



**Relevanz der gp130 Endozytose bei der Maturierung und
Differenzierung dendritischer Zellen sowie Charakterisierung des
molekularen Mechanismus der OSM-vermittelten Induktion
antiviraler Gene**

**Relevance of the IL-6 receptor gp130 endocytosis during dendritic cell
maturation and activation as well as characterization of the molecular
mechanism of OSM-mediated antiviral gene induction**

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

Klasse: Biomedizin

Vorgelegt von
Frau Diplom Biologin

Sabine Hergovits, geb. Walter

aus
Kahla

Würzburg 2017

Eingereicht am: 09. März 2016

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Müller

1. Betreuer: PD Dr. Heike M. Hermanns AOR

2. Betreuer: Prof. Dr. Manfred B. Lutz

3. Betreuer: Prof. Dr. Svenja Meierjohann

Tag des Promotionskolloquiums: 20. Juni 2017

Doktorurkunde ausgehändigt am: 20. Juni 2017

You will only be great at things you love to do
don't pursue a career in something you hate to do.

— Dave Grohl —

ZUSAMMENFASSUNG

Interleukin-6 (IL-6)-Typ Zytokine, allen voran IL-6 und Oncostatin M (OSM), besitzen pleiotrope Eigenschaften und spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse. Als Akutphaseinduktoren sind IL-6 und OSM an der Initialisierung entzündlicher und immunologischer Prozesse beteiligt, können aber ebenso die Differenzierung und das Zellwachstum beeinflussen. Ihre biologische Wirkung vermitteln sie über die Bindung an einen multimeren Rezeptorkomplex. Dieser weist im Fall von IL-6 eine hexamere Struktur auf und besteht aus je zwei Molekülen des Glykoproteins 130 (gp130), des IL-6 α -Rezeptors (IL-6R) und IL-6. Der Rezeptor von OSM hingegen ist ein Heterodimer und besteht aus gp130 und dem OSM Rezeptor (OSMR) oder aber aus gp130 und dem *leukemia inhibitory factor* (LIF) Rezeptor (LIFR). Die Zytokine der IL-6-Familie vermitteln die Induktion des Jak/STAT (Januskinase/*signal transducer and activator of transcription*), PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-Kinasen/*AKR thymoma oncogene homolog*) und MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) Signalwegs. Da eine unkontrollierte Aktivierung dieser Signalkaskaden jedoch zu chronisch entzündlichen Erkrankungen oder abnormen Zellwachstum führen kann, ist eine Regulation durch verschiedene Rückkopplungsmechanismen essentiell. Neben der Rekrutierung inhibitorisch wirkender Proteine, wie den Mitgliedern der SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) Familie und Tyrosinphosphatasen, gilt die Rezeptorinternalisierung als regulierender Mechanismus.

Der erste Teil der vorliegenden Dissertation geht der Fragestellung nach, wie die Expression des IL-6-Rezeptors während der Differenzierung und Maturierung dendritischer Zellen (DZ) reguliert ist und welche Relevanz die gp130-Internalisierung bei diesen Entwicklungsprozessen spielt.

DZ gehören zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) und gelten als Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Sie spielen insbesondere bei der Polarisation der T-Helferzellen (Th1, Th2, Th17, Treg) eine wichtige Rolle. DZ repräsentieren eine heterogene Zellpopulation, die auf Basis ihrer Entstehung, ihres Vorkommens und/oder ihrer Funktionen in verschiedene Subtypen unterteilt werden und sich u.a. durch die Expression bestimmter Oberflächenmarker unterscheiden lassen. Es ist bekannt, dass DZ sowohl gp130 als auch den IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren, weshalb ihre Differenzierung und Maturierung durch IL-6 beeinflusst werden kann. Obwohl Studien der letzten Jahre bereits eindrucksvoll die Relevanz des IL-6-Signals für die DZ Entwicklung belegt haben, bleibt dessen

Funktion für diese Prozesse bisher kontrovers diskutiert. Inwiefern eine veränderte Rezeptorexpression auf diesen Zellen Einfluss auf die biologische Wirkung von IL-6 nimmt, wurde bisher nicht untersucht und war daher Ziel der hier durchgeführten Experimente. Mit Hilfe GM-CSF-gereifter DZ aus murinem Knochenmark (KM-DZ) sowie *steady state* DZ aus peripheren lymphatischen Organen konnte gezeigt werden, dass die Expression von gp130 und IL-6R bereits während der DZ Differenzierung unterschiedlich reguliert ist. Konventionelle DZ (kDZ) aus Milz und Lymphknoten wiesen ein höheres Expressionsniveau für den IL-6-Rezeptor auf als plasmazytoide DZ (pDZ). Es wurde nachgewiesen, dass die gp130 Expression im Verlauf der DZ Differenzierung stetig zunimmt, während nahezu keine Veränderung für die Expression des IL-6R festzustellen war. In weiteren Experimenten konnte darüber hinaus belegt werden, dass die Reifung der DZ, induziert durch Lipopolysaccharid (LPS), Tumornekrosefaktor- α (TNF α) oder Cholera toxin (Ctx), zu einer *Cross-Regulation* von gp130 führt. Diese konnte im Fall von TNF α und Ctx auf eine vorübergehende Internalisierung des Rezeptors in Folge der Aktivierung der Serin-/Threonin-Kinase MK2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2) zurückgeführt werden. Untersuchungen von KM-DZ aus der gp130 *knockin* Mauslinie gp130^{LLAA}, die sich durch eine Punktmutation des beschriebenen Endozytose-Motivs des Rezeptors auszeichnet, führten zu dem Schluss, dass LPS gp130 über einen bisher noch nicht beschriebenen Mechanismus reguliert. Dieser vermittelt eine frühe Clathrin-abhängige Internalisierung von gp130 und führt schließlich zu einer langfristigen Inhibierung der gp130 Expression. Die Regulation der IL-6 Rezeptorexpression ist insofern von Bedeutung als dass vermutet werden kann, dass das IL-6/STAT3-Signal für die Aufrechterhaltung eines unreifen DZ Phänotyps wichtig ist. Ferner kann vermutet werden, dass die Limitierung der Responsivität gegenüber LIF (und vermutlich auch OSM) für die Differenzierung von DZ wichtig ist, da die Expression des LIFR über die Dauer der KM-DZ Differenzierung stark herunterreguliert wurde. Eine Expression des OSMR auf DZ wurde hingegen nicht nachgewiesen und steht demzufolge im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Untersuchungen.

Im Rahmen dieses ersten Projekts wurde ebenfalls untersucht, wie sich die veränderte gp130 Endozytose auf die Homöostase myeloider und lymphoider Zellen auswirkt. Bei den hierfür analysierten gp130^{LLAA} Mäusen wurde eine geringfügige Verminderung der Frequenz und absoluten Zellzahl von kDZ in der Milz sowie eine Zunahme der Frequenz und absoluten Zellzahl von pDZ und Makrophagen in den inguinalen Lymphknoten nachgewiesen. Darüber hinaus wurde ein Anstieg in der Frequenz und absoluten Zellzahl von T-Zellen, jedoch eine Abnahme der B-Zellen in der Milz beobachtet.

Im zweiten Teil der Dissertation sollte die OSM-vermittelte Induktion antiviraler Gene in primären humanen dermalen Fibroblasten (HDF) untersucht werden.

Typ I Interferone (IFN) gelten als zentrale Zytokine der antiviralen Immunantwort. Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass eine Reihe proinflammatorischer Zytokine ebenso die antivirale Immunantwort beeinflussen können, indem sie u.a. die Expression der *pattern recognition receptors* (PRR) regulieren. PRR sind Teil des angeborenen Immunsystems und für die Erkennung von Pathogenen durch die Bindung an konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Strukturen (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*) wichtig. Im zweiten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass OSM dazu in der Lage ist, die Induktion der im Zytoplasma lokalisierten PRR *Retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I) und *Melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) zu vermitteln. Mit Hilfe von RNA Interferenzstudien konnte nachgewiesen werden, dass die Expression dieser beiden RNA-Helikasen von der OSM-vermittelten STAT1 Aktivierung abhängig ist und über einen STAT3/SOCS3-abhängigen Mechanismus reguliert wird. Während die Blockade der STAT1 Expression zu einer Inhibierung der OSM-induzierten Expression der Helikasen führte, wurde durch den Verlust von STAT3 oder SOCS3 die Expression von RIG-I und MDA5, aufgrund einer stärkeren und länger anhaltenden STAT1-Phosphorylierung, signifikant erhöht. Zusätzlich konnte ein additiver Effekt zwischen der OSM- und IFN γ -vermittelten Helikasenexpression belegt werden. Dieses Resultat steht im Einklang mit vorhergehenden Veröffentlichungen, die einen *Crosstalk* zwischen OSM und Typ I IFN bei der antiviralen Abwehr gegen das Hepatitis C Virus beschreiben.

SUMMARY

Interleukin-6 (IL-6)-type cytokines, most notably IL-6 and Oncostatin M (OSM), have pleiotropic functions and play a major role in multiple biological processes. As inducers of the acute phase response, IL-6 and OSM are involved in the initiation of proinflammatory and immunological processes as well as in cell growth and differentiation. They mediate their biological function through binding to a multimeric receptor complex. The IL-6 receptor complex has a hexameric structure consisting of two molecules each of gp130, IL-6R and IL-6. In contrast, the OSM receptor complex has a heterodimeric structure consisting either of gp130 and the OSM receptor (OSMR) or gp130 and the leukemia inhibitory factor receptor (LIFR). IL-6-type cytokines induce the activation of the Jak/STAT (Janus kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription), PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-kinase/AKR thymoma oncogene homolog) and MAPK (mitogen-activated kinase) pathway. Since uncontrolled activation of these pathways causes chronic inflammatory diseases or abnormal cell growth, regulation by distinct feedback mechanisms is very important. Besides recruitment of inhibitory proteins like members of the SOCS (suppressors of cytokine signaling) family and protein tyrosine phosphatases, receptor internalization is a common regulatory mechanism.

One aim of the first part of this thesis was to investigate the regulation of the IL-6 receptor expression during dendritic cell (DC) differentiation/maturation and furthermore, to determine the relevance of gp130 internalization for these developmental processes. DCs are professional antigen presenting cells (APC) and known to act as a link between innate and adaptive immune response. Especially during the initiation of T cell polarization (Th1, Th2, Th17, Treg) they play an important role. DCs are a heterogeneous cell population, which can be classified by their origin and/or function and are distinguished (among other things) by their cell surface markers. DCs express both gp130 and IL-6R, therefore it has been assumed that DC differentiation and maturation is influenced by IL-6. Although several publications suggest that IL-6 signaling is of importance for DC development, its precise function for this process still remains unclear. How differential receptor expression may influence the biological function of IL-6 has not been studied so far and was the goal of the present study. By using GM-CSF-driven DCs from murine bone marrow (BMDC) as well as steady state DCs from peripheral organs, it was demonstrated that the expression of gp130 and IL-6R is differentially regulated during DC differentiation. Conventional DCs (cDCs) from spleen and lymph nodes

showed a higher IL-6 receptor expression level than plasmacytoid DCs (pDCs) from these organs. While gp130 expression slowly increased over time in culture, no changes in IL-6R expression were observed in GM-CSF-driven BMDC differentiation. Furthermore, BMDC maturation induced by lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- α (TNF α) or cholera toxin (Ctx) caused a cross-regulation of gp130 cell surface expression. In case of TNF α and Ctx this cross-regulation could be traced back to a transient receptor internalization induced by the serine/threonine-kinase MK2 (MAPK-activated protein kinase 2). Studies with the gp130 knockin mouse strain gp130^{LLAA}, which is characterized by a point mutation of the internalization motif, revealed that the LPS-regulated gp130 expression depends on a so far unidentified mechanism. This mechanism induces an early clathrin-dependent gp130 internalization and furthermore leads to a long-term expression inhibition. This regulation of the IL-6 receptor expression is of importance, because it is assumed that the IL-6/STAT3-signal plays an important role to keep DCs in an immature state in absence of infection. Further data presented in this thesis indicate that limitation of the LIF response (and also OSM response) is necessary for DC differentiation, since expression of the LIFR was strongly downregulated in the course of GM-CSF-driven BMDC differentiation. In contrast to former studies, OSMR expression could not be confirmed.

An additional aim of the first part of the thesis was to investigate how missing gp130 endocytosis influences the homeostasis of myeloid and lymphoid cells in mice. For this purpose, gp130^{LLAA} mice were investigated and showed a slight decrease in frequency and absolute cell numbers of cDCs from spleen as well as an increase in frequency and absolute cells numbers of pDCs and macrophages from inguinal lymph nodes. Additionally, an increase in frequency and absolute cell number of T-cells, but a decrease of B cells could be detected in spleen.

The aim of the second part of this thesis was to investigate the OSM-mediated induction of antiviral gene expression in primary human dermal fibroblasts (HDF).

Type I interferons (IFN) are key players in the antiviral response. Many studies over the last years revealed that several proinflammatory cytokines were able to influence the antiviral response by induction of the pattern recognition receptor (PRR) expression. PRRs belong to the innate immunity and play a pivotal role in detection of pathogens through binding to pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). In the second part it was shown that OSM induces the expression of the PRR *retinoic acid inducible gene-I* (RIG-I) and *melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5). By using RNA interference studies it was demonstrated that the expression

of the RNA-helicases depends on the OSM-induced STAT1 activation and is mainly regulated by a STAT3/SOCS3-dependent mechanism. While knockdown of STAT1 inhibited OSM-induced helicase expression, loss of STAT3 or SOCS3 significantly enhanced the RIG-I and MDA5 expression through an increased and prolonged STAT1 phosphorylation. Moreover, it was shown that OSM and IFN γ had an additive effect on helicase expression. This result correlates well with former studies showing a crosstalk of OSM and IFN γ signaling in the antiviral response against Hepatitis C Virus.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
SUMMARY.....	IV
INHALTSVERZEICHNIS	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Interleukin-6 (IL-6) Zytokin Familie und ihre Rezeptorkomplexe	1
1.1.1 Glykoprotein 130.....	3
1.1.2 Interleukin-6.....	5
1.1.3 Oncostatin M.....	7
1.2 Die Signaltransduktion der IL-6-Typ Zytokine am Beispiel von IL-6.....	7
1.3 Regulationsmechanismen der IL-6-induzierten Signalwege	9
1.3.1 Klassische Regulationsmechanismen.....	10
1.3.2 <i>Crosstalk</i> -Regulation	11
1.4 Dendritische Zellen.....	13
1.4.1 Subtypen dendritischer Zellen der Maus.....	13
1.4.2 Reifungsstadien von DZ	16
1.5 Ziel der Arbeit	18
2. MATERIAL.....	32
2.1 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterial	32
2.1.1 Chemikalien	32
2.1.2 Kits	32
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	32
2.2 Stimulanzien und Rezeptoren	34
2.3 Inhibitoren.....	34
2.4 Antikörper	35
2.4.1 Antikörper für Western Blot	35
2.4.2 eBeads und Antikörper für die FACS Analyse	36
2.5 <i>Small interfering ribonucleic acid</i> (siRNA)	37

2.6	Protein Marker.....	38
2.7	Primer Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).....	38
2.8	Geräte.....	40
2.9	Verwendete Mausstämme.....	41
2.10	Verwendete primäre Zellen und Zelllinien	42
3.	METHODEN	44
3.1	Methoden der Zellbiologie	44
3.1.1	Kultivierung von Zellen.....	44
3.1.2	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	44
3.1.3	Zellzählung und Vitalitätstest.....	45
3.1.4	Gewinnung von GM-CSF-haltigen Zellkulturüberständen	45
3.1.5	Präparation von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus	45
3.1.5.1	Präparation von Milz oder Lymphknoten für die durchflusszytometrische Analyse	46
3.1.5.2	Präparation des Knochenmarks	47
3.1.6	Generierung dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark	49
3.1.7	Durchflusszytometrische Analyse	49
3.1.7.1	Oberflächenfärbung	50
3.1.7.2	Automatische Kompensation am FACS Canto II.....	50
3.2	Methoden der Molekularbiologie	51
3.2.1	Transiente Transfektion primärer humaner Fibroblasten mit siRNA.....	51
3.2.2	RNA-Isolierung aus Zellkulturen	52
3.2.3	Quantitative Bestimmung von RNA.....	52
3.2.4	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR).....	52
3.3	Methoden der Proteinbiochemie	54
3.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	54
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	54
3.3.3	Western Blot.....	55
3.3.4	Immundetektion	56
3.3.5	Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen im Überstand von KM-DZ Kulturen mittels <i>enzym-linked immunosorbent assay (ELISA)</i>	57
3.4	Statistik.....	58
4.	ERGEBNISSE	59
4.1	Analyse der IL-6 Rezeptorexpression auf gereiften dendritischen Zellen aus Knochenmark (KM-DZ)	59

4.1.1	Generierung und Charakterisierung GM-CSF-gereifter dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark.....	59
4.1.2	Phänotypische Charakterisierung unterschiedlich maturierter KM-DZ	61
4.1.3	KM-DZ exprimieren gp130, IL-6R und LIFR auf ihrer Oberfläche	64
4.1.4	Die DZ Reifung induziert die <i>Cross-Regulation</i> von gp130	66
4.1.5	TNF α und Ctx vermitteln eine p38-abhängige, LPS hingegen eine p38-unabhängige <i>Cross-Regulation</i> von gp130	70
4.2	Analyse der Auswirkung einer internalisierungsdefizienten gp130 Mutante auf Differenzierung und Maturierung von KM-DZ	72
4.2.1	gp130 ^{LLAA} KM-DZ zeigen eine erhöhte gp130 Expression	74
4.2.2	gp130 ^{LLAA} KM-DZ reagieren sensitiver auf das IL-6- <i>trans</i> -Signal	76
4.2.3	Der Einfluss der gp130 ^{LLAA} Mutation auf die Differenzierung von KM-DZ	79
4.2.4	Der Einfluss der gp130 ^{LLAA} Mutation auf die Maturierung der KM-DZ	81
4.2.5	Gp130 ^{LLAA} KM-DZ sind vor der gp130 <i>Cross-Regulation</i> durch TNF α und Ctx geschützt..	85
4.2.6	LPS vermittelt eine Clathrin-abhängige gp130 <i>Cross-Regulation</i> in KM-DZ.....	86
4.3	Relevanz der gp130 Endozytose für die Differenzierung myeloider und lymphoider Zellen <i>in vivo</i>	89
4.3.1	Das Körpergewicht sowie das Gewicht und die Zellularität lymphatischer Organe sind in gp130 ^{LLAA} und WT Mäusen vergleichbar	89
4.3.2	Leukozyten aus gp130 ^{LLAA} Mäusen exprimieren mehr gp130 an der Oberfläche.....	90
4.3.3	gp130 ^{LLAA} haben eine erhöhte Frequenz an pDZ und Makrophagen in den inguinalen Lymphknoten.....	95
4.3.4	Der Einfluss der gp130 ^{LLAA} Mutation auf die Homöostase von lymphoiden Zellen der Milz und inguinalen Lymphknoten	97
4.4	Die Rolle von Oncostatin M beim antiviralen Status von dermalen Fibroblasten	99
4.4.1	Oncostatin M induziert eine frühe Expression antiviraler Gene in humanen dermalen Fibroblasten.....	99
4.4.2	Die Induktion der Helikasen und IRF1 erfolgt über den Typ-II-Rezeptorkomplex	102
4.4.3	Die OSM-induzierte Expression der Helikasen und IRF ist STAT1-abhängig.....	104
4.4.4	Der RNA Interferenz-bedingte Verlust von STAT3 führt zu einer Verlängerung der OSM-induzierten STAT1-Phosphorylierung und Expression von ISGs	106
4.4.5	SOCS3 – Hauptregulator des OSM-induzierten STAT-Signals.....	108
4.4.6	Die Bedeutung von PTPN2, SUMO-1 und PML für die OSM-vermittelte Induktion antiviraler Gene.....	111
4.4.7	OSM verstärkt die IFN-induzierte Expression der Helikasen in HDF.....	115
4.4.8	Die OSM-vermittelte RLR Expression ist speziesunabhängig	116
5.	DISKUSSION.....	118
5.1	Die Regulation der IL-6 Rezeptorexpression auf dendritischen Zellen.....	118
5.1.1	Charakterisierung GM-CSF-gereifter dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark..	120

5.1.2	Die Expression der IL-6-Typ Zytokin-assoziierten Rezeptoren auf dendritischen Zellen ist unterschiedlich reguliert	121
5.1.3	Die gp130 Expression auf KM-DZ wird durch verschiedene Maturierungsstimuli unterschiedlich reguliert	124
5.1.4	Die Regulation von gp130 auf KM-DZ erfolgt je nach Stimulus über einen p38-abhängigen oder -unabhängigen Mechanismus	125
5.2	Die gp130^{LLAA} <i>knockin</i> Mauslinie – ein neues Mausmodell zur Untersuchung der gp130 Endozytose	127
5.2.1	Die gp130 ^{LLAA} Mäuse zeichnen sich durch eine erhöhte gp130 Expression aus	127
5.2.2	Die gp130 ^{LLAA} KM-DZ zeigen eine erhöhte Responsivität gegenüber hyper-IL-6	129
5.2.3	Die gp130 ^{LLAA} KM-DZ zeigen phänotypische Unterschiede im Vergleich zu WT KM-DZ	130
5.2.4	Relevanz der gp130 Endozytose für die Homöostase myeloider- und lymphoider Zellen	132
5.3	Die Rolle von Oncostatin M beim antiviralen Status von dermalen Fibroblasten	135
5.3.1	OSM induziert STAT1-abhängig die Expression der RLR und IRF in humanen Fibroblasten	137
5.3.2	SOCS3 reguliert die OSM-induzierte STAT1-Phosphorylierung	138
5.3.3	OSM verstärkt die IFN-induzierte Expression der Helikasen in HDF	138
LITERATURVERZEICHNIS		140
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		166
TABELLENVERZEICHNIS		168
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS		169
DANKSAGUNG		173
VERÖFFENTLICHUNGEN		175
EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG		177
LEBENS LAUF		FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

1. EINLEITUNG

Zytokine sind lösliche Botenstoffe, die der Kommunikation von Zellen und der Koordination biologischer Prozesse in vielzelligen Organismen dienen. Anders als Hormone werden Zytokine in Folge eines auslösenden Reizes meist *de-novo* synthetisiert und sezerniert. Sie wirken auf die produzierende Zelle selbst (autokrin) und auf Zellen in der unmittelbaren Umgebung (parakrin) ein, können aber auch in seltenen Fällen auf weiter entfernte Zellen Einfluss nehmen (endokrin). Ihre Wirkung vermitteln sie über die Bindung an spezifische Rezeptorsysteme auf der Zelloberfläche der Zielzellen.

1.1 Die Interleukin-6 (IL-6) Zytokin Familie und ihre Rezeptorkomplexe

Zu den Mitgliedern der IL-6-Typ Zytokine gehören neben ihrem namensgebenden Vertreter IL-6 ebenso IL-11, *leukemia inhibitory factor* (LIF), Oncostatin M (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), *neuropoietin* (NP) und IL-31 [1-4]. Alle IL-6-Typ Zytokine (mit Ausnahme von IL-31) nutzen das Glykoprotein 130 (gp130) als signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit [1, 5]. Auch IL-27 und IL-35 erfüllen dieses Kriterium, gehören aber auf Grund ihrer Struktur der Familie der IL-12-Typ Zytokine an und gelten deshalb als Bindeglied zwischen beiden Zytokinfamilien [6, 7].

Die IL-6-Typ Zytokine sind strukturell aus vier antiparallel zu einem Bündel angeordneten α -Helices aufgebaut [1, 5]. Im Gegensatz dazu besitzen IL-27 und IL-35 gemäß der Familie der IL-12-Typ Zytokine eine heterodimere Struktur, die aus einer α -helikalen Untereinheit (IL-27p28, IL-12p35) und der β -Untereinheit *Epstein-Barr-virus induced gene 3* (EBI-3) besteht [7, 8].

IL-6-Typ Zytokine sind bekannt für ihre pleiotropen Eigenschaften. Sie spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen Prozessen und Infektionen. Des Weiteren sind sie aber auch an der Hämatopoese, Neurogenese, Zelldifferenzierung und Proliferation, dem Knochenstoffwechsel sowie kardiovaskulären Prozessen beteiligt [9-14]. Ihre Wirkung vermitteln sie über die Bindung an spezifische hochaffine Zelloberflächenrezeptoren, die in die nicht-signaltransduzierenden α -Rezeptoren (IL-6R, IL-11R, CNTFR) und die signaltransduzierenden Rezeptoren (gp130, OSMR, LIFR, IL-27R, IL-12R β 2) unterteilt werden [7, 11, 15]. Die Gemeinsamkeit aller Rezeptoren ist ihre strukturelle Verwandtschaft, aufgrund der sie der Superfamilie der hämatopoetischen Rezeptoren zugeordnet werden. Außerdem können sie als

Typ-I Transmembranproteine klassifiziert werden, da sie über einen extrazellulären N-Terminus und eine einzelne Transmembrandomäne verfügen [5]. Eine Ausnahme bildet einzig der CNTF-Rezeptor, der an Stelle einer Transmembrandomäne einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker besitzt [16]. Die Familie der hämatopoetischen Rezeptoren wird darüber hinaus in zwei Klassen unterteilt, wobei die Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine inklusive der für IL-27 und IL-35 der Klasse I zugeordnet werden. Diese Klasse zeichnet sich durch ein extrazellulär gelegenes zytokinbindendes Modul (ZBM) aus, das aus zwei Fibronektin-Typ-III (FNIII-) ähnlichen Domänen besteht und durch vier konservierte Cysteinreste sowie ein Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin (WSXWS) Motiv charakterisiert ist. Den Klasse II Rezeptoren fehlt dieses Motiv [5].

Obwohl gp130 die allgemeine signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit der IL-6-Typ Zytokine repräsentiert, vermitteln die einzelnen Mitglieder der Familie ihre spezifische Wirkung über die Bindung an verschiedene Rezeptorkomplexe (Abb. 1).

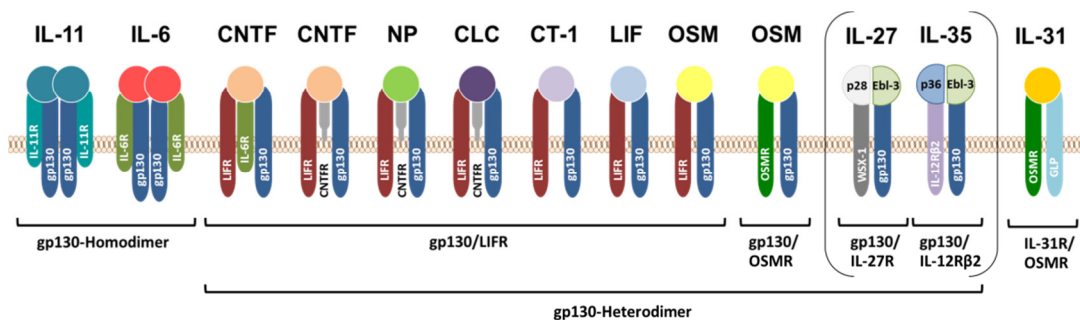


Abb. 1: Die IL-6-Typ Zytokinfamilie und ihre Rezeptorkomplexe. Mit Ausnahme von IL-31 nutzen alle IL-6-Typ Zytokine gp130 als signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit. Die IL-6-Typ Zytokine signalisieren entweder über ein Homodimer zweier gp130-Moleküle oder über ein Heterodimer aus gp130 und dem LIFR, OSMR, IL-27R oder IL-12R β 2. IL-31 bindet ein Heterodimer aus dem OSMR und dem IL-31R. IL-6, IL-11, CNTF, NP und CLC binden zusätzlich an nicht-signalisierende α -Rezeptoren (IL-6R, IL-11R und CNTFR). IL-27 und IL-35 repräsentieren ein Bindeglied zwischen der IL-12-Typ Zytokinfamilie und den IL-6-Typ Zytokinen.

IL-6 und IL-11 binden jeweils an ihren spezifischen α -Rezeptor, den IL-6R bzw. den IL-11R, und induzieren die Rekrutierung eines gp130-Homodimers, sodass ein hexamerer Komplex entsteht [17-19]. CNTF, NP und CLC binden den α -Rezeptor CNTF-Rezeptor (CNTFR) sowie ein Heterodimer aus LIF-Rezeptor (LIFR) und gp130 [16, 20, 21]. CNTF kann zusätzlich über einen Komplex, bestehend aus einem IL-6R α und dem LIFR/gp130 Heterodimer, signalisieren. CT-1, LIF und OSM benötigen keinen spezifischen α -Rezeptor, binden aber ebenfalls an ein LIFR/gp130 Heterodimer [22-24]. Darüber hinaus kann OSM über ein Heterodimer bestehend aus OSMR und gp130 signalisieren [22, 25]. Die OSM-vermittelte Signaltransduktion

über den LIFR/gp130 Rezeptorkomplex ist bisher nur im humanen System und in der Ratte nachgewiesen [26]. IL-27 bindet ein Heterodimer aus gp130 und seinem spezifischen Rezeptor WSX-1 (auch IL-27 Rezeptor genannt) [15]. IL-35 kann über ein Heterodimer aus IL-12R β 2 und gp130 signalisieren. Darüber hinaus existieren Hinweise, dass es ebenso an ein gp130 oder IL-12R β 2 Homodimer binden kann [7]. Einen Sonderfall stellt IL-31 dar, da es anstelle von gp130 das sogenannte *gp130-like protein* (GPL, auch bekannt als IL-31 Rezeptor) rekrutiert und über ein Heterodimer aus IL-31R und OSMR signalisiert [3, 4].

Während die allgemeine Rezeptoruntereinheit gp130 auf der Oberfläche nahezu aller Zellen exprimiert wird, ist die Expression der restlichen Rezeptoren auf bestimmte Zelltypen beschränkt. Dadurch wird eine spezifische Regulation der Signaltransduktion durch einzelne Mitglieder der IL-6-Typ Zytokinfamilie ermöglicht.

Zusätzlich zu den membranständigen Rezeptoren existieren ebenfalls lösliche Varianten, die entweder agonistisch oder antagonistisch wirken können. Die Ligandenbindung an die löslichen α -Rezeptoren IL-6R (sIL-6R) [27, 28], IL-11R (sIL-11R) [29, 30] und CNTFR (sCNTFR) [31] erlaubt nach wie vor eine Zellaktivierung, da die löslichen Rezeptoren selbst nicht an der Signaltransduktion, sondern nur an der Bindung des Liganden beteiligt sind. Diese Form der Zellaktivierung wird auch als *trans*-Signal bezeichnet. Demgegenüber führt die Bindung an die lösliche Form von gp130 (sgp130) [32, 33], OSMR (sOSMR) [34], LIFR (sLIFR) [33, 35] oder WSX-1 (sIL-27R) [36] zur Hemmung der Liganden-induzierten Zellaktivierung, da die Dimerisierung der membranständigen, signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten verhindert wird. Die Entstehung der löslichen Variante der Rezeptoren kann auf proteolytische Spaltung (*shedding*) durch Metalloproteinasen [36-39] und Glykosylphosphatidylinositol-Phospholipase C (GPI-PLC) [40] sowie auf das alternative Spleißen ihrer mRNA zurückgeführt werden [41, 42].

1.1.1 Glykoprotein 130

Wie bereits erwähnt, ist gp130 ein ubiquitär exprimierter, signaltransduzierender Rezeptor und Bestandteil aller Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Zytokine (mit Ausnahme von IL-31) sowie einiger Vertreter der IL-12-Typ Zytokine [43]. Aus Untersuchungen mit gp130 defizienten (gp130^{-/-}) Mäusen ist bekannt, dass der Rezeptor eine essentielle Rolle bei embryonalen Entwicklungsprozessen spielt, da

gp130^{-/-} Mäuse embryonal letal (E12.5) sind. Als Ursache für diese frühe Letalität wird eine krankhafte Veränderung der Herzventrikelwand (hypoplastisches Myokardium) und eine signifikant verminderte Anzahl pluripotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen in Leber und Thymus angenommen [44]. Die grundlegende Notwendigkeit der gp130-vermittelten Zellaktivierung konnte ebenfalls anhand konditioneller gp130 *knockout* Mäuse nachgewiesen werden. Hierbei kann über eine postnatale Deletion des Exon 15¹ die Expression der membranständigen Variante von gp130 in bestimmten Zellen inhibiert werden, was jedoch zur Sezernierung des löslichen gp130 (sgp130) führt. Die Folge waren gravierende neuronale, kardiovaskuläre, hämatopoetische, immunologische, hepatologische und pulmonale Veränderungen [45].

Das gp130 Molekül umfasst 917 Aminosäuren (AS) (murin: 917AS; human: 918AS) und besitzt, je nach Glykosylierungsgrad, ein Molekulargewicht von 130 - 150 kDa. Der extrazelluläre Bereich des Proteins besteht aus einer Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Domäne (D1) und fünf Fibronectin-Typ-III (FNIII)-ähnlichen Domänen (D2-D6) (Abb. 2). Die beiden N-terminal gelegenen FNIII-ähnlichen Domänen (D2-D3) bilden zusammen das ZBM und sind durch vier konservierte Cysteinreste (D2) sowie das für Typ-I Rezeptoren charakteristische WSXWS-Motiv (D3) gekennzeichnet. Es ist beschrieben, dass die Ig-ähnliche Domäne D1 sowie die FNIII-ähnlichen Domänen D2 und D3 von essentieller Bedeutung für die Ligandenbindung sind. Die FNIII-ähnlichen Domänen D4-D6 hingegen sind nicht an der Ligandenbindung beteiligt, spielen aber ebenso wie die Transmembran-Domäne (TM) eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion [11, 46]. Der intrazelluläre Bereich von gp130 weist keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität auf, erlaubt jedoch die konstitutive Assoziation mit Januskinasen (JAK: JAK1, JAK2, TYK2) im Bereich der membranproximalen Box1/2-Region. Die am Rezeptor vorliegenden JAK sind sowohl für die Initialisierung der Signalkaskaden als auch für die Oberflächenexpression der Rezeptoren selbst von Bedeutung [47-50]. Als weitere Charakteristika gelten die für die Bindung der STAT (*signal transducer and activator of transcription*) Faktoren notwendigen Tyrosinreste (murin: Y₇₅₇, Y₇₆₅, Y₈₁₂, Y₉₀₄, Y₉₁₄; human: Y₇₅₉, Y₇₆₇, Y₈₁₄, Y₉₀₅, Y₉₁₅) sowie der Serinrest 780 (murin: S₇₈₀; human: S₇₈₂) und das hierzu proximal gelegene Dileucin-Motiv (murin: L₇₈₄L₇₈₅; human: L₇₈₆L₇₈₇), welche an der Internalisierung des Rezeptors beteiligt sind (siehe auch Abschnitt 1.3) [51-53].

¹ kodiert für die Transmembrandomäne

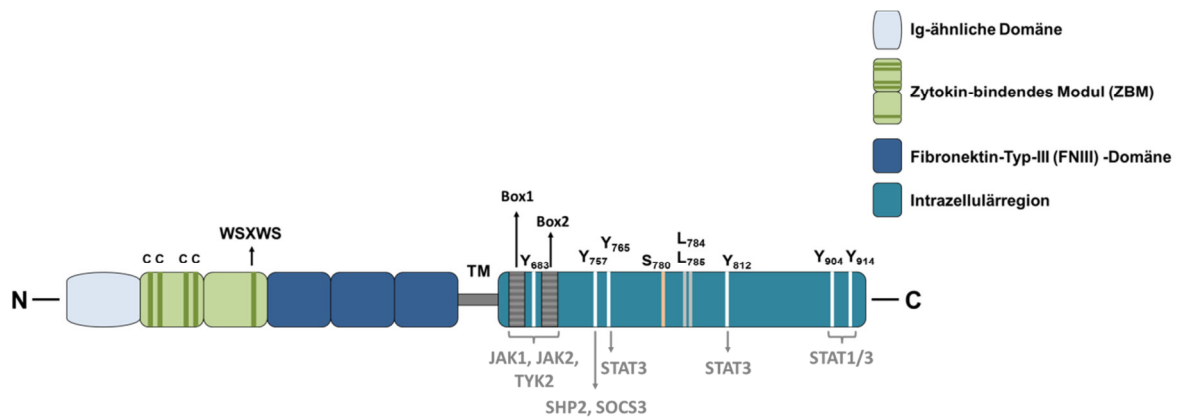


Abb. 2: Schematische Darstellung des murinen Glykoproteins 130. Der extrazelluläre Bereich des gp130 Moleküls besteht aus einer N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne (D1) und fünf FNIII-Domänen (D2-D6). Die Domänen D2 und D3 sind durch vier konservierte Cysteinreste bzw. ein konserviertes WSXWS-Motiv charakterisiert und bilden zusammen das zytokinbindende Modul (ZBM). Der intrazelluläre Bereich ist durch eine in unmittelbarer Nähe zur Transmembran-Domäne (TM) gelegene konservierte Box1/2 Region gekennzeichnet. Ein Serin an Position 780 (human: S₇₈₂) sowie ein hierzu proximal gelegenes Dileucin-Motiv (murin: L₇₈₄L₇₈₅; human: L₇₈₆L₇₈₇) sind für die Internalisierung des Rezeptors von Bedeutung. Die mit Y gekennzeichneten Stellen des intrazellulären Bereichs bezeichnen die für die Signaltransduktion relevanten Tyrosine.

1.1.2 Interleukin-6

IL-6 wurde ausgehend von seiner Erstbeschreibung in den 1980iger Jahren als ein Faktor charakterisiert, der sowohl an der Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen (daher auch BSF-2 genannt, engl. *b-cell stimulating factor 2*) als auch an der Expansion und Aktivierung von T-Zellen sowie der Induktion der Akutphase-Reaktion beteiligt ist [54-59]. Neben seiner Bedeutung für immunologische und inflammatorische Prozesse ist IL-6 ebenso an der Regulierung verschiedener metabolischer, regenerativer und neuronaler Prozesse beteiligt, weshalb ihm auch hormonähnliche Eigenschaften zugeschrieben werden [60].

IL-6 wird als Vorläuferprotein mit einer Gesamtgröße von 211AS (murin: 211AS; human: 212AS) translatiert und nach Abspaltung des N-terminalen Signalpeptids (murin: 24AS; human: 28AS) als ein etwa 21 kDa großes Protein sezerniert [61-63]. Aufgrund verschiedener posttranslationaler Modifikationen, wie N- und O-Glykosylierungen oder auch serinspezifischen Phosphorylierungen, kann die Größe des reifen Proteins jedoch im Bereich von 21-28 kDa schwanken [62, 64, 65]. Zu den Hauptproduzenten von IL-6 gehören neben Monozyten/Makrophagen [66, 67], B- und T-Zellen [68] ebenso Fibroblasten [69], Endothelzellen [70] und Epithelzellen [71]. Die Expression selbst wird durch virale und bakterielle

Infektionen [72], aber auch durch eine Reihe verschiedener Zytokine (TNF α , IL-1 β , IFN γ , IL-3) induziert [73-76].

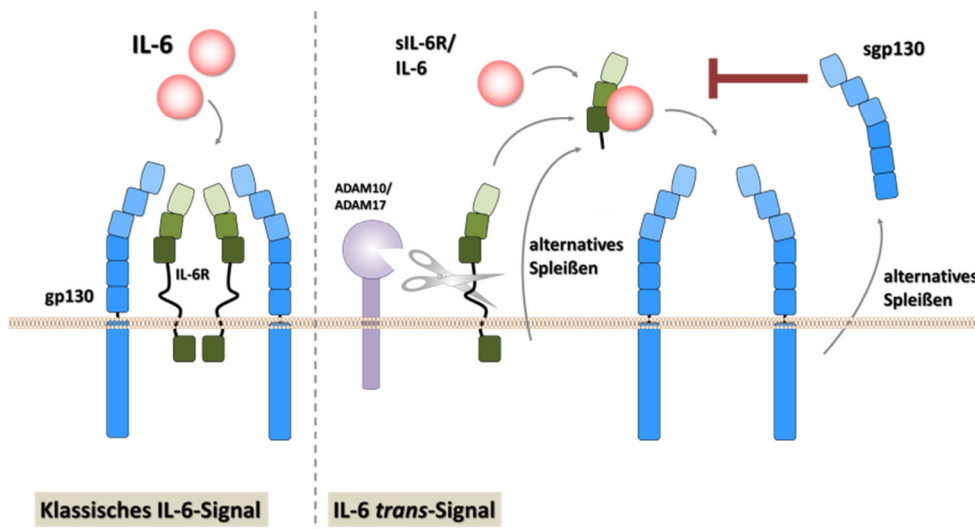


Abb. 3: Schematische Darstellung des klassischen IL-6-Signals und IL-6 *trans*-Signals. Das klassische IL-6-Signal zeichnet sich durch einen membranständigen Rezeptorkomplex aus, der nach Bindung von IL-6 an den IL-6R zur Rekrutierung von gp130 und schließlich zur Aktivierung der IL-6 Signalkaskade führt. Dem gegenüber steht das IL-6 *trans*-Signal. Der durch proteolytische Spaltung (Maus und Mensch) oder alternatives Spleißen (nur Mensch) entstandene lösliche IL-6R (sIL-6R) komplexiert zunächst mit IL-6 und bindet anschließend an membranständiges gp130, wodurch ebenfalls eine Aktivierung der IL-6-Signalkaskade erfolgt. Das durch alternatives Spleißen ebenfalls gebildete lösliche gp130 Molekül (sgp130) kompetiert mit dem membranständigen Rezeptor und ist in der Lage das IL-6 *trans*-Signal sowie bei sehr hohen Konzentrationen das klassische IL-6 Signal zu hemmen.

Wie bereits erwähnt, signalisiert IL-6 über einen tetrameren Rezeptorkomplex aus einem gp130 Homodimer und zwei membranständigen IL-6R-Ketten (klassisches IL-6-Signal) oder aber zwei sIL-6R-Ketten (IL-6 *trans*-Signal) (Abb. 3). Letzteres ermöglicht Zellen, die lediglich gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren, ebenfalls auf IL-6 zu reagieren. Diese Form der Aktivierung spielt insofern eine wichtige Rolle, als dass in Folge von Infektionen, Traumata oder Verletzungen nicht nur IL-6, sondern ebenso vermehrt sIL-6R von infiltrierenden Neutrophilen, Monozyten oder auch T-Zellen freigesetzt wird. Dadurch steigt der Pool an aktiv-wirkenden IL-6/sIL-6R-Komplexen signifikant an [60, 77-79]. IL-6 selbst hat nur eine geringe Affinität zu gp130, die jedoch nach Assoziation mit dem IL-6R (oder sIL-6R) verstärkt wird und so die Bildung des funktionellen Rezeptorkomplexes induziert. Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass das Signal über den membranständigen IL-6R die Induktion regenerativer und antiinflammatorischer Prozesse vermittelt, während das IL-6 *trans*-Signal über den sIL-6R für die Vermittlung

proinflammatorischer Prozesse zuständig zu sein scheint [80, 81]. Sgp130 fungiert als natürlicher Antagonist, der das IL-6 *trans*-Signal, und bei sehr hohen Konzentrationen ebenso das klassische IL-6-Signal, inhibieren kann [80, 82, 83].

1.1.3 Oncostatin M

OSM wurde 1986 aus dem Überstand von U937 Zellkulturen isoliert, die zuvor mit Phorbol ester (PMA) behandelt wurden [84]. Seinen Namen verdankt es ursprünglich der wachstumshemmenden Wirkung, die es auf Melanomzellen, Lungenkrebszellen, Brustkrebszellen und Gliomzellen hat [84-87]. Eine Reihe von Untersuchungen hat jedoch gezeigt, dass es ähnlich dem IL-6 in eine Reihe biologischer Prozesse involviert ist und somit pleiotrope Eigenschaften besitzt. Neben seiner Rolle bei der Hämatopoese [88-91] ist OSM ebenso an der Differenzierung mesenchymaler Stammzellen [92], an regenerativen Prozessen der Leber und des Herzens [93-97], sowie an einer Vielzahl von inflammatorischen [98-105] und metabolischen Prozessen [106-109] beteiligt.

Ebenso wie IL-6 wird OSM zunächst als ein Vorläuferprotein translatiert (human: 252AS, murin: 263AS), das nach posttranslationaler Spaltung des N-terminalen Signalpeptids (human: 25AS; murin: 24AS) sezerniert wird. Die Größe des freigesetzten Proteins schwankt im Bereich von 22 bis 24 kDa, da OSM anders als IL-6 zusätzlich über eine C-terminale Prodomäne (human: 32AS; murin: 58AS) verfügt. Diese kann ebenso wie das Signalpeptid abgespalten werden, was jedoch keine notwendige Voraussetzung für die Sekretion des Zytokins ist [110, 111]. Die Bedeutung der Prodomäne ist bislang noch ungeklärt. OSM wird vor allem von Makrophagen, T-Zellen, Neutrophilen und dendritischen Zellen produziert [84, 112-114].

1.2 Die Signaltransduktion der IL-6-Typ Zytokine am Beispiel von IL-6

Die Initialisierung einer biologischen Signalkaskade setzt eine Liganden-induzierte Homo- oder Heterodimerisierung von signaltransduzierenden Rezeptorketten voraus. Für die Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Zytokine ist beschrieben, dass sie mindestens ein gp130 Molekül sowie eine für das Zytokin spezifische zweite Rezeptorkette enthalten.

IL-6 bindet zunächst mit geringer Affinität seinen spezifischen α -Rezeptor IL-6R. Der entstandene IL6/IL-6R-Komplex assoziiert anschließend mit hoher Affinität an gp130 und führt zur Rekrutierung eines zweiten gp130-Moleküls, sodass ein hexamerer Rezeptorkomplex, aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6R und gp130 entsteht (Abb. 4) [115]. Die Liganden-vermittelte Dimerisierung führt zur Aktivierung der intrazellulär mit gp130 assoziierten JAK, die anschließend die Phosphorylierung membrandistaler Tyrosinreste (Y) induzieren. Die phosphorylierten Tyrosinreste dienen als Bindungsstellen für Mitglieder der STAT Familie und der Tyrosinphosphatase SHP2 (*Src homology 2 (SH2)-domain-containing phosphatase 2*) [1, 11]. IL-6 vermittelt primär die Aktivierung von STAT3 über die Rekrutierung an Y_{765/767} (murin/human), Y_{812/814} (murin/human), Y_{904/905} (murin/human), Y_{914/915} (murin/human), sowie in einem geringeren Maße von STAT1 über die Bindung an Y_{904/905} (murin/human), Y_{914/915} (murin/human). Die phosphorylierten STAT Faktoren bilden nach ihrer Dissoziation von gp130 Homo- und Heterodimere, die daraufhin in den Zellkern translozieren und als Transkriptionsfaktoren die Expression von IL-6 Zielgenen vermitteln.

Neben der Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs führt die Stimulation mit IL-6 weiterhin zur Induktion der MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase)-Kaskade über die Rekrutierung von SHP2 an Y_{757/759} (murin/human). Die phosphorylierte SHP2 führt ihrerseits zur Rekrutierung von Adapterproteinen wie Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), das über die Bindung an den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos (*Son of sevenless*) sowie das kleine G-Protein Ras (*Rat sarcoma*) die Aktivierung der MAPK ERK1/2 (extrazellulär regulierte Kinase 1/2) vermittelt. Zusätzlich, jedoch zellspezifisch, erfolgt die Aktivierung der PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) Kaskade. Diese wird sowohl über die Interaktion von SHP2 mit Gab1 (*Grb2-associating binder 1*) und/oder direkt über die Interaktion mit JAK induziert [1, 11, 116].

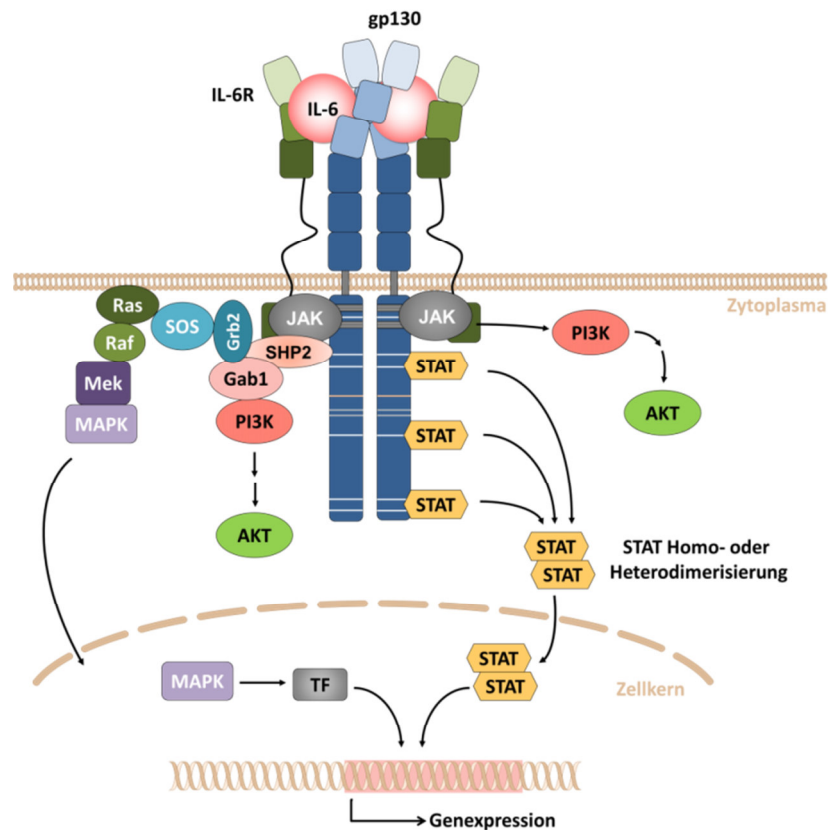


Abb. 4: Schematische Darstellung des IL-6-Rezeptorkomplexes und die durch ihn aktivierten Signalkaskaden. Die Liganden-induzierte Dimerisierung von gp130 führt zur Aktivierung der JAKs, die in Folge dessen spezifische Tyrosinreste im zytoplasmatischen Bereich von gp130 phosphorylieren. Die Bindung von STAT3 und STAT1 an Y_{765/767} (murin/human), Y_{812/814} (murin/human), Y_{904/905} (murin/human) und Y_{914/915} (murin/human) führt zur Homo- und Heterodimerisierung der STAT Proteine und induziert deren Translokation in den Zellkern, wo sie als Transkriptionsfaktoren an der Expression von IL-6 Zielgenen beteiligt sind. SHP2 bindet an Y_{757/759} (murin/human) und induziert die Aktivierung der PI3K- sowie MAPK-Kaskade. (Abkürzungen: Akt – *AKR thymoma oncogene homolog*; ERK1/2 – Extrazellulär regulierte Kinase 1/2 ; Gab1 – *Grb2-associated binder 1*; gp130 – Glykoprotein 130; Grb2 – *growth factor receptor-bound protein 2*; IL-6 – Interleukin-6; IL-6R – Interleukin-6 Rezeptor; JAK – Januskinasen; MAPK – mitogenaktivierte Proteinkinase; Mek - MAPK/ERK Kinase; PI3K – Phosphoinositid-3-Kinase; Ras – *Rat sarcoma*; Raf – *Rat fibrosarcoma*, SHP2 – *SH2 domain-containing phosphatase 2*; STAT – *signal transducer and activator of transcription*; SOS – *son of sevenless*; TF – Transkriptionsfaktor; Y – Tyrosin)

1.3 Regulationsmechanismen der IL-6-induzierten Signalwege

Eine dauerhafte Aktivierung der IL-6-induzierten Signalkaskaden steht im Zusammenhang mit einer Reihe von Erkrankungen, die u.a. zu chronischen Entzündungen der Gelenke oder des Herzen sowie zu Tumorwachstum führen können [117-125]. Aus diesem Grund ist eine Limitierung der induzierten Signalkaskaden von essentieller Bedeutung, um eine langanhaltende und/oder unkontrollierte Aktivierung von Zellen zu vermeiden.

Unter physiologischen Bedingungen stehen eine Reihe komplexer Regulationsmechanismen zur Verfügung, die das IL-6-Signal sowohl in seiner Stärke

als auch Dauer einschränken können. Hierbei werden die klassischen von den *Crosstalk*-vermittelten Regulationsmechanismen unterschieden. Im nachfolgenden Abschnitt werden die einzelnen Mechanismen genauer beschrieben und deren Funktion erläutert.

1.3.1 Klassische Regulationsmechanismen

Zu den klassischen Regulationsmechanismen gehört die Induktion und/oder Rekrutierung von Mitgliedern der CIS-SOCS- (*cytokine-inducible SH2-domain-containing protein, suppressors of cytokine signaling*) und PIAS-Familie (*protein inhibitors of activated STATs*) sowie die negative Regulation durch Proteintyrosinphosphatasen (PTP).

SOCS Proteine agieren als klassische Rückkopplungsinhibitoren, deren Synthese durch die Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs induziert wird. Bis heute sind insgesamt 8 Mitglieder beschrieben (CIS und SOCS1-7), von denen alle über eine zentrale SH2-Domäne, eine N-terminale *kinase inhibitory region* (KIR) unterschiedlicher Länge und eine C-terminale SOCS Box verfügen [126]. SOCS1 und SOCS3 gehören zu den am besten charakterisierten Vertretern dieser Familie und spielen für die Regulierung des STAT1 und STAT3 Signals eine wichtige Rolle. Während SOCS1 direkt mit den Januskinasen (JAK1, JAK2 und Tyk2) interagiert um ihre katalytische Aktivität zu hemmen [127, 128], bindet SOCS3 vornehmlich an den proximal zu gebundenen JAK gelegenen Tyrosinrest Y_{757/759} (*murin/human*) des gp130 und inhibiert die Rekrutierung des STAT3 Proteins an den aktivierten Rezeptor [129, 130]. Alle SOCS Proteine können über ihre SOCS Box mit einem Komplex bestehend aus Elongin B und C, Cullin-5, RBX2 (*Ring-box 2*) und einer E2-Ligase interagieren, um so die Ubiquitin-abhängige Degradation von aktivierten Signalproteinen und von sich selbst zu induzieren [131-133].

Ebenso können die Mitglieder der PIAS Familie (PIAS1, PIAS3, PIAS_x/PIAS2, PIAS_y/PIAS4) das IL-6-induzierte JAK/STAT Signal regulieren. Anders als die SOCS Proteine werden die PIAS Proteine konstitutiv exprimiert und binden nach Zytokinaktivierung an phosphorylierte STAT-Faktoren. PIAS1 und PIAS3 beispielsweise interagieren direkt mit STAT1 und STAT3 und blockieren deren Bindung an die DNA. Im Gegensatz dazu können PIAS_x und PIAS_y die Rekrutierung von Co-Repressor Molekülen induzieren (HDAC, Histon-Deacetylasen), um die transkriptionelle Aktivität verschiedener STAT-Faktoren zu inhibieren [134]. Darüber hinaus weisen alle Mitglieder der Familie eine SUMO-E3-

Ligase Aktivität auf, die sie zur SUMOylierung von Signalproteinen befähigt, um auf diese Weise die Lokalisation sowie Degradation der STAT Faktoren zu regulieren [135-138].

Ein weiterer Mechanismus zur Regulation des JAK/STAT Signalwegs besteht in der Dephosphorylierung von Proteinen durch PTPs. Für das IL-6-Signal als relevant gelten die Phosphatasen SHP2 und PTPN2² (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2*). PTPN2 ist eine ubiquitär und konstitutiv exprimierte Phosphatase, die in zwei Isoformen auftreten kann. Eine 45kDa schwere Form (TC45), welche im Zellkern lokalisiert ist und eine etwa 48kDa schwere Form (TC48), die im endoplasmatischen Retikulum zu finden ist [139]. Während die Funktion von TC48 bisher noch unzureichend charakterisiert ist, haben Versuche mit TC45-defizienten Mäusen gezeigt, dass diese nukleäre Isoform die Dephosphorylierung von STAT1 und STAT3 induziert [140, 141].

SHP2 wird ebenso wie PTPN2 ubiquitär und konstitutiv exprimiert und ist neben seiner Funktion als Adapterprotein für die Aktivierung der MAPK Kaskade ebenso für die Regulation des IL-6-Signals von Bedeutung. Die Phosphatase besteht aus zwei N-terminalen SH2-Domänen, einer zentralen katalytischen Domäne (PTP-Domäne) und einer C-terminalen Domäne, die eine prolinreiche Sequenz sowie Tyrosinphosphorylierungsstellen besitzt. Im inaktiven Zustand liegt SHP2 in einer geschlossenen Konformation vor, bei der die SH2-Domäne mit der PTP-Domäne interagiert und so die Erreichbarkeit für Substrate verhindert. Nach Stimulation kommt es in Folge der Bindung an gp130 (Y^{757/759} (murin/human)) über die SH2-Domänen zur Konformationsänderung, wodurch das katalytische Zentrum für Substrate zugänglich wird [11, 142, 143].

1.3.2 *Crosstalk*-Regulation

Da während entzündlicher Prozesse und Infektionen eine Vielzahl von Zytokinen freigesetzt wird, spielt auch die Regulation der Zytokine und ihrer Signalwege untereinander (*Crosstalk*) eine wichtige Rolle. Untersuchungen haben gezeigt, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α ebenso wie andere proinflammatorische Faktoren (LPS, Zellstress) an der *Crosstalk*-Regulation des IL-6-Signals beteiligt sind. Sie induzieren u.a. die Expression von SOCS3 [144] oder aber

² ebenfalls unter dem Namen TC-PTP (*T-cell protein tyrosine phosphatase*) bekannt

verstärken dessen Expression über die Stabilisierung der mRNA, in dem sie p38 aktivieren [145, 146].

Ein weiterer und unter physiologischen Bedingungen womöglich relevanter Mechanismus ist die *Crosstalk*-vermittelte Internalisierung von gp130 (Abb. 5). Hierbei wird durch die Phosphorylierung von p38 durch proinflammatorische Stimuli (IL-1 β , TNF α , LPS, oxidativer Stress, UV Licht) die Aktivierung ihres Substrates, der Serin-/Threonin-Kinase MK2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2), vermittelt, die infolgedessen gp130 an S_{780/782} (murin/human) phosphoryliert. Die Phosphorylierung des Serinrests sowie das Vorhandensein des Dileucin-Motivs (murin: L₇₈₄L₇₈₅; human: L₇₈₆L₇₈₇), welches als Bindestelle für das Adapterprotein-2 (AP2) fungiert [51, 53, 147], begünstigen die Aufnahme von gp130 in Clathrin-umhüllte Vesikel (*coated pits*) und führen schließlich zur lysosomalen Degradation des Rezeptors [52, 148].

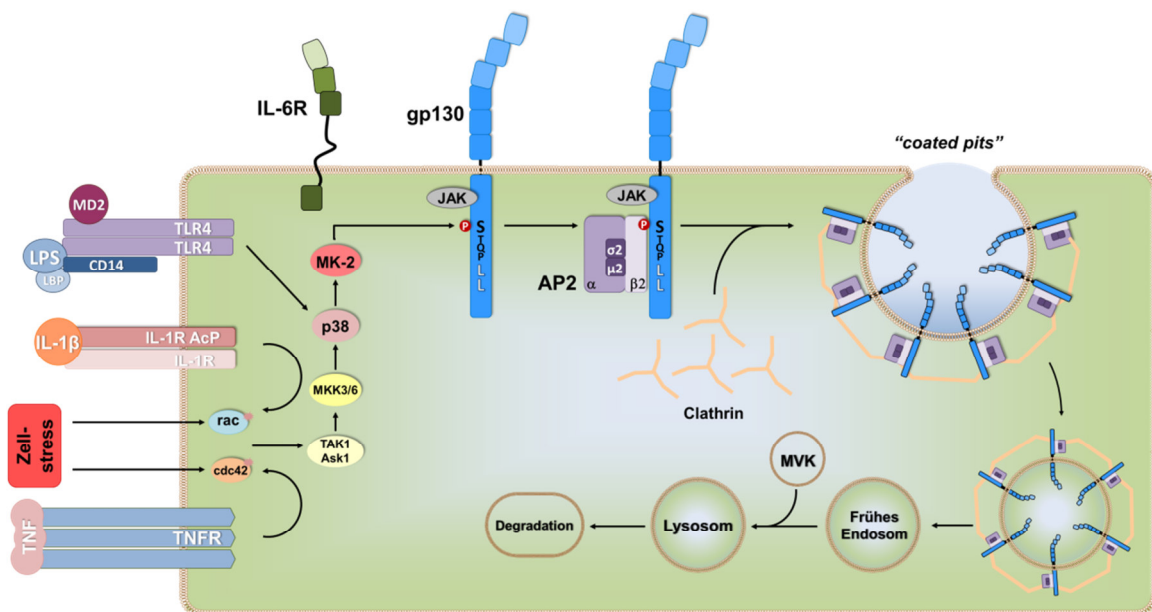


Abb. 5: Internalisierung von gp130 durch proinflammatorische Zytokine oder Zellstress. Proinflammatorische Zytokine oder Zellstress führen zur Aktivierung der Serin-/Threonin-Kinase MK2, die infolgedessen gp130 an Serin 780 (human:782) phosphoryliert. Bedingt dadurch bindet das Adapterprotein AP2 möglicherweise mit einer höheren Affinität an ein Dileucin-Motiv und es kommt zu einer beschleunigten Aufnahme in Clathrin-umhüllte Vesikel und schließlich zum lysosomalen Abbau des gp130 Moleküls. (Abkürzungen: AP2 – Adapterprotein 2; gp130 – Glykoprotein 130; IL-1 – Interleukin-1; IL-1R AcP – IL-1 Rezeptor akzessorisches Protein; IL-6 – Interleukin-6; IL-6R – Interleukin-6 Rezeptor; JAK – Januskinasen; LBP – LPS-Bindeprotein; LPS – Lipopolysaccharid; MD2 – myeloisches Differenzierungsprotein 2; MK2 – MAPK-aktivierte Proteinkinase 2; MKK3/6 – MAPK Kinase 3/6; MVK – multivesikuläre Körper; TAK/Ask1 – tumor growth factor-aktivierte Kinase/Apoptosesignal-regulierende Kinase-1; TLR4 – Toll-like Rezeptor 4; TNF – Tumornekrosefaktor; TNFR – TNF Rezeptor).

1.4 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort dar. Sie gehören zu den sogenannten professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APZ), deren primäre Aufgabe darin besteht Pathogene zu erkennen, diese aufzunehmen und zu prozessieren, um sie anschließend naiven T-Zellen in den lymphatischen Organen zu präsentieren. Neben ihrer zentralen Rolle bei der Induktion einer primären Immunantwort, spielen DZ ebenso eine wichtige Rolle bei der Induktion immunologischer Toleranzen [149-151].

Die DZ wurden 1973 von Ralph Steinmann als ein neuer sternförmiger oder Baum-ähnlicher Zelltyp (lat. *dendriticus* – verzweigt) charakterisiert, der in den lymphatischen Organen der Maus zu finden ist [152]. Erstmals beobachtet wurden sie jedoch bereits 1868 vom deutschen Mediziner Paul Langerhans. Dieser beschrieb die in der Epidermis lokalisierten, nach ihm benannten *Langerhans Zellen* fälschlicherweise als einen Bestandteil des zentralen Nervensystems, da er sie für Nervenzellen der Haut hielt. In den Jahren nach 1973 konnte in einer Reihe von Studien die Existenz von DZ sowohl in lymphatischen als auch nicht-lymphatischen Organen der Maus und anderer Spezies, inklusive des Menschen, eindeutig nachgewiesen werden. Doch erst mit der Entwicklung neuer Methoden in den 1990iger Jahren, die eine *in vitro* Generierung aus CD34⁺ Knochenmark-Vorläuferzellen [153] oder CD14⁺ Monozyten [154] erlaubten, rückten die DZ in den Fokus der immunologischen Forschung.

1.4.1 Subtypen dendritischer Zellen der Maus

DZ repräsentieren eine heterogene Zellpopulation, die auf Basis ihrer Entstehung, ihres Vorkommens und/oder ihrer Funktionen in verschiedene Subtypen unterteilt werden können. Entsprechend der Einteilung nach *Satpathy et al.* [155] und *Belz & Nutt* [156] werden folgende vier Haupttypen unterschieden: die konventionellen DZ (kDZ), die plasmazytoiden DZ (pDZ), die Langerhans Zellen (LZ) sowie die inflammatorischen DZ (auch monozytäre DZ, moDZ).

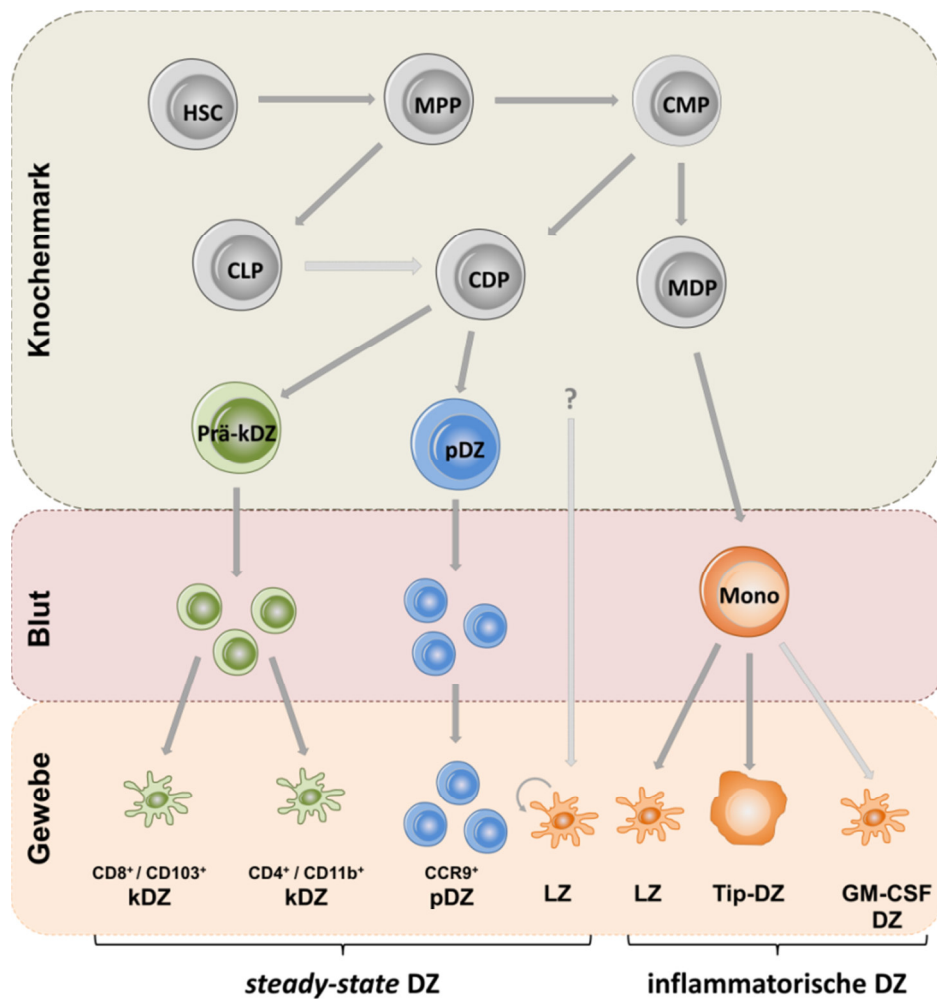


Abb. 6: Entwicklung von *steady-state*- und inflammatorischen DZ der Maus. CLP – *common lymphoid progenitor*; CMP – *common myeloid progenitor*; CDP – *common dendritic cell progenitor*; DZ – dendritische Zellen; GM-CSF – *granulocyte/macrophage colony-stimulating factor*; HSC – *hematopoietic stem cell*; kDZ – konventionelle/klassische DZ; Mono – Monozyten, MPP – *multipotent progenitor*; MDP – *macrophage/dendritic cell progenitors*; pDZ – plasmazytoide DZ; LZ – Langerhans Zellen, Tip-DZ – TNF- und iNos-produzierende DZ (Modifiziert nach Satpathy *et al.* [155]).

Ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) im Knochenmark können sich DZ sowohl aus myeloiden (CMPs, engl. *common myeloid progenitors*) als auch lymphoiden Vorläuferzellen (CLPs, engl. *common lymphoid progenitors*) entwickeln. Der überwiegende Anteil der DZ in den lymphoiden Organen (~90%) ist jedoch auf CMPs zurückzuführen. Diese entwickeln sich zu Makrophagen/DZ-Vorläuferzellen (MDPs, engl. *macrophage/dendritic cell progenitors*), aus denen Monozyten sowie DZ-Vorläuferzellen (CDPs, engl. *common dendritic cell progenitors*) hervorgehen. CDPs besitzen die Fähigkeit sich zu allen DZ Subtypen zu entwickeln, die unter homöostatischen Bedingungen auftreten können. Hierzu zählen die pDZ und prä-kDZ, die nach Auswanderung über die Blutbahn lymphoide- und nicht-lymphoide

Gewebe besiedeln, in denen sie ihre Ausreifung in die verschiedenen kDZ Subtypen beenden. Eine weitere Klasse stellen die inflammatorischen DZ dar, welche nur in Folge einer Entzündung oder Infektion auftreten und aus im Blut zirkulierenden Monozyten hervorgehen. Die epidermalen Langerhans Zellen nehmen eine Sonderstellung innerhalb der DZ-Klassen ein, da sie aus lokalen Vorläuferzellen oder durch Selbsterneuerung entstehen. Auch ist beschrieben, dass sie unter entzündlichen Bedingungen aus Monozyten-Vorläuferzellen hervorgehen können [151, 155-160].

Konventionelle DZ

Die konventionellen DZ oder auch klassischen DZ zeichnen sich durch eine hohe Phagozytoseaktivität und die Fähigkeit Antigene zu prozessieren und zu präsentieren aus. Sie besitzen eine kurze Halblebenszeit von nur wenigen Tagen, weshalb sie permanent durch Knochenmark-Vorläuferzellen ersetzt werden [161]. Entsprechend ihrer Lokalisation im Gewebe und ihrer migratorischen Eigenschaften werden sie in zwei Gruppen unterteilt: die lymphoiden geweberesidenten CD4⁺ und CD8⁺ kDZ sowie die nicht-lymphoiden, migratorischen CD11b⁺ und CD103⁺ kDZ [159, 160, 162, 163]. Während CD8⁺ kDZ durch *cross*-Präsentation die Aktivierung zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen vermitteln, sind CD4⁺ kDZ durch ihre MHCII (*major histocompatibility complex II*)-abhängige Antigenpräsentation charakterisiert, die zur Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen führt. Aufgrund ihrer analogen Entwicklung und Funktionen repräsentieren die migratorischen CD11b⁺ kDZ das Äquivalent zu den residenten CD4⁺ kDZ und die migratorischen CD103⁺ kDZ das Äquivalent zu den residenten CD8⁺ kDZ [155].

Plasmazytoide DZ

Die Klasse der plasmazytoiden DZ ist durch ihre Fähigkeit große Mengen an Typ I Interferonen (IFN) freizusetzen charakterisiert, weshalb sie eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunantwort spielen. Ihren Namen verdanken die pDZ ihrer plasmazellartigen Morphologie, wodurch sie sich von herkömmlichen DZ unterscheiden. Darüber hinaus haben sie nur sehr geringe phagozytische Eigenschaften sowie einen hohen MHCII Membran *turnover*, weshalb sie nur schlecht

Antigene präsentieren. Murine pDZ sind positiv für Marker B220/CD45RA und Ly6C, aber exprimieren nur schwach CD11c [157, 160, 164, 165].

Inflammatorische DZ

Anders als kDZ und pDZ treten die inflammatorischen DZ lediglich transient während entzündlicher Prozesse oder mikrobieller Infektionen auf. Sie zeichnen sich durch eine hohe Ly6C, MHCII und CD11b sowie mittlere CD11c Expression aus [157]. Zu den bekanntesten Vertretern ihrer Klasse gehören die TNF α - (Tumornekrosefaktor- α) und iNos- (*inducible nitric oxide-synthase*) produzierenden DZ, auch Tip-DZ (*TNF α - and iNOS-producing inflammatory DZ*) genannt. Sie produzieren große Mengen TNF- α und iNos und wurden erstmals in mit *Listeria monocytogenes* infizierten Mäusen nachgewiesen [166]. Als weitere Vertreter dieser Klasse gelten die GM-CSF DZ (*granulocyte/macrophage colony-stimulation factor DZ*), welche *in vitro* aus Knochenmark-Vorläuferzellen oder mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, engl. *peripheral blood mononuclear cells*) in Anwesenheit von GM-CSF differenzieren [167, 168].

Langerhans Zellen

Wie bereits erwähnt nehmen die Langerhans Zellen eine Sonderstellung innerhalb der DZ Ontologie ein. Unter homöostatischen Bedingungen entwickeln sie sich aus lokalen Vorläuferzellen, die bereits pränatal in die Epidermis eingewandert sind, oder durch Selbsterneuerung [157]. Es wird vermutet, dass die Vorläuferzellen auf Monozyten der fötalen Leber sowie auf Dottersack-Makrophagen zurückzuführen sind [157, 169].

1.4.2 Reifungsstadien von DZ

DZ können hinsichtlich ihres Reifegrads in unreife, semireife und (voll-) reife DZ unterteilt werden. Bei dem Großteil der in den peripheren Geweben und lymphatischen Organen vorliegenden DZ handelt es sich um nicht-migratorische unreife DZ, die zwar eine hohe Endozytoseaktivität besitzen, jedoch bei Abwesenheit pathogener Faktoren und der permanenten Aufnahme von Selbstantigenen nicht

aktiviert werden können [170, 171]. Sie exprimieren nur schwach MHC-Moleküle sowie CD40, CD80 und CD86. Auch sezernieren sie kaum proinflammatorische Zytokine, weshalb sie als tolerogen gelten [150, 155, 171].

Vollreife DZ entstehen durch den Kontakt mit pathogenen Antigenen, wie dem bakteriellen Zellmembranbestandteil Lipopolysaccharid (LPS) oder anderen mikrobiellen Faktoren. Sie haben eine verminderte Phagozytoseaktivität, zeigen aber eine erhöhte Fähigkeit zur Induktion und Polarisation immunogener T-Zellen. Reife DZ zeichnen sich durch eine verstärkte Expression von MHC II und CD40 sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 aus. Überdies produzieren sie große Mengen proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF α , IL-1 β , IL-12), deren Produktion durch ein positives Rückkopplungssignal der differenzierten T-Zellen (CD40/CD40L) noch verstärkt werden kann [155, 172].

Semireife DZ stellen einen intermediären Phänotyp zwischen unreifen und vollreifen DZ dar. Genau wie vollreife DZ exprimieren sie verstärkt MHCII, CD40 und kostimulatorische Moleküle, sezernieren aber im Gegensatz dazu keine proinflammatorischen Zytokine. Daher gelten sie auch als reife tolerogene DZ. *In vitro* kann die Entstehung eines solchen semireifen Phänotyps durch die Behandlung mit TNF α oder die Zerstörung der E-Cadherin-vermittelten DZ-DZ Interaktion begünstigt werden [173]. Erhalten die DZ jedoch ein zusätzliches zweites Signal z.B. durch die Behandlung mit LPS oder CD40L können sie sich zu vollreifen DZ entwickeln [171, 174, 175].

1.5 Ziel der Arbeit

Die Differenzierung und Aktivierung dendritischer Zellen wird durch eine Reihe verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren beeinflusst, inklusive IL-6 und STAT3. Die Funktion des IL-6-Signals für die DZ Reifung ist bisher jedoch umstritten. Einerseits ist gezeigt, dass IL-6 die Differenzierung und Aktivierung der DZ einschränkt und stattdessen die Entwicklung von Monozyten/Makrophagen verstärkt [176-180], andererseits gibt es Berichte die darauf hindeuten, dass IL-6 die Differenzierung und Expansion unreifer DZ steigert [181, 182].

Wie bereits erwähnt, ist die biologische Wirkung eines Zytokins von der Dauer und Stärke des induzierten Signals abhängig und wird u.a. von der Rezeptorexpression beeinflusst. Obwohl schon seit langen bekannt ist, dass DZ sowohl gp130 als auch den IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren, weiß man bisher nur wenig über die Regulation der Rezeptoren auf diesem Zelltyp. Ziel der vorliegenden Arbeit sollte daher sein, das Expressionsprofil des IL-6-Rezeptors auf DZ zu untersuchen und die Relevanz der gp130 Internalisierung für die Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen zu analysieren. Für die Versuche sollten sowohl DZ aus murinem Knochenmark (KM-DZ) als auch DZ Subtypen (kDZ, pDZ) von WT Mäusen und Mäusen mit einer internalisierungsdefizienten gp130 Mutante (gp130^{LLAA}) analysiert werden.

Da IL-6 generell eine wichtige Rolle bei der Differenzierung hämatopoetischer Zellen spielt, so auch bei T- und B-Zellen, sollte zusätzlich der Einfluss der gp130^{LLAA} Mutante auf die Homöostase myeloider und lymphoider Zellen untersucht werden.

Aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe und von Kooperationspartner war bekannt, dass OSM in humanen dermalen Fibroblasten (HDF) die Expression einer Vielzahl von Genen induzieren kann. Zu den über 400 Genen, die um mehr als das Dreifache erhöht waren, zählten auch Interferon-stimulierte Gene (ISG), wie der Transkriptionsfaktor *interferon regulatory factor 1* (IRF1) und die RNA DExD/H-Box Helikasen *Retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I) und *Melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5). Diese Gene werden bereits früh während einer viralen Infektion induziert und sind für die Induktion weiterer antiviraler Gene [183, 184] bzw. für die Erkennung und Bindung viraler im Zytoplasma lokalisierter RNA wichtig [185]. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen zeigen, dass OSM die antivirale Wirkung von Typ I IFN steigern kann, indem es die Phosphorylierung von STAT1 sowie die Induktion der ISG verstärkt [186-188].

Im zweiten Teilprojekt der vorliegenden Arbeit sollte die OSM-vermittelte Induktion früher antiviraler Gene, insbesondere die der Helikasen RIG-I und MDA5, in HDF untersucht und der zugrunde liegende molekulare Mechanismus aufgeklärt werden. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob ein additiver/synergistischer Effekt zwischen der OSM- und IFN-vermittelten Induktion der Helikasen existiert.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien, Kits und Verbrauchsmaterial

2.1.1 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von AppliChem (Darmstadt), Gibco (Karlsruhe), Life Technologies (Darmstadt), MerckMillipore (Darmstadt), PAA (Cölbe), Peqlab (Erlangen), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Alle Puffer und Medien wurden mit entsalztem Wasser aus einer Millipore Filteranlage (MerckMillipore, Darmstadt) angesetzt und ggfs. autoklaviert oder steril filtriert.

2.1.2 Kits

Folgende Reaktionskits wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt:

<i>Clarity™ Western ECL Blotting Substrate</i>	BioRad, München
<i>FastStart SYBR Green (Rox) Master kit</i>	Roche, Mannheim
<i>Lipofectamin® RNAiMAX Transfection Reagent</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
<i>Mouse IL-6 Quantikine ELISA kit</i>	R&D, Wiesbaden
<i>QIAshredder™</i>	Qiagen, Hilden
<i>RNeasy Mini RNA-Isolationskit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Pierce Enhanced Chemiluminescence kit</i>	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
<i>Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit</i>	Roche, Mannheim

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Amersham Hybond PVDF Membran (0.45µm)	GE Healthcare, München
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München
Einmalpipetten in verschiedenen Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen und -kanülen	Braun, Melsungen
Corning Bottle Top Filter (1000 ml, 0.22 µm)	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt

Corning Lagerflasche, steril (250 ml, 500 ml)	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Countess™ cell counting chamber slide	Life Technologies, Darmstadt
EDTA Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
FACS®-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Filter-Tips	Sarstedt, Nümbrecht
gentleMACS™ C Tube	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Handschuhe	Starlab, Hamburg
Konduktive Spitzen	Qiagen, Hilden
Konduktive Spitzen	Biozym, Hessisch-Oldendorf
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
MicroAmp® Optical 384-well Platten	Applichem, Darmstadt
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applichem, Darmstadt
Multiwell-Zellkulturplatten (12well)	BD Biosciences, Heidelberg
Multiwell-Zellkulturplatten (6well, 96well)	Sarstedt, Nümbrecht
Nalgene™ Rapid-Flow™ Einweg-Filtrationsgerät	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Petrischalen (6 cm/10 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Röntgenfilm (Kodak)	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Röhre (flow cytometry)	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubröhren (15 ml/50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Whatman™, Blottingpapier (3 mm)	GE Healthcare, München
Zellkulturplatten in verschiedenen Größen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb (70 µM)	BD Biosciences, Heidelberg

2.2 Stimulanzen und Rezeptoren

Tabelle 1: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Zytokine, Stimulanzen und Rezeptoren sowie deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.

Zytokine/Rezeptoren		Konzentration	Hersteller
Rekombinantes humanes Interferon- α 2b	hIFN α 2	100 U/ml	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. Baron, RWTH Aachen
Rekombinantes humanes Interferon- β	hIFN β	1000 U/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes humanes Interferon- γ	hIFN γ	1000 U/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes humanes IL-6	hIL-6	20 ng/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinanter humaner sIL-6R	hsIL-6R	500 ng/ml	Zur Verfügung gestellt von G. Müller-Newen, RWTH Aachen
Hyper-IL-6	h-IL-6	1 – 50 ng/ml	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. Scheller und Dr. D. Floss, Düsseldorf.
Rekombinantes humanes Oncostatin M	hOSM	20 ng/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes murines Interferon- γ	mIFN γ	500-1000 U/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes murines IL-6	mIL-6	0.1 – 5 ng/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes murines Oncostatin M	mOSM	10-20 ng/ml	R&D Systems, Wiesbaden
Rekombinantes murines TNF α	mTNF α	10 ng/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes Ratten Oncostatin M	rOSM	10-20 ng/ml	PeptoTech, Hamburg
Rekombinantes Ratten Interferon γ	rIFN γ	500-1000 U/ml	PeptoTech, Hamburg
Choleratoxin	Ctx	0.5 μ g/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid (0111:B4)*	LPS	100 ng/ml	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lipopolysaccharid (0127:B8)	LPS	100 ng/ml	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. M. Lutz, Universität Würzburg

(* LPS, das standardmäßig für die Stimulation der KM-DZ Kulturen verwendet wurde)

2.3 Inhibitoren

Tabelle 2: Bezeichnung der verwendeten Inhibitoren, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.

Inhibitor	Target	Konzentration	Inkubationszeit	Hersteller
R406	Syk	5 μ M	30 min	Zur Verfügung gestellt von AG Nieswandt
SB202190	p38 Inhibitor	10 μ M	20-30 min	MerckMillipore, Darmstadt
SB202190	p38 Inhibitor	10 μ M	20-30 min	Absource Diagnostics (Selleckchem), München
SB203085	p38 Inhibitor	10 μ M	20-30 min	MerckMillipore, Darmstadt

Mek1/2 Inhibitor	Mek1/2	5 μ M	30 min	MerckMillipore, Darmstadt
IKK16	IKK Inhibitor	5 μ M	30 min	Absource Diagnostics (Selleckchem), München
Ly294002	PI3 Kinase Inhibitor	20 μ M	30 min	Invitrogen Life Technologies, Darmstadt
Filipin III	Cholesterol	5mg/ml	1-5 min	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dynasore	Dynamin	80 μ M	1-5 min	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Dynamin	0.45M	1-5 min	Appllichem, Darmstadt

2.4 Antikörper

2.4.1 Antikörper für Western Blot

Tabelle 3: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Western Blot Antikörper, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.

Spezifität	Klon	Wirtsspezies	Konzentration	Hersteller
Anti-Maus OSMR β	pk	Ziege	1:1000	R&D* Systems, Wiesbaden
Anti-Maus gp130 (M-20)	pk	Kaninchen	1:250	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Maus LIFR (C-19)	pk	Kaninchen	1:250	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Jak1	6G4	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-Jak2	D2E12	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-STAT1 (Y701)	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-STAT1 (Y701)	D4A7	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-STAT1 (S727)	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph- STAT1 (S727)	D3B7	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-STAT1	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-STAT3 (Y705)	3E2	Maus	1:1000-2000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-STAT3 (S727)	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-STAT3	124H6	Maus	1:1000-2000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-NF κ B p65 (Ser536)	93H1	Kaninchen	1:10000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-NF κ B p65	C22B4	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-IKK α/β (Ser176/180)	16A6	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-IKK α	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-IKK β	L570	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-I κ B α (Ser32)	14D4	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-I κ B α	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-PI3K p85	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-Akt (S473)	D9E	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-Akt	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-p38 (T180/Y182)	D3F9	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.

Anti-p38	D13E1	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-MK2 (T ₃₃₄)	27B7	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-MK2 (T ₂₂₂)		Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-MK2	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-p44/42 (T ₂₀₂ /Y ₂₀₄)	E10	Maus	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-p44/42	pk	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-RIG-I	D14G6	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-MDA5	D74E4	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-IRF1	D5E4	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-ph-IRF3 (S ₃₉₆)	4D4G	Kaninchen	1:1000	CST**, Frankfurt a. M.
IRF3 (FL-425)	pk	Kaninchen	1:250	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-PTPN2 (TC-PTP)		Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-GAPDH	14C10	Kaninchen	1:2000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti- α -Tubulin	pk	Maus	1:3000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Anti-Maus IgG-HRP		Pferd	1:2000-3000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-Kaninchen IgG-HRP		Ziege	1:2000	CST**, Frankfurt a. M.
Anti-Ziege IgG-HRP		Kaninchen	1:3000-4000	Dako (Biozol), Eching
Anti-Biotin-HRP		Ziege	1:3000	CST**, Frankfurt a. M.

(* Research and Development)

(** Cell Signaling Technology)

2.4.2 eBeads und Antikörper für die FACS Analyse

Für die Analyse myeloider und lymphoider Zellen mittels FACS wurden Maus spezifische Antikörper verwendet, die mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycocerythrin (PE), Indocarbocyanin (Cy), Allophycocyanin (APC), Perdinin-Chlorophyll (PerCP) oder Tandem-Konjugaten markiert waren.

Tabelle 4: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten FACS Antikörper für die Oberflächenfärbung, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.

Spezifität	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller
CD16/CD32	Ratte, IgG, λ	93	1:200	eBioscience, Frankfurt a.M.
B220 eFluor450	Ratte, IgG2a, κ	RA3-6B2	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD3 eFluor450	Ratte, IgG2a, κ	17A2	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD4 PeCy7	Ratte, IgG2b, κ	GK1.5	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD8 α PerCP Cy5.5	Ratte, IgG2a, κ	53-6.7	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD11b APC	Hamster, IgG	N418	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD11c PeCy7	Hamster, IgG	N418	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD11c APC	Hamster, IgG	N418	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD19 APC	Maus, IgG, κ	MB19-1	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD40 APC	Ratte, IgG2a, κ	1C10	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45 APC eFluor780	Ratte, IgG2b, κ	30-F11	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD80 APC	Hamster IgG	16-10A1	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.

CD86 APC	Ratte, IgG2a, κ	GL1	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD135 (Flt3) APC	Ratte, IgG2a, κ	A2F10	1:20	BioLegend, London (UK)
Lineage cocktail FITC:				
CD3e FITC		145-2C11		
Ly-6G/Ly-6C FITC	Hamster IgG	RB6-8C5		
CD11b	Ratten IgG2a	M1/70	20 μ l/1*10 ⁶	BioLegend, London (UK)
B220	Ratten IgG2b	RA3-6B2		
TER-19		Ter-119		
MHC II eFluor450	Ratte, IgG2b, κ	M5/114.15.2	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD118 (LIFR β) PE	Ratte, IgG1	673602	1: 15	R&D Systems, Wiesbaden
CD126 (IL-6R α) PE	Ratte, IgG2b	D7715A7	1:150	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD130 (IL-6R β) PE	Ratte, IgG2a	125623	1:10-20	R&D Systems, Wiesbaden
CD130 (IL-6R β) PE*	Ratte, IgG2a, κ	KGP130	1:150	eBioscience, Frankfurt a.M.
IL-27R α (WSX-1/TCCR) PE	Ratte, IgG2b	263503	1:15	R&D Systems, Wiesbaden
Isotyp PE	Ratte, IgG2a, κ	eBR2a	1:15	eBioscience, Frankfurt a.M.
Isotyp PE	Ratte, IgG2b, κ	eB149/10H5	1:15	eBioscience, Frankfurt a.M.
Isotyp PE	Ratte, IgG		1:15	Emfret, Eibelstadt

(* wenn nicht anders vermerkt, wurde dieser Antikörper standardmäßig für die Analyse der gp130 Expression verwendet)

Tabelle 5: Bezeichnung der verwendeten Comp eBeads für die FACS Analyse.

Spezifität	Verwendung	Hersteller
OneComp Beads	FACS Kompensation	eBioscience, Frankfurt a.M.
UltraComp Beads	FACS Kompensation	eBioscience, Frankfurt a.M.

2.5 Small interfering ribonucleic acid (siRNA)

Alle *small interfering ribonucleic acids* (siRNAs) wurden als *ON-TARGET plus SMART pool* oder *ON-TARGET plus Set of 4* von der Firma Dharmacon, verkauft von Thermo Fisher Scientific Inc. (Darmstadt), bezogen. Die *nonsilencing control* siRNA wurde von der Firma Qiagen (Hilden) bezogen.

Tabelle 6: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten siRNAs.

Target	
<i>human STAT1</i> siRNA	NM_007315, NM_139266
<i>human STAT3</i> siRNA	NM_139276, NM_2123662, NM_003150
<i>human IRF1</i> siRNA	NM_002198
<i>human LIFR</i> siRNA	XM_005248302, NM_002310, XM_005248303, NM_001127671 XM_005248301
<i>human PTPN2</i> siRNA	NM_080426, NM_001207013, NM_002828, NM_080422
<i>human SUMO1</i> siRNA	NM_001005781, NM_003352, NM_001005782

<i>human PML siRNA</i>	NM_033250, XM_005254461, XM_005254462, NM_033246, XM_005254454, XM_005254456, XM_005254455, XM_005254452, NM_033240, XM_005254453, NM_033239, NM_033247, NM_033238, NM_002675, XM_005254451, NM_033249, XM_005254460, XM_005254459, XM_005254458, XM_005254457, NM_033244
<i>human SOCS3 siRNA</i>	NM_003955
non-silencing control siRNA	

2.6 Protein Marker

Protein Marker für SDS-Gel und Western Blot:

PageRuler™ Plus Prestained Protein Marker (10-250 kDa) (Fermentas, St. Leon-Rot)

Biotinylierter Protein Marker (9-200 kDa) (CST³, Frankfurt a.M)

2.7 Primer Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

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

Tabelle 7: Übersicht der für die qRT-PCR verwendeten humanen Primer.

Primer	GC Gehalt	Länge	Sequenz (5'→3')	Genbezeichnung
hGAPDH for	57,9	19	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	<i>GAPDH</i>
hGAPDH rev	52,6	19	5'-GCCCAATACGACCAATCC-3'	
hRIG-I for	39,1	23	5'-CTTTTTCTCAAGTTCCTGTTGGA-3'	<i>DDX58</i>
hRIG-I rev	45	20	5'-TCCCAACTTCAATGGCTTC-3'	
hMDA5 for	52,6	19	5'-GGCACCATGGGAAGTGATT-3'	<i>IFH1</i>
hMDA5 rev	39,1	23	5'-GATGATGATATTCTTCCCTTCCA-3'	
hIRF1 for	57,9	19	5'-CAGCCCAAGAAAGTCTCCTC-3'	<i>IRF1</i>
hIRF1 rev	47,6	21	5'-TTGAACGGTACAGACAGAGCA-3'	
hIRF7 for	61,1	18	5'-AGCTGTGCTGGCGAGAAG-3'	<i>IRF7</i>
hIRF7 rev	52,6	19	5'-CATGTGTGTGTGCCAGGAA-3'	
hIRF9 for	57,9	19	5'-AGCCTGGACAGCAACTCAG-3'	<i>IRF9</i>
hIRF9 rev	55	20	5'-GAAACTGCCCACTCTCCAC-3'T	
hSTAT3 for	47,6	21	5'-CCCTTGATTGAGAGTCAAGA-3'	<i>STAT3</i>
hSTAT3 rev	55	20	5'-AAGCGGCTATACTGCTGGTC-3'	
hSOCS3 for	52,6	19	5'-AGACTTCGATTCGGGACCA-3'	<i>SOCS3</i>
hSOCS3 rev	52,6	19	5'-AACTTGCTGTGGGTGACCA-3'	

³ Cell Signaling Technology

hSOCS1 for	57	19	5'-CCCCTGGTTGTTGTAGCAG-3'	SOCS1
hSOCS1 rev	60	20	5'-GTAGGAGGTGCGAGTTCAGG-3'	
hLIFR for	55	20	5'-GGCCCGGAGAAGAGTATGTA-3'	LIFR
hLIFR rev	47,6	21	5'-TCACCACTCCAACAATGACAG-3'	
hPML for	39,1	23	5'-ACCTCAAGATTGACAATGAAACC-3'	PML
hPML rev	55	20	5'-ACACGGCCTTGGAGTAGATG-3'	
hSUMO1 for	50	20	5'-AAGCCACCGTCATCATGTCT-3'	SUMO1
hSUMO1 rev	47,6	21	5'-TTATCCCCCAAGTCCTCAGTT-3'	

Tabelle 8: Übersicht der für die qRT-PCR verwendeten murinen Primer.

Primer	GC Gehalt	Länge	Sequenz (5'→3')	Genbezeichnung
mActin for	50	20	5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3'	<i>Actb</i>
mActin rev	55	20	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'	
mGAPDH for	52,4	21	5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'	<i>Gapdh</i>
mGAPDH rev	43,5	23	5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'	
mRIG-I for	61,1	18	5'-TCCTGGCTCGAGGATGAG-3'	<i>Ddx58</i>
mRIG-I rev	50	20	5'-TGACTGCAGCTTCAACAGGT-3'	
mMDA5 for	55	20	5'-CTGCCCAGAAGACAACACAG-3'	<i>Ifih1</i>
mMDA5 rev	47,6	21	5'-TCCAGACTTGACTCATCGACA-3'	
mMDA5 for II	55	20	5'-CCTGCTGTCCGATGAGTCAAG-3'	<i>Ifih1</i>
mMDA5 rev II	43	23	5'-GCCAAACTTGTGTCTGATTCTGT-3'	
mIRF1 for	61,1	18	5'-CTCTGCTGTGCGGGTGTA-3'	<i>Irf1</i>
mIRF1 rev	55	20	5'-CCACACAGCTTCCTCTTGGT-3'	
mIRF7 for	57,9	19	5'-ACCCTGATCCTGGTGAAGC-3'	<i>Irf7</i>
mIRF7 rev	50	20	5'-TAGACAAGCACAAGCCGAGA-3'	
mIRF9 for	55	20	5'-CAGCAACTGCAACTCTGAGC-3'	<i>Irf9</i>
mIRF9 rev	55	20	5'-AGCAGCAGCGAGTAGTCTGA-3'	
mGP130 for	50	20	5'-TCCCATGGGCAGGAATATAG-3'	<i>Il6st</i>
mGP130 rev	50	20	5'-CCATTGGCTTCAGAAAGAGG-3'	
mOSMR for	47,6	21	5'-CCAAAAAGAGTTCAGCACACC-3'	<i>Osmr</i>
mORMR rev	55	20	5'-CCGACCACACTTGTCTCCAT-3'	
mIL-6R for	57,9	19	5'-ATCCTCTGGAACCCACAC-3'	<i>Il6r</i>
mIL-6R rev	47,8	23	5'-GAACTTTCGTAAGTATCCTCGTG-3'	
mLIFR for	50	20	5'-TGTGTTTGCCTTGTGAGAGG-3'	<i>Lifr</i>
mLIFR rev	36	25	5'-TCTTTTATTGTCTACCATCCACGAT-3'	
mOSM for	52,4	21	5'-TGCTCCAACCTTCTCTCAG-3'	<i>Osm</i>
mOSM rev	52,6	19	5'-CAGGTTTTGGAGGCGGATA-3'	
mIL-6 for	34,6	26	5'-TCTAATTCATATCTTCAACCAAGAGG-3'	<i>Il6</i>
mIL-6 rev	55	20	5'-TGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'	
mSOCS3 for	52,6	19	5'-ATTCGCTTCGGGACTAG-3'	<i>Socs3</i>
mSOCS3 rev	50	20	5'-AACTTGCTGTGGGTGACCAT-3'	
mIL-1 α for	38,1	21	5'-TTGGTTAAATGACCTGCAACA-3'	<i>Il1a</i>
mIL-1 α rev	57,9	19	5'-GAGCGCTCACGAACAGTTG-3'	
mIL-1 β for	47,4	19	5'-TTGACGGACCCCAAAGAT-3'	<i>Il1b</i>
mIL-1 β rev	52,6	19	5'-GATGTGCTGCTGCGAGATT-3'	
mIL-10 for	55	20	5'-CAGAGCCACATGCTCCTAGA-3'	<i>Il10</i>
mIL-10 rev	50	20	5'-TGTCCAGCTGGTCCTTTGTT-3'	

mIL-2 for	52,4	21	5'-GCTGTTGATGGACCTACAGGA-3'	<i>Il2</i>
mIL-2 rev	45	20	5'-TTCAATTCTGTGGCCTGCTT-3'	
mIL-12p40 for	63,2	19	5'-GACTCCAGGGGACAGGCTA-3'	<i>Il12b</i>
mIL-12p40 rev	50	22	5'-GGAGATGGTTAGCTTCTGAGGA-3'	
mIL-12p35 for	42,9	21	5'-TCAGAATCACAACCATCAGCA-3'	<i>Il12a</i>
mIL-12p35 rev	45,9	22	5'-CGCCATTATGATTCAAGACTG-3'	
mIL-23p19 for	54,5	22	5'-TCCCTACTAGGACTCAGCCAAC-3'	<i>Il23a</i>
mIL-23p19 rev	57,9	19	5'-AGAACTCAGGCTGGGCATC-3'	
mTNF α for	52,4	21	5'-TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC-3'	<i>Tnf</i>
mTNF α rev	50	20	5'-GAGGCCATTTGGGAATTCT-3'	
mTGF β for	61,1	18	5'-CCTTCCTGCTCCTCATGG-3'	<i>Tgfb1</i>
mTGF β rev	55	20	5'-CGCACACAGCAGTTCTTCTC-3'	

Tabelle 9: Übersicht der für die qRT-PCR verwendeten Ratten Primer.

Zielgen	GC Gehalt	Länge	Sequenz (5'→3')	Genbezeichnung
rGAPDH for	52,6	19	5'-TGGGAAGCTGGTCATCAAC-3'	<i>Gapdh</i>
rGAPDH rev	45	20	5'-GCATCACCCCATTTGATGTT-3'	
rRIG-I for	50	20	5'-AGAACAAACCAGGCAACAGG-3'	<i>Ddx58</i>
rRIG-I rev	57,9	19	5'-CGACCGAGGTAGCAATCAG-3'	
rMDA5 for	47,4	19	5'-CGCCATCGATGCATTAAGT-3'	<i>Irfi1</i>
rMDA5 rev	45,5	22	5'-GCCAACTTGTGTCTGATTCTG-3'	
rIRF1 for	47,8	23	5'-AAGGGAAGTTACCTGAGGACATC-3'	<i>Irf1</i>
rIRF1 rev	48,1	27	5'-GCTGAAGTCTCCATAGACAGTAGAGAG-3'	
rIRF7 for	50	20	5'-TCTGGATGAAGCTGATGCAC-3'	<i>Irf7</i>
rIRF7 rev	66,7	18	5'-GCCTCTGGGGGTGGTAAG-3'	
rIRF9 for	55,6	18	5'-ACAGCGGCAGCAATGTCT-3'	<i>Irf9</i>
rIRF9 rev	50	20	5'-TTCAGTTGTCCAGCTCCTT-3'	

2.8 Geräte

ABI PRISM® 7900HT, real time PCR cycler	Life Technologies, Darmstadt
BD FACS Canto II™	BD Biosciences, Heidelberg
Benchtop Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Biometra Multigel und Maxigel	Analytik Jena, Jena
Cawomat2000IR Entwicklermaschine	Cawo, Schrobenhausen
Countess™, automatischer Zellzähler	Life Technologies, Darmstadt
FluorChemQ, Western Blot Imager	ProteinSimple, San Jose, CA (USA)
Einkanalpipetten (10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)	Eppendorf, Hamburg
Einkanalpipetten (20 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Brand, Wertheim
Evos™ XL core (<i>digital inverted microscope</i>)	Peqlab, Erlangen
Kühlgeräte (4°C, -20°C)	Liebherr, Biberach an der Riß
gentleMACS™ Octo Dissociator	Miltenyi, Bergisch-Gladbach

Hamilton®, Mikroliterspritze (50 µl)	Bonduz, Schweiz
Heraeus HERAcell 240®, cell incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
Heraeus HERAfreeze, -80°C freezer	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
High Performance Zentrifuge (Avanti™J25, Avanti™J-20XP)	Beckmann Coulter, Krefeld
Lichtmikroskop, Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mastercycler® pro	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipetten (30 - 300 µl)	Eppendorf, Hamburg
Multiskan EX	Thermo Fisher Scientific Inc., Darmstadt
NanoPhotometer® P 300	Implen, München
pH Sensor, FE20 - FiveEasy™ pH	Mettler-Toledo, Giessen
Pipetus®, elektrische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Power Supply	Consort, Turnhout (BE)
QIAgility Pipettierroboter	Qiagen, Hilden
Röntgenkassette	Hartenstein Laborbedarf, Würzburg
Sterilbank, BDK-S 1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnebühl
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie® 2, Vortexer	Scientific Industries, Schwerte
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik; Burgwedel
Western Blot Kammer, <i>semi-dry blotting</i>	Peqlab, Erlangen

2.9 Verwendete Mausstämme

C57BL/6J	(Janvier; im Weiteren als WT bezeichnet)
C57BL/6J	(Rückkreuzung/Eigenzucht; im Weiteren als WT bezeichnet)
C57BL/6-TgHII6st ^{L784A/L785A1Hema}	(Eigenzucht; im Weiteren als gp130 ^{LLAA} bezeichnet)
B6.129S2-II6 ^{tm1Kopf}	(im Weiteren als IL-6 ^{-/-} bezeichnet)

Alle für diese Experimente verwendeten Versuchstiere wurden in der lokalen Tierhaltung des Rudolf-Virchow-Zentrums oder im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin der Universität Würzburg gezüchtet und gehalten oder von Janvier Labs (Saint Berthevin, Frankreich) bezogen und in die Tierhaltung aufgenommen. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 h, Standardfutter, Wasser *ad libitum*). Die Erzeugung der

neuen transgenen Mauslinie wurde von der Bezirksregierung Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen: 55.2-2531.01-21/10).

Alle Versuchstiere wurden mit Isofluran narkotisiert, durch zervikale Dislokation getötet und vor der Organentnahme äußerlich mit 70%-igem Ethanol desinfiziert. Für die Experimente wurden weibliche Tiere im Alter von 8 - 14 Wochen verwendet.

Die gp130^{LLAA} Maus wurde erstmals in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Heike Hermanns von Dr. Christine Mais generiert. Die genetisch veränderte Mauslinie exprimiert eine punktmutierte gp130 Variante, in der das im zytoplasmatischen Bereich von gp130 vorliegende Dileucin-Motiv (L₈₇₄, L₇₈₅) zu Dialanin verändert wurde, weshalb diese Form von gp130 vermutlich resistent gegenüber der Liganden- und *crossstalk*-vermittelten Endozytose ist [52, 53, 147].

Die für die Generierung von IL-6^{-/-} KM-DZ benötigten femoralen Knochen der IL-6^{-/-} Maus [189] wurden freundlicherweise von Dr. Christoph Garbers, Institut für Biochemie, Universität Kiel zur Verfügung gestellt.

2.10 Verwendete primäre Zellen und Zelllinien

X63-Ag8653	nichtadhärent wachsende murine Myelomzelllinie zur Gewinnung GM-CSF-haltigen Überstandes; Kultivierung in RPMI-1640 ergänzt mit 10% fötalem Kälberserum (FKS), 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und 50 µM 2-Mercaptoethanol (siehe auch Abschnitt 3.1.4); zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Manfred Lutz, Virologie Universität Würzburg
KM-DZ	nichtadhärent wachsende Knochenmark-generierte dendritische Zellen von WT, gp130 ^{LLAA} und IL-6 ^{-/-} Mäusen; Kultivierung in RPMI-1640 ergänzt mit 10% FKS, 1% P/S, 50 µM 2-Mercaptoethanol und 10% GM-CSF Überstand (siehe auch Abschnitt 3.1.6)
HDF	adhärent wachsende humane primäre dermale Fibroblasten verschiedener Spender; Kultivierung in DMEM ergänzt mit 10% FKS; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. H. F. Merk und Yvonne Marquart, Dermatologie Universität RWTH Aachen
MDF	adhärent wachsende murine primäre Hautfibroblasten; Kultivierung in DMEM ergänzt mit 15% FKS und 1% P/S; zur Verfügung gestellt von Dr. Christine Mais (AG Hermanns)

NRCFB	adhärent wachsende primäre neonatale kardiale Rattenfibroblasten (<i>neonatal rat cardiac fibroblasts</i>); Kultivierung in Medium 199 ergänzt mit 10% FKS; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Kristina Lorenz, Rudolf-Virchow-Zentrum Universität Würzburg
RDF	adhärent wachsende primäre dermale Rattenfibroblasten (Provitro, Berlin); Kultivierung in Medium 199 ergänzt mit 10% FKS
VSMC	adhärent wachsende murine primäre vaskuläre glatte Muskelzellen (<i>vascular smooth muscle cells</i>), Kultivierung in DMEM ergänzt mit 10% FKS, 10% MS, 1% P/S und 0,2% Amphotericin B; zur Verfügung gestellt von Dr. Carmen Schäfer (AG Hermanns)

3. METHODEN

3.1 Methoden der Zellbiologie

3.1.1 Kultivierung von Zellen

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

Trypsin: 0,05% Trypsin-EDTA (1X) (Gibco, Karlsruhe)

Accutase (Gibco, Karlsruhe)

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden gemäß der allgemeinen Verhaltensregeln unter einer Sterilbank, die regelmäßig mit Bacillol desinfiziert wurde, durchgeführt. Lösungen sowie Medien wurden vor Gebrauch auf 37°C erwärmt. Mit Ausnahme der KM-DZ erfolgte die Kultivierung der Zellen in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5% CO₂. Die KM-DZ wurden in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert.

Für die Weiterkultivierung von adhärent wachsenden Zellen wurden konfluente Zellkulturplatten zunächst mit PBS gewaschen und die Zellen durch die Behandlung mit Trypsin/EDTA oder Accutase von der Platte gelöst. Je nach vorliegender Konfluenz wurden die Zellen in Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 in frischem Medium auf neue Zellkulturplatten ausgesät.

3.1.2 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Einfrieremedium: Kulturmedium, 50% FKS, 10% DMSO

Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in 1 ml Einfrieremedium aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt und bei -80°C in einem Kryomaster über Nacht (üN) eingefroren, bevor sie zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz im 37°C Wasserbad inkubiert und zum Entfernen des DMSO in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 1000 rpm/121 rcf), im Zellkulturmedium resuspendiert und auf einer Zellkulturplatte ausgesät.

3.1.3 Zellzählung und Vitalitätstest

Trypanblau: 0,4%ige Trypanblau-Lösung (Invitrogen Life Technologies, Darmstadt)

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die Zellsuspension mit 0,4% Trypanblau in einem Verhältnis von 1:1 verdünnt und mit Hilfe des Zellzählgerätes Countess™ *Cell Counter* ausgezählt. Da tote Zellen aufgrund ihrer durchlässig geworden Membran blau gefärbt werden, erlaubt diese Methode eine selektive Auszählung von ungefärbten lebenden Zellen.

3.1.4 Gewinnung von GM-CSF-haltigen Zellkulturüberständen

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

Für die Gewinnung von GM-CSF- (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) haltigen Überständen wurde eine mit dem GM-CSF-Gen transfizierte Myelom-X63-Ag8-Zelllinie verwendet [190]. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in 10 ml Kulturmedium resuspendiert und für bis zu 2 Tage auf Zellkulturschalen (10 cm) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen pro 100 ml Kulturmedium auf Zellkulturflaschen (T-175) ausgesät. Nach 2-3 Tagen wurde der Zellkulturüberstand verworfen und gegen 100 ml frisches Kulturmedium ausgetauscht. Nachfolgend wurde alle 3-4 Tage, wenn das Medium aufgrund des pH-Wertes einen orange-gelben Farbton angenommen hatte, der Überstand abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1000 rpm/121 rcf) und in ein steriles Gefäß überführt. Die Zellkulturflaschen wurden mit 100 ml frischem Kulturmedium aufgefüllt und weitere 3-4 Tage kultiviert. Insgesamt wurde diese Prozedur 2-3-mal wiederholt. Vor der Verwendung wurde der Zellkulturüberstand steril filtriert. Zur Langzeitaufbewahrung wurde das Filtrat in 50 ml Aliquots bei -80°C gelagert.

3.1.5 Präparation von Zellen aus lymphatischen Organen der Maus

Alle Versuchstiere wurden mit Isofluran narkotisiert, durch zervikale Dislokation getötet und vor der Organentnahme äußerlich mit 70%-igem Ethanol desinfiziert.

3.1.5.1 Präparation von Milz oder Lymphknoten für die durchflusszytometrische Analyse

Kulturmedium: RPMI-1640, 10% FKS, 1% P/S, 50 μ M 2-Mercaptoethanol

Erythrozytenlyse-Puffer: 10 mM KHCO₃, 150 mM NH₄Cl, 0,1 mM EDTA

Verdaupuffer: Kulturmedium, 1 mg/ml DNase I (AppliChem, Darmstadt), 1 mg/ml Kollagenase III (Worthington, Lakewood, NJ USA) (2 ml/ Milz, 1 ml/ Lymphknoten)

Präparationspuffer: PBS, 5% FKS, 1 mM EDTA (Appllichem, Darmstadt)

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden die inguinalen Lymphknoten und/oder die Milz entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS bei 4°C aufbewahrt. Die Lymphknoten (LK) wurden mittels zweier gebogener Pinzetten, die Milz mit Hilfe des *gentleMACS Octo Dissociators*, gemäß den Hersteller Angaben [191], in kleine Gewebestücke zerteilt. Anschließend wurden diese zentrifugiert (5 min, 1200 rpm/ 174 rcf) und in 1 ml (Lymphknoten) bzw. 2 ml (Milz) Verdaupuffer resuspendiert. Das Milzgewebe wurde vor dem enzymatischen Verdau zusätzlich einer Erythrozytenlyse, wie unter Abschnitt 3.1.5.2 beschrieben, unterzogen. Für einen effektiven Verdau des Gewebes wurden die Proben unter stetiger Bewegung für 30 min bei RT inkubiert. Zur Trennung der DZ/T-Zell-Komplexe wurde nach Inkubationsende 10 mM EDTA zugegeben und die Proben für weitere 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 ml Präparationspuffer zugegeben und die Zellsuspensionen über ein Zellsieb (70 μ M) passagiert. Die Zellen wurden gezählt und direkt zur durchflusszytometrischen Analyse (siehe Abschnitt 3.3.5) verwendet.

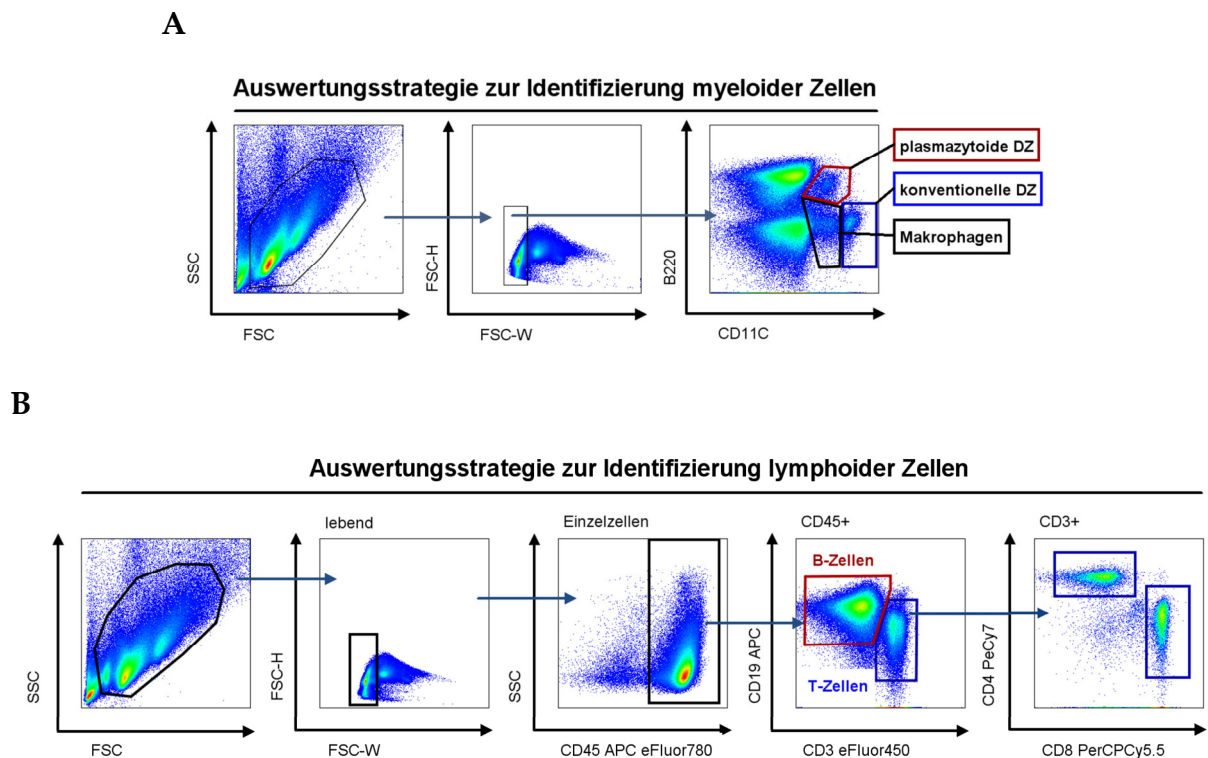


Abb. 7: Auswertungsstrategie zur Identifizierung myeloider und lymphoider Zellen der Milz und Lymphknoten. (A) Dargestellt ist die zur Identifizierung der konventionellen DZ (kDZ), plasmazytoiden DZ (pDZ) und Makrophagen ($M\Phi$) verwendete Auswertungsstrategie. Für die Analyse wurden nur lebende Einzelzellen berücksichtigt. $CD11c^{high} B220^{-}$ Zellen sind als kDZ, $CD11c^{+} B220^{+}$ Zellen als pDZ und $CD11c^{low} B220^{-}$ Zellen als $M\Phi$ definiert. (B) Dargestellt ist die zur Identifizierung der B- und T-Zellen verwendete Auswertungsstrategie. Für die Analyse wurden nur lebende $CD45^{+}$ Einzelzellen berücksichtigt. $CD19^{+}$ Zellen sind als B-Zellen (rote Begrenzung) und $CD3^{+}$ als T-Zellen definiert (blaue Begrenzung), die im Weiteren in $(CD3^{+}) CD4^{+}$ und $(CD3^{+}) CD8^{+}$ T-Zellen unterteilt wurden.

3.1.5.2 Präparation des Knochenmarks

PBS (pH 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4

Erythrozytenlyse-Puffer: 10 mM $KHCO_3$, 150 mM NH_4Cl , 0,1 mM EDTA

Kulturbedium: RPMI-1640, 10% FKS, 1% P/S, 50 μM 2-Mercaptoethanol

Für die Gewinnung des Knochenmarks wurde der Femur freipräpariert, entnommen und bis zur Weiterverarbeitung in PBS bei 4°C aufbewahrt. Das noch am Knochen befindliche Gewebe wurde mittels Präparierbesteck sowie Papiertüchern unsteril entfernt. Zum Desinfizieren wurden die Knochen in 70%-igem Ethanol inkubiert und anschließend in steriles PBS überführt. Nach dem Abtrennen der Epiphysen mit einer sterilen Schere, wurde das Knochenmark mit PBS mit einer Kanüle aus dem Knochen gespült und in einer sterilen Petrischale mit PBS aufgefangen. Zum Vereinzeln der Zellen wurde das Knochenmark mehrmals auf- und abpipettiert und anschließend über ein Zellsieb (70 μM) passagiert. Die Zellsuspension wurde

zentrifugiert (5 min, 1500 rpm/274 rcf) und zur Bestimmung der Zellzahl in 10 – 20 ml Kulturmedium resuspendiert.

Für die durchflusszytometrische Analyse sowie zur Herstellung von Zellysaten wurden die Knochenmarkszellen einer Erythrozytenlyse, wie unter Abschnitt 3.1.5.2 beschrieben, unterzogen.

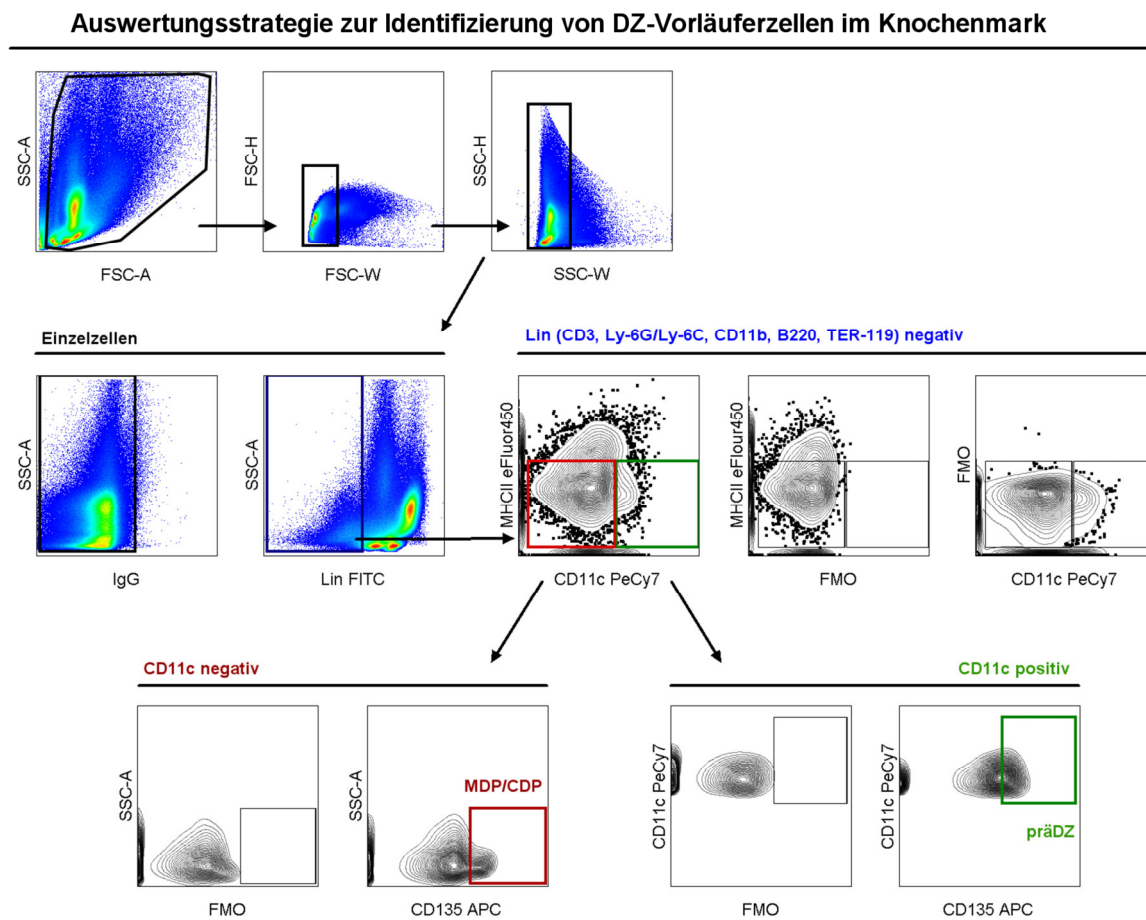


Abb. 8: Auswertungsstrategie zur Identifizierung von DZ-Vorläuferzellen im Knochenmark. Dargestellt ist die zur Identifizierung der DZ-Vorläuferzellen des Knochenmarks verwendete Auswertungsstrategie. Für die Analyse wurden nur lebende Einzelzellen berücksichtigt. Durch die Verwendung eines Linienmarkers (CD3, Ly-6G/Ly-6C, CD11b, B220, TER-19) wurden zunächst die Linien-negativen (Lin-) Zellen selektiert und anschließend auf die Expression von MHCII, CD11c und CD135 (= Flt3L) untersucht. Lin⁻MHCII⁻CD11c⁻CD135⁻ Zellen (rote Begrenzung) wurden als Makrophagen/DZ Vorläuferzellen (MDP/CDP) und Lin⁻MHCII⁻CD11c⁺CD135⁺ präDZ definiert (grüne Begrenzung). (Abkürzungen: CDP - *common dendritic cell progenitors*; DZ - *dendritische Zellen*; Lin - *lineage*; MDP - *marcophage/dendritic cell progenitor cells*).

3.1.6 Generierung dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark

Erythrozytenlyse-Puffer: 10 mM KHCO₃, 150 mM NH₄Cl, 0,1 mM EDTA

Kulturmedium: RPMI-1640, 10% FKS, 1% P/S, 50 µM 2-Mercaptoethanol, 10% GM-CSF Überstand

Die Gewinnung von DZ aus murinem Knochenmark erfolgte gemäß der Methode nach *Inaba et al.* [167], mit Modifikationen nach *Lutz et al.* [192].

Die isolierten Knochenmarkszellen wurden (ohne vorhergehende Depletierung oder Erythrozytenlyse) mit einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml auf 6 cm bzw. 10 cm Petrischalen in 3 ml bzw. 10 ml Kulturmedium oder mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/ml pro Vertiefung auf einer 12well-Zellkulturschale ausgesät und bei 37°C und 7% CO₂ kultiviert. Für die Ausreifung der DZ wurde das Kulturmedium mit 10% GM-CSF-haltigen Überstand versetzt. An Tag 3 wurden weitere 3 ml (pro 6 cm), 10 ml (pro 10 cm) bzw. 1 ml (pro well) Kulturmedium, welches 10% GM-CSF-haltigen Überstand enthielt, zugegeben. An Tag 6 und 8 wurde jeweils die Hälfte des Zellkulturüberstandes abgenommen und durch die gleiche Menge an frischem Kulturmedium plus 10% GM-CSF-haltigen Überstand ersetzt. Die KM-DZ Kulturen wurden je nach Experiment an Tag 3, 6, 8 oder 9 verwendet. Für die phänotypische Charakterisierung der KM-DZ wurden die nichtadhärenten Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression der DZ-Oberflächenmarker CD11c und MHCII sowie der Kostimulatoren CD80 und CD86 und des Aktivierungsmarkers CD40 untersucht.

Das für die Generierung von KM-DZ verwendete Knochenmark wurde nicht gepoolt, sondern es wurde für jede Maus eine separate KM-DZ Zellkultur angefertigt.

3.1.7 Durchflusszytometrische Analyse

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Einzelzellen aufgrund ihrer Lichtstreuungseigenschaften sowie der emittierten Strahlung Fluoreszenzgekoppelter Antikörper charakterisiert werden.

Die in einer Suspension vorliegenden Zellen werden, bedingt durch einen Überdruck, in eine Messküvette transportiert, in der sie Laserstrahlen mit unterschiedlichen Anregungswellen passieren. Beim Passieren des Laserstrahls erfolgt eine Richtungs- bzw. Wellenlängenänderung des angeregten Lichts, wobei eine Auftrennung in ein Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter channel*) und ein Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *side scatter channel*) erfolgt. Das Vorwärtsstreulicht gilt

als Maß für die Lichtbrechung im flachen Winkel und gibt Aufschluss über die Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht gilt als Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Zusätzlich zu den Streulichtsignalen wird das emittierte Licht der angeregten Fluoreszenzsignale detektiert und mit Hilfe mehrerer Photovervielfältigerröhren (PM, engl. *Photomultiplier*) in elektrische Signale umgewandelt. Durch Verwendung verschiedener *Longpass* (LP)- und *Bandpass* (BP)-Filter können Fluorophore, die von den gleichen Lasern angeregt werden und deren Emission nahe beieinander liegt, differenziert werden.

Die gemessenen Signale wurden durch die FACSDiVa Software (v6.1.1) verarbeitet und gespeichert. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe der FlowJo X 10.0.7 Software (TreeStar Inc., Ashland USA).

3.1.7.1 Oberflächenfärbung

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

FACS Waschpuffer: PBS (pH 7,4), 5% FKS

FACS Färbepuffer: PBS (pH 7,4), 5% FKS, 0,1% 1 M NaN₃

Für die Oberflächenfärbung wurden 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen einer Einzelzellsuspension von Milz, LK und Knochenmark bzw. 1×10^5 bis 1×10^6 Zellen einer KM-DZ Kultur verwendet. Die Zellen wurden auf eine *96well* Rundbodenplatte überführt und zentrifugiert (10 min, 1500 rpm/274 rcf, 4°C). Um unspezifische Bindungen durch Fc-Rezeptoren zu verhindern, wurden die Zellen in 100 µl FACS Färbepuffer mit anti-CD16/CD32 resuspendiert und bis zu 15 min bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen mit 200 µl Waschpuffer/*well*, wurden die Zellen in 50 µl Antikörperlösung resuspendiert und für bis zu 45 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 200 µl FACS Waschpuffer gewaschen und für die Messung in 200 µl FACS Färbepuffer resuspendiert.

3.1.7.2 Automatische Kompensation am FACS Canto II

Da bei Mehrfarbenanalysen eine spektrale Überlappung der einzelnen Fluorophore zu erwarten ist, wurde eine spektrale Kompensation durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Einzelfärbungen für die jeweils verwendeten Fluorophor-gekoppelten Antikörper (Tabelle 5) hergestellt und anschließend am FACSCanto II gemessen.

Für die Einzelfärbungen wurden *CompBeads* (Tabelle 5) oder Einzelzellsuspensionen von Milz und/oder KM-DZ Kulturen verwendet. Die Färbung der *Beads* erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Färbung der Milzzellen bzw. KM-DZ erfolgte wie unter Abschnitt 3.1.7.1 beschrieben. Für die Einstellung des FSC und SSC sowie der Schwellenwerte der einzelnen Fluoreszenzkanäle wurden zunächst ungefärbte Proben gemessen. Anschließend erfolgte die Messung der Einzelfärbungen, ohne die zuvor eingestellten Parameter zu verändern. Nach dem Ende der Messung erfolgte die automatische Kompensation mit Hilfe der FACSDiva Software (v6.1.1).

3.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 Transiente Transfektion primärer humaner Fibroblasten mit siRNA

Kulturmedium: DMEM, 10% FKS

Transfektionsansatz A: 2 μ l siRNA (20 μ M) in 100 μ l OptiMem

Transfektionsansatz B: 2 μ l Lipofectamin RNAiMax in 100 μ l OptiMem

Die RNA Interferenz stellt eine Methode dar mit deren Hilfe man die Funktionen von Proteinen untersuchen kann, indem die Proteinexpression posttranskriptionell unterdrückt wird (*Silencing*). Hierfür werden kurze, meist 19-23 Nukleotide (nt) umfassende chemisch synthetisierte siRNAs verwendet, die mit der komplementären mRNA des zu untersuchenden Proteins interagieren und zu deren Degradation führen [193, 194].

Für die transiente Transfektion von humanen dermalen Fibroblasten mit siRNA wurden 4×10^4 Zellen/*well* in 1 ml Kulturmedium auf einer 12*well*-Zellkulturschale ausgesät und für 2–4 h bei 37°C und 5% CO₂ in einer wassergesättigten Atmosphäre inkubiert. Währenddessen wurde die siRNA sowie das Transfektionsreagenz RNAiMax in OptiMem verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt, für weitere 10 bis 20 min bei RT inkubiert und schließlich tropfenweise auf die Zellen gegeben (200 μ l/*well*, entspricht 33 nM siRNA Endkonzentration). Nach zweitägiger Inkubation (~40 h) entsprechend der oben genannten Bedingungen, wurden die Zellen für Stimulationsversuche verwendet.

3.2.2 RNA-Isolierung aus Zellkulturen

Die Isolierung von RNA aus Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini kits* der Firma Qiagen (Hilden).

Für die RNA-Isolierung wurde der Zellkulturüberstand komplett entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in RLT-Puffer, welcher 1% 2-Mercaptoethanol enthielt, lysiert. Das Zellysate wurde gemäß den Herstellerangaben aufgearbeitet. Die gewonnene RNA wurde in 30-50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und die Konzentration mittels photometrischer Analyse (3.2.3) bestimmt.

3.2.3 Quantitative Bestimmung von RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der gewonnenen RNA wurde mit Hilfe des NanoPhotometer® P 300 bei einer Wellenlänge von 230 nm, 260 nm und 280 nm durchgeführt.

Die OD_{260} gilt dabei als Maß für die Konzentration der Nukleotide, die OD_{230} als Maß für die in der Probe vorhandenen Polysaccharide und die OD_{280} als Maß für die Verunreinigung mit Proteinen. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} sollte bei RNA im Bereich von 2.0 liegen.

3.2.4 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Für die Genexpressionsanalyse wurden die relativen mRNA Spiegel mit Hilfe der qRT-PCR⁴ untersucht. Diese Methode basiert auf der Detektion eines Fluoreszenzsignals, welches proportional mit der Menge des PCR-Produktes ansteigt [195, 196]. Da die emittierte Fluoreszenz während jedes Zyklus detektiert wird, erlaubt diese Methode sowohl die Quantifizierung der *Templatemenge* in einer Reaktion (absolute Quantifizierung), als auch die Bestimmung von Unterschieden in der Abundanz eines *Templates* zwischen verschiedenen Proben (relative Quantifizierung). Für diese Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green verwendet, welcher sequenzunabhängig doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet.

⁴ qRT-PCR: *quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction*

Die zuvor isolierte RNA wurde mittels des *Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit* (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurden gleiche Mengen RNA (10 µl Gesamtvolumen) mit 10 µl eines Master Mixes, bestehend aus 1 µl Oligo(dT)₁₈ Primer, 4 µl reverser Transkriptionspuffer, 0,5 µl RNase Inhibitor, 2 µl dNTP-Mix und 0,5 µl reverser Transkriptase, gemischt und gemäß des folgenden Programms in einem *Cycler* der Firma Eppendorf umgeschrieben: 60 min bei 50°C (reverse Transkription) und 5 min bei 85°C (Inaktivierung). Im Anschluss wurden die Proben in einem Verhältnis von 1:4 mit nukleasefreiem Wasser verdünnt und ggf. bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt. Für die Genexpressionsanalyse wurde das *FastStart Universal SYBR Green (Rox) Master kit* verwendet. Für jedes zu untersuchende Zielgen wurden 5 µl SybrGreen Master Mix, 400 nM jedes Primers (0,4 µl eines 10 µM Stocks), 2,2 µl nukleasefreies Wasser und 2 µl cDNA auf einer *384well* Platte mit Hilfe des QIAgility Pipettierroboters gemischt. Jede Probe wurde dabei im technischen Duplikat untersucht. Zur Überprüfung der Primereffizienz wurde zusätzlich eine Verdünnungsreihe der jeweiligen cDNA mit folgenden Verdünnungen aufgetragen: 1:1, 1:4, 1:16, 1:64, 1:256. Mit Hilfe dieser Kurve wurde die Effizienz der Primer mit folgender Formel berechnet:

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Die Steigung beschreibt hierbei den Anstieg der Kurve der nachgewiesenen dsDNA im Verlauf der PCR. Im bestmöglichen Fall sollte der Wert für die Effizienz (E) 2,0 betragen. Dies würde bedeuten, dass sich die Menge der dsDNA pro PCR-Zyklus verdoppelt.

Die für die Analyse genutzten Primer sind unter Abschnitt 2.7 aufgeführt. Die qRT-PCR wurde mittels qRT-PCR *Cycler* ABI PRISM 7900HT unter folgenden Bedingungen durchgeführt: initiale Aktivierung – 10 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 sec Denaturierung bei 95°C, 20 sec Hybridisierung bei 60°C, 20 sec Elongation bei 60°C und einer abschließenden Elongation bei 65°C für 15 sec. Für die Spezifitätsanalyse der einzelnen Primer wurde am Ende eines jeden PCR Laufes eine zusätzliche Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (15 sec bei 95°C, 15 sec bei 60°C). Hierbei handelt es sich um eine Qualitätskontrolle, bei der überprüft wird, ob ein PCR-Produkt mit einer spezifischen Länge entstanden ist, oder ob das Signal auf Verunreinigungen oder aber auf die Zusammenlagerung der Primer (Primer-Dimere) zurückzuführen ist. Bei fehlerhaften Produkten wird der Peak für das Amplikon bereits bei niedrigeren Temperaturen erreicht oder es treten mehrere Peaks auf.

Die quantitative Analyse der Zielgene erfolgte für die HDF entsprechend dem mathematischen Modell nach *Pfaffl* [197] und für die KM-DZ nach dem Modell von *Livak & Schmittgen* [198].

3.3 Methoden der Proteinbiochemie

3.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Triton-X 100 Lysispuffer: 20 mM Tris (pH7.5), 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 1% TritonX-100, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 5 µg/ml Aprotinin, 5 µg/ml Leupeptin, 3 µg/ml Pepstatin

RIPA Lysispuffer: 10x RIPA (Cell Signaling Technology, Frankfurt a.M.)

2x Lämmli: 125 mM Tris (pH 6,8), 20% Glycerol, 10% 2-Mercaptoethanol, 4% SDS, 0,01% (w/v) Bromphenolblausalz

Für die Herstellung von Zelllysaten wurde der Zellkulturüberstand komplett entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden diese durch Zugabe von Triton-X 100 Lysispuffer, RIPA Lysispuffer oder 2x Laemmli lysiert. Während Lämmli Lysate direkt aliquotiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert wurden, wurde im Fall der Lyse mit Triton-X 100- bzw. RIPA-Puffer das Zelllysate zunächst für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Zelllysate für 15 min bei 14000 rpm/2031 rcf zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4x Lämmli: 250 mM Tris (pH 6,8), 40% Glycerol, 20% 2-Mercaptoethanol, 8% SDS, 0,02% (w/v) Bromphenolblausalz

8% Trenngel: 6,9 ml Millipore Wasser, 4 ml 30% Acrylamid, 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 150 µl 10% SDS, 75 µl 40% APS, 12 µl TEMED

10% Trenngel: 5,9 ml Millipore Wasser, 5 ml 30% Acrylamid, 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 150 µl 10% SDS, 75 µl 40% APS, 12 µl TEMED

12% Trenngel: 4 ml Millipore Wasser, 6 ml 30% Acrylamid, 3,8 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 150 µl 10% SDS, 75 µl 40% APS, 12 µl TEMED

3% Sammelgel: 3,4 ml Millipore Wasser, 830 µl 30% Acrylamid, 630 µl 2,0 M Tris (pH 6,8), 50 µl 10% SDS, 40 µl 40% APS, 5 µl TEMED

10x Laufpuffer: 250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 35 mM SDS

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteine in einem elektrischen Feld entsprechend ihrem molekularen Gewicht aufgetrennt [199].

Die zu untersuchenden Proben wurden, wenn nicht direkt in Lämmli Puffer lysiert, zunächst mit 4x Lämmli verdünnt. Anschließend wurden sie für 5 min bei 95°C denaturiert. Das im Probenpuffer vorliegende 2-Mercaptoethanol sorgt für

reduzierende Bedingungen und löst Cysteinbrücken innerhalb der Proteine auf. Das Detergenz SDS führt zur Ausbildung von negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen, die die Eigenladung der Proteine überdecken und dadurch eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes ermöglichen. Für die diskontinuierliche Elektrophorese wurde eine vertikale Flachgelkammer, die ein Sammel- und Trenngel enthält, verwendet. Im weitmaschigen Sammelgel (3%) wurden die Proteine zunächst fokussiert und in dem sich anschließenden engporigen Trenngel (8% – 12%) aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 – 50 mA für 2 - 3 h durchgeführt.

Zusätzlich zu den untersuchenden Proben wurden der *PageRuler™ Plus prestained Protein Ladder* und der *biotinylated Protein Ladder* aufgetragen.

3.3.3 Western Blot

Anode I Puffer: 300 mM Tris, 20% (v/v) Methanol

Anode II Puffer: 25 mM Tris, 20% (v/v) Methanol

Kathode Puffer: 40 mM 6-Aminocapronsäure, 20% (v/v) Methanol

10x TBS-T (pH 7,6): 1,37 M NaCl, 200 mM Tris, 1% (v/v) Tween 20

Blockierungspuffer: 10% BSA oder 5% TM in 1x TBS-T

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese mit Hilfe der *semidry*-Western Blot Methode auf eine PVDF⁵-Membran übertragen. Hierfür wurden 12 Whatmann-Papiere und die PVDF-Membran entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnitten. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften musste die PDVF-Membran zunächst aktiviert werden, indem sie für einige Sekunden in 100% Methanol inkubiert wurde. Anschließend wurde die Membran mit H₂O (Millipore) gewaschen und im Anode II Puffer äquilibriert. Das zu blottende Gel wurde aus den Glasplatten entnommen und zum Äquilibrieren in den Kathode Puffer überführt. Der Aufbau des „*Blotsandwich*“ erfolgte nach einem 5-2-5 Schema. Hierfür wurden 5 in Anode I Puffer getränkte und 2 in Anode II Puffer getränkte Whatmann-Papiere luftblasenfrei übereinander gelegt. Als nächstes wurde die PVDF-Membran und das Gel sowie abschließend 5 in Kathode Puffer getränkte Whatmann-Papiere darauf gelegt. Der Kathoden Deckel wurde mittels 3 Schrauben fixiert und die elektrophoretische Übertragung der Proteine für mindestens 1 h bei 0,8 mA/cm² durchgeführt.

⁵ PVDF: Polyvinylidendifluorid

Nach dem Ende des Proteintransfers wurde die PVDF-Membran in eine Schale mit Blockierungspuffer überführt und für mindesten 20 min unter steter Bewegung bei RT inkubiert.

3.3.4 Immundetektion

Stripping Puffer: 62,5 mM Tris (pH 7,5), 2% SDS, 0,78% 2-Mercaptoethanol

London Stripping Puffer: 2 M Glycin (pH 2,5)

10x TBS-T (pH 7,6): 1,37 M NaCl, 200 mM Tris, 1% (v/v) Tween 20

Antikörperlösung: 5% BSA in 1x TBS-T

Für die Detektion der zu untersuchenden Proteine wurden Erstantikörperlösungen entsprechend der in Tabelle 3 aufgeführten Verdünnungen hergestellt. In dieser wurde die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Zum Entfernen überschüssiger Erstantikörper wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem HRP⁶-konjugierten Zweitantikörper (Tabelle 3) für mindestens 1 h bei RT. Nach dem Inkubationsende wurde der überschüssige Zweitantikörper durch dreimaliges Waschen für 10 min mit TBS-T entfernt. Der Nachweis der spezifischen Proteinsignale erfolgte mit Hilfe eines Chemilumineszenz Substrats. Das zu detektierende Signal wurde entweder mittels eines quantitativen Western Blot Imagers oder mittels Röntgenfilmexposition nachgewiesen.

Für weitere Detektionen wurde die Membran in *Stripping* Puffer, dem 2-Mercaptoethanol frisch zugesetzt wurde, für 20 min bei 70°C inkubiert, um so Erst- und Zweitantikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte der Nachweis der unphosphorylierten Ladungsproteine bzw. eines Haushaltsproteins entsprechend der obigen Angaben.

⁶ HRP: *horseradish peroxidase* (Meerrettichperoxidase)

3.3.5 Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen im Überstand von KM-DZ Kulturen mittels *enzym-linked immunosorbent assay* (ELISA)

ELISA Kit⁷: *Mouse Quantikine IL-6 ELISA Kit, murin gp130 DuoSet ELISA*

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

Waschpuffer: 0.05% Tween®20 in PBS

Blockpuffer: 1% BSA in PBS

Substrat-Lösung⁷: Reagenz A (H₂O₂), Reagenz B (Tetramethylbenzidin), im Verhältnis 1:1 verwendet

Abstopp-Lösung⁷: 2 N H₂SO₄

Der Enzym-gekoppelte Immunoassay (ELISA, *enzym-linked immunosorbent assay*) stellt ein immunologisches Verfahren dar, mit dessen Hilfe man exprimierte Proteine im Zellkulturüberstand nachweisen kann. Beim sogenannten *Sandwich*-ELISA wird das nachzuweisende Antigen zunächst mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Zugabe spezifischer enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper (i.d.R. Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Antikörper), welche an die auf der Platte fixierten Antikörper-Antigen-Komplexe binden. Durch die Zugabe eines entsprechenden Substrates kommt es zum Farbumschlag, der mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden kann.

Tag 8 DZ Zellkulturen wurden für fünf Stunden bzw. über Nacht (16 h) mit 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml mTNF α oder 0.5 μ g/ml Cholera toxin (Ctx) stimuliert. Die Zellkulturüberstände wurden nach dem Ende der Stimulationszeit in Protein *lowbind* Reaktionsgefäße überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei - 80°C aufbewahrt.

Die Analyse der murinen IL-6 Spiegel im Überstand von WT und gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen erfolgte mittels des *Mouse Quantikine IL-6 ELISA Kit* entsprechend der Herstellerangaben.

Die Bestimmung der IL-12p70 und IL-12p40 Konzentrationen im Überstand von WT und gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen sowie der IL-6 Konzentration im Überstand von WT und IL-6^{-/-} KM-DZ Kulturen wurde freundlicherweise in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Lutz von Vini John (Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg) durchgeführt.

⁷ R&D Systems, Wiesbaden

3.4 Statistik

Die statische Auswertung erfolgte mit den Programmen SPSS oder SigmaPlot. Die für die Berechnung der Signifikanzwerte angewendeten Tests sind an entsprechender Stelle in den Abbildungsunterschriften angegeben. Als signifikant galt, wenn $p \leq 0.05$ war.

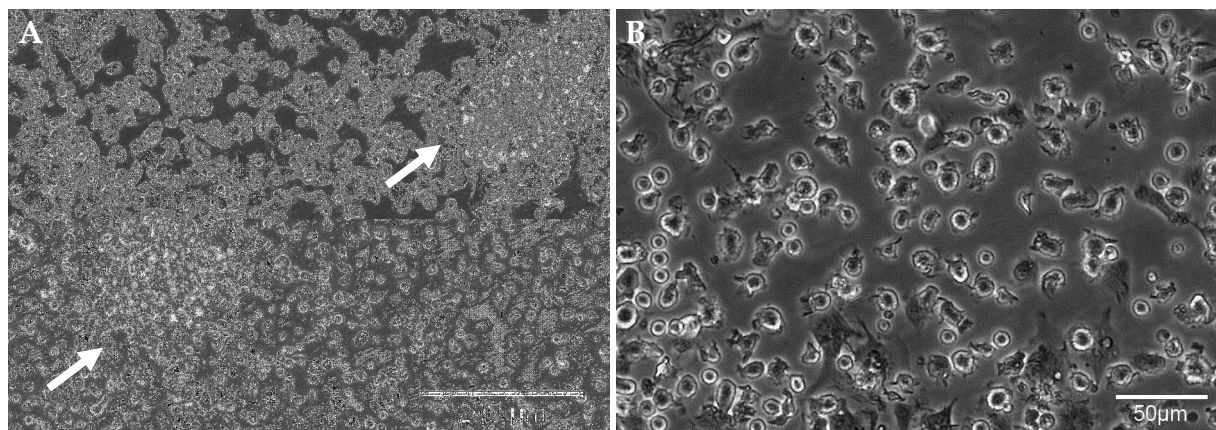
4. ERGEBNISSE

4.1 Analyse der IL-6 Rezeptorexpression auf gereiften dendritischen Zellen aus Knochenmark (KM-DZ)

Das Glykoprotein 130 (gp130) ist die allgemeine signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit der IL-6-Typ Zytokine und wird von nahezu allen Zellen exprimiert. Die für IL-6 spezifische zweite Rezeptoruntereinheit IL-6R hingegen ist in ihrer Expression auf nur wenige Zellen beschränkt (Hepatozyten, Leukozyten). Dendritische Zellen repräsentieren einen der wenigen Zelltypen, die sowohl gp130 als auch den IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren. Obwohl Studien der letzten Jahre die Relevanz des IL-6-Signals für die Differenzierung und Maturierung der DZ belegen, ist bisher nur wenig über die Regulation der IL-6 Rezeptorexpression für diese Zellen bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie die Expression des IL-6-Rezeptors im Verlauf der Differenzierung und Maturierung dendritischer Zellen reguliert ist und welche Rolle dabei die Endozytose von gp130 spielt.

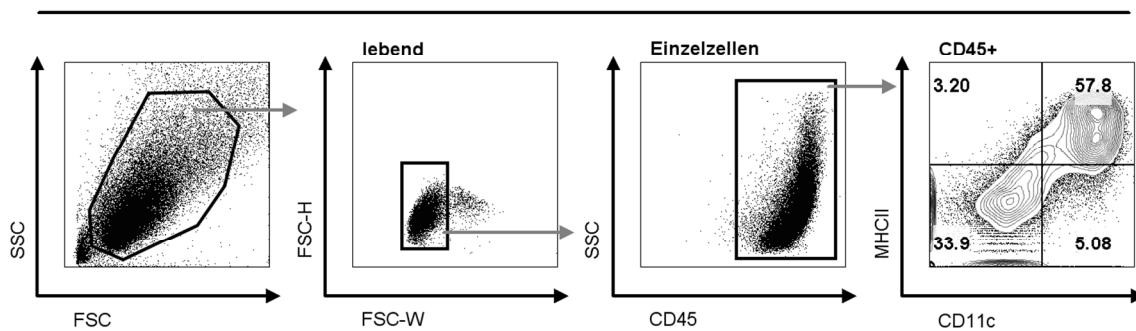
4.1.1 Generierung und Charakterisierung GM-CSF-gereifter dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark

Für die Generierung muriner KM-DZ wurde das femorale Knochenmark von wildtypischen (WT) C57Bl/6 Mäusen entsprechend der Methode nach *Inaba et al.* [167], mit Modifikation nach *Lutz et al.* [192] kultiviert (siehe auch Abschnitt 3.1.5.2 und 3.1.6.). Nach 8-tägiger Behandlung mit GM-CSF (*Granulocyte-monocyte colony-stimulating factor*) wurden die Zellen für Versuche verwendet. Für die phänotypische Charakterisierung der KM-DZ wurden die Kulturen regelmäßig lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch auf morphologische Charakteristika und die Expression spezifischer Oberflächenmarker untersucht. Neben der Expression der DZ-typischen Oberflächenmarker CD45, CD11c und MHCII wurde zusätzlich die Expression des Aktivierungsmarkers CD40 und der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 untersucht [157, 200-203]. Die zur Charakterisierung verwendete Auswertungsstrategie ist beispielhaft in Abb. 9B dargestellt.



C

KM-DZ Auswertungsstrategie



D

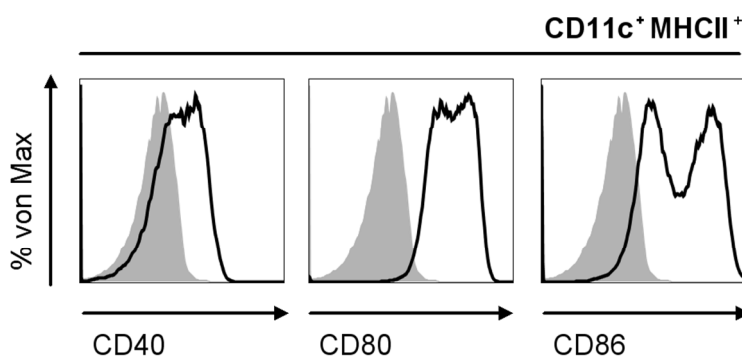


Abb. 9: Generierung und Charakterisierung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark.

(A+B) Durchlichtmikroskopische Untersuchung von Tag 6 KM-DZ Kulturen. Gezeigt sind die für DZ-Kulturen typischen Zellaggregate (A, Pfeil) und dendritischen Fortsätze (B). Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem digital inversen Durchlichtmikroskop (Evos™XL core) erstellt. (C) Durchflusszytometrische

Analyse der nichtadhärenten Zellen von Tag 8 KM-DZ Kulturen. Dargestellt ist die Auswertungsstrategie zur Identifizierung der Knochenmark-gereiften dendritischen Zellen (KM-DZ). Für die Auswertung wurden nur lebende CD45⁺ Zellen innerhalb des FSC/SSC berücksichtigt. Die Zahlen innerhalb der Quadranten geben den Anteil [%] der jeweiligen Population in Bezug auf die CD45⁺ Zellen an. (D) Die Histogramme zeigen die CD40, CD80 und CD86 Expression der CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ (schwarze Linien) im Vergleich zur FMO Kontrolle (*Fluorescence minus one*, grau gefüllte Histogramme). CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ entsprechen dem oberen rechten Quadranten aus (C).

Wie in der Literatur beschrieben [167, 192] wurde zwischen Tag 3 und 5 in Kultur eine Zunahme kleiner Zellaggregate (Abb. 9A), sowie mit fortschreitender Differenzierung der Knochenmarkszellen die Ausbildung DZ-typischer Fortsätze

beobachtet (Abb. 9B). Die durchflusszytometrische Analyse der nichtadhärenten Zellen ergab, dass Tag 8 Kulturen im Schnitt 60 - 70% CD11c⁺ Zellen enthielten (die beiden rechten Quadranten, Abb. 9C), von denen der überwiegende Anteil zusätzlich positiv für MHCII war (oberer rechter Quadrant, Abb. 9C). Für die CD11c⁺MHCII⁺ Zellen wurde zusätzlich eine Hochregulation der CD40, CD80 und CD86 Expression nachgewiesen (Abb. 9D). Die im Konturdiagramm erkennbare Doppelpopulation (CD11c⁺MHCII^{med} und CD11c⁺MHCII^{high}, Abb. 9C) sowie die im Histogramm dargestellten Doppelpeaks (CD80 und CD86, Abb. 9D) machen deutlich, dass es sich um eine Mischpopulation aus DZ unterschiedlichen Reifegrads handelt. Phänotypisch reifere DZ zeichnen sich gegenüber unreifen DZ durch eine erhöhte MHCII, CD40, CD80 und CD86 Expression aus.

4.1.2 Phänotypische Charakterisierung unterschiedlich maturierter KM-DZ

Die immunregulatorischen Eigenschaften der DZ werden durch ihren Maturierungsgrad bestimmt. Unreife DZ exprimieren nur geringe Mengen der antigenpräsentierenden MHC- sowie kostimulatorischen Moleküle (CD40, CD80, CD86) und sezernieren keine Zytokine. Sie gelten daher als tolerogen. Semireife und reife DZ hingegen zeigen eine erhöhte MHC sowie CD40, CD80 und CD86 Expression. Semireife DZ sezernieren, genau wie unreife DZ, keine Zytokine und sind ebenfalls tolerogen. Vollreife DZ hingegen zeichnen sich durch die Produktion einer Reihe verschiedener proinflammatorischer Zytokine aus und sind immunogen. *In vitro* kann die Maturierung der DZ durch die Behandlung mit verschiedenen Agenzien, wie pathogenen Faktoren oder proinflammatorischen Zytokinen, induziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Tag 8 KM-DZ Kulturen zur Induktion der DZ Maturierung entweder mit 100 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS) [204, 205], 10 ng/ml Tumornekrosefaktor- α (TNF α) [206, 207] oder 0.5 μ g/ml Choleratoxin (Ctx) [nicht veröffentlichte Daten M. Lutz] behandelt. Für die Charakterisierung des LPS-, TNF α - und Ctx-vermittelten Phänotyps wurden die KM-DZ Kulturen über Nacht (~ 16 h) mit den Maturierungsstimuli inkubiert und der DZ Reifegrad anhand der Expression von MHCII, CD40, CD80 und CD86 sowie der Induktion der Zytokinexpression bestimmt. Die Analyse der Oberflächenmarker erfolgte mittels durchflusszytometrischer Messungen und die Zytokinexpression anhand der Genexpression mittels qRT-PCR. Hierfür wurde die RNA der

nichtadhärenten Zellen isoliert und auf die Induktion der *Il1a^s* (IL-1 α), *Il1b^s* (IL-1 β), *Tnfa^s* (TNF α), *Osm^s* (OSM), *Il6^s* (IL-6), *Il23a^s* (IL-23p19), *Il12a^s* (IL-12p35) und *Il12b^s* (IL-12p40) Expression untersucht. Als interne Kontrolle wurde die Expression des in allen eukaryotischen Zellen exprimierten Strukturproteins β -Actin (*Actb*) bestimmt. Die Analyse der relativen mRNA Spiegel erfolgte nach der $2^{-\Delta CT}$ Methode von *Livak & Schmittgen* [198], wobei die Werte der unstimulierten Kontrolle als 1 definiert wurden.

Wie Abb. 10 zu entnehmen ist, führte die Behandlung mit LPS zu einer erhöhten MHCII, CD40, CD80 und CD86 Expression. Darüber hinaus wurde die Induktion T-Zell relevanter Zytokine, inklusive *Il12a*, *Il12b*, *Il23a*, sowie weiterer proinflammatorischer Zytokine (*Il1a*, *Il1b*, *Osm*, *Tnfa*, *Il6*) nachgewiesen. Demgegenüber zeigten TNF α - und Ctx-gereifte KM-DZ nur eine geringe Hochregulation der Expression von CD40 und CD80. Die Expression von MHCII und CD86 wurde durch TNF α nur geringfügig verstärkt, während Ctx eine zu LPS vergleichbare Hochregulation vermittelte. Die mit TNF α behandelten KM-DZ Kulturen zeigten generell keine Induktion der untersuchten mRNA Expression. Die Behandlung mit Ctx hingegen verstärkte die *Il1b*, *Il6* und *Il12a* Expression, inhibierte jedoch die basale *Tnfa* und *Il23a* Expression.

In Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen zeigen diese Ergebnisse, dass die Behandlung mit LPS [204, 205], TNF α [204, 206, 208, 209] und Ctx [210-216] die Maturierung der DZ, wenn auch in unterschiedlicher Weise, induziert.

⁸ Genbezeichnung

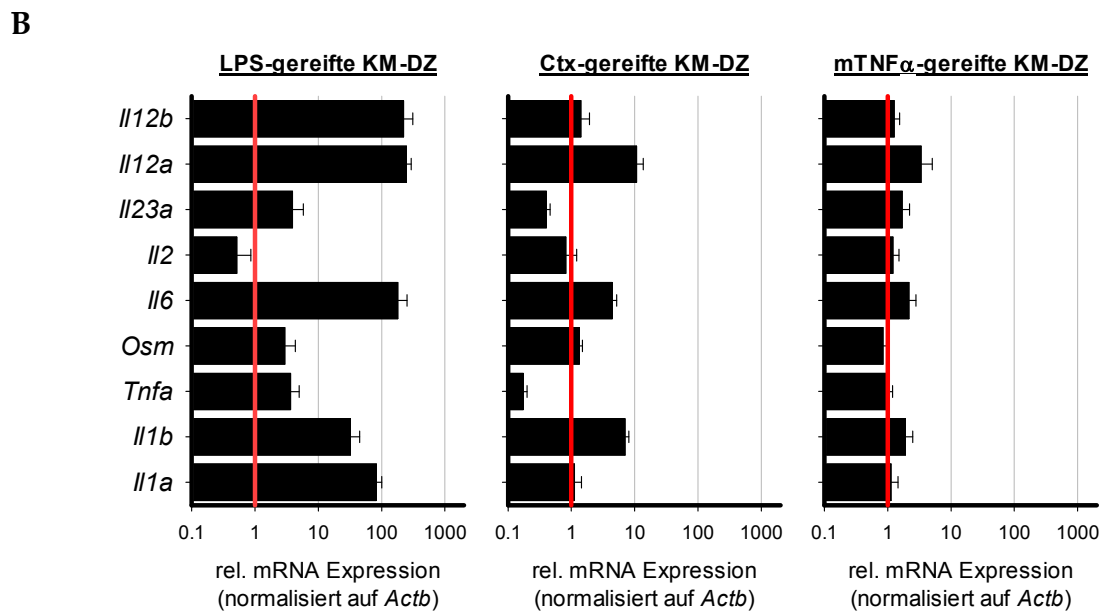
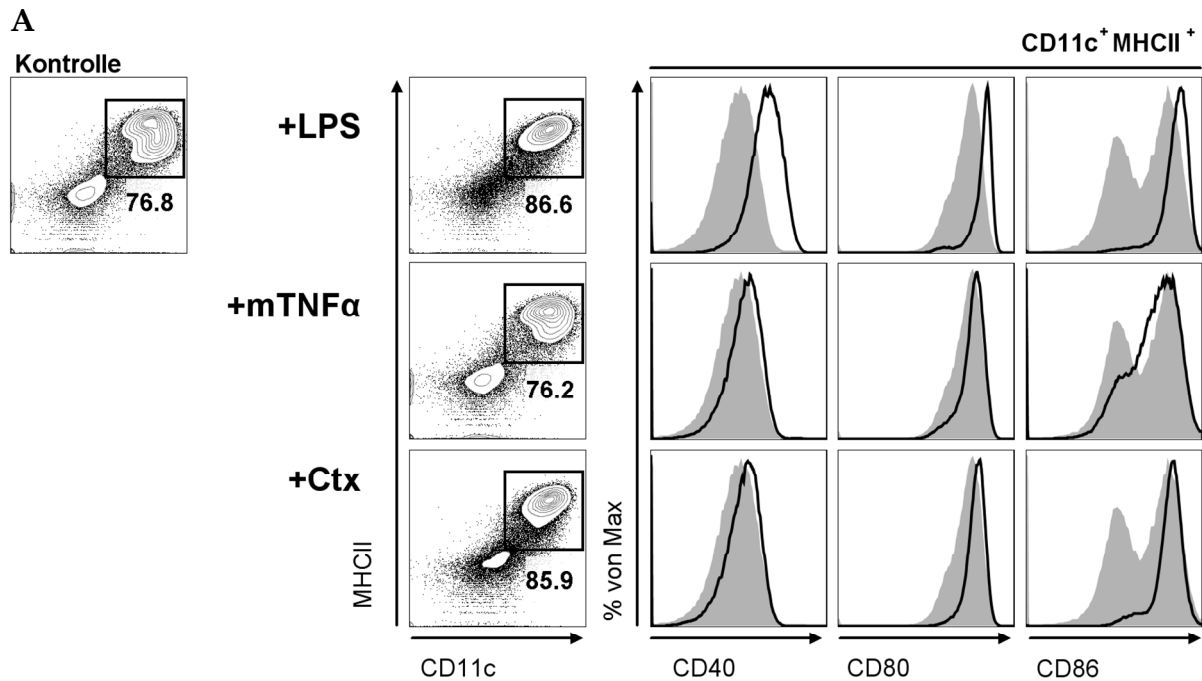


Abb. 10: LPS, TNF α und Ctx induzieren eine unterschiedliche DZ Reifung/Maturierung. Für die Induktion der DZ Maturierung wurden Tag 8 KM-DZ Kulturen für 16 h mit 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml mTNF α oder 0.5 μ g/ml Ctx inkubiert, durchflusszytometrisch analysiert und es wurde das Zytokinprofil der gereiften KM-DZ untersucht. (A) Durchflusszytometrische Analyse der nichtadhärenten Zellen von KM-DZ Kulturen für die Expression von CD11c, MHCII, CD40, CD80 und CD86. Die dargestellten Histogramme zeigen die CD40, CD80 und CD86 Expression der CD11c⁺MHCII⁺ Zellen (schwarze Linien) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (grau gefüllte Histogramme). Für die Analyse wurden nur die innerhalb der Eingrenzung liegenden CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ berücksichtigt. (B) Analyse der relativen mRNA Expression proinflammatorischer Zytokine von LPS-, mTNF α - und Ctx-behandelten KM-DZ Kulturen. Die RNA der nichtadhärenten Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der *Il12b*, *Il12a*, *Il23a*, *Il6*, *Osm*, *Tnfa*, *Il1a* und *Il1b* mRNA Expression in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (definiert als 1, rote Linie), normalisiert auf das Referenzgen *Actb*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 7) + SEM (standard error of mean, Standardfehler).

4.1.3 KM-DZ exprimieren gp130, IL-6R und LIFR auf ihrer Oberfläche

Für die Analyse der IL-6-Typ Zytokine-assoziierten Rezeptoren wurde die RNA der nichtadhärenten Zellen von Tag 8 KM-DZ Kulturen isoliert und zur Bestimmung der Genexpression von *Il6st* (gp130), *Il6r* (IL-6R), *Osmr* (OSMR) und *Lifr* (LIFR) mittels qRT-PCR untersucht. Die Beurteilung der Rezeptorexpression erfolgte auf Basis der ermittelten C_T (*cycle threshold*)-Werte. Der C_T -Wert gilt als Maß für den PCR-Zyklus, in dem ein PCR-Signal erstmals einen festgelegten Schwellenwert überschreitet. Demzufolge korreliert die Menge der vorhandenen mRNA mit dem zu messenden C_T -Wert. Niedrige C_T -Werte sind somit ein Indiz für eine erhöhte mRNA Expression und hohe C_T -Werte für eine niedrige mRNA Expression.

Wie in Abb. 11A zu erkennen ist, wurden alle untersuchten Rezeptoren auf mRNA Ebene nachgewiesen. Die Analyse ergab einen mittleren C_T -Wert von 23.5 ± 0.13 für *Il6st*, 26.6 ± 0.52 für *Il6r*, 24.6 ± 0.33 für *Lifr* und 35.5 ± 0.4 für *Osmr*. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass *Osmr* nur geringfügig transkribiert wird, da der ermittelte C_T -Wert (35.5 ± 0.4) auf einen sehr niedrigen mRNA Spiegel hindeutet. Im Gegensatz dazu wurden *Il6st*, *Il6r* und *Lifr* verhältnismäßig stark transkribiert. Die Überprüfung der Primereffizienz (siehe Abschnitt 3.2.4) für die einzelnen Zielgene ergab einen Wert im Bereich von 1.95 bis 2.01, was darauf hindeutet, dass die untersuchten Rezeptoren mit einer vergleichbaren Effizienz amplifiziert wurden. Aufgrund der ermittelten C_T -Werte kann somit vermutet werden, dass *Il6st* am stärksten transkribiert wurde und die Transkription der *Lifr* mRNA geringfügig stärker war als die der *Il6r* mRNA. Ein ähnliches Ergebnis erbrachte auch die Analyse der Proteinspiegel, bei der die Gesamtproteinmenge mittels Western Blot untersucht bzw. die Zelloberflächenexpression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ durchflusszytometrisch analysiert wurde. Wie Abb. 11B und Abb. 11C zeigen, wurde eine deutliche Proteinexpression von gp130 sowohl in den Gesamtzelllysaten der nichtadhärenten Zellen (Abb. 11B) als auch auf der Zelloberfläche von CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ nachgewiesen (Abb. 11C). Im Unterschied dazu war die Proteinexpression des IL-6R und LIFR schwächer und nur mittels FACS, nicht aber (IL-6R – Daten nicht gezeigt; Abb. 11C) bzw. nur sehr schwach mittels Western Blot nachweisbar (LIFR – Abb. 11B). Eine Proteinexpression des OSMR konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieses Befunds sowie der Beobachtung, dass die Stimulation von KM-DZ mit OSM zu keiner Aktivierung OSM-bekannter Signalwege führte (Daten Bachelorarbeit R. Schlund [217]) wurde geschlussfolgert, dass KM-DZ unter den gegebenen Bedingungen keinen OSMR

exprimierten. Daher wurde für nachfolgende Experimente auf die Untersuchung der OSMR Expression verzichtet.

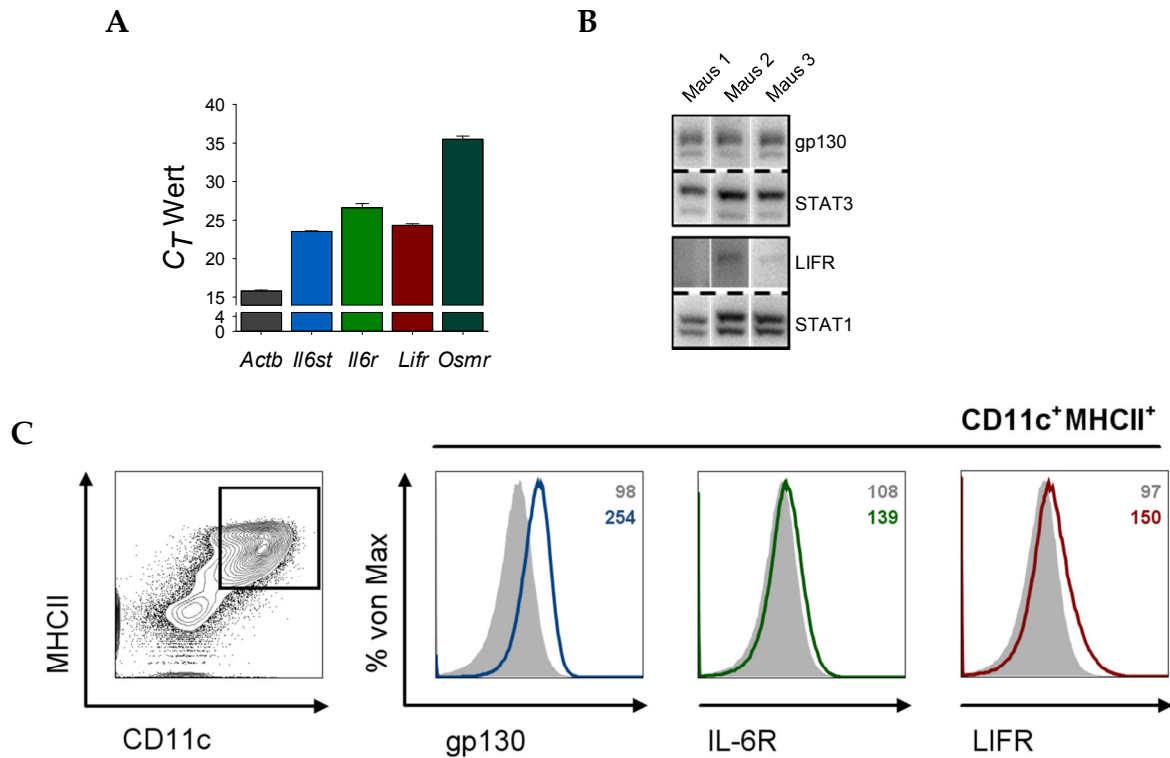


Abb. 11: Charakterisierung der IL-6-Typ Zytokin Rezeptorexpression in KM-DZ Kulturen. Nichtadhärente Zellen von Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden auf die Expression von gp130, IL-6R, LIFR und OSMR mittels qRT-PCR, Western Blot und FACS untersucht. (A) Für die Analyse der *Il6st* (n = 6), *Il6r* (n = 6), *Lifr* (n = 6) und *Osmr* (n = 3) mRNA Spiegel wurde die aus den Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM der C_T -Werte für die Rezeptoren, sowie für das Haushaltsgen Beta-Actin (*Actb*). (B) Für die Analyse der Gesamtproteinmenge wurden die Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die Expression von gp130 und LIFR untersucht. STAT3 und STAT1 dienten als Beladungskontrollen. Dargestellt ist die Rezeptorexpression in drei voneinander unabhängigen WT KM-DZ Kulturen. (C) Durchflusszytometrische Analyse der gp130, IL-6R und LIFR Oberflächenexpression auf KM-DZ. Für die Analyse wurden nur lebende CD45⁺ Zellen innerhalb des FSC/SSC berücksichtigt. Die dargestellten Histogramme zeigen die Rezeptorexpression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ (Linien) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau gefüllte Histogramme). Die Zahlen geben die MFI (*median fluorescence intensity*)-Werte der Rezeptoren (blau/grün/rot) und der dazugehörigen Isotypkontrolle (grau) an.

Um der Frage auf den Grund zu gehen, wie sich die Expression von gp130, IL-6R und LIFR während der Differenzierung der DZ verändert, wurde im Rahmen einer Zeitkinetik die Expression der Rezeptoren auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ an den Tagen 3, 6 und 8 in Kultur durchflusszytometrisch ermittelt. Wie aus Abb. 12 hervorgeht, nahm die Expression von gp130 auf den CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ im Verlauf der Differenzierung bis Tag 8 stetig zu (blaues Histogramm, Abb. 12). Die Expression des IL-6R hingegen blieb über den beobachteten Zeitraum hinaus nahezu unverändert (grünes Histogramm, Abb. 12). Demgegenüber zeigte der LIFR zu Anfang der DZ

Differenzierung (Tag 3) ein sehr hohes Expressionsniveau, das im Verlauf der Differenzierung jedoch signifikant herunterreguliert wurde (rotes Histogramm, Abb. 12). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass GM-CSF-gereifte KM-DZ gp130 sowie den IL-6R und den LIFR auf ihrer Oberfläche exprimieren, wobei deren Expression im Verlauf der KM-DZ Differenzierung unterschiedlich reguliert wird.

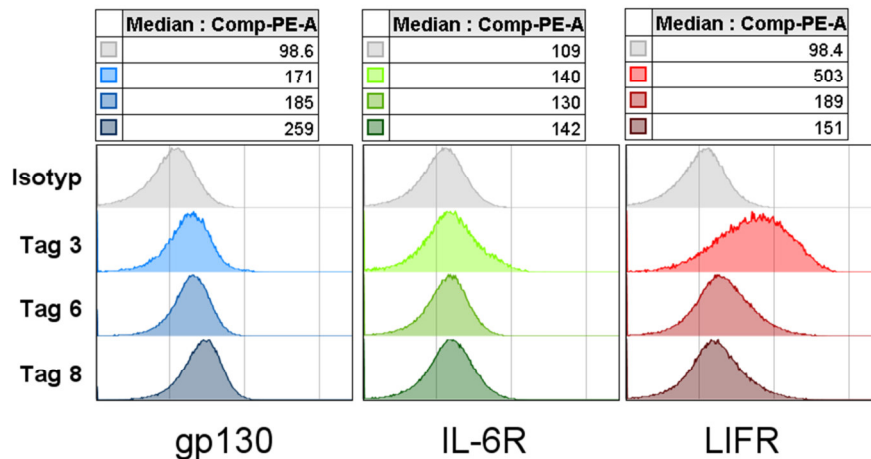


Abb. 12: Regulation der Zelloberflächenexpression von gp130, IL-6R und LIFR in CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ. Nichtadhärente Zellen von Tag 3, 6 und 8 KM-DZ Kulturen wurden durchflusszytometrisch auf die Expression von gp130 (blau), IL-6R (grün) und LIFR (rot) untersucht. Die dargestellten Histogramme zeigen jeweils die Rezeptorexpression der CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ (entsprechend der Eingrenzung aus Abb. 11C) im Vergleich zur jeweiligen Isotypkontrolle (grau gefüllte Histogramm). Für die Analyse wurden nur lebende CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FCS/SSC berücksichtigt. Die Tabellen oberhalb der Histogramme geben die für die Rezeptoren an Tag 3, 6 und 8 sowie die für die Isotypkontrollen gemessenen MFI (*median fluorescence intensity*)-Werte an.

4.1.4 Die DZ Reifung induziert die Cross-Regulation von gp130

Studien mit Monozyten und Makrophagen haben gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF α) und Stressfaktoren (LPS, UV, H₂O₂) das IL-6-Signal in Immunzellen inhibieren können [218, 219]. Die Ergebnisse von *Radtko et al.* [52] und *Honke et al.* [218] deuten darauf hin, dass es aufgrund der Zellaktivierung zur Cross-Regulation von gp130 kommt, die zu einer Limitierung der Rezeptorverfügbarkeit an der Oberfläche führt. Es stellte sich daher die Frage, ob die Maturierung der DZ durch LPS, TNF α oder Ctx einen Einfluss auf die gp130 Expression hat. Um dies zu überprüfen, wurde die gp130 Expression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ im Verlauf einer fünf-stündigen Stimulation mit LPS, TNF α oder Ctx untersucht.

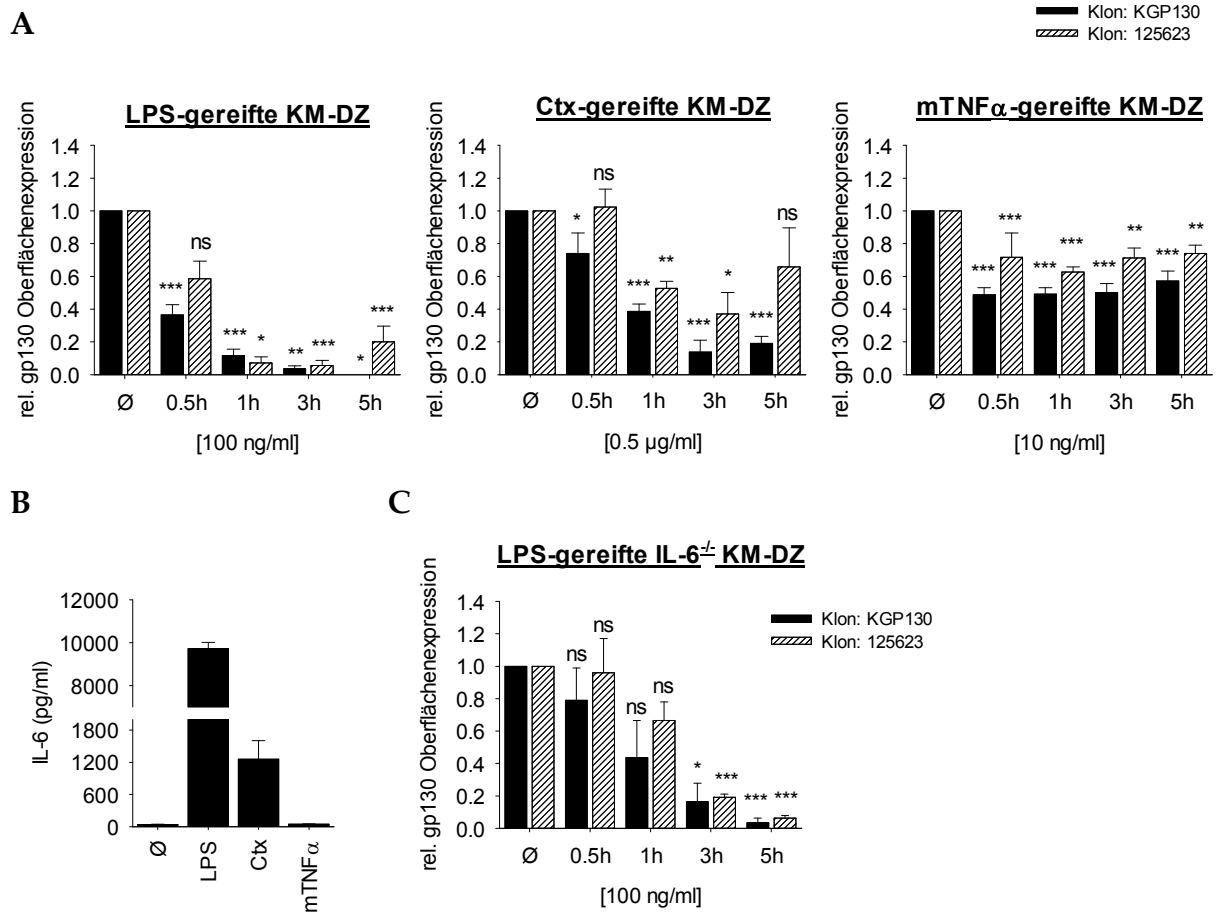


Abb. 13: LPS, mTNFα und Ctx induzieren die Cross-Regulation von gp130 auf KM-DZ. Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für bis zu 5 h mit 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml mTNFα oder 0.5 µg/ml Ctx stimuliert. Anschließend wurden die nichtadhärenten Zellen für die Untersuchung der gp130 Expression mit dem anti-gp130-PE (KGP130) oder dem anti-gp130-PE (125623) Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A) Dargestellt ist die relative gp130 Oberflächenexpression der CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Ø), die als 1 definiert wurde. Für die Analyse wurden nur lebende CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC berücksichtigt. (schwarze Säule = Klon: KGP130; quergestreifte Säule = Klon: 125623). (B) Analyse der IL-6 Konzentration im Überstand der KM-DZ Kulturen nach 5-stündiger Behandlung mit LPS, mTNFα oder Ctx. Die Bestimmung der IL-6 Konzentrationen erfolgte in Duplikaten mittels des *Mouse* IL-6 Quantikine ELISA Kits. (C) Dargestellt ist die relative gp130 Oberflächenexpression der CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ von IL-6^{-/-} KM-DZ Kulturen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (definiert als 1). Für die Analyse wurden nur lebende CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FCS/SSC berücksichtigt. (schwarze Säule = Klon: KGP130; quergestreifte Säule = Klon: 125623). (A-C) Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM der korrigierten MFI⁹ (*median fluorescence intensity*)-Werte von WT (n ≥ 4) und IL-6^{-/-} (n = 3) KM-DZ Kulturen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten T-Tests oder des Wilcoxon Rangsummen-Tests: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.005; ***, p ≤ 0.001 (*versus* unbehandelte Kontrolle).

Wie Abb. 13A zeigt (schwarze Säulen), führte die Stimulation mit TNFα zu einer 50%-igen, mit Ctx zu einer etwa 70%-igen und mit LPS sogar zu einer bis zu 95%-igen Reduktion der gp130 Expression. Da nachgewiesen wurde, dass DZ bereits früh nach

⁹ Korrigierte MFI: MFI-Wert des Rezeptors abzüglich des MFI-Werts der Isotypkontrolle

Behandlung mit LPS und Ctx IL-6 sezernieren (Abb. 13B), stellte sich die Frage, ob der beobachtete Effekt auf eine kompetitive Reaktion zwischen dem anti-gp130 Antikörper (Klon: KGP130) und dem freigesetzten, am Rezeptor gebundenen, IL-6 zurückzuführen ist. Aus diesem Grund wurde die Analyse der gp130 Expression mit einem zweiten FACS-Antikörper überprüft (Klon: 125623) und zusätzlich die gp130 Expression auf IL-6-defizienten KM-DZ (IL-6^{-/-}) untersucht. Wie aus Abb. 13A hervorgeht (quergestreifte Säulen), wurde zwar eine zum Klon KGP130 geringfügig schwächere, jedoch im Trend vergleichbare Reduktion von gp130 nachgewiesen. Auch die Analyse der LPS-behandelten IL-6^{-/-} KM-DZ bestätigte einen nahezu kompletten Verlust der gp130 Expression auf KM-DZ (Klon: KGP130 – schwarze Säulen; Klon: 125623 – quergestreifte Säulen; Abb. 13C). Auffällig jedoch war, dass die Regulation der gp130 Expression auf den IL-6^{-/-} KM-DZ zu frühen Zeitpunkten (0.5 - 1 h, Abb. 13C) schwächer war als auf den KM-DZ der WT Mäuse (Abb. 13A), was möglicherweise doch auf einen Effekt durch endogen produziertes IL-6 schließen lässt.

Als nächstes wurde untersucht, ob die Regulation von gp130 ausschließlich für die initiale Phase der DZ Aktivierung eine Rolle spielt oder ob die Maturierung generell zu einer Verminderung der gp130 Expression auf DZ führt. Hierfür wurden KM-DZ Kulturen, die für mindestens 16 Stunden (über Nacht) mit LPS-, TNF α oder Ctx behandelt wurden, untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass LPS im Gegensatz zu TNF α und Ctx eine langanhaltende negative Regulation induzierte, die zu einer über 90%-igen Verminderung der gp130 Oberflächenexpression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ führte (schwarze Säulen, Abb. 14A). Demgegenüber zeigten TNF α -behandelte KM-DZ eine mit den unbehandelten Kontrollen vergleichbare gp130 Expression. Bei Ctx-behandelten KM-DZ war sogar eine leicht erhöhte gp130 Expression festzustellen. Um auszuschließen, dass es sich bei der langanhaltenden LPS-vermittelten gp130 Reduktion um einen indirekten Effekt handelt, der durch weitere in den Kulturen enthaltenen Zellen bedingt ist (wie bspw. Makrophagen [220-223]), wurden die nichtadhärenten Zellen vor der Behandlung mit den Maturierungsstimuli in eine neue Kulturschale überführt (rote Säulen, Abb. 14A). Darüber hinaus wurden Kulturen, die mit rekombinantem GM-CSF generiert wurden untersucht, um ebenfalls einen Effekt durch andere, im GM-CSF enthaltenden Zellkulturüberstand befindliche Faktoren, auszuschließen (blaue Säulen, Abb. 14A).

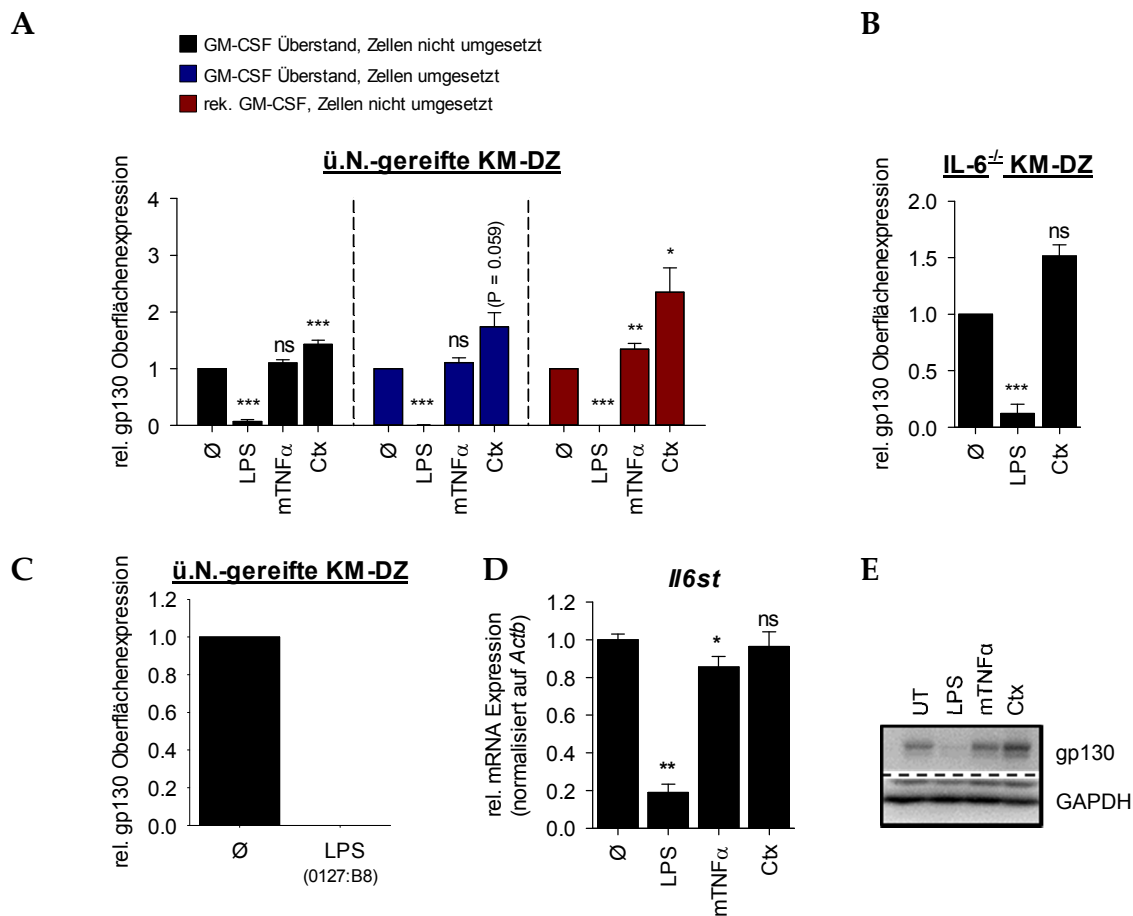


Abb. 14: Über Nacht-gereifte KM-DZ zeigen eine unterschiedliche gp130 Regulation. Analyse der gp130 Expression nach Stimulation mit 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml mTNF α oder 0.5 μ g/ml Ctx über Nacht (ü.N.: ~ 16 h). (A) Für die Generierung von KM-DZ wurde das femorale Knochenmark von WT Mäusen für 8 Tage mit 10% GM-CSF Überstand (schwarz und blau) oder 50 ng/ml rGM-CSF kultiviert (rot). An Tag 8 wurden die Kulturen entweder in derselben Petrischale belassen (Zellen nicht umgesetzt) oder es wurden die nichtadhärenten Zellen auf eine neue Petrischale überführt (Zellen umgesetzt). Dargestellt ist die relative gp130 Expression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ bezogen auf die unbehandelte Kontrolle (definiert als 1). (B) Analyse der gp130 Expression auf KM-DZ von IL-6^{-/-} Mäusen. Dargestellt ist die relative gp130 Expression auf CD11c⁺MHCII⁺ Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (definiert als 1). (C) Analyse der gp130 Expression auf KM-DZ von WT Mäusen nach über Nacht Behandlung mit 100 ng/ml LPS (Serotyp: 0127:B8). Dargestellt ist die relative gp130 Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (\emptyset , definiert als 1). (D) Die RNA der nichtadhärenten Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der *Il6st* Expression in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *Actb* (n = 4). (E) Die Zelllysate der nichtadhärenten Zellen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot für die Expression von gp130 untersucht. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten. (A-C) Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM der korrigierten MFI (*median fluorescence intensity*)-Werte von WT (n \geq 4) und IL-6^{-/-} (n = 3) KM-DZ Kulturen. (A-D) Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten T-Tests oder des Wilcoxon Rangsummen-Tests: ns, p > 0.05; *, p \leq 0.05; **, p \leq 0.005;***, p \leq 0.001 (*versus* unbehandelte Kontrolle).

Wie in Abb. 14A zu erkennen ist, führte LPS in beiden Fällen zu einem Verlust der gp130 Oberflächenexpression, während für TNF α nahezu keine Veränderung festzustellen war. Ctx induzierte, wie zuvor, eine Verstärkung der gp130 Expression.

Zusätzlich wurden ebenfalls LPS- und Ctx-behandelte IL-6^{-/-} KM-DZ sowie KM-DZ von WT Mäusen, die mit LPS eines anderen Serotyps¹⁰ behandelt wurden [224-227], überprüft. Wie sich in Abb. 14B erkennen lässt, wurde auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ von IL-6-defizienten Mäusen gleichfalls eine Ab- bzw. Zunahme der gp130 Oberflächenexpression beobachtet. Die Behandlung mit einem anderen LPS Serotyp führte zum kompletten Verlust der gp130 Zelloberflächenexpression (Abb. 14C). Weitere Analysen, bei denen die *Il6st* mRNA Expression und gp130 Gesamtproteinexpression analysiert wurden belegten, dass LPS ebenso die Transkription des Rezeptors inhibierte. Wie in Abb. 14 D+E zu erkennen ist, wiesen LPS-behandelte KM-DZ eine signifikant verminderte *Il6st* mRNA Expression sowie eine deutlich reduzierte gp130 Gesamtproteinexpression auf. In Übereinstimmung mit den FACS Befunden war in den Lysaten der Ctx-behandelten KM-DZ eine Zunahme der gp130 Gesamtproteinexpression nachzuweisen (Abb. 14E). Diese war jedoch nicht auf eine verstärkte *Il6st* mRNA Expression zurückzuführen (Abb. 14D). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Maturierung der DZ zu einer *Cross-Regulation* der gp130 Expression führt, wobei die Stärke und Dauer der Regulation vom Maturierungsstimulus abhängig ist.

4.1.5 TNF α und Ctx vermitteln eine p38-abhängige, LPS hingegen eine p38-unabhängige *Cross-Regulation* von gp130

Es ist beschrieben, dass auf Hepatozyten und Monozyten die *Crosstalk*-vermittelte Regulation von gp130 auf der Aktivierung der p38 MAPK beruht [52, 218]. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die frühe Regulation der gp130 Oberflächenexpression auf maturierenden DZ ebenfalls auf die Aktivierung der Stresskinase p38 zurückzuführen ist. Zunächst wurde die Aktivierung der p38 MAPK in LPS-, TNF α - und Ctx-gereiften KM-DZ Kulturen anhand der Phosphorylierung von p38 oder ihres Substrats, der Serin-/Threonin-Kinase MK2, überprüft. Die Western Blot Analyse zeigt, dass in der Tat alle drei Maturierungsstimuli die Aktivierung des p38 Signals in KM-DZ Kulturen induzierten (Abb. 15A). Bereits nach 15-minütiger Behandlung war eine deutliche Zunahme der Phosphorylierung von MK2 an Threonin 334 mit LPS und Ctx sowie von p38 an Threonin180/Tyrosin182 mit TNF α zu detektieren. Die Phosphorylierung

¹⁰ Bakterielle Endotoxine sind im Bereich der O-Polysaccharidkette hoch variabel und werden daher in verschiedene Serotypen klassifiziert. Diese können verschiedene Funktionen vermitteln.

nahm im weiteren Verlauf wieder ab, war jedoch auch noch nach fünf Stunden nachweisbar.

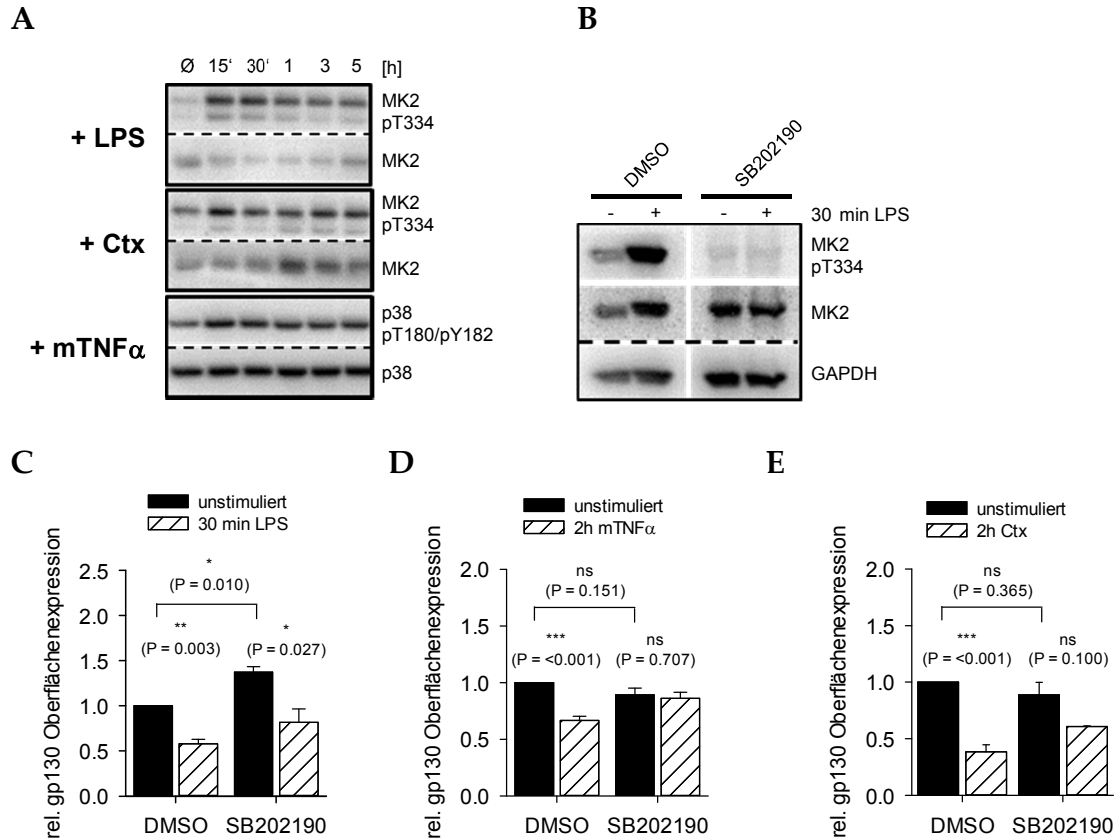


Abb. 15: Die TNF α - und Ctx-induzierte gp130 Cross-Regulation ist p38-abhängig. Untersuchung der Relevanz von p38 bei der LPS, mTNF α und Ctx-vermittelten Cross-Regulation von gp130. (A) Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für bis zu 5 h mit 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml mTNF α oder 0.5 μ g/ml Ctx stimuliert und die nichtadhärenten Zellen wurden für den Nachweis der Threonin (T₃₃₄)-MK2 und Threonin (T₁₈₀)/Tyrosin (Y₁₈₂)-p38 Phosphorylierung lysiert. (B-E) Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für 30 min mit 10 μ M SB202190 oder DMSO vorinkubiert und anschließend für 30 min mit LPS (B+C) oder für 2 h mit mTNF α (D) oder Ctx (E) stimuliert. Die nichtadhärenten Zellen wurden für den Nachweis der MK2 Phosphorylierung lysiert oder für die Analyse der gp130 Oberflächen-expression durchflusszytometrisch untersucht. (A+B) Die Zellysate der nichtadhärenten Zellen wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mittels phospho-spezifischer Antikörper untersucht. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurden die Membranen nach dem Strippen mit einem MK2 oder p38 spezifischen Antikörper gegengefärbt. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten. (C-E) Die nichtadhärenten Zellen wurden für CD45, CD11c, MHCII und gp130 gefärbt. Dargestellt ist die relative gp130 Expression der CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ im Vergleich zur unbehandelten DMSO Kontrolle, die als 1 definiert wurde. Für die Analyse wurden nur lebende CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC berücksichtigt. Gezeigt sind die Mittelwerte (n \geq 3) + SEM der korrigierten MFI (*median fluorescence intensity*)-Werte. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten T-Tests oder des Wilcoxon Rangsummen-Tests: ns, p > 0.05; *, p \leq 0.05; **, p \leq 0.005; ***, p \leq 0.001.

Als nächstes wurde überprüft, welchen Einfluss ein p38-spezifischer Inhibitor auf die gp130 Cross-Regulation hat. Hierfür wurden die KM-DZ Kulturen mit SB202190

vorinkubiert und nach der Stimulation mit LPS, TNF α oder Ctx die Expression von gp130 auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO)-behandelte KM-DZ Kulturen. Die Funktionalität des Inhibitors wurde durch die Detektion der MK2 Phosphorylierung kontrolliert. Wie in Abb. 15B beispielhaft dargestellt ist, inhibierte SB202190 nicht nur die LPS-vermittelte Phosphorylierung von MK2, sondern ebenso die in unbehandelten KM-DZ auftretende basale MK2 Threoninphosphorylierung. Die Analyse der gp130 Oberflächenexpression macht deutlich (Abb. 15 C-E), dass die Vorbehandlung mit SB202190 die TNF α -vermittelte, jedoch nicht die LPS-vermittelte Reduktion von gp130 inhibierte. Die Ctx-vermittelte *Cross*-Regulation von gp130 wurde durch die Behandlung mit SB202190 nicht gänzlich inhibiert, war aber ebenfalls gehemmt, wie die statistische Analyse zeigt.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die Aktivierung der p38 MAPK-Kaskade bei der Regulation der gp130 Oberflächenexpression auf maturierenden DZ eine Rolle spielt, jedoch ein zusätzlicher Mechanismus existieren muss, der die Oberflächenexpression in LPS-gereiften DZ zu frühen Zeitpunkten reguliert.

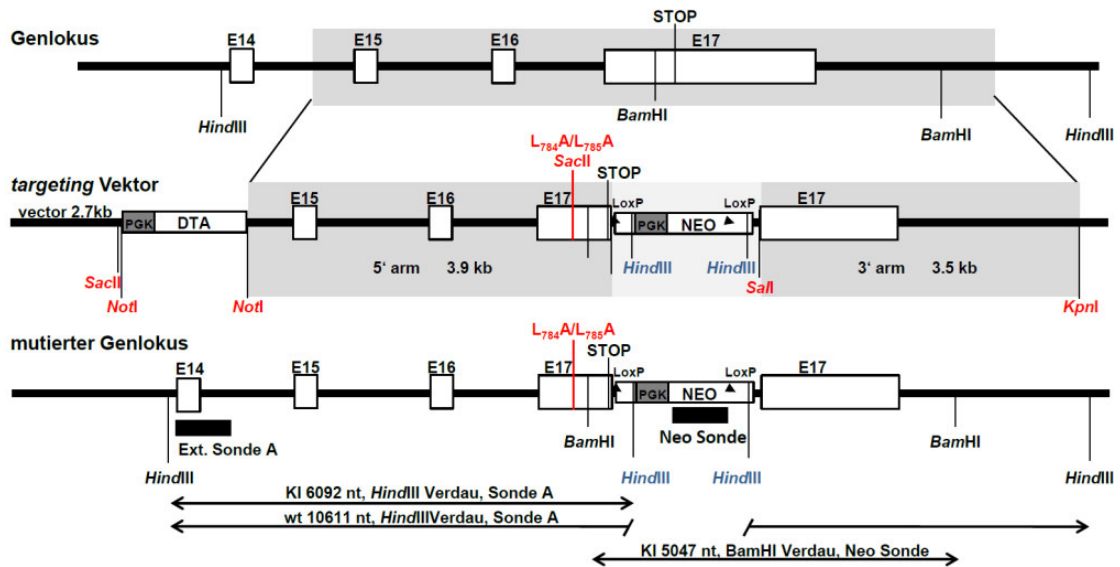
4.2 Analyse der Auswirkung einer internalisierungsdefizienten gp130 Mutante auf Differenzierung und Maturierung von KM-DZ

Die bisherigen Daten zeigen, dass die Reifung der DZ (LPS, TNF α , Ctx) mit einer Abnahme der gp130 Oberflächenexpression einhergeht (4.1.4). Im Fall von TNF α und Ctx konnte dies auf eine Aktivierung der als Stresskinase bekannten MAPK p38 zurückgeführt werden (4.1.5). Aus Untersuchungen mit Hepatozyten war bekannt, dass gp130 über einen p38/MK2-vermittelten Signalweg an Serin 782 phosphoryliert wird, wodurch vermutlich die Bindung des Adapterproteins 2 (AP2) an das Dileucin-Motiv von gp130 begünstigt wird [51, 52, 228]. In Folge dessen kommt es zu einer beschleunigten Internalisierung und Degradation des Rezeptors. Neueste Untersuchungen mit Monozyten deuten darauf hin, dass dieser Mechanismus ebenfalls in anderen Zellen von Bedeutung ist [218].

Um die Relevanz der gp130 Internalisierung bei der Differenzierung und Maturierung von DZ genauer zu untersuchen, wurden als nächstes KM-DZ von Mäusen mit einer internalisierungsdefizienten gp130-Mutante (C57BL/6-TgHil6st^{L784A/L785A1Hema}) analysiert. Gp130^{LLAA} Mäuse verfügen über eine punktmutierte gp130 Variante, in der das besagte Dileucin-Motiv (L₇₈₄,L₇₈₅) zu Dialanin verändert wurde (Hil6st^{LLAA/LLAA}), weshalb diese Form von gp130 vermutlich

resistent gegenüber der Liganden- und *crostalk*-vermittelten Endozytose ist [51-53, 147].

A



B

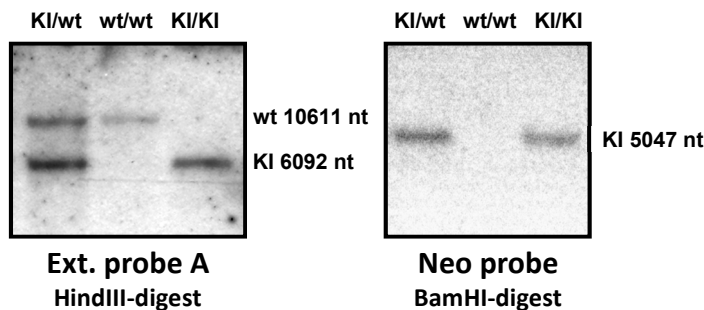


Abb. 16: Strategie zur Herstellung der gp130^{LLAA} knockin Mauslinie. (A) Genlokus des endogenen gp130, targeting Vektor zur Injektion in ES-Zellen und veränderter Genlokus in homolog rekombinanten Mäusen. (B) Southern Blot Analysen genomischer DNA der F2-Generation. (entnommen aus dem SBF688 Antrag zum Teilprojekt A20, Hermanns /Frantz).

Für die Generierung der genetisch veränderten gp130 knockin Mauslinie wurden die entsprechenden Basentriplets im für den zytoplasmatischen Bereich kodierenden Exon 17 des *Il6st* Gens punktmutiert, sowie eine für die Selektion der embryonalen Stamm (ES)-Zellklone notwendige Neomycin (Neo)-Kassette [229] in Exon 17 hinter dem Stop-Codon in den 3' untranslatierten Bereich eingeführt (Abb. 16). Die nach erfolgreicher ES-Zell-Transfektion und Blastozysten-Injektion erhaltenen chimären Mäuse wurden für die Generierung einer heterozygoten F1-Generation (*Il6st*^{wt/LLAA}) mit C57Bl/6 Mäusen verpaart und zur Zucht einer homozygoten (*Il6st*^{LLAA/LLAA}, im Weiteren als gp130^{LLAA} benannt) F2-Generation untereinander verpaart. Die davon abstammenden homozygoten transgenen Mäuse sind

lebensfähig, fertil und zeigten bisher keine auffälligen phänotypischen Unterschiede im Vergleich zu C57Bl/6 Mäusen.

4.2.1 gp130^{LLAA} KM-DZ zeigen eine erhöhte gp130 Expression

Zunächst wurde die Auswirkung der *knockin* Mutation auf die gp130 Expression in KM-DZ untersucht. Hierfür wurden die nichtadhärenten Zellen der gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen für die Expression von gp130 durchflusszytometrisch analysiert bzw. zur Bestimmung der Gesamtproteinexpression lysiert und mittels Western Blot untersucht. Wie in Abb. 17A+B zu erkennen ist, wiesen CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ von gp130^{LLAA} Mäusen eine 4-fach höhere gp130 Expression als vergleichbare WT Kontrollen auf. Auch wurde eine deutlich stärkere Gesamtproteinexpression in den Zelllysaten der gp130^{LLAA} Kulturen nachgewiesen, die jedoch nur auf eine Zunahme der molekular schwereren Form von gp130 zurückzuführen war (oberes Proteinsignal gp130 Blot, Abb. 17C). Die Analyse der *Il6st* mRNA Spiegel ergab, dass die relative *Il6st* Expression in gp130^{LLAA} Kulturen leicht erhöht, jedoch im Verhältnis zur Proteinexpression nur geringfügig verstärkt war (Abb. 17D). Als nächstes wurde untersucht, wie sich die gp130 Expression im Verlauf der GM-CSF-vermittelten DZ Differenzierung zwischen WT und gp130^{LLAA} KM-DZ unterscheidet. Hierfür wurde die gp130 Gesamtproteinexpression von Knochenmarkzellen sowie von KM-DZ Kulturen an Tag 3, 6 und 8 miteinander verglichen. Die Analyse mittels Western Blot ergab, dass bereits an Tag 3 und 6 ein stärkeres Proteinsignal für die schwerere, sehr wahrscheinlich komplex glykosylierte Form von gp130 (obere Bande, ~140kDa) in den Gesamtzelllysaten der gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen zu detektieren war. Das Signal für die leichtere, sehr wahrscheinlich mannosereiche Form von gp130 (untere Bande, ~110k Da) hingegen war bei beiden Genotypen vergleichbar (Abb. 18 A). Während die Expression des schwereren Proteins im Verlauf der Differenzierung immer mehr zunahm und sich deutlich zwischen WT und gp130^{LLAA} KM-DZ unterschied, war die Expression des leichteren Proteins über die Dauer nahezu gleich und zeigte keine Unterschiede zwischen WT und gp130^{LLAA} KM-DZ. Auch in den Knochenmarklysaten von gp130^{LLAA} Mäusen war eine deutlich stärkere Bande bei ~140 kDa nachzuweisen, was vermuten ließ, dass bereits gp130^{LLAA}-positive Vorläuferzellen eine erhöhte gp130 Expression zeigen (Spur 1 und 5, Abb. 18A).

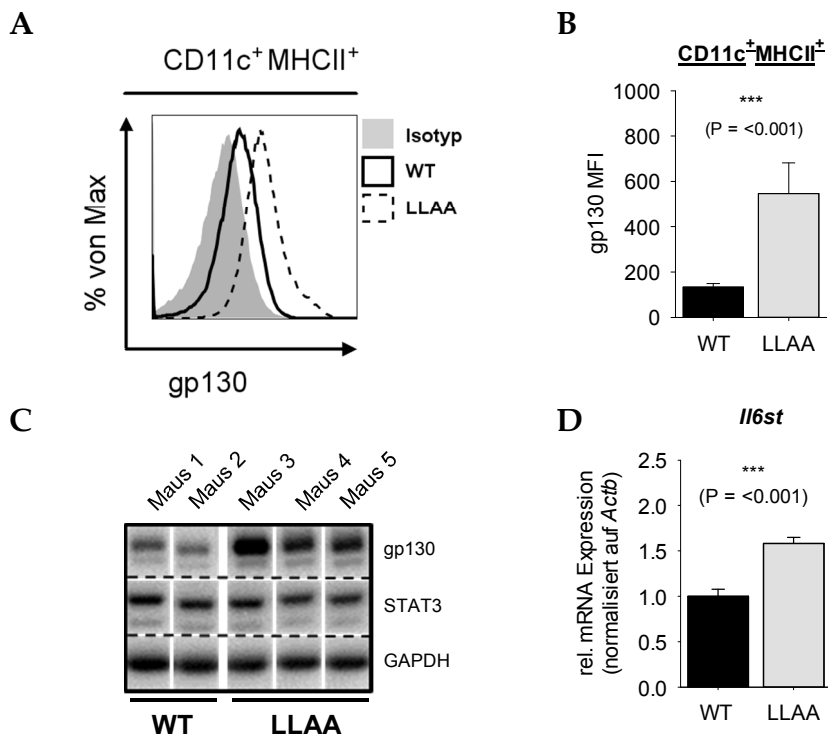


Abb. 17: KM-DZ aus gp130^{LLAA} Mäusen akkumulieren reife Formen des gp130 an ihrer Oberfläche. Tag 8 KM-DZ Kulturen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen wurden mittels durchflusszytometrischer Messungen, Western Blot und qRT-PCR auf die Expression von gp130 untersucht. (A) Die nichtadhärenten Zellen wurden für CD45, CD11c, MHCII und gp130 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das Histogramm zeigt die gp130 Expression der WT (schwarze Linie) und gp130^{LLAA} CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ (gestrichelte Linie) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau gefüllte Histogramm). Für die Auswertung wurden nur CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC berücksichtigt. (B) Das Diagramm zeigt die gp130 Expression auf WT (schwarz) und gp130^{LLAA} (grau) CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ dargestellt als korrigierter MFI (*median fluorescence intensity*)-Wert. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von WT (n=9) und gp130^{LLAA} (n=10). (C) Die nichtadhärente Zellen wurden lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot auf die gp130 Gesamtproteinmenge untersucht. Die Detektion erfolgte mit einem für den Rezeptor spezifischen Antikörper. STAT3 und GAPDH dienen als Beladungskontrollen. Dargestellt ist die Expression von gp130 in voneinander unabhängigen, aber auf einer *Blotting*-Membran detektierten KM-DZ Kulturen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen. (D) Die RNA der nichtadhärenten Zellen wurde in cDNA umgeschrieben und in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative *Il6st* mRNA Expression im Vergleich zum WT (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *Actb*. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von WT (n=6) und gp130^{LLAA} (n=4). (B+D) Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests bestimmt: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; ***, p ≤ 0.001.

Für eine genauere Analyse der DZ Vorläuferzellen wurde das Knochenmark für die Linienmarker CD3¹¹, Ly-6G/Ly-6C¹¹, CD11b¹¹, B220¹¹ und TER-19¹¹ sowie für die DZ Marker CD11c, MHCII und CD135¹² gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Lin⁺MHCII⁺CD11c⁺CD135⁺ Zellen wurden als Makrophagen (MΦ)/DZ-

¹¹ CD3: T-Zell Marker; Ly-6G/Ly-6C: Granulozyten Marker; CD11b: Monozyten/Makrophagen Marker; B220: B-Zell Marker; TER-19: Erythrozyten Marker

¹² auch bekannt als Flt-3L (*fibromyalgia syndrom (FMS)-like tyrosine kinase-3 ligand*)

Vorläuferzellen und die Lin⁻MHCII⁻CD11c⁺CD135⁺ Zellen als prä-DZ definiert [230, 231]. Die für die Auswertung verwendete Strategie zur Identifizierung der MΦ/DZ-Vorläuferzellen und prä-DZ ist beispielhaft in Abb. 8 dargestellt. Wie aus Abb. 18B ersichtlich ist, exprimierten sowohl MΦ/DZ-Vorläuferzellen als auch prä-DZ von gp130^{LLAA} Mäusen deutlich mehr gp130 auf ihrer Oberfläche, wobei der Unterschied zwischen gp130^{LLAA} und WT Mäusen besonders deutlich bei den prä-DZ in Erscheinung trat.

Diese Befunde zeigen, dass die Mutation des Internalisierungsmotivs von gp130 eine erhöhte Zelloberflächenexpression des Rezeptors zur Folge hat, die sich bereits bei den DZ-Vorläuferzellen im Knochenmark manifestiert.

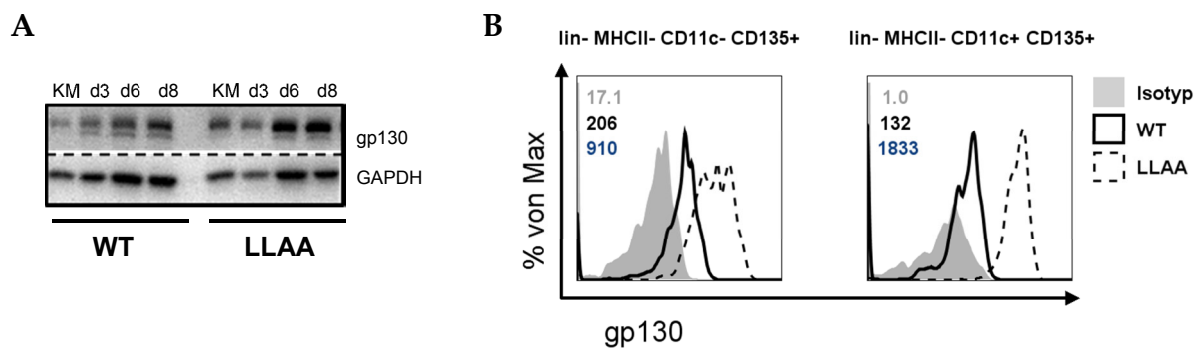


Abb. 18: Knochenmarksvorläuferzellen von gp130^{LLAA} Mäusen zeigen ein erhöhtes gp130 Expressionsniveau. Analyse der gp130 Gesamtproteinexpression in den Zelllysaten des Knochenmarks bzw. der nichtadhärenten Zellen von gp130^{LLAA} und WT KM-DZ Kulturen an Tag 3, 6 und 8. (A) Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion von gp130 erfolgte mit einem für den Rezeptor spezifischen Antikörper. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von WT (n = 7) und gp130^{LLAA} (n = 9) unabhängigen KM-DZ Kulturen. (B) Durchflusszytometrische Analyse der gp130 Expression auf (Lin⁻MHCII⁻CD11c⁻CD135⁺) MΦ/DZ-Vorläufer und (Lin⁻MHCII⁻CD11c⁺CD135⁺) prä-DZ. Knochenmarkszellen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen wurden für die Linienmarker CD3, Ly-6G/Ly-6C, CD11b, B220 und TER-19 sowie CD11c, MHCII und CD135 gefärbt und entsprechend der in Abb. 8 dargestellten Auswertungsstrategie analysiert. Die Histogramme zeigen die gp130 Expression der WT (schwarze Linien) und gp130^{LLAA} Zellen (gestrichelte Linien) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau gefüllte Histogramme). Die Zahlen innerhalb der Histogramme geben den jeweiligen MFI (*median fluorescence intensity*)-Wert von WT (schwarz), gp130^{LLAA} (blau) und Isotypkontrolle (grau) an. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von WT (n=2) und gp130^{LLAA} (n=3) Mäusen.

4.2.2 gp130^{LLAA} KM-DZ reagieren sensitiver auf das IL-6-trans-Signal

Aufgrund des Nachweises, dass gp130^{LLAA} KM-DZ vermehrt gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde vermutet, dass diese möglicherweise sensitiver auf IL-6 reagieren. Um dies zu überprüfen wurden gp130^{LLAA} und WT KM-DZ Kulturen mit aufsteigenden Konzentrationen IL-6 stimuliert und anschließend für die Induktion der STAT3 Tyrosinphosphorylierung mittels Western Blot untersucht.

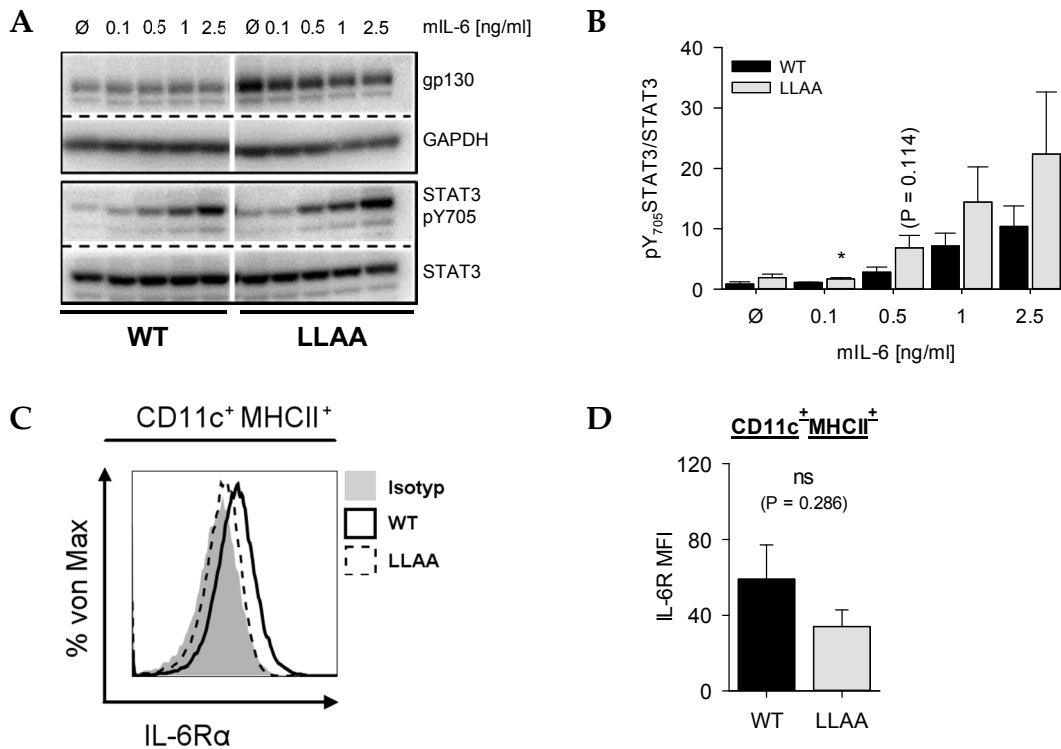


Abb. 19: Die gp130^{LLAA} KM-DZ zeigen keine signifikante Veränderung beim IL-6/STAT3-Signal. Untersuchung des klassischen IL-6-Signals in KM-DZ Kulturen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen. (A) Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für 15 min mit aufsteigenden Konzentrationen mIL-6 simuliert. Anschließend wurden die nichtadhärenten Zellen abgenommen und lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Der Nachweis von gp130 und Y705-phosphoryliertem STAT3 erfolgte mit spezifischen (phospho-) Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem *Strippen* mit einem STAT3 spezifischen Antikörper gegengefärbt. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von WT (n = 3) und gp130^{LLAA} (n = 3). (B) Die quantitative Bestimmung der Y705-STAT3 Phosphorylierung erfolgte mittels densitometrischer Analyse mit Hilfe der AlphaView Software. Dargestellt ist die relative Zunahme der Y705-STAT3 Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandeltem WT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Gesamtprotein STAT3. (C) Analyse der IL-6R Expression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ von WT und gp130^{LLAA} Mäusen. Die nichtadhärenten Zellen von Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für CD45, CD11c, MHCII und IL-6R gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Auswertung wurden nur CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC berücksichtigt. Das Histogramm zeigt die IL-6R Expression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ von WT (schwarze Linie) und gp130^{LLAA} Mäusen (gestrichelte Linie) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau gefüllte Histogramm). (D) Das Diagramm zeigt die IL-6R Expression von WT (schwarz) und gp130^{LLAA} (grau) CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ, dargestellt als korrigierte MFI (*median fluorescence intensity*)-Werte. (B+D) Gezeigt sind die Mittelwerte(n ≥ 3) + SEM. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05 (WT versus gp130^{LLAA}).

Wie in Abb. 19A zu erkennen ist, wiesen sowohl gp130^{LLAA} als auch WT KM-DZ bereits eine basale Phosphorylierung von STAT3 an Tyr(705) auf. Die Behandlung mit IL-6 führte in beiden Kulturen zu einem dosisabhängigen Anstieg der STAT3-Phosphorylierung, wobei eine Zunahme des STAT3-Signals sowohl in gp130^{LLAA} als auch in WT KM-DZ erst bei einer Konzentration von 0.5 ng/ml IL-6 nachzuweisen war. Die densitometrische Analyse des Western Blots verdeutlicht (Abb. 19B), dass

gp130^{LLAA} KM-DZ zwar tendenziell eine stärkere STAT3-Phosphorylierung bei einer Behandlung mit 0.5 – 2.5 ng/ml IL-6 aufweisen, doch unterscheidet sich diese nicht signifikant von der in WT KM-DZ. Nicht ganz eindeutig hingegen ist der Nachweis, dass bei einer geringeren Konzentration (0.1 ng/ml IL-6) zwar ein signifikanter Unterschied festgestellt wurde, die relative STAT3-Phosphorylierung jedoch keine Zunahme gegenüber den unbehandelten Kontrollen zeigt. Vermutlich handelt es sich hierbei um ein falsch positives Ergebnis aufgrund der erhöhten basalen Phosphorylierung von STAT3 in den Lysaten der gp130^{LLAA} KM-DZ.

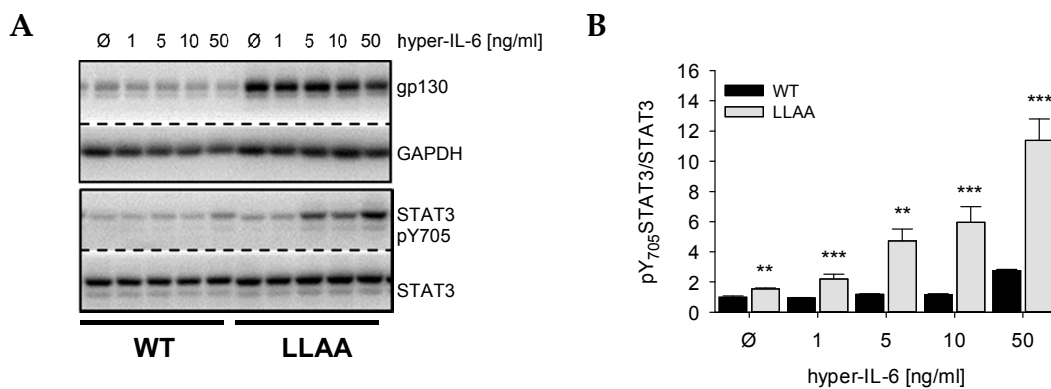


Abb. 20: Die verstärkte gp130 Expression führt zu einer erhöhten Responsivität gegenüber hyper-IL-6 in gp130^{LLAA} KM-DZ. Untersuchung des IL-6 *trans*-Signals in KM-DZ von WT und gp130^{LLAA} Mäusen. (A) Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für 15 min mit aufsteigenden Konzentrationen hyper-IL-6 stimuliert. Anschließend wurden die nichtadhärenten Zellen lysiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Der Nachweis von gp130 und Y₇₀₅-phosphorylierten STAT3 erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem *Strippen* mit einem STAT3 spezifischen Antikörper gegengefärbt. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von WT (n=3) und gp130^{LLAA} (n=3). (B) Die quantitative Bestimmung der Y₇₀₅-STAT3 Phosphorylierung erfolgte mittels densitometrischer Analyse mit Hilfe der AlphaView Software. Dargestellt ist die relative Zunahme der Y₇₀₅-STAT3 Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten WT Kontrolle (definiert als 1), normalisiert auf das Gesamtprotein STAT3. Gezeigt sind die Mittelwerte (n=3) + SEM. Die statistische Auswertung erfolgt mit Hilfe des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests: **, p ≤ 0.005, ***, p ≤ 0.001 (WT *versus* gp130^{LLAA}).

IL-6 besitzt nur eine geringe Affinität zu gp130 und bindet daher zunächst an den IL-6R. Infolgedessen erhöht sich die Affinität und gp130 wird an den bestehenden IL-6/IL-6R-Komplex rekrutiert [115]. Die Analyse der IL-6R Expression ergab, dass die CD11c⁺MCHII⁺ gp130^{LLAA} KM-DZ tendenziell weniger IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimierten als vergleichbare WT KM-DZ (Abb. 19C+D). Da das IL-6 *trans*-Signal unabhängig von membrangebundenem IL-6R erfolgt, wurde als nächstes untersucht, ob gp130^{LLAA} KM-DZ statt dessen sensitiver auf eine Behandlung mit hyper-IL-6 reagieren. Hyper-IL-6 ist ein synthetisch hergestelltes Fusionsprotein, bestehend aus IL-6 und dem löslichen humanen IL-6R, welches alternativ zur Behandlung mit IL-6 in Kombination mit löslichem IL-6R (sIL-6R) verwendet werden kann [232]. Wie die

Analyse der Tyr(705)-STAT3 Phosphorylierung zeigt, induzierte die Behandlung mit 5 ng/ml hyper-IL-6 die Aktivierung des STAT3 Signals in gp130^{LLAA} KM-DZ, nicht aber in WT KM-DZ (Abb. 20A). Erst bei einer Konzentration von 50 ng/ml hyper-IL-6 wurde eine Zunahme der STAT3 Tyrosinphosphorylierung auch in WT KM-DZ detektiert. Die densitometrische Auswertung bestätigte, dass hyper-IL-6 bereits bei geringen Konzentrationen zu einem Anstieg der STAT3 Tyrosinphosphorylierung in gp130^{LLAA} KM-DZ führt, die sich signifikant von der in WT KM-DZ unterschied.

Diese Befunde zeigen, dass gp130^{LLAA} KM-DZ sensitiver auf das IL-6 *trans*-Signal, jedoch nicht auf das klassische IL-6-Signal reagieren können.

4.2.3 Der Einfluss der gp130^{LLAA} Mutation auf die Differenzierung von KM-DZ

Um die Relevanz der Endozytose von gp130 für die Differenzierung und Maturierung der KM-DZ zu untersuchen, wurden gleiche Mengen Knochenmarkzellen von gp130^{LLAA} und WT Mäusen ausgesät und im Rahmen einer Kinetik an Tag 3, 6 und 8 in Kultur miteinander verglichen. Für die Analyse der Wachstums- und Differenzierungsrate wurde die Gesamtzellzahl der nichtadhärenten Zellen bestimmt sowie der prozentuale Anteil der CD11c⁺ Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Wie aus Abb. 21A ersichtlich wird, wiesen die Kulturen von gp130^{LLAA} und WT Mäusen ein ähnliches Zellwachstum auf, da die Zellzahl der nichtadhärenten Zellen an Tag 3, 6 und 8 in beiden Kulturen vergleichbar war. Die durchflusszytometrische Analyse macht jedoch deutlich, dass die KM-DZ Differenzierung zu Beginn der Kultivierung in den gp130^{LLAA} Kulturen retardiert war (Abb. 21B). Der Vergleich zeigt, dass der prozentuale Anteil der CD11c⁺ Zellen in den Kulturen der gp130^{LLAA} Mäuse an Tag 3 und Tag 6 deutlich niedriger war als in den WT Kulturen. Auch ist ersichtlich, dass gp130^{LLAA} Kulturen einen höheren Anteil unreifer KM-DZ enthielten (CD11c⁺ Zellen mit einer geringen MHCII Expression; unterer rechter Quadrant Abb. 21B), während der Anteil der reifen KM-DZ (CD11c⁺MHCII⁺ Zellen) bereits an Tag 3 und 6 in den WT Kulturen deutlich höher war als in Kulturen der gp130^{LLAA} Mäuse (oberer rechter Quadrant Abb. 21B). An Tag 8 hingegen war der Anteil der CD11c⁺ bzw. CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ in beiden Kulturen nahezu vergleichbar.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Differenzierung der KM-DZ aus Knochenmark von gp130^{LLAA} Mäusen anfänglich vermindert war, jedoch durch die fortschreitende Behandlung mit GM-CSF verbessert wurde.

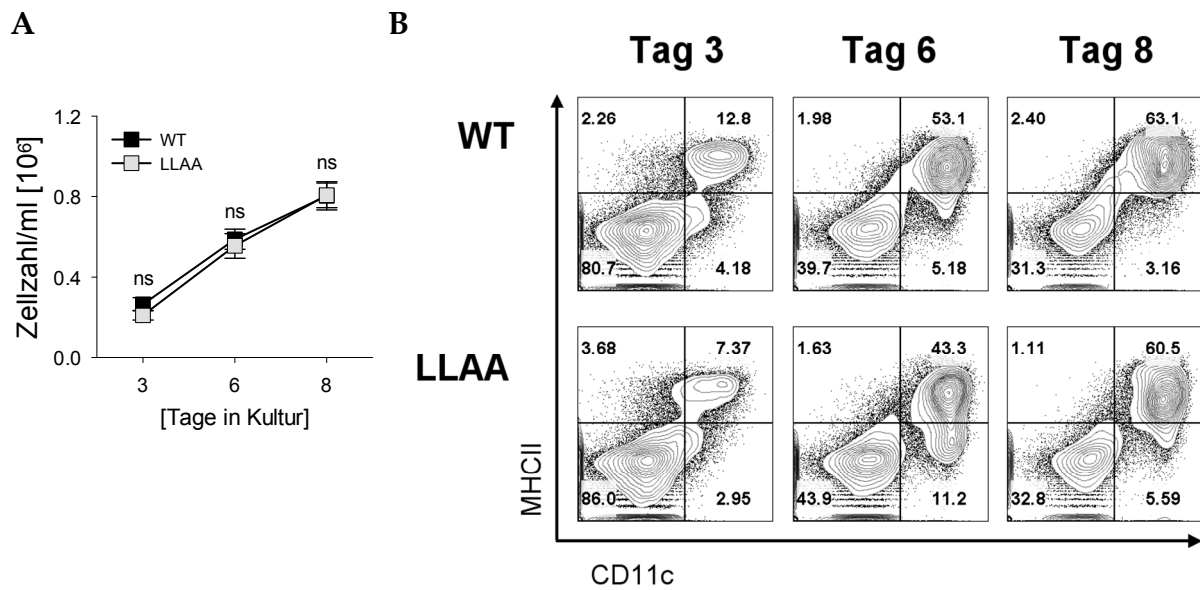


Abb. 21: Knochenmark von gp130^{LLAA} und WT Mäusen generiert vergleichbar Mengen an DZ. Analyse der Relevanz der gp130 Internalisierung für die Differenzierung der KM-DZ. Tag 3, 6 und 8 KM-DZ Kulturen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen wurden hinsichtlich ihrer Wachstumsrate und dem prozentualen Anteil der KM-DZ verglichen. (A) Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen der nichtadhärenten Zellen von WT (schwarz) und gp130^{LLAA} (grau) KM-DZ Kulturen. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM von WT: n = 9 und gp130^{LLAA}: n = 10 KM-DZ Kulturen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Test: ns, p > 0.05 (WT versus gp130^{LLAA}). (B) Die nichtadhärenten Zellen wurden für die Expression von CD45, CD11c und MHCII gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Konturdiagramme zeigen nur lebende CD45⁺ Zellen innerhalb des FSC/SSC. Die Zahlen innerhalb der Quadranten geben den Anteil [%] der jeweiligen Population bezogen auf die CD45⁺ Zellen an.

Die Differenzierung funktioneller DZ ist abhängig von der Aktivität einer Reihe verschiedener Signalkaskaden, inklusive der Raf/MEK/ERK- und PI3K/Akt-Kaskade sowie der Aktivierung von NFκB und p38 [233, 234]. Um die Expression der genannten Signalproteine sowie deren Aktivität zu untersuchen, wurde in Zellysaten von Knochenmark und Tag 3, 6 und 8 KM-DZ Kulturen die Phosphorylierung von NFκB (S563), Akt (S473), MK2 (T334) und ERK1/2 (T202/Y204) sowie nach dem *Strippen* der Membran die Gesamtproteinexpression und die Expression des NFκB Zielgenes IκBα untersucht. Zusätzlich wurde die Expression der für das GM-CSF- bzw. IL-6-Signal notwendigen Proteine Jak1 und Jak2 sowie STAT1 und STAT3 analysiert. Wie Abb. 22 zeigt, nahm über die Dauer der Differenzierung die Proteinexpression der untersuchten Signalproteine, inklusive die des Haushaltsgen GAPDH zu. Einzig die Expression von Jak1 blieb im Verlauf von Tag 3 bis 8 stabil. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass der Anstieg von NFκB, Akt und ERK mit einem Anstieg der Phosphorylierung dieser Proteine einhergeht. Für eine verstärkte nukleäre Translokation von NFκB spricht die verstärkte Expression des NFκB Zielgenes IκBα. Im Gegensatz dazu wurde die MAPK p38 im Verlauf nur

sehr schwach aktiviert, da lediglich ein geringer Anstieg der Phosphorylierung von MK2 an Tag 6 und 8 nachgewiesen wurde. Die starke MK2 Phosphorylierung, die in den Knochenmarklysaten detektiert wurde, ist vermutlich ein Artefakt und auf die Präparation und den damit verbundenen Zellstress zurückzuführen. Mit Ausnahme einer verringerten PI3K Expression sowie einer dadurch verminderten Akt-Phosphorylierung in den Lysaten der gp130^{LLAA} KM-DZ, war kein signifikanter Unterschied bei WT und gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen nachzuweisen.

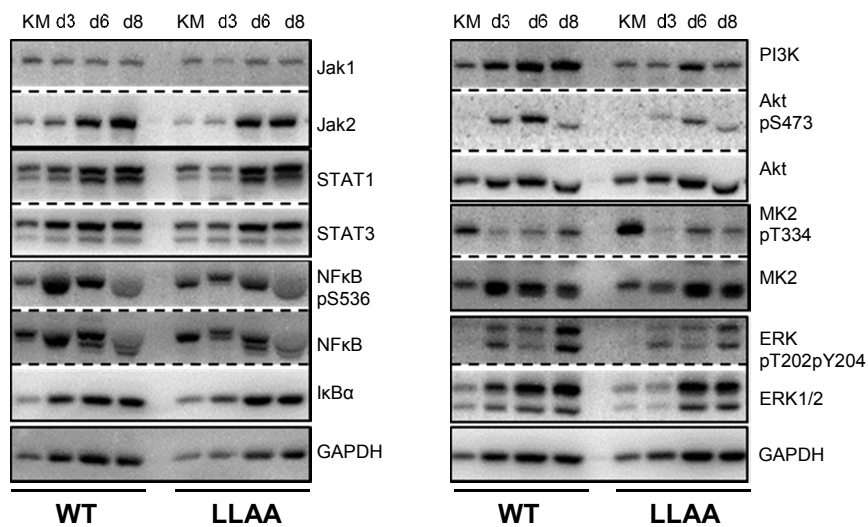


Abb. 22: Die während der Reifung induzierten Signalkaskaden weisen keine signifikanten Unterschiede bei den KM-DZ Kulturen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen auf. Für die Untersuchung des JAK/STAT, NFκB, PI3K/Akt sowie MAPK Signalwegs wurden frisch isolierte Knochenmarkszellen (KM) sowie nichtadhärente Zellen von Tag 3, 6 und 8 KM-DZ Kulturen lysiert. Die Gesamtzelllysate wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem *Strippen* mit einem NFκB, Akt, MK2 oder ERK1/2 spezifischen Antikörper gegengefärbt. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von WT (n = 6) und gp130^{LLAA} (n = 9).

4.2.4 Der Einfluss der gp130^{LLAA} Mutation auf die Maturierung der KM-DZ

Um heraus zu finden, ob ein Unterschied im Aktivierungs-/Maturierungstatus der WT und gp130^{LLAA} KM-DZ besteht, wurde als nächstes die Expression des Aktivierungsmarkers CD40 sowie der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 genauer untersucht. Wie aus Abb. 23A ersichtlich ist, wiesen CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ von WT und gp130^{LLAA} Kulturen einen vergleichbaren Phänotyp auf, da kein signifikanter Unterschied in der basalen Expression von CD40, CD80 oder CD86 nachgewiesen wurde. Die Reifung mit LPS führte gleichermaßen zu einem Anstieg der Expression der kostimulatorischen Moleküle und des Aktivierungsmarkers

CD40. Zwar war die Expression von CD40 auf den CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ der gp130^{LLAA} Kulturen geringfügig erhöht, jedoch nicht signifikant verstärkt im Vergleich zu den WT Kulturen (Abb. 23B). Im Unterschied dazu war die Expression von CD80 und CD86 auf den TNF α - und Ctx-gereiften CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ der gp130^{LLAA} Kulturen geringfügig schwächer, was sich jedoch nur im Fall von CD80 als signifikant erwies. Die Induktion der CD40 Expression bei den TNF α - und Ctx-gereiften KM-DZ zeigte keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen.

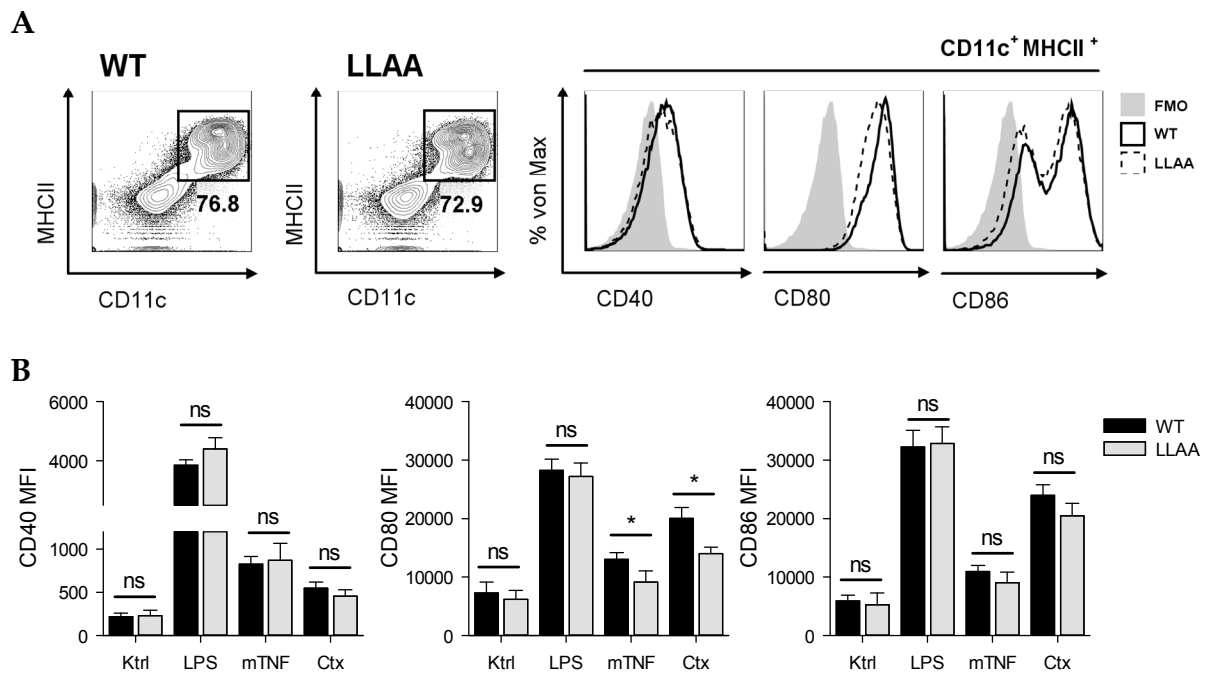


Abb. 23: gp130^{LLAA} KM-DZ haben einen vergleichbaren Reifestatus wie WT KM-DZ. Analyse des Reifestatus der KM-DZ von WT und gp130^{LLAA} Mäusen. (A) Nichtadhärente Zellen von Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für CD45, CD11c, MHCII, CD40, CD80 und CD86 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die dargestellten Konturdiagramme zeigen nur lebende CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC. Die Histogramme zeigen die CD40, CD80 und CD86 Expression der WT (schwarze Linien) und gp130^{LLAA} CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ (gestrichelte Linien) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau gefüllte Histogramme). (B) Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden für 16 h mit 100 ng/ml LPS, 10 ng/ml mTNF α oder 0.5 μ g/ml Ctx stimuliert und durchflusszytometrisch auf die Expression von CD45, CD11c, MHCII, CD40, CD80 und CD86 untersucht. Die Diagramme zeigen die CD40, CD80 und CD86 Expression auf WT (schwarz) und gp130^{LLAA} (grau) CD11c⁺MHCII⁺ Zellen, dargestellt als MFI (*median fluorescence intensity*)-Werte. Gezeigt ist der Mittelwert + SEM von WT: n = 7 und gp130^{LLAA}: n = 10 KM-DZ. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests: ns, p > 0.05; *, p \leq 0.05 (WT versus gp130^{LLAA}).

Weiterhin wurde untersucht, ob sich das Zytokinprofil der WT und gp130^{LLAA} KM-DZ vor und nach der Behandlung mit LPS oder Ctx unterschied. Hierfür wurde die mRNA Expression mittels qRT-PCR analysiert und die relative mRNA Expression entsprechend der 2^{- Δ CT} Methode nach Livak & Schmittgen [198] bestimmt. Die unbehandelte Kontrolle der WT KM-DZ wurde in diesem Fall als 1 definiert.

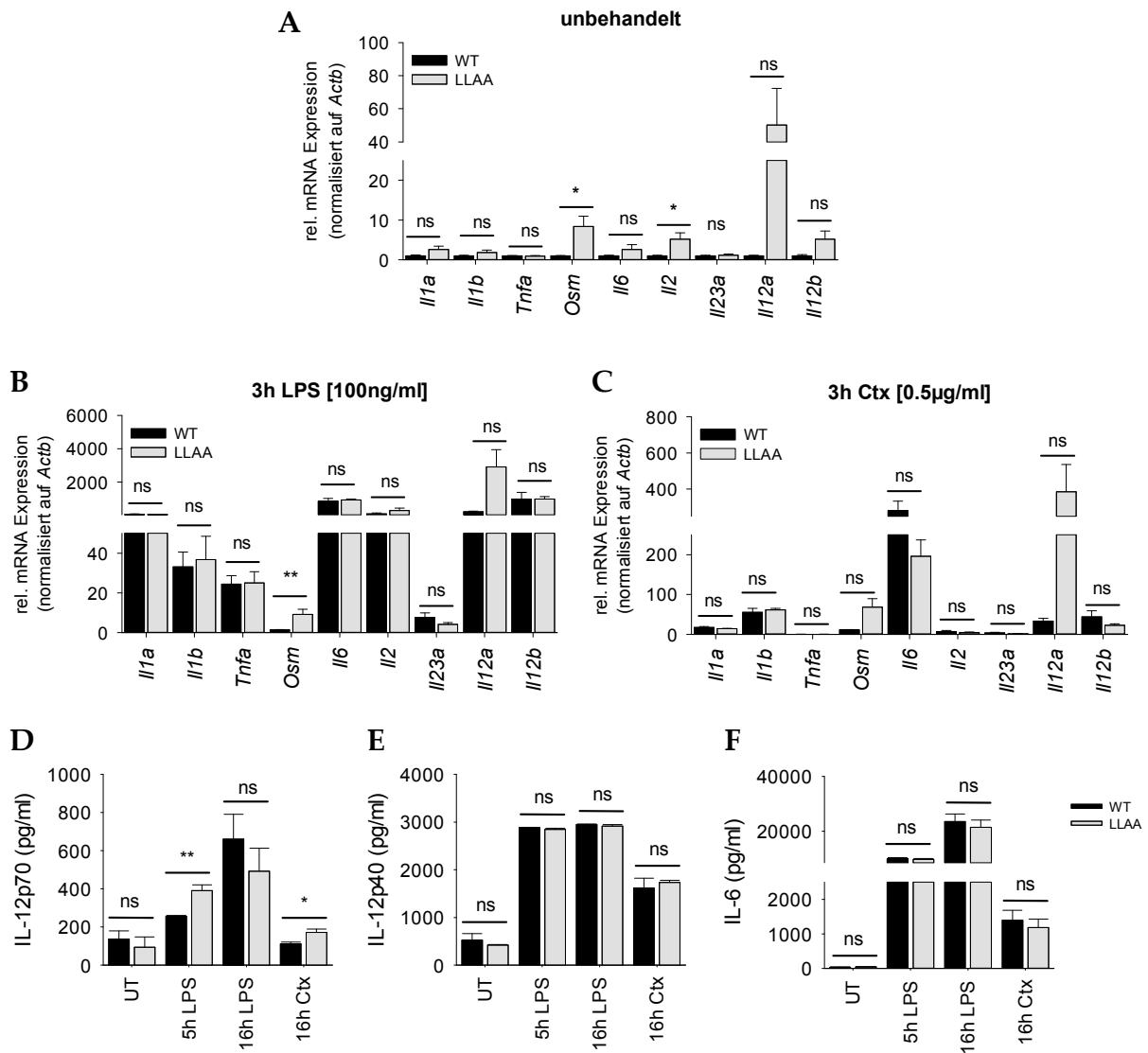


Abb. 24: Analyse des Zytokin-Profiles von WT und gp130^{LLAA} KM-DZ Zellkulturen. (A-C) Tag 8 KM-DZ Kulturen wurden mit 100 ng/ml LPS oder 0.5 µg/ml Ctx und für die Induktion der *Il1a*, *Il1b*, *Tnfa*, *Osm*, *Il6*, *Il2*, *Il23a*, *Il12a* und *Il12b* mRNA Expression in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA Expression (A) unbehandelter, (B) 3 h LPS behandelter und (C) 3 h Ctx behandelten KM-DZ Kulturen von WT (schwarz) und gp130^{LLAA} Mäusen (grau) im Vergleich zur unbehandelten WT Kontrolle (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *Actb*. (D) Analyse der IL-12p70, IL-12p40 und IL-6 Konzentration im Überstand der KM-DZ Kulturen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen mittels ELISA. (A –F) Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM (WT: n ≥ 4; gp130^{LLAA}: n ≥ 4). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.005 (WT versus gp130^{LLAA}).

Interessanterweise konnte bereits in unbehandelten gp130^{LLAA} KM-DZ ein Unterschied für die mRNA Expression der Zytokine festgestellt werden. Wie in Abb. 24A zu erkennen ist, zeigten gp130^{LLAA} KM-DZ eine im Vergleich zu den WT Zellen signifikant verstärkte *Osm* und *Il2* mRNA Expression. Zudem wurde eine erhöhte

Expression der *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Il12a*¹³ und *Il12b*¹⁴ mRNA in gp130^{LLAA} KM-DZ nachgewiesen, die jedoch gegenüber den WT Kontrollen nicht signifikant verstärkt war. Bei Letzterem ist jedoch zu vermerken, dass bei einem der vier getesteten gp130^{LLAA}Kulturen der ermittelte C_T-Wert für *Il12a* deutlich abwich. Würde dieser bei der Auswertung nicht berücksichtigt, wäre auch hier ein signifikanter Unterschied nachzuweisen. Zukünftige Experimente sollten zu diesem Punkt Klarheit verschaffen.

Die Analyse der LPS-behandelten KM-DZ ergab, dass gp130^{LLAA} KM-DZ eine erhöhte *Il12a* mRNA Expression sowie eine im Vergleich zu den WT Kontrollen signifikant verstärkte *Osm* mRNA Expression aufwies (Abb. 12B). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigten ebenfalls Ctx-behandelte KM-DZ von gp130^{LLAA} Mäusen eine im Vergleich zu den WT KM-DZ erhöhte *Osm* und *Il12a* mRNA Expression. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass Ctx-behandelte gp130^{LLAA} KM-DZ weniger *Il6* und *Il12b* mRNA exprimierten als WT KM-DZ (Abb. 12C). Eine zukünftige Erhöhung der Anzahl an Versuchstieren sollte Klarheit bringen, ob diese Veränderungen statistisch signifikant sind.

Da IL-6 und IL-12 insbesondere bei der Polarisation naiver T-Zellen eine wichtige Rolle spielen, wurde zusätzlich überprüft, ob die auf mRNA Ebene beobachteten Unterschiede auch auf Proteinebene nachzuweisen sind. Daher wurde die Konzentration von IL-6 und IL-12 (IL-12p70) sowie von IL-12p40, einer IL-12 Untereinheit, mittels ELISA in den Überständen der WT und gp130^{LLAA} Kulturen vor und nach der Behandlung mit LPS oder Ctx bestimmt. In Korrelation mit den mRNA Daten war in den Überständen der LPS-behandelten gp130^{LLAA} Kulturen verglichen mit den WT Kontrollen eine erhöhte IL-12p70 Konzentration nachzuweisen (Abb. 12D), die jedoch nicht auf eine erhöhte Sekretion von IL-12p40 zurückzuführen war (Abb. 12F). Daher ist anzunehmen, dass der erhöhte IL-12 Spiegel vielmehr auf einer verstärkten IL-12p35 Expression beruht, da IL-12p40 und IL-12p35 zusammen funktionelles IL-12 (IL-12p70) bilden. Dies würde wiederum mit den mRNA Daten übereinstimmen, die zeigen, dass die *Il12a* mRNA Expression, nicht aber die *Il12b* mRNA Expression, in gp130^{LLAA} Kulturen erhöht war. Ein ähnlicher Befund war auch für Ctx-behandelte gp130^{LLAA} KM-DZ nachzuweisen, da hier ebenso eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-12p70, nicht aber von IL-12p40 in den Überständen nachzuweisen war. Auch hier ist der Anstieg vermutlich auf eine Zunahme der

¹³ Proteinname: IL-12p35

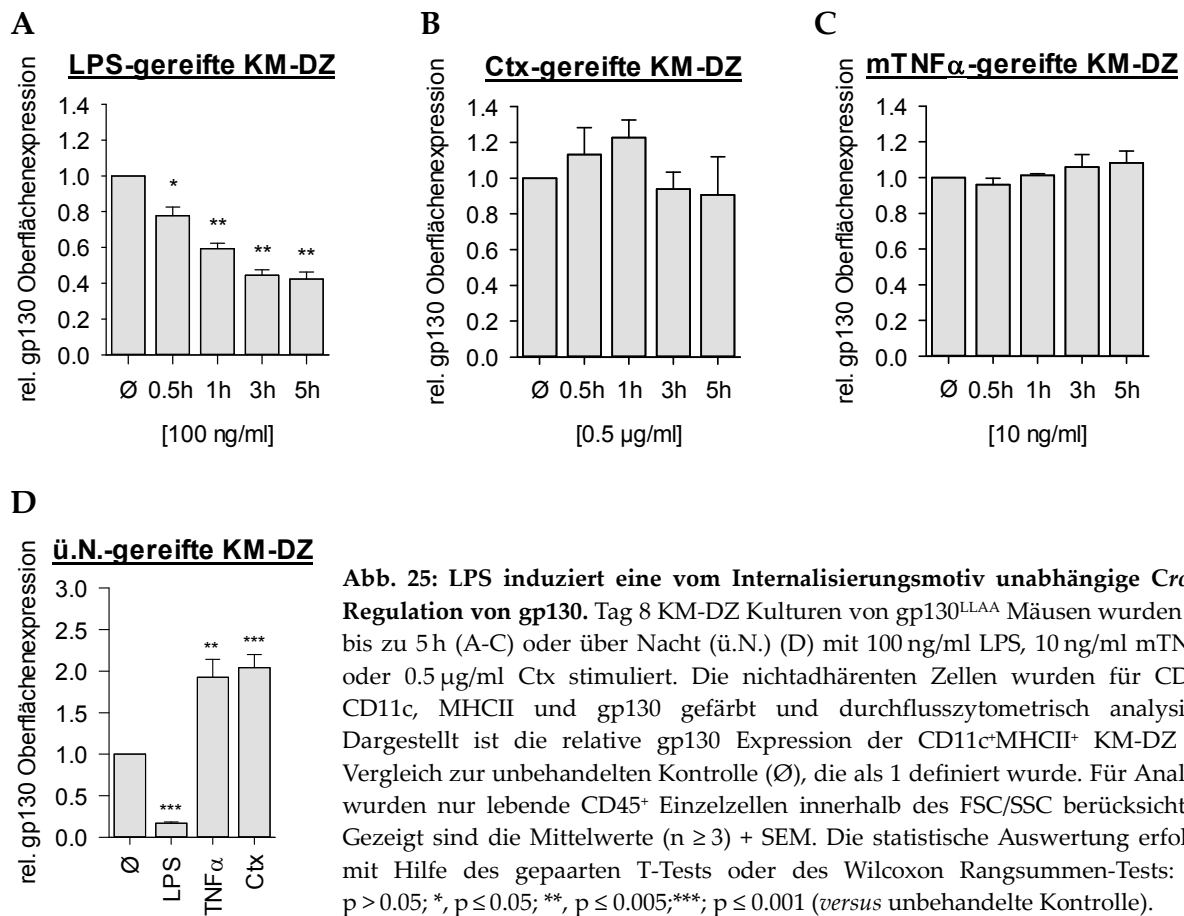
¹⁴ Proteinname: IL-12p40

IL-12p35 Konzentration zurückzuführen, wie bereits die mRNA Daten vermuten ließen. Die Analyse der IL-6 Konzentrationen zeigte, dass weder in den Überständen der LPS- noch der Ctx-behandelten Kulturen ein Unterschied zwischen WT und gp130^{LLAA} nachzuweisen war.

4.2.5 Gp130^{LLAA} KM-DZ sind vor der gp130 Cross-Regulation durch TNF α und Ctx geschützt

Vorangegangene Analysen ließen den Schluss zu, dass die TNF α - und Ctx-vermittelte Regulation von gp130 auf KM-DZ über einen p38-abhängigen Mechanismus erfolgt, ähnlich der in Hepatozyten beschriebenen *Crosstalk*-vermittelten Endozytose des Rezeptors [52]. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob gp130^{LLAA} KM-DZ vor einer solchen Cross-Regulation geschützt waren. Darüber hinaus wurde der Einfluss von LPS auf die gp130 Expression der KM-DZ von gp130^{LLAA} Mäusen genauer untersucht. KM-DZ Kulturen von gp130^{LLAA} Mäusen wurden hierfür in gleicher Art und Weise wie die Kulturen von WT Mäusen stimuliert (vgl. 4.1.4) und für die Expression von gp130 auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ durchflusszytometrisch analysiert. Die Analyse der gp130 Expression zeigt, dass TNF α - und Ctx-gereifte CD11c⁺MHCII⁺ gp130^{LLAA} KM-DZ zu frühen Zeitpunkten (1 h bis 5 h) eine zur unbehandelten Kontrolle vergleichbare Expression von gp130 aufwiesen (Abb. 25A+B). Die Behandlung über Nacht hingegen verstärkte sogar die gp130 Expression auf diesen Zellen (Abb. 25D). Da gp130^{LLAA}Mäuse aufgrund der Punktmutation des Internalisierungsmotivs sehr wahrscheinlich vor der Liganden- bzw. *crosstalk*-vermittelten Endozytose von gp130 geschützt sind [51, 53, 147], bestätigten diese Befunde, dass der auf WT KM-DZ beobachtete Effekt der TNF α - und Ctx-vermittelten gp130 Regulation auf der Endozytose des Rezeptors beruht. Darüber hinaus bestätigen diese Ergebnisse ebenso frühere Beobachtungen (Abb. 14A), wonach eine länger anhaltende Behandlung mit Ctx zu einer verstärkten gp130 Oberflächenexpression auf KM-DZ führt.

Überraschenderweise induzierte die Behandlung mit LPS auch auf den gp130^{LLAA} KM-DZ eine signifikante Verminderung der gp130 Expression (1 – 5 h, Abb. 25C), die sich auch nach längerer Behandlung noch manifestierte (16 h, Abb. 25D). Dieser Befund bekräftigt somit die Annahme, dass LPS einen anderen Mechanismus (als TNF α oder Ctx) bedient, um gp130 auf KM-DZ zu regulieren.



4.2.6 LPS vermittelt eine Clathrin-abhängige gp130 Cross-Regulation in KM-DZ

Die Ergebnisse der vorhergehenden Untersuchungen warfen die Frage auf, durch welchen Mechanismus LPS die gp130 Expression auf DZ reguliert. Zur Klärung dieser Frage, wurden KM-DZ Kulturen mit verschiedenen Inhibitoren inkubiert, die entweder die Aktivierung bekannter LPS-induzierter Signalwege oder aber die Internalisierung des TLR4 oder die Clathrin- bzw. Caveolae/Raft-vermittelte Endozytose inhibierte. Als Kontrolle dienten mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelte KM-DZ Kulturen. Die Analyse der Funktionalität der Inhibitoren erfolgte, sofern es möglich war, anhand der Untersuchung entsprechender Signalproteine mittels Western Blot. Wie Abb. 26 eindeutig zu entnehmen ist, hatte weder die Inhibierung der MAPK ERK1/2 durch Mek1/2-Inhibitor (Abb. 26A) noch die Hemmung von NFκB durch IKK-16 (Abb. 26B) oder Akt durch Ly294002 (Abb. 26C) einen Einfluss auf die LPS-vermittelte Cross-Regulation von gp130. Folglich konnte ausgeschlossen werden, dass die Verminderung der gp130

Oberflächenexpression über einen der bisher beschriebenen LPS-vermittelten Signalwege reguliert wird.

Die Internalisierung des TLR4 in DZ ist von der Aktivierung von Syk/PLC γ 2 abhängig und wird durch die Bindung von LPS an CD14 induziert [235]. Um auszuschließen, dass die Regulation von gp130 in direktem Zusammenhang mit der Internalisierung des TLR4 steht, wurde Syk mit Hilfe des Inhibitors R406 inhibiert. Zur Bestätigung der Funktionalität des Inhibitors wurde die LPS-vermittelte IRF3 Phosphorylierung untersucht, da die Aktivierung von IRF3 über den TRAM/TRIF-abhängigen Signalweg erfolgt, der erst nach Internalisierung des TLR4 Rezeptorkomplexes induziert wird [236, 237]. Wie Abb. 26D zeigt, verhinderte die Behandlung mit R406 die LPS-vermittelte Phosphorylierung von IRF3 in KM-DZ, inhibierte aber nicht die gp130 Reduktion. Demnach war ebenfalls auszuschließen, dass die Internalisierung des TLR4 mit dem Verlust von gp130 auf KM-DZ im Zusammenhang steht.

Abschließend wurde überprüft, ob die Reduktion der gp130 Expression generell mit der Endozytose des Rezeptors im Zusammenhang steht. Aus diesem Grunde wurden die KM-DZ mit einer hypertonen Glukoselösung, einem pharmakologischen Inhibitor für Dynamin (Dynasore; [238]) oder aber mit einem Inhibitor inkubiert, der die Struktur und Funktion von Caveolae/Raft-Strukturen zerstört (Filipin III). Es ist gezeigt, dass hypertone Lösungen die Bildung Clathrin-umhüllter Vesikel inhibieren [239]. Dynamin gehört zu den GTPasen und ist sowohl bei der Clathrin-abhängigen als auch -unabhängigen Endozytose für die Abschnürung der Vesikel an der Zellmembran verantwortlich [240, 241]. Caveolae beschreiben cholesterinreiche Mikrodomänen (*Lipid Rafts*) auf der Zellmembran, die sich einstülpen können und eine Clathrin-unabhängige (Dynamin-abhängige) Endozytose bedingen. Die Analyse der gp130 Expression ergab, dass die Regulation von gp130 über einen Clathrin-abhängigen Mechanismus erfolgen muss, da sowohl Glucose-behandelte als auch Dynasore-behandelte KM-DZ vor der LPS-vermittelten gp130 Reduktion geschützt waren (Abb. 26F+G). Filipin III-behandelte KM-DZ hingegen zeigten eine zur Kontrollgruppe vergleichbare gp130 Reduktion (Abb. 26E). Ein Beweis dafür, dass die Behandlung mit Dynasore zu einer Inhibierung der Clathrin-abhängigen Endozytose führt, wurde durch die Hemmung der TLR4-Internalisierung erbracht [242]. Wie Abb. 26G eindeutig zeigt, wurde in Dynasore-behandelten KM-DZ Lysaten (gp130^{LLAA}) keine Phosphorylierung von IRF3 nachgewiesen. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse somit daraufhin, dass die LPS-vermittelte Aktivierung dendritischer Zellen zu einer Clathrin-abhängigen Endozytose von gp130 führt.

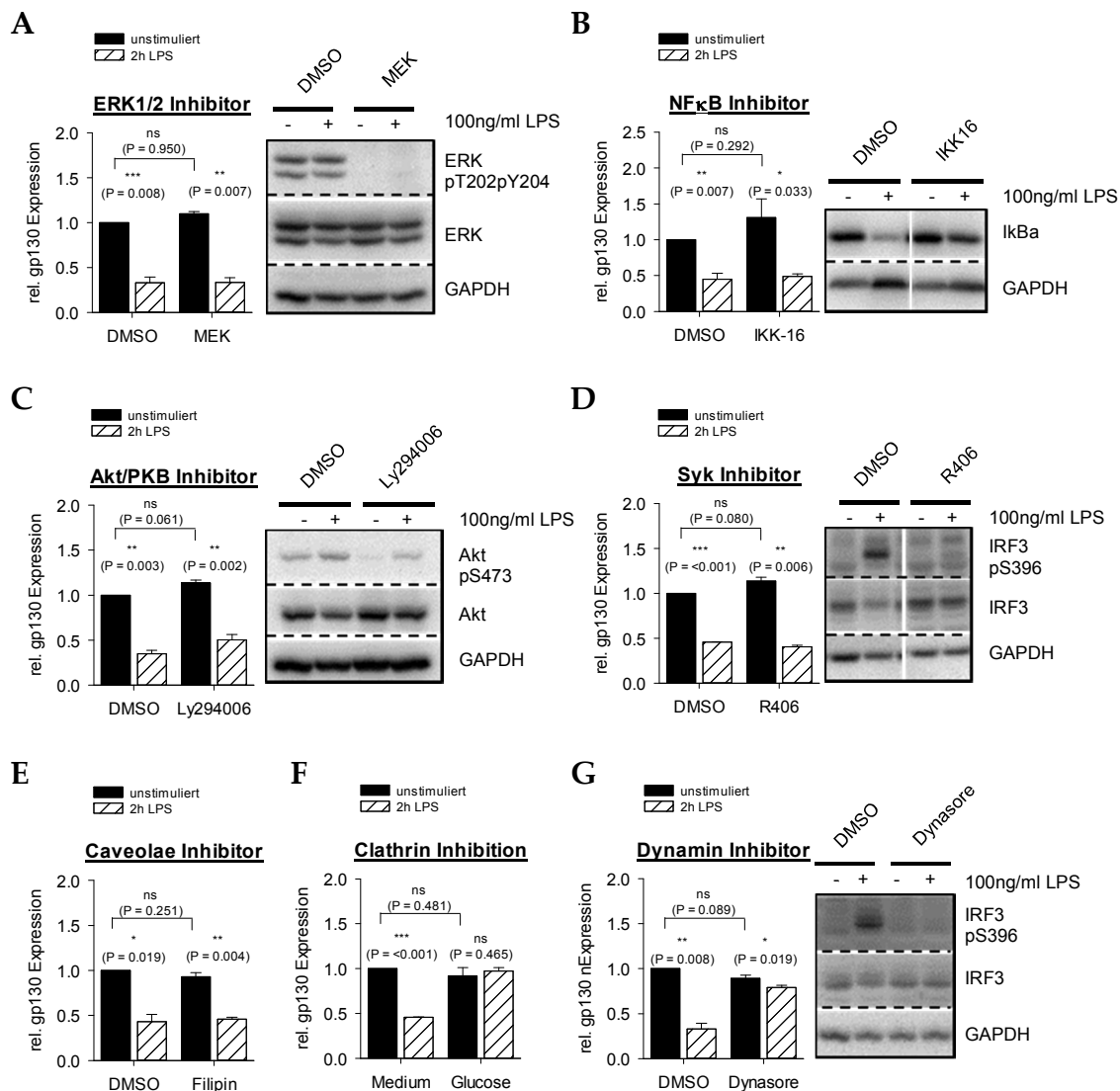


Abb. 26: Die LPS-vermittelte gp130 Cross-Regulation in KM-DZ ist Clathrin-abhängig. Für die Untersuchung des Mechanismus der LPS-induzierten gp130 Cross-Regulation wurden gp130^{LAA} KM-DZ Kulturen für 30 min mit (A) Mek1/2-Inhibitor (5 μ M), (B) IKK-16 (5 μ M), (C) Ly294002 (20 μ M), (D) R406 (10 mM) oder für max. 5 min mit (E) Filipin III (1 μ g/ml), (E) Glucose (0.45 M) oder (G) Dynasore (80 μ M) inkubiert und anschließend für 30 min (Western Blot Analyse) oder 2 h (FACS Analyse) mit 100 ng/ml LPS stimuliert. Für die Untersuchung der gp130 Expression auf CD11c⁺MHCII⁺ Zellen wurden die nichtadhärenten Zellen für CD45, CD11c, MHCII und gp130 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Auswertung wurden nur lebende CD45⁺ Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC berücksichtigt. Dargestellt ist die relative gp130 Expression im Vergleich zur unbehandelten DMSO bzw. Medium Kontrolle, die als 1 definiert wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte + SEM (n \geq 3). Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des gepaarten T-Tests oder des Wilcoxon Rangsummen-Tests: ns, p > 0.05; *, p \leq 0.05; **, p \leq 0.01; ***, p \leq 0.001. Für die Analyse der Funktionalität der getesteten Inhibitoren wurden die Gesamtzelllysate der nichtadhärenten Zellen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Der Nachweis der Phosphorylierung von Threonin-(T₃₃₄) MK2, Threonin-(T₂₀₂)/Tyrosin-(Y₂₀₄) ERK1/2, Serin-(S₄₇₃) Akt und Serin-(S₃₉₆) IRF3 sowie der Degradation von I κ B α erfolgte mit (phospho-)spezifischen Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membranen nach dem *Strippen* mit MK2, ERK1/2, Akt oder IRF3 spezifischen Antikörpern gegengefärbt. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis (n \geq 3).

4.3 Relevanz der gp130 Endozytose für die Differenzierung myeloider und lymphoider Zellen *in vivo*

Sowohl frühere Beobachtungen [177, 218, 219] als auch die im Rahmen dieser Arbeit bisher erhobenen Daten deuten darauf hin, dass die *Cross*-Regulation von gp130 ein physiologisch relevanter Mechanismus ist, der u.a. die Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen beeinflussen kann. Im nächsten Abschnitt wurde daher der Einfluss der gp130 *knockin* Mutation auf die Leukozyten Homöostase unter *steady state*¹⁵ Bedingungen untersucht.

4.3.1 Das Körpergewicht sowie das Gewicht und die Zellularität lymphatischer Organe sind in gp130^{LLAA} und WT Mäusen vergleichbar

Zunächst wurde untersucht, ob sich gp130^{LLAA} Mäuse hinsichtlich ihres Körpergewichts, des Gewichts der Milz sowie der Zellularität lymphatischer Organe von WT Mäusen unterscheiden. Um die beiden Genotypen miteinander vergleichen zu können, wurden für die Untersuchungen Tiere ähnlichen Alters (8 - 12 Wochen) und gleichen Geschlechts (♀) analysiert.

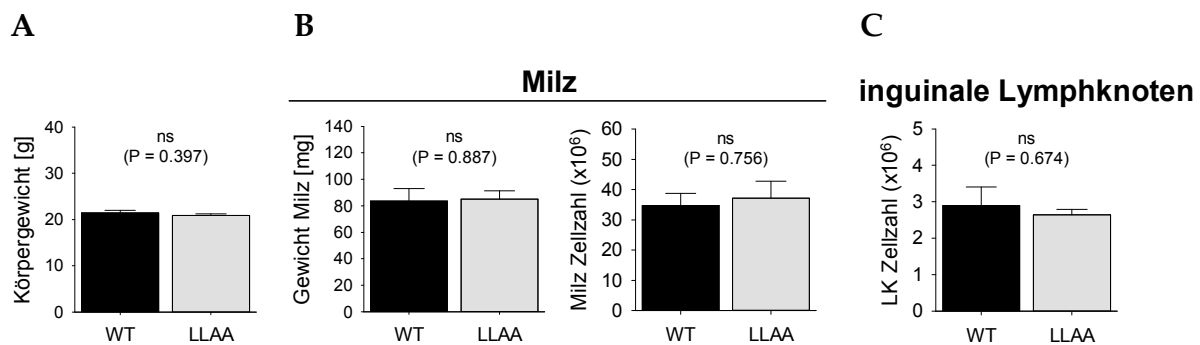


Abb. 27: gp130^{LLAA} Mäuse zeigen keinen Unterschied im Körpergewicht sowie im Gewicht und der Zellularität lymphatischer Organe gegenüber WT Mäusen. Für die Untersuchung wurden WT und gp130^{LLAA} Mäuse hinsichtlich ihres (A) Körpergewichtes, sowie des (B) Gewichtes und der absoluten Zellzahlen der Milz (n ≥ 7) und (C) der inguinalen Lymphknoten (n ≥ 5) verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests bestimmt: ns, p > 0.05.

¹⁵ *Steady state*: Beschreibt den Immunstatus in gesunden Mäusen, die keiner Infektion oder inflammatorischen Stimuli ausgesetzt sind.

Die Analyse ergab, dass $gp130^{LLAA}$ Mäuse ein zu WT Mäusen vergleichbares Gesamtkörpergewicht (Abb. 27A) sowie Milzgewicht aufwiesen (Abb. 27B, linkes Diagramm). Darüber hinaus zeigte die Analyse der Milz (Abb. 27B, rechtes Diagramm) und der inguinalen Lymphknoten (LK^{ing}) (Abb. 27C), dass WT und $gp130^{LLAA}$ Mäuse eine ähnliche Gesamtzellzahl in den lymphatischen Organen aufwiesen.

4.3.2 Leukozyten aus $gp130^{LLAA}$ Mäusen exprimieren mehr $gp130$ an der Oberfläche

Vorhergehende Untersuchungen zeigten, dass die Mutation des Internalisierungsmotivs von $gp130$ eine verstärkte Expression des Rezeptors zur Folge hat (siehe Abschnitt 4.2.1). Auch gab es Hinweise, dass aufgrund der erhöhten $gp130$ Expression die Expression des IL-6R vermindert ist. Nachfolgend wurde überprüft, ob dieser Befund ebenfalls auf Immunzellen der lymphatischen Organe von $gp130^{LLAA}$ Mäusen zutrifft. Hierfür wurde neben der $gp130$ Expression zusätzlich die Expression des IL-6R auf myeloiden (kDZ, pDZ, Makrophagen) und lymphoiden Zellen (T- und B-Zellen) der Milz und der LK^{ing} von WT und $gp130^{LLAA}$ Mäusen untersucht.

Für die Analyse der myeloiden Zellen wurden Zellsuspensionen der Milz und LK^{ing} für die Marker CD11c, B220, CD4 und CD8 sowie für $gp130$ oder IL-6R gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zellen mit einer hohen CD11c Expression, die kein B220 exprimierten, wurden als kDZ definiert ($CD11c^{high}B220^{-}$) [157, 162]. Zellen, die sowohl CD11c als auch B220 exprimierten, wurden als pDZ definiert ($CD11c^{+}B220^{+}$) [164, 165]. Zellen, die nur wenig CD11c und kein B220 exprimierten, wurden als Makrophagen definiert ($CD11c^{low}B220^{-}$) (nicht veröffentlichte Daten M. Lutz und [243]). Die der Analyse zugrunde liegende Auswertungsstrategie ist beispielhaft in Abb. 7A dargestellt. Die Untersuchung der Rezeptorexpression ergab, dass kDZ und Makrophagen von WT Tieren $gp130$ exprimierten, wohingegen auf pDZ nahezu keine Expression des Rezeptors nachgewiesen wurde (Milz: Abb. 28A; LK^{ing} : Abb. 28C). Der IL-6R wurde von kDZ, jedoch nur von einem bestimmten Prozentsatz der pDZ exprimiert, wie an dem in Abb. 28A dargestellten Doppelpack zu erkennen ist (Milz: Abb. 28A; LK^{ing} : bisher nicht untersucht). Auf Makrophagen hingegen war die Expression des IL-6R nur sehr schwach. Der Vergleich mit den $gp130^{LLAA}$ Mäusen macht deutlich (schwarze Linie *versus* gestrichelte Linie), dass die $gp130$ Expression signifikant erhöht, die Expression des IL-6R hingegen auf allen

untersuchten myeloiden Zellpopulationen vergleichbar war. Für einen direkten Vergleich wurden zunächst die korrigierten MFI-Werte der WT Mäuse gemittelt und als 1 definiert. Anschließend wurde der für jeder gp130^{LLAA} Maus ermittelte und auf die Isotypkontrolle korrigierte MFI-Wert ins Verhältnis gesetzt. Wie in Abb. 28B und Abb. 28D zu erkennen ist, war der Anstieg der relativen gp130 Expression auf den kDZ am stärksten, auf den Makrophagen hingegen am schwächsten. Die Analyse der relativen IL-6R Expression macht deutlich, dass kDZ und pDZ von WT und gp130^{LLAA} Mäusen verhältnismäßig gleich viel Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimierten, Makrophagen von WT Mäusen hingegen eine geringfügig höhere Expression des IL-6R zeigten.

Da vorhergehende Daten aus KM-DZ Versuchen auf eine Negativ-Regulation der LIFR Expression im Verlauf der DZ Differenzierung hindeuteten, wurde in einem ersten Versuchsansatz ebenfalls die Expression des LIFR auf den myeloiden Zellen der Milz untersucht. Wie aus Abb. 28 hervorgeht, zeigten pDZ eine stark erhöhte, Makrophagen eine schwache und kDZ (nahezu) keine LIFR Expression. Diese Ergebnisse lassen somit vermuten, dass die LIFR Expression auf verschiedenen DZ Subtypen unterschiedlich reguliert ist. Weitere Versuche müssen jedoch durchgeführt werden, um diese Hypothese zu untermauern.

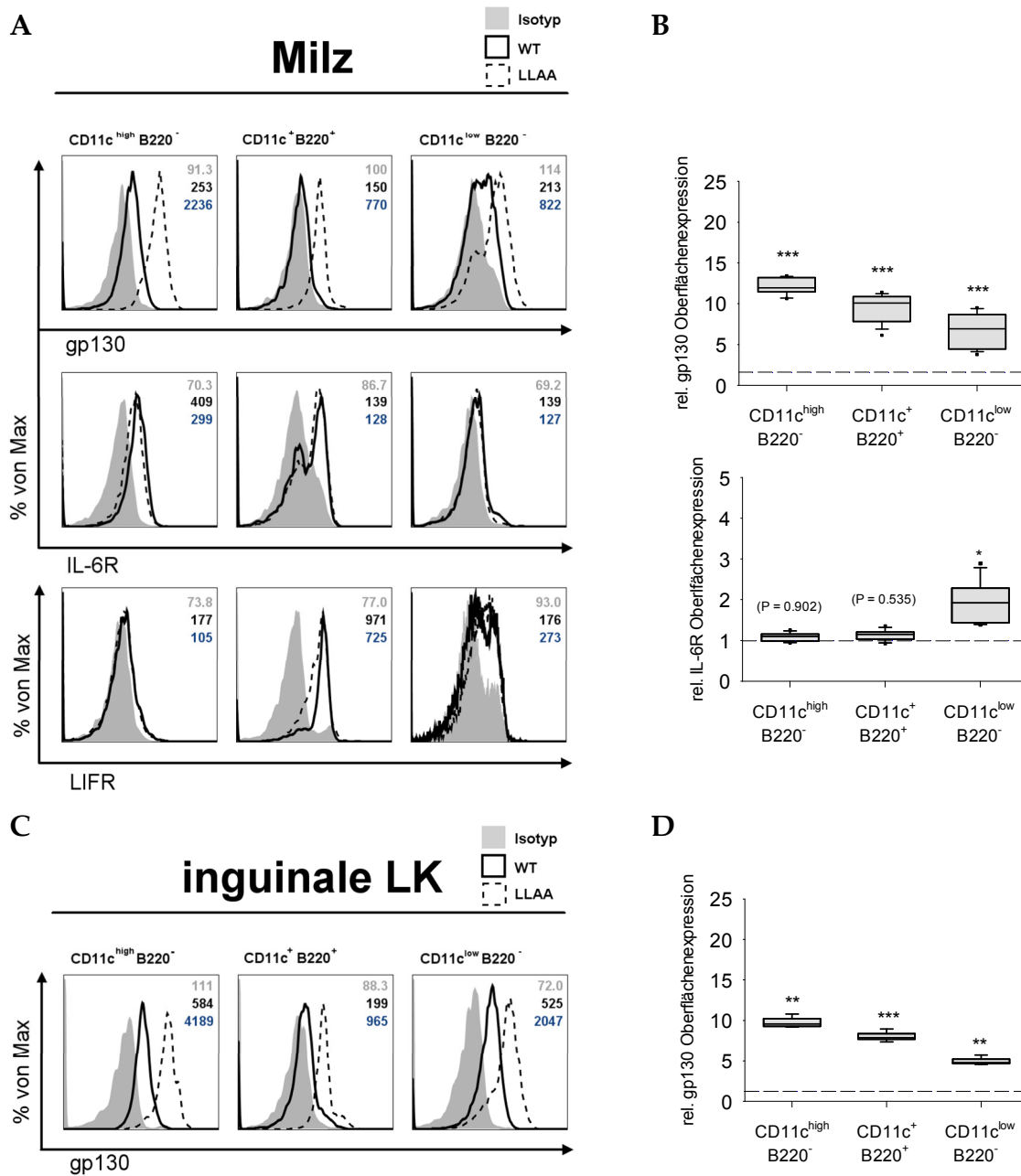


Abb. 28: Myeloide Zellen der peripheren lymphatischen Organe von gp130^{LLAA} Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression. Analyse der gp130, IL-6R und LIFR Expression auf myeloiden Zellen der Milz und inguinalen Lymphknoten nach enzymatischem Verdau. Zellen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen wurden für B220, CD11c und gp130, IL-6R oder LIFR gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A+C) Die Histogramme zeigen die gp130, IL-6R oder LIFR Expression auf kDZ (CD11c^{high} B220⁻), pDZ (CD11c⁺ B220⁺) und MΦ (CD11c^{low} B220⁻) von WT (schwarze Linien) und gp130^{LLAA} Mäusen (gestrichelte Linien) im Vergleich zur Isotypkontrolle (grau gefüllte Histogramm). Die Zahlen innerhalb der Histogramme geben den jeweiligen MFI (*median fluorescence intensity*)-Wert von WT (schwarz), gp130^{LLAA} (blau) und Isotypkontrolle (grau) an. Die für die Analyse verwendete Auswertungsstrategie ist beispielhaft in Abb. 7A dargestellt. (B+D) Die Diagramme zeigen die relative gp130 und IL-6R Expression der einzelnen Zellpopulationen von gp130^{LLAA} Mäusen (n ≥ 5) im Vergleich zu WT Mäusen (n ≥ 6). Die korrigierten MFI Werte der WT Mäuse wurden gemittelt und als 1 definiert (gestrichelte Linie). (Box: 25%-Quantil und 75%-Quantil; Whiskers 10%-Quantil und 90%-Quantil; vertikale Linie: Median; Punkte ober-/unterhalb Whiskers: Ausreißerwerte). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests bestimmt: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass naive B- und T-Zellen sowohl gp130 als auch den IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren [244-246]. Ebenso war bekannt, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ein unterschiedliches Expressionsniveau beider Rezeptoren aufweisen [245, 247]. In Übereinstimmung mit diesen Befunden wurde auf den CD3⁺ T-Zellen von WT Mäusen gp130 und IL-6R nachgewiesen (Milz, Abb. 29A; LK^{ing}, Abb. 29C). Eine genauere Analyse der T-Zellen ergab, dass CD4⁺ T-Zellen weniger gp130 exprimierten als CD8⁺ T-Zellen und umgekehrt CD4⁺ T-Zellen mehr IL-6R exprimierten als CD8⁺ T-Zellen. Entgegen der Erwartung wurde auf CD19⁺ B-Zellen nur ein sehr geringes Expressionsniveau beider Rezeptoren nachgewiesen. Der direkte Vergleich von WT und gp130^{LLAA} Mäusen macht deutlich (schwarze Linie *vs* gestrichelte Linie; Abb. 29A+C), dass gp130 ebenfalls deutlich stärker auf den Lymphozyten der gp130^{LLAA} Mäuse exprimiert wurde. Die Expression des IL-6R war auf den T-Zellen der gp130^{LLAA} Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen geringfügig reduziert. Die Analyse der relativen gp130 Expression legte dar, dass T-Zellen von gp130^{LLAA} Mäusen eine 4-fach höhere gp130 Expression aufwiesen, wohingegen die Expression auf B-Zellen sogar um das 12-fache gegenüber den WT Kontrollen erhöht war (oberer Boxplot: Milz - Abb. 29B; LK^{ing} - Abb. 29D). Im Unterschied dazu war die relative IL-6R Expression auf den T-Zellen der gp130^{LLAA} Tiere signifikant reduziert, die Expression auf den B-Zellen jedoch unverändert (unterer Boxplot: Milz - Abb. 29B; LK^{ing} - Abb. 29D).

Diese Befunde zeigen, dass die Mutation des Internalisierungsmotivs generell zu einem Anstieg der gp130 Expression auf Immunzellen der peripheren lymphatischen Organe führt. Außerdem kann festgestellt werden, dass Makrophagen von gp130^{LLAA} Tieren eine erhöhte, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hingegen eine verminderte IL-6R Expression zeigen.

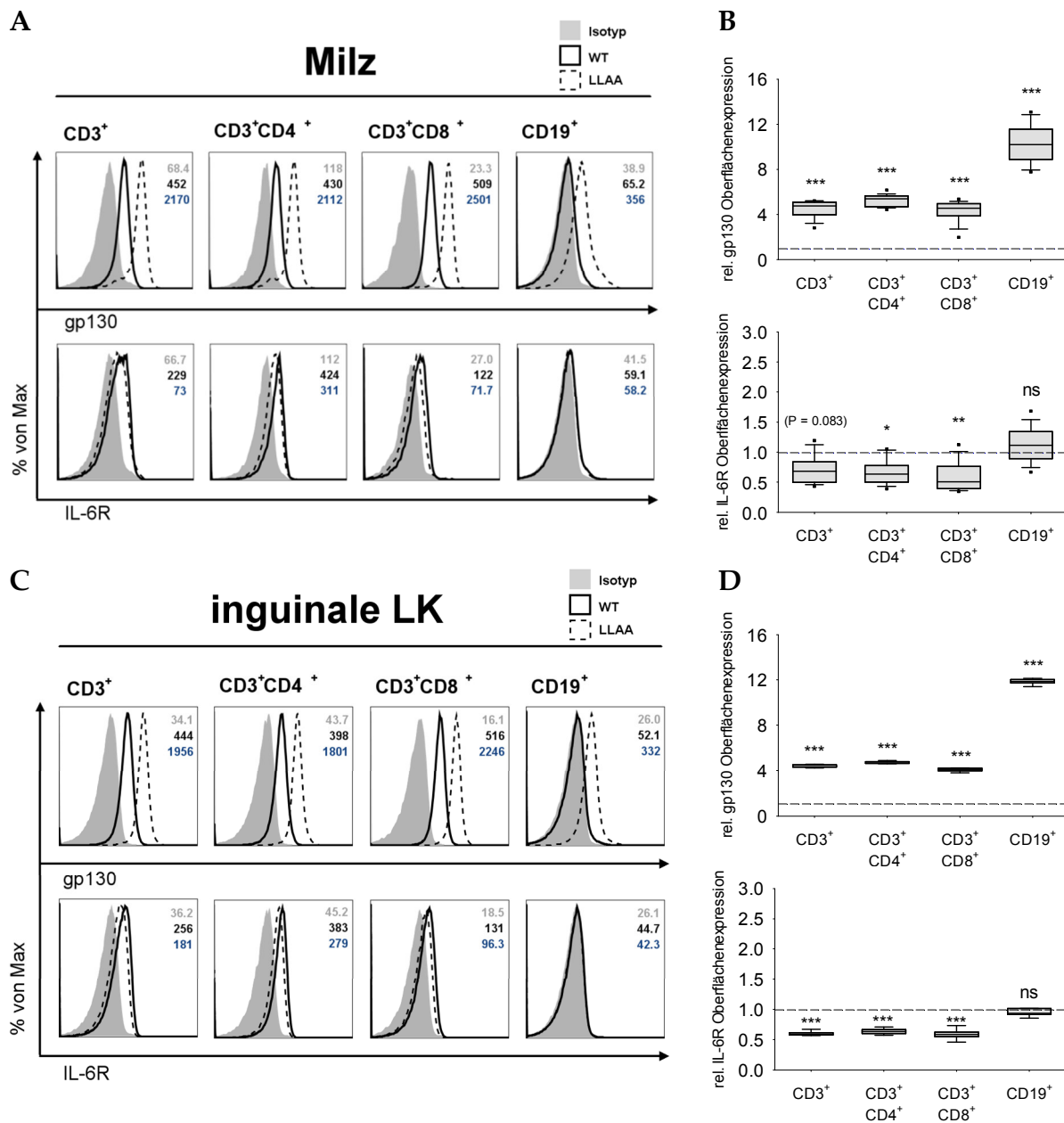


Abb. 29: Lymphozyten der peripheren lymphatischen Organe von gp130^{LLAA} Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression. Analyse der gp130 und IL-6R Expression auf lymphoiden Zellen der Milz und inguinalen Lymphknoten nach enzymatischem Verdau. Zellen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen wurden für CD19, CD3, CD4, CD8 und gp130 oder IL-6R gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (A+C) Die Histogramme zeigen die gp130 und IL-6R Expression auf B-Zellen (CD19⁺) und T-Zellen (CD3⁺) sowie auf CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen von WT (schwarze Linien) und gp130^{LLAA} Mäusen (gestrichelte Linien) im Vergleich zur Isotypkontrolle (graue gefüllte Histogramme). Die Zahlen innerhalb der Histogramme geben den jeweiligen MFI (*median fluorescence intensity*)-Wert von WT (schwarz), gp130^{LLAA} (blau) und Isotypkontrolle (grau) an. Die für die Analyse verwendete Auswertungsstrategie ist beispielhaft in Abb. 7B dargestellt. (B+D) Die Diagramme zeigen die relative gp130 und IL-6R Expression der einzelnen Zellpopulationen von gp130^{LLAA} Mäusen (n ≥ 5) im Vergleich zu WT Mäusen (n ≥ 6). Die korrigierten MFI (*median fluorescence intensity*)-Werte der WT Mäuse wurden gemittelt und als 1 definiert (gestrichelte Linie). (Box: 25%-Quantil und 75%-Quantil; Whiskers 10%-Quantil und 90%-Quantil; vertikale Linie: Median; Punkte ober-/unterhalb Whiskers: Ausreißerwerte). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests bestimmt: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

4.3.3 gp130^{LLAA} haben eine erhöhte Frequenz an pDZ und Makrophagen in den inguinalen Lymphknoten

Da in vorangegangenen Analysen gezeigt wurde, dass die Differenzierung der KM-DZ von gp130^{LLAA} Mäusen verlangsamt ist (4.2.3), sollte überprüft werden, ob die Homöostase der DZ in gp130^{LLAA} Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen beeinflusst ist. Neben der Untersuchung der kDZ und pDZ in den peripheren lymphatischen Organen, wurde auch der Anteil der Makrophagen genauer untersucht, da beschrieben ist, dass IL-6 die Monozyten/Makrophagen Differenzierung begünstigt [177, 178, 180].

Wie in Abb. 30A zu erkennen ist, war die Frequenz der CD11c^{high}B220⁻ Zellen (kDZ, blaue Umrandung), CD11c⁺B220⁺ Zellen (pDZ, rote Umrandung) und CD11c^{low}B220⁻ Zellen (Makrophagen, schwarze Umrandung) in der Milz von gp130^{LLAA} Mäusen leicht verringert, jedoch nicht signifikant verändert im Vergleich zu den WT Mäusen. Im Unterschied dazu war in den LK^{ing} der gp130^{LLAA} Mäuse die Frequenz der pDZ und Makrophagen, nicht aber der kDZ, signifikant erhöht. Vergleichbare Ergebnisse waren auch für die Gesamtzellzahlen zu beobachten. Während die Zellzahl der kDZ in der Milz der gp130^{LLAA} Mäuse leicht verringert war, war die Anzahl der pDZ und Makrophagen der LK^{ing} geringfügig erhöht im Vergleich zu den WT Mäusen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Inhibierung der gp130 Internalisierung eine leicht hemmende Wirkung auf die Differenzierung der kDZ hat, sich jedoch förderlich auf die Differenzierung der pDZ und Makrophagen auswirkt.

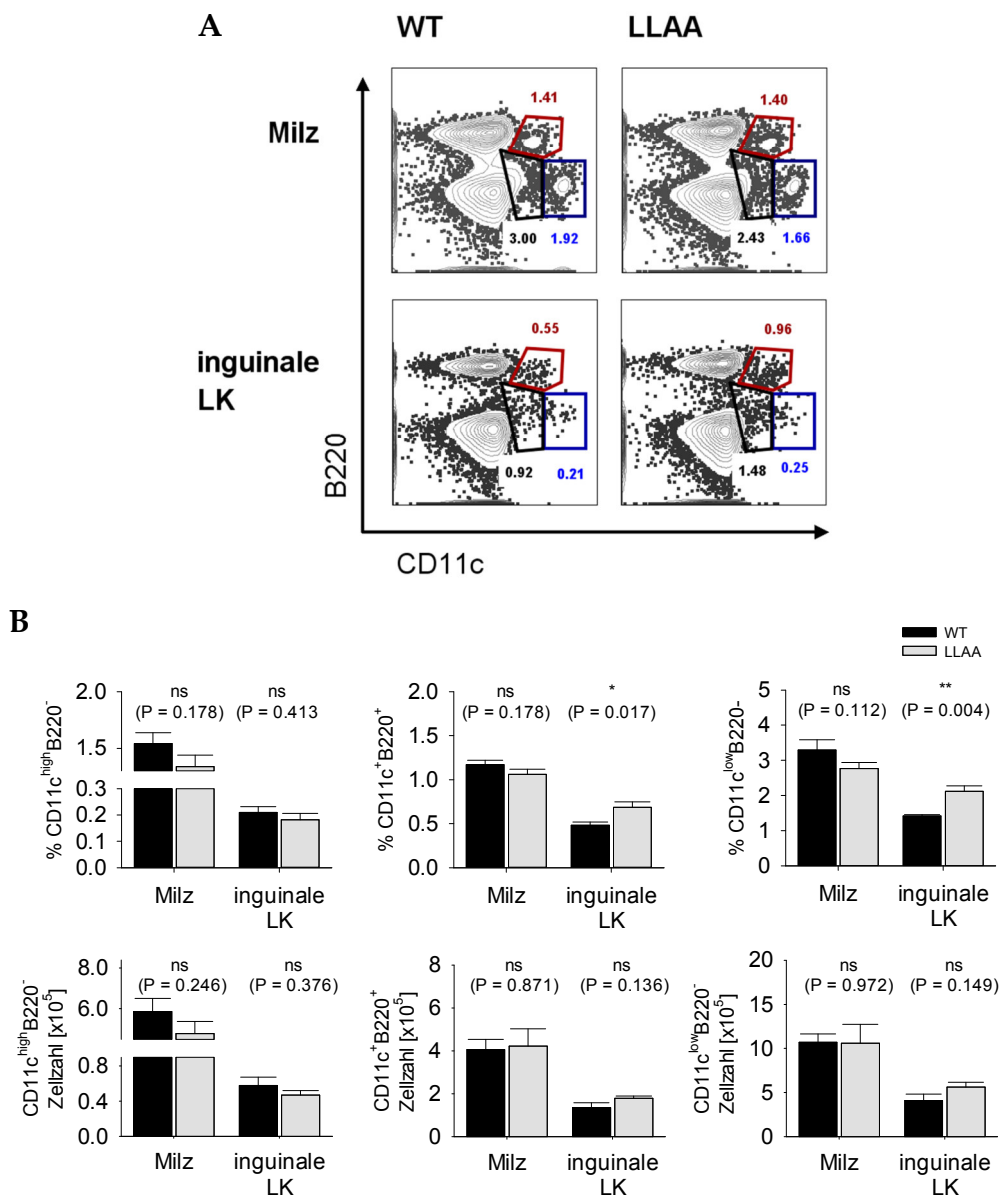


Abb. 30: Gp130^{LLAA} Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der kDZ, pDZ und MΦ in den lymphatischen Organen im Vergleich zu WT Mäusen. Für die Untersuchung der kDZ, pDZ und MΦ in der Milz und den inguinalen Lymphknoten wurden Zellsuspensionen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen nach dem enzymatischen Verdau durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD11c und B220 analysiert. (A) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der kDZ (blaue Eingrenzung), pDZ (rote Eingrenzung) und MΦ (schwarze Eingrenzung). (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil bezogen auf die lebenden Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC sowie die absolute Zellzahl der CD11c^{high}B220⁻ (kDZ), CD11c⁺B220⁺ (pDZ) und CD11c^{low}B220⁻ (MΦ) von WT (schwarz) und gp130^{LLAA} Mäusen (grau). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (Milz: n ≥ 6; LK^{ing}: (n ≥ 5). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests bestimmt: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01.

4.3.4 Der Einfluss der gp130^{LLAA} Mutation auf die Homöostase von lymphoiden Zellen der Milz und inguinalen Lymphknoten

IL-6 ist sowohl an dem Überleben, der Expansion und Differenzierung von B-Zellen [60, 68, 189, 248-251] als auch an der Proliferation, dem Überleben und der Polarisation von T-Zellen beteiligt [60, 246, 252-255]. Aus diesem Grund wurde untersucht, welchen Einfluss die Mutation von gp130 auf die Homöostase der T- und B-Zellen von gp130^{LLAA}Mäusen hat. Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass die Frequenz der CD19⁺ B-Zellen in der Milz der gp130^{LLAA} im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant verringert, jedoch der Anteil in den LK^{ing} erhöht, wenn auch nicht signifikant verstärkt, war (Abb. 31A+B). In Übereinstimmung mit diesem Befund wurde ebenso eine Abnahme der absoluten Zellzahl von B-Zellen in der Milz nachgewiesen. Weiterhin wurde ein signifikanter Anstieg der Frequenz sowie der absoluten Zellzahl von CD3⁺ Zellen in der Milz, nicht aber in den LK^{ing}, nachgewiesen (Abb. 31A+B). Eine genauere Betrachtung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zeigte, dass der Anstieg gleichermaßen auf eine Zunahme der CD4⁺ als auch der CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen war (Abb. 31C+D). Eine leichte, wenn auch nicht signifikante, Erhöhung der CD8⁺ T-Zellen war auch in den LK^{ing} zu beobachten.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte gp130 Expression die Expansion der T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen fördert, sowie zu einer geringen Zunahme der B-Zellen in den LK^{ing} und umgekehrt zu einer Abnahme in der Milz führt.

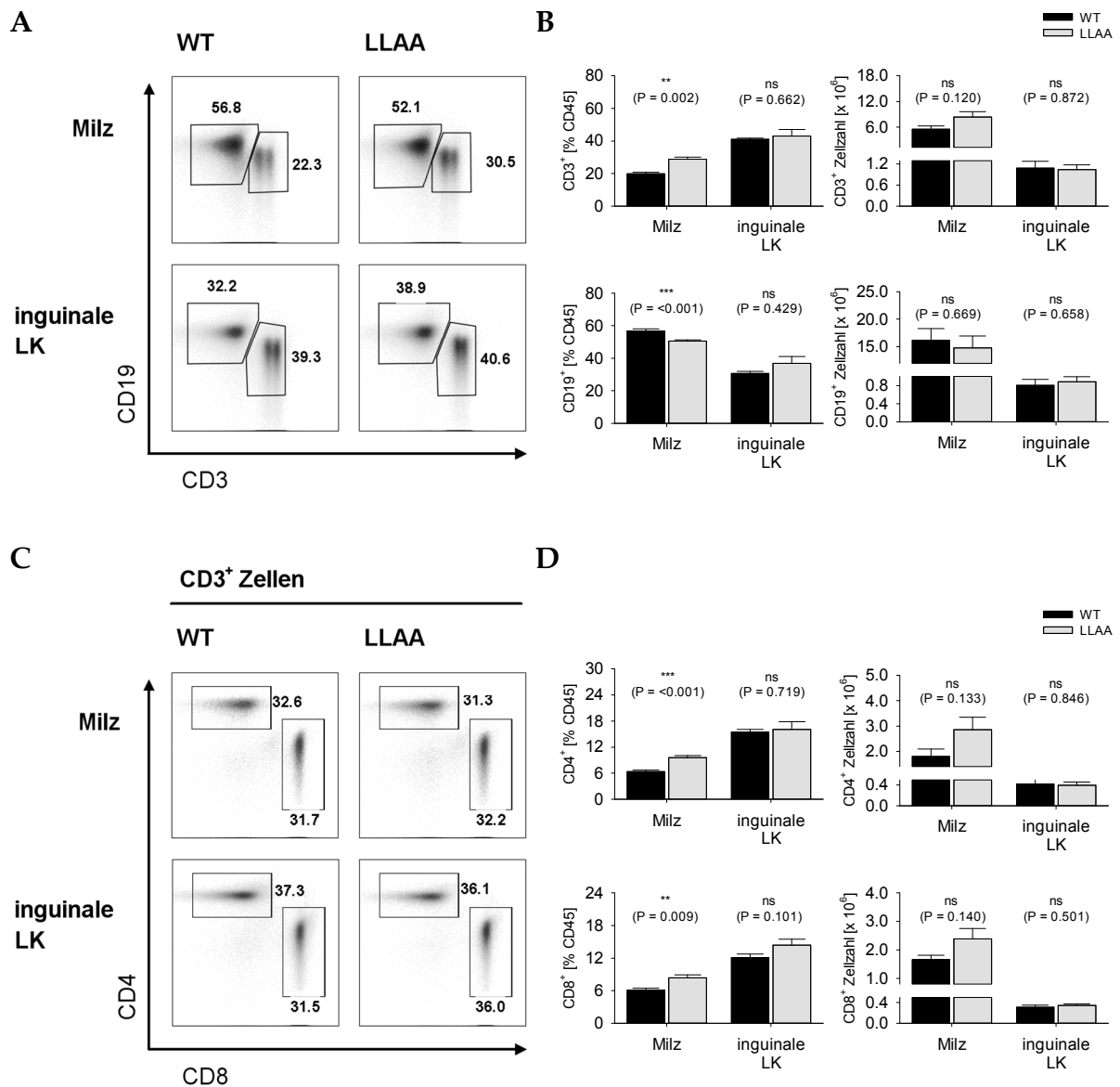


Abb. 31: Gp130^{LLAA} Mäuse zeigen eine erhöhte T-Zell-Frequenz in der Milz im Vergleich zu Kontrollmäusen. Für die Untersuchung der lymphoiden Zellen in der Milz und den inguinalen Lymphknoten wurden Zellsuspensionen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen nach dem enzymatischen Verdau durchflusszytometrisch für die Expression von CD45, CD3, CD4, CD8 und CD19 analysiert. Die Histogramme zeigen eine repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der CD3⁺ (T-Zellen) und CD19⁺ (B-Zellen) (A) sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (C) in der Milz und den inguinalen Lymphknoten. (B+D) Prozentualer Anteil bezogen auf die CD45⁺ Zellen sowie absolute Zellzahlen der T- und B-Zellen sowie CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von WT (schwarz) und gp130^{LLAA} Mäusen (grau). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM (Milz: n ≥ 6; LK^{ins}: n ≥ 5). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests oder Mann-Whitney Tests bestimmt: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001.

4.4 Die Rolle von Oncostatin M beim antiviralen Status von dermalen Fibroblasten

Das Erkennen von Pathogenitätsfaktoren durch *Pattern recognition receptors* (PRR) stellt einen ersten wichtigen Schritt der angeborenen Immunantwort bei der Abwehr von Infektionen dar. Die *retinoic acid-inducible gene* (RIG)-*I-like receptors* (RLRs) gehören zu den im Zytoplasma lokalisierten PRR und spielen insbesondere bei der Erkennung und Bindung einzel- (ss) und doppelsträngiger (ds) viraler RNA eine entscheidende Rolle [256-259]. RIG-I wird konstitutiv in nicht-professionellen Immunzellen wie Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und Epithelzellen [256, 260-264] exprimiert und in Folge einer viralen Infektion oder durch die Behandlung mit Typ I Interferonen¹⁶ (IFN) zusätzlich verstärkt [262, 265]. Auch wurde gezeigt, dass LPS [266] und proinflammatorische Zytokine, wie IFN γ ¹⁷ [264, 267-273], TNF α [262, 264, 274] oder IL-1 β [275], die Expression induzieren können.

Obwohl IL-6-Typ Zytokine selbst keine antivirale Aktivität besitzen [276, 277], haben Studien belegt, dass OSM die Expression verschiedener Interferonzielgene (ISGs, *interferon stimulated genes*) induziert [100, 187]. In Übereinstimmung mit diesem Befund haben gruppeninterne Vorversuche, bei denen die Genexpression von OSM-behandelten humanen dermalen Fibroblasten (HDF) mittels Affymetrix® Gene Chips analysiert wurde, Hinweise darauf geliefert, dass OSM u.a. die Expression der RLRs RIG-I und MDA5 (*melanoma differentiation associated gene 5*) sowie des Transkriptionsfaktors IRF1 (*interferon regulatory factor 1*) in HDF induziert (nicht veröffentlichte Daten H. Hermanns).

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte die Bedeutung von OSM für die Induktion des antiviralen Status in HDF untersucht und der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus genauer beleuchtet werden.

4.4.1 Oncostatin M induziert eine frühe Expression antiviraler Gene in humanen dermalen Fibroblasten

Um die Relevanz von OSM bei der Induktion von ISGs in HDF zu untersuchen, wurden Fibroblasten verschiedener Spender über den Verlauf von 24 Stunden mit OSM stimuliert. Anschließend wurde die RNA isoliert und die Induktion der

¹⁶ hierzu zählen IFN α und IFN β

¹⁷ Typ II IFN

*DDX58*¹⁸, *IFIH1*¹⁹ und *IRF1* mRNA Expression mittels qRT-PCR untersucht. Für die Auswertung der relativen Genexpression wurde die Methode nach Pfaffl [197] angewendet und die Werte der unstimulierten Probe gleich eins gesetzt.

Wie in Abb. 32A zu erkennen ist, führt die Behandlung mit OSM zu einer raschen und statistisch signifikanten Induktion von *IRF1*, *DDX58* und *IFIH1* in HDF (obere Reihe). Auffällig hierbei ist, dass die Induktion von *IRF1* deutlich früher und stärker erfolgt als die Induktion von *DDX58* und *IFIH1*. Bereits nach einstündiger Behandlung mit OSM war eine maximale 20-fach erhöhte *IRF1* Expression nachzuweisen, die jedoch nach zweistündiger Behandlung wieder deutlich abfiel. Im Gegensatz dazu wurde eine um das 6- bis 8-fach erhöhte *DDX58* und *IFIH1* Expression erst nach dreistündiger Behandlung mit OSM nachgewiesen, die im weiteren Verlauf langsam auf das Basalniveau absank.

Vergleichbare Ergebnisse wurden ebenfalls auf Proteinebene nachgewiesen. Hierfür wurden die Gesamtzelllysate der OSM-behandelten HDF zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im Western Blot untersucht. Wie Abb. 32B zeigt, induziert OSM eine frühe bereits nach einer Stunde nachweisbare *IRF1* Proteinexpression und eine um zwei Stunden verzögerte *RIG-I* und *MDA5* Proteinexpression. Während *IRF1* jedoch bereits nach fünf Stunden nicht mehr nachzuweisen war, wurde eine maximale Proteinexpression von *RIG-I* und *MDA5* erst nach fünfstündiger Behandlung mit OSM detektiert.

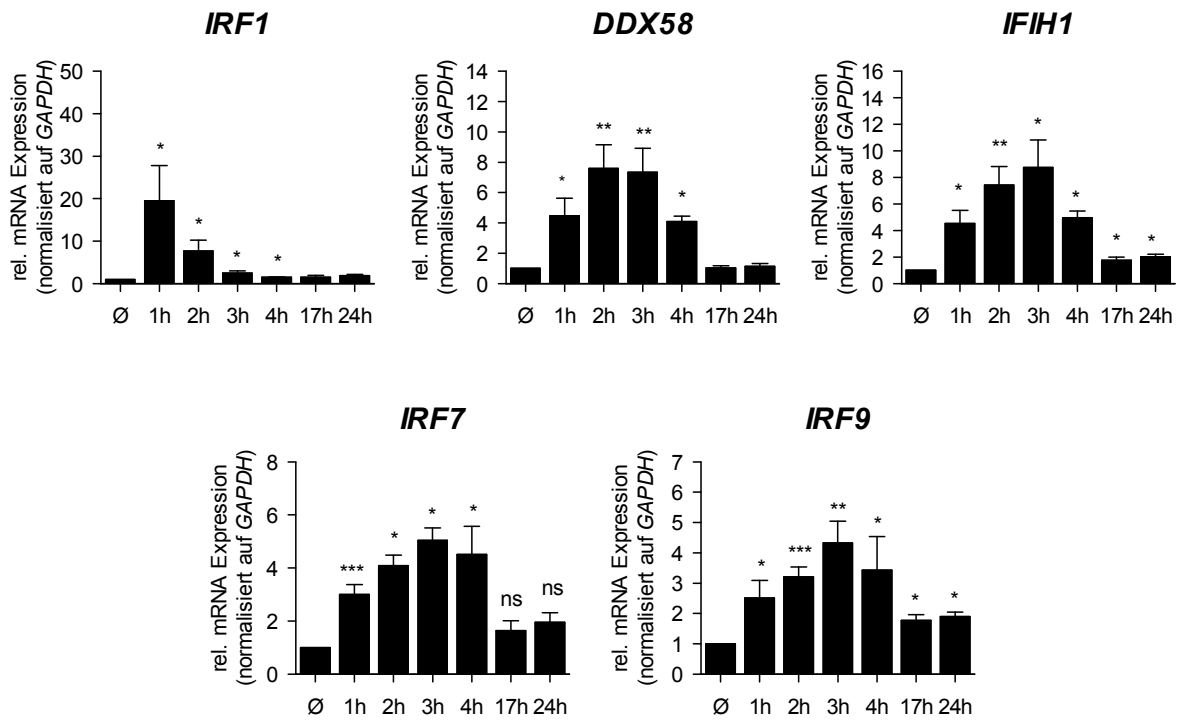
Neben der Induktion von *IRF1* konnte zusätzlich die Expression von zwei weiteren IRF Faktoren – *IRF7* und *IRF9* –, die ebenfalls für die antivirale Immunantwort von Bedeutung sind, belegt werden (Abb. 32A, untere Reihe). Ähnlich der *DDX58* und *IFIH1* Expression, konnte eine maximale *IRF7* und *IRF9* Induktion nach dreistündiger Behandlung mit OSM nachgewiesen werden. Versuche mit Lungen-, Synovial- und Cervix-Fibroblasten lieferten vergleichbare Ergebnisse (eigene nicht gezeigte Daten sowie Dissertation C. Hintzen [278]).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass OSM eine frühe Induktion von ISGs in HDF vermittelt, die durch eine zeitige und starke *IRF1* Antwort und eine darauffolgende *RIG-I*, *MDA5*, *IRF7* und *IRF9* Induktion gekennzeichnet ist.

¹⁸ Genbezeichnung: *RIG-I*

¹⁹ Genbezeichnung: *MDA5*

A



B

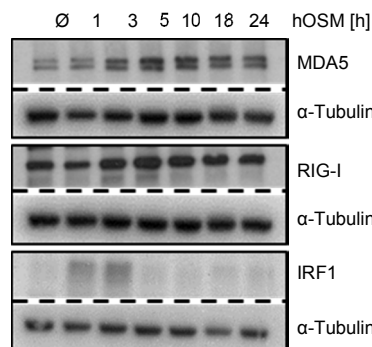


Abb. 32: OSM induziert die Expression von RLR sowie IRF in dermalen Fibroblasten. Humane dermale Fibroblasten wurden für bis zu 24 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der Gen- und Proteinexpression lysiert. (A) Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von *IRF1*, *DDX58*, *IFIH1*, *IRF7* und *IRF9* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative mRNA Expression des Zielgens im Vergleich zur unstimulierten Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 4 – 5) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001 (versus unstimulierte Probe). (B) Für den Nachweis von RIG-I, MDA5 und IRF1 auf Proteinebene wurden die Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion der Proteine erfolgte mit spezifischen Antikörpern. α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

4.4.2 Die Induktion der Helikasen und IRF1 erfolgt über den Typ-II-Rezeptorkomplex

Humane Fibroblasten exprimieren gp130, LIFR und OSMR [279], weshalb sie nicht nur auf OSM reagieren, sondern ebenso auf LIF und das IL-6 *trans*-Signal. Aus Untersuchungen mit humanen Lungenfibroblasten (HLF) war bereits bekannt, dass OSM, nicht aber IL-6 oder LIF, die Expression von RIG-I induzieren (Dissertation C. Hintzen [262]). Um zu überprüfen, ob dieser Befund ebenfalls auf HDF zutrifft, wurden die dermalen Fibroblasten sowohl mit LIF als auch IL-6 in Kombination mit dem löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R) stimuliert. Wie in Abb. 33 zu erkennen ist, führt weder die Behandlung mit LIF noch die mit IL-6/sIL-6R α zu einer nachweisbaren RIG-I oder MDA5 Proteinexpression.

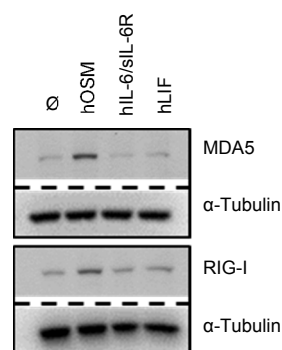


Abb. 33: Die Induktion von RIG-I und MDA5 ist zytokinspezifisch. Humane dermale Fibroblasten wurden mit 20 ng/ml hOSM, 20 ng/ml hIL-6 in Kombination mit 500 ng/ml hsIL-6R oder 10 ng/ml hLIF für 2 h stimuliert und anschließend lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion von RIG-I und MDA5 erfolgte mit spezifischen Antikörpern. α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Humanes OSM signalisiert sowohl über den gp130/LIFR Komplex als auch über den gp130/OSMR Komplex (siehe Abschnitt 1.1). Da die Aktivierung des Typ I Rezeptorkomplexes (gp130/LIFR) durch LIF jedoch keine Induktion der RLRs vermittelte, wurde postuliert, dass die Expression von RIG-I und MDA5 auf die Aktivierung des Typ II Rezeptorkomplexes (gp130/OSMR) zurückzuführen ist. Um dies zu überprüfen, wurde die *LIFR* Expression mittels RNA-Interferenz-Technik inhibiert und die OSM-vermittelte *IRF1*, *DDX58* und *IFIH1* Expression mittels qRT-PCR analysiert. Hierfür wurden HDF transient mit siRNA (*small interfering RNA*) gegen *LIFR* (*siLIFR*) transfiziert und anschließend mit OSM stimuliert. Als Kontrolle für die Effizienz und Spezifität des *knockdown* dienten HDF, die mit einer

nicht-inaktivierenden Kontroll-siRNA (siKtrl) transfiziert bzw. nur mit dem Transfektionsreagenz (NT) inkubiert wurden.

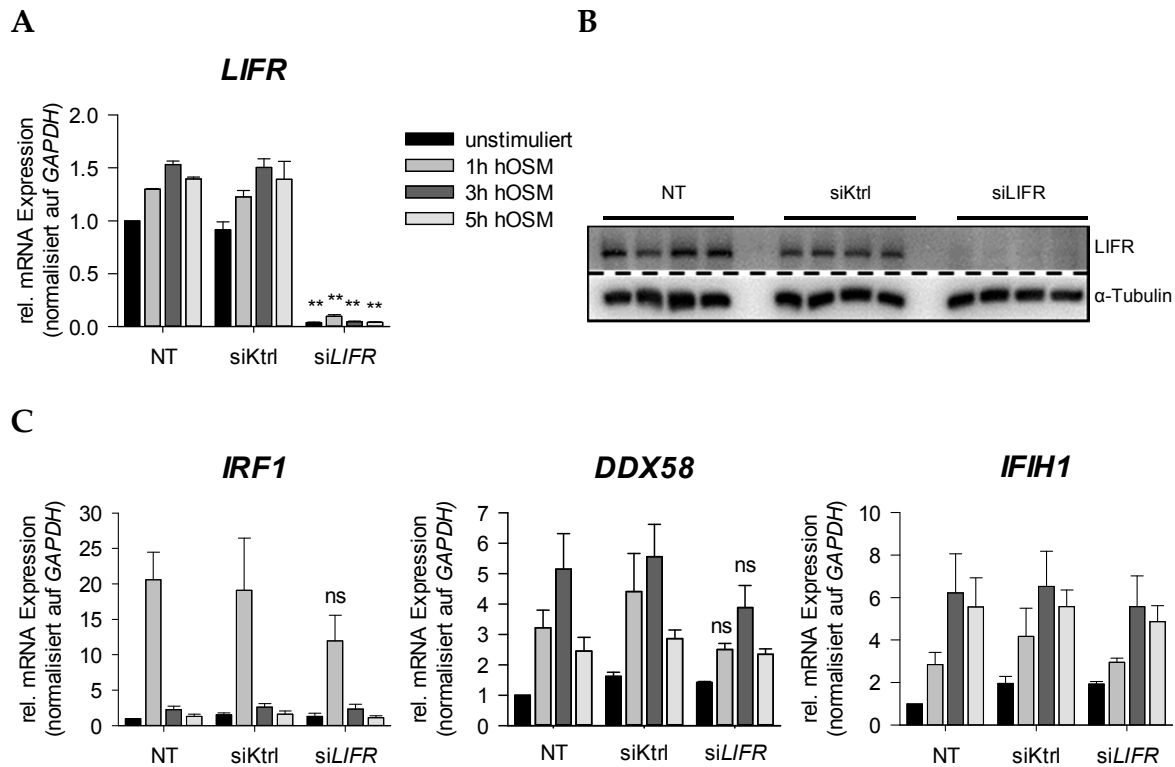


Abb. 34: Das Signal des Typ II Rezeptorkomplexes (gp130/OSMR) reicht aus, um die Expression der RLRs und *IRF1* zu induzieren. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit *LIFR* siRNA (siLIFR) oder Kontroll-siRNA (siKtrl) transfiziert oder nur mit dem Transfektionsreagenz (NT) inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten für bis zu 5 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der Gen- und Proteinexpression lysiert. (A+C) Die aus den Zellen isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von *IRF1*, *DDX58*, *IFIH1* und *LIFR* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; **, p ≤ 0.01 (siKtrl versus siLIFR). (B) Die Gesamtzelllysate wurden zum Nachweis des *LIFR* knockdown mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion des Rezeptors erfolgte mit einem spezifischen Antikörper. α-Tubulin diente als Beladungskontrolle. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Der Vergleich der beiden Kontrollen (NT und siKtrl) mit den siLIFR transfizierten HDF zeigt, dass trotz des Verlusts des LIFR (mRNA: Abb. 34A, Protein: Abb. 34B) die OSM-vermittelte Induktion von *IRF1*, *DDX58* und *IFIH1* nahezu unbeeinflusst ist (Abb. 34C). Die bei einer und zwei Stunden OSM-Stimulation auftretende leichte Reduktion der *IRF1* und *DDX58* mRNA, erwies sich als statistisch nicht signifikant. Dieses Ergebnis zeigt, dass obwohl OSM vergleichbare Affinitäten zum humanen

LIFR und humanen OSMR besitzt, das Signal über den OSMR für die Induktion von *RIG-I*, *MDA5* und *IRF1* in HDF ausreicht.

4.4.3 Die OSM-induzierte Expression der Helikasen und IRF ist STAT1-abhängig

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe legten nahe, dass die OSM-vermittelte RIG-I Expression in HLF auf die Aktivierung des STAT1-Signals, im speziellen auf die Phosphorylierung von Tyrosin (Tyr)701 und Serin (Ser)727 zurückzuführen ist (Dissertation C. Hintzen [262]). Dies sollte in HDF weitergehend charakterisiert werden. Als Kontrolle dienten mit IFN γ -stimulierte HDF, da IFN γ ebenfalls die Expression von RIG-I induziert [264, 267, 269, 270].

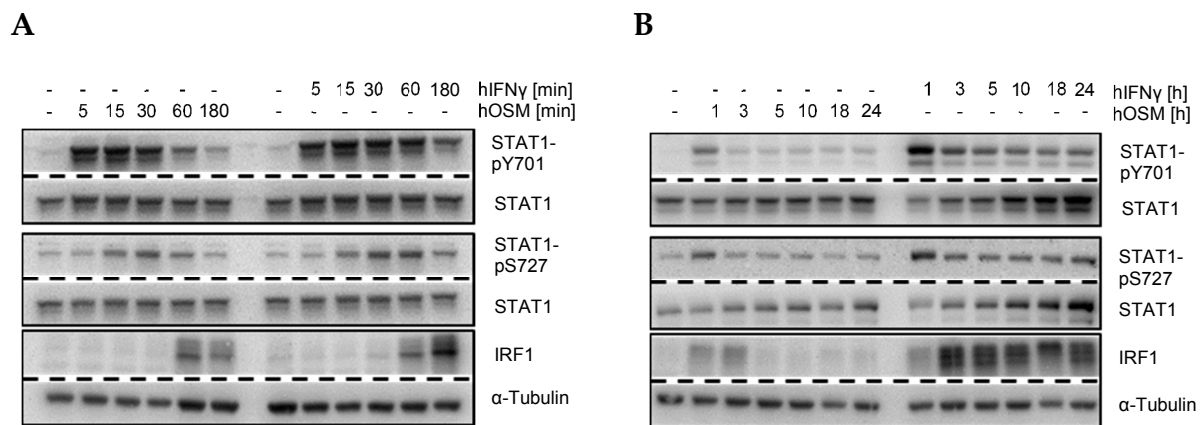


Abb. 35: OSM induziert eine transiente Tyrosin (Y₇₀₁)- und Serin (S₇₂₇)-STAT1 Phosphorylierung. Für die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von STAT1 sowie der IRF1 Proteinexpression wurden humane dermale Fibroblasten für bis zu 3 h (A) bzw. 24 h (B) mit 20 ng/ml hOSM oder 1000 U/ml hIFN γ stimuliert und anschließend lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Der Nachweis von Y₇₀₁- und S₇₂₇-phosphoryliertem STAT1 sowie IRF1 erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern. Für die Detektion der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem *Strippen* mit einem STAT1 spezifischen Antikörper gegengefärbt. α -Tubulin diene als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abb. 35A hervorgeht, führt die Stimulation mit OSM zu einer frühen bereits nach fünf Minuten nachweisbaren STAT1-Tyrosinphosphorylierung, gefolgt von einer zeitlich verzögerten STAT1-Serinphosphorylierung (Abb. 35, 15 min). Während jedoch die OSM-vermittelte Phosphorylierung von STAT1 äußerst transient ist und bereits nach einer Stunde Behandlung wieder deutlich abnimmt, führt die Stimulation mit IFN γ zu einem langanhaltenden STAT1-Signal in HDF (Abb. 35A+B). Zusätzlich zeigt die Analyse der IRF1 Proteinexpression, dass die Behandlung mit

OSM nur eine transiente Induktion von IRF1 vermittelt (Abb. 35A, bis zu 3 h), während $\text{IFN}\gamma$ zu einer langanhaltenden bis zu 24 Stunden nachweisbaren Proteinexpression in HDF führt (Abb. 35B, Blot 5). Das transiente OSM-vermittelte STAT1-Signal korreliert somit mit der ebenfalls nur transient induzierten IRF1 sowie RIG-I und MDA5 Expression in HDF (Abb. 32).

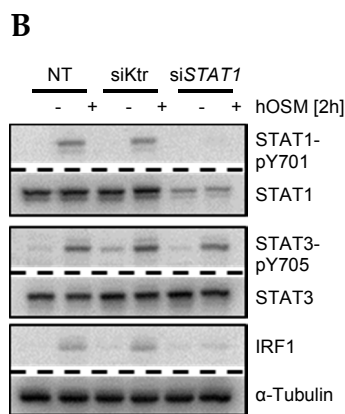
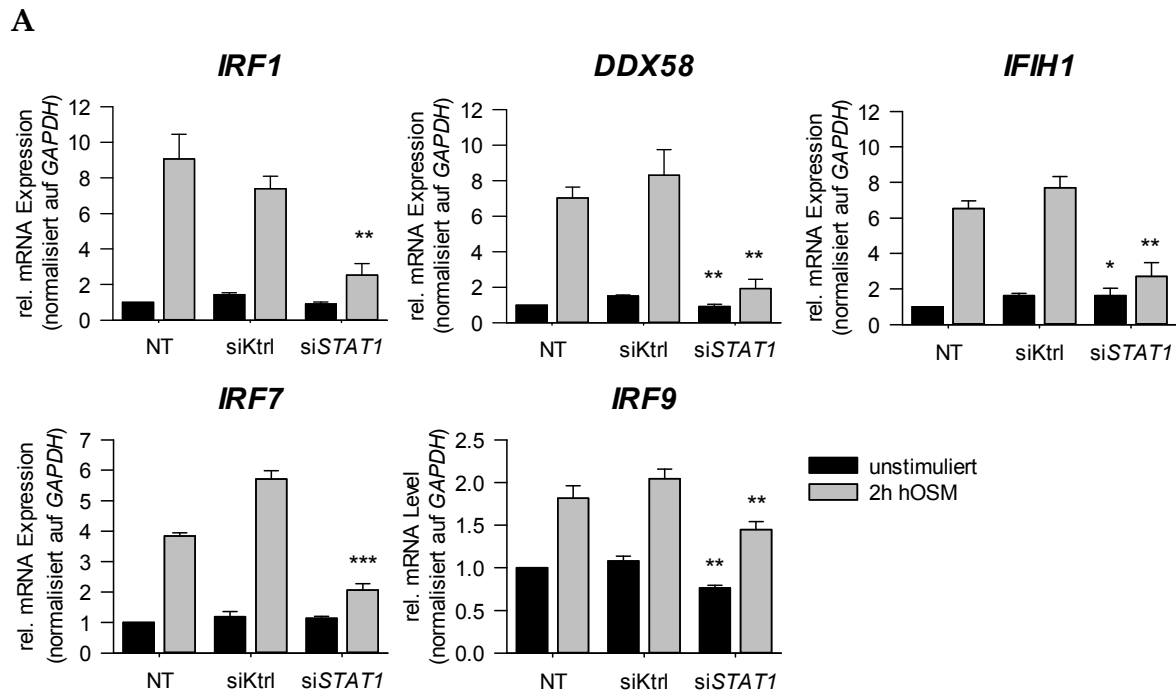


Abb. 36: Die Expression der RLRs und IRFs ist abhängig von der OSM-vermittelten STAT1-Phosphorylierung. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit *STAT1* siRNA (*siSTAT1*) oder siKtrl transfiziert oder nur mit dem Transfektionsreagenz (NT) inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten für 1 h (A) bzw. 2 h (B) Stunden mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der Gen- und Proteinexpression lysiert. (A) Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von *IRF1*, *DDX58*, *IFIH1*, *IRF7* und *IRF9* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten, NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$ (siKtrl versus siSTAT1). (B) Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und für den Nachweis der Y_{701} -STAT1 und Y_{705} -STAT3 Phosphorylierung im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Für die Detektion der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem *Strippen* mit einem STAT1 bzw. STAT3 spezifischen Antikörper gegengefärbt. α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$ (siKtrl versus siSTAT1). (B) Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und für den Nachweis der Y_{701} -STAT1 und Y_{705} -STAT3 Phosphorylierung im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern untersucht. Für die Detektion der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem *Strippen* mit einem STAT1 bzw. STAT3 spezifischen Antikörper gegengefärbt. α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Ein weiterer Beweis dafür, dass die OSM-vermittelte Expression der RLRs und IRF1/7/9 in HDF von der Induktion des STAT1-Signal abhängt, wurde durch die Hemmung der STAT1 Proteinexpression mittels *STAT1* siRNA (*siSTAT1*) erbracht. Wie in Abb. 36A zu erkennen ist, wurde die Expression des STAT1-Proteins durch die transiente Transfektion mit *siSTAT1* signifikant reduziert und die durch OSM-induzierte STAT1-Tyrosinphosphorylierung vollständig gehemmt. Dies führte, wie erwartet, zu einer signifikanten Hemmung der *IRF1*, *DDX58*, *IFIH1*, *IRF7* und *IRF9* mRNA Expression (Abb. 36B) sowie IRF1 Proteinexpression (Abb. 36A, unterer Blot). Da weder die Proteinexpression von STAT3, noch die OSM-induzierte STAT3-Tyrosinphosphorylierung durch die Transfektion mit *siSTAT1* beeinflusst war, muss es sich um einen spezifischen Effekt aufgrund des *knockdown* von STAT1 handeln.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die OSM-vermittelte Induktion der ISGs in HDF von der Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT1 abhängig ist und bestätigen somit frühere Beobachtungen in HLF (Dissertation C. Hintzen [262]).

4.4.4 Der RNA Interferenz-bedingte Verlust von STAT3 führt zu einer Verlängerung der OSM-induzierten STAT1-Phosphorylierung und Expression von ISGs

Es wurde beschrieben, dass embryonale Mausfibroblasten (MEF) von STAT3-defizienten Mäuse eine verstärkte RIG-I und MDA5 Expression nach viraler Infektion zeigen [280], sowie eine IFN γ -ähnliche Zellantwort nach Behandlung mit IL-6/sIL-6R α [281]. *Wang et al.* [280] und *Costa-Pereira et al.* [281] lieferten somit den Beweis, dass STAT3 als Negativregulator der Typ I IFN oder IL-6 Antwort fungiert, da die virale Infektion und/oder Zytokin-vermittelte Aktivierung von STAT3-defizienten MEF zu einer verstärkten sowie verlängerten STAT1-Phosphorylierung und Expression von ISGs führte.

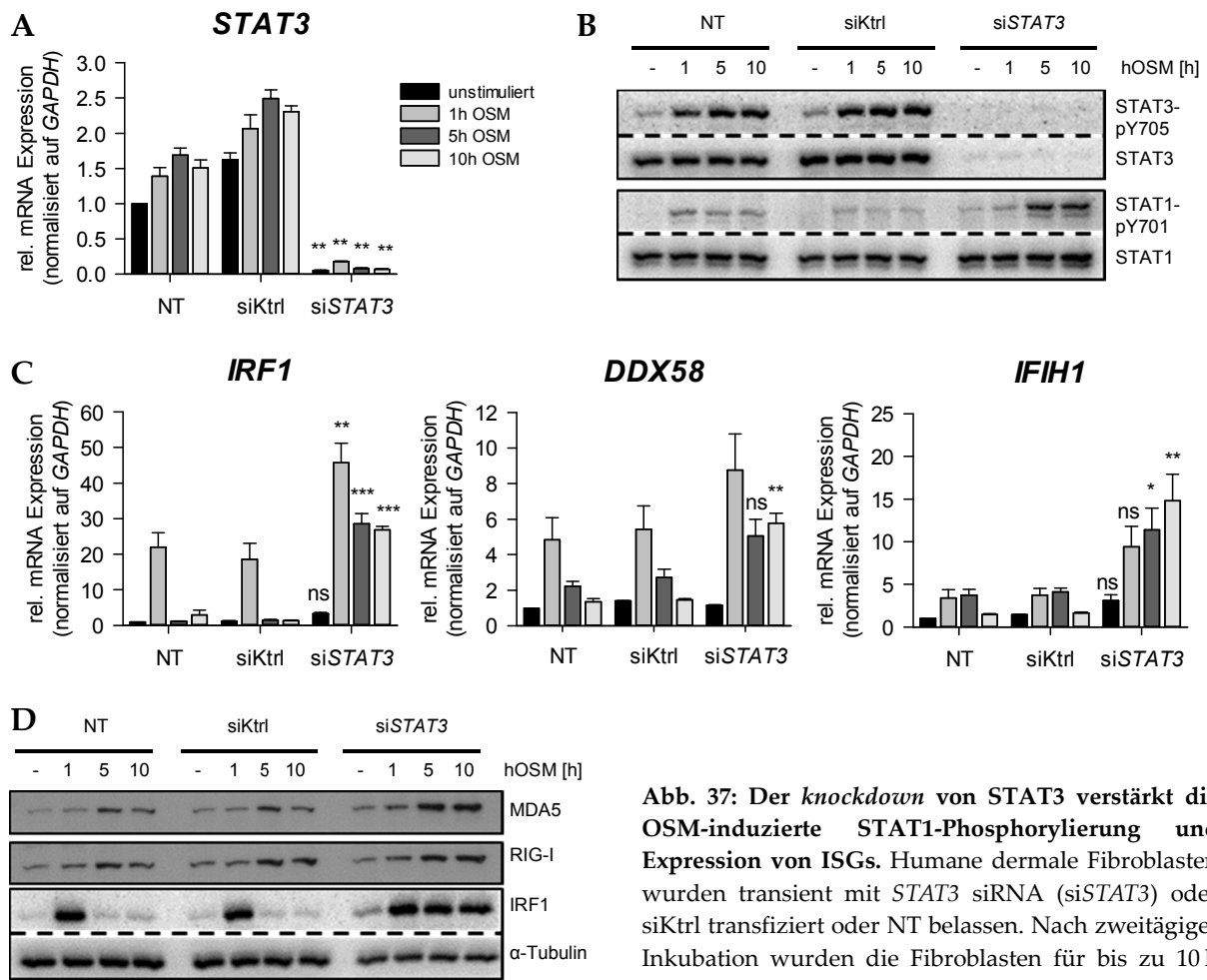


Abb. 37: Der knockdown von STAT3 verstärkt die OSM-induzierte STAT1-Phosphorylierung und Expression von ISGs. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit *STAT3* siRNA (*siSTAT3*) oder siKtrl transfiziert oder NT belassen. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten für bis zu 10 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der

Gen- und Proteinexpression lysiert. Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von (A) *STAT3* sowie (C) *IRF1*, *DDX58* und *IFIH1* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001 (*siKtrl versus siSTAT3*). (B) Für den Nachweis der Y₇₀₁-STAT1 und Y₇₀₅-STAT3 Phosphorylierung sowie (D) der Expression von RIG-I, MDA5 und IRF1 wurden die Gesamzelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem Strippen mit einem STAT1 bzw. STAT3 spezifischen Antikörper gegengefärbt. α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Da OSM eine langanhaltende bis zu 24 Stunden nachweisbare STAT3 Phosphorylierung in HDF vermittelt (eigene nicht dargestellte Ergebnisse sowie [282]), stellte sich die Frage, ob STAT3 als Regulator des OSM-induzierten STAT1-Signals wirkt. Wie in Abb. 37 zu erkennen ist, führte die Transfektion mit *STAT3* siRNA (*siSTAT3*) zu einem nahezu kompletten Verlust der *STAT3* mRNA (Abb. 37A) und des STAT3 Proteins (Abb. 37B, Blot 2), sowie zur vollständigen Inhibierung der OSM-induzierten STAT3-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 37B, Blot 1). Entgegen der Beobachtung, dass der Verlust von STAT1 keinen Einfluss auf das STAT3-Signal in

HDF hat (Abb. 36), führte der *knockdown* von STAT3 zu einer signifikant verstärkten STAT1-Tyrosinphosphorylierung nach 5- und 10-stündiger Stimulation mit OSM (Abb. 37B, Blot 3). Darüber hinaus wurde eine Zunahme des STAT1 Gesamtproteins in siSTAT3 behandelten HDF, nicht aber in den Kontrollen (NT und siKtrl), beobachtet (Abb. 37B, Blot 4, Vergleich Spur 4, 8 und 12). Wie erwartet, führte die gesteigerte STAT1-Phosphorylierung in den siSTAT3 transfizierten HDF ebenso zu einer signifikant verstärkten und in seiner Dauer verlängerten IRF1, RIG-I und MDA5 mRNA- (Abb. 37C) und Proteinexpression (Abb. 37D). Auch die Expression der ebenfalls durch OSM induzierten Transkriptionsfaktoren IRF7 und IRF9 nahm in den siSTAT3 behandelten HDF geringfügig zu (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund zeigt, dass STAT3 direkt oder indirekt die OSM-induzierte STAT1-abhängige Expression von RIG-I, MDA5 und IRF1/7/9 supprimiert.

4.4.5 SOCS3 – Hauptregulator des OSM-induzierten STAT-Signals

Die STAT-abhängige Induktion von Mitgliedern der SOCS Familie ist ein grundlegender Mechanismus, um die chronische Aktivierung von Signaltransduktionswegen zu unterbinden (siehe Abschnitt 1.3.1.). Eine Reihe von Untersuchungen zeigte, dass SOCS3 als direktes STAT3 Zielgen eine wichtige Rolle bei der Limitierung der IL-6-Typ Zytokin Antwort spielt [283-285].

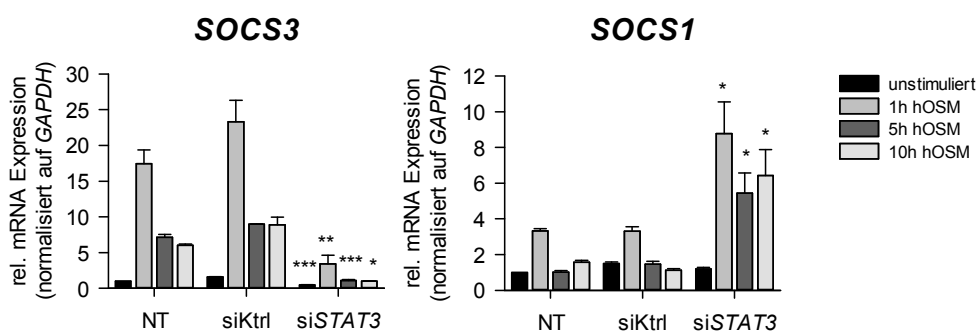
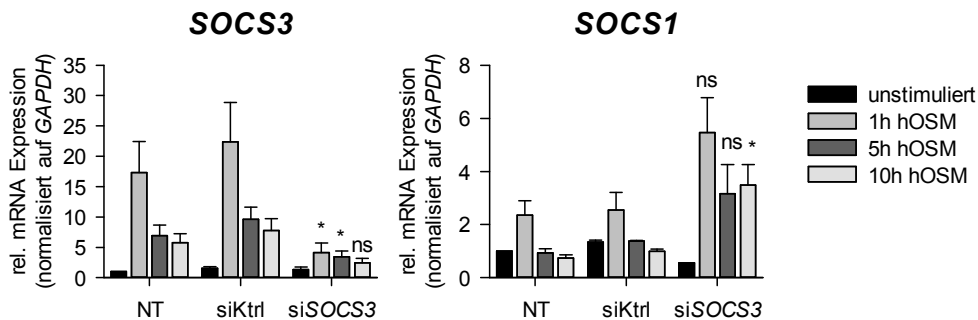


Abb. 38: OSM induziert eine STAT3-abhängige SOCS3 und eine STAT1-abhängige SOCS1 Expression. Analyse der SOCS3 und SOCS1 Expression in siSTAT3, siKtrl und NT transfizierten HDF mittels qRT-PCR (siehe auch Abb. 37). Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen GAPDH. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001 (siKtrl versus siSTAT3).

Wie Abb. 38 zu entnehmen ist, wurde die OSM-vermittelte *SOCS3* mRNA Expression durch den *knockdown* von *STAT3* signifikant inhibiert (linkes Diagramm). Im Gegensatz dazu wurde das *STAT1*-abhängige Zielgen *SOCS1* signifikant stärker und länger in den OSM-stimulierten *siSTAT3* transfizierten HDF induziert (rechtes Diagramm) und korreliert folglich mit dem ebenfalls verstärkten und in seiner Dauer verlängerten *STAT1*-Signal in diesen Zellen (Abb. 37). Um nachfolgend den Beweis zu erbringen, dass *SOCS3* nicht nur an der Abschaltung des OSM-vermittelten Signals beteiligt ist, sondern vielmehr an der Feinabstimmung der OSM-induzierten *STAT*-Signalwege, wurden HDF als nächstes mit *SOCS3* siRNA (*siSOCS3*) transient transfiziert.

A



B

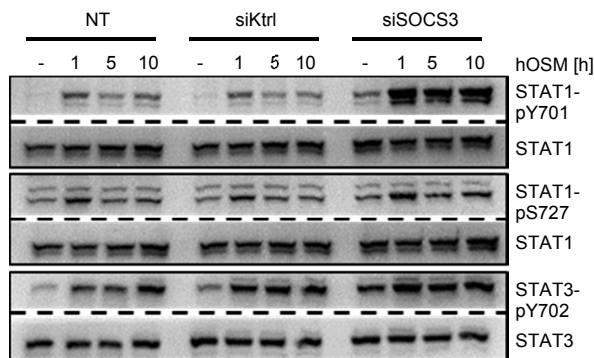


Abb. 39: Der *knockdown* von *SOCS3* verstärkt die OSM-induzierte *STAT1*-Phosphorylierung. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit *SOCS3* siRNA (*siSOCS3*) oder *siKtrl* transfiziert oder nur mit dem Transfektionsreagenz (NT) inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten bis zu 10 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der Gen- und Proteinexpression lysiert. (A) Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von *SOCS3* und *SOCS1* in technischen

Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte ($n = 3$) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$ (*siKtrl* versus *siSOCS3*). (B) Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Für den Nachweis der Y701- und S727-*STAT1* sowie der Y705-*STAT3* Phosphorylierung wurden phosphospezifische Antikörper verwendet. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem *Stripping* mit einem *STAT1* bzw. *STAT3* spezifischen Antikörper gegengefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie in Abb. 39A zu erkennen ist, wurde die Induktion der OSM-vermittelten *SOCS3* mRNA Expression nahezu vollständig in den *siSOCS3*-behandelten HDF

inhibiert. In Übereinstimmung mit den Daten der siSTAT3-behandelten HDF wurde eine verstärkte STAT1-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 39B) sowie SOCS1 Expression (Abb. 39A) nachgewiesen. Auch konnte eine geringe Verstärkung der STAT3-Tyrosinphosphorylierung beobachtet werden, die jedoch nicht mit der Zunahme der Phosphorylierung von STAT1 zu vergleichen war (Abb. 39B).

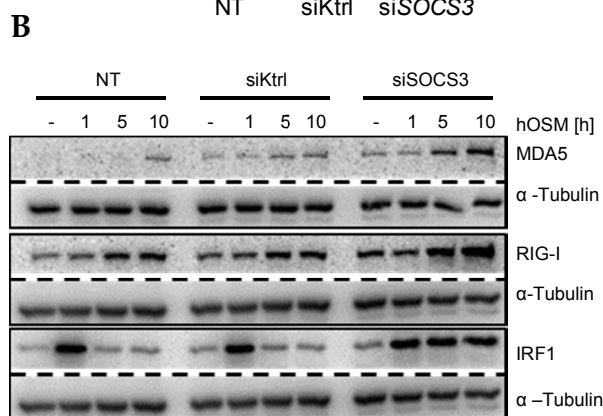
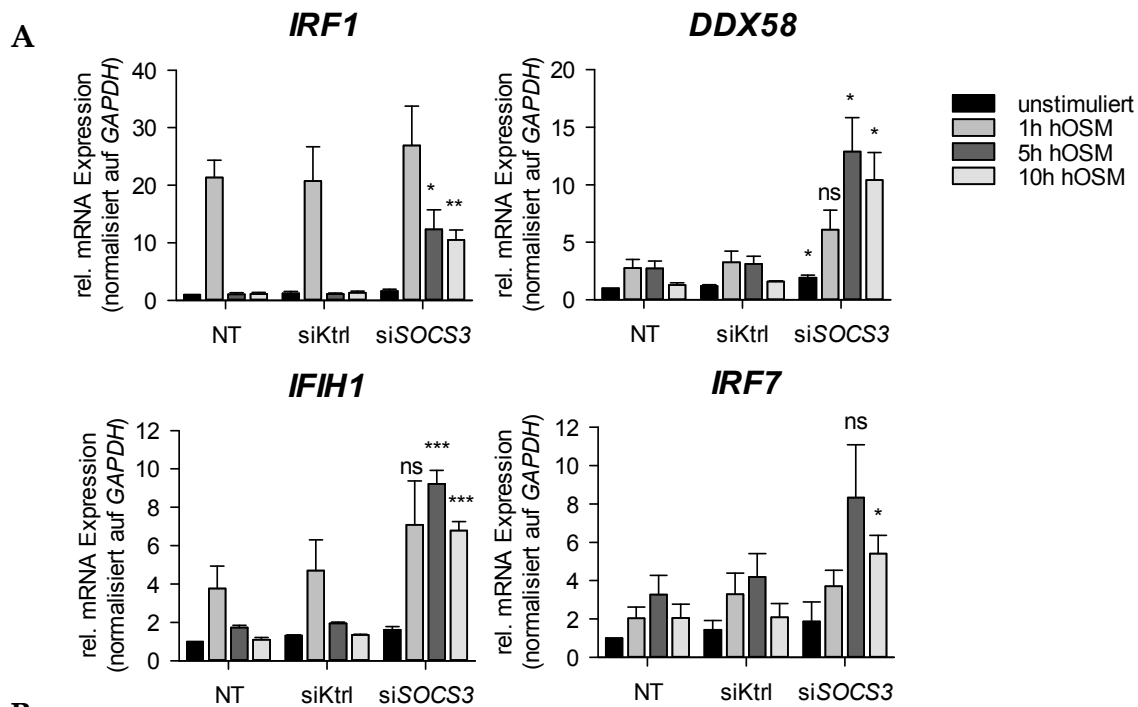


Abb. 40: Der knockdown von SOCS3 verstärkt die OSM-induzierte ISG Expression. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit SOCS3 siRNA (siSOCS3) oder siKtrl transfiziert oder nur mit dem Transfektionsreagenz (NT) inkubiert. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten bis zu 10 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der Gen- und Proteinexpression lysiert. (A) Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von *IRF1*, *DDX58*, *IFIH1* und *IRF7* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR

untersucht. Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, p ≤ 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001 (siKtrl versus siSOCS3). (B) Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion von RIG-I, MDA5 und IRF1 erfolgte mit spezifischen Antikörpern. α-Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Untersuchung der mRNA- (Abb. 39A) und Proteinspiegel (Abb. 39C) der RLR und IRF Faktoren bestätigt überdies, dass OSM-stimulierte siSOCS3-transfizierte

HDF signifikant mehr und länger RIG-I, MDA5 und IRF1/7 exprimieren als die zu vergleichenden Kontrollen.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die STAT3-abhängige SOCS3 Induktion im Wesentlichen für die Limitierung der OSM-vermittelten STAT1-Phosphorylierung verantwortlich ist, jedoch nur in geringem Maß die STAT3-Phosphorylierung reguliert.

4.4.6 Die Bedeutung von PTPN2, SUMO-1 und PML für die OSM-vermittelte Induktion antiviraler Gene

Eine Reihe von Untersuchungen zeigte, dass weitere Proteine die STAT1/IRF1-abhängige RLR Expression beeinflussen können. Hierzu zählen die Proteintyrosinphosphatase PTPN2 (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2*, auch TC-PTP genannt), das kleine Ubiquitin-verwandte Protein SUMO-1 (*small ubiquitin-related modifier 1*) sowie das Tumorsuppressor-Protein PML (*promyelocytic leukemia protein*). Um zu untersuchen, ob einer der genannten Faktoren ebenfalls die OSM-vermittelte Induktion von *IRF1*, *DDX58* und *IFIH1* beeinflusst, wurden HDF transient mit siRNA gegen die oben erwähnten Faktoren transfiziert und die Änderung der mRNA Expression im Vergleich zu den siKtrl-behandelten HDF untersucht.

Obwohl bekannt ist, dass PTPN2 die Dephosphorylierung von STAT1 vermittelt [140, 286], zeigt die Analyse der RLR Expression in siPTPN2 transfizierten HDF keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen, sondern lediglich einen Trend zur verstärkten mRNA Expression bei drei Stunden (*DDX58*, *IFIH1*) und fünf Stunden (*IFIH1*). Der *knockdown* von PTPN2 führte zwar zu einer deutlich verstärkten *IRF1* Expression nach dreistündiger OSM-Stimulation (Abb. 41A, linkes Diagramm), die jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die RLR Expression in diesen Zellen hatte. In Übereinstimmung mit diesem Befund wiesen die siPTPN2-behandelten HDF im Vergleich zu den siKtrl-transfizierten HDF nur eine leicht verlängerte STAT1-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 41B, bei 1 h OSM) und *IRF1* Expression auf (Abb. 41B, bei 3 h OSM).

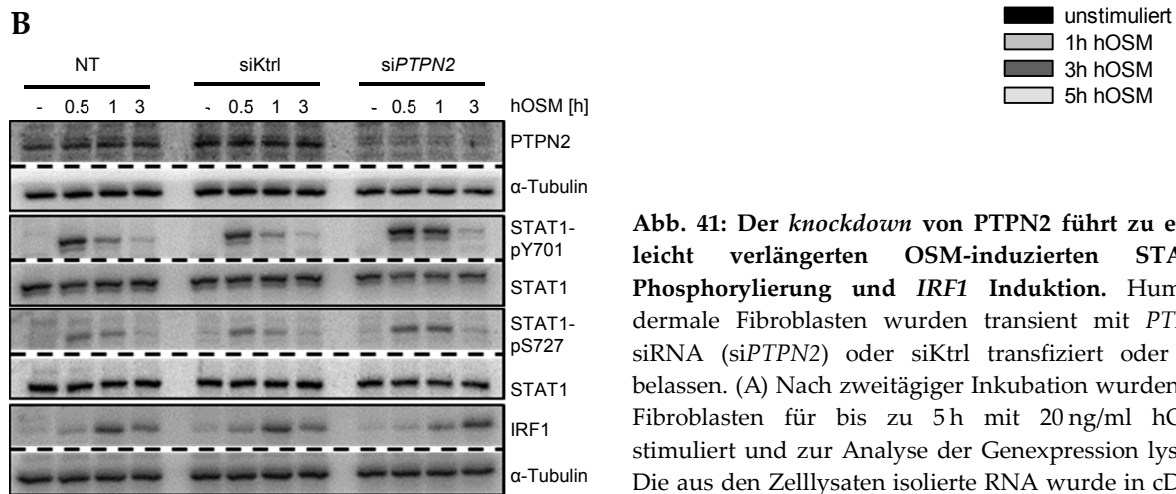
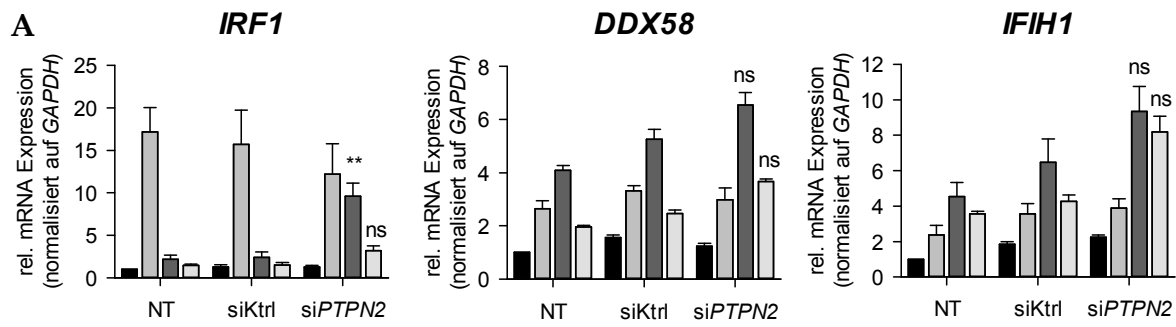


Abb. 41: Der knockdown von PTPN2 führt zu einer leicht verlängerten OSM-induzierten STAT1-Phosphorylierung und IRF1 Induktion. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit PTPN2 siRNA (siPTPN2) oder siKtrl transfiziert oder NT belassen. (A) Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten für bis zu 5 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der Genexpression lysiert. Die aus den Zellysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen

Expression von *IRF1*, *DDX58* und *IFIH1* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zunahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; **, p ≤ 0.01 (siKtrl versus siPTPN2). (B) Für den Nachweis der Y701- und S727-STAT1 Phosphorylierung sowie der IRF1 und PTPN2 Expression wurden die Fibroblasten für bis zu 3 h stimuliert und anschließend lysiert. Die Gesamtzellysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem Strippen mit einem STAT1 spezifischen Antikörper gegengefärbt. α-Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Ähnlich der Ubiquitylierung stellt die SUMOylierung von Proteinen eine posttranslationale Modifikation dar, die entweder zu einer Änderung der Aktivität oder Stabilität von Proteinen führt oder zu deren Translokation innerhalb der Zelle [287]. Studien zeigten, dass die SUMOylierung von STAT1 [288, 289] wie auch IRF1 [136] die transkriptionelle Aktivität der Proteine einschränken und somit die STAT1/IRF1-abhängige Expression verschiedener Zielgene inhibieren kann.

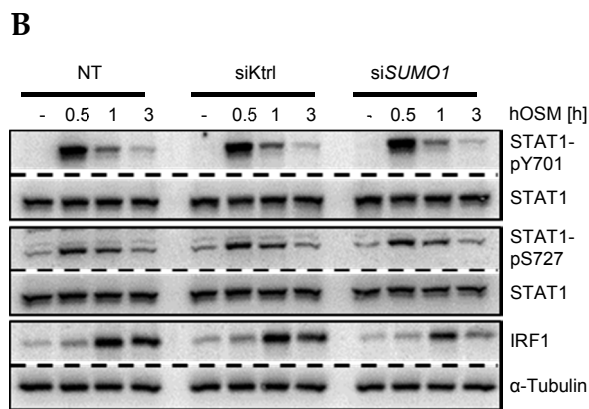
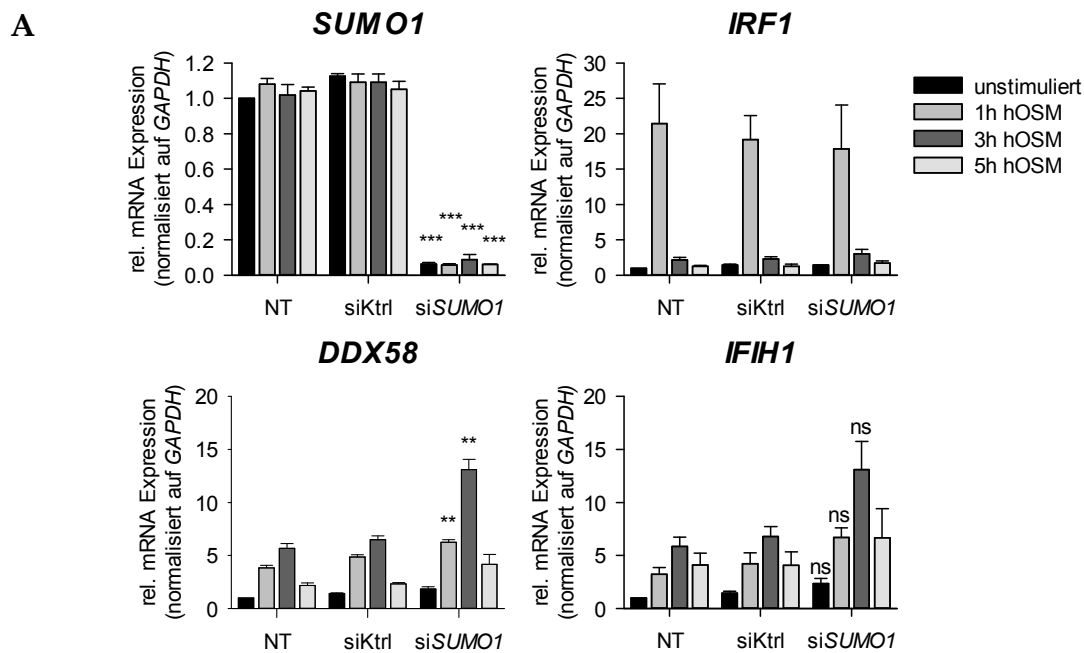


Abb. 42: Der knockdown von SUMO-1 führt zu einer transienten leichten Verstärkung der OSM-induzierten DDX58 und IFIH1 mRNA Expression in HDF. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit SUMO1 siRNA (siSUMO1) oder siKtrl transfiziert oder NT belassen. (A) Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten für bis zu 5 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und zur Analyse der Genexpression lysiert. Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von IRF1, DDX58, IFIH1 und SUMO1 in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR

untersucht. Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten, NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen GAPDH. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; **, p ≤ 0.01; ***, p ≤ 0.001 (siKtrl versus siSUMO1). (B) Für den Nachweis der Y701- und S727-STAT1 Phosphorylierung sowie der Expression von IRF1 wurden die Fibroblasten für bis zu 3 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und anschließend lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem Strippen mit einem STAT1 spezifischen Antikörper gegengefärbt. α-Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abb. 42A hervorgeht, wurde trotz des effizienten knockdowns von SUMO1 (linkes Diagramm) keine verlängerte Expression von IRF1, DDX58 und IFIH1 in den siSUMO1-transfizierten HDF nachgewiesen (rechte Diagramme). Erneut ist ein Trend hin zu einer Zunahme der DDX58 und IFIH1 mRNA Expression nach einer und drei Stunden OSM-Stimulation zu erkennen. Auch die Phosphorylierung und damit Aktivierung von STAT1 selbst, zeigt keine Veränderung zwischen den siSUMO1-transfizierten HDF und den Kontrollen (Abb. 42B).

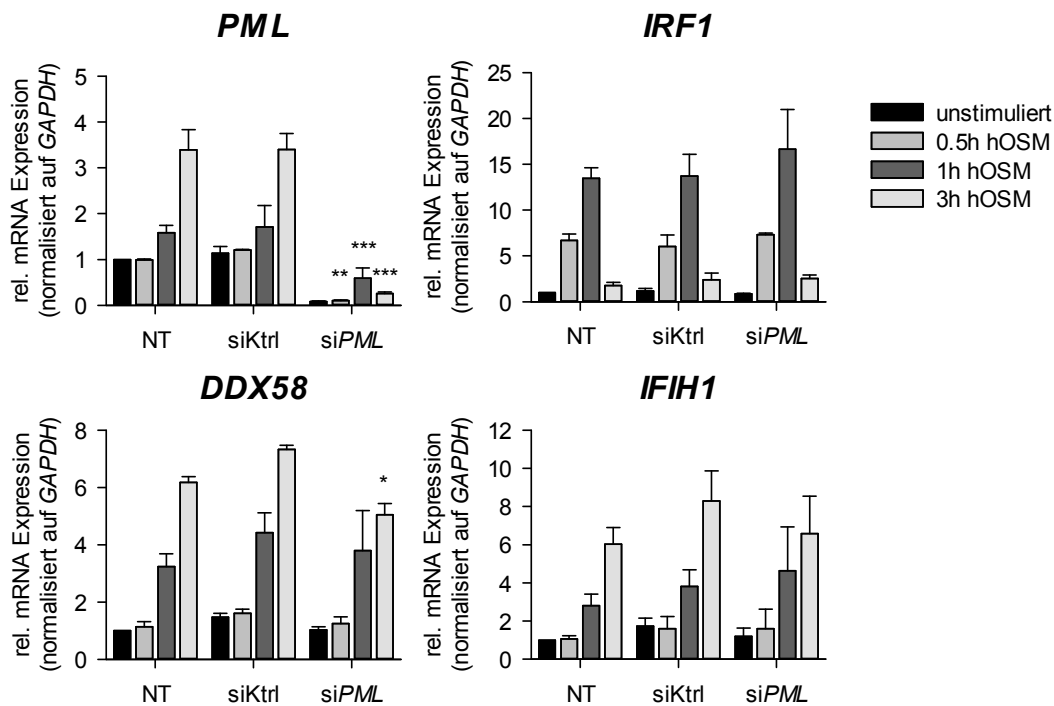


Abb. 43: Der knockdown von PML hat keinen Einfluss auf die OSM-vermittelte Induktion von IRF1, DDX58 und IFIH1. Humane dermale Fibroblasten wurden transient mit PML siRNA (siPML) oder siKtrl transfiziert oder NT belassen. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Fibroblasten für bis 3 h mit 20 ng/ml hOSM stimuliert und anschließend lysiert. Die aus den Zellysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von PML, IRF1, DDX58 und IFIH1 in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zu- bzw. Abnahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten NT Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen GAPDH. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 2 - 3) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, p ≤ 0.05 (siKtrl versus siPML).

PML selbst ist ein Interferonzielgen [290], gilt jedoch ebenso als Regulator des Typ I- und Typ II IFN-induzierten Signals [291, 292], weshalb es eine wichtige Rolle bei der antiviralen Immunantwort spielt. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass OSM die Expression von PML in HDF induziert (Affymetrix Gene Chips - nicht veröffentlichte Daten H. Hermanns und Abb. 43A, linkes Diagramm). Obwohl die Transfektion mit siPML die Expression von PML in HDF signifikant inhibierte (Abb. 43A, linkes Diagramm), wurde die OSM-vermittelte Induktion von IRF1, DDX58 und IFIH1 durch den knockdown nicht positiv beeinflusst (Abb. 43).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PTPN2 und SUMO1 eine eher untergeordnete und PML keine Rolle bei der OSM-vermittelten ISG Expression in HDF einnehmen.

4.4.7 OSM verstärkt die IFN-induzierte Expression der Helikasen in HDF

Die frühe und transiente Induktion der RLR in OSM-behandelten HDF legt die Vermutung nahe, dass OSM an der antiviralen Immunantwort in diesen Zellen beteiligt ist. Untersuchungen, bei denen der zytopathische Effekt einer Enzephalomyokarditis Virus (EMCV) Infektion in HDF analysiert wurde, haben gezeigt, dass eine hohe Konzentration IFN γ notwendig ist, um eine zu den Typ I IFN vergleichbare antivirale Abwehr in HDF zu induzieren. Wurden die HDF allerdings vor der Stimulation mit IFN γ zusätzlich mit OSM vorbehandelt oder erfolgte eine gleichzeitige Behandlung mit OSM und IFN γ , konnte beobachtet werden, dass eine geringere Konzentration von IFN γ ausreichte, um die Zellen gegen eine EMCV Infektion zu schützen. Die alleinige Behandlung mit OSM hingegen hatte keine antivirale Aktivität (Kooperation mit Dr. Anna-Paula Costa-Pereira, Imperial College London).

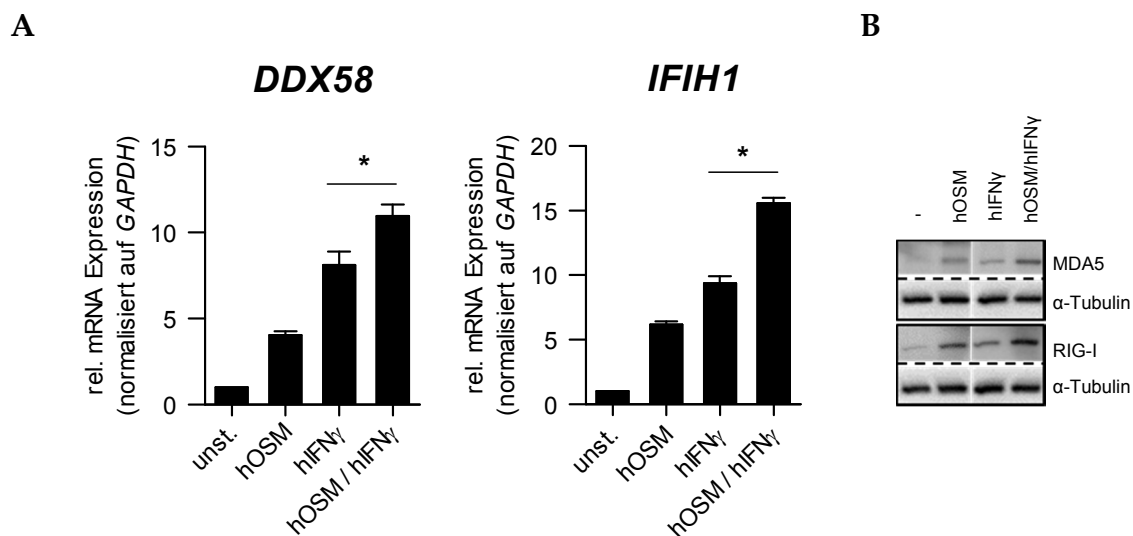


Abb. 44: OSM verstärkt die IFN γ -induzierte RLR Expression. Humane dermale Fibroblasten wurden 2 h (A) bzw. 3 h (B) mit 20 ng/ml hOSM vorbehandelt, anschließend für 2 h mit 1000 U/ml IFN γ stimuliert und zur Analyse der Gen- und Proteinexpression lysiert. (A) Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von *DDX58* und *IFIH1* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zunahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten Probe (definiert als 1), normalisiert auf das Referenzgen *GAPDH*. Gezeigt sind die Mittelwerte (n = 3 – 4) + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten T-Tests bestimmt: *, p \leq 0.05 (versus unstimulierte Probe). (B) Für den Nachweis von RIG-I und MDA5 auf Proteinebene wurden die Gesamtzelllysate mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit spezifischen Antikörpern untersucht. α -Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten.

Um zu überprüfen, ob beide Zytokine zur Verstärkung der antiviralen Antwort miteinander interagieren, wurden HDF mit OSM vorbehandelt und anschließend mit

IFN γ stimuliert. Die Analyse der *DDX58* und *IFIH1* Induktion ergab, dass in der Tat die kombinierte Stimulation mit OSM und IFN γ zu einer verstärkten Induktion der RLRs führt, die sich durch eine verstärkte *DDX58* und *IFIH1* (Abb. 44A) sowie RIG-I und MDA5 Expression nachweisen ließ (Abb. 44B).

Diese Daten machen deutlich, dass das OSM-induzierte STAT1-Signal mit dem IFN γ -induzierten STAT1-Signal in HDF kooperiert, um so die antivirale Immunantwort zu verstärken.

4.4.8 Die OSM-vermittelte RLR Expression ist speziesunabhängig

Um zukünftig die physiologische Relevanz des *Crosstalk* von OSM und IFN γ auf die antivirale Immunantwort auch *in vivo* untersuchen zu können, stellte sich die Frage ob OSM die Expression von ISG auch in Maus- und Rattenzellen induziert. Aus diesem Grund wurde im letzten Versuchsabschnitt dieses Projekts die OSM-abhängige Induktion der RLR und von IRF1 sowohl in vaskulären glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs) und dermalen Fibroblasten (Zelllinie L-929) der Maus als auch in dermalen Fibroblasten (*rat dermal fibroblasts*, RDF) und neonatalen kardialen Fibroblasten (*neonatal rat cardiac fibroblasts*, NRCFBs) der Ratte untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass OSM keine Expression von *Ddx58* und *Ifih1* in den dermalen Maus- und Rattenfibroblasten induziert (Abb. 45A-D), jedoch ein Trend zur Zunahme beider RLR in OSM-behandelten VSMCs und NRCFBs besteht. Eine verstärkte Induktion von *Irf1* konnte, mit Ausnahme der L-929 dermalen Mausfibroblasten (Abb. 45A), in allen untersuchten Zelltypen nachgewiesen werden (Abb. 45 B-D). Die Untersuchung des STAT1-Signals bestätigt zudem eine OSM-vermittelte Tyrosin- und Serinphosphorylierung von STAT1 in allen getesteten Zellen (Abb. 45 E+F). Obwohl OSM die Expression von RLR und IRF1 nicht in gleichem Maß in allen untersuchten Maus- und Rattenzellen induziert, deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass es sich bei der OSM-vermittelten Expression von ISG um einen generellen, speziesunabhängigen Effekt handelt.

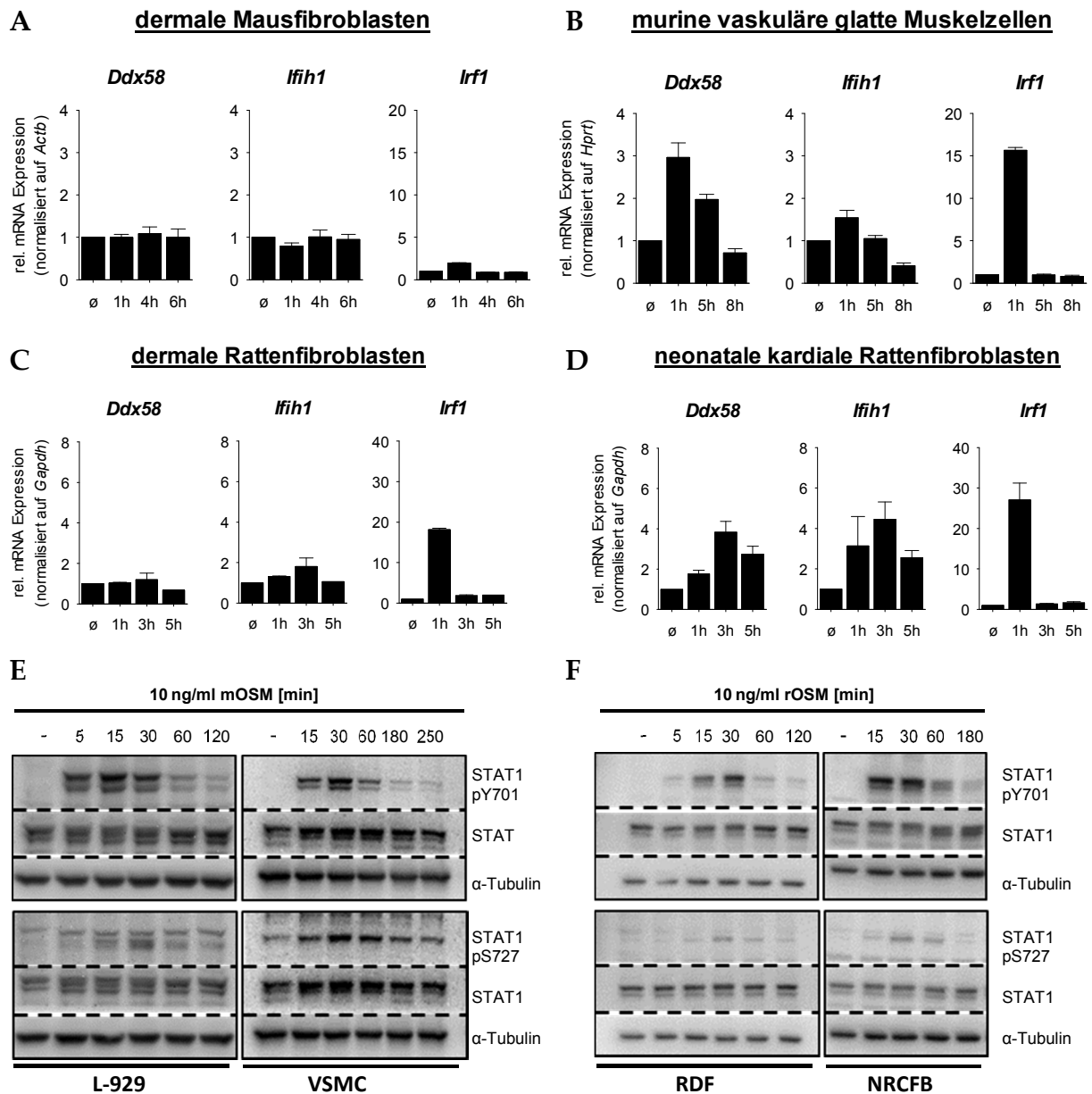


Abb. 45: Die OSM-vermittelte *Ddx58*, *Ifih1* und *Irf1* mRNA Expression in Maus- und Rattenzellen. (A) Dermale Mausfibroblasten (L-929, n = 2) und (B) murine vaskuläre glatte Muskelzellen (VSMC, n = 3) sowie (C) dermale Rattenfibroblasten (RDF, n = 2) und (D) neonatale kardiale Rattenfibroblasten (NRCFB, n = 4) wurden entsprechend der Beschriftung mit 10 ng/ml mOSM bzw. 10 ng/ml rOSM stimuliert und zur Analyse der Genexpression lysiert. Die aus den Zelllysaten isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und zur Bestimmung der relativen Expression von *Ddx58*, *Ifih1* und *Irf1* in technischen Duplikaten mittels qRT-PCR untersucht. Dargestellt ist die relative Zunahme der mRNA Expression im Vergleich zur unstimulierten Probe (definiert als 1), normalisiert auf die Referenzgene *Actb* (A), *Hprt* (B) oder *Gapdh* (C+D). Gezeigt sind die Mittelwerte (n ≥ 2) + SEM. (E+F) Für den Nachweis der Y701- und S727-STAT1 Phosphorylierung wurden die Maus- und Rattenzellen entsprechend der Beschriftung mit 10 ng/ml mOSM bzw. 10 ng/ml rOSM stimuliert und anschließend lysiert. Die Gesamtzelllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot untersucht. Die Detektion erfolgte mit (phospho-) spezifischen Antikörpern. Für den Nachweis der Gesamtproteinmenge wurde die Membran nach dem Strippen mit einem STAT1 spezifischen Antikörper gegengefärbt. α-Tubulin diente als Beladungskontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei (Maus) bzw. fünf (Ratte) unabhängigen Experimenten.

5. DISKUSSION

5.1 Die Regulation der IL-6 Rezeptorexpression auf dendritischen Zellen

Interleukin-6 (IL-6) ist eins der umfassend erforschtesten Zytokine unserer Zeit. Dennoch ist IL-6 aufgrund seiner pleiotropen Eigenschaften und der Komplexität seiner ausgelösten Signale nach wie vor Mittelpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Fragestellungen. Die Besonderheit des IL-6-Signals besteht darin, dass es kontextbezogen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzt, die abhängig von der Dauer des Signals protektiv oder aber schädigend wirken können. Aus diesem Grund ist die Erforschung der Regulationsmechanismen des IL-6-Signals von besonderem Interesse, um neue und spezifischere Ansatzpunkte für klinische/pharmakologische Interventionsstrategien zu erarbeiten.

Ein bisher (*in vivo*) nur wenig erforschter Regulationsmechanismus, der vermutlich einen wesentlichen Beitrag zur Balance der IL-6 Zytokinwirkung (und anderer Zytokine der Familie) beiträgt, ist die durch Endozytose veränderbare Verfügbarkeit der Rezeptorkette gp130. Studien haben gezeigt, dass eine effektive Internalisierung von gp130 nicht nur durch den Liganden selbst, sondern auch durch vorgeschaltete proinflammatorische Zytokine oder Zellstress induziert werden kann [52, 53]. Diese strenge Regulation der Rezeptorexpression ist deshalb von Bedeutung, weil während entzündlicher Prozesse nicht nur der IL-6-Serumspiegel enorm ansteigen kann²⁰, sondern ebenso die Konzentration an löslichem IL-6R (sIL-6R) [60]. Der α -Rezeptor IL-6R wird nur von wenigen Zellen exprimiert (Hepatozyten, Leukozyten), weshalb das klassische IL-6-Signal auch nur auf diese Zelltypen beschränkt ist. Während einer Entzündungsreaktion werden vermehrt Metalloproteinasen exprimiert, die dazu führen, dass der IL-6R von infiltrierenden Leukozyten freigesetzt wird. Dies hat zur Folge, dass alle in unmittelbarer Umgebung zum Entzündungsherd befindlichen Zellen aktiviert werden können, da der IL-6/sIL-6R-Komplex agonistisch wirkt und gp130 auf nahezu allen Zellen exprimiert wird (IL-6 *trans*-Signal, siehe Abschnitt 1.1.2).

Ein für Immunreaktionen zentraler und wichtiger Zelltyp des angeborenen Immunsystems sind dendritische Zellen (DZ). Ihre immunregulatorische Fähigkeit besteht darin, über spezifische Rezeptoren (PRRs, *pattern recognition receptors*)

²⁰ Im gesunden Zustand liegt die Serumkonzentration von IL-6 im Bereich von wenigen pg/ml. Während eines septischen Schocks kann diese in Bereiche von mg/ml ansteigen.

Strukturmerkmale von Pathogenen (PAMPS, *Pathogen-associated molecular patterns*) zu erkennen, diese aufzunehmen und zu prozessieren, um sie anschließend mit Hilfe von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, *major histocompatibility complex*) naiven T-Zellen zu präsentieren. Darüber hinaus sezernieren sie proinflammatorische Zytokine (inklusive IL-6 und OSM) und induzieren die Expression kostimulatorischer Moleküle, die zur Aktivierung und Polarisation von T-Zellen des adaptiven Immunsystems führen.

Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass IL-6 die Differenzierung und funktionellen Eigenschaften der DZ beeinflussen kann. Die biologische Wirkung von IL-6 wird bisher jedoch kontrovers diskutiert. *Menetrier-Caux et al.* [176] und *Ratta et al.* [178] postulieren in ihren Studien einen inhibitorischen Effekt, da IL-6 die DZ-Differenzierung aus hämatopoetischen Vorläuferzellen (CD34⁺) inhibierte und stattdessen die der Monozyten förderte. Einhergehend damit haben *Mitani et al.* [177] und *Chomorat et al.* [180] demonstriert, dass Monozyten (PBMCs, *peripheral blood mononuclear cells*) in Anwesenheit von IL-6 vermehrt zu Makrophagen differenzieren. Sie konnten zeigen, dass das IL-6-Signal nicht nur die Freisetzung des Makrophagen-spezifischen Wachstumsfaktors M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) induzierte, sondern ebenso die Expression des M-CSF Rezeptors (M-CSFR) förderte. Studien von *Park et al.* [179] und *Kitamura et al.* [293] deuteten ferner darauf hin, dass das IL-6/STAT3-Signal die Maturierung der DZ unterdrückt, indem es die Expression der antigenpräsentierenden MHC-Moleküle sowie der Kostimulatoren CD80 und CD86 hemmte. Dem entgegen weisen zwei andere Studien darauf hin, dass endogen produziertes IL-6 für die Differenzierung und Proliferation der DZ günstig ist [181, 182]. Während *Santiago-Schwarz et al.* [182] gezeigt haben, dass eine erhöhte IL-6 Konzentration in CD34⁺ Zellkulturen (Knochenmarkvorläufer) mit einer stärkeren DZ Proliferation einhergeht, haben *Brasel et al.* [181] nachgewiesen, dass die Inkubation mit einem anti-IL-6 Antikörper die Anzahl der DZ in Flt3L (*Fms-related tyrosine kinase 3 ligand*)-gereiften Knochenmark-Kulturen deutlich reduzierte. Interessant in diesem Zusammenhang ist auch ein Befund von *Bernhard et al.* [294], der zeigt, dass hyper-IL-6²¹, aber nicht IL-6, förderlich für die Differenzierung funktioneller DZ aus PBMCs ist. Umgekehrt haben *Sere et al.* [158] nachgewiesen, dass hyper-IL-6 eine blockierende Wirkung auf die DZ-Maturierung in Flt3L-gereiften KM-DZ Kulturen hat.

²¹ Fusionsprotein aus IL-6 und löslichem IL-6R

Ein wichtiger Aspekt, der in den erwähnten Studien nicht berücksichtigt wurde, ist die Variabilität der Rezeptorexpression auf Zellen unterschiedlichen Differenzierungs- und Aktivierungsgrads. Zwar wurde vielfach gezeigt, dass DZ sowohl gp130 als auch den IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren [179, 295-297], doch ist unbekannt wie die Rezeptorexpression auf diesen Zellen reguliert ist. Aus diesem Grund sollte der Hypothese auf den Grund gegangen werden, dass für die unterschiedliche biologische Wirkung von IL-6 die veränderbare Verfügbarkeit des IL-6 Rezeptors auf DZ eine zentrale Rolle spielt. Hierfür wurde die Expression der IL-6 Rezeptoren im Verlauf der DZ-Differenzierung am Beispiel GM-CSF-gereifter KM-DZ genauer untersucht. Weiterhin wurde beleuchtet, wie sich die gp130 Expression während der DZ-Reifung verändert, da es bereits Hinweise auf eine aktivierungsbedingte *cross*-Regulation des IL-6-Rezeptors gab [177].

5.1.1 Charakterisierung GM-CSF-gereifter dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark

Die Generierung dendritischer Zellen aus Knochenmark (KM-DZ) durch Behandlung mit GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) gilt als Standardmethode zur Gewinnung großer Mengen DZ für *in vitro* Versuche [167, 192]. Obwohl GM-CSF-gereifte DZ ihrer Entwicklung nach den inflammatorischen DZ zuzuordnen sind und nicht den *steady-state* konventionellen DZ (kDZ) [160, 168], gelten sie doch als allgemeines Modellsystem zur Untersuchung der Entwicklung und funktionellen Eigenschaften von DZ. Genau wie kDZ exprimieren GM-CSF-gereifte KM-DZ nach Aktivierung vermehrt MHCII- und kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) auf ihrer Oberfläche. Des Weiteren sind sie in der Lage naive T-Zellen zu aktivieren und deren Differenzierung zu induzieren. Die Polarisierung der T-Helferzellen (Th1, Th2, Th17, Treg) ist von den regulatorischen Eigenschaften der DZ abhängig. Diese werden durch die Maturierungsbedingungen bestimmt, die ähnlich der Polarisation bei T-Zellen zur Entstehung verschiedener DZ Subtypen mit unterschiedlichen Reifegraden führen (siehe Abschnitt 1.4.2 Reifungsstadien von DZ). *In vitro* kann die Maturierung der DZ durch die Behandlung mit mikrobiellen Antigenen oder proinflammatorischen Zytokinen induziert werden. Studien zeigten, dass eine Behandlung mit TNF α (ohne ein zusätzliches weiteres Signal) zur Entstehung semireifer DZ führt, die eine Th2-Polarisation bedingen [173, 298]. LPS hingegen vermittelt die Induktion eines vollreifen DZ Phänotyps, der insbesondere durch die Sezernierung von IL-6 und

IL-12 die Polarisation von Th1-Zellen fördert [204, 299, 300]. Ctx hingegen, scheint die Induktion von sowohl semireifen als auch reifen DZ zu vermitteln, die entweder zu einer Th2 [211] oder aber zu einer Th17 Antwort führen [214, 301].

Da für die Analyse der IL-6 Rezeptorexpression neben „unreifen“ DZ²² auch DZ verschiedener Reifegrade untersucht werden sollten, wurden zunächst die unterschiedlichen DZ Subtypen anhand der Expression von Oberflächenmarkern (MHCII, CD40, CD80, CD86) und Zytokinen charakterisiert. In Übereinstimmung mit der Literatur [167, 192] wurde gezeigt, dass murine Knochenmarkzellen in Anwesenheit von GM-CSF zu CD11c⁺ KM-DZ differenzierten, die an Tag 8 in Kultur bereits positiv für MHCII, CD40, CD80 und CD86 waren. Sowohl die Behandlung mit LPS als auch mit TNF α oder Ctx verstärkte die Expression dieser Oberflächenmarker, wobei die höchste Zunahme durch die Behandlung mit LPS induziert wurde. Ctx wiederum vermittelte eine stärkere MHCII und CD86 Expression, als die Behandlung mit TNF α . Weiterhin wurde nachgewiesen, dass in LPS-behandelten KM-DZ Kulturen die Transkription einer Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen erhöht war. Die Behandlung mit Ctx hingegen verstärkte nur die *Il6*, *Il1b* und *Il12a* mRNA Expression, inhibierte jedoch die *Tnfa* und *Il23a* mRNA Expression. Im Gegensatz dazu konnte in TNF α -behandelten KM-DZ Kulturen keine Zytokininduktion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse führten zu dem Schluss, dass die hier angewendeten Maturierungsmodelle den in der Literatur beschriebenen vergleichbar sind. Daher wurde angenommen, dass LPS einen vollreifen, TNF α einen semireifen und Ctx einen reifen (KM-)DZ Phänotyp induzierten.

5.1.2 Die Expression der IL-6-Typ Zytokin-assoziierten Rezeptoren auf dendritischen Zellen ist unterschiedlich reguliert

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit war bekannt, dass DZ gp130 und IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren [179, 295-297]. Darüber hinaus deuteten Untersuchungen von *Jung et al.* [302] und *Satphaty et al.* [303] daraufhin, dass DZ ebenso einen funktionellen OSMR und LIFR exprimieren. Mit Hilfe von Gen- und Proteinexpressionsanalysen wurde zunächst bestätigt, dass ausgereifte KM-DZ (CD11c⁺MHCII⁺) gp130 und den IL-6R sowie zusätzlich den LIFR exprimieren. Die

²² Bezieht sich auf Tag 8 GM-CSF-gereifte DZ aus Knochenmarkzellen, die nicht mit anderen Stimulanzen behandelt wurden

Ergebnisse ließen ferner darauf schließen, dass gp130 am stärksten, der IL-6R und LIFR hingegen nur sehr schwach auf KM-DZ exprimiert werden. Entgegen früherer Untersuchungen [302], wurde für OSMR nur eine sehr geringe Genexpression und keine Proteinexpression auf KM-DZ nachgewiesen. Die Analyse der Gesamtzelllysate ergab kein detektierbares OSMR-Signal im Western Blot sowie keine Aktivierung von OSM-relevanten Signalwegen nach Stimulation mit OSM (eigene nicht dargestellte Ergebnisse sowie Bachelorarbeit R. Schlund [213]). Aus diesem Grund wird vermutet, dass KM-DZ keinen OSMR exprimieren. Dieses Ergebnis steht damit im deutlichen Gegensatz zu dem Befund von *Jung et al.* [302], die in ihrer Studie eine erhöhte OSMR Expression auf GM-CSF-gereiften KM-DZ sowie eine OSM-vermittelte KM-DZ Maturierung nachgewiesen haben. Die Autoren nahmen folglich an, dass der beobachtete Effekt der DZ-Maturierung auf einer durch den gp130/OSMR-Komplex-vermittelten Zellaktivierung beruht. Diese widersprüchlichen Befunde hinsichtlich der OSMR Expression könnten darin begründet sein, dass *Jung et al.* [302] für die Generierung der DZ aus Knochenmark rekombinantes GM-CSF sowie zusätzlich rekombinantes IL-4 verwendeten. Im Unterschied dazu wurden die für diese Arbeit verwendeten KM-DZ mit Hilfe eines GM-CSF-angereicherten Überstands einer murinen Myelomzelllinie generiert. Entweder es war ein zusätzlicher Faktor im GM-CSF-Überstand enthalten der die OSMR-Expression verhinderte, oder aber IL-4 begünstigte die OSMR Oberflächenexpression. Ein weiterer Faktor der von den Autoren *Jung et al.* nicht berücksichtigt wurde ist, dass OSM ebenso über einen Komplex aus gp130 und LIFR signalisieren kann [106]. Eine Analyse der LIFR Expression fehlt jedoch. Zwar deuten die in dieser Arbeit dargelegten Befunde, nur auf eine sehr geringe LIFR Expression auf KM-DZ hin (Abb. 11C) (welche zudem unzureichend ist um die Zellen zu aktivieren), doch ist aufgrund der unterschiedlichen Behandlung der KM-DZ ebenfalls eine veränderte LIFR Expression nicht gänzlich auszuschließen. Inwiefern die Expression des OSMR und/oder LIFR durch die Behandlung beeinflusst ist, müsste durch zusätzliche Experimente aufgeklärt werden.

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern sich das Expressionsmuster der Rezeptoren (gp130, IL-6R, LIFR) im Verlauf DZ-Differenzierung verändert. Die Analyse ergab, dass die GM-CSF-vermittelte Differenzierung der KM-DZ mit einem drastischen Verlust der LIFR Expression, sowie mit einer geringen aber stetigen Zunahme der gp130 Expression auf den CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ einhergeht. Die Expression des IL-6R hingegen war über den Verlauf der Differenzierung nahezu unbeeinflusst. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass die Sensitivität gegenüber LIF im Verlauf der

DZ Differenzierung abnimmt, während sich die Sensitivität gegenüber IL-6 nicht wesentlich veränderte. Auch vorhergehende Untersuchungen von *Satpathy et al.* [303] legten bereits die Vermutung nahe, dass die Negativ-Regulation der LIFR Expression für die kDZ Differenzierung eine Rolle spielt. Die Autoren konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor *Zbtb46*, der in prä-DZ und kDZ nicht aber in anderen Immunzellen exprimiert wird, als Repressor der G-CSFR und LIFR Expression fungiert. Wurde dieser in Knochenmarkzellen überexprimiert, war eine Zunahme der CD4⁺ kDZ in der Milz zu beobachten. Dieser Befund deutete somit daraufhin, dass eine Abnahme der LIFR Expression mit einer verbesserten kDZ Differenzierung in Verbindung steht. Einhergehend mit dieser Vermutung wurde in weiteren Analysen dieser Arbeit gezeigt, dass kDZ aus peripheren lymphatischen Organen nahezu keinen LIFR auf ihrer Oberfläche exprimieren, während pDZ und Makrophagen eine erhöhte LIFR Expression zeigten. Auch wurde nachgewiesen, dass sowohl kDZ als auch Makrophagen gp130 exprimieren, pDZ im Vergleich dazu aber nahezu keine gp130 Expression aufwiesen. Überraschenderweise wurde umgekehrt auf Makrophagen so gut wie keine IL-6R Expression nachgewiesen, während beide DZ-Subtypen eine deutliche IL-6R Expression zeigten. Dies ist insofern verwunderlich, als dass verschiedene Studien vermuten lassen, dass IL-6 als Wachstums- und Differenzierungsfaktor von Monozyten/Makrophagen dient [177, 180].

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse daraufhin, dass die Expression der einzelnen IL-6-Typ-assoziierten Rezeptoren auf dendritischen Zellen einer komplexen und differentiellen Regulation zu unterliegen scheint und sich außerdem zwischen den verschiedenen DZ-Subtypen unterscheidet. Es kann vermutet werden, dass die Differenzierung der kDZ mit einem Verlust der Responsivität gegenüber LIF einhergeht, während die Responsivität gegenüber IL-6 erhalten bleibt. Unklar ist bisher nur, warum pDZ zwar den IL-6R und LIFR exprimieren, jedoch nicht die allgemeine Rezeptorkette gp130. Dies würde bedeuten, dass pDZ generell unempfindlich gegenüber IL-6-Typ Zytokinen sind. Es stellt sich daher die Frage, ob ähnlich den Befunden in Mastzellen [304], die Oberflächenexpression von gp130 erst in Folge der Aktivierung der pDZ induziert wird. Untersuchungen diesbezüglich wurden bisher nicht durchgeführt und sind daher Ziel zukünftiger Versuche.

5.1.3 Die gp130 Expression auf KM-DZ wird durch verschiedene Maturierungsstimuli unterschiedlich reguliert

Stressfaktoren und proinflammatorische Zytokine können regulierend auf die Expression von gp130 einwirken. *Radtke et al.* [52] haben gezeigt, dass bereits eine 30-minütige Vorbehandlung mit IL-1 β oder TNF α eine signifikante Abnahme der gp130 Zelloberflächenexpression auf Hepatozyten (HepG2) zur Folge hat. Hiermit verbunden war ebenfalls eine 50%-ige Reduktion der IL-6-vermittelten STAT3 Phosphorylierung in diesen Zellen. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis konnte bereits in früheren Untersuchungen von *Ahmed & Ivashkiv* [219] eine antagonistische Wirkung von Stressfaktoren und proinflammatorischen Agenzien (TNF α , IL-1 β ; LPS) auf das IL-6-Signal in Monozyten und Makrophagen beobachtet werden. Eine kürzlich veröffentlichte Studie von *Honke et al.* [218] lieferte überdies einen Hinweis darauf, dass die gp130 Expression auf Monozyten ebenfalls über einen *Crosstalk* Mechanismus reguliert zu werden scheint. In Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) wurde eine signifikant verminderte gp130 Expression auf den Monozyten der Synovialflüssigkeit, im Vergleich zu peripheren Monozyten des Bluts (PBMC) nachgewiesen. Interessant in diesem Zusammenhang sind auch Befunde von *Mitani et al* [177] die zeigen, dass die Behandlung von PBMCs mit TNF α , IL-1 β oder LPS die inhibitorische Wirkung von IL-6 auf die DZ-Differenzierung aufhebt. Ein zugrunde liegender Mechanismus ist bisher nicht beschrieben, ließe sich aber ebenfalls durch eine verminderte Responsivität der Zellen aufgrund einer verminderten gp130 Expression erklären. Diese Ergebnisse bestärken die Vermutung, dass die gp130 *Cross*-Regulation generell ein wichtiger Mechanismus zu sein scheint, um die Responsivität von Zellen gegenüber IL-6 (sowie anderen IL-6-Typ Zytokinen) zu regulieren.

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchung wurde nun erstmals demonstriert, dass die gp130 Expression ebenso auf DZ durch die Behandlung mit proinflammatorischen Faktoren (LPS, TNF α , Ctx) herunterreguliert wird. Auffällig hierbei war jedoch, dass sich die Stärke und Dauer der gp130 *Cross*-Regulation abhängig vom Maturierungsstimulus deutlich unterschied. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation mit TNF α eine 50%-ige, mit Ctx eine bis zu 70%ige und mit LPS sogar eine bis zu 95%-ige Reduktion der gp130 Expression auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ induzierte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass TNF α und Ctx eine transiente (bis zu 5h), LPS hingegen eine dauerhafte Abnahme der gp130 Expression induzierte. Eine Erklärung für die Unterschiede bezüglich der Quantität der Rezeptorregulation könnte sein, dass Ctx und LPS die Produktion

proinflammatorischer Zytokine induzierten (siehe Abschnitt 4.1.2), die vermutlich in einem autokrinen *Loop* die Regulation von gp130 zusätzlich verstärkten. Die langanhaltende Reduktion durch LPS wiederum, konnte eindeutig auf die Inhibierung der *Il6st* mRNA Expression in den KM-DZ Kulturen zurückgeführt werden.

Wie bereits in den Studien von *Park et al.* [179] und *Kitamura et al.* [293] angedeutet, scheint IL-6 unter homöostatischen Bedingungen die Aktivierung/Reifung der DZ zu verhindern. Durch die Freisetzung früher proinflammatorischer Zytokine (TNF α) oder aber durch das Pathogen selbst (LPS, Ctx) wird jedoch gewährleistet, dass während der Induktion einer Immunantwort die Responsivität gegenüber IL-6 sinkt, sodass eine optimale Maturierung/Reifung der DZ ermöglicht wird.

5.1.4 Die Regulation von gp130 auf KM-DZ erfolgt je nach Stimulus über einen p38-abhängigen oder -unabhängigen Mechanismus

Sowohl *Radtko et al.* [52] als auch *Honke et al.* [218] haben gezeigt, dass die *Cross*-Regulation von gp130 auf Hepatozyten und Monozyten auf eine beschleunigte p38/MK2-vermittelte Endozytose des Rezeptors zurückzuführen ist. Es ist bekannt, dass LPS und TNF α zu frühen Zeitpunkten (bis 30 min) die Phosphorylierung von p38 in DZ induzieren [305]. Vergleichbare Studien mit Ctx-behandelten DZ existierten bisher nicht, doch belegten Untersuchungen mit Adipozyten und B-Zellen ebenfalls eine frühe Ctx-vermittelte p38-Phosphorylierung [216, 306]. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurde in LPS- und Ctx-behandelten KM-DZ eine Zunahme der MK2-, sowie in TNF α -behandelten KM-DZ eine Zunahme der p38-Phosphorylierung nachgewiesen, die bis zu fünf Stunden nach Behandlung präsent war. Folglich wurde angenommen, dass die Herunterregulation von gp130 auf CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ auf einer beschleunigten durch p38-induzierten Internalisierung des Rezeptors beruht und sich vermutlich durch die Inhibierung des p38-Signals verhindern ließe. Die Analyse der p38-Inhibitor-behandelten KM-DZ ergab, dass diese Zellen zwar vor der gp130 *Cross*-Regulation durch TNF α sowie Ctx geschützt waren, LPS jedoch nach wie vor zu einer signifikant verminderten gp130 Oberflächenexpression führte. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass TNF α und Ctx in der Tat zu einer beschleunigten p38-abhängigen *Cross*-Regulation von gp130 führten, während LPS einen anderen Mechanismus zu induzieren scheint. Bestätigt wurde diese Annahme ferner durch die Befunde von gp130 internalisierungsdefizienten (gp130^{LLAA}) KM-DZ. Mit deren Hilfe konnte eindeutig

nachgewiesen werden, dass TNF α oder Ctx zu einer Internalisierung des Rezeptors führten, da die Behandlung der gp130^{LLAA} KM-DZ mit diesen Stimulanzen keinen Effekt auf die gp130 Expression hatte. Dem gegenüber wiesen LPS-behandelte gp130^{LLAA} KM-DZ immer noch eine signifikante Abnahme der gp130 Expression auf. Ein kompetitiver Effekt aufgrund der LPS-vermittelten IL-6 Sezernierung zwischen Zytokin und dem für die FACS Messung verwendeten Antikörper konnte ausgeschlossen werden. Allerdings ist zu bemerken, dass eine frühe LPS-vermittelte Internalisierung von gp130 trotz der oben erwähnten Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann, da gp130^{LLAA} KM-DZ eine zu WT KM-DZ verlangsamte Reduktion der gp130 Oberflächenexpression aufwies. Während LPS bereits nach 30-minütiger Behandlung eine 50%-ige Reduktion von gp130 auf WT CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ induzierte, war auf gp130^{LLAA} CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ nur eine etwa 20%-ige Reduktion in der gleichen Zeitspanne zu beobachten. Dieses Ergebnis könnte somit ein Hinweis darauf sein, dass LPS gp130 sowohl über eine schnelle p38-abhängige Endozytose, als auch über einen zweiten bisher noch nicht beschriebenen Mechanismus reguliert. Ersteres ist, wie bereits erwähnt, vermutlich auf die autokrine Wirkung proinflammatorischer Zytokine in Folge der LPS-Stimulation zurückzuführen. Eine Beteiligung anderer LPS-induzierter Signalwege (ERK1/2, PI3K/Akt, NF κ B) sowie eine durch die Internalisierung des TLR4 vermittelte gp130 Cross-Regulation konnte hingegen ausgeschlossen werden. Überraschenderweise führte jedoch die Inhibierung der Clathrin-abhängigen nicht aber der Caveolae-vermittelten Endozytose zu einer Hemmung der LPS-vermittelten gp130 Regulation. Dieser Befund deutet daraufhin, dass zusätzlich zur p38/Clathrin-abhängigen Endozytose ein weiterer Regulationsmechanismus existieren muss, der eine Aufnahme von gp130 in Clathrin-umhüllte Vesikel begünstigt.

Es stellt sich allerdings weiterhin die Frage, wie LPS langfristig die Transkription von *Il6st* inhibiert. Eine Erklärung könnte zum einen in der direkten Aktivierung eines supprimierenden Transkriptionsfaktors oder aber in der Induktion eines indirekt wirkenden *de novo* synthetisierten Proteins begründet sein. Die LPS-induzierte IL-2 Produktion (Abb. 24B sowie [307]) stellt in diesem Zusammenhang einen interessanten Kandidaten dar, da dieses Zytokin die Transkription von *Il6r* und *Il6st* in T-Zellen inhibierte [246]. *Mnasria et al.* [308] und *Herr et al.* [309] konnten zeigen, dass DZ den IL-2 Rezeptor exprimieren und IL-2 die Zytokinproduktion der DZ beeinflusst. Demzufolge bestünde die Möglichkeit, dass IL-2 einen negativen Rückkopplungsmechanismus induziert, der die gp130 Transkription in DZ inhibiert.

5.2 Die gp130^{LLAA} *knockin* Mauslinie – ein neues Mausmodell zur Untersuchung der gp130 Endozytose

Das im zytoplasmatischen Bereich von gp130 liegende und zwischen den Spezies konservierte Dileucin-Motiv (human: L₇₈₆L₇₈₇; murin: L₇₈₄L₇₈₅) gilt als notwendige Voraussetzung für die Liganden- [53, 147] und die *Crosstalk*-vermittelte Internalisierung des Rezeptors [52]. Sowohl *Dittrich et al.* [147] als auch *Radtke et al.* [52] konnten eindrucksvoll zeigen, dass bereits eine Punktmutation des Dileucin-Motivs zu Dialanin die Endozytose von gp130 verhinderte. Auf Grundlage dieser Experimente wurde mit Hilfe einer *knockin*-Strategie, bei der die für das Dileucin-Motiv kodierende Basenfolge im *Il6st* Gen zu einer für ein Dialanin kodierenden verändert wurde, eine neue Mauslinie generiert. Diese ist dadurch charakterisiert, dass sie erstens alle anderen bisher beschriebenen Regulationsmechanismen unbeeinflusst zulässt (Rekrutierung von SOCS1/SOCS3 oder SHP-2) und zweitens weder durch das gleichzeitige Vorhandensein eines WT-gp130 noch durch die Überexpression des Rezeptors beeinflusst ist.

Die hier erhobenen Daten geben somit erstmals einen Hinweis darauf, welche Rolle die gp130 Internalisierung bei der Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen hat und inwiefern sich die Homöostase myeloider und lymphoider Zellen von gp130^{LLAA} und WT Mäusen unterscheidet.

5.2.1 Die gp130^{LLAA} Mäuse zeichnen sich durch eine erhöhte gp130 Expression aus

Die Frage die sich zunächst stellte war, ob die *knockin* Mutation einen Einfluss auf die gp130 Expression der gp130^{LLAA} Mäuse hat. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit wurde gezeigt, dass in ausdifferenzierten gp130^{LLAA} KM-DZ die *Il6st* mRNA Expression 1,5-fach erhöht, sowie die Gesamtprotein- und Zelloberflächenexpression auf den CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ deutlich verstärkt war (4-fach). Darüber hinaus lieferte die Analyse der gp130 Expression über den Verlauf der KM-DZ Differenzierung einen Hinweis darauf, dass bereits Vorläuferzellen über ein erhöhtes gp130 Expressionsniveau verfügen. In den Gesamtzelllysaten von Tag 3 und Tag 6 KM-DZ Kulturen wie auch in den Lysaten des Knochenmarks von gp130^{LLAA} Tieren wurde ein sichtbar stärkeres Proteinsignal für gp130 nachgewiesen. Die durchflusszytometrische Analyse des Knochenmarks bestätigte ferner, dass MΦ/DZ-Vorläufer (MDP, Lin⁻MHCII⁻CD11c⁻CD135⁺) und prä-DZ (Lin⁻MHCII⁻CD11c⁺CD135⁺) von gp130^{LLAA} Mäusen eine im Vergleich zu WT Mäusen verstärkte

gp130 Expression aufwiesen. Darüber hinaus belegten weitere Untersuchungen dieser Arbeit sowie innerhalb der Arbeitsgruppe, dass die *knockin* Mutation generell zu einer verstärkten gp130 Expression auf verschiedenen Immunzellen myeloiden (M Φ , KDZ, pDZ) und lymphoiden Ursprungs (T- und B-Zellen) sowie auf geweberesidenten Zellen der Lunge, der Haut und des kardiovaskulären Systems führt (unveröffentlichte Daten von C. Mais, C. Schäfer und H. Boekhoff). Interessant hierbei war vor allem der Befund, dass sich nicht nur die relative Zunahme der gp130 Expression zwischen den verschiedenen Zelltypen unterschied (T-Zellen – 5-fach; B-Zellen – 10-fach; M Φ – 6-fach), sondern ebenfalls zwischen den DZ Subtypen (KDZ – 12-fach; pDZ – 9-fach). Dies könnte einerseits auf eine unterschiedliche transkriptionelle Regulation, andererseits aber auch auf ein unterschiedliches *Trafficking* (lysosomale Degradation, Recycling) des Rezeptors (abhängig vom Zelltyp) zurückzuführen sein.

Da die Zunahme der Proteinexpression (3 – 4-fach) nicht im Verhältnis zum Anstieg der *Il6st* mRNA Expression in gp130^{LLAA} KM-DZ stand (1,5-fach), wurde vermutet, dass es sich beim Anstieg der gp130 Expression nicht (nur) um einen transkriptionellen Effekt handelte. In Studien mit Hepatozyten (HepG2) wurde gezeigt, dass gp130 konstitutiv mit dem Adapterprotein AP2 assoziiert vorliegt [228]. Von diesem ist bekannt, dass es an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt ist [241]. *Thiel et al.* [228] vermuteten, dass die konstitutive gp130 Internalisierung, die sie in gp130-transfizierten COS-7 Zellen beobachtet haben, die Folge dieser Assoziation von gp130 mit AP2 ist. AP2 bindet entweder über ein Tyrosin- oder aber Dileucin-Motiv an die zu transportierenden Frachtproteine [310, 311]. Folglich postulierten sie, dass AP2 über das von *Dittrich et al.* [147] identifizierte Dileucin-Motiv an gp130 bindet und so eine Liganden-unabhängige Clathrin-vermittelte Internalisierung des Rezeptors vermittelt. Da demzufolge die Mutation des Dileucin-Motivs zu Dialanin die konstitutive Assoziation von AP2 mit gp130 verhindert, kann vermutet werden, dass die verstärkte Expression von gp130 auf den Verlust der konstitutiven Internalisierung des Rezeptors zurückzuführen ist. Bestärkt wurde diese Hypothese durch den Nachweis, dass bei der Immundetektion von gp130 zwei Proteinsignale auf den *Blotting*-Membranen nachgewiesen wurden, aber nur das molekular schwerere Protein in den Gesamtzelllysaten der gp130^{LLAA} KM-DZ eine starke Zunahme zeigte. Das Molekulargewicht von gp130 kann aufgrund seiner posttranslationalen Modifikationen (Glykosylierungen) schwanken [312]. Während reifes an der Zelloberfläche exponiertes gp130 im Schnitt 140kDa schwer ist, weist das noch unreife innerhalb der Zelle vorliegende (ER, Golgi-Apparat) gp130 nur ein Molekulargewicht von etwa 110 kDa auf. Bei entsprechender Auftrennung durch

*SDS-PAGE*²³ können beide gp130 Varianten mittels Immundetektion nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde geschlussfolgert, dass die mittels Western Blot nachgewiesenen Proteinsignale komplex glykosyliertem (reifen) und mannosereich glykosyliertem gp130 (unreifen) entsprachen [312]. Demzufolge weisen WT und gp130^{LLAA} KM-DZ zwar ähnliche Mengen der unreifen gp130 Variante auf, doch besitzen gp130^{LLAA} KM-DZ einen deutlich höheren Anteil der reifen gp130 Variante. Daher ist die verstärkte Expression vermutlich auf die Anreicherung des Rezeptors an der Oberfläche zurückzuführen und nicht (ausschließlich) auf eine gesteigerte transkriptionelle Regulation. Weiterführende Experimente müssen jedoch klären, ob in der Tat eine fehlende Assoziation von gp130 und AP2 den beobachteten Effekt erklären können. Denkbar wäre, dies anhand von Immunpräzipitationsexperimenten genauer zu analysieren.

5.2.2 Die gp130^{LLAA} KM-DZ zeigen eine erhöhte Responsivität gegenüber hyper-IL-6

Aufgrund der verstärkten IL-6 Rezeptorexpression auf gp130^{LLAA} KM-DZ stellte sich die Frage, ob diese Zellen sensitiver auf IL-6 reagieren. Daher wurden KM-DZ Kulturen beider Genotypen in gleicher Art und Weise mit aufsteigender Konzentration an IL-6 stimuliert und die Zellaktivierung anhand der STAT3 Tyrosinphosphorylierung untersucht. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass gp130^{LLAA} und WT KM-DZ keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der IL-6-Sensitivität zeigten. Bereits bei geringen Konzentrationen (0.5 ng/ml) wurde sowohl bei den gp130^{LLAA} als auch bei den WT KM-DZ eine Zunahme der STAT3 Phosphorylierung nachgewiesen. Die densitometrische Analyse ergab zwar eine tendenziell stärkere Zunahme bei den gp130^{LLAA} KM-DZ, die sich aber nicht signifikant von der bei den WT KM-DZ unterschied. Ein Erklärung hierfür könnte sein, dass gp130^{LLAA} KM-DZ (CD11c⁺MHCII⁺) eine im Verhältnis zu WT KM-DZ geringere (wenn auch nicht signifikant verminderte) IL-6R Expression aufwiesen. IL-6 besitzt nur eine geringe Affinität zu gp130, die erst nach der Bindung an den spezifischen α -Rezeptor IL-6R verstärkt wird [115]. Folglich fungiert eine geringere IL-6R Expression als limitierender Faktor des IL-6-Signals. Die verminderte IL-6R Expression könnte somit einen Kompensationseffekt in Folge der erhöhten gp130

²³ SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Expression darstellen, um die KM-DZ auf diese Weise vor einer verstärkten IL-6-Anwort zu schützen. Im Zusammenhang hiermit steht auch der Befund, dass gp130^{LLAA} KM-DZ deutlich sensitiver auf das IL-6 *trans*-Signal reagierten als WT KM-DZ. Die Analyse ergab, dass 1 ng/ml hyper-IL-6 genügte um einen Anstieg der STAT3-Phosphorylierung in gp130^{LLAA} KM-DZ zu induzieren. Es bedurfte aber um das 50-fache mehr an hyper-IL-6, um eine vergleichbare Induktion der STAT3 Aktivierung in WT KM-DZ zu induzieren. Ein ähnliches Ergebnis lieferten bereits frühere Untersuchungen mit der pro-B-Zelllinie Ba/F3, die entweder mit einer WT (gp130^{WT}) oder aber einer *knockin* Variante (gp130^{AA}) von gp130 transfiziert wurden [313]. Im Unterschied zu den Ba/F3-gp130^{WT} Zellen wiesen die Ba/F3-gp130^{AA} Zellen eine stärkere STAT3 und STAT1 Homo- und Heterodimerisierung nach Behandlung mit IL-6/sIL-6R auf, was ebenfalls auf eine stärkere Zellaktivierung hindeutet.

Diese Befunde lassen darauf schließen, dass gp130^{LLAA} KM-DZ sensitiver auf IL-6 reagieren, jedoch die verminderte Expression des membranständigen IL-6R als ein limitierender Faktor zum Schutz vor einem zu starken IL-6-Signal dient. Welchen Einfluss die fehlende gp130 Endozytose auf die Dauer des IL-6-Signals in DZ hat, ist bisher noch nicht untersucht und bleibt zu klären.

5.2.3 Die gp130^{LLAA} KM-DZ zeigen phänotypische Unterschiede im Vergleich zu WT KM-DZ

Aus Untersuchungen anderer gp130 *knockin* Mutanten war bekannt, dass ein gestörtes SHP2-²⁴ oder STAT3-Signal²⁵ bereits unter *steady state* Bedingungen zu einem veränderten DZ Phänotyp führen kann [179, 314]. Dies warf die Frage auf, ob und welche phänotypischen Unterschiede DZ von gp130^{LLAA} und WT Tieren aufweisen. Aus diesem Grund wurden KM-DZ Kulturen beider Genotypen über den Verlauf der GM-CSF-vermittelten Differenzierung verglichen und der Einfluss der gp130 *knockin* Mutation auf die LPS, TNF α und Ctx-vermittelte DZ Reifung untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die Internalisierung von gp130 bereits früh während der DZ-Ontogenese eine wichtige Rolle zu spielen scheint, da nachgewiesen wurde, dass die KM-DZ Differenzierung in den Knochenmark-Kulturen der gp130^{LLAA} Mäuse retardiert war. Die Analyse zeigte, dass nicht nur der Anteil an unreifen KM-DZ (CD11c⁺ Zellen mit geringer MHCII

²⁴ gp130^{F795} Mutante: verhindert SHP2/SOCS3 Rekrutierung, verhindert Ras/Raf/ERK, verlängert STAT3-Signal

²⁵ gp130^{FxxQ} Mutante: verhindert STAT3 Aktivierung

Expression) in den gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen deutlich höher war, sondern der Gesamtanteil der CD11c⁺ Zellen zu Beginn der Kultivierung deutlich geringer war als in den WT Kulturen (Tag 3: WT - 16,9%; gp130^{LLAA} -10,3%). Da jedoch der Unterschied zwischen beiden Genotypen im Verlauf der Kultivierung immer mehr abnahm, kann vermutet werden, dass entweder ein durch gp130-induziertes Signal im Verlauf der GM-CSF-vermittelten Differenzierung abgeschwächt wird oder aber ein für DZ notwendiges Wachstumssignal zu Beginn der Differenzierung bei den gp130^{LLAA} Zellen abgeschwächt war. Für Letzteres spricht, dass in Analysen bei denen die Expression und Aktivität GM-CSF- und IL-6-relevanter Signalproteine untersucht wurde, eine geringere Expression von PI3K sowie ein im Vergleich zu WT KM-DZ abgeschwächtes pAKT-Signal in den gp130^{LLAA} KM-DZ Lysaten detektiert wurde. Das PI3K/Akt-Signal spielt während der frühen Phase der DZ Differenzierung beim Überleben und der Proliferation der DZ eine wichtige Rolle [315], ist aber auch an der Expression der DZ Oberflächenmarker (inklusive MHCII, CD40, CD80) beteiligt [233]. Einhergehend damit wurde in weiteren Analysen gezeigt, dass die TNF α - und Ctx-vermittelte CD80 und CD86 Expression auf KM-DZ von gp130^{LLAA} Tieren geringfügig vermindert war.

Ein weiterer interessanter Befund war, dass in unbehandelten gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen eine deutlich höhere *Il2*, *Il12a* und *Il12b* mRNA Expression sowie zusätzlich in den Überständen der LPS- und Ctx-behandelten gp130^{LLAA} KM-DZ Kulturen eine deutlich höhere IL-12 (IL-12p70) Konzentration nachgewiesen wurde. IL-12 ist ein für die Induktion der Th1-Antwort essentielles immunmodulierendes Zytokin, da es die IFN γ Freisetzung durch T- und NK-Zellen induziert [316]. IL-2 hingegen gilt als Überlebens- und Wachstumsfaktor regulatorischer T-Zellen (T_{reg}), spielt aber auch bei der Proliferation und Homöostase der T-Helfersubtypen (T_{H1}, T_{H2}, T_{H17} und CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen) eine bedeutende Rolle [200, 246, 317]. Beide Zytokine werden über die Induktion des Calcineurin/NFAT-Signals reguliert [318-321], weshalb es zukünftig interessant wäre zu untersuchen, ob dieser Signalweg möglicherweise in gp130^{LLAA} Mäusen gestört ist.

Aus früheren Studien war bekannt, dass die Behandlung mit LPS zur Produktion von OSM in DZ führt [112, 187]. Einhergehend damit konnte in dieser Arbeit belegt werden, dass sowohl die Stimulation mit LPS als auch mit Ctx zu einem Anstieg der *Osm* mRNA Expression in gp130^{LLAA} und WT KM-DZ führte. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass nicht nur die durch die Behandlung induzierte mRNA Expression in den gp130^{LLAA} KM-DZ deutlich stärker war als im Vergleich zu den WT KM-DZ, sondern ebenso die bereits in unbehandelten gp130^{LLAA} KM-DZ nachgewiesene *Osm* mRNA Expression. Aus Untersuchungen von *Chomarat et al.*

[180] war bekannt, dass das IL-6-Signal die Expression des M-CSFR fördert. Ein vergleichbarer Effekt auf die Expression des GM-CSF Rezeptors (GM-CSFR) ist bisher nicht beschrieben, könnte jedoch die verstärkte *Osm* mRNA Expression in KM-DZ von gp130^{LLAA} Tieren möglicherweise erklären. Da OSM ein STAT5 Zielgen ist [322-324], könnte eine verstärkte GM-CSFR Expression und ein damit verbundenes stärkeres GM-CSF/STAT5-Signal [234] in gp130^{LLAA} KM-DZ zu einer erhöhten OSM Expression in diesen Zellen führen. Weitere Experimente sind jedoch notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen.

5.2.4 Relevanz der gp130 Endozytose für die Homöostase myeloider- und lymphoider Zellen

IL-6 ist nicht nur für die Differenzierung und Maturierung dendritischer Zellen von Bedeutung, sondern spielt generell eine wichtige Rolle bei der Entwicklung hämatopoetischer Zellen. Aus Untersuchungen mit gp130^{F795} Mäusen war bekannt, dass ein gestörtes gp130/STAT3-Signal zu Splenomegalie und Lymphadenopathie [314] sowie zu einem deutlichen Anstieg der Zellzahl verschiedener Immunzellen (kDZ, pDZ, MΦ, T- und B-Zellen) in den lymphatischen Organen führt [179]. Entgegen dieser Befunde wurde bei gp130^{LLAA} Tieren keine Veränderung beim Gewicht der Milz oder der absoluten Zellzahl der lymphatischen Organe (Milz, LK^{ing}) nachgewiesen. Allerdings konnte bei der Analyse der verschiedenen Immunzellpopulationen eine Veränderung bei der Zellzusammensetzung von gp130^{LLAA} und WT Tieren nachgewiesen werden. In der Milz von gp130^{LLAA} Mäusen wurde eine deutliche Abnahme der kDZ (CD11c⁺B220⁺) und B-Zellen (CD19⁺) sowie eine signifikante Zunahme der T-Zellen (CD3⁺CD4⁺ und CD3⁺CD8⁺) nachgewiesen, während in den LK^{ing} die Anzahl an pDZ (CD11c^{high}B200⁻) und Makrophagen (CD11c^{low}B200⁻) teils signifikant erhöht war. Da in den LK^{ing} von gp130^{LLAA} Mäusen zusätzlich ein Trend zur Abnahme der kDZ auftrat, könnte die Differenzierung dieser DZ Subpopulation in diesen Tieren gestört sein. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass die Regulation von gp130 wichtig ist, um eine optimale Differenzierung der kDZ zu gewährleisten. Da kDZ wie zuvor erwähnt nur schwach positiv auf die Expression des LIFR getestet wurden, andererseits aber eine deutlich erhöhte IL-6R Expression aufwiesen, ist ferner davon auszugehen, dass es sich um einen durch IL-6 vermittelten Effekt handelte.

Anders scheint es sich hingegen bei den pDZ zu verhalten. Hier konnte zusätzlich zum Anstieg in den LK^{ing} eine Tendenz zur Abnahme in der Milz von gp130^{LLAA}

Tieren nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet daraufhin, dass die Zunahme der pDZ nicht auf eine gesteigerte Proliferation, sondern vielmehr auf eine Akkumulation der Zellen in den LK^{ing} zurückzuführen ist. Vorstellbar wäre, dass in gp130^{LLAA} Tieren ein gestörtes *Homing*-Signal vorliegt, welches für eine vermehrte Einwanderung der pDZ in die Lymphknoten verantwortlich ist [325-329]. Aus diesem Grund wäre zu überprüfen, ob auch in anderen Bereichen (axial, mesenterial, periaortal) ein erhöhtes Vorkommen der pDZ nachgewiesen werden kann. Eine Ursache könnte u.a. in einer veränderten Expression der *Homing*-Marker²⁶ sowie Adhäsionsmoleküle und/oder deren Liganden²⁷ in den Bereichen der HEV (*high endothelial venules*) von gp130^{LLAA} Mäusen begründet sein [60, 330-332]. Auch wäre zu überprüfen, ob ein verstärktes IL-6- oder LIF-Signal als Ursache in Frage käme, da die gesteigerte gp130 Expression auf den pDZ der gp130^{LLAA} Tiere zu einer erhöhten Responsivität der Zellen geführt haben könnte.

Für die Makrophagen der gp130^{LLAA} wurde ein ähnlicher Befund nachgewiesen wie für die pDZ. Es konnte ein deutlicher Anstieg in den LK^{ing} sowie ein Trend zur Reduktion in der Milz festgestellt werden, was ebenfalls dafür spricht, dass es sich hierbei nicht um eine erhöhte Proliferation, sondern vielmehr um eine veränderte Lokalisation der Zellen handeln muss.

IL-6 kann sowohl direkt als auch indirekt Einfluss auf die Homöostase von T-Zellen nehmen. Einerseits ist gezeigt, dass das IL-6-Signal die Expression von anti-apoptischen Zielgenen in T-Zellen induziert, wodurch das Überleben der T-Zellen verbessert, ihre Zusammensetzung in den peripheren lymphatischen Organen aber nicht verändert wird [252]. Andererseits gibt es Studien die daraufhin deuten, dass IL-6 einen stark supprimierenden Effekt auf die Differenzierung von Foxp3⁺ T_{reg} Zellen hat [333] und darüber hinaus die Produktion des immunstimulierenden Zytokins IL-7 in nicht-hämatopoetischen Zellen induziert [334, 335]. In Abwesenheit regulatorischer T-Zellen, könnte eine erhöhte IL-7 Produktion somit zu einer verstärkten T-Zell Proliferation führen [336]. Interessant jedoch ist, dass zwar ein signifikanter Anstieg beider T-Zell Subpopulationen (CD4⁺ und CD8⁺) in der Milz, jedoch nur ein Anstieg der CD8⁺ T-Zellen in den LK^{ing} von gp130^{LLAA} Tieren festgestellt wurde. Dieser Befund lässt vermuten, dass sich eine fehlende gp130 Endozytose günstiger auf die Proliferation der CD8⁺ T-Zellen auswirkt. Wie zuvor erwähnt, stellt IL-2 ein für die T-Zell Homöostase wichtiges Zytokin dar. Während

²⁶ CCR7, CD62L, ICAM-1, VCAM-1, P-Selektin, β 1 und β 2 Integrin

²⁷ CXCL5, CXCL6, CCL2, CCL8, CXCL9, CXCL10

naïve CD4⁺ Zellen nahezu keine Expression des IL-2 Rezeptorkomplexes aufweisen, zeigen CD8⁺ T-Zellen eine schwache, aber dafür signifikante Expression des Rezeptors [337]. *In vitro* Experimente mit gp130^{LLAA} KM-DZ ließen vermuten (siehe Abschnitt 4.2.4), dass die *Il2* mRNA Expression in DZ gestört ist. Obwohl bisherige Untersuchungen eine DZ-abhängige IL-2 Produktion nur nach Aktivierung durch mikrobielle Antigene belegen [337, 338], wäre vorstellbar, dass die fehlende gp130 Endozytose bereits in Abwesenheit einer Infektion (oder anderer Stimuli) zur IL-2 Produktion führt und dadurch zur Proliferation/Überleben der CD8 T-Zellen beiträgt.

In weiteren Analysen wurde festgestellt, dass die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von gp130^{LLAA} Tieren signifikant weniger IL-6R exprimierten, als T-Zellen von WT Tieren. Im Unterschied dazu wurde auf DZ und MΦ von gp130^{LLAA} Tieren eine zu WT Tieren vergleichbare (DZ) bzw. verstärkte IL-6R Expression nachgewiesen (MΦ), weshalb angenommen wurde, dass es sich um einen spezifischen Effekt handeln muss. Dies könnte wiederum ein Hinweis auf eine verstärkte T-Zellaktivierung sein, da bekannt ist, dass die TCR-Aktivierung (TCR, *T cell receptor*) und Reifung bestimmter Effektor-T-Zellen mit einem Verlust der IL-6R Expression einhergeht [245, 246, 339]. Demzufolge ist es ebenso möglich, dass die erhöhte Frequenz an T-Zellen nicht auf ein gesteigertes Überleben peripherer naiver T-Zellen zurückzuführen ist [252], sondern vielmehr auf eine erhöhte Proliferation von T-Effektorzellen.

IL-6 gilt als ein wichtiger Faktor für das Überleben, die Expansion und die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen [60, 189, 340]. Entgegen den Erwartungen konnte in der Milz von gp130^{LLAA} Mäusen eine signifikante Abnahme der B-Zellen, jedoch ein geringer Trend zur Zunahme in den LK^{ing} dieser Tiere nachgewiesen werden. Da der zur Identifizierung der B-Zell Population verwendete Oberflächenmarker CD19 sowohl auf naiven B-Zellen als auch differenzierten Plasmazellen exprimiert wird [341], war auszuschließen, dass es sich um einen unspezifischen Effekt aufgrund einer veränderten Expression dieses Oberflächenmarkers handelte. Offen bleibt jedoch, weshalb eine erhöhte gp130 Expression auf CD19⁺ B-Zellen bei einer im Vergleich zu WT Zellen unveränderten IL-6R Expression zu einer deutlichen Abnahme dieser in der Milz führt. Da in der Literatur bisher keine vergleichbaren Befunde beschrieben sind, müssen zukünftige Experimente zu diesem Punkt Klarheit verschaffen.

Zusammengefasst legen diese Ergebnisse dar, dass eine fehlende gp130 Expression die Homöostase verschiedener Immunzellen auf verschiedene Art und Weise

beeinflussen kann. Es sind jedoch eine Reihe weiterführender Experimente notwendig, um einerseits aufzuklären welche der diskutierten Faktoren für die veränderte Zellzusammensetzung in den lymphatischen Organen der gp130^{LLAA} Tiere verantwortlich ist. Andererseits ist die Frage zu beantworten, welche Relevanz diese Veränderung beim Verlauf einer Infektion bzw. eines IL-6-assoziierten Krankheitsbild hat.

5.3 Die Rolle von Oncostatin M beim antiviralen Status von dermalen Fibroblasten

Das Erkennen von konservierten Pathogen-assoziierten molekularen Strukturen (PAMPs, *Pathogen-associated molecular patterns*) durch PRRs stellt wie bereits erwähnt einen ersten wichtigen Schritt der angeborenen Immunantwort bei der Abwehr von Infektionen dar. Hierbei unterscheidet man die membranassoziierten PRRs, zu denen die *Toll-like receptors* (TLRs) und die *C-type lectin receptors* (CTLs) gehören, von den zytoplasmatischen PRRs, zu denen die RLRs und die *nucleotide binding leucine rich repeat* (NLR) *containing receptors*, auch bekannt als *NOD-like receptors*, gehören [342, 343]. Eine Reihe von Studien zeigte, dass die RLRs eine wichtige Rolle bei der Immunantwort von nicht-professionellen Immunzellen wie Fibroblasten, Keratinozyten, Endothelzellen und Epithelzellen spielen [256, 260-263]. Während RIG-I-defiziente MEF nach viraler Infektion kein IFN β produzieren, sind Virus-infizierte DZ aus RIG-I^{-/-} Mäusen nach wie vor in der Lage große Mengen Typ I IFN zu sezernieren [256].

Die RLRs gehören zur Familie der DExD/H-Box RNA Helikasen und fungieren als zytoplasmatische RNA Detektoren bei der antiviralen Immunantwort. Zu den bekanntesten Vertretern gehören die beiden Proteine RIG-I und MDA5 [258, 342, 344]. Sie binden sowohl einzel- (ss) als auch doppelsträngige (ds)RNA, erkennen jedoch unterschiedliche Viren. RIG-I detektiert hauptsächlich Paramyxovirus²⁸-, Rhabdo²⁹- und Orthomyxoviren³⁰, während MDA5 hauptsächlich Picornaviren³¹ erkennt [345]. In Folge der RNA-Bindung kommt es zur Aktivierung der Helikasen und zur Induktion verschiedener Signalkaskaden, die zur Produktion von Typ I IFN und

²⁸ Bsp. Sendai-Virus, Newcastle Disease Virus

²⁹ Bsp. Vesikulärer Stomatitis-Virus

³⁰ Bsp. Influenza Viren

³¹ Bsp. Enzephalomyokarditis Virus

proinflammatorischen Zytokinen führt [256, 257, 346]. Während ruhende Zellen nur ein niedriges RLR Expressionsniveau aufweisen, kommt es in Folge einer viralen Infektion durch die Sezernierung von Typ I Interferonen [265, 345] und proinflammatorischen Zytokinen, wie $\text{IFN}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ [262, 264, 266-275] zu einer verstärkten Induktion der Helikasen.

Obwohl IL-6-Typ Zytokine selbst keine antivirale Aktivität besitzen [276, 277] lassen verschiedene Untersuchungen auf immunmodulierende Eigenschaften schließen. Es wurde gezeigt, dass sowohl IL-6- als auch IL-6R-defiziente Mäuse eine stark verminderte antivirale Immunantwort bei einer Infektion mit Influenza A Viren zeigen [347, 348]. Eine weitere Studie belegt, dass OSM die Expression verschiedener ISG induziert, die mit der Antigenprozessierung und -präsentation in Zusammenhang stehen [100]. In Kombination mit Typ I IFN zeigte OSM sogar einen synergistischen Effekt bei der Abwehr von HCV³² und HAV³³ Infektionen in Hepatomzellen, in dem es die Expression der ISG sowie die Induktion immunstimulatorischer Moleküle wie IL-7 und IL-15R verstärkt [186, 187].

OSM selbst wird von aktivierten Monozyten und Makrophagen sezerniert, kann aber auch von Neutrophilen und dendritischen Zellen durch die Stimulation mit LPS oder GM-CSF freigesetzt werden. Im humanen System signalisiert OSM über zwei Rezeptorkomplexe, den Typ I Rezeptorkomplex bestehend aus gp130 und LIFR sowie den Typ II Rezeptorkomplex aus gp130 und OSMR [22, 25, 26, 88, 148]. Da Gewebezellen, wie Fibroblasten sowohl LIFR als auch OSMR exprimieren, stellen sie potentielle Zielzellen von OSM dar. Fibroblasten finden sich in allen Geweben und gelten als sogenannte Wächterzellen (*sentinel cells*) des Bindegewebes, da sie aufgrund ihrer Fähigkeit große Mengen IFN zu produzieren, eine wichtige Rolle bei der frühen Immunantwort spielen [349].

Obgleich eine OSM-abhängige Induktion verschiedener ISG bereits gezeigt wurde, ist eine OSM-abhängige transkriptionelle Regulation von antiviralen Genen wie RIG-I und MDA5 bisher nicht, oder im Fall von IRF und GBP2 nur unzureichend, beschrieben [100, 187]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals der Nachweis erbracht werden, dass OSM die Induktion der RLRs RIG-I und MDA5 sowie der Transkriptionsfaktoren IRF1/7/9 vermittelt. Weiterhin konnte der zugrundeliegende molekulare Mechanismus mittels RNA Interferenz Studien genauer aufgeklärt werden.

³² Hepatitis-C-Virus

³³ Hepatitis-A-Virus

5.3.1 OSM induziert STAT1-abhängig die Expression der RLR und IRF in humanen Fibroblasten

An Modellen mit rekonstruierter menschlicher Epidermis konnten *Gazel et al.* [100] erstmals zeigen, dass OSM zu frühen Zeitpunkten (1-4 h) die Induktion einer Vielzahl von ISG in Gewebezellen vermittelt, was einen Hinweis auf eine mögliche Verbindung der OSM- und IFN-vermittelten Signalwege lieferte.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass OSM zu einer transienten, jedoch signifikant verstärkten Induktion der RLR RIG-I und MDA5 sowie der Transkriptionsfaktoren IRF1, IRF7 und IRF9 in HDF führt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die OSM-abhängige Expression dieser ISGs von der OSM-vermittelten STAT1-Phosphorylierung abhängig ist, da sowohl die Expression von Helikasen als auch von IRF1/7/9 in STAT1-depletierten Zellen inhibiert war. Sowohl IFN γ als auch OSM induzierten eine in ihrer Stärke vergleichbare STAT1-Tyrosin- und Serinphosphorylierung, welche für die maximale transkriptionelle Aktivität wichtig ist [350-352]. Aufgrund dieses Befunds sowie der Beobachtung, dass weder die alleinige Phosphorylierung von Tyr701- noch Ser727-STAT1 ausreicht um die RIG-I Expression zu induzieren (Daten aus dieser Arbeit und C. Hintzen [262]), wird postuliert, dass die OSM-abhängige Expression der ISG von der simultan induzierten STAT1-Tyrosin-/Serinphosphorylierung abhängig ist. Die unterschiedliche Kinetik der frühen *IRF1* Expression und der darauffolgenden *DDX58/IFIH1* Induktion lässt zudem vermuten, dass die Expression des IRF1 Proteins für die nachgeschaltete Induktion der *DDX58/IFIH1* Expression notwendig ist. Einhergehend damit haben *Su et al.* [353] gezeigt, dass die Mutation potentieller STAT1-Bindungsstellen in der Promotorregion von *DDX58* die Promotoraktivität nicht beeinflusst, wohingegen die Mutation oder Deletion vermeintlicher IRF1-Bindungsstellen die Aktivität des RIG-I-Promotors signifikant vermindert. In Übereinstimmung damit war eine verstärkte Promotoraktivität in IRF1 überexprimierenden Zellen nachzuweisen, wohingegen die Depletion von *IRF1* mittels siRNA die Induktion von RIG-I gänzlich inhibierte [353, 354]. Vergleichbare Studien für eine IRF1-abhängige MDA5 Expression gibt es bisher nicht. Dies müsste daher in zukünftigen Experimenten genauer untersucht werden.

5.3.2 SOCS3 reguliert die OSM-induzierte STAT1-Phosphorylierung

SOCS Proteine gelten als die physiologischen Schlüsselregulatoren des Zytokin-induzierten JAK/STAT Signalwegs. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das STAT3-induzierte SOCS3 ausschlaggebend für die Regulation des STAT1-Signals in HDF ist und folglich die OSM-induzierte ISG Expression limitiert. In Abwesenheit von STAT3 oder SOCS3 induzierte die Behandlung mit OSM eine verstärkte und in ihrer Dauer verlängerte STAT1-Phosphorylierung sowie Expression von ISG, vergleichbar mit der von IL-6-behandelten STAT3^{-/-} MEF oder SOCS3^{-/-} Makrophagen [281, 283, 355, 356]. Croker *et al.* [283] und Johnston *et al.* [355] konnten ebenfalls den Nachweis erbringen, dass das IL-6-Signal gezielt durch die Induktion von SOCS3 nicht aber SOCS1 reguliert wird, da SOCS1-defiziente Zellen weder eine veränderte STAT1- noch STAT3-Phosphorylierung nach IL-6 Stimulation aufwiesen. Die erhöhte SOCS1 mRNA Expression in den OSM-behandelten siSTAT3 und siSOCS3 transfizierten HDF kann als Nachweis dafür gesehen werden, dass SOCS3 auch als Regulator des OSM-Signals fungiert. Dieser Befund bestätigt frühere Beobachtungen, die SOCS3 ebenfalls als Regulator des OSM-vermittelten Signals in anderen Zelltypen identifizierten [284, 285, 357]. Anzumerken ist jedoch, dass SOCS3 kein genereller Inhibitor des OSM-Signals ist, da die STAT3-Tyrosinphosphorylierung im Vergleich zur STAT1-Phosphorylierung nur geringfügig durch den *knockdown* von SOCS3 beeinflusst war. Dies impliziert, dass SOCS3 vielmehr für die Feinabstimmung des OSM-vermittelten Signals in verschiedenen Zellen fungiert.

In weiteren Analysen wurden darüber hinaus gezeigt, dass ebenfalls der Verlust der Proteintyrosinphosphatase PTPN2 oder des Ubiquitin-verwandten Proteins SUMO-1 mit einem Trend zur verstärkten Regulation der ISG Expression einhergeht. Dies war zwar nicht mit siSOCS3 transfizierten HDF zu vergleichen, was daraufhin deutet, dass SOCS3 der dominantere Regulator ist, jedoch wäre es interessant zu untersuchen, welchen Einfluss eine kombinierte Behandlung mit SOCS3/PTPN2 siRNA oder SOCS3/SUMO1 siRNA auf die Expression der antiviralen Gene hat.

5.3.3 OSM verstärkt die IFN-induzierte Expression der Helikasen in HDF

Interferone gelten als die Schlüsselzytokine der antiviralen Immunantwort, da sie schon früh während der Induktion einer Immunantwort freigesetzt werden und Zellen dazu anregen Gene und Proteine mit antiviralen, antiproliferativen und immunmodulierenden Eigenschaften zu induzieren. Zu den IFN-produzierenden

Zellen gehören neben T- und B-Zellen auch aktivierte antigenpräsentierende Zellen (APZ) und Fibroblasten [187, 309, 358].

Larrea et al. [187] haben gezeigt, dass TLR-Liganden nicht nur die Sekretion von Typ I IFN in APZ induzieren, sondern zeitgleich die Freisetzung von OSM vermitteln. Da jedoch APZ (im humanen System) weder den LIFR noch den OSMR auf ihrer Oberfläche exprimieren, schlussfolgerten sie, dass OSM für den *Crosstalk* zwischen APZ und Hepatozyten verantwortlich sein muss, da Leberepithelzellen beide Rezeptoren in großen Mengen exprimieren [187, 188]. Mit Hilfe von *in vitro* Experimenten konnte schließlich gezeigt werden, dass OSM nicht nur die Induktion einer Reihe verschiedener immunstimulatorischer Moleküle in Hepatomzellen vermittelte, sondern die Kombination aus OSM und IFN α eine verstärkte antivirale Immunantwort in den Leberzellen, nach einer Infektion mit HCV und HAV, auslöste [186-188]. OSM vermittelte dabei selber keine antivirale Aktivität, verstärkte jedoch die IFN-induzierte Expression von ISG, inklusive *TRIM22*³⁴, *ISG20*³⁵, *GBP2*³⁶ sowie von immunstimulatorischen Molekülen, wie *IL7*³⁷ und *IL15RA*³⁸.

In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen konnte auch in dieser Arbeit ein kostimulatorischer Effekt von IFN γ , welches ebenfalls von aktivierten APZ freigesetzt wird [359, 360], und OSM in HDF nachgewiesen werden. Es stellte sich heraus, dass die Vorbehandlung mit OSM oder die zeitgleiche Gabe von OSM und IFN γ zu einer verstärkten antiviralen Immunantwort in EMCV-infizierten HDF führte, da bereits geringere Mengen IFN γ genügten, um eine adäquate antivirale Immunantwort zu induzieren (nicht veröffentlichte Daten in Kooperation mit A. Costa-Pereira). Als Ursache hierfür wurde ebenfalls eine Verstärkung der durch IFN γ -induzierten ISG in HDF vermutet. Obwohl IFN γ selbst ein starker Induktor der Helikasen ist [267-273] stellte sich heraus, dass das OSM-Signal mit dem IFN γ -Signal kooperiert und zu einer verstärkten *DDX58* und *IFIH1* sowie RIG-I und MDA5 Expression führte. Diese erhöhte Helikasenexpression, insbesondere von MDA5³⁹, könnte den günstigen Effekt der OSM- und IFN γ -vermittelten Immunantwort in HDF bei einer EMCV Infektion erklären.

³⁴ TRIM22

³⁵ ISG20

³⁶ GBP2

³⁷ IL-7

³⁸ IL15RA

³⁹ MDA5 – erkennt und bindet Picornaviren, inklusive EMCV

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;334 (Pt 2):297-314.
- [2] Derouet D, Rousseau F, Alfonsi F, Froger J, Hermann J, Barbier F, et al. Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:4827-32.
- [3] Ghilardi N, Li J, Hongo JA, Yi S, Gurney A, de Sauvage FJ. A novel type I cytokine receptor is expressed on monocytes, signals proliferation, and activates STAT-3 and STAT-5. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:16831-6.
- [4] Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Bilsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 2004;5:752-60.
- [5] Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990;87:6934-8.
- [6] Devergne O, Birkenbach M, Kieff E. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:12041-6.
- [7] Collison LW, Delgoffe GM, Guy CS, Vignali KM, Chaturvedi V, Fairweather D, et al. The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nat Immunol* 2012;13:290-9.
- [8] Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* 2002;16:779-90.
- [9] Baumann H, Won KA, Jahreis GP. Human hepatocyte-stimulating factor-III and interleukin-6 are structurally and immunologically distinct but regulate the production of the same acute phase plasma proteins. *The Journal of biological chemistry* 1989;264:8046-51.
- [10] Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Fabra R, Trullenque R, Heinrich PC. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* 1990;12:1179-86.
- [11] Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.
- [12] Peters M, Roeb E, Pennica D, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S. A new hepatocyte stimulating factor: cardiostrophin-1 (CT-1). *FEBS letters* 1995;372:177-80.
- [13] Richards CD, Brown TJ, Shoyab M, Baumann H, Gauldie J. Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro. *J Immunol* 1992;148:1731-6.

- [14] White UA, Stephens JM. The gp130 receptor cytokine family: regulators of adipocyte development and function. *Curr Pharm Des* 2011;17:340-6.
- [15] Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, Rosales R, Vaisberg E, Bazan JF, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 2004;172:2225-31.
- [16] Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, et al. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 1991;253:59-63.
- [17] Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, et al. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 1988;241:825-8.
- [18] Murakami M, Hibi M, Nakagawa N, Nakagawa T, Yasukawa K, Yamanishi K, et al. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 1993;260:1808-10.
- [19] Hilton DJ, Hilton AA, Raicevic A, Rakar S, Harrison-Smith M, Gough NM, et al. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *The EMBO journal* 1994;13:4765-75.
- [20] Vlotides G, Zitzmann K, Stalla GK, Auernhammer CJ. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine (CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions. *Cytokine & growth factor reviews* 2004;15:325-36.
- [21] White UA, Stephens JM. Neuropoietin activates STAT3 independent of LIFR activation in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;395:48-50.
- [22] Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, et al. THE IL-6 SIGNAL TRANSDUCER, GP130 - AN ONCOSTATIN-M RECEPTOR AND AFFINITY CONVERTER FOR THE LIF RECEPTOR. *Science* 1992;255:1434-7.
- [23] Hilton DJ, Nicola NA. Kinetic analyses of the binding of leukemia inhibitory factor to receptor on cells and membranes and in detergent solution. *The Journal of biological chemistry* 1992;267:10238-47.
- [24] Zhang JG, Owczarek CM, Ward LD, Howlett GJ, Fabri LJ, Roberts BA, et al. Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem J* 1997;325 (Pt 3):693-700.
- [25] Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, et al. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:32635-43.
- [26] Drechsler J, Grotzinger J, Hermanns HM. Characterization of the Rat Oncostatin M Receptor Complex Which Resembles the Human, but Differs from the Murine Cytokine Receptor. *PloS one* 2012;7:12.
- [27] Muller-Newen G, Kohne C, Keul R, Hemmann U, Muller-Esterl W, Wijdenes J, et al. Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *European journal of biochemistry / FEBS* 1996;236:837-42.

- [28] Novick D, Engelmann H, Wallach D, Rubinstein M. Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J Exp Med* 1989;170:1409-14.
- [29] Baumann H, Wang Y, Morella KK, Lai CF, Dams H, Hilton DJ, et al. Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells. *J Immunol* 1996;157:284-90.
- [30] Karow J, Hudson KR, Hall MA, Vernallis AB, Taylor JA, Gossler A, et al. Mediation of interleukin-11-dependent biological responses by a soluble form of the interleukin-11 receptor. *Biochem J* 1996;318 (Pt 2):489-95.
- [31] Davis S, Aldrich TH, Ip NY, Stahl N, Scherer S, Farruggella T, et al. Released form of CNTF receptor alpha component as a soluble mediator of CNTF responses. *Science* 1993;259:1736-9.
- [32] Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, et al. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 1993;82:1120-6.
- [33] Zhang JG, Zhang Y, Owczarek CM, Ward LD, Moritz RL, Simpson RJ, et al. Identification and characterization of two distinct truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain in normal human urine and plasma. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:10798-805.
- [34] Diveu C, Venereau E, Froger J, Ravon E, Grimaud L, Rousseau F, et al. Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M/interleukin-31 shared receptor. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:36673-82.
- [35] Layton MJ, Cross BA, Metcalf D, Ward LD, Simpson RJ, Nicola NA. A major binding protein for leukemia inhibitory factor in normal mouse serum: identification as a soluble form of the cellular receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992;89:8616-20.
- [36] Dietrich C, Candon S, Ruemmele FM, Devergne O. A soluble form of IL-27Alpha is a natural IL-27 antagonist. *J Immunol* 2014;192:5382-9.
- [37] Lokau J, Agthe M, Garbers C. Generation of Soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 Receptors: A Crucial Function for Proteases during Inflammation. *Mediators Inflamm* 2016;2016:1785021.
- [38] Matthews V, Schuster B, Schutze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, et al. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *The Journal of biological chemistry* 2003;278:38829-39.
- [39] Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, et al. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European journal of immunology* 1993;23:473-80.
- [40] Kamiguchi H, Yoshida K, Sagoh M, Sasaki H, Inaba M, Wakamoto H, et al. Release of ciliary neurotrophic factor from cultured astrocytes and its modulation by cytokines. *Neurochem Res* 1995;20:1187-93.

- [41] Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* 1992;4:96-100.
- [42] Muller-Newen G, Kohne C, Heinrich PC. Soluble receptors for cytokines and growth factors. *Int Arch Allergy Immunol* 1996;111:99-106.
- [43] Rose-John S, Scheller J, Schaper F. "Family reunion"--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine & growth factor reviews* 2015;26:471-4.
- [44] Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, et al. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:407-11.
- [45] Betz UA, Bloch W, van den Broek M, Yoshida K, Taga T, Kishimoto T, et al. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med* 1998;188:1955-65.
- [46] Kurth I, Horsten U, Pflanz S, Timmermann A, Kuster A, Dahmen H, et al. Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *J Immunol* 2000;164:273-82.
- [47] Gauzzi MC, Barbieri G, Richter MF, Uze G, Ling L, Fellous M, et al. The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:11839-44.
- [48] Huang LJ, Constantinescu SN, Lodish HF. The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol Cell* 2001;8:1327-38.
- [49] Radtke S, Hermanns HM, Haan C, Schmitz-Van De Leur H, Gascan H, Heinrich PC, et al. Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:11297-305.
- [50] Ragimbeau J, Dondi E, Alcover A, Eid P, Uze G, Pellegrini S. The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *The EMBO journal* 2003;22:537-47.
- [51] Thiel S, Behrmann I, Dittrich E, Muys L, Tavernier J, Wijdenes J, et al. Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998;330 (Pt 1):47-54.
- [52] Radtke S, Wuller S, Yang XP, Lippok BE, Mutze B, Mais C, et al. Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *J Cell Sci* 2010;123:947-59.
- [53] Dittrich E, Rose-John S, Gerhartz C, Mullberg J, Stoyan T, Yasukawa K, et al. 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. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:19014-20.

- [54] Hirano T, Taga T, Matsuda T, Hibi M, Suematsu S, Tang B, et al. Interleukin 6 and its receptor in the immune response and hematopoiesis. *Int J Cell Cloning* 1990;8 Suppl 1:155-66; discussion 66-7.
- [55] Andus T, Geiger T, Hirano T, Northoff H, Ganter U, Bauer J, et al. Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS letters* 1987;221:18-22.
- [56] Yoshizaki K, Nakagawa T, Fukunaga K, Tseng LT, Yamamura Y, Kishimoto T. Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line. *J Immunol* 1984;132:2948-54.
- [57] Woloski BM, Fuller GM. Identification and partial characterization of hepatocyte-stimulating factor from leukemia cell lines: comparison with interleukin 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82:1443-7.
- [58] Yasukawa K, Hirano T, Watanabe Y, Muratani K, Matsuda T, Nakai S, et al. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *The EMBO journal* 1987;6:2939-45.
- [59] Klimpel GR. Soluble factor(s) from LPS-activated macrophages induce cytotoxic T cell differentiation from alloantigen-primed spleen cells. *J Immunol* 1980;125:1243-9.
- [60] Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol* 2015;16:448-57.
- [61] Clogston CL, Boone TC, Crandall BC, Mendiaz EA, Lu HS. Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human granulocyte colony stimulating factor. *Arch Biochem Biophys* 1989;272:144-51.
- [62] Gross V, Andus T, Castell J, Vom Berg D, Heinrich PC, Gerok W. O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. *FEBS letters* 1989;247:323-6.
- [63] Simpson RJ, Moritz RL, Van R, Van Snick J. Characterization of a recombinant murine interleukin-6: assignment of disulfide bonds. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;157:364-72.
- [64] Schiel X, Rose-John S, Dufhues G, Schooltink H, Gross V, Heinrich PC. Microheterogeneity of human interleukin 6 synthesized by transfected NIH/3T3 cells: comparison with human monocytes, fibroblasts and endothelial cells. *European journal of immunology* 1990;20:883-7.
- [65] May LT, Ghrayeb J, Santhanam U, Tatter SB, Stoeber Z, Helfgott DC, et al. Synthesis and secretion of multiple forms of beta 2-interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte-stimulating factor by human fibroblasts and monocytes. *The Journal of biological chemistry* 1988;263:7760-6.
- [66] Aarden LA, De Groot ER, Schaap OL, Lansdorp PM. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *European journal of immunology* 1987;17:1411-6.
- [67] Van Snick J, Cayphas S, Vink A, Uyttenhove C, Coulie PG, Rubira MR, et al. Purification and NH2-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor

activity for B-cell hybridomas. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1986;83:9679-83.

[68] Hirano T, Taga T, Nakano N, Yasukawa K, Kashiwamura S, Shimizu K, et al. Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1985;82:5490-4.

[69] Van Damme J, Cayphas S, Opdenakker G, Billiau A, Van Snick J. Interleukin 1 and poly(rI).poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. European journal of immunology 1987;17:1-7.

[70] Corbel C, Melchers F. The synergism of accessory cells and of soluble alpha-factors derived from them in the activation of B cells to proliferation. Immunol Rev 1984;78:51-74.

[71] Baumann H, Jahreis GP, Sauder DN, Koj A. Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse. The Journal of biological chemistry 1984;259:7331-42.

[72] Cayphas S, Van Damme J, Vink A, Simpson RJ, Billiau A, Van Snick J. Identification of an interleukin HP1-like plasmacytoma growth factor produced by L cells in response to viral infection. J Immunol 1987;139:2965-9.

[73] Fujisawa H, Wang B, Sauder DN, Kondo S. Effects of interferons on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human keratinocytes. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research 1997;17:347-53.

[74] Miyashita M, Sugimoto K, Suzuki J, Taniguchi S, Aramaki K, Mori KJ. Hierarchical regulation of interleukin production: induction of interleukin 6 (IL-6) production from bone marrow cells and marrow stromal cells by interleukin 3 (IL-3). Leuk Res 1991;15:1125-31.

[75] Sanceau J, Kaisho T, Hirano T, Wietzerbin J. Triggering of the human interleukin-6 gene by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha in monocytic cells involves cooperation between interferon regulatory factor-1, NF kappa B, and Sp1 transcription factors. The Journal of biological chemistry 1995;270:27920-31.

[76] Zhang YH, Lin JX, Vilcek J. Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. Mol Cell Biol 1990;10:3818-23.

[77] Shirota K, LeDuy L, Yuan SY, Jothy S. Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1990;58:303-8.

[78] Bethin KE, Vogt SK, Muglia LJ. Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000;97:9317-22.

[79] Hurst SM, McLoughlin RM, Monslow J, Owens S, Morgan L, Fuller GM, et al. Secretion of oncostatin M by infiltrating neutrophils: Regulation of IL-6 and chemokine expression in human mesothelial cells. J Immunol 2002;169:5244-51.

- [80] Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci* 2012;8:1237-47.
- [81] Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Muller-Newen G, Grotzinger J, Rose-John S, et al. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine & growth factor reviews* 2012;23:85-97.
- [82] Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest* 2011;121:3375-83.
- [83] Scheller J, Ohnesorge N, Rose-John S. Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer. *Scand J Immunol* 2006;63:321-9.
- [84] Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. ONCOSTATIN-M - A GROWTH-REGULATOR PRODUCED BY DIFFERENTIATED HISTIOCYTIC LYMPHOMA-CELLS. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:9739-43.
- [85] Halfter H, Lotfi R, Westermann R, Young P, Ringelstein EB, Stogbauer FT. Inhibition of growth and induction of differentiation of glioma cell lines by oncostatin M (OSM). *Growth Factors* 1998;15:135-47.
- [86] Liu J, Spence MJ, Wallace PM, Forcier K, Hellstrom I, Vestal RE. Oncostatin M-specific receptor mediates inhibition of breast cancer cell growth and down-regulation of the c-myc proto-oncogene. *Cell Growth Differ* 1997;8:667-76.
- [87] Horn D, Fitzpatrick WC, Gompper PT, Ochs V, Bolton-Hansen M, Zarling J, et al. Regulation of cell growth by recombinant oncostatin M. *Growth Factors* 1990;2:157-65.
- [88] Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 2003;102:3154-62.
- [89] Minehata K, Takeuchi M, Hirabayashi Y, Inoue T, Donovan PJ, Tanaka M, et al. Oncostatin m maintains the hematopoietic microenvironment and retains hematopoietic progenitors in the bone marrow. *Int J Hematol* 2006;84:319-27.
- [90] Mukoyama Y, Hara T, Xu M, Tamura K, Donovan PJ, Kim H, et al. In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity* 1998;8:105-14.
- [91] Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukoyama Y, Hara T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine & growth factor reviews* 2000;11:177-83.
- [92] Lee MJ, Song HY, Kim MR, Sung SM, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M stimulates expression of stromal-derived factor-1 in human mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell B* 2007;39:650-9.
- [93] Kubin T, Poling J, Kostin S, Gajawada P, Hein S, Rees W, et al. Oncostatin M Is a Major Mediator of Cardiomyocyte Dedifferentiation and Remodeling. *Cell Stem Cell* 2011;9:420-32.
- [94] Hams E, Colmont CS, Dioszeghy V, Hammond VJ, Fielding CA, Williams AS, et al. Oncostatin M receptor-beta signaling limits monocytic cell recruitment in acute inflammation. *J Immunol* 2008;181:2174-80.

- [95] Lorchner H, Poling J, Gajawada P, Hou Y, Polyakova V, Kostin S, et al. Myocardial healing requires Reg3beta-dependent accumulation of macrophages in the ischemic heart. *Nat Med* 2015;21:353-62.
- [96] Poling J, Gajawada P, Richter M, Lorchner H, Polyakova V, Kostin S, et al. Therapeutic targeting of the oncostatin M receptor-beta prevents inflammatory heart failure. *Basic Res Cardiol* 2014;109:396.
- [97] Sun D, Li S, Wu H, Zhang M, Zhang X, Wei L, et al. Oncostatin M (OSM) protects against cardiac ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice by regulating apoptosis, mitochondrial biogenesis and insulin sensitivity. *J Cell Mol Med* 2015;19:1296-307.
- [98] Hui W, Bell M, Carroll G. Detection of oncostatin M in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1997;56:184-7.
- [99] Bonifati C, Mussi A, D'Auria L, Carducci M, Trento E, Cordiali-Fei P, et al. Spontaneous release of leukemia inhibitory factor and oncostatin-M is increased in supernatants of short-term organ cultures from lesional psoriatic skin. *Arch Dermatol Res* 1998;290:9-13.
- [100] Gazel A, Rosdy M, Bertin B, Tornier C, Sahuc F, Blumenberg M. A characteristic subset of psoriasis-associated genes is induced by oncostatin-m in reconstituted epidermis. *J Invest Dermatol* 2006;126:2647-57.
- [101] Albasanz-Puig A, Murray J, Preusch M, Coan D, Namekata M, Patel Y, et al. Oncostatin M is expressed in atherosclerotic lesions: A role for Oncostatin M in the pathogenesis of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2011;216:292-8.
- [102] Hintzen C, Haan C, Tuckermann JP, Heinrich PC, Hermanns HM. Oncostatin M-Induced and Constitutive Activation of the JAK2/STAT5/CIS Pathway Suppresses CCL1, but Not CCL7 and CCL8, Chemokine Expression. *J Immunol* 2008;181:7341-9.
- [103] Hintzen C, Quaiser S, Pap T, Heinrich PC, Hermanns HM. Induction of CCL13 expression in synovial fibroblasts highlights a significant role of oncostatin M in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2009;60:1932-43.
- [104] Hohensinner PJ, Kaun C, Rychli K, Niessner A, Pfaffenberger S, Rega G, et al. The inflammatory mediator oncostatin M induces stromal derived factor-1 in human adult cardiac cells. *Faseb J* 2009;23:774-82.
- [105] Langdon C, Kerr C, Tong L, Richards CD. Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol* 2003;170:548-55.
- [106] Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ, et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest* 2010;120:582-92.
- [107] Miyaoka Y, Tanaka M, Naiki T, Miyajima A. Oncostatin M inhibits adipogenesis through the RAS/ERK and STAT5 signaling pathways. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:37913-20.
- [108] Song HY, Jeon ES, Kim JI, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2007;101:1238-51.

- [109] Komori T, Tanaka M, Senba E, Miyajima A, Morikawa Y. Deficiency of oncostatin M receptor beta (OSMRbeta) exacerbates high-fat diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. *The Journal of biological chemistry* 2014;289:13821-37.
- [110] Linsley PS, Kallestad J, Ochs V, Neubauer M. CLEAVAGE OF A HYDROPHILIC C-TERMINAL DOMAIN INCREASES GROWTH-INHIBITORY ACTIVITY OF ONCOSTATIN-M. *Mol Cell Biol* 1990;10:1882-90.
- [111] Malik N, Kallestad JC, Gunderson NL, Austin SD, Neubauer MG, Ochs V, et al. MOLECULAR-CLONING, SEQUENCE-ANALYSIS, AND FUNCTIONAL EXPRESSION OF A NOVEL GROWTH-REGULATOR, ONCOSTATIN-M. *Mol Cell Biol* 1989;9:2847-53.
- [112] Suda T, Chida K, Todate A, Ide K, Asada K, Nakamura Y, et al. Oncostatin M production by human dendritic cells in response to bacterial products. *Cytokine* 2002;17:335-40.
- [113] Grenier A, Combaux D, Chastre J, Gougerot-Pocidallo MA, Gibert C, Dehoux M, et al. Oncostatin M production by blood and alveolar neutrophils during acute lung injury. *Lab Invest* 2001;81:133-41.
- [114] Brown TJ, Lioubin MN, Marquardt H. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF CYTOSTATIC LYMPHOKINES PRODUCED BY ACTIVATED HUMAN LYMPHOCYTES-T - SYNERGISTIC ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR-BETA-1, INTERFERON-GAMMA, AND ONCOSTATIN-M FOR HUMAN-MELANOMA CELLS. *J Immunol* 1987;139:2977-83.
- [115] Ward LD, Howlett GJ, Discolo G, Yasukawa K, Hammacher A, Moritz RL, et al. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *The Journal of biological chemistry* 1994;269:23286-9.
- [116] Thiem S, Pierce TP, Palmieri M, Putoczki TL, Buchert M, Preaudet A, et al. mTORC1 inhibition restricts inflammation-associated gastrointestinal tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* 2013;123:767-81.
- [117] Yu H, Liu Y, McFarland BC, Deshane JS, Hurst DR, Ponnazhagan S, et al. SOCS3 Deficiency in Myeloid Cells Promotes Tumor Development: Involvement of STAT3 Activation and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer Immunol Res* 2015;3:727-40.
- [118] Shi Y, Frost PJ, Hoang BQ, Benavides A, Sharma S, Gera JF, et al. IL-6-induced stimulation of c-myc translation in multiple myeloma cells is mediated by myc internal ribosome entry site function and the RNA-binding protein, hnRNP A1. *Cancer Res* 2008;68:10215-22.
- [119] Bellone S, Watts K, Cane S, Palmieri M, Cannon MJ, Burnett A, et al. High serum levels of interleukin-6 in endometrial carcinoma are associated with uterine serous papillary histology, a highly aggressive and chemotherapy-resistant variant of endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 2005;98:92-8.
- [120] Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Chou CH, Lai KB, Lee CN, et al. Interleukin-6 promotes cervical tumor growth by VEGF-dependent angiogenesis via a STAT3 pathway. *Oncogene* 2003;22:1517-27.

- [121] Chung SJ, Kwon YJ, Park MC, Park YB, Lee SK. The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Yonsei Med J* 2011;52:113-20.
- [122] Hsu CP, Chen YL, Huang CC, Chou CC, Liu CL, Hung CH, et al. Anti-interleukin-6 receptor antibody inhibits the progression in human colon carcinoma cells. *Eur J Clin Invest* 2011;41:277-84.
- [123] Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension* 2001;38:399-403.
- [124] Roig E, Orus J, Pare C, Azqueta M, Filella X, Perez-Villa F, et al. Serum interleukin-6 in congestive heart failure secondary to idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1998;82:688-90, A8.
- [125] Ridker PM, Rifai N, Stampfer MJ, Hennekens CH. Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* 2000;101:1767-72.
- [126] Krebs DL, Hilton DJ. SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 2001;19:378-87.
- [127] Nicholson SE, Willson TA, Farley A, Starr R, Zhang JG, Baca M, et al. Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *The EMBO journal* 1999;18:375-85.
- [128] Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, et al. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *The EMBO journal* 1999;18:1309-20.
- [129] Nicholson SE, De Souza D, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, et al. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97:6493-8.
- [130] Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *The Journal of biological chemistry* 2000;275:12848-56.
- [131] Kamura T, Maenaka K, Kotoshiba S, Matsumoto M, Kohda D, Conaway RC, et al. VHL-box and SOCS-box domains determine binding specificity for Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules of ubiquitin ligases. *Genes Dev* 2004;18:3055-65.
- [132] Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG, Jr., Conaway RC, et al. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 1998;12:3872-81.
- [133] Zhang JG, Farley A, Nicholson SE, Willson TA, Zugaro LM, Simpson RJ, et al. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:2071-6.
- [134] Shuai K, Liu B. Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2005;5:593-605.

- [135] Heo KS, Chang E, Takei Y, Le NT, Woo CH, Sullivan MA, et al. Phosphorylation of Protein Inhibitor of Activated STAT1 (PIAS1) by MAPK-Activated Protein Kinase-2 Inhibits Endothelial Inflammation via Increasing Both PIAS1 Transrepression and SUMO E3 Ligase Activity. *Arterioscl Throm Vas* 2013;33:321-+.
- [136] Nakagawa K, Yokosawa H. PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF-1. *FEBS letters* 2002;530:204-8.
- [137] Rogers RS, Horvath CM, Matunis MJ. SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:30091-7.
- [138] Vanhatupa S, Ungureanu D, Paakkunainen M, Silvennoinen O. MAPK-induced Ser(727) phosphorylation promotes SUMOylation of STAT1. *Biochem J* 2008;409:179-85.
- [139] Ibarra-Sanchez MJ, Simoncic PD, Nestel FR, Duplay P, Lapp WS, Tremblay ML. The T-cell protein tyrosine phosphatase. *Seminars in immunology* 2000;12:379-86.
- [140] ten Hoeve J, Ibarra-Sanchez MD, Fu YB, Zhu W, Tremblay M, David M, et al. Identification of a nuclear Stat1 protein tyrosine phosphatase. *Mol Cell Biol* 2002;22:5662-8.
- [141] Yamamoto T, Sekine Y, Kashima K, Kubota A, Sato N, Aoki N, et al. The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation. *Biochem Bioph Res Co* 2002;297:811-7.
- [142] Barford D, Neel BG. Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure* 1998;6:249-54.
- [143] Haque A, Andersen JN, Salmeen A, Barford D, Tonks NK. Conformation-sensing antibodies stabilize the oxidized form of PTP1B and inhibit its phosphatase activity. *Cell* 2011;147:185-98.
- [144] Bode JG, Nimmesgern A, Schmitz J, Schaper F, Schmitt M, Frisch W, et al. LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages. *FEBS letters* 1999;463:365-70.
- [145] Ehrling C, Lai WS, Schaper F, Brenndorfer ED, Matthes RJ, Heinrich PC, et al. Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *J Immunol* 2007;178:2813-26.
- [146] Yang XP, Albrecht U, Zakowski V, Sobota RM, Haussinger D, Heinrich PC, et al. Dual function of interleukin-1beta for the regulation of interleukin-6-induced suppressor of cytokine signaling 3 expression. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:45279-89.
- [147] Dittrich E, Haft CR, Muys L, Heinrich PC, Graeve L. 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. *The Journal of biological chemistry* 1996;271:5487-94.
- [148] Hermanns HM, Wohlfahrt J, Mais C, Hergovits S, Jahn D, Geier A. Endocytosis of pro-inflammatory cytokine receptors and its relevance for signal transduction. *Biol Chem* 2016;397:695-708.

- [149] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-52.
- [150] Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* 2003;21:685-711.
- [151] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 2000;18:767-811.
- [152] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974;139:380-97.
- [153] Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, de Saint-Vis B, Jacquet C, et al. CD34⁺ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* 1996;184:695-706.
- [154] Zhou LJ, Tedder TF. CD14⁺ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83⁺ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:2588-92.
- [155] Satpathy AT, Wu X, Albring JC, Murphy KM. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol* 2012;13:1145-54.
- [156] Belz GT, Nutt SL. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* 2012;12:101-13.
- [157] Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology* 2013;31:563-604.
- [158] Sere KM, Lin Q, Felker P, Rehage N, Klisch T, Ortseifer I, et al. Dendritic cell lineage commitment is instructed by distinct cytokine signals. *European journal of cell biology* 2012;91:515-23.
- [159] Liu K, Nussenzweig MC. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 2010;234:45-54.
- [160] Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:19-30.
- [161] Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* 2014;40:642-56.
- [162] Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K. CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* 2000;164:2978-86.
- [163] Henri S, Vremec D, Kamath A, Waithman J, Williams S, Benoist C, et al. The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* 2001;167:741-8.
- [164] Bjorck P. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 2001;98:3520-6.
- [165] Nakano H, Yanagita M, Gunn MD. CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2001;194:1171-8.

- [166] Serbina NV, Salazar-Mather TP, Biron CA, Kuziel WA, Pamer EG. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* 2003;19:59-70.
- [167] Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1992;176:1693-702.
- [168] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-18.
- [169] Hoeffel G, Wang Y, Greter M, See P, Teo P, Malleret B, et al. Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* 2012;209:1167-81.
- [170] Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400.
- [171] Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23:445-9.
- [172] Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006;6:476-83.
- [173] Menges M, Rossner S, Voigtlander C, Schindler H, Kukutsch NA, Bogdan C, et al. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 2002;195:15-21.
- [174] Voigtlander C, Rossner S, Cierpka E, Theiner G, Wiethe C, Menges M, et al. Dendritic cells matured with TNF can be further activated in vitro and after subcutaneous injection in vivo which converts their tolerogenicity into immunogenicity. *J Immunother* 2006;29:407-15.
- [175] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, et al. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 1994;180:1263-72.
- [176] Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, et al. Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;92:4778-91.
- [177] Mitani H, Katayama N, Araki H, Ohishi K, Kobayashi K, Suzuki H, et al. Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells. *Br J Haematol* 2000;109:288-95.
- [178] Ratta M, Fagnoni F, Curti A, Vescovini R, Sansoni P, Oliviero B, et al. Dendritic cells are functionally defective in multiple myeloma: the role of interleukin-6. *Blood* 2002;100:230-7.
- [179] Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *J Immunol* 2004;173:3844-54.
- [180] Chomarar P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol* 2000;1:510-4.

- [181] Brasel K, De Smedt T, Smith JL, Maliszewski CR. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 2000;96:3029-39.
- [182] Santiago-Schwarz F, Tucci J, Carsons SE. Endogenously produced interleukin 6 is an accessory cytokine for dendritic cell hematopoiesis. *Stem Cells* 1996;14:225-31.
- [183] Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Current opinion in immunology* 2002;14:111-6.
- [184] Taniguchi T, Tanaka N, Ogasawara K, Taki S, Sato M, Takaoka A. Transcription factor IRF-1 and its family members in the regulation of host defense. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 1999;64:465-72.
- [185] Barral PM, Sarkar D, Su ZZ, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, et al. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: Key regulators of innate immunity. *Pharmacol Therapeut* 2009;124:219-34.
- [186] Ikeda M, Mori K, Ariumi Y, Dansako H, Kato N. Oncostatin M synergistically inhibits HCV RNA replication in combination with interferon-alpha. *FEBS letters* 2009;583:1434-8.
- [187] Larrea E, Aldabe R, Gonzalez I, Segura V, Sarobe P, Echeverria I, et al. Oncostatin M enhances the antiviral effects of type I interferon and activates immunostimulatory functions in liver epithelial cells. *Journal of virology* 2009;83:3298-311.
- [188] Larrea E, Echeverria I, Riezu-Boj JI, Aldabe R, Guembe L, Sola I, et al. Characterization of the CD40L/Oncostatin M/Oncostatin M receptor axis as an antiviral and immunostimulatory system disrupted in chronic HCV infection. *J Hepatol* 2014;60:482-9.
- [189] Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. IMPAIRED IMMUNE AND ACUTE-PHASE RESPONSES IN INTERLEUKIN-6-DEFICIENT MICE. *Nature* 1994;368:339-42.
- [190] Zal T, Volkmann A, Stockinger B. Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen. *J Exp Med* 1994;180:2089-99.
- [191] Jungblut M, Oeltze K, Zehnter I, Hasselmann D, Bosio A. Preparation of single-cell suspensions from mouse spleen with the gentleMACS Dissociator. *J Vis Exp* 2008.
- [192] Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, et al. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of immunological methods* 1999;223:77-92.
- [193] Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002;418:244-51.
- [194] Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science* 2002;296:1263-5.
- [195] Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413-7.
- [196] Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995;4:357-62.

- [197] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:6.
- [198] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [199] Laemmli UK. CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4. *Nature* 1970;227:680-&.
- [200] Guiducci C, Valzasina B, Dislich H, Colombo MP. CD40/CD40L interaction regulates CD4+CD25+ T reg homeostasis through dendritic cell-produced IL-2. *European journal of immunology* 2005;35:557-67.
- [201] Harris NL, Ronchese F. The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunology and cell biology* 1999;77:304-11.
- [202] Shin T, Kennedy G, Gorski K, Tsuchiya H, Koseki H, Azuma M, et al. Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC costimulation of CD4+ T cells independent of the PD-1 receptor. *J Exp Med* 2003;198:31-8.
- [203] Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev* 1996;153:47-83.
- [204] Pletinckx K, Stijlemans B, Pavlovic V, Laube R, Brandl C, Kneitz S, et al. Similar inflammatory DC maturation signatures induced by TNF or Trypanosoma brucei antigens instruct default Th2-cell responses. *European journal of immunology* 2011;41:3479-94.
- [205] Dearman RJ, Cumberbatch M, Maxwell G, Basketter DA, Kimber I. Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology* 2009;126:475-84.
- [206] Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, et al. Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* 2000;165:6278-86.
- [207] Sumoza-Toledo A, Lange I, Cortado H, Bhagat H, Mori Y, Fleig A, et al. Dendritic cell maturation and chemotaxis is regulated by TRPM2-mediated lysosomal Ca²⁺ release. *Faseb J* 2011;25:3529-42.
- [208] Summers deLuca L, Gomerman JL. Fine-tuning of dendritic cell biology by the TNF superfamily. *Nat Rev Immunol* 2012;12:339-51.
- [209] Trevejo JM, Marino MW, Philpott N, Josien R, Richards EC, Elkon KB, et al. TNF-alpha-dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:12162-7.
- [210] Bagley KC, Abdelwahab SF, Tuskan RG, Lewis GK. Cholera toxin indirectly activates human monocyte-derived dendritic cells in vitro through the production of soluble factors, including prostaglandin E(2) and nitric oxide. *Clin Vaccine Immunol* 2006;13:106-15.

- [211] Gagliardi MC, Sallusto F, Marinaro M, Langenkamp A, Lanzavecchia A, De Magistris MT. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *European journal of immunology* 2000;30:2394-403.
- [212] George-Chandy A, Eriksson K, Lebens M, Nordstrom I, Schon E, Holmgren J. Cholera toxin B subunit as a carrier molecule promotes antigen presentation and increases CD40 and CD86 expression on antigen-presenting cells. *Infection and immunity* 2001;69:5716-25.
- [213] Isomura I, Yasuda Y, Tsujimura K, Takahashi T, Tochikubo K, Morita A. Recombinant cholera toxin B subunit activates dendritic cells and enhances antitumor immunity. *Microbiol Immunol* 2005;49:79-87.
- [214] Kang JO, Lee JB, Chang J. Cholera Toxin Promotes Th17 Cell Differentiation by Modulating Expression of Polarizing Cytokines and the Antigen-Presenting Potential of Dendritic Cells. *PLoS one* 2016;11:e0157015.
- [215] Kawamura YI, Kawashima R, Shirai Y, Kato R, Hamabata T, Yamamoto M, et al. Cholera toxin activates dendritic cells through dependence on GM1-ganglioside which is mediated by NF-kappaB translocation. *European journal of immunology* 2003;33:3205-12.
- [216] Schnitzler AC, Burke JM, Wetzler LM. Induction of cell signaling events by the cholera toxin B subunit in antigen-presenting cells. *Infection and immunity* 2007;75:3150-9.
- [217] Schlund R. Charakterisierung der Expression des Interleukin-6-Rezeptors Glykoprotein 130 (gp130) während der Reifung und Aktivierung dendritischer Zellen. Bachelorarbeit. Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2014.
- [218] Honke N, Ohl K, Wiener A, Bierwagen J, Peitz J, Di Fiore S, et al. The p38-mediated rapid down-regulation of cell surface gp130 expression impairs interleukin-6 signaling in the synovial fluid of juvenile idiopathic arthritis patients. *Arthritis Rheumatol* 2014;66:470-8.
- [219] Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J Immunol* 2000;165:5227-37.
- [220] Guillemins M, Malissen B. A Death Notice for In-Vitro-Generated GM-CSF Dendritic Cells? *Immunity* 2015;42:988-90.
- [221] Helft J, Bottcher J, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c(+)MHCII(+) Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 2015;42:1197-211.
- [222] Helft J, Bottcher JP, Chakravarty P, Zelenay S, Huotari J, Schraml BU, et al. Alive but Confused: Heterogeneity of CD11c(+) MHC Class II(+) Cells in GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures. *Immunity* 2016;44:3-4.
- [223] Lutz MB, Inaba K, Schuler G, Romani N. Still Alive and Kicking: In-Vitro-Generated GM-CSF Dendritic Cells! *Immunity* 2016;44:1-2.
- [224] Erridge C, Bennett-Guerrero E, Poxton IR. Structure and function of lipopolysaccharides. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2002;4:837-51.
- [225] Diaz-Zuniga J, Yanez JP, Alvarez C, Melgar-Rodriguez S, Hernandez M, Sanz M, et al. Serotype-dependent response of human dendritic cells stimulated with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Clin Periodontol* 2014;41:242-51.

- [226] Dogan MD, Ataoglu H, Akarsu ES. Effects of different serotypes of *Escherichia coli* lipopolysaccharides on body temperature in rats. *Life Sci* 2000;67:2319-29.
- [227] Nedrebo T, Reed RK. Different serotypes of endotoxin (lipopolysaccharide) cause different increases in albumin extravasation in rats. *Shock* 2002;18:138-41.
- [228] Thiel S, Dahmen H, Martens A, Muller-Newen G, Schaper F, Heinrich PC, et al. Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS letters* 1998;441:231-4.
- [229] Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83:9065-9.
- [230] Hettinger J, Richards DM, Hansson J, Barra MM, Joschko AC, Krijgsveld J, et al. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* 2013;14:821-30.
- [231] Schlitzer A, Sivakamasundari V, Chen J, Sumatoh HR, Schreuder J, Lum J, et al. Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat Immunol* 2015;16:718-28.
- [232] Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JP, Kallen KJ, Wollmer A, et al. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol* 1997;15:142-5.
- [233] Xie J, Qian J, Yang J, Wang S, Freeman ME, 3rd, Yi Q. Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp Hematol* 2005;33:564-72.
- [234] van de Laar L, Coffer PJ, Woltman AM. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood* 2012;119:3383-93.
- [235] Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell* 2011;147:868-80.
- [236] Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol* 2008;9:361-8.
- [237] Tanimura N, Saitoh S, Matsumoto F, Akashi-Takamura S, Miyake K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:94-9.
- [238] Macia E, Ehrlich M, Massol R, Boucrot E, Brunner C, Kirchhausen T. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev Cell* 2006;10:839-50.
- [239] Heuser JE, Anderson RGW. HYPERTONIC MEDIA INHIBIT RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS BY BLOCKING CLATHRIN-COATED PIT FORMATION. *Journal of Cell Biology* 1989;108:389-400.
- [240] Mayor S, Pagano RE. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:603-12.
- [241] McMahon HT, Boucrot E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011;12:517-33.

- [242] Husebye H, Halaas O, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger O, Bogen B, et al. Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *The EMBO journal* 2006;25:683-92.
- [243] Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37.
- [244] Kobayashi I, Matsuda T, Saito T, Yasukawa K, Kikutani H, Hirano T, et al. Abnormal distribution of IL-6 receptor in aged MRL/lpr mice: elevated expression on B cells and absence on CD4+ cells. *Int Immunol* 1992;4:1407-12.
- [245] Betz UA, Muller W. Regulated expression of gp130 and IL-6 receptor alpha chain in T cell maturation and activation. *Int Immunol* 1998;10:1175-84.
- [246] Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol* 2011;12:551-9.
- [247] Wang XJ, Taga T, Yoshida K, Saito M, Kishimoto T, Kikutani H. gp130, the cytokine common signal-transducer of interleukin-6 cytokine family, is downregulated in T cells in vivo by interleukin-6. *Blood* 1998;91:3308-14.
- [248] Barr TA, Brown S, Mastroeni P, Gray D. TLR and B cell receptor signals to B cells differentially program primary and memory Th1 responses to *Salmonella enterica*. *J Immunol* 2010;185:2783-9.
- [249] Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, et al. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 2012;209:1001-10.
- [250] Rosser EC, Oleinika K, Tonon S, Doyle R, Bosma A, Carter NA, et al. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1beta and interleukin-6 production. *Nat Med* 2014;20:1334-9.
- [251] Yoshizaki K, Matsuda T, Nishimoto N, Kuritani T, Taeho L, Aozasa K, et al. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* 1989;74:1360-7.
- [252] Hong C, Nam AS, Keller HR, Ligons DL, Park JY, Yoon HW, et al. Interleukin-6 expands homeostatic space for peripheral T cells. *Cytokine* 2013;64:532-40.
- [253] Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, Flavell RA. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997;185:461-9.
- [254] O'Connor RA, Floess S, Huehn J, Jones SA, Anderton SM. Foxp3(+) Treg cells in the inflamed CNS are insensitive to IL-6-driven IL-17 production. *European journal of immunology* 2012;42:1174-9.
- [255] Xiao S, Jin H, Korn T, Liu SM, Oukka M, Lim B, et al. Retinoic acid increases Foxp3+ regulatory T cells and inhibits development of Th17 cells by enhancing TGF-beta-driven Smad3 signaling and inhibiting IL-6 and IL-23 receptor expression. *J Immunol* 2008;181:2277-84.
- [256] Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.

- [257] Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-5.
- [258] Schmidt A, Rothenfusser S, Hopfner KP. Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation. *European journal of cell biology* 2012;91:78-85.
- [259] Matsumiya T, Stafforini DM. Function and Regulation of Retinoic Acid-Inducible Gene-I. *Crit Rev Immunol* 2010;30:489-513.
- [260] Berghall H, Siren J, Sarkar D, Julkunen I, Fisher PB, Vainionpaa R, et al. The interferon-inducible RNA helicase, mda-5, is involved in measles virus-induced expression of antiviral cytokines. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2006;8:2138-44.
- [261] Kubota K, Sakaki H, Imaizumi T, Nakagawa H, Kusumi A, Kobayashi W, et al. Retinoic acid-inducible gene-I is induced in gingival fibroblasts by lipopolysaccharide or poly IC: possible roles in interleukin-1 beta, -6 and -8 expression. *Oral Microbiol Immun* 2006;21:399-406.
- [262] Matikainen S, Siren J, Tissari J, Veckman V, Pirhonen J, Severa M, et al. Tumor necrosis factor alpha enhances influenza A virus-induced expression of antiviral cytokines by activating RIG-I gene expression. *Journal of virology* 2006;80:3515-22.
- [263] Ohta K, Fukui A, Shigeishi H, Ishida Y, Nishi H, Tobiume K, et al. Expression and function of RIG-I in oral keratinocytes and fibroblasts. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 2014;34:1556-65.
- [264] Kitamura H, Matsuzaki Y, Kimura K, Nakano H, Imaizumi T, Satoh K, et al. Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression in human epidermal keratinocytes. *Journal of Dermatological Science* 2007;45:127-34.
- [265] Kang DC, Gopalkrishnan RV, Lin L, Randolph A, Valerie K, Pestka S, et al. Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene. *Oncogene* 2004;23:1789-800.
- [266] Imaizumi T, Aratani S, Nakajima T, Carlson M, Matsumiya T, Tanji K, et al. Retinoic acid-inducible gene-I is induced in endothelial cells by LPS and regulates expression of COX-2. *Biochem Bioph Res Co* 2002;292:274-9.
- [267] Cui XF, Imaizumi T, Yoshida H, Borden EC, Satoh K. Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates the expression of interferon-gamma stimulated gene 15 in MCF-7 cells. *Biochem Cell Biol* 2004;82:401-5.
- [268] Imaizumi T, Tanaka H, Tajima A, Tsuruga K, Oki E, Sashinami H, et al. Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) is induced by IFN-gamma in human mesangial cells in culture: possible involvement of RIG-I in the inflammation in lupus nephritis. *Lupus* 2010;19:830-6.
- [269] Imaizumi T, Yagihashi N, Hatakeyama M, Yamashita K, Ishikawa A, Taima K, et al. Expression of retinoic acid-inducible gene-I in vascular smooth muscle cells stimulated with interferon-gamma. *Life Sci* 2004;75:1171-80.

- [270] Yuzawa E, Imaizumi T, Matsumiya T, Yoshida H, Fukuhara R, Kimura H, et al. Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interferon-gamma and regulates CXCL11 expression in HeLa cells. *Life Sci* 2008;82:670-5.
- [271] Imaizumi T, Hatakeyama M, Yamashita K, Yoshida H, Ishikawa A, Taima K, et al. Interferon-gamma induces retinoic acid-inducible gene-I in endothelial cells. *Endothelium : journal of endothelial cell research* 2004;11:169-73.
- [272] Imaizumi T, Yagihashi N, Hatakeyama M, Yamashita K, Ishikawa A, Taima K, et al. Upregulation of retinoic acid-inducible gene-I in T24 urinary bladder carcinoma cells stimulated with interferon-gamma. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2004;203:313-8.
- [273] Hatakeyama M, Imaizumi T, Terasaki F, Mori F, Tanji K, Sato F, et al. Interferon-gamma upregulates retinoic acid-inducible gene-I in human pericardial mesothelial cells. *Acta cardiologica* 2007;62:553-7.
- [274] Matsumiya T, Prescott SM, Stafforini DM. IFN-epsilon mediates TNF-alpha-Induced STAT1 phosphorylation and induction of retinoic acid-inducible gene-i in human cervical cancer cells. *J Immunol* 2007;179:4542-9.
- [275] Sakaki H, Imaizumi T, Matsumiya T, Kusumi A, Nakagawa H, Kubota K, et al. Retinoic acid-inducible gene-I is induced by interleukin-1 beta in cultured human gingival fibroblasts. *Oral Microbiol Immun* 2005;20:47-50.
- [276] Hirano T, Matsuda T, Hosoi K, Okano A, Matsui H, Kishimoto T. Absence of antiviral activity in recombinant B cell stimulatory factor 2 (BSF-2). *Immunology letters* 1988;17:41-5.
- [277] Reis LFL, Le J, Hirano T, Kishimoto T, Vilcek J. ANTIVIRAL ACTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR IN HUMAN-FIBROBLASTS IS NOT MEDIATED BY B-CELL STIMULATORY FACTOR-II IFN-BETA-2, AND IS INHIBITED BY SPECIFIC ANTIBODIES TO IFN-BETA. *J Immunol* 1988;140:1566-70.
- [278] Hintzen C. Molekulare Mechanismus der Oncostatin-M-vermittelten Signaltransduktion und deren Bedeutung in der Entzündung sowie der antiviralen Immunabwehr. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität Würzburg 2009.
- [279] Le Goff B, Singbrant S, Tonkin BA, Martin TJ, Romas E, Sims NA, et al. Oncostatin M acting via OSMR, augments the actions of IL-1 and TNF in synovial fibroblasts. *Cytokine* 2014;68:101-9.
- [280] Wang WB, Levy DE, Lee CK. STAT3 Negatively Regulates Type I IFN-Mediated Antiviral Response. *J Immunol* 2011;187:2578-85.
- [281] Costa-Pereira AP, Tininini S, Strobl B, Alonzi T, Schlaak JF, Is'harc H, et al. Mutational switch of an IL-6 response to an interferon-gamma-like response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:8043-7.
- [282] Dreuw A, Hermanns HM, Heise R, Jousseen S, Rodriguez F, Marquardt Y, et al. Interleukin-6-type cytokines upregulate expression of multidrug resistance-associated proteins in NHEK and dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2005;124:28-37.
- [283] Croker BA, Krebs DL, Zhang JG, Wormald S, Willson TA, Stanley EG, et al. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 2003;4:540-5.

- [284] Magrangeas F, Boisteau O, Denis S, Jacques Y, Minvielle S. Negative regulation of oncostatin M signaling by suppressor of cytokine signaling (SOCS-3). *Eur Cytokine Netw* 2001;12:309-15.
- [285] Stross C, Radtke S, Clahsen T, Gerlach C, Volkmer-Engert R, Schaper F, et al. Oncostatin M receptor-mediated signal transduction is negatively regulated by SOCS3 through a receptor tyrosine-independent mechanism. *The Journal of biological chemistry* 2006;281:8458-68.
- [286] Scharl M, Hruz P, McCole DF. Protein tyrosine phosphatase non-receptor Type 2 regulates IFN-gamma-induced cytokine signaling in THP-1 monocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:2055-64.
- [287] Hannoun Z, Maarifi G, Chelbi-Alix MK. The implication of SUMO in intrinsic and innate immunity. *Cytokine & growth factor reviews* 2016;29:3-16.
- [288] Begitt A, Droscher M, Knobloch KP, Vinkemeier U. SUMO conjugation of STAT1 protects cells from hyperresponsiveness to IFN gamma. *Blood* 2011;118:1002-7.
- [289] Maarifi G, Maroui MA, Dutrieux J, Dianoux L, Nisole S, Chelbi-Alix MK. Small Ubiquitin-like Modifier Alters IFN Response. *J Immunol* 2015;195:2312-24.
- [290] Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *European journal of immunology* 2008;38:619-30.
- [291] Choi YH, Bernardi R, Pandolfi PP, Benveniste EN. The promyelocytic leukemia protein functions as a negative regulator of IFN-gamma signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:18715-20.
- [292] El Bougrini J, Dianoux L, Chelbi-Alix MK. PML positively regulates interferon gamma signaling. *Biochimie* 2011;93:389-98.
- [293] Kitamura H, Kamon H, Sawa S, Park SJ, Katunuma N, Ishihara K, et al. IL-6-STAT3 controls intracellular MHC class II alphabeta dimer level through cathepsin S activity in dendritic cells. *Immunity* 2005;23:491-502.
- [294] Bernhard H, Lohmann M, Batten WY, Metzger J, Lohr HF, Peschel C, et al. The gp130-stimulating designer cytokine hyper-IL-6 promotes the expansion of human hematopoietic progenitor cells capable to differentiate into functional dendritic cells. *Exp Hematol* 2000;28:365-72.
- [295] Larregina A, Morelli A, Kolkowski E, Fainboim L. Flow cytometric analysis of cytokine receptors on human Langerhans' cells. Changes observed after short-term culture. *Immunology* 1996;87:317-25.
- [296] Larregina AT, Morelli AE, Kolkowski E, Sanjuan N, Barboza ME, Fainboim L. Pattern of cytokine receptors expressed by human dendritic cells migrated from dermal explants. *Immunology* 1997;91:303-13.
- [297] Wang YD, Gu ZJ, Huang JA, Zhu YB, Zhou ZH, Xie W, et al. gp130-linked signal transduction promotes the differentiation and maturation of dendritic cells. *Int Immunol* 2002;14:599-603.

- [298] Wiethe C, Schiemann M, Busch D, Haeberle L, Kopf M, Schuler G, et al. Interdependency of MHC class II/self-peptide and CD1d/self-glycolipid presentation by TNF-matured dendritic cells for protection from autoimmunity. *J Immunol* 2007;178:4908-16.
- [299] Pletinckx K, Dohler A, Pavlovic V, Lutz MB. Role of dendritic cell maturity/costimulation for generation, homeostasis, and suppressive activity of regulatory T cells. *Front Immunol* 2011;2:39.
- [300] Lutz MB. Therapeutic potential of semi-mature dendritic cells for tolerance induction. *Front Immunol* 2012;3:123.
- [301] Datta SK, Sabet M, Nguyen KP, Valdez PA, Gonzalez-Navajas JM, Islam S, et al. Mucosal adjuvant activity of cholera toxin requires Th17 cells and protects against inhalation anthrax. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:10638-43.
- [302] Jung ID, Noh KT, Lee CM, Chun SH, Jeong SK, Park JW, et al. Oncostatin M induces dendritic cell maturation and Th1 polarization. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;394:272-8.
- [303] Satpathy AT, Kc W, Albring JC, Edelson BT, Kretzer NM, Bhattacharya D, et al. Zbtb46 expression distinguishes classical dendritic cells and their committed progenitors from other immune lineages. *J Exp Med* 2012;209:1135-52.
- [304] Traum D, Timothee P, Silver J, Rose-John S, Ernst M, LaRosa DF. IL-10-induced gp130 expression in mouse mast cells permits IL-6 trans-signaling. *J Leukoc Biol* 2012;91:427-35.
- [305] Arrighi JF, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers. *J Immunol* 2001;166:3837-45.
- [306] Mizuno K, Kanda Y, Kuroki Y, Nishio M, Watanabe Y. Stimulation of beta(3)-adrenoceptors causes phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase via a stimulatory G protein-dependent pathway in 3T3-L1 adipocytes. *Br J Pharmacol* 2002;135:951-60.
- [307] Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *The EMBO journal* 2003;22:2546-51.
- [308] Mnasria K, Lagaraine C, Velge-Roussel F, Oueslati R, Lebranchu Y, Baron C. Anti-CD25 antibodies affect cytokine synthesis pattern of human dendritic cells and decrease their ability to prime allogeneic CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2008;84:460-7.
- [309] Herr F, Lemoine R, Gouilleux F, Meley D, Kazma I, Heraud A, et al. IL-2 phosphorylates STAT5 to drive IFN-gamma production and activation of human dendritic cells. *J Immunol* 2014;192:5660-70.
- [310] Bremnes T, Lauvrak V, Lindqvist B, Bakke O. A region from the medium chain adaptor subunit (mu) recognizes leucine- and tyrosine-based sorting signals. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:8638-45.

- [311] Rodionov DG, Bakke O. Medium chains of adaptor complexes AP-1 and AP-2 recognize leucine-based sorting signals from the invariant chain. *The Journal of biological chemistry* 1998;273:6005-8.
- [312] Wang Y, Fuller GM. Biosynthetic and glycosylation events of the IL-6 receptor beta-subunit, gp130. *J Cell Biochem* 1995;57:610-8.
- [313] Thiel S, Sommer U, Kortylewski M, Haan C, Behrmann I, Heinrich PC, et al. Termination of IL-6-induced STAT activation is independent of receptor internalization but requires de novo protein synthesis. *FEBS letters* 2000;470:15-9.
- [314] Ohtani T, Ishihara K, Atsumi T, Nishida K, Kaneko Y, Miyata T, et al. Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* 2000;12:95-105.
- [315] van de Laar L, Buitenhuis M, Wensveen FM, Janssen HL, Coffey PJ, Woltman AM. Human CD34-derived myeloid dendritic cell development requires intact phosphatidylinositol 3-kinase-protein kinase B-mammalian target of rapamycin signaling. *J Immunol* 2010;184:6600-11.
- [316] Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine & growth factor reviews* 2015;26:559-68.
- [317] Letourneau S, Krieg C, Pantaleo G, Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:758-62.
- [318] Sauma D, Fierro A, Mora JR, Lennon-Dumenil AM, Bono MR, Roseblatt M, et al. Cyclosporine preconditions dendritic cells during differentiation and reduces IL-2 and IL-12 production following activation: a potential tolerogenic effect. *Transplantation proceedings* 2003;35:2515-7.
- [319] Granucci F, Vizzardelli C, Pavelka N, Feau S, Persico M, Virzi E, et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* 2001;2:882-8.
- [320] Liao W, Lin JX, Leonard WJ. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity* 2013;38:13-25.
- [321] Yu HB, Yurieva M, Balachander A, Foo I, Leong X, Zelante T, et al. NFATc2 mediates epigenetic modification of dendritic cell cytokine and chemokine responses to dectin-1 stimulation. *Nucleic Acids Res* 2015;43:836-47.
- [322] Berchtold S, Moriggl R, Gouilleux F, Silvennoinen O, Beisenherz C, Pfitzner E, et al. Cytokine receptor-independent, constitutively active variants of STAT5. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:30237-43.
- [323] Ma Y, Streiff RJ, Liu J, Spence MJ, Vestal RE. Cloning and characterization of human oncostatin M promoter. *Nucleic Acids Res* 1999;27:4649-57.
- [324] Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ, et al. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *The EMBO journal* 1996;15:1055-63.

- [325] Chen Q, Wang WC, Bruce R, Li H, Schleider DM, Mulbury MJ, et al. Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Immunity* 2004;20:59-70.
- [326] Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, et al. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001;14:705-14.
- [327] McLoughlin RM, Hurst SM, Nowell MA, Harris DA, Horiuchi S, Morgan LW, et al. Differential regulation of neutrophil-activating chemokines by IL-6 and its soluble receptor isoforms. *J Immunol* 2004;172:5676-83.
- [328] Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest* 1997;100:2752-6.
- [329] Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:315-25.
- [330] Sozzani S, Vermi W, Del Prete A, Facchetti F. Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends Immunol* 2010;31:270-7.
- [331] Seth S, Oberdorfer L, Hyde R, Hoff K, Thies V, Worbs T, et al. CCR7 essentially contributes to the homing of plasmacytoid dendritic cells to lymph nodes under steady-state as well as inflammatory conditions. *J Immunol* 2011;186:3364-72.
- [332] Swiecki M, Colonna M. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 2015;15:471-85.
- [333] Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006;441:235-8.
- [334] Niu N, Qin X. New insights into IL-7 signaling pathways during early and late T cell development. *Cell Mol Immunol* 2013;10:187-9.
- [335] Sawa S, Kamimura D, Jin GH, Morikawa H, Kamon H, Nishihara M, et al. Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *J Exp Med* 2006;203:1459-70.
- [336] Tan JT, Dudl E, LeRoy E, Murray R, Sprent J, Weinberg KI, et al. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001;98:8732-7.
- [337] Boyman O, Sprent J. The role of interleukin-2 during homeostasis and activation of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012;12:180-90.
- [338] Granucci F, Feau S, Angeli V, Trottein F, Ricciardi-Castagnoli P. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J Immunol* 2003;170:5075-81.

- [339] Jones GW, McLoughlin RM, Hammond VJ, Parker CR, Williams JD, Malhotra R, et al. Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells. *J Immunol* 2010;184:2130-9.
- [340] Muraguchi A, Hirano T, Tang B, Matsuda T, Horii Y, Nakajima K, et al. The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 1988;167:332-44.
- [341] Tedder TF. CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:572-7.
- [342] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 2011;34:637-50.
- [343] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16-34.
- [344] Schlee M. Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology* 2013;218:1322-35.
- [345] Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34:680-92.
- [346] Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* 2006;344:119-30.
- [347] Lauder SN, Jones E, Smart K, Bloom A, Williams AS, Hindley JP, et al. Interleukin-6 limits influenza-induced inflammation and protects against fatal lung pathology. *European journal of immunology* 2013;43:2613-25.
- [348] Dienz O, Rud JG, Eaton SM, Lanthier PA, Burg E, Drew A, et al. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol* 2012;5:258-66.
- [349] Hausmann M, Rogler G. Immune-non immune networks in intestinal inflammation. *Curr Drug Targets* 2008;9:388-94.
- [350] Wen Z, Darnell JE, Jr. Mapping of Stat3 serine phosphorylation to a single residue (727) and evidence that serine phosphorylation has no influence on DNA binding of Stat1 and Stat3. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2062-7.
- [351] Wen Z, Zhong Z, Darnell JE, Jr. Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995;82:241-50.
- [352] Zhu X, Wen Z, Xu LZ, Darnell JE, Jr. Stat1 serine phosphorylation occurs independently of tyrosine phosphorylation and requires an activated Jak2 kinase. *Mol Cell Biol* 1997;17:6618-23.
- [353] Su ZZ, Sarkar D, Emdad L, Barral PM, Fisher PB. Central role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) in controlling retinoic acid inducible gene-I (RIG-I) expression. *Journal of cellular physiology* 2007;213:502-10.
- [354] Wang F, Xia W, Liu F, Li J, Wang G, Gu J. Interferon regulator factor 1/retinoic inducible gene I (IRF1/RIG-I) axis mediates 25-hydroxycholesterol-induced interleukin-8 production in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2012;93:190-9.

- [355] Johnston JA, O'Shea JJ. Matching SOCS with function. *Nat Immunol* 2003;4:507-9.
- [356] Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, et al. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol* 2003;4:546-50.
- [357] Ehling C, Bohmer O, Hahnel MJ, Thomas M, Zanger UM, Gaestel M, et al. Oncostatin M regulates SOCS3 mRNA stability via the MEK-ERK1/2-pathway independent of p38(MAPK)/MK2. *Cellular signalling* 2015;27:555-67.
- [358] Mustafa M, Wondimu B, Bakhiet M, Modeer T. Induction of interferon gamma in human gingival fibroblasts challenged with phytohaemagglutinin. *Cytokine* 2000;12:368-73.
- [359] Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O'Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol* 2001;22:556-60.
- [360] Gessani S, Belardelli F. IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine & growth factor reviews* 1998;9:117-23.

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Die IL-6-Typ Zytokinfamilie und ihre Rezeptorkomplexe. 2

Abb. 2: Schematische Darstellung des murinen Glykoproteins 130. 5

Abb. 3: Schematische Darstellung des klassischen IL-6-Signals und IL-6 *trans*-Signals. 6

Abb. 4: Schematische Darstellung des IL-6-Rezeptorkomplexes und die durch ihn aktivierten Signalkaskaden. 9

Abb. 5: Internalisierung von gp130 durch proinflammatorische Zytokine oder Zellstress. ... 12

Abb. 6: Entwicklung von *steady-state*- und inflammatorischen DZ der Maus. 14

Abb. 7: Auswertungsstrategie zur Identifizierung myeloider und lymphoider Zellen der Milz und Lymphknoten. 47

Abb. 8: Auswertungsstrategie zur Identifizierung von DZ-Vorläuferzellen im Knochenmark. 48

Abb. 9: Generierung und Charakterisierung dendritischer Zellen aus murinem Knochenmark. 60

Abb. 10: LPS, TNF α und Ctx induzieren eine unterschiedliche DZ Reifung/Maturierung. ... 63

Abb. 11: Charakterisierung der IL-6-Typ Zytokin Rezeptorexpression in KM-DZ Kulturen. 65

Abb. 12: Regulation der Zelloberflächenexpression von gp130, IL-6R und LIFR in CD11c⁺MHCII⁺ KM-DZ. 66

Abb. 13: LPS, mTNF α und Ctx induzieren die *Cross*-Regulation von gp130 auf KM-DZ. 67

Abb. 14: Über Nacht-gereifte KM-DZ zeigen eine unterschiedliche gp130 Regulation. 69

Abb. 15: Die TNF α - und Ctx-induzierte gp130 *Cross*-Regulation ist p38-abhängig. 71

Abb. 16: Strategie zur Herstellung der gp130^{LLAA} *knockin* Mauslinie. 73

Abb. 17: KM-DZ aus gp130^{LLAA} Mäusen akkumulieren reife Formen des gp130 an ihrer Oberfläche. 75

Abb. 18: Knochenmarkvorläuferzellen von gp130^{LLAA} Mäusen zeigen ein erhöhtes gp130 Expressionsniveau. 76

Abb. 19: Die gp130^{LLAA} KM-DZ zeigen keine signifikante Veränderung beim IL-6/STAT3-Signal. 77

Abb. 20: Die verstärkte gp130 Expression führt zu einer erhöhten Responsivität gegenüber hyper-IL-6 in gp130^{LLAA} KM-DZ. 78

Abb. 21: Knochenmark von gp130^{LLAA} und WT Mäusen generiert vergleichbar Mengen an DZ. 80

Abb. 22: Die während der Reifung induzierten Signalkaskaden weisen keine signifikanten Unterschiede bei den KM-DZ Kulturen von WT und gp130^{LLAA} Mäusen auf. 81

Abb. 23: gp130^{LLAA} KM-DZ haben einen vergleichbaren Reifestatus wie WT KM-DZ. 82

Abb. 24: Analyse des Zytokin-Profiles von WT und gp130^{LLAA} KM-DZ Zellkulturen. 83

Abb. 25: LPS induziert eine vom Internalisierungsmotiv unabhängige *Cross*-Regulation von gp130. 86

Abb. 26: Die LPS-vermittelte gp130 *Cross*-Regulation in KM-DZ ist Clathrin-abhängig. 88

Abb. 27: gp130 ^{LLAA} Mäuse zeigen keinen Unterschied im Körpergewicht sowie im Gewicht und der Zellularität lymphatischer Organe gegenüber WT Mäusen.	89
Abb. 28: Myeloide Zellen der peripheren lymphatischen Organe von gp130 ^{LLAA} Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression.	92
Abb. 29: Lymphozyten der peripheren lymphatischen Organe von gp130 ^{LLAA} Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression.	94
Abb. 30: Gp130 ^{LLAA} Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der kDZ, pDZ und MΦ in den lymphatischen Organen im Vergleich zu WT Mäusen.	96
Abb. 31: Gp130 ^{LLAA} Mäuse zeigen eine erhöhte T-Zell-Frequenz in der Milz im Vergleich zu Kontrollmäusen.	98
Abb. 32: OSM induziert die Expression von RLR sowie IRF in dermalen Fibroblasten.	101
Abb. 33: Die Induktion von RIG-I und MDA5 ist zytokinspezifisch.	102
Abb. 34: Das Signal des Typ II Rezeptorkomplexes (gp130/OSMR) reicht aus, um die Expression der RLRs und <i>IRF1</i> zu induzieren.	103
Abb. 35: OSM induziert eine transiente Tyrosin (Y ₇₀₁)- und Serin (S ₇₂₇)-STAT1 Phosphorylierung.	104
Abb. 36: Die Expression der RLRs und IRFs ist abhängig von der OSM-vermittelten STAT1-Phosphorylierung.	105
Abb. 37: Der <i>knockdown</i> von STAT3 verstärkt die OSM-induzierte STAT1-Phosphorylierung und Expression von ISGs.	107
Abb. 38: OSM induziert eine STAT3-abhängige <i>SOCS3</i> und eine STAT1-abhängige <i>SOCS1</i> Expression.	108
Abb. 39: Der <i>knockdown</i> von <i>SOCS3</i> verstärkt die OSM-induzierte STAT1-Phosphorylierung.	109
Abb. 40: Der <i>knockdown</i> von <i>SOCS3</i> verstärkt die OSM-induzierte ISG Expression.	110
Abb. 41: Der <i>knockdown</i> von <i>PTPN2</i> führt zu einer leicht verlängerten OSM-induzierten STAT1-Phosphorylierung und <i>IRF1</i> Induktion.	112
Abb. 42: Der <i>knockdown</i> von <i>SUMO-1</i> führt zu einer transienten leichten Verstärkung der OSM-induzierten <i>DDX58</i> und <i>IFIH1</i> mRNA Expression in HDF.	113
Abb. 43: Der <i>knockdown</i> von <i>PML</i> hat keinen Einfluss auf die OSM-vermittelte Induktion von <i>IRF1</i> , <i>DDX58</i> und <i>IFIH1</i>	114
Abb. 44: OSM verstärkt die IFN γ -induzierte RLR Expression.	115
Abb. 45: Die OSM-vermittelte <i>Ddx58</i> , <i>Ifih1</i> und <i>Irf1</i> mRNA Expression in Maus- und Rattenzellen.	117

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Zytokine, Stimulanzen und Rezeptoren sowie deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.....	34
Tabelle 2: Bezeichnung der verwendeten Inhibitoren, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.	34
Tabelle 3: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten Western Blot Antikörper, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.	35
Tabelle 4: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten FACS Antikörper für die Oberflächenfärbung, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.	36
Tabelle 5: Bezeichnung der verwendeten Comp eBeads für die FACS Analyse.....	37
Tabelle 6: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten siRNAs.....	37
Tabelle 7: Übersicht der für die qRT-PCR verwendeten humanen Primer.....	38
Tabelle 8: Übersicht der für die qRT-PCR verwendeten murinen Primer.	39
Tabelle 9: Übersicht der für die qRT-PCR verwendeten Ratten Primer.	40

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Akt	<i>AKR thymoma oncogene homolog</i>
AP2	Adapterprotein 2
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ctx	Choleratoxin
d	Tag (lat. <i>deis</i>)
d.h.	das heisst
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zellen
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
Flt3L	Flt3 Ligand (<i>FMS-like-tyrosine-3</i>)
Gab	<i>Grb2-associated-binder</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophages colony-stimulating-factor</i>
gp80	Glykoprotein 80
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde (engl. <i>hour</i>)
h	human
HDF	humane dermale Fibroblasten
HLF	humane Lungenfibroblasten
HPRT	<i>hypoxanthine phosphoribosyl-transferase</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

IC50	<i>inhibitory-concentration 50%</i>
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
I κ B α	<i>inhibitor-of-NF-κB alpha</i>
IL-6	Interleukin-6
IFN α 2a	Interferon alpha 2a
IFN β	Interferon beta
IFN γ	Interferon gamma
IRF1	<i>interferon regulatory factor 1</i>
IRF3	<i>interferon regulatory factor 3</i>
Jak	Januskinase
kDa	Kilodalton
kDZ	konventionelle Dendritische Zellen
KM	Knochenmark
KM-DZ	Knochenmark-generierte dendritische Zellen
ki	<i>knock-in</i>
l	Liter
LIF	<i>leukemia inhibitor factor</i>
LIFR β	<i>leukemia inhibitor factor receptor-β</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
m	murin
mAB	<i>monoclonal antibody</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDA5	<i>Melanoma Differentiation-Associated protein 5</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
MK2	<i>MAPK-activated kinase 2</i>
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μ M	Mikromolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NRCFB	<i>neonatal rat cardiofibroblasts</i>
OSM	<i>oncostatin M</i>
OSMR β	<i>oncostatin M receptor β</i>
p38	Stress-aktivierte Proteinkinase 38kDa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PAMP	pathogen associated molecular pattern
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
ph	phospho
PML	<i>promyelocytic leukemia protein</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PBS	<i>phosphate-buffered solution</i>
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	Phenylephrin
pg	Pikogramm
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase
pk	Polyklonal
PKB/Akt	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pY	Phospho-Tyrosin
pS	Phospho-Serin
PVDF	Polyvinylenddifluorid
R	Rezeptor
r	<i>rat</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RDF	<i>rat dermal fibroblast</i> (dt. dermale Rattenfibroblasten)
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
Ser (S)	Serin
SHP	<i>small heterodimer partner</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SUMO1	<i>small ubiquitin-related modifier 1</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline Tween-20</i>
TC-PTP	<i>T-cell protein-tyrosine phosphatase</i>
TF	Transkriptionsfaktor
TGF β	<i>transforming growth factor-beta</i>

Th	T-Helferzellen
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TM	Trockenmilch
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr (Y)	Tyrosin
U	Unit
ü.N.	über Nacht

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei all jenen bedanken, die zum erfolgreichen Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Besonderer Dank gilt PD Dr. Heike Hermanns die mir die Möglichkeit bot in Ihrem Labor zu arbeiten und damit diese Promotionsarbeit erst ermöglichte. Danke für die hervorragende Betreuung und Unterstützung, die vielen hilfreichen Ratschläge und den unermüdlichen Enthusiasmus bezüglich meiner Ergebnisse (auch wenn ich diesen nicht immer geteilt habe).

Weiterhin bedanke ich mich recht herzlich bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Manfred Lutz und meiner Drittbetreuerin Prof. Dr. Svenja Meierjohann für die fachliche Unterstützung, Anregungen und Diskussionen sowie für die Begutachtung meiner Arbeit.

Bei meinen (ehemaligen) Kollegen Dr. Christine Mais, Dr. Johannes Drechsler, Dr. Carmen Schäfer und Dr. Christiane Erb bedanke ich mich für die praktische Unterstützung, die hilfreichen Diskussionen, die familiäre Atmosphäre und die schönen Studenten auch außerhalb des Labors. Ein großes Dankeschön gilt insbesondere Christine für die gemeinsame Zeit in Würzburg – danke dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest, für die vielen wunderbaren gemeinsamen Ausflüge und Konzertbesuche (hoffentlich werden es noch mehr ☺) sowie für deine Unermüdlichkeit beim Korrekturlesen.

Auch bedanke ich mich bei meinen „hinzugewonnenen“ Kollegen Dr. Daniel Jahn, Julia Wohlfahrt, Donata Dorbarth und Anne-Kristin Schilling der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andreas Geier für die praktische Unterstützung im Labor sowie für die anregenden Diskussionen während unserer gemeinsamen Seminare.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen ehemaligen Studenten und HIWIs des Labors sowie bei allen „Nachbar“-Arbeitsgruppen für die gemeinsame Zeit. Ein besonderer Dank gilt hierbei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen, allen voran Martin und Miriam, für ihre fachliche wie auch praktische Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Kristina Lorenz (ehemals Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg) bedanke ich mich für die Bereitstellung der NRCFB. Prof. Dr. Christoph Garbers (Institut für Biochemie der Universität Kiel) Danke ich für die Bereitstellung der *IL-6^{-/-}* femoralen Mausknochen. Der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Manfred Lutz (Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg) danke ich für die Bereitstellung von Reagenzien und die nette Zusammenarbeit, insbesondere Dr. Eliana Ribechini für die Möglichkeit an ihrem MDCS-Projekt

mitarbeiten zu dürfen und Vini John für die Durchführung der IL-6 und IL-12 ELISA. Auch bedanke ich mich recht herzlich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Bernhard Nieswandt (insbesondere Dr. Viola Lorenz, Dr. Judith van Eeuwjik, Dr. Simon Stritt, Kiran Gotru) für die Bereitstellung der Inhibitoren.

Schließlich möchte ich mich von ganzen Herzen bei meiner Familie für Ihre Unterstützung und das fortwährende Interesse an meiner Arbeit bedanken (auch wenn die nicht immer einfach zu verstehen war). Ganz besonders bedanke ich mich bei meinem Mann, der mit mir in den letzten Jahren die vielen Höhen und Tiefen des Studiums und dieser Arbeit durchlebt und mich dabei stets motiviert hat. Es lässt sich wohl kaum in Worte fassen, wie unendlich Dankbar ich dir bin!

VERÖFFENTLICHUNGEN

Hergovits S, Mais C, Haan C, Costa-Pereira AP, Hermanns HM. (2017) Oncostatin M induces RIG-I and MDA5 expression and enhances the double-stranded RNA response in fibroblasts.

eingereicht bei J. Cell. Mol. Med.

Hergovits S, Mais C, Lutz MB, Hermanns HM. (2017) Stimuli shaping BMDC activation differentially regulate cell surface expression of the IL-6 signal transducer gp130.

in Vorbereitung

Ribechini E, Hutchinson J, Hergovits S, [...], Lutz MB. (2017) Specific GM-CSF and M-CSF signaling via IRF-1 and mTOR control the generation of monocytes or monocyte myeloid-derived suppressor cells.

in Vorbereitung

Hermanns HM, Wohlfahrt J, Mais C, Hergovits S, Jahn D, Geier A. (2016) Endocytosis of pro-inflammatory cytokine receptors and its relevance for signal transduction.

Biol. Chem. 397: 695-708.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Relevanz der gp130 Endozytose bei der Maturierung und Differenzierung dendritischer Zellen sowie Charakterisierung des molekularen Mechanismus der OSM-vermittelten Induktion antiviraler Gene“ 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.

Würzburg,

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)

AFFIDAVIT

I hereby confirm that my thesis entitled „Relevance of the IL-6 receptor gp130 endocytosis during dendritic cell maturation and activation as well as characterization of the molecular mechanism of OSM-mediated antiviral gene induction“ 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 the thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Wuerzburg,

(Place, Date)

.....

(Signature)

