Schematische Darstellung des IL-6- <i>Signaling</i>	3
1.3	Schematische Darstellung des JAK/STAT-Signalwegs	4
1.4	Schematische Darstellung der <i>Crosstalk</i> -induzierten gp130-Endozytose	5
1.5	Schematische Darstellung der Interaktion von Makrophagen und CD4-T-Zellen	7
3.1	Durchflusszytometrische Identifizierung CD11b ⁺ Zellen	17
4.1	M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT-Mäusen exprimieren mehr gp130 und IL-6Rα auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte KM-MΦ	21
4.2	IL-6 induziert in M-CSF-ausgereiften KM-MΦ aus WT-Mäusen eine stärkere STAT1- und STAT3-Phosphorylierung als in GM-CSF-ausgereiften KM-MΦ	22
4.3	IL-6-Signale induzieren in KM-MΦ aus WT-Mäusen nur eine kurzzeitige STAT1-Phosphorylierung	24
4.4	KM-MΦ aus gp130 ^{LLAA} -Mäusen exprimieren mehr gp130 auf der Zelloberfläche als KM-MΦ aus WT-Mäusen	25
4.5	Die IL-6-induzierte STAT1-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130 ^{LLAA} -Mäusen	26
4.6	Die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130 ^{LLAA} -Mäusen	27
4.7	Hyper-IL-6 induziert in KM-MΦ aus gp130 ^{LLAA} -Mäusen eine stärkere STAT1-Phosphorylierung als in KM-MΦ aus WT-Mäusen	28
4.8	Die hyper-IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130 ^{LLAA} -Mäusen	29
4.9	LPS induziert auf M-CSF ausgereiften KM-MΦ aus WT-Mäusen die gp130- und IL-6Rα-Expression	30
4.10	LPS verändert die gp130-Expression auf M-CSF ausgereiften KM-MΦ aus gp130 ^{LLAA} -Mäusen nicht	31
4.11	KM-MΦ aus WT- und gp130 ^{LLAA} -Mäusen zeigen ein ähnliches MHCII- und CD86-Expressionsmuster	33
4.12	IFN-γ induziert, anders als LPS, sowohl in GM-CSF- als auch in M-CSF-ausgereiften KM-MΦ die MHCII- und CD86-Expression	34

Abkürzungsverzeichnis

ADAM17	<i>a disintegrin and metalloprotease 17</i>
AP2	Adapterprotein 2
BMDC	<i>bone marrow-derived dendritic cell</i>
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophage</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CRS	<i>Cytokine Release Syndrome</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gp130	Glykoprotein 130 kDa
gp130 ^{LLAA}	C57BL/6-TgHII6st ^{L784A/L785A1Hema}
IFN- γ	Interferon γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-6R α	Interleukin-6-Rezeptor α
JAK	Januskinase
KM-DZ	Knochenmark-generierte dendritische Zelle
KM-M Φ	Knochenmarksmakrophage
LPS	Lipopolysaccharid
M Φ	Makrophage
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
MHCII	<i>major histocompatibility complex class II</i>
Mk2	MAPK-aktivierte Proteinkinase 2
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NF κ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
p38	p38-Mitogen-aktivierte Proteinkinase, p38-MAPK
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i>
PIAS	<i>protein inhibitors of activated STAT</i>
S	Serin
SHP-2	<i>Src homology 2 domain-containing phosphatase 2</i>
sIL-6R α	löslicher Interleukin-6-Rezeptor α
SD	Standardabweichung
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAM	Tumor-assoziiertes Makrophage
T _H 1	Typ 1-T-Helferzelle
TLR-4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

1 Einleitung

Die Sepsis und der septische Schock sind häufige Krankheitssyndrome und gehören zu den Haupttodesursachen auf Intensivstationen [42]. 2013 betrug die Sepsisinzidenz unter hospitalisierten Patient:innen in Deutschland 279.530 [32]. 67.849 Patient:innen starben an oder mit einer Sepsis, die Kosten der stationären und ambulanten Behandlung wurden auf 7,7 Milliarden Euro geschätzt. Die hohe Morbidität und Mortalität der Sepsis sowie die hohen direkten und indirekten Krankheitskosten stellen eine medizinische und gesellschaftliche Herausforderung dar.

Die Sepsis wird gemäß der Dritten Internationalen Konsensusdefinition der Sepsis und des septischen Schocks als akut lebensbedrohliche Organdysfunktion definiert, die durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion hervorgerufen wird [117]. Physiologisch kommt es bei einer Infektion im Rahmen der 24 bis 48 Stunden dauernden Akute-Phase-Reaktion zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6); die Inflammation wird nach einer anfänglich exponentiellen Signalamplifikation durch verschiedene Regulationsmechanismen lokal und zeitlich begrenzt [21, 25, 18, 132]. Bei der Sepsis hingegen führt eine massive Hyperzytokinämie zu einer systemischen Hyperinflammation, die sich klinisch als *Cytokine Release Syndrome* (CRS) mit Fieber, Leukozytose, Hypoxämie, Azotämie, myokardialer Dysfunktion, disseminierter intravasaler Gerinnung und Exanthem manifestiert [78]. Hierbei korreliert die IL-6-Konzentration im peripheren Blut nicht nur mit der Intensität der systemischen Zytokinantwort, sondern auch mit dem klinischen Schweregrad der Erkrankung, der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Behandlung und der Mortalität [108, 118, 127].

Zur Behandlung des therapieassoziierten CRS wird in der Hämatologie Tocilizumab, ein humanisierter monoklonaler Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor α (IL-6R α), eingesetzt [29, 44, 126]. Im Rattenmodell der Sepsis verminderte Tocilizumab die inflammatorische Lungen- und Nierenschädigung [59]. Auch bei Infektionen mit dem *severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2* (SARS-CoV-2) korrelieren der Schweregrad der Erkrankung und die Mortalität mit der IL-6-Konzentration im peripheren Blut [37]. Randomisierte, kontrollierte Studien zum Einsatz von Tocilizumab bei Patient:innen mit *coronavirus disease 2019* (COVID-19) konnten bisher jedoch insgesamt weder eine relevante klinische Verbesserung noch eine Reduktion der Mortalität zeigen [122, 109, 12]. Für die Entwicklung zielgerichteter Sepsistherapien ist ein besseres Verständnis der Regulierung IL-6-vermittelter Signale nötig.

1.1 Interleukin-6-vermittelte Signale

1.1.1 Interleukin-6

Zytokine sind bis zu 25 kDa große Polypeptide, die von Zellen als Reaktion auf einen Stimulus synthetisiert werden und über spezifische Rezeptorsysteme als Signalmoleküle (i) autokrin auf die synthetisierende Zelle, (ii) parakrin auf Zellen in der Mikroumgebung oder (iii) endokrin über die Blutbahn auf entfernte Zellen wirken [94]. Werden Zytokine von Leukozyten sezerniert

oder wirken auf diese, werden sie als Interleukine bezeichnet. Der Begriff des *Zytokin-Crosstalks* beschreibt die Regulierung von Zytokinsignalen durch andere Zytokine. Dies ermöglicht eine koordinierte Antwort der simultan agierenden pleiotropen und teils redundanten Zytokine.

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das insbesondere von Monozyten und Makrophagen (MΦ), aber auch von anderen Leukozyten, von Endothelzellen, Fibroblasten, Adipozyten und Epithelzellen unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert wird [55, 70]. Primär wird die IL-6-Expression durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) und proinflammatorische Zytokine wie IL-1β und TNF-α induziert (Abb. 1.1). Nach Abschluss der posttranslationalen Modifikationen bilden 184 Aminosäuren eine Struktur aus vier α-Helices, das Molekulargewicht beträgt ungefähr 21 kDa [6, 48].

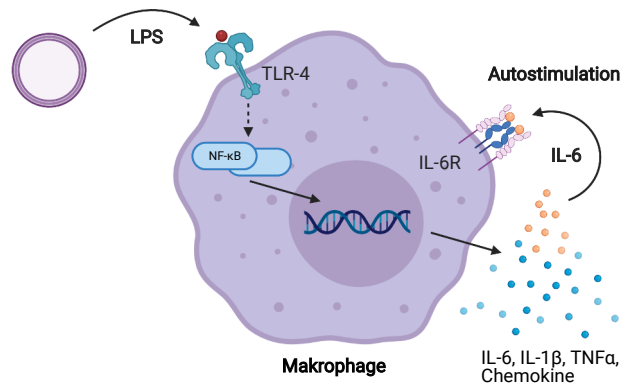


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Makrophagenreaktion auf einen bakteriellen Stimulus: Bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) bindet an den Toll-*like*-Rezeptor 4 (TLR-4) und induziert über den NFκB-Signalweg die Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie die Autostimulation der Makrophagen durch IL-6.

Unter inflammatorischen Bedingungen kann die IL-6-Plasmakonzentration kurzfristig von 1-10 pg/mL auf Konzentrationen von wenigen Nanogramm pro Milliliter steigen, bei schweren Infektionen sogar auf über 500 ng/mL [49]. Im Rahmen der physiologischen Akute-Phase-Reaktion induziert IL-6 die Synthese der Cyclooxygenase 2, die Prostaglandin-E2-vermittelt Fieber auslöst, und von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein, das eine Komplementaktivierung bewirkt [94]. Zudem stimulieren IL-6-vermittelte Signale Wachstum und Differenzierung von B- und T-Zellen und wirken so als Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem [38, 54]. Chronische IL-6-Aktivität hingegen kann die Entstehung von Autoimmun-, Krebs- und Gefäßerkrankungen sowie von metabolischen Störungen fördern [58].

1.1.2 Signaltransduktion

Die Transduktion IL-6-vermittelter Signale erfolgt durch einen Rezeptorkomplex aus (i) dem Liganden IL-6, (ii) dem spezifischen Rezeptor IL-6Rα und (iii) dem membrangebundenen Signaltransduktor und Korezeptor Glykoprotein 130 kDa (gp130) [53]. Dieser Komplex kann als Tetramer aus je einem Molekül IL-6 und IL-6Rα sowie zwei gp130-Molekülen oder als Hexamer aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6Rα und gp130 vorliegen [43, 76]. Im Gegensatz zu gp130, das auf allen Zellen exprimiert wird, wird IL-6Rα nur auf der Oberfläche von Leukozyten, Hepatozyten und einigen Epithelzellen exprimiert [130]. Da IL-6 und IL-6Rα für sich allein keine messbare Affinität gegenüber gp130 aufweisen, kann nur der Komplex aus IL-6 und

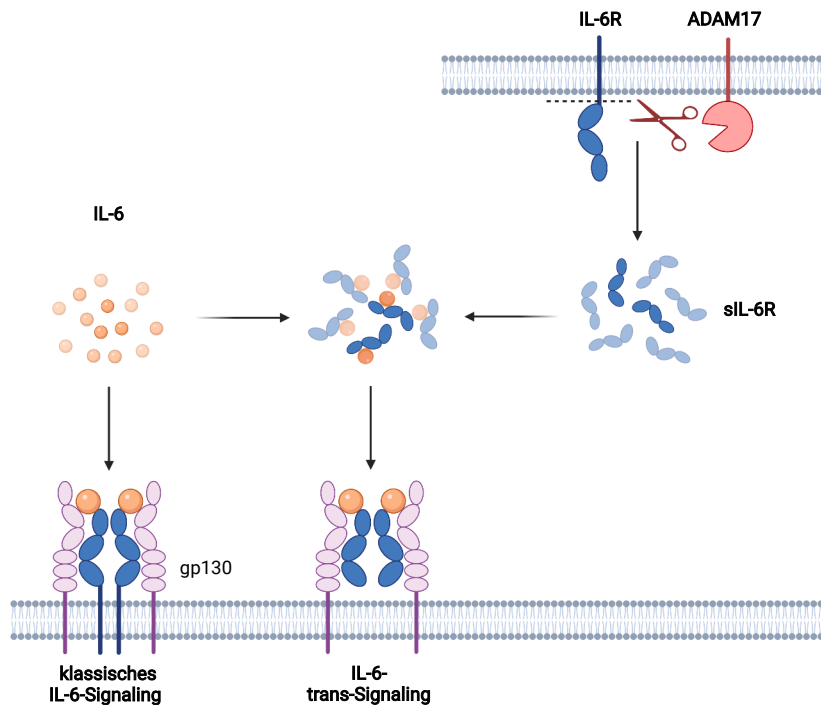


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des IL-6-Signaling: Beim klassischen IL-6-Signaling bindet IL-6 an den IL-6-Rezeptor α (IL-6R α), dies induziert die Bindung und Dimerisierung von gp130. Beim IL-6-trans-Signaling bindet ein Komplex aus IL-6 und löslichem IL-6R α (sIL-6R α) direkt an gp130 und induziert so die gp130-Dimerisierung. sIL-6R α entsteht durch Rezeptor-Shedding durch die Metalloprotease ADAM17. Modifiziert nach Schmidt-Arras et Rose-John [115].

IL-6R α an gp130 binden und eine gp130-Dimerisierung auslösen [66]. Beim klassischen IL-6-Signaling bindet IL-6 an den membrangebundenen IL-6R α , beim IL-6-trans-Signaling hingegen an löslichen IL-6R α (sIL-6R α) (Abb. 1.2) [124, 60]. Dadurch ist klassisches IL-6-Signaling von der Zelloberflächenexpression von IL-6R α abhängig und im Gegensatz zum IL-6-trans-Signaling auf wenige Zellarten beschränkt.

1.1.3 Intrazelluläre Signalwege

Die IL-6-vermittelte intrazelluläre gp130-Dimerisierung induziert die Autophosphorylierung der konstitutiv an gp130 gebundenen Januskinasen (JAK), die membrandistale Tyrosinreste des Signaltransduktors gp130 phosphorylieren (Abb. 1.3) [119]. Diese phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für Proteine der STAT-Familie (*signal transducer and activator of transcription*) und für die Tyrosinphosphatase SHP-2 (*Src homology 2 domain-containing phosphatase 2*) und somit als Ausgangspunkt der Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs und des MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinase-Wegs [39, 142, 137, 35]. IL-6 induziert über den JAK/STAT-Signalweg primär die Phosphorylierung von STAT3 an Tyrosin 705 (Y₇₀₅), zu einem geringeren Ausmaß auch die STAT1-Phosphorylierung an Y₇₀₁ [67, 116]. Aktivierte STAT-Proteine bilden Homo- und Heterodimere, die nach der Translokation in den Zellkern als Transkriptionsfaktoren für IL-6-Zielgene wirken [82].

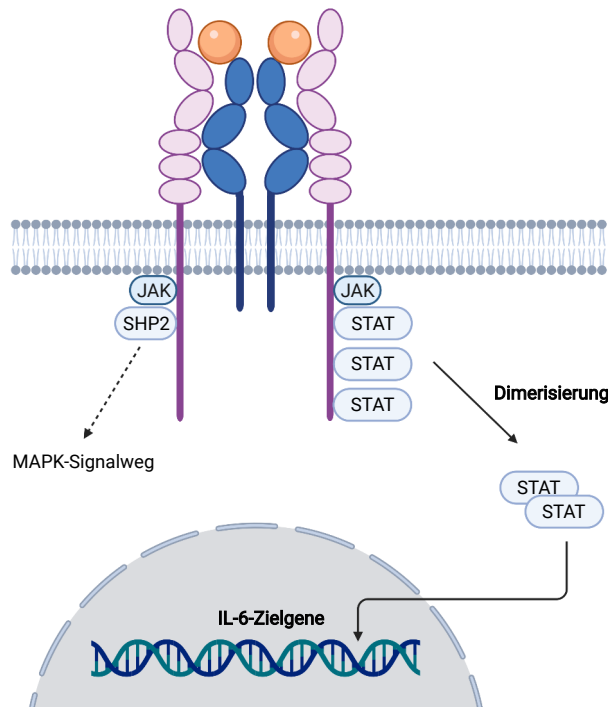


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des JAK/STAT-Signalwegs: Die gp130-Dimerisierung induziert die JAK-Autophosphorylierung. Dadurch werden membrandistale Tyrosinreste phosphoryliert, die als Bindungsstelle für STAT-Moleküle dienen. Aktivierte STAT-Moleküle dimerisieren, translozieren in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren für IL-6-Zielgene. Modifiziert nach *Hergovits* [51].

1.1.4 Regulierung

Unter physiologischen Bedingungen werden IL-6-vermittelte Signale durch verschiedene Mechanismen räumlich und zeitlich begrenzt. Lösliches gp130 und sIL-6R α bilden durch Komplexbildung ein Puffersystem für systemisches IL-6, sodass IL-6-Signaling bei physiologischen IL-6-Konzentrationen auf Mikroumgebungen begrenzt bleibt [5]. Die Metalloprotease ADAM17 (*a disintegrin and metalloprotease 17*) beendet klassisches IL-6-Signaling durch die Spaltung des IL-6R α ; dieses Rezeptor-Shedding führt jedoch gleichzeitig zur Freisetzung von sIL-6R α und ermöglicht so IL-6-trans-Signaling [141]. Durch Liganden- und Crosstalk-induzierte gp130-Endozytose sinkt die gp130-Oberflächenexpression und limitiert somit klassisches und trans-Signaling [105]. Proteintyrosinphosphatasen wie SHP-2 dephosphorylieren Komponenten des JAK/STAT-Signalwegs, die durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden [79]. Konstitutiv aktive Proteine der PIAS-Familie (*Protein inhibitors of activated STAT*) inhibieren die DNA-Bindung von STAT-Proteinen und verhindern so die Expression von IL-6-Zielgenen [80, 97]. Die IL-6-vermittelte Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs induziert zudem die Expression von SOCS-Proteinen (*Suppressor of cytokine signaling*), die als klassische Feedbackinhibitoren die katalytische Aktivität der JAK inhibieren, Bindungsstellen für Signalmoleküle an gp130 blockieren und Komponenten der Signalkaskade über Ubiquitylierung dem proteasomalen Abbau zuführen [120].

1.2 Regulierung IL-6-vermittelter Signale durch Endozytose des Glykoproteins 130 kDa

1.2.1 Das gp130-Internalisierungsmotiv

Gp130 ist der signaltransduzierende Korezeptor für Zytokine der IL-6-Familie. Als einer der ältesten Zytokinrezeptoren besitzt gp130 in der zytoplasmatischen Region ein über Spezies hinweg konserviertes Dileucin-Internalisierungsmotiv (murin L_{784,785}, human L_{786,787}), dessen Expression die (i) konstitutive, (ii) Liganden-induzierte und (iii) *Crosstalk*-induzierte gp130-Endozytose ermöglicht; dieser Vorgang ist unabhängig von IL-6-induzierten intrazellulären Signalkaskaden [136, 128, 27, 26].

Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α induzieren durch die Aktivierung der p38-MAP-Kinase (p38) und der MAPK-aktivierten Proteinkinase 2 (Mk2) die gp130-Phosphorylierung an den Serinresten S_{780,782} (Abb. 1.4) [105]. Diese Modifizierung fördert vermutlich die Interaktion des Adapterproteins 2 (AP2) mit dem Dileucin-Motiv und leitet so die Clathrin-vermittelte endolysosomale Rezeptordegradierung ein [129, 125]. Untersuchungen in HeLa-Zellen zur Endozytose von CD4, dem Korezeptor des T-Zell-Rezeptors, konnten aufzeigen, dass die Serinphosphorylierung die Affinität der Interaktion von AP2 und der Dileucin-Sequenz um den Faktor 350 bis 700 erhöht [102]. Die Kristallstruktur der Bindung zwischen der CD4-Dileucin-Sequenz und AP2 ergab jedoch keinen Anhalt für die Notwendigkeit von Phosphoserin für die Interaktion [69].

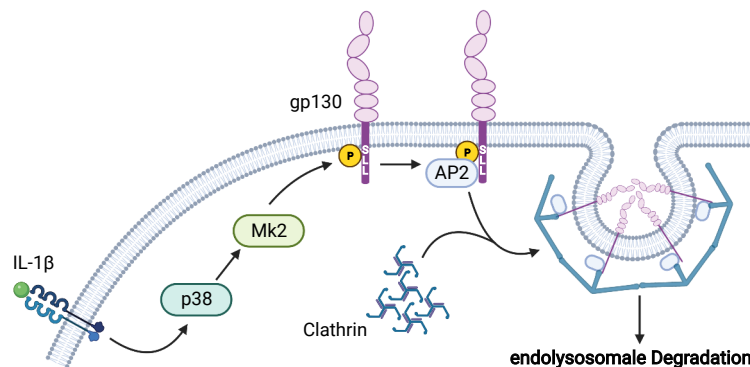


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der *Crosstalk*-induzierten gp130-Endozytose: Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β induzieren über die Aktivierung von p38 und Mk2 die Phosphorylierung von gp130 an Serin_{780,782}. Das Adapterprotein 2 (AP2) leitet über durch die Bindung an das membrandistale Dileucin-Motiv die Clathrin-vermittelte endolysosomale Rezeptordegradierung ein. Modifiziert nach *Hergovits* [51].

Obwohl das Grundprinzip der Zytokinrezeptorendozytose seit langem bekannt ist und auch die Internalisierungsmechanismen anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF- α entschlüsselt werden konnten, bleibt die *in vivo*-Relevanz der gp130-Endozytose für IL-6-vermittelte Signale sowie für die Zellfunktion und -differenzierung bisher unklar [52]. Neuere Untersuchungen an HeLa-Zellen ergaben, dass endozytisiertes gp130 von den Lysosomen aus wieder an die Zelloberfläche recycelt werden kann; dieser Prozess wird durch die Präsenz von IL-6 gefördert [33]. Daraus ergibt sich die Frage, ob die gp130-Endozytose nicht eher modulierend auf IL-6-vermittelte Signale wirkt anstatt diese primär negativ zu regulieren.

1.2.2 Die gp130^{LLAA}-Maus: ein *knock-in*-Modell zur Suppression der gp130-Endozytose

Zur Untersuchung der *in vivo*-Bedeutung des gp130-Internalisierungsmotivs wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Heike Hermanns die Mauslinie C57BL/6-TgHll6st^{L784A/L785A1Hema} (im weiteren gp130^{LLAA} genannt) als *knock-in*-Modell der Suppression der gp130-Endozytose generiert. Zwei Punktmutationen im Dileucin-Motiv L_{784,785} zu Dialanin führen tatsächlich auf allen bisher untersuchten Zellen zu einer erhöhten gp130-Zelloberflächenexpression und zu verminderter *Crosstalk*-induzierter gp130-Endozytose [51]. Unter homöostatischen Bedingungen unterschieden sich gp130^{LLAA}-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) nicht hinsichtlich der Lebensdauer, des Körpergewichts, der Leber- und Darmmorphologie sowie der Thrombozytenfunktion [unpublizierte Daten]. Allerdings fielen in ersten Untersuchungen eine leicht veränderte Herzarchitektur mit einer rechtsventrikulären Dysfunktion sowie eine veränderte Zusammensetzung der Immunzellen in den Lymphknoten und der Milz auf; eine weitergehende Untersuchung dieser Befunde steht aus.

1.3 Murine Knochenmarksmakrophagen

1.3.1 Makrophagen

MΦ entstehen aus der gemeinsamen myeloischen Vorläuferzelle (*common myeloid progenitor*) und wirken durch Rezeptoren (*pattern recognition receptors*) für Mikrobenbestandteile (*microbial associated molecular patterns*) als Sensorzellen des angeborenen Immunsystems [94]. So exprimieren MΦ den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4), der bakterielles LPS erkennt und durch die Aktivierung des NFκB-Signalwegs die Genexpression von Chemokinen sowie von proinflammatorischen Zytokinen und Transkriptionsfaktoren induziert (Abb. 1.1) [57, 45]. Als Teil der *first line of defense* phagozytieren MΦ Mikroorganismen sowie infizierte Zellen und sezernieren Entzündungsmediatoren wie IL-6 [89, 133, 74]. Als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität präsentieren MΦ über MHC-Klasse-II-Moleküle (*major histocompatibility complex*) CD4⁺ T-Zellen Antigene; dabei wirken CD80 und CD86 als Kostimulatoren der T-Zell-Aktivierung (Abb. 1.5) [101, 3]. Aufgrund der erhöhten Konzentration lysosomaler Proteasen werden internalisierte Proteine in MΦ schneller abgebaut als in dendritischen Zellen (DZ); dies limitiert die Antigenpräsentation zeitlich [24]. Aktivierte CD4⁺ Typ 1-T-Helferzellen (T_H1) sezernieren das Zytokin Interferon-γ (IFN-γ), das wiederum MΦ JAK/STAT-vermittelt aktiviert und deren bakterizide Eigenschaften verstärkt [93, 123].

1.3.2 IL-6 in Makrophagen

Während der akuten Entzündungsreaktion reguliert IL-6 die Leukozytenrekrutierung und leitet den Übergang von einer neutrophilen zu einer mononukleären Zellpopulation ein [65]. IL-6 wird unter inflammatorischen Bedingungen hauptsächlich durch Monozyten und MΦ produziert [36]. Gleichzeitig reagieren MΦ selbst auf IL-6 als Stimulus, sodass die IL-6-vermittelte autokrine MΦ-Stimulation zu einer Amplifikation inflammatorischer Signale führt [15].

In humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) fördert IL-6 die Differenzierung zu MΦ und hemmt die Differenzierung zu DZ [14, 92]. Während die IL-6-Produktion selbst als Charakteristikum proinflammatorischer, mikrobizider MΦ gilt, führt die Stimulation mit IL-6 in MΦ, die zuvor mit Interleukin-4 und Interleukin-13 ausgereift wurden, zu einer

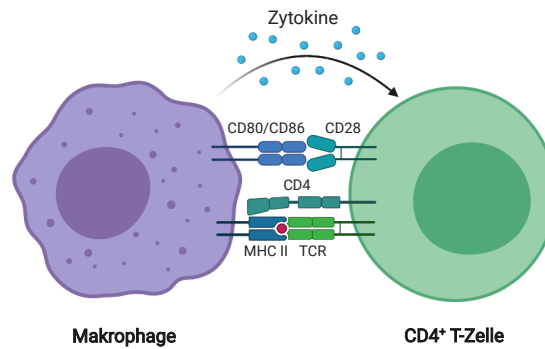


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Interaktion von Makrophagen und CD4⁺ T-Zellen: Makrophagen präsentieren über MHC-Klasse-II-Moleküle Antigene, die über den T-Zell-Rezeptor (TCR) eine T-Zell-Aktivierung initiieren. Die kostimulierende Bindung von CD80 oder CD86 an CD28 ist ein Überlebenssignal für die T-Zelle; Zytokine wirken als Differenzierungssignale. Modifiziert nach *Iwasaki et Medzhitov* [62].

Verstärkung des antiinflammatorischen Phänotyps und unterstützt so die Gewebereparatur [31]. Auch bei Infektionen mit *Trypanosoma cruzi*, dem Erreger der Chagas-Krankheit, induziert IL-6 in kardialen MΦ einen antiinflammatorischen Phänotyp und reduziert die schädliche, IL-1β-vermittelte NO-Produktion [113]. Darüber hinaus gibt es in der Literatur kaum Untersuchungen zum Einfluss von IL-6 auf den MΦ-Phänotyp im Rahmen der akuten Inflammation, der Fokus liegt bisher vielmehr auf der Wirkung von IL-6 auf MΦ bei chronischen Erkrankungen. So ergaben Untersuchungen an Modellen verschiedener solider Tumoren, dass IL-6 die Entstehung Tumor-assoziiertes Makrophagen (TAM) fördert, deren Auftreten mit Immunsuppression, Progress der Tumorerkrankung und Therapieresistenz assoziiert ist [13, 47, 34, 104].

MΦ, die aus der Milz und aus Lymphknoten von gp130^{LLAA}-Mäusen isoliert wurden, exprimieren fünfmal so viel gp130 und doppelt so viel IL-6Rα auf der Zelloberfläche wie MΦ aus WT-Mäusen [51]. Untersuchungen an dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark (KM-DZ) zeigen, dass IL-6-*trans-Signaling* durch Dileucin-abhängige gp130-Endozytose reguliert wird, nicht jedoch klassisches IL-6-*Signaling* [51].

Das Exopyrogen LPS induziert durch Zytokin-*Crosstalk* die Endozytose des Signaltransduktors gp130. Dabei ist der Mechanismus der gp130-Endozytose in myeloischen Zellen nicht uniform: In KM-DZ induziert LPS die gp130-Endozytose unabhängig von p38 und der Expression des Dileucin-Internalisierungsmotivs, in Vorarbeiten an M-CSF-ausgereiften murinen Knochenmarksmakrophagen (KM-MΦ) hingegen zeigte sich eine Regulierung der gp130-Oberflächenexpression durch p38- und Dileucin-abhängige Rezeptorendozytose [51]. Auch IFN-γ, ein zentrales Molekül in der Interaktion zwischen MΦ und T-Zellen, induziert in Stammzellen der Zahnpulpa p38-abhängig die gp130-Endozytose [144]. Die Regulierung der gp130-Expression auf MΦ durch IFN-γ wurde bisher jedoch noch nicht untersucht.

1.3.3 Murine KM-MΦ: ein Primärzellkulturmodell

Während sich organspezifische geweberesidente MΦ bereits während der Embryogenese entwickeln, migrieren im Blut zirkulierende Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen ins Gewebe und differenzieren erst dort zu MΦ aus [111, 56]. Da nicht-geweberesidente MΦ nicht im Knochenmark gebildet werden oder im peripheren Blut zirkulieren, ist eine Kultivierung nur durch Ausreifung aus Monozyten möglich. Ein etabliertes Modell ist die Primärzellkultur

aus murinem Knochenmark, bei der monozytäre Zellen durch Stimulation mit Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) und M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor) zu adhären, CD11b⁺ MΦ ausreifen [10, 73]. Unter physiologischen Bedingungen wirkt M-CSF primär als hämatopoetischer Wachstumsfaktor, der die Differenzierung von Knochenmarksvorläuferzellen, Monozyten und MΦ induziert [131]. GM-CSF hingegen ist für die reguläre Myelopoese entbehrlich und bewirkt stattdessen als proinflammatorisches Zytokin die Aktivierung mononukleärer Zellen [7].

Der Versuch, das Paradigma der proinflammatorischen T_H1-Zellen und der homöostatischen T_H2-Zellen auf MΦ zu übertragen und diese abhängig vom Zytokinstimulus in M1 und M2 zu klassifizieren, scheitert am dynamischen Phänotyp der MΦ [95]. Auf einem kontinuierlichen Spektrum stellen GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-MΦ extreme Phänotypen da, wobei GM-CSF-ausgereiften KM-MΦ eher proinflammatorische, M-CSF-ausgereiften KM-MΦ dagegen eher homöostatische Eigenschaften aufweisen [131].

In der Literatur gibt es bisher jedoch keine vergleichende Charakterisierung der gp130- und IL-6Rα Expression auf GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-MΦ, noch ist die Regulierung der Rezeptorexpression durch Dileucin-abhängige gp130-Endozytose und die Auswirkung derselben auf die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs untersucht. Ob die *Crosstalk*-induzierte gp130-Endozytose in GM-CSF-ausgereiften KM-MΦ durch das Dileucin-Internalisierungsmotiv vermittelt wird, ist bisher nicht bekannt. Für M-CSF-ausgereifte KM-MΦ liegen die bereits genannten unpublizierten Daten vor, die zumindest für LPS einen p38- und Dileucin-abhängigen gp130-Endozytosemechanismus aufzeigen.

MΦ sind professionelle Antigen-präsentierenden Zellen. GM-CSF-ausgereifte KM-MΦ exprimieren mehr MHC Klasse II-Moleküle auf der Zelloberfläche als M-CSF-ausgereifte KM-MΦ bei ähnlicher CD86-Expression [8, 90, 30]. Zahlreiche Studien konnten die Induktion der MHCII- und CD86-Expression auf MΦ durch LPS und IFN-γ dokumentieren [110, 81, 138]. Ob die MHCII- und CD86-Expression und somit das Antigenpräsentationspotential auf GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-MΦ durch gp130-Endozytose reguliert wird, ist nicht bekannt.

1.4 Zielsetzung

IL-6 ist ein zentrales Kommunikationsmolekül inflammatorischer Prozesse, das als Teil der angeborenen Immunantwort insbesondere durch MΦ sezerniert wird und auch autokrin auf diese wirkt. IL-6-vermittelte Signale können durch *Crosstalk*-induzierte, Dileucin-abhängige gp130-Endozytose beeinflusst werden. Die Bedeutung des gp130-Internalisierungsmotivs für die Qualität und Quantität IL-6-vermittelter Signale in KM-MΦ sowie für die Interaktion der MΦ mit anderen Immunzellen ist jedoch unklar.

Ziel dieser Arbeit ist eine Charakterisierung muriner GM-CSF- und M-CSF-ausgereifter KM-MΦ hinsichtlich der Relevanz des gp130-Internalisierungsmotivs für IL-6-vermittelte-Signale und für das Antigenpräsentationspotential unter Berücksichtigung des *Crosstalks* durch LPS und IFN-γ. In der Zusammenschau der Literatur ergeben sich diesbezüglich folgende Hypothesen:

1. IL-6-vermittelte Signale in KM-MΦ sind zeitlich begrenzt und induzieren über den JAK-STAT-Signalweg primär eine STAT3-Aktivierung.
2. IL-6-*trans*-*Signaling* wird in KM-MΦ durch Dileucin-abhängige gp130-Endozytose reguliert, nicht jedoch klassisches IL-6-*Signaling*.

3. LPS und IFN- γ regulieren IL-6-vermittelte Signale in KM-M Φ durch Dileucin-vermittelte gp130-Endozytose.
4. GM-CSF ausgereifte KM-M Φ besitzen stärkere antigenpräsentierende Eigenschaften als M-CSF ausgereifte KM-M Φ . Stimulation mit LPS oder IFN- γ fördert das Antigenpräsentationspotential der KM-M Φ .

2 Material

2.1 Chemikalien

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Wasser aus dem Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem angesetzt und bei Verwendung in der Zellkultur autoklaviert.

30 % Acrylamid (37,5:1)	AppliChem, Darmstadt
Albumin Fraktion V (pH 7,0)	AppliChem, Darmstadt
6-Aminohexansäure	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	AppliChem, Darmstadt
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolut für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycin	AppliChem, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol <i>BioChemica</i>	AppliChem, Darmstadt
<i>Midori Green Advance DNA Stain</i>	Nippon Genetics, Düren
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	AppliChem, Darmstadt
Nukleasefreies H ₂ O	Roth, Karlsruhe
2-Propanol für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
<i>Rotiphorese® 50 x Tris-Acetat-EDTA-Puffer</i>	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl), rauchend (37 %)	Roth, Karlsruhe
20 % SDS	AppliChem, Darmstadt
SDS ultrapure	AppliChem, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Tris	AppliChem, Darmstadt
Tween®20 für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt
Universalagarose <i>peqGOLD</i>	Peqlab, Erlangen

2.2 Kits

<i>Clarity™ Western ECL Substrate Kit</i>	BioRad, München
<i>MyTaq™ Extract-PCR Kit</i>	Bioline, London
<i>NucleoZol</i>	Macherey-Nagel, Düren

2.3 Verbrauchsmaterialien

<i>Amersham HybondTM</i> PVDF Membran 0.45 µm	GE Healthcare, München
<i>Cell Scraper</i> 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht
<i>CELLSTAR®</i> Polypropylen Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>CELLSTAR®</i> Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
<i>KIMTECH®</i> Cellulose-Präzisionswischtücher	Kimberly-Clark, Koblenz
<i>CountessTM</i> Cell Counting Chamber Slides	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Carlsbad (CA)
<i>EASYstrainerTM</i> 70 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filtertips	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotestplatten 96 well	Sarstedt, Nümbrecht
<i>NEOJECT®</i> Ultradünnwandkanülen 20G	Dispomed, Gelnhausen
<i>Parafilm®</i>	Pechiney, Menasha (WI)
<i>Peha-soft® nitrile</i> Handschuhe	Hartmann, Heidenheim
PCR-SoftTubes 0,2 ml	Biozym, Wien (A)
Petrischalen 10 cm	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Probenröhre, <i>flow cytometry</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Reagiergefäße (0,5 mL/1,5 mL/2,0 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubgefäße 1,5 mL	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Platten, Standard F (6 well/12 well)	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Schalen, Standard (60/100)	Sarstedt, Nümbrecht
<i>WhatmanTM</i> Blottingpapier 3 mm	GE Healthcare, München

2.4 Zellkultur: Nährmedien und Reagenzien

<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma Aldrich (jetzt: Merck KGaA) Darmstadt
Fetales bovines Serum <i>FBS Superior</i>	Biochrom GmbH , Berlin
L-Glutamin Solution (200 nM)	Gibco, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin 100 x	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 Medium, <i>no glutamine</i>	Gibco, Karlsruhe
<i>StemProTM AccutaseTM</i>	Gibco, Karlsruhe
<i>Trypan Blue Stain</i> 0,4%	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Karlsruhe

2.5 Stimulantien

Stimulans	Konzentration	Hersteller
Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF)	10 %	Überstand aus XG3-Ag8653-Zellkultur
Hyper-Interleukin-6 (hyper-IL-6)	1,5 - 30 ng/mL	zur Verfügung gestellt von Dr. D. Floss, Düsseldorf
Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O127:B8 (LPS)	100 ng/mL	zur Verfügung gestellt von Prof. M. Lutz, Würzburg
Monozytenkolonien-stimulierender Faktor (M-CSF)	10 %	Überstand aus L929-Zellkultur
rekombinantes murines Interferon- γ (IFN- γ)	500 u/mL	PeproTech, Hamburg
rekombinantes murines Interleukin-6 (IL-6)	0,5 - 50 ng/mL	PeproTech, Hamburg

2.6 Inhibitoren

Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Roth, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (jetzt: Merck KGaA), Darmstadt
Pepstatin A	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Roth, Karlsruhe

2.7 Antikörper

2.7.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Alle Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden von eBioscience (Frankfurt a. M.) bezogen und in FACS-Puffer verdünnt.

Spezifität	Isotyp	Klon	Konzentration
CD11b PerCP-Cy5.5	Ratte, IgG2b, α	M1/70	1:300
CD16/CD32	Ratte, IgG, λ	93	1:200
CD86 APC	Ratte, IgG2a, α	GL1	1:300
CD126 (IL-6-R α) PE	Ratte, IgG2b	D7715A7	1:150
CD130 (gp130) PE	Ratte, IgG2a, α	KGP130	1:150
MHCII eFluor450	Ratte, IgG2b, α	M5/114.15.2	1:300

2.7.2 Antikörper für Western Blot

Spezifität	Klon	Wirtspezies	Konzentration	Hersteller
Anti-ph-STAT1 (Y ₇₀₁)	D4A7	Kaninchen	1:1000	CST ¹
Anti-STAT1	pk	Kaninchen	1:2000	CST ¹
Anti-ph-STAT3 (Y ₇₀₅)	D3A7	Kaninchen	1:2000	CST ¹
Anti-STAT3	124H6	Maus	1:2000	CST ¹
Anti- α -Tubulin	DM1A	Maus	1:10000	Abcam ²
Anti- α -Tubulin	B512	Maus	1:5000	Sigma Aldrich ³
Anti-Biotin IgG-HRP		Ziege	1:4000	CST ¹
Anti-Maus IgG-HRP		Pferd	1:4000	CST ¹
Anti-Kaninchen IgG-HRP		Ziege	1:4000	CST ¹

2.8 Proteinmarker

Proteinmarker	Hersteller
Biotinylated Protein Ladder	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.
PageRuler™ Plus Prestained Protein Marker	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards	Bio-Rad, München
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe

2.9 Primer

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt.

Primer	Sequenz (5' → 3')	Funktion
NeoF4n	TAT AGA TCT CTC GTG GGA TC	<i>forward</i> -Primer gp130 ^{LLAA}
genoF1	GCC AGA AGA CCT GCA GCT GGT G	<i>forward</i> -Primer gp130-WT
3fR1n	AGC TGA ACG ATG CCA TGA CAT TG	<i>reverse</i> -Primer

¹Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M.

²Cambridge (GB)

³(jetzt: Merck KGaA), Darmstadt

2.10 Geräte

Accu-Jet® Pro Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
AE2000 Inversmikroskop	Motic, Barcelona (E)
BD FACS Canto II™	BD Biosciences, Heidelberg
Biometra Multigel	Analytik Jena, Jena
BioRad Chemi Doc™ MP <i>Imaging System</i>	Bio-Rad, München
<i>Centrifuge</i> 5424 und 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Ecoline RE 106/E 100 Wasserbad	LAUDA, Lauda-Königshofen
Einkanalpipetten	Brand, Wertheim
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Electrophoresis Power Supply	Consort, Turnhout (BE)
EVE™ <i>Automatic Cell Counter</i>	NanoEnTek, Guro-gu (Korea)
EVOS™ XL core (<i>digital inverted microscope</i>)	PeqLab, Erlangen
FE20 - FiveEasy™ pH-Sensor	Mettler-Toledo, Giessen
Hamilton® Mikroliterspritze (50 µl)	Bonduz (CH)
Heracell 150i Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
HeraSafe Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Heraeus Biofuge Primo R	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Heraeus HERAfreeze, -80°C freezer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Vacuboy Absaughilfe	INTEGRA Biosciences, Biebertal
Kühlgeräte (4°C, -20°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
Labormikrowelle	Siemens, Erlangen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Milli-Q® Direct Wasseraufbereitungssystem	Merck Millipore (Merck KGaA), Darmstadt
MiniSpin® Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Ofen MHR-23	HLC Biotech, Boyenden
PeqStar 96 Universal Gradient Thermocycler	PeqLab, Erlangen
<i>SemiDry Blotting Chamber</i>	PeqLab, Erlangen
<i>Shake n stack</i> Hybridisierungsöfen	MWG-Biotech, Ebersberg
SMZ 168 Auflichtmikroskop	Motic, Barcelona (E)
Stuart™ See-Saw Rocker	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries, Schwerte
Wasserbad	Memmert, Schwabach

2.11 Mausstämme

Stamm	Herkunft	Bezeichnung im weiteren Verlauf
C57BL/6J	Janvier, Saint-Berthevin (FR)	Wildtyp (WT)
C57BL/6J	Rückkreuzung/Eigenzucht	Wildtyp (WT)
C57BL/6-TgHII6st ^{L784A/L785A1Hema}	Eigenzucht	gp130 ^{LLAA}

Die transgene Mauslinie C57BL/6-TgHII6st^{L784A/L785A1Hema} wurde von Dr. Christine Mais in der Arbeitsgruppe Hermanns nach Genehmigung durch die Regierung von Unterfranken (Aktenzeichen: 55.2-2531.01-21/10) generiert. Alle Versuchstiere wurden in den Tierhaltungen des Rudolf-Virchow-Zentrums und des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin der Universität Würzburg unter Standardbedingungen (Standardfutter und Wasser *ad libitum*, Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden) gehalten. Die Tötung zur Organentnahme erfolgte durch CO₂-Inhalation und zervikale Dislokation.

2.12 Software

BioRender
FACSDiVa v6.1.1
FlowJo™ v10.6.2
Image Lab 5.2.1
Nanodrop2000
Prism6

BioRender, Toronto (Kanada)
BD Biosciences, Heidelberg
TreeStar Inc., Ashland (USA)
Bio-Rad, München
Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe
GraphPad, San Diego (CA)

3 Methoden

3.1 Methoden der Zellbiologie

Alle Arbeiten im Zellkulturlabor wurden gemäß den Richtlinien der *Good Scientific Cell Culture Practice* unter einer Sterilbank durchgeführt [16]. Medien und Lösungen wurden vor dem Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

3.1.1 Isolation des murinen Knochenmarks

Die Isolation des murinen Knochenmarks erfolgte nach dem Protokoll von *Amend et al* [1]. Das Knochenmark wurde in 20 mL Kulturmedium resuspendiert und über ein 70 µm-Zellsieb passagiert. Die Konzentration vitaler Zellen in der Knochenmarksuspension wurde mit dem EVE™ *Automatic Cell Counter* durch eine 0,4 % Trypan-Blau-Färbung nach Herstelleranweisung bestimmt.

3.1.2 Kultivierung von KM-MΦ

PBS (pH 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄

Kulturmedium: RPMI 1640, 10 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % P/S, 50 µM 2-Mercaptoethanol

Hungermedium: RPMI 1640, 1 % FBS, 1 % L-Glutamin, 1 % P/S, 50 µM 2-Mercaptoethanol

Die Kultivierung muriner KM-MΦ basierte auf den Protokollen von *Inaba et al.*, *Lutz et al.* und *Assouvie et al.* sowie eigenen Modifikationen [61, 83, 2]. Knochenmarkszellen wurden an Tag 0 in Kulturmedium, das entweder mit 10 % GM-CSF- oder mit 10 % M-CSF-haltigem Zellkulturüberstand versetzt wurde, auf 6 cm-Platten ($7,5 \times 10^5$ Zellen in 3 mL Kulturmedium) und 6 *well*-Platten (3×10^5 in 2 mL/*well*) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre kultiviert. An Tag 3 wurde pro Platte bzw. *well* die gleiche Menge GM-CSF- oder M-CSF-versetztes Kulturmedium zugegeben wie an Tag 0. An Tag 6 wurde von allen Platten die Hälfte des Mediums abgenommen und durch die gleiche Menge GM-CSF- oder M-CSF-versetztes Kulturmedium ersetzt; an Tag 8 wurde dieser Mediumwechsel auf den 6 cm-Platten wiederholt.

3.1.3 Behandlung mit Stimulantien

Die auf 6 cm-Platten ausgereiften adhärennten Zellen wurden nach dem Mediumwechsel an Tag 8 für 24 Stunden mit 100 ng/mL LPS oder 500 u/mL IFN-γ stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Von den 6 *well*-Platten wurde an Tag 8 das Medium abgenommen und durch 2 mL/*well* Hungermedium ersetzt. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden wurden die KM-MΦ mit IL-6 oder hyper-IL-6 stimuliert. Aus den adhärennten Zellen der 6 *well*-Platten wurden Zellsate zur proteinbiochemischen Analyse hergestellt.

3.1.4 Zelloberflächenfärbung

FACS-Puffer: PBS, 5% FBS, 1 mM EDTA

Die KM-M Φ wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit Accutase™ nach Herstelleranweisung von den 6 cm-Platten gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 mL-Röhrchen mit 4 mL PBS überführt und die Zellkonzentration mit dem EVE™ *Automatic Cell Counter* bestimmt. Die KM-M Φ wurden zentrifugiert (5 min, 300 * g, 4 °C) und das Zellpellet nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer in einer Konzentration von 5 * 10⁵ Zellen/200 μ L in FACS-Puffer resuspendiert.

In eine 96 well-Rundbodenplatte wurden 200 μ L/well Zellsuspension gegeben. Zur Unterbindung unspezifischer Bindungen der fluorophorgekoppelten Antikörper an Fc-Rezeptoren wurden die Zellen nach dem Zentrifugieren (10 min, 280 ref, 4 °C) in 50 μ L anti-CD16/CD32-Lösung resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 150 μ L FACS-Puffer resuspendiert, zentrifugiert und in 50 μ L einer Lösung mit fluorophorgekoppelten Antikörpern gegen CD11b, MHCII, CD86 und CD126 oder CD130 resuspendiert. Nach 45-minütiger Inkubation auf Eis im Dunkeln wurden die KM-M Φ in 150 μ L FACS-Puffer resuspendiert, mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 200 μ L FACS-Puffer resuspendiert.

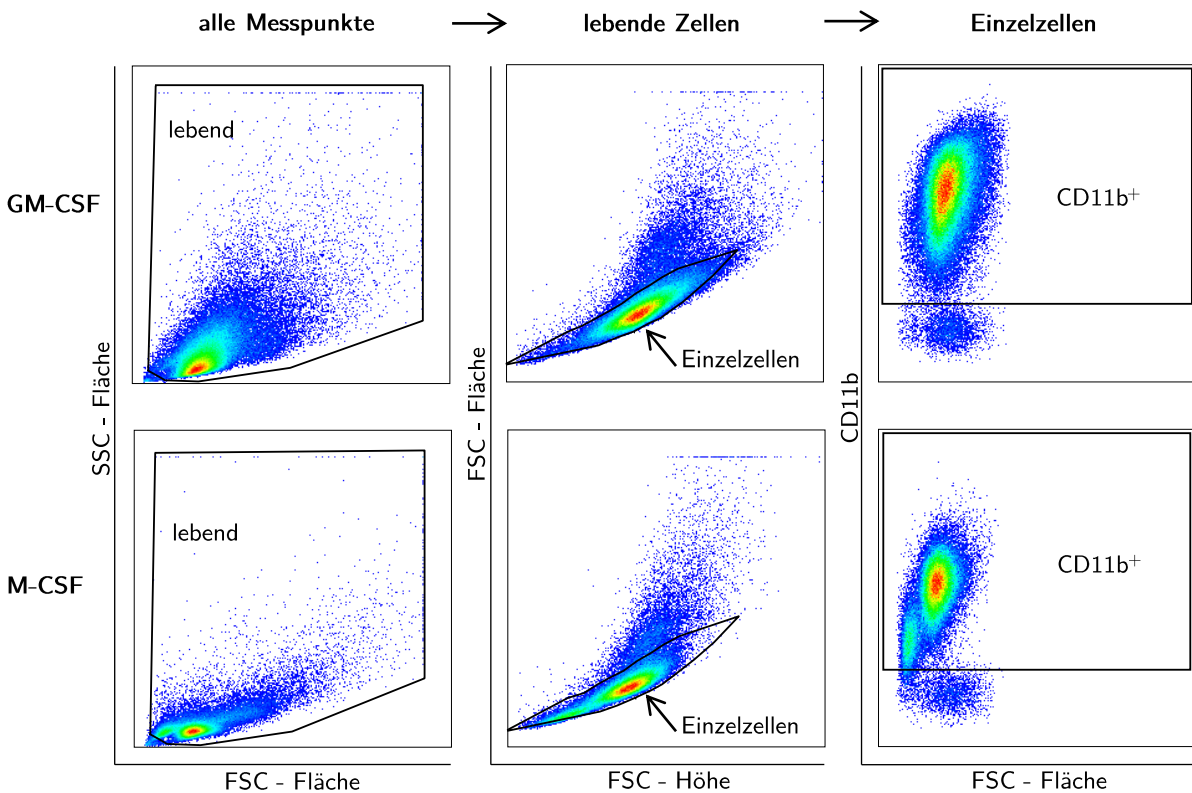


Abbildung 3.1: Durchflusszytometrische Identifizierung CD11b⁺ Zellen

3.1.5 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie sind die Parameter Vorwärtsstreulicht (*forward scatter channel*, FSC), Seitstreulicht (*side scatter channel*, SSC) und die Fluoreszenz fluorophorgekoppelter Antikörper Maß für die Zellgröße, die Zellgranularität und die Expression spezifischer Proteine [28, 17]. Vor der Messung der Proben am FACS Canto II™ mit der Software FACSDiVa wurden zunächst FSC und SSC durch die Messung von ungefärbten Zellen eingestellt. Im zweiten Schritt wurden die Fluoreszenzkanäle zur Verminderung der spektralen Überlappung durch die Messung von Einzelfärbungen für jedes Fluorophor eingestellt. Die Messung der Proben wurde automatisch durch FACSDiVa kompensiert. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten erfolgte mit Hilfe der Software FlowJo™. Dabei wurde die gp130- und IL-6R α -Zelloberflächenexpression lebender, einzelner, CD11b⁺ Zellen (Abb. 3.1) als Histogramm dargestellt und durch die Bestimmung des geometrischen Mittels der Fluoreszenzintensität quantifiziert. Zur Abbildung der MHCII- und CD86-Zelloberflächenexpression wurden bivariate *Contour Plots* gewählt.

3.2 Methoden der Proteinbiochemie

3.2.1 Herstellung der Zelllysate

Lysispuffer: 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM NaF, 1 % Triton X-100

Proteaseinhibitoren: 1 mM Na₃VO₄, 10 μ M Pepstatin A, 2 μ g/mL Leupeptin, 2 μ g/mL Aprotinin, 1 mM PMSF

Nach Stimulation mit IL-6 oder hyper-IL-6 wurden die KM-M Φ mit eiskaltem, mit 0,1 mM Natriumorthovanadat versetzten PBS gewaschen und mit 100 μ L eiskaltem, mit Proteaseinhibitoren versetzten Triton X-100-Lysispuffer permeabilisiert [91]. Vorsichtig wurden die KM-M Φ mit einem Zellschaber gelöst und die Zelllysate in Reaktionsgefäße überführt. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Zelllysate zweimal gevortext. Schließlich wurden die Proben zentrifugiert (15 min, *full speed*, 4°C). Der proteinhaltige Überstand wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4x Lämmli-Puffer: 0,25 M Tris (pH 6,8), 40 % Glycerin, 20 % β -Mercaptoethanol, 8 % SDS, 0,008 % Bromphenolblau

10% Trenngel: 2,1 mL H₂O, 2,5 mL 30 %-Acrylamid, 2,81 mL 1 mM Tris-HCl (pH 8,8), 37,5 μ L 20 % SDS, 37,5 μ L 20 % APS, 6 μ L TEMED

5% Sammelgel: 2,77 mL H₂O, 830 μ L 30 %-Acrylamid, 1260 μ L 1 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25 μ L 20 % SDS, 40 μ L 20 % APS, 5 μ L TEMED

10x Laufpuffer: 0,025 M Tris, 1,92 M Glycin, 0,035 M SDS

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) beruht auf den Arbeiten von Lämmli [77]. Vorbereitend wurden 16 μ L Zelllysate in 4 μ L 4x-Lämmli-Puffer suspendiert und anschließend zur Proteindenaturierung für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Pro Tasche wurden 24 μ L Probenvolumen aufgetragen und bei 300 V, 150 W und 25 mA in der Gelelektrophoresekammer aufgetrennt.

3.2.3 Western Blot

Anode I-Puffer: 0,3 M Tris, 20 % Methanol

Anode II-Puffer: 0,025 M Tris, 20 % Methanol

Kathodenpuffer: 0,040 M 6-Aminohexansäure, 20 % Methanol

Die Fixierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf einer Membran, der *Western Blot*, erfolgte als *Semi Dry Plot* in einer *Blotting*-Kammer der Firma PeqLab [75]. Dafür wurden vier Lagen Filterpapier in Anode I-Puffer gelegt und anschließend in der *Blotting*-Kammer geschichtet. Auf zwei Lagen Filterpapier in Anode II-Puffer wurde zuerst die mit Methanol aktiviert PVDF-Membran, dann das Elektrophoresegel gelegt. Die oberste Schicht bildeten vier Lagen Filterpapier in Kathodenpuffer. Der *Western Blot* lief bei 300 V, 150 W und 0,8 mA/cm² eine Stunden lang.

3.2.4 Immundetektion

10x TBST: 1,37 M NaCl, 0,2 M Tris, 1 % (v/v) Tween 20

Stripping Buffer (pH 6,7): 62,5 mM Tris, 2 % SDS, 100 mM β -Mercaptoethanol (frisch)

Die Membran wurde für 15 Minuten in 10 % BSA in TBST inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran einmal mit TBST gewaschen und über Nacht in 5 mL einer Lösung aus dem Primärantikörper in 5 % BSA in einer 50 mL-Röhre auf einem Rollschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran über 25 Minuten dreimal mit TBST gewaschen und dann für 2 Stunden in 12 mL einer Lösung aus dem Meerrettichperoxidase-gekoppelten Sekundärantikörper in TBST inkubiert. Als Chemilumineszenzsubstrat wurde das Kit Clarity™ Western ECL Substrate der Firma Bio-Rad im vom Hersteller angegebenen Verhältnis verwendet. Die Detektion erfolgte durch das Bildgebungssystem ChemiDoc und die Anwendung „Chemi High Sensitivity“ des Programms ImageLab. Zur erneuten Immundetektion wurde die Membran für 25 Minuten bei 70°C in *Stripping Buffer* inkubiert und danach über 10 Minuten zweimal in TBST gewaschen, bevor die zuvor beschriebenen Schritte wiederholt wurden.

3.2.5 Quantifizierung

Um die STAT-Aktivierung zu quantifizieren, wurde mit ImageLab eine densitometrische Analyse der Banden durchgeführt. Die Menge an phosphoryliertem Protein wurde auf das Gesamtprotein und die am stärksten phosphorylierte Probe normiert.

3.3 Methoden der Molekularbiologie

3.3.1 DNA-Isolation und Polymerase-Kettenreaktion

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde das MyTaq™ Extract-PCR Kit der Firma Bioline den Herstelleranweisungen entsprechend verwendet. Nach der Extraktion der DNA aus Ohrlochstanzen wurde der genetisch veränderte DNA-Abschnitt mittels Polymerase-Kettenreaktion in einem Thermocycler der Firma PeqLab amplifiziert [72, 112]. Die Amplifikation bestand aus 35 Zyklen Denaturierung (95°C für 15 s), *Annealing* (50°C für 15 s) und Elongation (72°C für 10 s).

3.3.2 DNA-Detektion

Die amplifizierten DNA-Proben wurden in einem 1 % Agarosegel, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Midori Green versetzt wurde, bei 200 V, 1000 mA und 150 W für 20 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Detektion und Dokumentation erfolgte am ChemiDoc durch die ImageLab-Anwendung „Nucleic Acid, Etidiumbromid“.

3.4 Statistische Auswertung und Diagramme

Zur Erstellung von Diagrammen und statistischen Auswertung wurde das Programm *GraphPad Prism* genutzt. In den Diagrammen werden, wenn nicht anders angegeben, arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Ergebnisse wurde der multiple t-Test durchgeführt; zur Korrektur einer Alphafehler-Kumulierung wurde die Holm-Šidák-Methode angewendet. Abweichungen von der Nullhypothese galten als signifikant, wenn für die Irrtumswahrscheinlichkeit p galt, dass $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$). Schematische Abbildungen wurden mit Hilfe der Online-Software *Biorender.com* erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen exprimieren mehr gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ

IL-6 bindet als Ligand an den IL-6R α und an den Signaltransduktor gp130. Um die Expression der IL-6-Rezeptoren auf murinen GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ zu vergleichen, wurden KM-M Φ aus 18 WT-Mäusen über 9 Tage mit GM-CSF oder M-CSF ausgereift. An Tag 9 wurde die Expression von gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche CD11b⁺ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

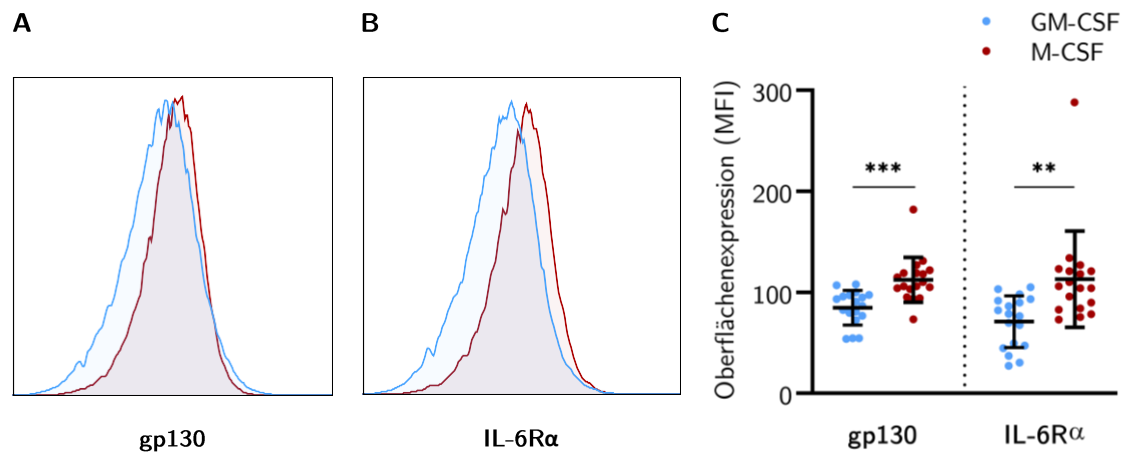


Abbildung 4.1: M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen exprimieren mehr gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ . Die Expression von (A, C) gp130 und (B, C) IL-6R α auf der Zelloberfläche GM-CSF- und M-CSF-ausgereifter KM-M Φ aus WT-Mäusen wurde an Tag 9 durchflusszytometrisch bestimmt. (A, B) Repräsentative Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Zytokinrezeptorexpression auf CD11b⁺ KM-M Φ einer WT-Maus. (C) Dargestellt sind mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Einzelmessungen und Mittelwerte mit Standardabweichung (SD); n=18.

M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen exprimierten signifikant mehr gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen (Abb. 4.1). Während die gp130-Expression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ das 1,3-fache der gp130-Expression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ betrug, war die IL-6R α -Expression M-CSF-ausgereifter KM-M Φ gegenüber jener der GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ sogar um den Faktor 1,6 erhöht.

4.2 IL-6 induziert in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen eine stärkere STAT1- und STAT3-Phosphorylierung als in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ

Die IL-6-vermittelte Dimerisierung des Signaltransduktors gp130 induziert die Phosphorylierung der Proteine STAT1 und STAT3 über den JAK-STAT-Signalweg. Um zu untersuchen, ob die erhöhte gp130- und IL-6R α -Expression M-CSF-ausgereifter KM-M Φ gegenüber GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ (Abb. 4.1) auch in einer stärkeren STAT-Aktivierung resultiert, wurden KM-M Φ aus WT-Mäusen an Tag 8 für 15 Minuten mit IL-6 in verschiedenen Konzentrationen (1-100 ng/mL) stimuliert. Mittels *Western Blot* wurde die STAT1-Phosphorylierung an Tyrosin 701 (Y₇₀₁) und die STAT3-Phosphorylierung an Tyrosin 705 (Y₇₀₅) analysiert. Diese Phosphorylierungen sind mit einer Aktivierung der Proteine assoziiert [116, 67].

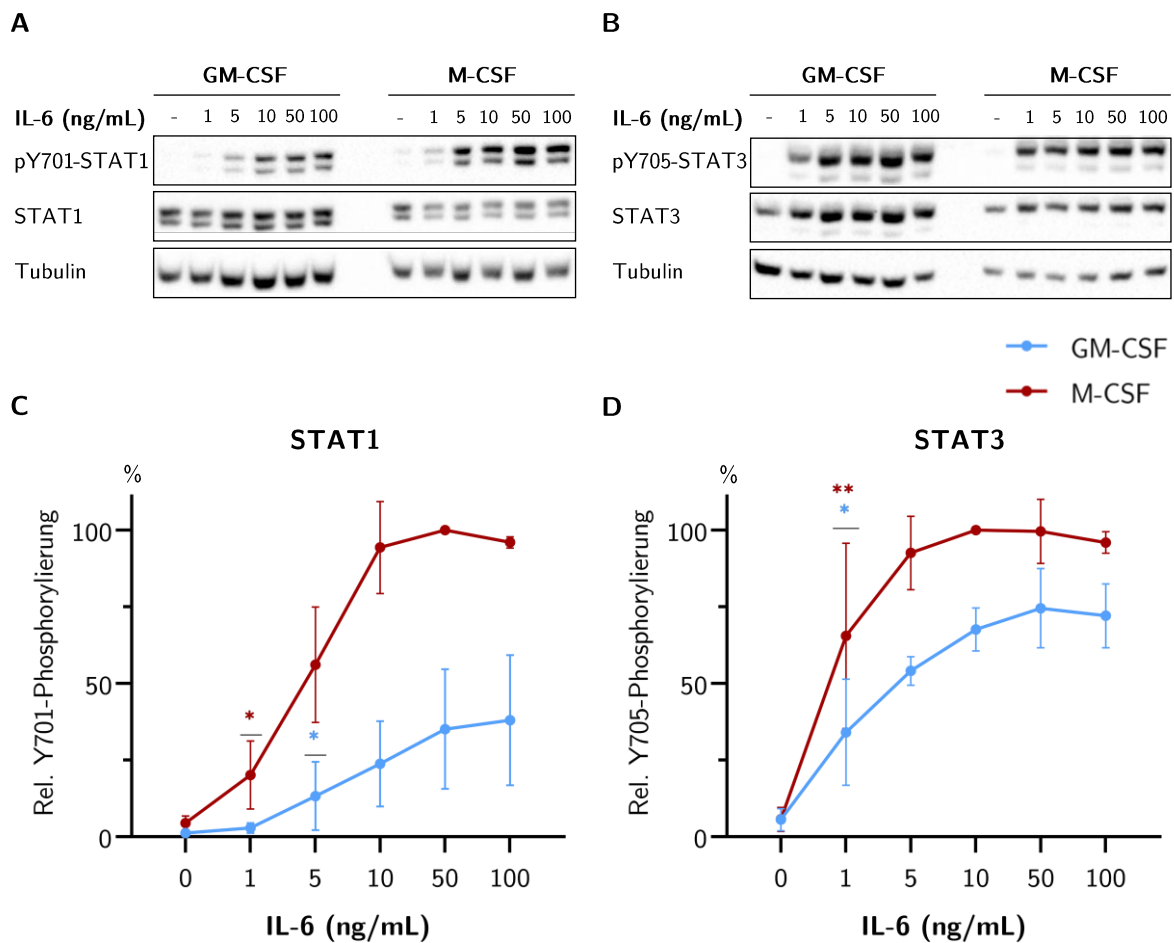


Abbildung 4.2: IL-6 induziert in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen eine stärkere STAT1- und STAT3-Phosphorylierung als in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ . GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen wurden an Tag 8 für 15 Minuten mit 1-100 ng/mL IL-6 stimuliert. Mittels SDS-PAGE und *Western Blot* wurden in Gesamtzelllysaten (**A**) pY₇₀₁-STAT1, STAT1, (**B**) pY₇₀₅-STAT3 und STAT3 detektiert; α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. (**C**, **D**) Dargestellt sind Mittelwerte der relativen STAT-Phosphorylierung (pSTAT/STAT) mit SD, markiert ist die niedrigste Konzentration mit signifikanter Abweichung zur unstimulierten Kontrolle; n=3.

15-minütige Stimulation mit IL-6 induzierte in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen eine konzentrationsabhängige Zunahme der STAT3-Phosphorylierung bis zu einer Konzentration von 10 ng/mL IL-6, in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ bis zu einer Konzentration von 50 ng/mL (Abb. 4.2B und D). Auch STAT1 wurde in KM-M Φ konzentrationsabhängig vermehrt phosphoryliert, allerdings wurde die halbmaximale Phosphorylierung erst bei höheren IL-6-Konzentrationen erreicht als bei STAT3 (Abb. 4.2A und C). Abgesehen von der STAT1-Phosphorylierung in GM-CSF ausgereiften KM-M Φ zeigte sich bereits bei der niedrigsten eingesetzten IL-6-Konzentration eine signifikant erhöhte STAT1- und STAT3-Phosphorylierung im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Insgesamt induziert IL-6 in M-CSF ausgereiften KM-M Φ eine stärkere STAT1- und STAT3-Phosphorylierung als in GM-CSF ausgereiften KM-M Φ . Bei einer IL-6-Konzentration von 10 ng/mL war die STAT1-Phosphorylierung M-CSF-ausgereifter KM-M Φ gegenüber jener GM-CSF-ausgereifter KM-M Φ 4,0-fach erhöht, während sich die STAT3-Phosphorylierung nur um den Faktor 1,4 unterschied.

4.3 IL-6-Signale induzieren in KM-M Φ aus WT-Mäusen nur eine kurzzeitige STAT1-Phosphorylierung

Die physiologische Induktion IL-6-vermittelter Signale im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion ist zeitlich begrenzt. Um zu ermitteln, ob sich der Zeitverlauf der IL-6-vermittelten STAT1- oder STAT3-Phosphorylierung zwischen GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ unterscheidet, wurden KM-M Φ aus WT-Mäusen an Tag 8 unterschiedlich lang (15 Minuten bis sechs Stunden) stimuliert. Da IL-6-Signale unter inflammatorischen Bedingungen auch über *trans-Signaling* vermittelt werden, wurden die KM-M Φ neben IL-6 auch mit hyper-IL-6, einem Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R α , in äquimolarer Konzentration stimuliert.

Unabhängig vom Stimulus war die STAT1- und STAT3-Phosphorylierung in GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen nach 15 Minuten am höchsten (Abb. 4.3A-D). Doch während die STAT1-Phosphorylierung nach einstündiger Stimulation mit IL-6 oder hyper-IL-6 wieder auf das Basalniveau abgefallen war, betrug die STAT3-Phosphorylierung auch nach sechs Stunden noch ein Viertel der maximalen Phosphorylierung. Bei Betrachtung der STAT-Phosphorylierung nach 15-minütiger Stimulation mit hyper-IL-6 zeigte sich, dass sowohl STAT1 als auch STAT3 in M-CSF-stimulierten KM-M Φ aus WT-Mäusen signifikant stärker phosphoryliert waren als in GM-CSF-stimulierten KM-M Φ : Die Y⁷⁰¹-Phosphorylierung von STAT1 betrug das 2,0-fache, die Y⁷⁰⁵-Phosphorylierung von STAT3 das 1,3-fache (Abb. 4.3E und F). Zudem induzierte IL-6 in M-CSF-stimulierten KM-M Φ eine signifikant erhöhte STAT1-Phosphorylierung im Vergleich zu hyper-IL-6 (Abb. 4.3E).

4.4 KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen exprimieren mehr gp130 auf der Zelloberfläche als KM-M Φ aus WT-Mäusen

IL-6-vermittelte Signale werden durch die Liganden- und *Crosstalk*-vermittelte gp130-Endozytose reguliert. Die gp130^{LLAA}-Maus ist ein *knock in*-Modell zur Suppression der gp130-Endozytose durch das Dileucin-Internalisierungsmotiv. Um die Auswirkung der gp130-Endozytose auf die IL-6-Zytokinrezeptorexpression in KM-M Φ zu untersuchen, wurde die gp130- und IL-6R α -Zelloberflächenexpression zwischen GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen und solchen aus gp130^{LLAA}-Mäusen durchflusszytometrisch verglichen.

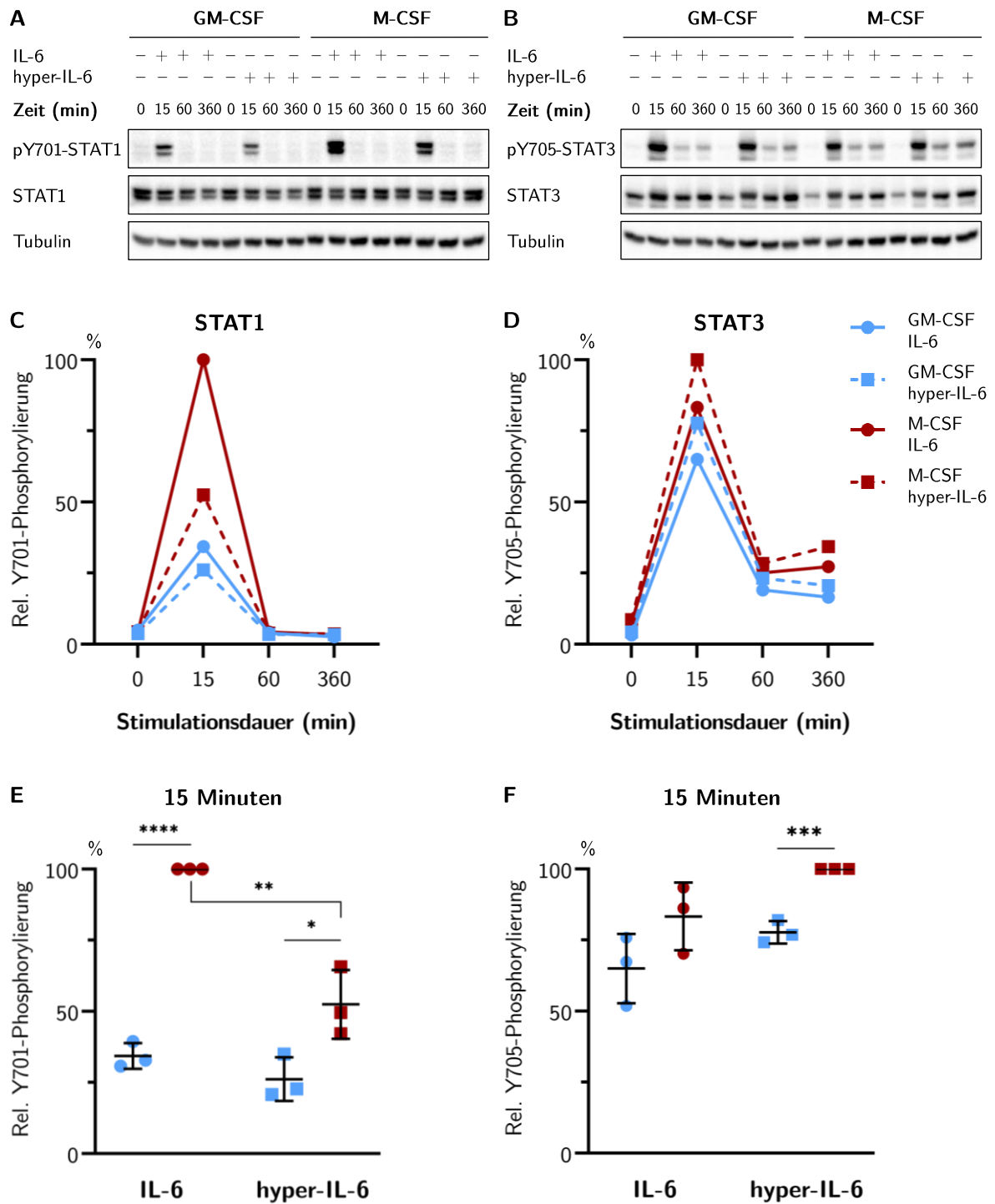


Abbildung 4.3: IL-6-Signale induzieren in KM-M Φ aus WT-Mäusen nur eine kurzzeitige STAT1-Phosphorylierung GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen wurden an Tag 8 für 15, 60 oder 360 Minuten mit 5 ng/mL IL-6 oder 15 ng/mL hyper-IL-6 stimuliert. Mittels SDS-PAGE und *Western Blot* wurden in Gesamtzelllysaten (A) pY₇₀₁-STAT1 und STAT1 sowie (B) pY₇₀₅-STAT3 und STAT3 detektiert; α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. (C, D) Dargestellt sind Mittelwerte der relativen STAT-Phosphorylierung (pSTAT/STAT) im Zeitverlauf mit SD. (E, F) Zur Differenzierung sind die Einzelmessungen und Mittelwerte mit SD bei einer Stimulationsdauer von 15 Minuten dargestellt; n=3.

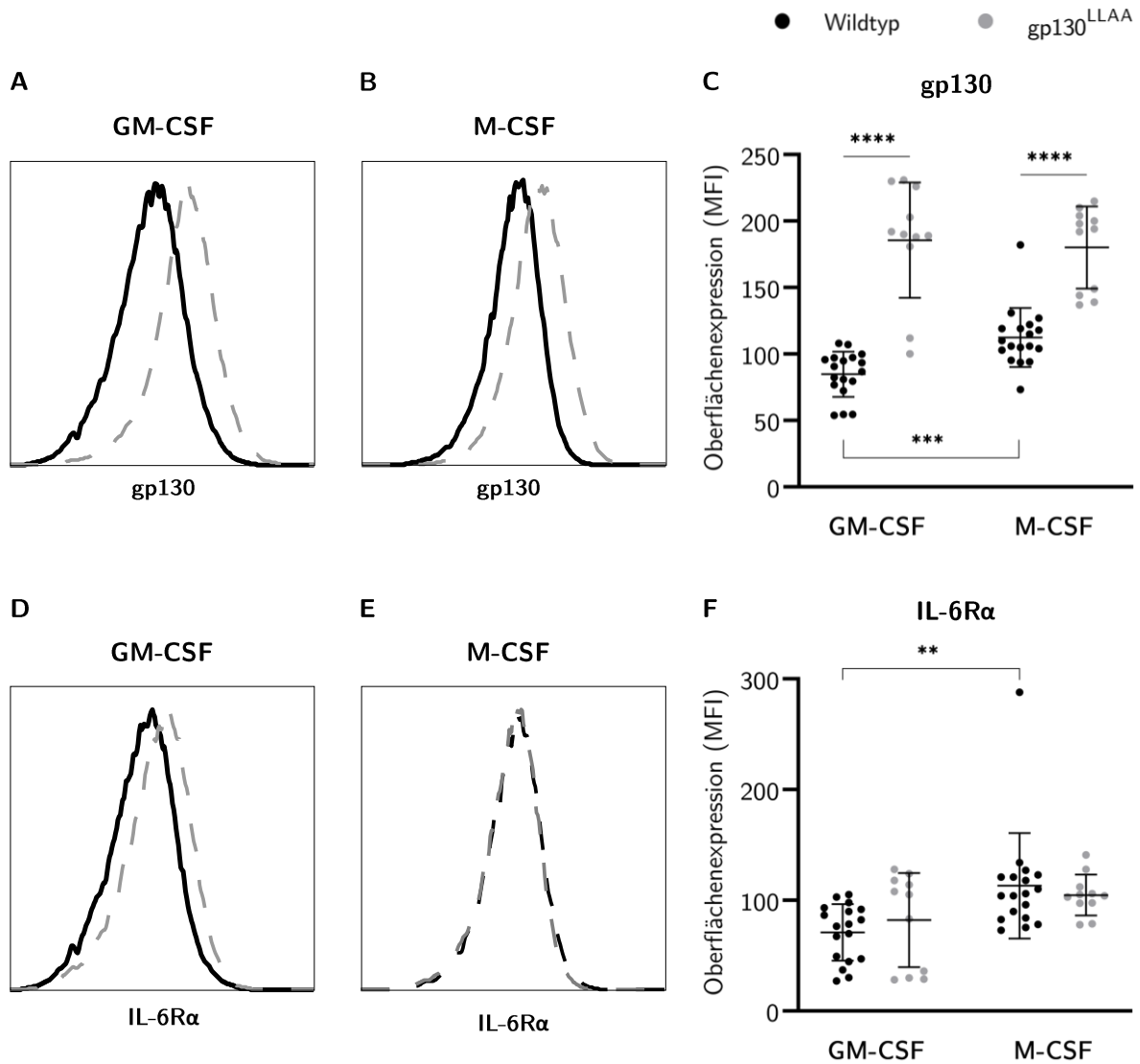


Abbildung 4.4: KM-MΦ aus gp130^{LLAA}-Mäusen exprimieren mehr gp130 auf der Zelloberfläche als KM-MΦ aus WT-Mäusen. Die Expression von (A-C) gp130 und (D-F) IL-6Rα auf der Zelloberfläche GM-CSF- und M-CSF-ausgereifter KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen wurde an Tag 9 durchflusszytometrisch bestimmt. (A, B, D, E) Repräsentative Darstellung der Häufigkeitsverteilung der Zytokinrezeptorexpression auf CD11b⁺ KM-MΦ einer WT-Maus und einer gp130^{LLAA}-Maus. (C, F) Dargestellt sind mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Einzelmessungen und Mittelwerte mit Standardabweichung (SD); WT: n=18; gp130^{LLAA}: n=11.

GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus gp130^{LLAA}-Mäusen exprimieren signifikant mehr gp130 auf der Zelloberfläche als KM-MΦ aus WT-Mäusen, aber ähnliche Mengen an IL-6Rα (Abb. 4.4). Im Gegensatz zu KM-MΦ aus WT-Mäusen unterscheidet sich die gp130- und IL-6Rα-Expression auf KM-MΦ aus gp130^{LLAA}-Mäusen nicht signifikant zwischen GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-MΦ (Abb. 4.4C und F).

4.5 Die IL-6-induzierte STAT1- und STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen

Beim klassischen IL-6-Signaling bindet IL-6 zunächst an den membrangebundenen IL-6R α und im zweiten Schritt an gp130. Um herauszufinden, ob aus der stärkeren gp130-Expression auf KM-MΦ aus gp130^{LLAA}-Mäusen im Vergleich zu KM-MΦ aus WT-Mäusen (Abb. 4.4C) eine stärkere Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs durch klassisches IL-6-Signaling resultiert, wurden GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen 15 Minuten lang mit IL-6 in verschiedenen Konzentrationen (0,5-10 ng/mL) stimuliert. Anschließend wurde mittels *Western Blot* die Y₇₀₁-Phosphorylierung von STAT1 sowie die Y₇₀₅-Phosphorylierung von STAT3 untersucht.

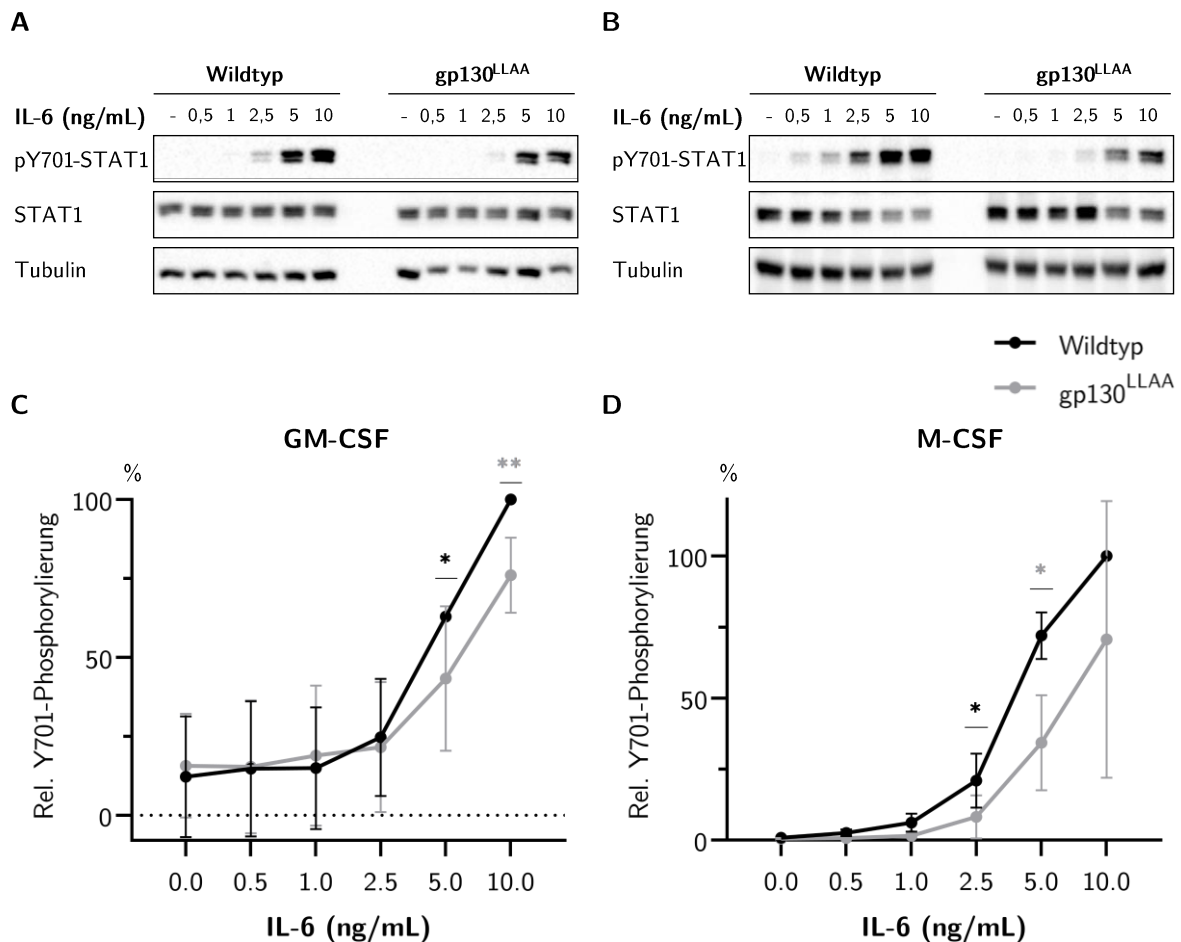


Abbildung 4.5: Die IL-6-induzierte STAT1-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen. (A) GM-CSF- und (B) M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen wurden an Tag 8 für 15 Minuten mit 0,5-10 ng/mL IL-6 stimuliert. Mittels SDS-PAGE und *Western Blot* wurden in Gesamtzelllysaten pY⁷⁰¹-STAT1 und STAT1 detektiert; α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. (C, D) Dargestellt sind Mittelwerte der relativen STAT1-Phosphorylierung (pSTAT1/STAT1) mit SD, markiert ist die niedrigste Konzentration mit signifikanter Abweichung zur unstimulierten Kontrolle; n=3.

Unabhängig von der Ausreifung mit GM-CSF und M-CSF, besteht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen kein signifikanter Unterschied in der IL-6-induzierten STAT1-Phosphorylierung (Abb. 4.5). Allerdings weisen KM-MΦ aus WT-Mäusen im Gegensatz zu solchen aus gp130^{LLAA}-Mäusen bereits bei niedrigeren IL-6-Konzentrationen eine signifikant erhöhte STAT1-Phosphorylierung im Vergleich zur unstimulierten Probe auf.

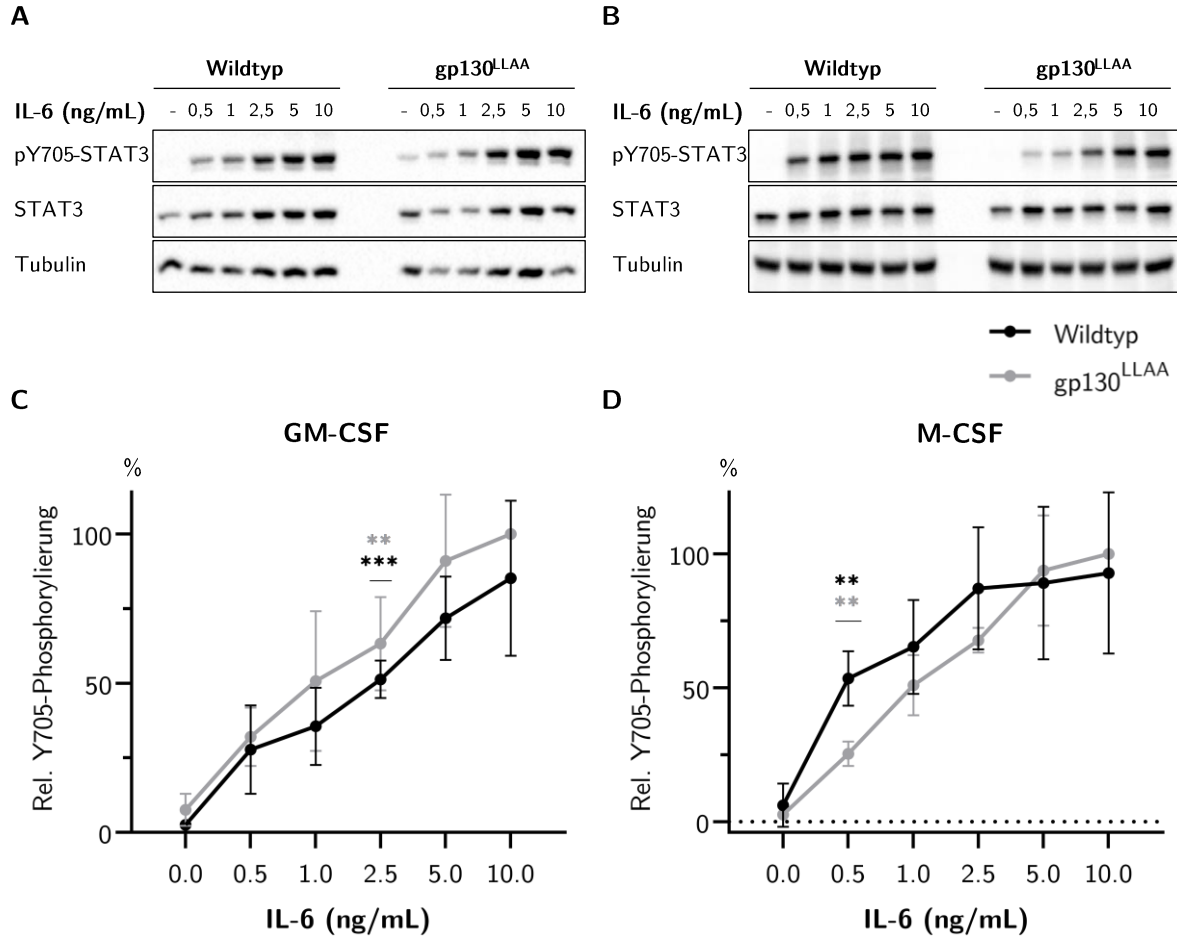


Abbildung 4.6: Die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen. (A) GM-CSF- und (B) M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen wurden an Tag 8 für 15 Minuten mit 0,5-10 ng/mL IL-6 stimuliert. Mittels SDS-PAGE und *Western Blot* wurden in Gesamtzelllysaten pY₇₀₅-STAT3 und STAT3 detektiert; α-Tubulin diente als Beladungskontrolle. (C, D) Dargestellt sind Mittelwerte der relativen STAT3-Phosphorylierung (pSTAT3/STAT3) mit SD, markiert ist die niedrigste Konzentration mit signifikanter Abweichung zur unstimulierten Kontrolle; n=3.

Die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung unterschied sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen; dies galt sowohl für GM-CSF- als auch für M-CSF-ausgereifte KM-MΦ (Abb. 4.6). Die niedrigste IL-6-Konzentration, bei der die STAT3-Phosphorylierung in GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-MΦ signifikant von der unstimulierten Probe abwich, war bei WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen gleich.

4.6 Hyper-IL-6 induziert die STAT1-Phosphorylierung in KM-MΦ aus gp130^{LLAA}-Mäusen stärker als in KM-MΦ aus WT-Mäusen

Beim IL-6-*trans-signaling* bindet ein Komplex aus IL-6 und sIL-6Rα direkt an gp130. Deswegen ist diese Form des IL-6-Signaling zwar von der gp130-Expression auf der Zelloberfläche abhängig, nicht aber von der Expression des membrangebundenen IL-6Rα. Um herauszufinden, ob die Dileucin-abhängige gp130-Endozytose die Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs durch IL-6-*trans-Signaling* reguliert, wurden GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-MΦ für 15 Minuten mit hyper-IL-6 in verschiedenen Konzentrationen (1,5-15 ng/mL) stimuliert. Mittels *Western Blot* wurde im Anschluss die Y₇₀₁-Phosphorylierung von STAT1 untersucht.

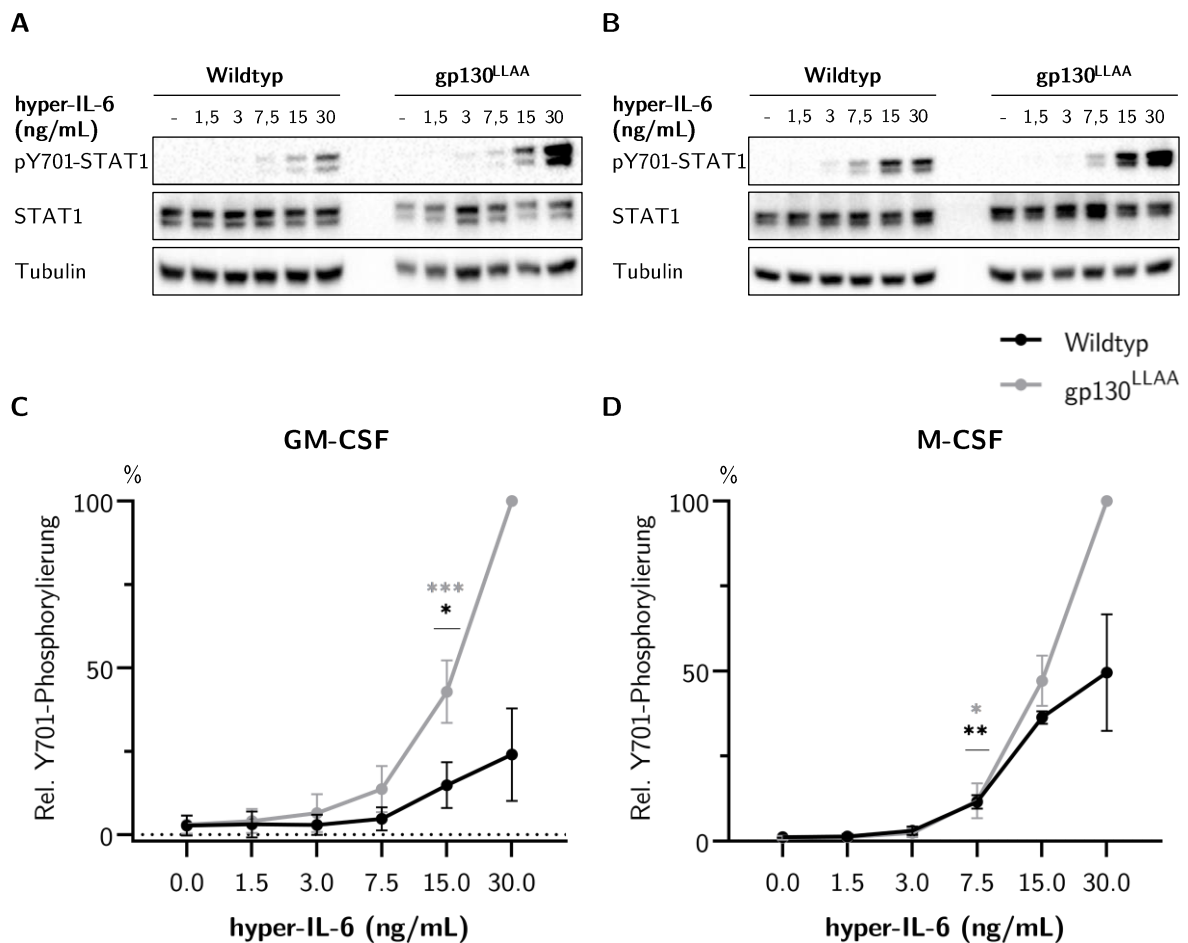


Abbildung 4.7: Hyper-IL-6 induziert in KM-MΦ aus gp130^{LLAA}-Mäusen eine stärkere STAT1-Phosphorylierung als in KM-MΦ aus WT-Mäusen. (A) GM-CSF- und (B) M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen wurden an Tag 8 für 15 Minuten mit 1,5-15 ng/mL IL-6 stimuliert. Mittels SDS-PAGE und *Western Blot* wurden in Gesamtzelllysaten pY₇₀₁-STAT1 und STAT1 detektiert; α-Tubulin diente als Beladungskontrolle. (C, D) Dargestellt sind Mittelwerte der relativen STAT1-Phosphorylierung (pSTAT1/STAT1) mit SD, markiert ist die niedrigste Konzentration mit signifikanter Abweichung zur unstimulierten Kontrolle; n=3.

Hyper-IL-6 induzierte in KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen eine stärkere STAT1-Phosphorylierung als in KM-M Φ aus WT-Mäusen (Abb. 4.7). Der Unterschied in der STAT1-Phosphorylierung war stärker ausgeprägt bei höheren hyper-IL-6-Konzentrationen und in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ . Während die STAT1-Phosphorylierung GM-CSF-ausgereifter KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen bei einer hyper-IL-6-Konzentration von 30 ng/mL 4,2-fach höher war als jene GM-CSF-ausgereifter KM-M Φ aus WT-Mäusen, unterschied sich die STAT1-Phosphorylierung in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ nur um den Faktor 2,0.

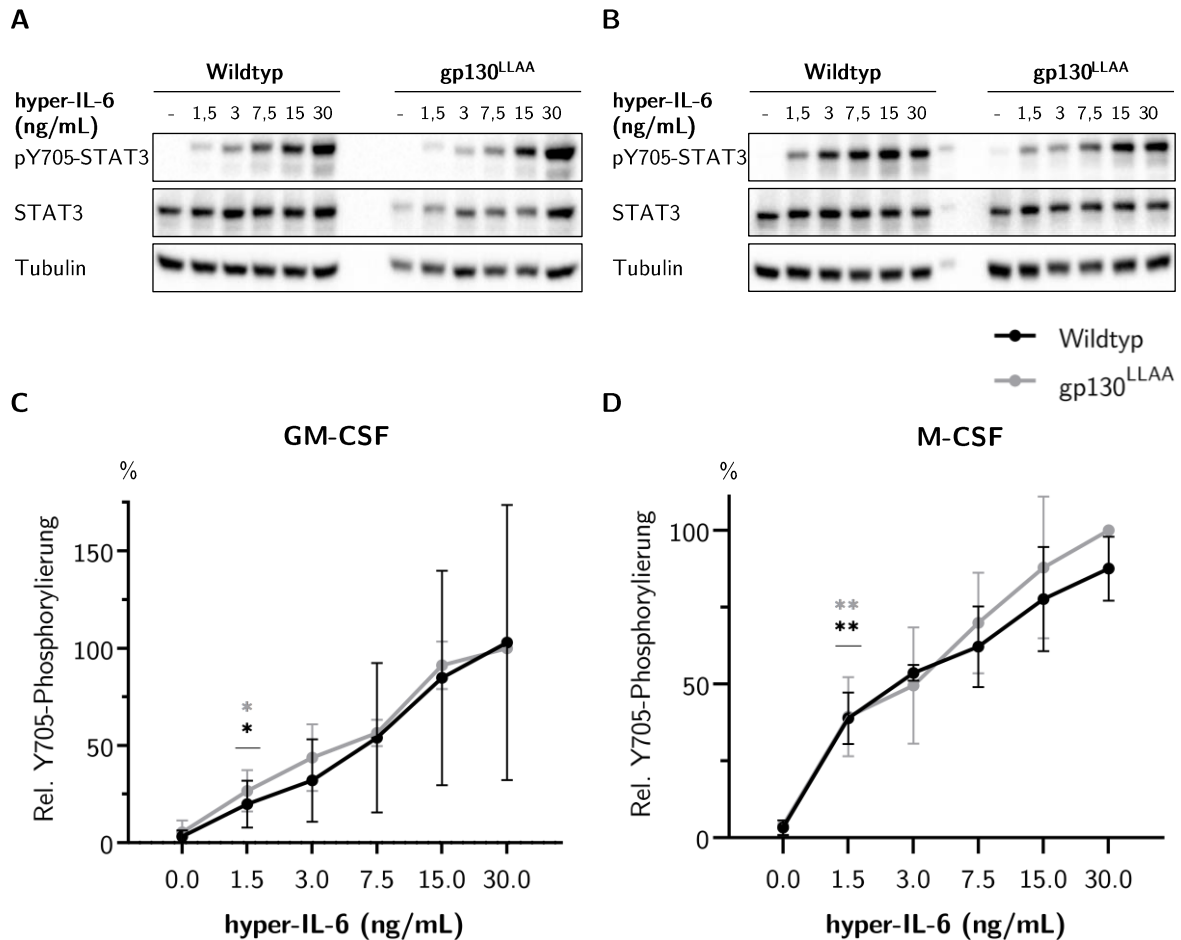


Abbildung 4.8: Die hyper-IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen. (A) GM-CSF- und (B) M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen wurden an Tag 8 für 15 Minuten mit 1,5-15 ng/mL IL-6 stimuliert. Mittels SDS-PAGE und *Western Blot* wurden in Gesamtzelllysaten pY₇₀₅-STAT3 und STAT3 detektiert; α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. (C, D) Dargestellt sind Mittelwerte der relativen STAT3-Phosphorylierung (pSTAT3/STAT3) mit SD, markiert ist die niedrigste Konzentration mit signifikanter Abweichung zur unstimulierten Kontrolle; n=3.

4.7 Die hyper-IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung unterscheidet sich nicht zwischen KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen

Da hyper-IL-6 in KM-MΦ aus gp130^{LLAA}-Mäusen eine stärkere STAT1-Phosphorylierung induzierte als in solchen aus WT-Mäusen, stellte sich die Frage, ob dies auch für die STAT3-Phosphorylierung gilt. Deswegen wurden GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen für 15 Minuten mit hyper-IL-6 in verschiedenen Konzentrationen (1,5-15 ng/mL) stimuliert, anschließend wurde mittels *Western Blot* die Y₇₀₅-Phosphorylierung von STAT3 untersucht.

Hyper-IL-6 induzierte unabhängig vom Ausreifungsfaktor in KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen eine ähnlich starke STAT3-Phosphorylierung (Abb. 4.8). Diese wich in GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-MΦ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen bereits bei der niedrigsten hyper-IL-6-Konzentration signifikant von der unstimulierten Probe ab.

4.8 LPS induziert auf M-CSF ausgereiften KM-MΦ aus WT-Mäusen die gp130- und IL-6Rα-Expression

LPS und IFN-γ können die Expression von Zytokinrezeptoren modulieren. Um herauszufinden, ob LPS und IFN-γ die IL-6-Zytokinrezeptorexpression auf KM-MΦ regulieren, wurden GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT-Mäusen an Tag 8 für 24 Stunden mit LPS oder IFN-γ stimuliert. An Tag 9 wurde die gp130- und IL-6Rα-Expression auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt.

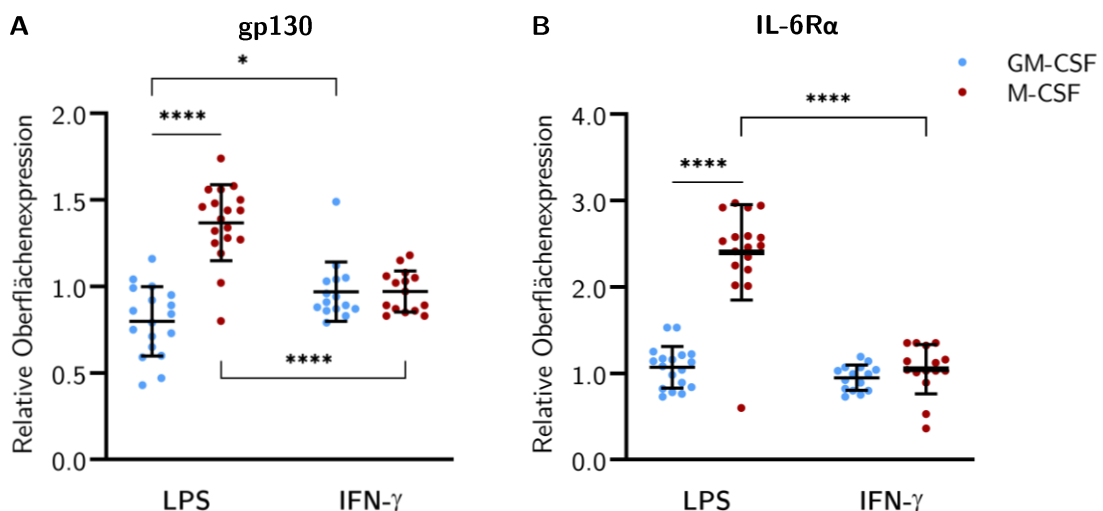


Abbildung 4.9: LPS induziert auf M-CSF ausgereiften KM-MΦ aus WT-Mäusen die gp130- und IL-6Rα-Expression. GM-CSF und M-CSF-ausgereifte KM-MΦ aus WT-Mäusen wurden an Tag 8 für 24 Stunden mit 100 ng/mL LPS oder 500 u/mL IFN-γ stimuliert. An Tag 9 wurde die Zelloberflächenexpression von (A) gp130 und (B) IL-6Rα durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Einzelmessungen sowie Mittelwerte mit SD der relativen Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; n=18.

24-stündige Stimulation mit LPS erhöhte die gp130-Expression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen um den Faktor 1,4 im Vergleich zur basalen Expression, die IL-6R α -Expression sogar um den Faktor 2,4 (Abb. 4.9). Auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen sank die gp130-Expression durch Stimulation mit LPS auf das 0,8-Fache der unstimulierten Kontrolle, während die IL-6R α -Expression unverändert blieb. 24-stündige Stimulation mit IFN- γ veränderte auf GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen weder die gp130- noch die IL-6R α -Expression.

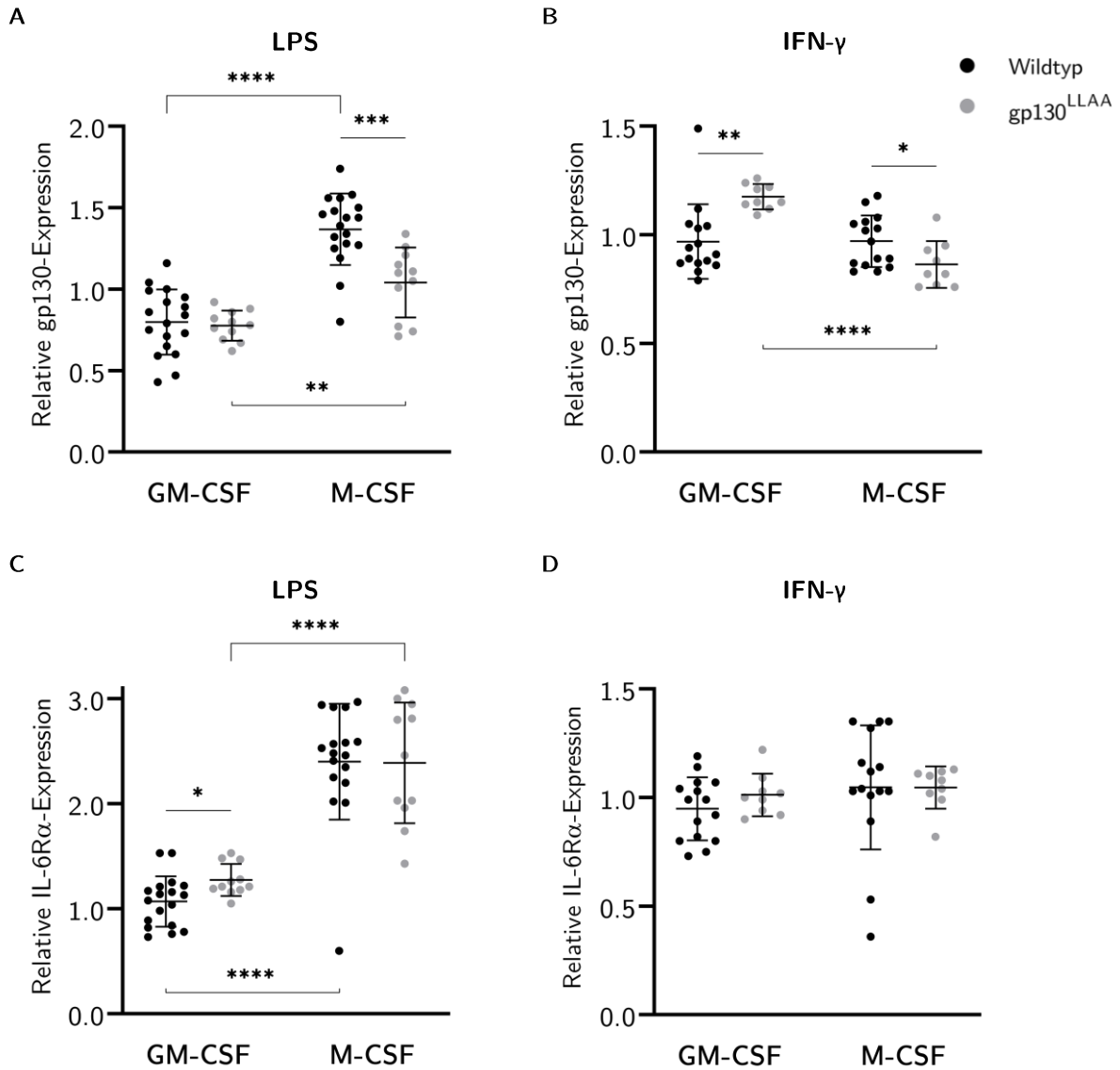


Abbildung 4.10: LPS verändert die gp130-Expression auf M-CSF ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen nicht. GM-CSF und M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen wurden an Tag 8 für 24 Stunden mit (A, C) LPS oder (B, D) IFN- γ stimuliert. An Tag 9 wurde die Zelloberflächenexpression von (A, B) gp130 und (C, D) IL-6R α durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Einzelmessungen sowie Mittelwerte mit SD der relativen Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle; WT: n=18; gp130^{LLAA}: n=11.

4.9 LPS verändert die gp130-Expression auf M-CSF ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen nicht

Die LPS-vermittelte Regulierung der gp130-Expression ist in murinen KM-DZ unabhängig von der p38- und Dileucin-vermittelten gp130-Endozytose [51]. IFN- γ hingegen reguliert die gp130-Expression in Stammzellen der Zahnpulpa p38-abhängig [144]. Um zu untersuchen, ob die Wirkung von LPS und IFN- γ auf die IL-6-Zytokinrezeptorexpression in KM-M Φ von der Dileucin-vermittelten gp130-Endozytose abhängig ist, wurden GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen für 24 Stunden mit LPS oder IFN- γ stimuliert. Anschließend wurde die Expression von gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt.

Die gp130-Expression M-CSF-ausgereifter KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen war nach 24-stündiger Stimulation mit LPS im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle unverändert; dies steht im Gegensatz zur erhöhten gp130-Expression M-CSF-ausgereifter KM-M Φ aus WT-Mäusen (Abb. 4.10 A). Auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen unterschied sich die gp130-Expression nach Stimulation mit LPS nicht von jener der GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen. IFN- γ -stimulierte KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen zeigten im Vergleich zu KM-M Φ aus WT-Mäusen geringfügige, aber statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der gp130-Expression (Abb. 4.10 B).

Die Stimulation mit LPS bewirkte auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen eine ähnlich starke Erhöhung der IL-6R α -Expression, während die relative IL-6R α -Expression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen gegenüber jener der KM-M Φ aus WT-Mäusen leicht erhöht war (Abb. 4.10 C). IFN- γ -stimulierte KM-M Φ zeigten unabhängig vom Ausreifungsfaktor und Genotyp nach 24 Stunden keine Veränderung der IL-6R α -Expression (Abb. 4.10 D).

4.10 KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen zeigen ein ähnliches MHCII- und CD86-Expressionsmuster

M Φ interagieren über die Antigenpräsentation auf MHCII-Molekülen und über die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 mit T-Zellen und sind so Teil der zellulären Immunität. Um herauszufinden, ob die MHCII- und CD86-Expression durch den Ausreifungsfaktor der KM-M Φ oder durch gp130-Endozytose reguliert wird, wurde die MHCII- und CD86-Expression GM-CSF- und M-CSF-ausgereifter KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen an Tag 9 durchflusszytometrisch bestimmt.

Das MHCII- und CD86-Expressionsmuster auf KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen ist sehr ähnlich (Abb. 4.11). Dabei exprimierten M-CSF-ausgereifte KM-M Φ größtenteils weder MHCII noch CD86 auf der Zelloberfläche. GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ exprimierten kein CD86 und teilten sich in eine MHCII⁻ und eine MHCII⁺ Fraktion auf.

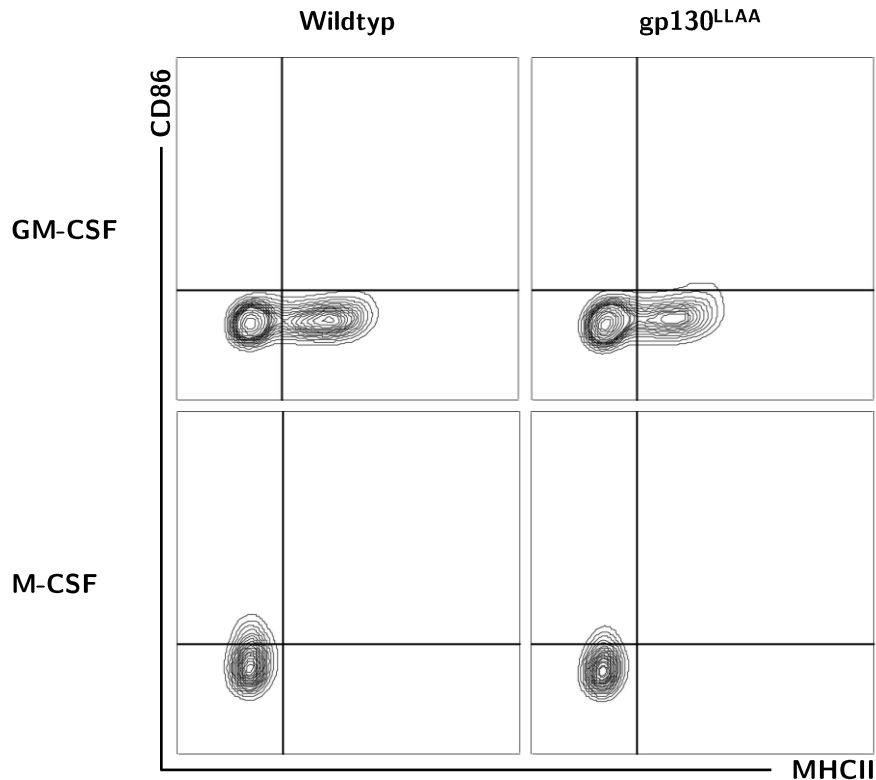


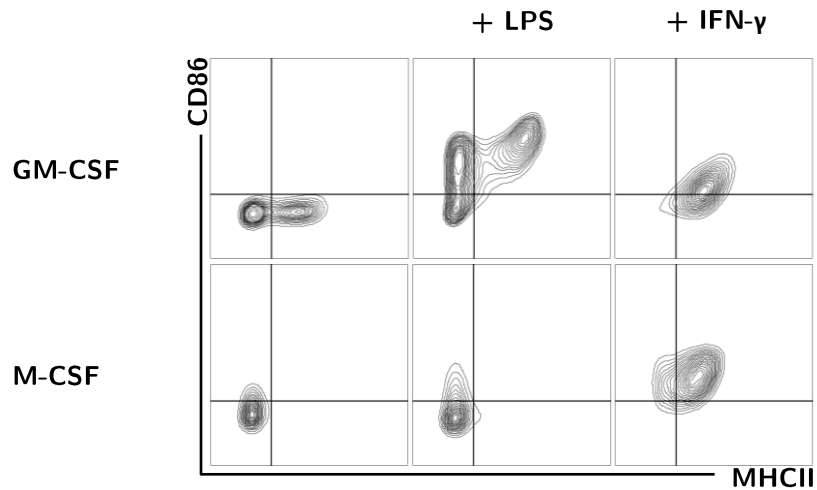
Abbildung 4.11: KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen zeigen ein ähnliches MHCII- und CD86-Expressionsmuster. Auf CD11b⁺ GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen wurde an Tag 9 die Zelloberflächenexpression von MHCII und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind repräsentative, bivariate *Contour Plots* von einer WT- und einer gp130^{LLAA}-Maus; WT: n=18; gp130^{LLAA}: n=11.

4.11 IFN- γ induziert, anders als LPS, sowohl in GM-CSF- als auch in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ die MHCII- und CD86-Expression

LPS- und IFN- γ modulieren die Interaktion von M Φ und T-Zellen. Um untersuchen, ob LPS und IFN- γ in KM-M Φ die Expression von Molekülen, die für die Interaktion mit T-Zellen relevant sind, induzieren, wurden GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen an Tag 8 für 24 Stunden mit LPS oder IFN- γ stimuliert. An Tag 9 wurde die Zelloberflächenexpression von MHCII und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Stimulation mit IFN- γ induzierte sowohl in GM-CSF- als auch in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ die MHCII- und CD86-Expression (Abb. 4.12). Stimulation mit LPS führte in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ zu einer starken CD86-Induktion, während die CD86-Expression M-CSF-ausgereifter KM-M Φ nur geringfügig erhöht war. Unabhängig vom Ausreifungsfaktor wirkte sich die Stimulation mit LPS kaum auf die MHCII-Expression der KM-M Φ aus. Diese Effekte waren auf KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen gleichermaßen zu beobachten.

A Wildtyp



B gp130^{LLAA}

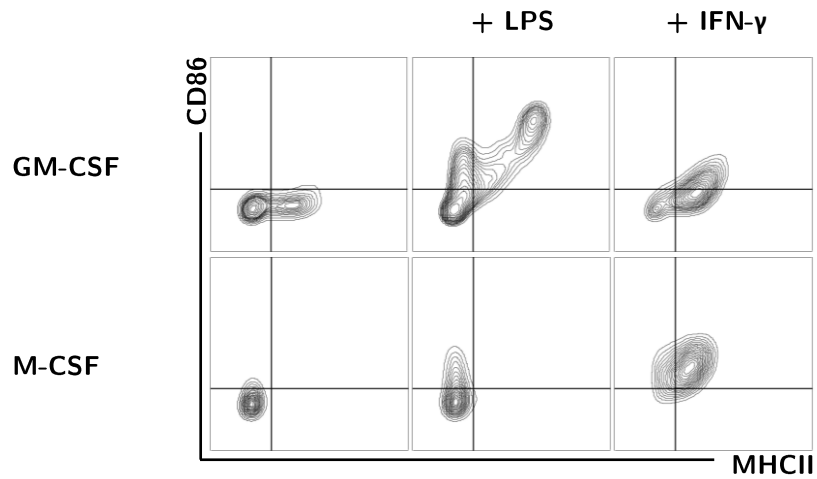


Abbildung 4.12: IFN- γ induziert, anders als LPS, sowohl in GM-CSF- als auch in M-CSF- ausgereiften KM-M Φ die MHCII- und CD86-Expression. GM-CSF und M-CSF- ausgereifte KM-M Φ aus (A) WT- und (B) gp130^{LLAA}-Mäusen wurden an Tag 8 für 24 Stunden mit LPS oder IFN- γ stimuliert. An Tag 9 wurde die MHCII- und CD86-Expression auf der Oberfläche CD11b⁺ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind repräsentative, bivariate *Contour Plots* von einer WT- und einer gp130^{LLAA}-Maus; WT: n=18; gp130^{LLAA}: n=11.

5 Diskussion

IL-6 ist ein zentrales Signalmolekül der Akute-Phase-Reaktion. M Φ bewirken im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion durch die Sekretion von IL-6 und die damit einhergehende auto- und parakrine Stimulation eine Signalexpansion. Gleichzeitig bilden M Φ als antigenpräsentierende Zellen eine Brücke zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem und initiieren eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort.

Insuffiziente Regulierung IL-6-vermittelter Signale kann akut zu einer systemischen Hyperinflammation wie zum Beispiel bei einer Sepsis führen, während chronische IL-6-Aktivität die Entstehung von Autoimmun-, Krebs- und metabolischen Erkrankungen fördert. Aus diesen Gründen sind IL-6-vermittelte Signale stark reguliert, unter anderem durch die p38- und Dileucin-vermittelte Endozytose des Signaltransduktors gp130, die durch Ligandenbindung oder Zytokin-*Crosstalk* induziert wird.

Zur Untersuchung der Auswirkung der gp130-Endozytose auf das IL-6-*Signaling* und die antigenpräsentierenden Eigenschaften der M Φ wurden KM-M Φ und die gp130^{LLAA}-Maus als *knock in*-Modell zur Suppression der gp130-Endozytose verwendet.

5.1 IL-6-vermittelte Signale in KM-M Φ

KM-M Φ entwickeln durch die Ausreifung mittels GM-CSF oder M-CSF einen distinkten Phänotyp: M-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen exprimieren signifikant mehr gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ (Abb. 4.1). Die stärkere Rezeptorexpression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ kann durch eine stärkere Expression der kodierenden Gene *Il6st* und *Il6r*, durch verminderte gp130-Endozytose oder durch vermindertes IL-6R α -*Shedding* bedingt sein. Tatsächlich gibt es bisher weder publizierte Daten zur gp130- und IL-6R α -Oberflächenexpression noch zur *Il6st*- und *Il6r*-mRNA-Expression in GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ . In Mikroglia, geweberesidenten M Φ des zentralen Nervensystems, wird das für IL-6R α kodierende Gen *Il6r* nach Stimulation mit GM-CSF oder M-CSF ähnlich stark exprimiert [106]. Die Metalloprotease ADAM17 wird in murinen KM-M Φ exprimiert und wirkt proteolytisch auf IL-6R α und TNF- α [86, 11]. Quantitative Daten hinsichtlich der ADAM17-Expression in GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ liegen nicht vor.

IL-6 aktiviert in KM-M Φ den JAK-STAT-Signalweg: Stimulation mit IL-6 über 15 Minuten induziert sowohl in GM-CSF- als auch in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ eine konzentrationsabhängige Zunahme der STAT1- und der STAT3-Phosphorylierung bis zum Erreichen eines Maximums (Abb. 4.2). Eine weitere Zunahme der STAT-Aktivierung bei bereits supraphysiologischer IL-6-Konzentration wird neben der begrenzten gp130- und IL-6R α -Oberflächenexpression sowie der Liganden-induzierten gp130-Endozytose wahrscheinlich vor allem durch die Aktivität von SOCS-Proteinen limitiert [4]. Insbesondere SOCS3, dessen Expression durch STAT3 induziert wird, verhindert eine weitere STAT-Aktivierung durch Bindung an Kinasedomänen der Januskinasen [114].

IL-6 induziert in KM-M Φ eine stärkere STAT3- als STAT1-Aktivierung: Die halbmaximale und die maximale STAT3-Phosphorylierung werden bereits bei niedrigeren IL-6-Konzentrationen

erreicht als bei STAT1 (Abb. 4.2). Dies stimmt überein mit Untersuchungen an HepG2-Zellen, die STAT3 im Vergleich zu STAT1 und STAT5 als potentesten Induktor der Expression von Akute-Phase-Genen identifizierten [87].

Während die IL6-vermittelte STAT3-Phosphorylierung zwischen GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ quantitativ nur geringfügig differiert, beträgt die maximale STAT1-Phosphorylierung in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ nur ein Viertel derer in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ (Abb. 4.2). Die verminderte STAT1-Aktivierung korreliert mit der geringeren IL-6R α - und gp130-Expression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ (Abb. 4.1). Die STAT1-Aktivierung durch klassisches IL-6-*Signaling* wird in KM-M Φ folglich durch die Zelloberflächenexpression der IL-6-Rezeptoren reguliert. Dass dieser Effekt nicht gleichermaßen für die STAT3-Aktivierung gilt, ist am ehesten auf die bereits genannte präferentielle STAT3-Aktivierung gegenüber anderen STAT-Proteinen zurückzuführen. Zudem ist bekannt, dass GM-CSF in murinen Monozyten einen Abfall der STAT1-Expression bewirkt [22]. Darüber hinaus induziert GM-CSF in hämatopoetischen Zelllinien die Dephosphorylierung der Januskinasen JAK1 und Tyk2 und vermittelt so einen Abfall der STAT1-Phosphorylierung [68]. Prinzipiell induzieren sowohl GM-CSF als auch M-CSF selbst die STAT1- und STAT3-Aktivierung [9, 98]. Da die KM-M Φ in den vorliegenden Untersuchungen vor der Stimulation mit IL-6 oder hyper-IL-6 für sechs Stunden in Hungermedium inkubiert wurden, ist jedoch nicht von einer Interferenz hinsichtlich der STAT-Aktivierung auszugehen.

IL-6-*trans-Signaling*, vermittelt durch Stimulation mit hyper-IL-6, induziert in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ eine signifikant stärkere STAT1- und STAT3-Phosphorylierung als in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ (Abb. 4.3 E und F) [100]. Dies korreliert mit der geringeren gp130-Expression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ , die als limitierender Faktor des IL-6-*trans-Signaling* wirkt (Abb. 4.1 A und C). IL-6 und hyper-IL-6 induzieren in KM-M Φ eine ähnlich starke STAT1- und STAT3-Aktivierung. Nur in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ bewirkt IL-6 eine doppelt so hohe STAT1-Phosphorylierung wie hyper-IL-6 (Abb. 4.3 E). Dies steht im Gegensatz zur in der Literatur beschriebenen höheren Affinität des Liganden hyper-IL-6 zum Signaltransduktor gp130, die beispielsweise in HepG2-Zellen in einer zehnfach höheren Sekretion des Akute-Phase-Proteins Haptoglobin resultiert als bei vergleichbaren IL-6-Konzentrationen [100]. Theoretisch kann die schwächere STAT1-Aktivierung durch hyper-IL-6 in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ auch durch die Zusammensetzung des Rezeptorkomplexes erklärt werden: Da dieser beim klassischen IL-6-*Signaling* nicht nur als Hexamer, sondern auch als Tetramer aus je einem Molekül IL-6 und IL-6R α sowie zwei Molekülen gp130 vorliegen kann, werden nur halb so viele Ligandenmoleküle zur Signaltransduktion benötigt wie beim *trans-Signaling*, das einen Hexamer aus je zwei Molekülen hyper-IL-6 und gp130 voraussetzt [76]. Neuere, systembiologische Ansätze gehen jedoch von einer Hexamerkonfiguration des Rezeptorkomplexes sowohl beim klassischen als auch beim IL-6-*trans-Signaling* aus [107, 85]. Möglicherweise ist die Divergenz der vorliegenden Daten zur Literatur auch durch die Wahl eines semiquantitativen Verfahrens zur Bestimmung der STAT-Phosphorylierung zu erklären. Eine Korrelation der Western Blot-Ergebnisse mit denen eines quantitativen Verfahrens, zum Beispiel mittels Durchflusszytometrie, wäre aufschlussreich.

Die Kinetik des JAK-STAT-*Signaling* ist in KM-M Φ unabhängig von den Stimuli IL-6 und hyper-IL-6: STAT1- und STAT3-Phosphorylierung erreichen jeweils nach 15-minütiger Stimulation ein Maximum (Abb. 4.3 A-D). Während die STAT1-Phosphorylierung nach einer Stunde jedoch auf das Basalniveau abfällt, beträgt die STAT3-Phosphorylierung sowohl nach einer als auch nach sechs Stunden noch ein Viertel des Maximums. Dieser Zeitverlauf der STAT1- und STAT3-Aktivierung konnte auch in murinen Neutrophilen im Rahmen des Krankheits-

modells der *Escherichia coli*-Pneumonie beobachtet werden [64]. Die kurze Dauer der IL-6- oder hyper-IL-6-vermittelten STAT1-Aktivierung in KM-M Φ ist kongruent mit Untersuchungen an murinen embryonalen Fibroblasten, die eine STAT3-induzierte Inhibierung und zeitliche Limitierung der STAT1-Aktivierung ergaben [20]. Gleichzeitig kann die Reduktion der STAT3-Aktivierung durch die STAT3-induzierte SOCS3-Expression erklärt werden; durch die negative Rückkopplung mittels SOCS3 entsteht ein biphasisches IL-6-Signal mit phasenspezifischem Genexpressionsprofil [140].

5.2 Relevanz des gp130-Internalisierungsmotivs für IL-6-vermittelte Signale

KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen exprimieren signifikant mehr gp130 auf der Zelloberfläche als KM-M Φ aus WT-Mäusen bei ähnlichen Mengen IL-6R α (Abb. 4.4). Dieser Befund bestätigt das *knock in*-Modell zur Suppression der gp130-Endozytose auch in murinen KM-M Φ . Gleichzeitig scheint die IL-6R α -Expression auf KM-M Φ unabhängig von der Expression des gp130-Internalisierungsmotivs zu sein (Abb. 4.4 D-F). Die vermehrte gp130-Expression bei konstanter IL-6R α -Expression konnte in ähnlicher Weise in KM-DZ beobachtet werden [51]. Auf Milzmakrophagen (CD11c^{low}B220⁻) aus gp130^{LLAA}-Mäusen hingegen ist die IL-6R α -Expression signifikant erhöht gegenüber solchen aus WT-Mäusen [51]. Allerdings stammen die M Φ der roten Milzpulpa aus dem Dottersack sowie aus der fetalen Leber und unterscheiden sich als geweberesidente M Φ hinsichtlich der Zytokinexpression und -interaktion von Peritoneal- und KM-M Φ [143, 135].

Im Gegensatz zu KM-M Φ aus WT-Mäusen unterscheidet sich die gp130- und IL-6R α -Expression zwischen GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen nicht (Abb. 4.4 C und F). Da GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT-Mäusen signifikant weniger gp130 auf der Zelloberfläche exprimieren als M-CSF-ausgereifte-KM-M Φ aus WT-Mäusen, wird die gp130-Expression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ vermutlich stärker durch Dileucin-abhängige gp130-Endozytose reguliert als in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ .

IL-6-vermitteltes klassisches IL-6-*Signaling* induziert in KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen eine ähnlich starke STAT1- und STAT3-Phosphorylierung; dies gilt sowohl für GM-CSF- als auch für M-CSF-ausgereifte KM-M Φ (Abb. 4.5 und 4.6). Die höhere gp130-Expression auf KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen induziert keine stärkere STAT-Aktivierung, da die unveränderte IL-6R α -Expression limitierend auf klassisches IL-6-*Signaling* wirkt (Abb. 4.4). Eine signifikante Zunahme der STAT1-Phosphorylierung gegenüber dem Basalniveau trat bei KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen erst bei höheren IL-6-Konzentrationen als bei solchen aus WT-Mäusen auf (Abb. 4.5). Diesbezüglich gibt es keine vergleichbaren Daten in der Literatur. Möglicherweise wirken aufgrund der fehlenden Dileucin-abhängigen gp130-Endozytose andere Regulierungsmechanismen IL-6-vermittelter Signale stärker als in KM-M Φ aus WT-Mäusen.

Hyper-IL-6-vermitteltes IL-6-*trans-Signaling* induziert die STAT1-Phosphorylierung in KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen signifikant stärker als in KM-M Φ aus WT-Mäusen; dieser Effekt ist bei höheren IL-6-Konzentrationen und bei GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ stärker ausgeprägt (Abb. 4.7). Da IL-6-*trans-Signaling* auf Rezeptorebene nur durch die gp130-Oberflächenexpression reguliert wird, entfällt die limitierende Wirkung der IL-6R α -Expression und die erhöhte gp130-Expression induziert tatsächlich eine stärkere STAT1-Aktivierung. Folglich wird die hyper-IL-6-induzierte STAT1-Aktivierung durch Dileucin-abhängige gp130-Endozytose reguliert. Diesen Zusammenhang bestätigen systembiologische Untersuchungen,

die das quantitative Verhältnis von gp130 zu IL-6R α als wichtigste Determinante der Antwort auf klassisches und IL-6-*trans-Signaling* definieren, während intrazelluläre Prozesse von untergeordneter Bedeutung sind [107].

Dagegen unterscheidet sich die STAT3-Aktivierung durch IL-6-*trans-Signaling* zwischen KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen nicht (Abb. 4.8). Die unterschiedliche Relevanz des gp130-Internalisierungsmotivs für die hyper-IL-6-vermittelte STAT1- und STAT3-Aktivierung beruht vermutlich auf der unterschiedlichen Rezeptorspezifität von STAT1 und STAT3: Diese bestimmt die Wahrscheinlichkeit der Interaktion zwischen SH2-Domäne des STAT-Moleküls und der Phosphotyrosinsequenz des Signaltransduktors gp130 [94]. So induziert IL-6, vermittelt durch gp130, primär eine STAT3-Aktivierung [87]. Zudem setzt die STAT1-Aktivierung durch IL-6 eine längere STAT-Verweildauer an gp130 voraus als die STAT3-Aktivierung [85]. STAT1 und STAT3 konkurrieren jedoch um gp130-Phosphotyrosine, sodass STAT1 stärker von der IL-6-Rezeptorenexpression abhängig ist als STAT3 [103]. Die stärkere gp130-Expression auf KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen sowie die höhere Affinität der Bindung von hyper-IL-6 an gp130 im Vergleich zur Interaktion von IL-6, IL-6R α und gp130 beim klassischen IL-6-*Signaling* ermöglichen folglich eine stärkere STAT1-Aktivierung. In KM-DZ aus gp130^{LLAA}-Mäusen hingegen induzierte IL-6-*trans-Signaling* eine signifikant stärkere STAT3-Aktivierung als in KM-DZ aus WT-Mäusen [51]. Die STAT1-Aktivierung wurde jedoch nicht untersucht, sodass es noch keine ausreichende Datengrundlage zur Bestätigung der Annahme einer stärkeren Regulierung der hyper-IL-6-induzierten STAT1-Aktivierung durch Dileucin-abhängige gp130-Endozytose im Vergleich zu STAT3 gibt. Zusammenfassend konnte der Zusammenhang zwischen gp130-Internalisierungsmotiv und STAT1-Aktivierung hier erstmals *ex vivo* gezeigt werden. Da aktuelle Studien die Konkurrenz um Phosphotyrosine als zentralen Faktor für die Regulierung von Zytokin-*Signaling* und -*Crosstalk* identifizieren konnten, liegt hier ein wichtiger Ansatzpunkt zur Untersuchung des zugrundeliegenden Mechanismus [139].

5.3 *Crosstalk*-Regulierung IL-6-vermittelter Signale durch LPS

LPS induziert die gp130- und IL-6R α -Expression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen und fördert so klassisches und IL-6-*trans-Signaling* (Abb. 4.9). Dies widerspricht zunächst der erwarteten verminderten gp130-Expression aufgrund der Liganden-induzierten gp130-Endozytose. Allerdings bildet die Messung nach 24-stündiger Stimulation mit LPS nicht den genauen zeitlichen Verlauf der gp130- und IL-6R α -Oberflächenexpression ab. Untersuchungen an KM-DZ zeigten, dass die gp130-Expression nach Stimulation mit TNF α bereits nach 30 Minuten ein Minimum erreicht und über Nacht über den Ausgangswert steigt [51]. Zudem führt 24-stündige Stimulation mit LPS in humanen PBMC zu einer Erhöhung der *Il6st*- und *Il6r*-Genexpression sowie der gp130-Oberflächenexpression [88]. Auch *in vivo* konnte ein Anstieg der gp130- und IL-6R α -Expression durch LPS gezeigt werden: Im Vollblut gesunder Probanden war die *Il6st*-Expression 24 Stunden nach intravenöser LPS-Injektion doppelt so hoch wie nach Placebo, die *Il6r*-Expression war um den Faktor 1,8 erhöht [84]. Während die *Il6st*-Expression bereits nach 4 Stunden ein erstes Maximum erreichte, stieg die *Il6r*-Expression erst nach 24 Stunden. Gleichzeitig ist die sIL-6R α -Konzentration im Plasma nach zwei Stunden maximal erhöht (20%) und fällt bereits nach vier Stunden wieder auf das Ausgangsniveau ab, IL-6R α wird also nur kurzzeitig durch verstärktes Rezeptor-*Shedding* reguliert [23]. Ursächlich für die LPS-induzierte Erhöhung der gp130- und IL-6R α -Expression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen ist folglich am ehesten die vermehrte Expression der Rezeptorgene.

Auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen hingegen bewirkt LPS keine Veränderung der gp130-Expression im Vergleich zur unstimulierten Probe (Abb. 4.10 A). Die gp130-Expression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ wird also durch die Expression des gp130-Internalisierungsmotivs reguliert. Durch die fehlende Dileucin-abhängige gp130-Endozytose in M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen entfällt möglicherweise ein Stimulus für die Induktion der *Il6st*-Expression, sodass die gp130-Expression nach 24-stündiger Stimulation mit LPS dem Basalniveau entspricht. Die IL-6R α -Expression hingegen wird auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen ähnlich stark induziert und ist somit unabhängig von der Expression des Internalisierungsmotivs (Abb. 4.10 C).

In GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus WT-Mäusen führt Stimulation mit LPS zu einem geringen Abfall der gp130-Oberflächenexpression bei konstanter IL-6R α -Expression; dies limitiert sowohl klassisches als auch IL-6-*trans-Signaling* (Abb. 4.9). Auch in GM-CSF-ausgereiften KM-DZ konnte ein starker Abfall der gp130-Oberflächen- und Proteinexpression sowie der *Il6st*-Expression nach Stimulation mit LPS über Nacht beobachtet werden; bezüglich der IL-6R α -Expression liegen keine Daten zum Vergleich vor [51].

Der LPS-induzierte Abfall der gp130-Oberflächenexpression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ ist unabhängig von der Expression des gp130-Internalisierungsmotivs (Abb. 4.10 A). Auch in KM-DZ induziert LPS die gp130-Endozytose p38- und Dileucin-unabhängig, jedoch vermittelt durch Clathrin [51]. Die IL-6R α -Expression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen steigt nach Stimulation mit LPS geringfügig an im Vergleich zur konstanten Expression auf KM-M Φ aus WT-Mäusen (Abb. 4.10 C). Da GM-CSF- und M-CSF ausgereifte KM-M Φ extreme Phänotypen darstellen, ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Verhältnisse *in vivo* nur bei starken Effekten zu erwarten; dies gilt auch für statistisch signifikante Ergebnisse. In diesem Sinne ist der geringfügige Anstieg der IL-6R α -Expression vermutlich nicht relevant.

Die Ursache für die unterschiedlichen Mechanismen der gp130-Endozytose in GM-CSF- und M-CSF-ausgereiften KM-M Φ bleibt unklar. Grundsätzlich exprimieren M Φ , die aus PBMC mit M-CSF-ausgereifte wurden, signifikant mehr TLR-4, CD14 und MD2 auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte M Φ [40]. Möglicherweise beeinflusst die unterschiedliche Expression des LPS-Rezeptors die Phosphorylierung von Komponenten der Signalkaskade, die Voraussetzung der p38-abhängigen, Dileucin-vermittelten gp130-Endozytose ist.

IFN- γ hat keinen Effekt auf die gp130- und IL-6R α -Expression auf KM-M Φ aus WT-Mäusen (Abb. 4.9). In Stammzellen der Zahnpulpa hingegen induziert IFN- γ p38-vermittelt die gp130-Endozytose [144]. Zudem sinkt die IL-6R α -Expression auf Monozyten aus Vollblut nach Inkubation mit IFN- γ über vier Stunden um 75 % [23]. Die Rezeptorexpression auf murinen KM-M Φ war bisher nicht bekannt; möglicherweise ist die in der Literatur beschriebene *Crosstalk*-vermittelte Regulierung der Zytokinrezeptorexpression durch IFN- γ vom Differenzierungsstatus der untersuchten Zellen abhängig.

IFN- γ induziert in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen einen geringen Anstieg der gp130-Zelloberflächenexpression, während die Expression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen geringfügig sinkt (Abb. 4.10 B). Die Relevanz dieser geringen, jedoch statistisch signifikanten Unterschiede in der gp130-Expression zwischen KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen ist unklar und müsste in *in vivo*-Modellen mit verstärkter Interferon- γ -Aktivität überprüft werden, um eine Aussage über die Bedeutung des Dileucin-Internalisierungsmotivs für die IFN- γ -vermittelte gp130-Endozytose treffen zu können. Unabhängig vom Genotyp und Ausreifungsfaktor ist die IL-6R α -Expression auf KM-M Φ nach 24-stündiger Stimulation mit IFN- γ unverändert gegenüber der unstimulierten Kontrolle, da IFN- γ die IL-6R α -Expression auf KM-M Φ entweder nicht oder nur kurzfristig reguliert (Abb. 4.10 D).

5.4 Antigenpräsentation und Kostimulation durch KM-M Φ

Die MHCII- und CD86-Expression auf KM-M Φ ist unabhängig von der Expression des gp130-Internalisierungsmotivs (Abb. 1.5). Anhand des Modells der gp130^{F759/F759}-Maus, in deren Zellen die gp130-vermittelte STAT3-Aktivierung erhöht ist, und anhand des Modells der gp130^{FxxQ/FxxQ}-Maus, in deren Zellen die gp130-vermittelte STAT3-Aktivierung defekt ist, konnte gezeigt werden, dass die MHCII- und CD86-Expression in KM-DZ durch IL-6-vermittelte STAT3-Aktivierung inhibiert wird [99, 71]. Dabei war die gp130- und IL-6R α -Expression auf den KM-DZ unabhängig vom Genotyp. Dies impliziert, dass die MHCII-Expression vermutlich nicht durch die quantitative gp130-Expression, wohl aber durch die Qualität der Signaltransduktion durch gp130 reguliert wird. Tatsächlich hat die unterschiedlich starke gp130-Expression auf KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen in den hier vorliegenden Daten keine Auswirkung auf die MHCII-Expression. Möglicherweise kann dies auch durch die ähnlich starke STAT3-Aktivierung in KM-M Φ aus WT- und solchen aus gp130^{LLAA}-Mäusen durch klassisches und IL-6-*trans-Signaling* erklärt werden (Abb. 4.6, Abb. 4.8).

Unstimulierte M-CSF-ausgereifte KM-M Φ sind MHCII⁻CD86⁻ (Abb. 1.5). Hingegen bestehen GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus WT- und gp130^{LLAA}-Mäusen jeweils aus zwei Populationen: MHCII⁻CD86⁻ und MHCII⁺CD86⁻. Dies stimmt überein mit Untersuchungen an „*loosely adherent*“, GM-CSF-ausgereiften CD11b⁺ Knochenmarkszellen, die sich aus je einer Population mit intermediärer und hoher MHCII-Expression zusammensetzen [50]. Da in der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Durchflusszytometrie keine Sortierung der CD11b⁺ Zellen basierend auf M Φ - und DZ-Markern erfolgte, lässt sich zudem nicht ausschließen, dass trotz mehrfachen Waschens der Zellkulturplatten nicht auch einzelne inadärente Zellen mit DZ-Phänotyp in die Messung eingeschlossen wurden.

LPS induziert die CD86-Expression auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ ; in geringem Ausmaß gilt dies auch für M-CSF-ausgereifte KM-M Φ (Abb. 4.12). Gleichzeitig steigt die MHCII-Expression der KM-M Φ nur geringfügig an. Es ist bekannt, dass die MHCII-Expression auf M-CSF-ausgereiften KM-M Φ durch Stimulation mit LPS nur transient ansteigt und nach 24 Stunden wieder das Basalniveau erreicht [138]. In M Φ der Zelllinie BAC1.2F5 induziert LPS die SOCS3-Expression und inhibiert so nach mindestens vier Stunden die STAT1-vermittelte MHCII-Expression durch IFN- γ [121]. Da die MHCII-Expression in der vorliegenden Untersuchung nur nach 24 Stunden gemessen wurde, kann der zeitliche Verlauf der Wirkung von LPS nicht nachvollzogen werden. Die Funktion der LPS-vermittelten Zunahme der Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 ohne relevante Induktion der MHCII-Expression bleibt unklar. Möglicherweise fehlt ein zweiter externer Stimulus zur Induktion der MHCII-Expression, die Voraussetzung für die Interaktion von M Φ mit T-Zellen ist.

IFN- γ -stimulierte GM-CSF- und M-CSF-ausgereifte KM-M Φ haben durch die starke MHCII- und CD86-Induktion einen ähnlichen Phänotyp (MHCII⁺CD86⁺) (Abb. 4.12). Die MHCII-Induktion in KM-M Φ durch IFN- γ ist seit langem bekannt. Fraglich ist allerdings, ob die vermehrte MHCII-Expression in einer vermehrten T-Zell-Aktivierung resultiert. Zumindest *in vitro* ist die Antigen-induzierte T-Zell-Proliferation durch IFN- γ -stimulierte M-CSF-ausgereifte KM-M Φ niedriger als durch unstimulierte GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ [30]. M-CSF-ausgereifte KM-M Φ teilen phänotypische und funktionelle Eigenschaften mit Tumor-assoziierten M Φ (TAM) [63]. Im murinen Myelom-Modell aktivieren CD11b⁺ Zellen CD4⁺ T-Zellen, die durch die Sekretion von IFN- γ eine Aktivierung der TAM und MHCII-Induktion bewirken [19]. Zudem ist bekannt, dass die MHCII- und CD86-Expression in tumoriziden M Φ hochreguliert ist, während die Tumorprogression mit einer Transition der TAM von MHC^{high} zu MHC^{low} assoziiert

ist [46, 134]. Nach vielversprechenden Ergebnissen im Mausmodell läuft aktuell eine klinischen Studie zum therapeutischen Einsatz von Monozyten, die aus dem peripheren Blut von Patientinnen mit therapierefraktärem, peritoneal metastasierten Ovarialkarzinom isoliert, *ex vivo* mit PEG-Interferon α -2b und Interferon γ -1b stimuliert und anschließend intraperitoneal injiziert werden [96, 41]. Ein Zusammenhang zwischen der MHCII- und CD86-Induktion auf monozytären Zellen durch IFN- γ und der immunvermittelten antineoplastischen Wirkung der genannten zellbasierten Therapie ist denkbar.

5.5 Ausblick

Die Expression des gp130-Internalisierungsmotivs reguliert in murinen KM-M Φ die STAT1-Aktivierung durch IL-6-*trans-Signaling*. Ob dieser Effekt auch eine relevante Veränderung der Gen- und Proteinexpression sowie der Funktion von M Φ bewirkt, ist noch unklar. Da STAT1 in M Φ primär im Rahmen der initialen Signalexpansion der Entzündungsreaktion aktiviert wird, stellt sich die Frage, ob beim Hyperinflammationssyndrom eine stärkere und länger anhaltende STAT1-Aktivierung durch verminderte gp130-Endozytose vorliegt. Weitere Untersuchungen *in vivo* anhand von Sepsis-Modellen sind nötig, um die pathophysiologische Bedeutung der gp130-Endozytose in M Φ zu verstehen.

GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ exprimieren basal mehr MHC-Klasse-II-Komplex als M-CSF-ausgereifte KM-M Φ ; Stimulation mit IFN- γ induziert in beiden Makrophagensubtypen einen MHCII⁺-Phänotyp. Weitere Untersuchungen hinsichtlich der Kompetenz zur Antigenpräsentation und zur Qualität der Interaktion mit T-Zellen sind nötig, um die Relevanz von IFN- γ für die M Φ -Funktion zu verstehen und zellbasierte Immuntherapien zu entwickeln.

6 Zusammenfassung

IL-6 bewirkt als Entzündungsmediator eine autokrine M Φ -Stimulation. Zur Verhinderung pathologischer Entzündungsaktivität sind IL-6-Signale stark reguliert, unter anderem durch die Dileucin-vermittelte Endozytose des Signaltransduktors gp130. Klassisches IL-6-*Signaling* ist abhängig von der Expression von IL-6R α und gp130 auf der Zelloberfläche, während IL-6-*trans-Signaling* durch löslichen IL-6R α nur von der gp130-Expression abhängt. Die Bedeutung des Dileucin-Internalisierungsmotivs für IL-6-vermittelte Signale in M Φ und die Interaktion der M Φ mit anderen Immunzellen ist jedoch unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Charakterisierung muriner GM-CSF- und M-CSF-ausgereifter KM-M Φ hinsichtlich der Relevanz des gp130-Internalisierungsmotivs für IL-6-vermittelte-Signale und das Antigenpräsentationspotential unter Berücksichtigung des *Crosstalk* durch LPS und IFN- γ . Hierzu wurde die gp130^{LLAA}-Mauslinie als *knock in*-Modell zur Suppression der gp130-Endozytose verwendet.

KM-M Φ entwickeln durch die Ausreifung mittels GM-CSF oder M-CSF einen distinkten Phänotyp: M-CSF-ausgereifte KM-M Φ exprimieren mehr gp130 und IL-6R α auf der Zelloberfläche als GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ . Dies limitiert sowohl klassisches als auch IL-6-*trans-Signaling* in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ : IL-6 induziert in diesen eine geringere STAT1-Aktivierung, das IL-6/IL-6R α -Fusionsprotein hyper-IL-6 eine geringere STAT1- und STAT3-Aktivierung.

KM-M Φ aus gp130^{LLAA}-Mäusen exprimieren mehr gp130 als KM-M Φ aus WT-Mäusen bei ähnlichen Mengen IL-6R α . Dabei ist die Rezeptorexpression auf gp130^{LLAA}-KM-M Φ unabhängig vom Ausreifungsfaktor GM-CSF oder M-CSF. Durch die erhöhte gp130-Expression induziert IL-6-*trans-Signaling* in gp130^{LLAA}-KM-M Φ eine stärkere STAT1-Aktivierung als in WT-KM-M Φ , dies gilt insbesondere bei Ausreifung mit GM-CSF. Dagegen sind die STAT3-Aktivierung durch IL-6-*trans-Signaling* und die STAT1- und STAT3-Aktivierung durch klassisches IL-6-*Signaling* unabhängig von der Expression des Dileucin-Internalisierungsmotivs.

Stimulation mit LPS induziert die gp130- und IL-6R α -Expression auf M-CSF-ausgereiften WT-KM-M Φ , während die gp130-Expression auf M-CSF-ausgereiften gp130^{LLAA}-KM-M Φ unverändert ist. Unabhängig von der Expression des Dileucin-Internalisierungsmotivs bewirkt LPS in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ einen Abfall der gp130-Expression. IFN- γ hingegen hat keinen relevanten Effekt auf die gp130- und IL-6R α -Expression auf KM-M Φ .

MHCII- und CD86-Expression auf KM-M Φ sind unabhängig von der Expression des gp130-Dileucin-Internalisierungsmotivs. M-CSF-ausgereifte KM-M Φ sind MHCII⁻CD86⁻, während sich GM-CSF-ausgereifte KM-M Φ aus einer MHCII⁻CD86⁻ und einer MHCII⁺CD86⁻ Population zusammensetzen. LPS induziert auf GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ die CD86-Expression bei kaum veränderter MHCII-Expression. Unabhängig vom Ausreifungsfaktor induziert IFN- γ in KM-M Φ einen MHCII⁺CD86⁺ Phänotyp.

Unklar bleibt, warum IL6-vermittelte Signale in GM-CSF-ausgereiften KM-M Φ stärker durch Dileucin-abhängige gp130-Endozytose reguliert werden als in M-CSF-ausgereifte KM-M Φ . Auch die Ursache der unterschiedlichen Wirkung von LPS auf die gp130-Expression verschiedener myeloischer Zellen ist nicht geklärt. Weitere Untersuchungen sind nötig.

Abstract

As a mediator of inflammation, IL-6 causes autocrine M Φ stimulation. To prevent pathological inflammatory activity, IL-6 signaling is regulated by di-leucine-mediated endocytosis of the signal transducer gp130, amongst other mechanisms. Classical IL-6 signaling depends on the expression of IL-6R α and gp130 on the cell surface, whereas IL-6 trans-signaling initiated by soluble IL-6R α depends only on gp130. However, the importance of the di-leucine internalization motif for IL-6-mediated signaling in M Φ and the interaction of M Φ with other immune cells is unclear.

The aim of this thesis was to characterize murine GM-CSF- and M-CSF-cultured bone marrow-derived macrophages (BMDM) regarding the relevance of the gp130 internalization motif for IL-6 signaling and antigen presentation capacity, taking into account crosstalk by LPS and IFN- γ . For this purpose, the gp130^{LLAA} mouse line was used as a knock-in model for suppression of gp130 endocytosis.

BMDM develop a distinct phenotype through culture with GM-CSF or M-CSF: M-CSF-cultured BMDM express more gp130 and IL-6R α on the cell surface than GM-CSF-cultured BMDM. This limits both classical and trans-signaling in GM-CSF-cultured BMDM: IL-6 induces a weaker STAT1 activation in these, the IL-6/IL-6R α fusion protein hyper-IL-6 a weaker STAT1 and STAT3 activation.

BMDM from gp130^{LLAA} mice express more gp130 than BMDM from WT mice but similar levels of IL-6R α . The receptor expression on gp130^{LLAA}-BMDM is independent of culture with GM-CSF or M-CSF. Due to increased gp130 expression, IL-6 trans-signaling induces stronger STAT1 activation in gp130^{LLAA}-BMDM than in WT-BMDM; this effect is more pronounced in BMDM cultured with GM-CSF. In contrast, STAT3 activation by IL-6 trans-signaling and STAT1 and STAT3 activation by classical IL-6 signaling are independent of the di-leucine internalization motif.

Stimulation with LPS induces gp130 and IL-6R α expression on M-CSF-cultured WT-BMDM, while gp130 expression on M-CSF-cultured gp130^{LLAA}-BMDM is unchanged. Independent of the expression of the di-leucine internalization motif, LPS causes a decrease in gp130 expression in GM-CSF-cultured BMDM. IFN- γ , on the other hand, has no relevant effect on gp130 and IL-6R α expression on BMDM.

MHCII and CD86 expression on BMDM are independent of the gp130 di-leucine internalization motif. M-CSF-cultured BMDM are MHCII⁻CD86⁻, whereas GM-CSF-cultured BMDM are composed of a MHCII⁻CD86⁻ and a MHCII⁺CD86⁻ population. LPS induces CD86 expression on GM-CSF-cultured BMDM without relevantly altering MHCII expression. Independent of the culture conditions, IFN- γ induces a MHCII⁺CD86⁺ phenotype in BMDM.

It remains unclear why IL-6 signaling in GM-CSF-cultured BMDM is more tightly regulated by di-leucine-dependent gp130 endocytosis than in M-CSF-cultured BMDM. Also, the mechanism of differential modulation of gp130 expression on different myeloid cells by LPS is not yet understood. Further investigations are necessary.

Literaturverzeichnis

- [1] S. Amend, K. Valkenburg, and K. Pienta. Murine hind limb long bone dissection and bone marrow isolation. *J. Vis. Exp.*, 110:e53936, 2016.
- [2] A. Assouvie, L. Daley-Bauer, and G. Rousselet. Growing murine bone marrow-derived macrophages. *Methods Mol. Biol.*, 1784:29–33, 2018.
- [3] M. Azuma, D. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. Phillips, L. Lanier, and C. Somoza. B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature*, 366(6450):76–79, 1993.
- [4] J. Babon, L. Varghese, and N. Nicola. Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Semin. Immunol.*, 26(1):13–19, 2014.
- [5] P. Baran, S. Hansen, G. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H. Huber, M. Ahmadian, J. Moll, and J. Scheller. The balance of interleukin (IL)-6, IL-6 · soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6 · sIL-6R · sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling. *J. Biol. Chem.*, 293(18):6762–6775, 2018.
- [6] J. Bazan. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(18):6934–6938, 1990.
- [7] B. Becher, S. Tugues, and M. Greter. GM-CSF: From growth factor to central mediator of tissue inflammation. *Immunity*, 45(5):963–973, 2016.
- [8] L. Boyette, C. Macedo, K. Hadi, B. Elinoff, J. Walters, B. Ramaswami, G. Chalasani, J. Taboas, F. Lakkis, and D. Metes. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*, 12(4):e0176460, 2017.
- [9] M. Brizzi, M. Aronica, A. Rosso, G. Bagnara, Y. Yarden, and L. Pegoraro. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates JAK2 signaling pathway and rapidly activates p93fes, STAT1 p91, and STAT3 p92 in polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.*, 271(7):3562–3567, 1996.
- [10] H. Broxmeyer. Biomolecule-cell interactions and the regulation of myelopoiesis. *Int. J. Cell Cloning*, 4(6):378–405, 1986.
- [11] A. Cabron, K. El azzouzi, M. Boss, P. Arnold, J. Schwarz, M. Rosas, J. Dobert, E. Pavlenko, N. Schumacher, T. Renné, P. Taylor, S. Linder, S. Rose-John, and F. Zunke. Structural and functional analyses of the shedding protease ADAM17 in HoxB8-immortalized macrophages and dendritic-like cells. *J. Immunol.*, 201(10):3106–3118, 2018.
- [12] C.-X. Chen, F. Hu, J. Wei, L.-t. Yuan, T.-m. Wen, R. Gale, and Y. Liang. Systematic review and meta-analysis of tocilizumab in persons with coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Leukemia*, 35(6):1661–1670, 2021.

- [13] L. Chen, S. Wang, Y. Wang, W. Zhang, K. Ma, C. Hu, H. Zhu, S. Liang, M. Liu, and N. Xu. IL-6 influences the polarization of macrophages and the formation and growth of colorectal tumor. *Oncotarget*, 9(25):17443–17454, 2018.
- [14] P. Chomarat, J. Banchereau, J. Davoust, and A. Karolina Palucka. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.*, 1(6):510–514, 2000.
- [15] E. Choy and S. Rose-John. Interleukin-6 as a multifunctional regulator: Inflammation, immune response, and fibrosis. *J. Scleroderma Relat. Disord.*, 2:S1–S5, 2017.
- [16] S. Coecke, M. Balls, G. Bowe, J. Davis, G. Gstraunthaler, T. Hartung, R. Hay, O. Merten, A. Price, L. Schechtman, G. Stacey, and W. Stokes. Guidance on good cell culture practice. A report of the second ECVAM task force on good cell culture practice. *Altern. Lab. Anim.*, 33(3):261–287, 2005.
- [17] A. Coons, H. Creech, R. Jones, and E. Berliner. The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody. *J. Immunol.*, 45(3):159–170, 1942.
- [18] S. Copeland, H. Warren, S. Lowry, S. Calvano, and D. Remick. Acute inflammatory response to endotoxin in mice and humans. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 12(1):60–67, 2005.
- [19] A. Corthay, D. Skovseth, K. Lundin, E. Røsjø, H. Omholt, P. Hofgaard, G. Haraldsen, and B. Bogen. Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells. *Immunity*, 22(3):371–383, 2005.
- [20] A. Costa-Pereira, S. Tininini, B. Strobl, T. Alonzi, J. Schlaak, H. Is’harc, I. Gesualdo, S. Newman, I. Kerr, and V. Poli. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon- γ -like response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99(12):8043–8047, 2002.
- [21] A. da Silva, H. Kaulbach, F. Chuidian, D. Lambert, A. Suffredini, and R. Danner. Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin. *N. Engl. J. Med.*, 328(20):1457–1460, 1993.
- [22] J. Däbritz, T. Weinhage, G. Varga, T. Wirth, K. Walscheid, A. Brockhausen, D. Schwarzmaier, M. Brückner, M. Ross, D. Bettenworth, J. Roth, J. Ehrchen, and D. Foell. Reprogramming of monocytes by GM-CSF contributes to regulatory immune functions during intestinal inflammation. *J. Immunol.*, 194(5):2424–2438, 2015.
- [23] P. Dekkers, N. Juffermans, T. ten Hove, E. de Jonge, S. van Deventer, and T. van der Poll. Endotoxin down-regulates monocyte and granulocyte interleukin-6 receptors without influencing gp130 expression in humans. *J. Infect. Dis.*, 181(3):1055–1061, 2000.
- [24] L. Delamarre, M. Pack, H. Chang, I. Mellman, and E. Trombetta. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, 307(5715):1630–1634, 2005.
- [25] C. Dinarello. The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor. *Immunol. Lett.*, 16(3):227–231, 1987.

- [26] E. Dittrich, C. Haft, L. Muys, P. Heinrich, and L. Graeve. A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.*, 271(10):5487–5494, 1996.
- [27] E. Dittrich, S. Rose-John, C. Gerhartz, J. Müllberg, T. Stoyan, K. Yasukawa, P. Heinrich, and L. Graeve. Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.*, 269(29):19014–19020, 1994.
- [28] W. Dittrich and W. Gohde. Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen. *Z. Naturforsch. B*, 24(3):360–361, 1969.
- [29] W. Drobyski, M. Pasquini, K. Kovatovic, J. Palmer, J. Douglas Rizzo, A. Saad, W. Saber, and P. Hari. Tocilizumab for the treatment of steroid refractory graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 17(12):1862–1868, 2011.
- [30] L. Falk, L. Wahl, and S. Vogel. Analysis of Ia antigen expression in macrophages derived from bone marrow cells cultured in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or macrophage colony-stimulating factor. *J. Immunol.*, 140(8):2652–2660, 1988.
- [31] M. Fernando, J. Reyes, J. Iannuzzi, G. Leung, and D. McKay. The pro-inflammatory cytokine, interleukin-6, enhances the polarization of alternatively activated macrophages. *PLoS One*, 9(4):e94188, 2014.
- [32] C. Fleischmann, D. Thomas-Rueddel, M. Hartmann, C. Hartog, T. Welte, S. Heublein, U. Dennler, and K. Reinhart. Hospital incidence and mortality rates of sepsis. *Dtsch. Ärztebl. Int.*, 113(10):159–166, 2016.
- [33] C. Flynn, B. Kespohl, T. Daunke, Y. Garbers, S. Düsterhöft, S. Rose-John, J. Haybaeck, J. Lokau, S. Aparicio-Siegmund, and C. Garbers. Interleukin-6 controls recycling and degradation, but not internalization of its receptors. *J. Biol. Chem.*, 296:100434, 2021.
- [34] X. Fu, W. Duan, C. Su, F. Mao, Y. Lv, Y. Teng, P. Yu, Y. Zhuang, and Y. Zhao. Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression. *Cancer Immunol Immunother*, 66(12):1597–1608, 2017.
- [35] T. Fukada, M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima, and T. Hirano. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity*, 5(5):449–460, 1996.
- [36] C. Gabay. Interleukin-6 and chronic inflammation. *Arthritis Res. Ther.*, 8 Suppl 2(Suppl 2):S3, 2006.
- [37] Y. Gao, T. Li, M. Han, X. Li, D. Wu, Y. Xu, Y. Zhu, Y. Liu, X. Wang, and L. Wang. Diagnostic utility of clinical laboratory data determinations for patients with the severe COVID-19. *J. Med. Virol.*, 92(7):791–796, 2020.
- [38] R. Garman, K. Jacobs, S. Clark, and D. Raulet. B-cell-stimulatory factor 2 (β 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(21):7629–7633, 1987.

- [39] C. Gerhartz, B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P. Heinrich, and L. Graeve. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130: I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J. Biol. Chem.*, 271(22):12991–12998, 1996.
- [40] A. Grahnert, R. Weiss, E. Schilling, N. Stanslowsky, U. Sack, and S. Hauschildt. CD14 counterregulates lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production in a macrophage subset. *J. Innate Immun.*, 11(4):359–374, 2019.
- [41] D. Green, A. Nunes, V. David-Ocampo, I. Ekwede, N. Houston, S. Highfill, H. Khuu, D. Stroncek, S. Steinberg, K. Zoon, and C. Annunziata. A phase 1 trial of autologous monocytes stimulated ex vivo with Sylatron® (Peginterferon α -2b) and Actimmune® (Interferon γ -1b) for intra-peritoneal administration in recurrent ovarian cancer. *J. Transl. Med.*, 16(1):196, 2018.
- [42] S. C. C. T. Group. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med.*, 42(12):1980–1989, 2016.
- [43] J. Grötzinger, T. Kernebeck, K. Kallen, and S. Rose-John. IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol. Chem.*, 380(7-8):803–813, 1999.
- [44] S. Grupp, M. Kalos, D. Barrett, R. Aplenc, D. Porter, S. Rheingold, D. Teachey, A. Chew, B. Hauck, J. Wright, M. Milone, B. Levine, and C. June. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 368(16):1509–1518, 2013.
- [45] M. Guha and N. Mackman. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.*, 13(2):85–94, 2001.
- [46] O. Haabeth, K. Lorvik, C. Hammarström, I. Donaldson, G. Haraldsen, B. Bogen, and A. Corthay. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat. Commun.*, 2(1):240, 2011.
- [47] S. Ham, L. Lima, E. Chai, A. Muller, R. Lobb, S. Krumeich, S. Wen, A. Wiegmanns, and A. Möller. Breast cancer-derived exosomes alter macrophage polarization via gp130/STAT3 signaling. *Front Immunol*, 9:871, 2018.
- [48] P. Heinrich, I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.*, 334 (Pt 2)(Pt 2):297–314, 1998.
- [49] D. Helfgott, S. Tatter, U. Santhanam, R. Clarick, N. Bhardwaj, L. May, and P. Sehgal. Multiple forms of IFN- β ₂/IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection. *J. Immunol.*, 142(3):948–953, 1989.
- [50] J. Helft, J. Böttcher, P. Chakravarty, S. Zelenay, J. Huotari, B. Schraml, D. Goubau, and C. Reis e Sousa. GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c⁺MHCII⁺ macrophages and dendritic cells. *Immunity*, 42(6):1197–1211, 2015.

- [51] S. Hergovits. *Relevanz der gp130 Endozytose bei der Maturierung und Differenzierung dendritischer Zellen sowie Charakterisierung des molekularen Mechanismus der OSM-vermittelten Induktion antiviraler Gene*. Dissertation, Universität Würzburg, 2017.
- [52] H. Hermanns, J. Wohlfahrt, C. Mais, S. Hergovits, D. Jahn, and A. Geier. Endocytosis of pro-inflammatory cytokine receptors and its relevance for signal transduction. *Biol. Chem.*, 397(8):695–708, 2016.
- [53] T. Hirano, T. Taga, T. Matsuda, M. Hibi, S. Suematsu, B. Tang, M. Murakami, and T. Kishimoto. Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis. *Int. J. Cell Cloning*, 8 Suppl 1:155–166; discussion 166–157, 1990.
- [54] T. Hirano, T. Taga, N. Nakano, K. Yasukawa, S. Kashiwamura, K. Shimizu, K. Nakajima, K. Pyun, and T. Kishimoto. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82(16):5490–5494, 1985.
- [55] T. Hirano, K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi, and T. Kishimoto. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324(6092):73–76, 1986.
- [56] G. Hoeffel, Y. Wang, M. Greter, P. See, P. Teo, B. Malleret, M. Leboeuf, D. Low, G. Oller, F. Almeida, S. Choy, M. Grisotto, L. Renia, S. Conway, E. Stanley, J. Chan, L. Ng, I. Samokhvalov, M. Merad, and F. Ginhoux. Adult langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J. Exp. Med.*, 209(6):1167–1181, 2012.
- [57] K. Hoshino, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.*, 162(7):3749–3752, 1999.
- [58] C. Hunter and S. Jones. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.*, 16(5):448–457, 2015.
- [59] Y. Ibrahim, R. Moussa, A. Bayoumi, and A. Ahmed. Tocilizumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of sepsis via down-regulation of NF- κ B/JNK: a possible role of P-glycoprotein. *Inflammopharmacology*, 28(1):215–230, 2020.
- [60] P. Igaz, A. Horváth, B. Horváth, C. Szalai, E. Pállinger, E. Rajnavölgyi, S. Tóth, S. Rose-John, and A. Falus. Soluble interleukin-6 receptor (sIL-6R) makes IL-6R negative T cell line respond to IL-6; it inhibits TNF production. *Immunol. Lett.*, 71(3):143–148, 2000.
- [61] K. Inaba, M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. Steinman. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.*, 176(6):1693–1702, 1992.

- [62] A. Iwasaki and R. Medzhitov. Biorender: Dendritic cells stimulate Tfh differentiation. <https://app.biorender.com/biorender-templates/t-6009c1940627dc02272eaea5-dendritic-cells-stimulate-tfh-differentiation>, 2021. Letzter Zugriff am 16.09.2021.
- [63] P. Jeannin, L. Paolini, C. Adam, and Y. Delneste. The roles of CSFs on the functional polarization of tumor-associated macrophages. *FEBS J.*, 285(4):680–699, 2018.
- [64] M. Jones, L. Quinton, B. Simms, M. Lupa, M. Kogan, and J. Mizgerd. Roles of interleukin-6 in activation of STAT proteins and recruitment of neutrophils during *Escherichia coli* pneumonia. *J. Infect. Dis.*, 193(3):360–369, 2006.
- [65] S. Jones. Directing transition from innate to acquired immunity: Defining a role for IL-6. *The Journal of Immunology*, 175(6):3463–3468, 2005.
- [66] T. Jostock, J. Müllberg, S. Özbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. Neurath, and S. Rose-John. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.*, 268(1):160–167, 2001.
- [67] A. Kaptein, V. Paillard, and M. Saunders. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 271(11):5961–5964, 1996.
- [68] S. Kasper, T. Kindler, S. Sonnenschein, F. Breitenbuecher, F. Böhmer, C. Huber, and T. Fischer. Cross-inhibition of interferon-induced signals by GM-CSF through a block in Stat1 activation. *J. Interferon Cytokine Res.*, 27(11):947–959, 2007.
- [69] B. Kelly, A. McCoy, K. Späte, S. Miller, P. Evans, S. Höning, and D. Owen. A structural explanation for the binding of endocytic dileucine motifs by the AP2 complex. *Nature*, 456(7224):976–979, 2008.
- [70] T. Kishimoto. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int. Immunol.*, 22(5):347–352, 2010.
- [71] H. Kitamura, H. Kamon, S. Sawa, S. Park, N. Katunuma, K. Ishihara, M. Murakami, and T. Hirano. IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II $\alpha\beta$ dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity*, 23(5):491–502, 2005.
- [72] K. Kleppe, E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, and H. Khorana. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.*, 56(2):341–361, 1971.
- [73] M. Köller, M. Willheim, W. Krugluger, M. Kurz, P. Höcker, O. Förster, and G. Boltz-Nitulescu. Immunophenotyping of human bone marrow-derived macrophages. *Scand. J. Immunol.*, 43(6):626–632, 1996.
- [74] R. Kotloff, J. Little, and J. Elias. Human alveolar macrophage and blood monocyte interleukin-6 production. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 3(5):497–505, 1990.
- [75] J. Kyhse-Andersen. Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 10(3-4):203–209, 1984.

- [76] M. Lacroix, F. Rousseau, F. Guilhot, P. Malinge, G. Magistrelli, S. Herren, S. Jones, G. Jones, J. Scheller, R. Lissilaa, M. Kosco-Vilbois, Z. Johnson, V. Buatois, and W. Ferlin. Novel insights into interleukin 6 (IL-6) cis- and trans-signaling pathways by differentially manipulating the assembly of the IL-6 signaling complex. *J. Biol. Chem.*, 290(45):26943–26953, 2015.
- [77] U. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680–685, 1970.
- [78] D. Lee, R. Gardner, D. Porter, C. Louis, N. Ahmed, M. Jensen, S. Grupp, and C. Mackall. Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome. *Blood*, 124(2):188–195, 2014.
- [79] U. Lehmann, J. Schmitz, M. Weissenbach, R. Sobota, M. Hörtnner, K. Friederichs, I. Behrmann, W. Tsiaris, A. Sasaki, J. Schneider-Mergener, A. Yoshimura, B. Neel, P. Heinrich, and F. Schaper. SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *J. Biol. Chem.*, 278(1):661–671, 2003.
- [80] B. Liu, J. Liao, X. Rao, S. Kushner, C. Chung, D. Chang, and K. Shuai. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95(18):10626–10631, 1998.
- [81] N. Lotfi, G. Zhang, N. Esmail, and A. Rostami. Evaluation of the effect of GM-CSF blocking on the phenotype and function of human monocytes. *Sci. Rep.*, 10(1):1567, 2020.
- [82] C. Lütticken, U. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A. Harpur, A. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, and et al. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, 263(5143):89–92, 1994.
- [83] M. Lutz, N. Kukutsch, A. Ogilvie, S. Rossner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods*, 223(1):77–92, 1999.
- [84] C. Marsik, T. Halama, F. Cardona, I. Schlifke, F. Mittermayer, and B. Jilma. Endotoxemia enhances expression of the signaling receptor (gp130) on protein and molecular level. *Clin. Immunol.*, 114(3):293–298, 2005.
- [85] J. Martinez-Fabregas, S. Wilmes, L. Wang, M. Hafer, E. Pohler, J. Lokau, C. Garbers, A. Cozzani, P. Fyfe, J. Piehler, M. Kazemian, S. Mitra, and I. Moraga. Kinetics of cytokine receptor trafficking determine signaling and functional selectivity. *eLife*, 8:e49314, 2019.
- [86] A. Mauermann. *Entstehung des humanen löslichen Interleukin-6 Rezeptors während der Makrophagendifferenzierung*. Dissertation, Universität Kiel, 2018.
- [87] P. May, U. Schniertshauer, C. Gerhartz, F. Horn, and P. Heinrich. Signal transducer and activator of transcription STAT3 plays a major role in gp130-mediated acute phase protein gene activation. *Acta Biochim. Pol.*, 50(3):595–601, 2003.
- [88] B. Memoli, G. Grandaliano, M. Soccio, L. Postiglione, B. Guida, V. Bisesti, P. Esposito, A. Procino, D. Marrone, A. Michael, M. Andreucci, F. Schena, and G. Pertosa. *In vivo*

- modulation of soluble “antagonistic“ IL-6 receptor synthesis and release in ESRD. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16(4):1099–1107, 2005.
- [89] E. Metchnikoff. *Leçons sur la pathologie comparée de l’inflammation: faites à l’Institut Pasteur en avril et mai 1891*. G. Masson, 1892.
- [90] S. Mia, A. Warnecke, X. Zhang, V. Malmström, and R. Harris. An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- β yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand. J. Immunol.*, 79(5):305–314, 2014.
- [91] G. Miozzari, P. Niederberger, and R. Hutter. Permeabilization of microorganisms by Triton X-100. *Anal. Biochem.*, 90(1):220–233, 1978.
- [92] H. Mitani, N. Katayama, H. Araki, K. Ohishi, K. Kobayashi, H. Suzuki, K. Nishii, M. Masuya, K. Yasukawa, N. Minami, and H. Shiku. Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br. J. Haematol.*, 109(2):288–295, 2000.
- [93] T. Mosmann, H. Cherwinski, M. Bond, M. Giedlin, and R. Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 136(7):2348–2357, 1986.
- [94] K. Murphy, C. Weaver, and L. Seidler. *Janeway Immunologie*. Springer Berlin Heidelberg, 2018.
- [95] P. Murray, J. Allen, S. Biswas, E. Fisher, D. Gilroy, S. Goerdts, S. Gordon, J. Hamilton, L. Ivashkiv, T. Lawrence, M. Locati, A. Mantovani, F. Martinez, J. Mege, D. Mosser, G. Natoli, J. Saeij, J. Schultze, K. Shirey, A. Sica, J. Suttles, I. Udalova, J. van Ginderachter, S. Vogel, and T. Wynn. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity*, 41(1):14–20, 2014.
- [96] H. Nakashima, K. Miyake, C. Clark, J. Bekisz, J. Finbloom, S. Husain, S. Baron, R. Puri, and K. Zoon. Potent antitumor effects of combination therapy with IFNs and monocytes in mouse models of established human ovarian and melanoma tumors. *Cancer Immunol. Immunother.*, 61(7):1081–1092, 2012.
- [97] G. Niu, J. Xu, W. Yuan, J. Sun, M. Yang, Z. He, X. Zhao, and J. Wang. Protein inhibitor of activated STAT (PIAS) negatively regulates the JAK/STAT pathway by inhibiting STAT phosphorylation and translocation. *Front. Immunol.*, 9:2392, 2018.
- [98] U. Novak, A. Harpur, L. Paradiso, V. Kanagasundaram, A. Jaworowski, A. Wilks, and J. Hamilton. Colony-stimulating factor 1–induced STAT1 and STAT3 activation is accompanied by phosphorylation of Tyk2 in macrophages and Tyk2 and JAK1 in fibroblasts. *Blood*, 86(8):2948–2956, 1995.
- [99] S. Park, T. Nakagawa, H. Kitamura, T. Atsumi, H. Kamon, S. Sawa, D. Kamimura, N. Ueda, Y. Iwakura, K. Ishihara, M. Murakami, and T. Hirano. IL-6 regulates *in vivo* dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J. Immunol.*, 173(6):3844–3854, 2004.

- [100] M. Peters, G. Blinn, F. Solem, M. Fischer, K. Meyer zum Büschenfelde, and S. Rose-John. In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine hyper-IL-6. *J. Immunol.*, 161(7):3575–3581, 1998.
- [101] J. Pfeifer, M. Wick, D. Russell, S. Normark, and C. Harding. Recombinant *Escherichia coli* express a defined, cytoplasmic epitope that is efficiently processed in macrophage phagolysosomes for class II MHC presentation to T lymphocytes. *J. Immunol.*, 149(8):2576–2584, 1992.
- [102] C. Pitcher, S. Höning, A. Fingerhut, K. Bowers, and M. Marsh. Cluster of differentiation antigen 4 (CD4) endocytosis and adaptor complex binding require activation of the CD4 endocytosis signal by serine phosphorylation. *Mol. Biol. Cell*, 10(3):677–691, 1999.
- [103] Y. Qi, Y. Huang, H. Wang, Y. Zhang, Y. Bao, L. Sun, Y. Wu, C. Yu, Z. Song, L. Zheng, Y. Sun, G. Wang, and Y. Li. Elucidating the crosstalk mechanism between IFN- γ and IL-6 via mathematical modelling. *BMC Bioinformatics*, 14(1):41, 2013.
- [104] B.-Z. Qian and J. Pollard. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*, 141(1):39–51, 2010.
- [105] S. Radtke, S. Wüller, X. Yang, B. Lippok, B. Mütze, C. Mais, H. de Leur, J. Bode, M. Gaestel, P. Heinrich, I. Behrmann, F. Schaper, and H. Hermanns. Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *J. Cell Sci.*, 123(6):947–959, 2010.
- [106] F. Re, S. Belyanskaya, R. Riese, B. Cipriani, F. Fischer, F. Granucci, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Brosnan, L. Stern, J. Strominger, and L. Santambrogio. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces an expression program in neonatal microglia that primes them for antigen presentation. *J. Immunol.*, 169(5):2264–2273, 2002.
- [107] H. Reeh, N. Rudolph, U. Billing, H. Christen, S. Streif, E. Bullinger, M. Schliemann-Bullinger, R. Findeisen, F. Schaper, H. Huber, and A. Dittrich. Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor α to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling. *Cell Commun. Signal.*, 17(1):46, 2019.
- [108] J. Ricarte-Bratti, N. Brizuela, N. Jaime-Albarran, and H. Montrull. IL-6, MMP 3 and prognosis in previously healthy sepsis patients. *Rev. Fac. Cienc. Med. Cordoba*, 74(2):99–106, 2017.
- [109] I. Rosas, N. Bräu, M. Waters, R. Go, B. Hunter, S. Bhagani, D. Skiest, M. Aziz, N. Cooper, I. Douglas, S. Savic, T. Youngstein, L. Del Sorbo, A. Cubillo Gracian, D. De La Zerda, A. Ustianowski, M. Bao, S. Dimonaco, E. Graham, B. Matharu, H. Spotswood, L. Tsai, and A. Malhotra. Tocilizumab in hospitalized patients with severe Covid-19 pneumonia. *N. Engl. J. Med.*, 384(16):1503–1516, 2021.
- [110] M. Roussel, J. Ferrell, PB, A. Greenplate, F. Lhomme, S. Le Gallou, K. Diggins, D. Johnson, and J. Irish. Mass cytometry deep phenotyping of human mononuclear phagocytes and myeloid-derived suppressor cells from human blood and bone marrow. *J. Leukoc. Biol.*, 102(2):437–447, 2017.

- [111] F. Sabin, R. Cunningham, and C. Doan. Discrimination of two types of phagocytic cells in the connective tissues by the supravital technique. *Contrib. Embryol.*, 16:127–162, 1925.
- [112] R. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. Mullis, G. Horn, H. Erlich, and N. Arnheim. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, 1985.
- [113] L. Sanmarco, N. Ponce, L. Visconti, N. Eberhardt, M. Theumer, R. Minguez, and M. Aoki. IL-6 promotes M2 macrophage polarization by modulating purinergic signaling and regulates the lethal release of nitric oxide during *Trypanosoma cruzi* infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(4):857–869, 2017.
- [114] A. Sasaki, H. Yasukawa, A. Suzuki, S. Kamizono, T. Syoda, I. Kinjyo, M. Sasaki, J. Johnston, and A. Yoshimura. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. *Genes Cells*, 4(6):339–351, 1999.
- [115] D. Schmidt-Arras and S. Rose-John. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy. *J. Hepatol.*, 64(6):1403–1415, 2016.
- [116] K. Shuai, G. Stark, I. Kerr, and J. Darnell. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon- γ . *Science*, 261(5129):1744–1746, 1993.
- [117] M. Singer, C. Deutschman, C. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. Bernard, J. Chiche, C. Coopersmith, R. Hotchkiss, M. Levy, J. Marshall, G. Martin, S. Opal, G. Rubenfeld, T. van der Poll, J. Vincent, and D. Angus. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8):801–810, 2016.
- [118] J. Song, D. Park, S. Moon, H. Cho, J. Park, H. Seok, and W. Choi. Diagnostic and prognostic value of interleukin-6, pentraxin 3, and procalcitonin levels among sepsis and septic shock patients: a prospective controlled study according to the Sepsis-3 definitions. *BMC Infect. Dis.*, 19(1):968, 2019.
- [119] N. Stahl, T. Boulton, T. Farruggella, N. Ip, S. Davis, B. Witthuhn, F. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, and et al. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. *Science*, 263(5143):92–95, 1994.
- [120] R. Starr, T. Willson, E. Viney, L. Murray, J. Rayner, B. Jenkins, T. Gonda, W. Alexander, D. Metcalf, N. Nicola, and D. Hilton. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature*, 387(6636):917–921, 1997.
- [121] D. Stoiber, P. Kovarik, S. Cohny, J. Johnston, P. Steinlein, and T. Decker. Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN- γ . *J. Immunol.*, 163(5):2640–2647, 1999.
- [122] J. Stone, M. Frigault, N. Serling-Boyd, A. Fernandes, L. Harvey, A. Foulkes, N. Horick, B. Healy, R. Shah, A. Bensaci, A. Woolley, S. Nikiforow, N. Lin, M. Sagar, H. Schragger, D. Huckins, M. Axelrod, M. Pincus, J. Fleisher, C. Sacks, M. Dougan, C. North, Y. Halvorsen, T. Thurber, Z. Dagher, A. Scherer, R. Wallwork, A. Kim, S. Schoenfeld,

- P. Sen, T. Neilan, C. Perugino, S. Unizony, D. Collier, M. Matza, J. Vinh, K. Bowman, E. Meyerowitz, A. Zafar, Z. Drobni, M. Bolster, M. Kohler, K. D'Silva, J. Dau, M. Lockwood, C. Cubbison, B. Weber, and M. Mansour. Efficacy of Tocilizumab in patients hospitalized with Covid-19. *N. Engl. J. Med.*, 383(24):2333–2344, 2020.
- [123] Y. Suzuki, M. Orellana, R. Schreiber, and J. Remington. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science*, 240(4851):516–518, 1988.
- [124] T. Taga, M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, 58(3):573–581, 1989.
- [125] Y. Tanaka, N. Tanaka, Y. Saeki, K. Tanaka, M. Murakami, T. Hirano, N. Ishii, and K. Sugamura. c-Cbl-dependent monoubiquitination and lysosomal degradation of gp130. *Mol Cell Biol*, 28(15):4805–4818, 2008.
- [126] D. Teachey, S. Rheingold, S. Maude, G. Zugmaier, D. Barrett, A. Seif, K. Nichols, E. Suppa, M. Kalos, R. Berg, J. Fitzgerald, R. Aplenc, L. Gore, and S. Grupp. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood*, 121(26):5154–5157, 2013.
- [127] P. Thao, T. Tra, N. Son, and K. Wada. Reduction in the IL-6 level at 24 h after admission to the intensive care unit is a survival predictor for Vietnamese patients with sepsis and septic shock: a prospective study. *BMC Emerg. Med.*, 18(1):39, 2018.
- [128] S. Thiel, I. Behrmann, E. Dittrich, L. Muys, J. Tavernier, J. Wijdenes, C. Heinrich, and L. Graeve. Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem. J.*, 330(1):47–54, 1998.
- [129] S. Thiel, H. Dahmen, A. Martens, G. Müller-Newen, F. Schaper, P. Heinrich, and L. Graeve. Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett.*, 441(2):231–234, 1998.
- [130] M. Uhlén, L. Fagerberg, B. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Pontén. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220):1260419, 2015.
- [131] I. Ushach and A. Zlotnik. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *J. Leukoc. Biol.*, 100(3):481–489, 2016.
- [132] S. van Deventer, H. Büller, J. ten Cate, L. Aarden, C. Hack, and A. Sturk. Experimental endotoxemia in humans: analysis of cytokine release and coagulation, fibrinolytic, and complement pathways. *Blood*, 76(12):2520–2526, 1990.
- [133] R. van Furth, Z. Cohn, J. Hirsch, J. Humphrey, W. Spector, and H. Langevoort. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull. World Health Organ.*, 46(6):845–852, 1972.

- [134] B. Wang, Q. Li, L. Qin, S. Zhao, J. Wang, and X. Chen. Transition of tumor-associated macrophages from MHC class II^{hi} to MHC class II^{low} mediates tumor progression in mice. *BMC Immunol.*, 12:43, 2011.
- [135] C. Wang, X. Yu, Q. Cao, Y. Wang, G. Zheng, T. Tan, H. Zhao, Y. Zhao, Y. Wang, and D. Harris. Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol.*, 14(1):6, 2013.
- [136] Y. Wang and G. Fuller. Phosphorylation and internalization of gp130 occur after IL-6 activation of Jak2 kinase in hepatocytes. *Mol. Biol. Cell*, 5(7):819–828, 1994.
- [137] U. Wegenka, J. Buschmann, C. Lütticken, P. Heinrich, and F. Horn. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell. Biol.*, 13(1):276–288, 1993.
- [138] J. Wenzel, J. Ouderkerk, M. Krendel, and R. Lang. Class I myosin Myo1e regulates TLR4-triggered macrophage spreading, chemokine release, and antigen presentation via MHC class II. *Eur. J. Immunol.*, 45(1):225–237, 2015.
- [139] S. Wilmes, P. Jeffrey, J. Martinez-Fabregas, M. Hafer, P. Fyfe, E. Pohler, S. Gaggero, M. López-García, G. Lythe, C. Taylor, T. Guerrier, D. Launay, S. Mitra, J. Piehler, C. Molina-París, and I. Moraga. Competitive binding of STATs to receptor phospho-Tyr motifs accounts for altered cytokine responses. *Elife*, 10, 2021.
- [140] S. Wormald, J. Zhang, D. Krebs, L. Mielke, J. Silver, W. Alexander, T. Speed, N. Nicola, and D. Hilton. The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling. *J. Biol. Chem.*, 281(16):11135–11143, 2006.
- [141] I. Yan, J. Schwarz, K. Lücke, N. Schumacher, V. Schumacher, S. Schmidt, B. Rabe, P. Saftig, M. Donners, S. Rose-John, H. 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. *J. Leukoc. Biol.*, 99(5):749–760, 2016.
- [142] T. Yin, R. Shen, G. Feng, and Y. Yang. Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.*, 272(2):1032–1037, 1997.
- [143] S. Yona, K. Kim, Y. Wolf, A. Mildner, D. Varol, M. Breker, D. Strauss-Ayali, S. Viukov, M. Guillemins, A. Misharin, D. Hume, H. Perlman, B. Malissen, E. Zelzer, and S. Jung. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*, 38(1):79–91, 2013.
- [144] Z. Zha, F. Bucher, A. Nejatfard, T. Zheng, H. Zhang, K. Yea, and R. Lerner. Interferon- γ is a master checkpoint regulator of cytokine-induced differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114(33):E6867–e6874, 2017.

Danksagungen

Diese Arbeit wäre ohne vielseitige Unterstützung und ohne die guten Arbeitsbedingungen, die ich im Hepatologischen Forschungslabor vorgefunden habe, nicht möglich gewesen.

Mein Dank gilt an erster Stelle meiner Doktormutter PD Dr. Heike Hermanns für die Überlassung des spannenden Promotionsthemas. Durch die stringente Projektplanung, die gute Einarbeitung sowie die kritischen und motivierenden Anregungen in allen Phasen des Promotionsprojektes konnte ich so erstmalig selbstständig wissenschaftlich arbeiten. Auch für die Möglichkeit der Teilnahme am Kurs Tierschutz und Versuchstierkunde möchte ich mich bedanken.

Prof. Dr. Andreas Geier danke ich für die Aufnahme in das Hepatologische Forschungslabor, die interessanten Diskussionen im Arbeitsgruppenseminar und die Übernahme der Zweitbetreuung. Auch PD Dr. Niklas Beyersdorf möchte ich für die Teilnahme an meinem Promotionskomitee und die Anregungen danken.

Donata Dorbath und Dr. Daniel Jahn danke ich für die Einarbeitung, die Hilfsbereitschaft und die technischen und fachlichen Ratschläge. Dr. Martha-Lena Müller danke ich für die Unterstützung bei der Durchflusszytometrie. Bei Kerstin Schmid, Janine Garbisch und Philipp Lederer möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre während der vielen gemeinsamen Laborstunden bedanken.

Der Studienstiftung des deutschen Volkes und der Graduate School of Life Sciences der Universität Würzburg danke ich für die finanzielle und ideelle Unterstützung meines Studiums und meiner Promotion.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Dr. Elisabeth und Martin Reinsberg, danke ich für ihr Vertrauen, ihren Ratschlag und die Ermutigung bei all meinen Vorhaben. Meinem Freundeskreis danke ich für die Verbundenheit und die gemeinsamen Erlebnisse und Erfahrungen außerhalb der Welt der Wissenschaft.

Curriculum Vitae

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation *Die Bedeutung des gp130-Internalisierungsmotivs für IL-6-vermittelte Signale und das Antigenpräsentationspotential muriner Knochenmarksmakrophagen* eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled *Relevance of the gp130 internalization motif for IL-6 signaling and antigen-presenting capacity of murine bone marrow-derived macrophages* is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature