

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Die Rolle der gp130 Endozytose für die Homöostase der B- und  
T-Zellen**

**Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

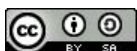
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Lena Katharina Dresselhaus**

aus Lüneburg

**Würzburg, Oktober 2021**



**Referentin: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Heike Hermanns**

**Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Beilhack**

**Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2022**

**Die Promovendin ist Zahnärztin**

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Allgemeine Grundlagen der Immunabwehr .....	1
1.2	Die Milz .....	2
1.3	Angeborene und erworbene Immunantwort in der Milz .....	4
1.4	Zytokine .....	6
1.4.1	Interleukin-6-Typ Zytokine und ihre Rezeptorkomplexe .....	7
1.4.2	Klassische Signaltransduktion am Beispiel von IL-6.....	8
1.4.3	<i>Trans</i> -Signal.....	10
1.4.4	Regulationsmechanismen des IL-6 Signalwegs .....	11
1.4.4.1	Klassische Regulation.....	11
1.4.4.2	<i>Crosstalk</i> -vermittelte Regulation .....	12
1.4.5	Gp130 Rezeptorstruktur.....	13
1.4.6	Interleukin-6 .....	15
1.5	Ziel der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden .....	18
2.1	Material .....	18
2.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	18
2.1.2	Antikörper.....	18
2.1.2.1	Antikörper für die FACS Analyse .....	18
2.1.2.2	Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung .....	20
2.1.3	Geräte .....	20
2.1.4	Kits .....	21
2.1.5	Verwendete Mausstämme .....	21
2.1.6	Software .....	22
2.2	Methoden .....	23
2.2.1	Hämatoxylin-Eosin-Färbung .....	23
2.2.2	Immunfluoreszenzfärbung FFPE Schnitte Milz.....	24
2.2.3	Durchflusszytometrische Analyse .....	26
2.2.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie .....	26
2.2.3.2	Kompensation .....	27
2.2.3.3	Ausschluss von toten Zellen und Doubletten.....	28

2.2.3.4	Isolation von Lymphozyten aus der Milz für die Durchflusszytometrie.....	28
2.2.3.5	Färbung von spezifischen Oberflächenmolekülen der Lymphozyten	29
2.2.3.6	Antikörper-Mischungen und Auswertungsstrategien für die Analyse der T- und B-Zell-Populationen.....	30
2.2.3.6.1	Follikuläre-, MZ-, T1-B-Zellen und Plasmazellen.....	30
2.2.3.6.2	Plasmazellen, B-Zellen und ihre CD130 Expression .....	31
2.2.3.6.3	B1-Zellen.....	32
2.2.3.6.4	B-Zellen des Keimzentrums.....	33
2.2.3.6.5	T-Lymphozyten und ihre CD130 Expression .....	34
2.2.4	Statistik .....	35
3	Ergebnisse.....	36
3.1	Relevanz der gp130 Endozytose für die Differenzierung lymphoider Zellen <i>in vivo</i> .....	36
3.1.1	Das Körpergewicht von gp130 <sup>LLAA</sup> und WT Mäusen ist vergleichbar.....	36
3.1.2	Die Gewichte von Milz, Herz, Niere und Leber von gp130 <sup>LLAA</sup> und WT Mäusen sind vergleichbar.....	36
3.1.3	Die Blutglucosespiegel von gp130 <sup>LLAA</sup> und WT Mäusen (nicht nüchtern) sind vergleichbar.....	38
3.2	Mikroskopische Befunde.....	39
3.2.1	H&E- Organschnitte von gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen und WT Mäusen sind vergleichbar .....	39
3.2.2	Immunhistochemische Untersuchung des FFPE Milzgewebes von gp130 <sup>LLAA</sup> und WT Mäusen zeigt vergleichbare Ergebnisse.....	44
3.3	Lymphozyten aus der Milz von gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen exprimieren mehr gp130 an der Oberfläche .....	47
3.4	Der Einfluss der gp130 <sup>LLAA</sup> Mutation auf die Homöostase von lymphoiden Zellen der Milz .....	54
4	Diskussion .....	67
4.1	Die gp130 <sup>LLAA</sup> <i>knockin</i> Mauslinie zur Untersuchung der gp130 Endozytose	67
4.2	Probleme bei der Immunfluoreszenzfärbung von CD3 und pSTAT3 in WT und gp130 <sup>LLAA</sup> FFPE Milzgewebe .....	67

4.3	Die gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeichnen sich durch eine erhöhte gp130 Expression aus.....	68
4.4	Präzisere Identifizierung von Plasmazellen erfordert möglicherweise eine neue Auswertungsstrategie .....	69
4.5	Gp130 <sup>LLAA</sup> Plasmazellen reagieren möglicherweise sensitiver auf IL-6 .....	72
4.6	Relevanz der gp130 Endozytose für die Homöostase lymphoider Zellen ....	75
4.7	Die Rolle des Geschlechts bei der gp130 Rezeptorexpression.....	79
4.8	Ausblick.....	87
5	Zusammenfassung .....	88
6	Literaturverzeichnis.....	90
I.	Abkürzungsverzeichnis.....	
II.	Abbildungsverzeichnis .....	
III.	Tabellenverzeichnis .....	



# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeine Grundlagen der Immunabwehr

Die Aufgabe des Immunsystems besteht darin, Fremddantigene zu erkennen und zu eliminieren, körpereigene Strukturen jedoch zu tolerieren und so den Organismus vor Infektionserregern, Toxinen und degenerierten Zellen zu schützen (1).

Die Immunantwort läuft in verschiedenen Phasen ab. Die frühe Phase der Immunantwort nutzt angeborene, schnelle, weniger effektive Abwehrmechanismen, sobald der Körper auf Pathogene trifft. Zu der unspezifischen Immunantwort gehören physische (Haut und Schleimhäute) und chemische Barrieren (pH-Wert Magen, bestimmte Enzyme z.B. Lysozym (2)), die Aktivierung des Komplementsystems, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen (DZ), Makrophagen und natürliche Killerzellen (NK) (3-6). Mittels spezieller Erkennungsrezeptoren, sog. PRRs (*Pattern Recognition Receptors*), erfassen diese Zellen unspezifisch Pathogen-typische Strukturen, sog. PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Bekannte PAMPs sind Zellwandbestandteile von Bakterien, wie Peptidoglycan und Lipopolysaccharid (LPS) (7,8).

Parallel wird eine spezifische Immunantwort eingeleitet, deren vollständige Effektivität sich erst nach mehreren Stunden bis Tagen entwickelt. Die wichtigsten Komponenten der erworbenen, adaptiven Immunität sind die Antigen-spezifischen Effektorzellen, die B- und T-Lymphozyten. Die Immunzellen gehen aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervor und reifen anschließend im Knochenmark (B-Lymphozyten) und im Thymus (T-Lymphozyten) (9,10). Von diesen zentralen lymphatischen Organen wandern die Lymphozyten über das Blut in die peripheren lymphatischen Gewebe, wie die Milz, die Lymphknoten und in die Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT), wo die Lymphozyten durch Antigene (Ag) aktiviert werden (11). Durch die Bindung des Ag an den B-Zell-Antigenrezeptor (BZR), welcher aus einem transmembranen Immunglobulin (Ig) besteht, werden naive, reife B-Zellen aktiviert (12). B-Lymphozyten vermitteln durch die Sekretion hoch-affiner, löslicher Antikörper (Ak) zunächst vom IgM-, dann vom IgG-Typ die humorale Immunabwehr. In Keimzentren (KMZ) kommt es vermittelt durch T-Zell-Hilfe zur Affinitätsreifung der Ak und Differenzierung der B-Zellen in antikörpersezernierende (ASZ) Plasmazellen und B-Gedächtniszellen, die nach erneutem Antigenkontakt für eine verstärkte sekundäre Immunantwort sorgen (13). Die T-Lymphozyten steuern die

zelluläre Immunabwehr und binden mit dem T-Zell-Antigenrezeptor (TZR) das Ag, das ihnen von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) prozessiert angeboten wird (14,15). CD4 und CD8 sind wichtige Oberflächenmoleküle auf den T-Lymphozyten, die zur Unterscheidung von Subpopulationen dienen. Diese Glykoproteine gehören zur Ig-Superfamilie und dienen als Co-Rezeptoren des TZR (16). Wird das über MHC (*Major Histocompatibility Complex*) präsentierte Fremdantigen von der T-Zelle erkannt, erfolgt ihre über den TZR vermittelte Aktivierung und Differenzierung (15). CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkennen auf MHC-I-Molekülen präsentierte Antigene und vermitteln ihre zytotoxische Effektorfunktion vor allem an viral infizierte Zellen und Tumorzellen, indem sie durch die Freisetzung von zytotoxischen Proteinen wie Perforinen und Granzymen die Apoptose in diesen Zielzellen auslösen (17). CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden als T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) bezeichnet. Über ihren TZR erkennen sie Antigen-Peptide, die ihnen über MHC II Moleküle präsentiert werden (18). T-Helferzellen werden durch die von ihnen ausgeschütteten Zytokine wiederum drei Subpopulationen zugeordnet (T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17) (19). T<sub>H</sub>1 Zellen unterstützen das Immunsystem bei der zellulären Immunantwort, indem durch die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  und IL-2 die Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen und anderen Zellen erfolgt. T<sub>H</sub>2 Zellen interagieren, vermittelt durch u.a. IL-4, mit B-Lymphozyten und sind dadurch an der humoralen Immunantwort beteiligt (20-22). Die T<sub>H</sub>17 Immunantwort, die mit der Produktion von Zytokinen der IL-17-Familie und IL-22 einhergeht, kann durch pro-inflammatorische Eigenschaften an Endzündungsprozessen oder an der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten beteiligt sein (23,24). Eine weitere CD4<sup>+</sup> Population wird von den regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) gebildet, deren Aufgabe darin besteht, autoreaktive T-Zellen zu hemmen und eine überschießende Immunantwort durch Effektor-T-Zellen zu verhindern (25,26).

## **1.2 Die Milz**

Die Milz dient als Filteranlage des Blutsystems und ist als sekundäres lymphatisches Organ ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems. Sie ist von einer Bindegewebskapsel umgeben, deren Ausläufer als Trabekel in das Parenchym ziehen und dieses unvollständig in Segmente unterteilen. Das Parenchym der Milz lässt sich histologisch in rote Pulpa, weiße Pulpa und eine marginale Zone (MZ) unterteilen (27,28).

Die rote Pulpa dient als Blutfilterstation und ist für den Abbau alter Erythrozyten und Thrombozyten verantwortlich, wohingegen die weiße Pulpa die lymphatische Funktion der Milz erfüllt.



In der roten Pulpa fließen die Erythrozyten durch arterielle Kapillaren zunächst über einen offenen Kreislauf in das retikuläre Netz der Pulpastränge (29).

Von dort aus gelangen sie in venöse Sinusoide, deren diskontinuierliches Endothel nur junge, gut verformbare Erythrozyten durch schmale Endothelschlitze passieren können. Alte und abnorm geformte Erythrozyten werden dagegen durch Makrophagen der roten Pulpa phagozytiert und abgebaut (30-32).

Die weiße Pulpa besteht aus den periarteriellen Lymphozytenscheiden (PALS) (33), die sich entlang der Zentralarteriolen erstrecken und u.a. dendritische  $CD8\alpha^+CD11b^-$  Zellen (34) und T-Lymphozyten enthalten. Diese DZ nehmen tote Zellen auf und sind für die Kreuzpräsentation von Antigenen an  $CD8^+$  T-Zellen zuständig (35,36). Lymphfollikel, bestehend aus B-Lymphozyten und follikulären dendritischen Zellen (FDZ), sind eng an die PALS angelagert. Primäre Lymphfollikel sind kugelförmige Ansammlungen von naiven B-Lymphozyten, sekundäre Lymphfollikel entstehen nach Antigenkontakt und bestehen aus einer Mantelzone und einem KMZ (*Germinal Centre*) (28). Die Aufrechterhaltung der B- und T-Zell Kompartimente wird durch spezifische Chemokine kontrolliert, die für die Chemotaxis bestimmter Zellen verantwortlich sind. Das von FDZ produzierte CXCL13 führt zu der Migration von Chemokinrezeptor CXCR5 exprimierenden B-Zellen in die B-Zell-Follikel (37), wohingegen Stromazellen und DZ in der T-Zell-Zone CC-Chemokin Ligand CCL19 und CCL21 produzieren und dadurch T-Zellen und dendritische Zellen in die PALS rekrutieren (38,39).

Die marginale Zone (MZ) gilt als Transitzone, da sie Zellen den Austritt aus dem Blutstrom und den Eintritt in die weiße Pulpa ermöglicht. Dieser aktive Vorgang wird durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren gesteuert (40,41). In dieser Zone befinden sich einige residente Zellen, zu denen auch die MZ-Makrophagen (MZM) und die metallophilen Makrophagen (MMM) gehören. Durch die Expression von spezifischen PRRs sind sie in der Lage, bestimmte Bakterien und Viren aus dem Blut zu entfernen (42-44). Zwischen den Makrophagen sind die B-Zellen der marginalen Zone und DZ lokalisiert (45,46). Dendritische  $CD8\alpha^-CD11b^+$  Zellen exprimieren MHCII Komplexe und sind für die Antigenpräsentation an  $CD4^+$ T-Zellen zuständig (34-36). Die B-Zellen der MZ können die CXCL13 vermittelte Rekrutierungsaktivität in die Follikel umgehen, indem sie eine höhere Expressionsrate des S1PR1 (*sphingosine-1-phosphate-1*) und S1PR3 Rezeptors als die follikulären B-Zellen aufweisen. Die Bindung des in der MZ in hoher Konzentration vorkommenden S1P (*sphingosin-1-phosphate*) an diese Rezeptoren triggert eine chemotaktische Aktivität und fördert die Ansammlung der MZ-B-Zellen in diesem Bereich (47). Intravitalmikroskopische Studien zeigen jedoch, dass

die MZ-B-Zellen zwischen der MZ und den B-Zell-Follikeln in der weißen Pulpa oszillieren (48).

Nach LPS Stimulation oder Antigenkontakt verringern MZ-B-Zellen die Expressionsrate von S1PR, um somit anschließend in die B-Zell-Follikel zu gelangen. Diese Desensibilisierung der Rezeptoren erfolgt durch die GRK2 (*guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor kinase-2*) (49). Die GRK2 vermittelte Regulation des S1PR erlaubt den MZ-B-Zellen das Erreichen der Follikel und stellt einen Mechanismus dar, über den opsonierte Antigene von der offenen Blutzirkulation in die B-Zell-Follikel transportiert werden. NK T-Zellen kommen größtenteils in der MZ vor, wo sie auf Lipidantigene reagieren und nachfolgend die Zellen der adaptiven Immunantwort aktivieren (50).

### **1.3 Angeborene und erworbene Immunantwort in der Milz**

Die beschriebene Milzstruktur (Abb. 1) ermöglicht sowohl eine unspezifische als auch eine spezifische Immunantwort. Die weiße Pulpa ist nur in die adaptive Abwehr involviert, wohingegen die MZ durch ihre Makrophagen und MZ-B-Zellen bei adaptiver und unspezifischer Immunantwort eine Rolle spielt.

Wie bereits beschrieben, exprimieren die Makrophagen in der MZ zusätzlich zu PRRs spezielle Rezeptoren, mit deren Hilfe sie effizient Pathogene aus dem Blut entfernen können (51). Beispielsweise bindet der SIGNR1 (murin homolog zu DC-SIGN *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) Polysaccharid-Antigene, die zum Beispiel auch auf der Oberfläche des *Mycobacterium tuberculosis* zu finden sind. Außerdem spielt er eine Rolle bei der Beseitigung des *Streptococcus pneumoniae* (44,52-54).

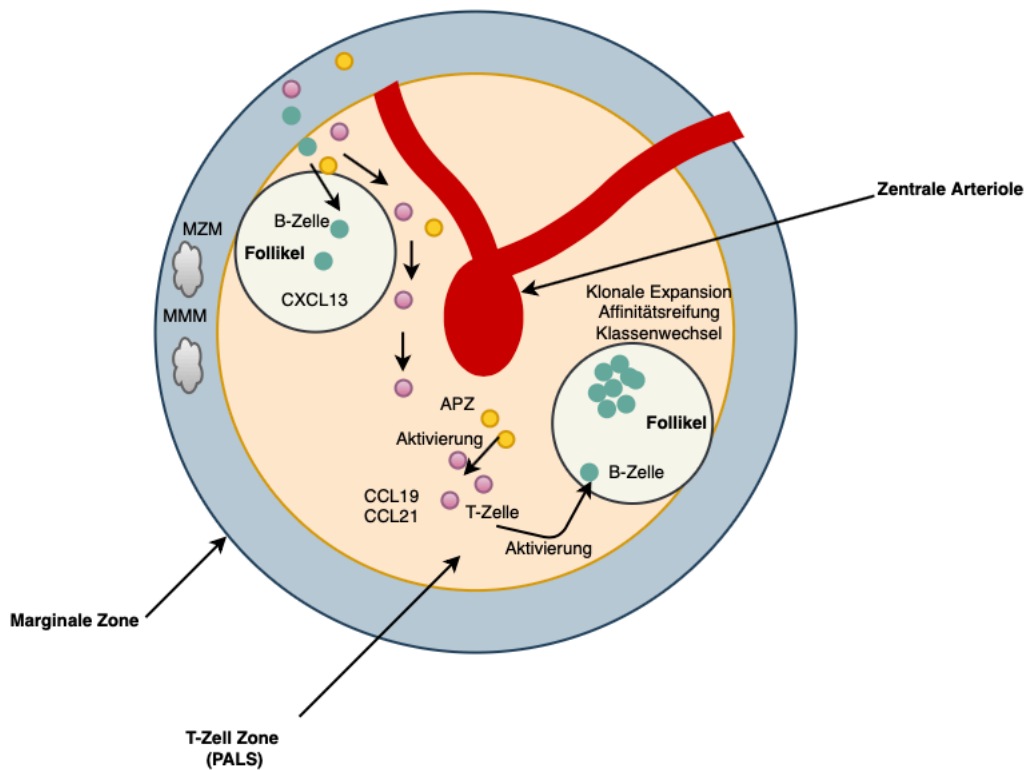
Die B-Zellen der MZ reagieren schnell auf Pathogene aus dem Blut, indem sie sich nach der Aufnahme von löslichen Antigenen in Plasmazellen differenzieren (55) oder als APZ fungieren (56), die daraufhin naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktivieren können (57). DZ der MZ exprimieren CXCR5 und werden vermutlich auch durch die Expression von S1P1/S1P3 in der MZ gehalten, bevor die Herunterregulierung der Rezeptoren auch diesen Zellen die Migration in die B-Zell-Follikel ermöglicht (45). Der Eintritt von APZ in die weiße Pulpa leitet die adaptive Immunabwehr ein (58,59).

Eine Ag-spezifische T-Zell Aktivierung erfordert eine Interaktion zwischen T-Zellen und APZ, deren Funktion auch B-Zellen selbst übernehmen können (60,61). Mit Erfassung der Antigene durch den BZR, gefolgt von ihrer Prozessierung und Präsentation an passende antigenspezifische T-Zellen durch eigene MHCII Rezeptorkomplexe, beginnt

die zelluläre Interaktion (62,63). Nachdem aktivierte APZ die weiße Pulpa erreicht haben, werden T-Zellen aktiviert, die CXCR5 Expression hochreguliert und die CCR7 Expression verringert. Dieses Verhalten ermöglicht den T-Zellen eine Migration an den Rand der B-Zell-Follikel (64). Analog dazu induziert die Bindung der Ag an die Rezeptoren in den B-Zell Follikeln eine Hochregulierung ihrer CCR7 Expression und bewirkt so eine Wanderung der B-Zellen an den Rand der Follikel, wo sie auf aktivierte T-Zellen treffen (65).

Die T-Zell-abhängige B-Zell-Aktivierung erfolgt durch co-stimulatorische Signale wie der Freisetzung von IL-2, IL-4 und durch direkte interzelluläre Kontakte (66-68). Für diese interzellulären Kontakte spielt die Interaktion von CD40 und seinem Liganden CD40L eine entscheidende Rolle. CD40 gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und wird auf reifen B-Zellen, DZ mit Ursprung im Knochenmark und FDZ exprimiert (61). Sein Ligand, CD40L, wird nur von aktivierten T-Zellen exprimiert (69,70). Die Vernetzung von CD40 fördert die B-Zell-Proliferation (71), verhindert die Apoptose von B-Zellen im Keimzentrum (KMZ) (72) und fördert den Klassenwechsel der Antikörper (73). Die initiale Aktivierung führt zunächst zur Proliferation und Differenzierung der B-Zellen zu IgM sezernierenden, kurzlebigen Plasmazellen (74) und zur Bildung eines sog. Primärfokus im Bereich der PALS (75-77). B-Zellen, die mit ihren passenden T-Zellen in das Zentrum der Primärfollikel migrieren, bilden dort sog. KMZ. Bei der Entstehung eines KMZ bildet sich zunächst eine dunkle Zone, in der die aktivierten B-Zellen (Zentroblasten) einer massiven klonalen Expansion unterliegen (78,79). Somatische Hypermutation in den Genen der variablen Teile der Ak kann zur Veränderung der Affinität der BZR zu ihren Ag führen (80,81). Die B-Zellen wandern aus der dunklen Zone heraus in das Netzwerk der FDZ und bilden die helle, äußere Zone des KMZ (82). Ist die Rezeptoraffinität der Zentrozyten zum präsentierten Ag auf den FDZ hoch genug, so können sie die Ag lysosomal prozessieren. Die Peptidfragmente werden, gebunden an MHCII, auf der Zelloberfläche exprimiert und an antigenspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert (83). In der hellen Zone erfolgt auch der Ig-Klassenwechsel, der durch Deletion eines Teils des Gensegments für die konstante Region der schweren Kette entsteht. Durch positive und negative Selektion kommt es zur Affinitätsreifung (72). Ausschließlich B-Zellen mit hoher Affinität zum Ag differenzieren zu IgG, IgA oder IgE produzierenden Plasmazellen (84,85) oder B-Gedächtniszellen (86,87). Ein Teil der entstandenen Plasmazellen wandert in das Knochenmark, in dem sie unter dem Einfluss von Zytokin- und Adhäsionsmolekülvermittelten Signalen zu langlebigen, nicht-proliferierenden Plasmazellen differenzieren

(88) und hochaffine IgG, IgA, IgE Ak sezernieren (84,85). Der Rand der Follikel besteht aus naiven B-Zellen, die als sog. Mantelzone das KMZ umschließen (89).



**Abbildung 1: Die Struktur der murinen Milz.** Dargestellt ist ein schematischer Ausschnitt der murinen Milz. Um die zentralen Arteriolen liegt die weiße Pulpa. Sie besteht aus den B-Zell Follikeln und der T-Zell Zone, der PALS (Periarterielle Lymphozytenscheide). Die zentralen Arteriolen enden in der roten Pulpa, von wo das Blut in venöse Sinusoide fließt. Die marginale Zone gilt als Transitzone und ermöglicht B- und T-Zellen den Eintritt in die weiße Pulpa. Die Chemokine CXCL13, CCL19 und CCL21 rekrutieren die B- und T-Zellen in die spezifischen Kompartimente. Makrophagen der marginalen Zone (MZM) und marginale-Zone-metallophile Makrophagen (MMM) können Pathogene aus dem Blut entfernen. Antigen-präsentierende Zellen (APZ) (dendritische Zellen, aber auch B-Zellen) aktivieren T-Zellen, die daraufhin an den Rand der B-Zell Follikel wandern und dort B-Zellen aktivieren können. In den nachfolgend gebildeten Keimzentren unterliegen die aktivierten B-Zellen einer massiven klonalen Expansion. Somatische Hypermutationen führen zur Affinitätsreifung der BZR und B-Zellen mit hoher Affinität können nach positiver Selektion und Differenzierung zu Plasmazellen hochaffine Antikörper sezernieren. Modifiziert nach (41).

#### 1.4 Zytokine

Zytokine sind Polypeptide, welche als Signalstoffe der interzellulären Kommunikation dienen. Sie werden von verschiedenen Zelltypen *de novo* synthetisiert und autokrin (Signalstoffe wirken auf die sezernierende Zelle selbst), parakrin (Wirkung der Signalstoffe auf unmittelbar benachbarte Zelltypen) oder selten endokrin (Signalstoffe

erreichen entfernte Zielstruktur über das Blut) sezerniert. Über die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen werden intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst, welche die Zielzelle zu Differenzierung, Proliferation, Migration, Apoptose oder Änderung ihrer Genexpression anregen. Zytokine können auf mehrere Zielzellen wirken (Pleiotropie) und sich synergistisch, additiv oder antagonistisch beeinflussen (90). Zu den Zytokinen zählt ebenfalls die Familie der Interleukine, die nach ihrer Funktion, der Kommunikation zwischen den Leukozyten, benannt sind (von lat. *inter* (zwischen); griech. *leukos* (weiß); *kinein* = (sich bewegen)).

#### **1.4.1 Interleukin-6-Typ Zytokine und ihre Rezeptorkomplexe**

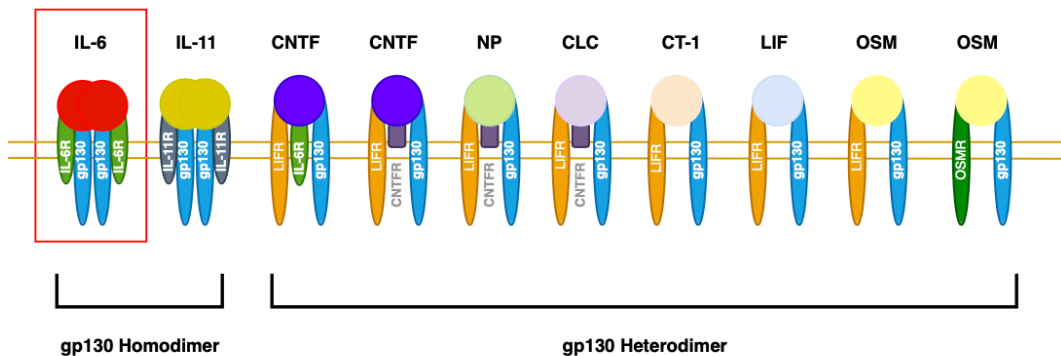
Die Zytokine vom Interleukin-6-Typ umfassen neben IL-6 zusätzlich IL-11, OSM (*oncostatin M*), LIF (*leukemia inhibitory factor*), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (*cardiotrophin-1*), CLC (*cardiotrophin-like cytokine*) und NP (*neuropoietin*). Diese Zytokine weisen eine gemeinsame Struktur auf, bei der vier antiparallele  $\alpha$ -Helices zu einem Bündel angeordnet sind. Abb. 2 zeigt die IL-6-Typ Zytokine und ihre Rezeptorkomplexe. Alle IL-6-Typ Zytokine nutzen mindestens ein Molekül des ubiquitär exprimierten Glykoprotein 130 (gp130) als signaltransduzierende Rezeptoreinheit (91,92).

Auch IL-27 und IL-35 signalisieren über eine gp130 Rezeptoruntereinheit. Aufgrund ihrer Struktur gehören sie zu der Familie der IL-12-Typ Zytokine und bilden deshalb ein Bindeglied zwischen beiden Zytokinfamilien. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Zytokinen weisen IL-27 und IL-35 eine heterodimere Struktur auf, bestehend aus einer  $\alpha$ -helikalen Untereinheit (IL-27p28, IL-12p35) und einer  $\beta$ -Untereinheit Epstein-Barr-virus induced gene 3 (EBI-3) (93-95).

IL-6, IL-11, CNTF, CLC und NP binden zunächst an spezifische, nicht signalisierende  $\alpha$ -Rezeptoren, wohingegen OSM, LIF und CT-1 direkt an ihre signaltransduzierenden  $\alpha$ -Rezeptoren binden (96). IL-6 und IL-11 binden jeweils an ihren spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor IL-6R, bzw. IL-11R und induzieren die Rekrutierung eines gp130/gp130 Homodimers (97,98). CNTF, CLC und NP binden an ihren spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor CNTFR und an ein LIFR/gp130 Heterodimer. CNTF kann darüber hinaus auch über den IL-6R und das LIFR/gp130 Heterodimer signalisieren (99-101). LIF und CT-1 binden ohne signaltransduzierenden  $\alpha$ -Rezeptor an ein LIFR/gp130 Heterodimer. OSM kann sowohl über ein LIFR/gp130 Heterodimer als auch über ein OSMR/gp130 Heterodimer signalisieren (102,103). Im Gegensatz zu gp130 ist die Expression der restlichen Rezeptoren auf ausgewählte Zelltypen beschränkt.

Auch der IL-6R (gp80) wird nur auf bestimmten Zellen wie Hepatozyten, Monozyten/Makrophagen und einigen Subpopulationen der Leukozyten exprimiert (104,105).

IL-6 hat eine geringe Affinität zu gp130, die jedoch durch den gebildeten IL-6/IL-6R Komplex deutlich verstärkt wird. Dies führt zur gp130 Homodimerisierung und Induktion der Signaltransduktion (106).



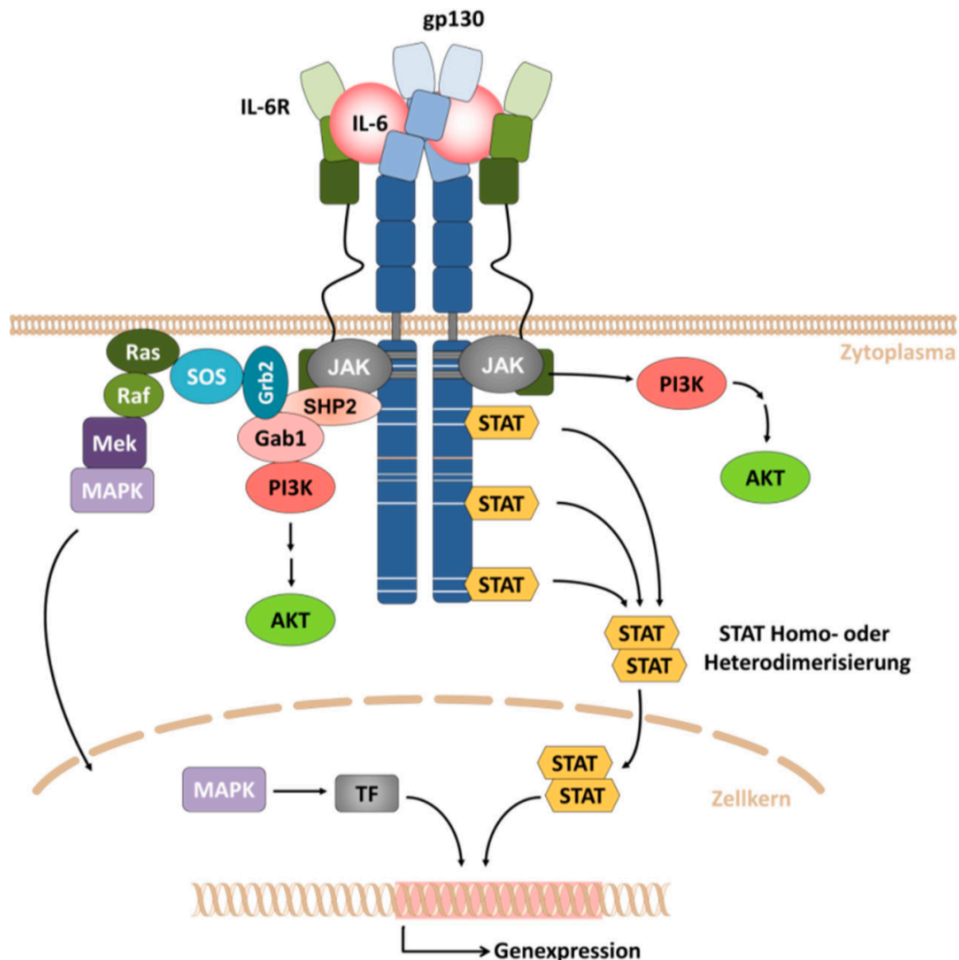
**Abbildung 2: Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Zytokine.** Alle IL-6-Typ Zytokine nutzen gp130 (blau) als signaltransduzierende Rezeptoreinheit. IL-6 und IL-11 signalisieren als einzige IL-6-Typ Zytokine über ein gp130 Homodimer. IL-6, IL-11, CNTF, NP und CLC binden zunächst an nicht signalisierenden  $\alpha$ -Rezeptoren (IL-6R, IL-11R, CNTFR).

#### 1.4.2 Klassische Signaltransduktion am Beispiel von IL-6

Zu Beginn der Signaltransduktion entsteht ein hexamerer Komplex aus jeweils zwei IL-6 Zytokinen, zwei IL-6R $\alpha$  und zwei gp130 Molekülen (107). Gp130 besitzt keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, sondern ist intrazellulär mit den Janus-Kinasen JAK1, JAK2, und TYK2 assoziiert, welche durch die IL-6 vermittelte Dimerisierung des gp130 aktiviert werden und Tyrosinreste im zytoplasmatischen Bereich des Rezeptors phosphorylieren (97,108,109). Diese phosphorylierten Tyrosinreste fungieren als Bindungsstellen für die *signal transducers and activator of transcription* (STAT)-Proteine und für die *Src homology 2-domain containing phosphatase 2* (SHP2). IL-6 vermittelt in erster Linie die Aktivierung von STAT3 über die Rekrutierung an Tyrosin<sup>765/767</sup> (murin/human), Tyrosin<sup>812/814</sup> (murin/human), Tyrosin<sup>904/905</sup> (murin/human), Tyrosin<sup>914/915</sup> (murin/human) sowie in einem geringeren Maße von STAT1 über die Bindung an Tyrosin<sup>904/905</sup> (murin/human), Tyrosin<sup>914/915</sup> (murin/human). Die durch Phosphorylierung aktivierten STAT-Proteine dissoziieren vom gp130 Rezeptor, bilden Homo- oder Heterodimere und translozieren in den Zellkern, um dort als Transkriptionsfaktoren die Expression

von IL-6 Zielgenen zu beeinflussen. Mit der Rekrutierung der SHP2 wird außerdem die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade (MAPK) induziert.

Die phosphorylierte SHP2 rekrutiert das Grb2 (*growth factor bound protein 2*) Adaptermolekül, welches an den Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos (*Son of sevenless*) bindet. Sos katalysiert den Austausch von GDP zu GTP im kleinen G-Protein Ras (*rat sarcoma*), welches die Aktivierung der MAPK ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) vermittelt. Außerdem kann die SHP2 mittels Gab1 (*Grb2-associating binder 1*) auch die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) -Kaskade aktivieren, die ebenfalls über den JAK/STAT-Signalweg induziert werden kann (91,96,110) (Abb.3).



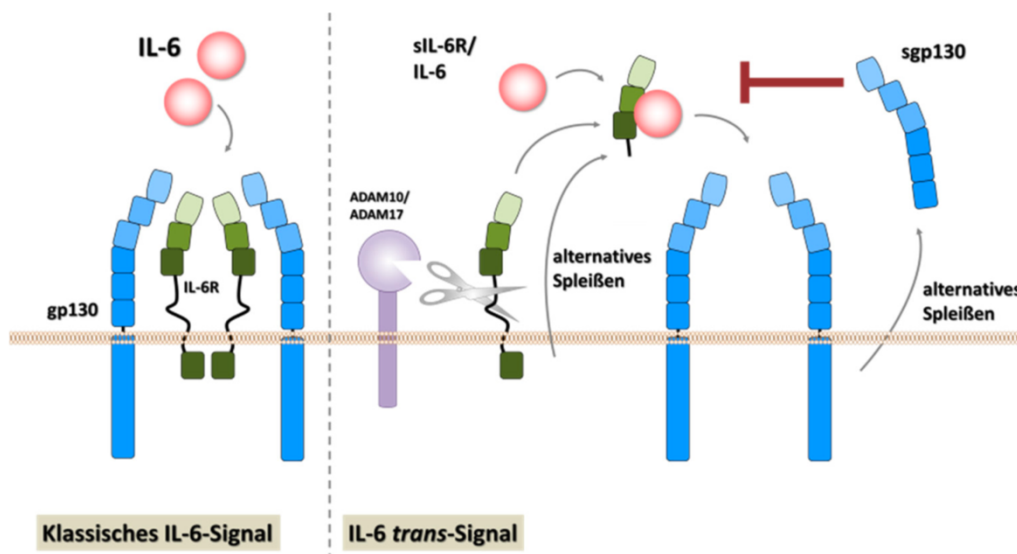
**Abbildung 3: Schematische Darstellung des IL-6 Signalwegs.** Die Bindung von IL-6 an den IL-6R $\alpha$  führt zu der Homodimerisierung von gp130. Durch die Konformationsänderung wird die intrazellulär mit gp130 assoziierte JAK aktiviert, die Tyrosinreste an gp130 phosphoryliert und dadurch Bindungsstellen für

STAT1 und STAT3 schafft. Nach JAK Phosphorylierungen können sie als Heterodimer oder Homodimer in den Zellkern translozieren und dort an regulatorische DNA-Sequenzen der IL-6 Zielgene binden und ihre Expression bewirken. Zusätzlich zu STAT kann auch die SHP2 an gp130 binden und über Adaptermoleküle zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs und des PI3K-Signalwegs führen. (Abkürzungen: Akt: *AKR thymoma oncogene homolog*, Gab1: *Grb2-associated binder 1*, Grb2: *growth factor receptor-bound protein 2*, MEK: *MAPK mitogen- activated protein kinase/ERK Kinase*, PI3K *phosphatidylinositol-3 kinase*, Ras: *Rat sarcoma*, Raf: *Rat fibrosarcoma*, SOS: *son of sevenless*, TF: Transkriptionsfaktor, Y: Tyrosin (111). (Mit freundlicher Genehmigung von Sabine Hergovits)

### 1.4.3 *Trans*-Signal

Zusätzlich zu dem klassischen Weg der IL-6 Signaltransduktion über die membranständigen IL-6R $\alpha$  Rezeptorketten kann zirkulierendes IL-6 auch an eine lösliche Form des IL-6R $\alpha$  (sIL-6R $\alpha$ ) binden und einen IL-6/sIL-6R $\alpha$  Komplex bilden. Der sIL-6R und der membranständige IL-6R binden IL-6 mit einer vergleichbaren Affinität (112). Der IL-6/sIL-6R Komplex kann Zellen stimulieren, die zwar gp130 exprimieren, jedoch keinen membranständigen IL-6R aufweisen. Dieser als „*Trans-signaling*“ bezeichnete Vorgang (Abb. 4) erweitert durch das ubiquitär vorkommende gp130 das Wirkungsspektrum für das IL-6 Signal erheblich (112-115). Das klassische Signal über den membranständigen IL-6R scheint antiinflammatorische und regenerative Prozesse zu vermitteln, wohingegen durch das *trans*-Signal eher proinflammatorische Prozesse eingeleitet werden sollen (106,116). Es existiert ebenfalls eine lösliche Variante des gp130 Rezeptors (sgp130), der als natürlicher Antagonist das IL-6 *trans*-Signal und bei höheren Konzentrationen zusätzlich das klassische IL-6-Signal inhibieren kann (106,117). Die löslichen Varianten der Rezeptoren entstehen im Menschen durch limitierte proteolytische Spaltung (*shedding*) des membrangebundenen Rezeptors mittels Metalloproteinase ADAM17 (*a disintegrin and metalloprotease 17*) (118) sowie durch Translation von alternativ gespleißter RNA (119). In Mäusen wurde lediglich die proteolytische Spaltung der Rezeptoren beobachtet (120).





**Abbildung 4: Schematische Darstellung des klassischen IL-6 Signals und des IL-6 *trans*-Signals.** Ist kein membranständiger IL-6R auf einer Zelle vorhanden, kann IL-6 mit vergleichbarer Affinität an eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R) binden. Der entstandene Komplex bindet im nächsten Schritt an membranständiges gp130. Da gp130 auf nahezu allen Zellen exprimiert wird, wird durch das *trans*-signaling das Wirkungsspektrum für IL-6 deutlich erweitert. Eine lösliche Form von gp130 (sgp130) dient als natürlicher IL-6-Signal-Antagonist. Die löslichen Rezeptoren entstehen durch proteolytische Spaltung oder alternatives Spleißen (111). (Mit freundlicher Genehmigung von Sabine Hergovits)

#### 1.4.4 Regulationsmechanismen des IL-6 Signalwegs

Eine überschießende Inflammation, die mit einer dauerhaften Aktivierung der IL-6-induzierten Signalübertragung einhergeht, kann unter anderem zu chronischen Entzündungen der Gelenke oder des Herzens und zu Tumorwachstum führen (121-125). Aus diesem Grund sind physiologische Mechanismen zur Limitierung der Dauer und Stärke des IL-6-vermittelten Signals von großer Bedeutung. Klassische Regulationsmechanismen können von *crossstalk*-vermittelten Regulationsmechanismen unterschieden werden.

##### 1.4.4.1 Klassische Regulation

Zur klassischen Regulation gehören die negativen Rückkopplungsmechanismen, die durch CIS-SOCS (*cytokine-inducible SH2-domain-containing-protein, suppressors of cytokine signaling*) - und PIAS (*protein inhibitors of activated STATs*) -Proteine vermittelt werden sowie die negative Regulation durch Proteintyrosinphosphatasen. Es sind 8 Mitglieder der CIS-SOCS Proteine bekannt (CIS, SOCS1-7), die eine zentrale SH2 Domäne, eine C-terminale SOCS Box und einer N-terminale KIR (*kinase*

*inhibitory region*) enthalten (126). Die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs induziert die Synthese der SOCS Proteine, sodass sie als klassische negative Rückkopplungsproteine agieren (127,128). Für den IL-6 Signalweg sind vor allem SOCS1 und SOCS3 nennenswert, da sie auf unterschiedliche Weise die Regulierung von STAT1 und STAT3 beeinflussen. SOCS1 interagiert direkt mit den Januskinasen JAK1, JAK2 und Tyk2, um ihre Tyrosinkinaseaktivität zu hemmen, wohingegen SOCS3 an Tyrosin<sup>757/759</sup>(murin/human) des gp130 Rezeptors bindet und infolgedessen den Zugang für STAT3 an seine Bindungsstelle verhindert (129,130) und durch Rekrutierung von Ubiquitinligasen die Degradation der JAKs einleiten kann (131).

Auch die Mitglieder der PIAS-Proteine können das IL-6/JAK/STAT Signal regulieren. Sie werden konstitutiv exprimiert und binden an durch Zytokin aktivierte, phosphorylierte STAT-Faktoren. Die PIAS-Proteine regulieren die Transkription durch unterschiedliche Mechanismen. PIAS1 und PIAS3 interagieren beispielsweise mit STAT1 und STAT3 und blockieren ihre Bindung an die DNA. Durch die Rekrutierung von Co-Repressoren wie der Histon-Deacetylasen können weitere PIAS-Proteine die transkriptionelle Aktivität einiger STAT-Proteine inhibieren. Ebenso können sie als Proteine mit SUMO-E3-Ligase Aktivität (*Small Ubiquitin-related Modifier*) die SUMOylierung von Signalproteinen fördern und somit die Degradation der STAT-Faktoren regulieren (132-135).

Eine weitere Regulationsmöglichkeit des JAK/STAT-Signalwegs bietet die Dephosphorylierung von Proteinen durch PTPs. SHP2 erfüllt nicht nur die Aufgabe als Adapterprotein für die Aktivierung der MAPK Kaskade, sondern spielt zudem eine Rolle bei der Regulierung des JAK/STAT Signals (136). SHP2 wird ubiquitär exprimiert und besteht aus zwei N-terminalen SH2 Domänen, einer katalytischen Phosphatase Domäne (PTP), sowie einer C-terminalen Domäne mit Tyrosinphosphorylierungsstellen. Im inaktiven Zustand interagiert die N-terminale SH2-Domäne mit der eigenen PTP-Domäne und macht dadurch das katalytische Zentrum für andere Substrate unzugänglich. Die Stimulation führt zu der Bindung an gp130 (<sup>Y757/759</sup> (murin/human)) über die SH2-Domänen und anschließend zur Entfaltung des Proteins, was den Zugang zum katalytischen Zentrum wieder ermöglicht (96,137,138).

#### **1.4.4.2 Crosstalk-vermittelte Regulation**

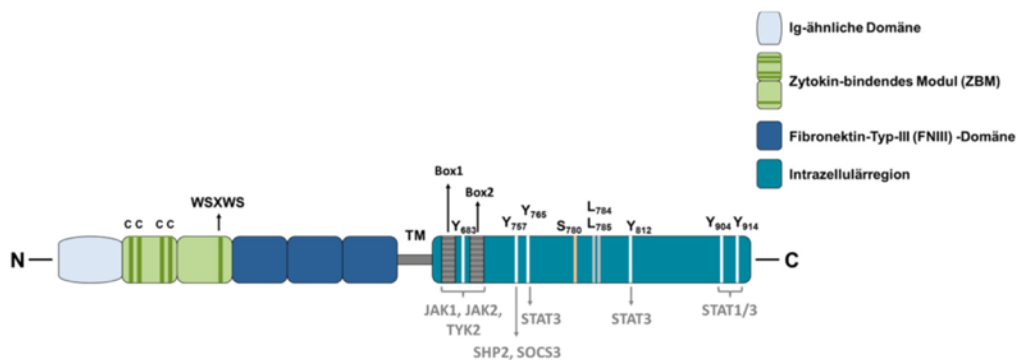
Während einer Entzündung werden neben IL-6 weitere proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  freigesetzt. Die Wechselwirkung zwischen den Zytokinen und weiteren proinflammatorischen Faktoren (LPS, Zellstress) wird auch als *Crosstalk*-

vermittelte Regulation bezeichnet. Die genannten Faktoren sind an der *Crosstalk*-Regulation des IL-6 Signals beteiligt. Sie äußert sich beispielsweise über die Aktivierung der Stress-abhängigen p38-MAPK, die zur Stabilisierung der mRNA von SOCS3 Proteinen führt (139) und damit auf diesem Weg oder durch direkte Induktion ihre Expression verstärkt (140). Auch die Internalisierung des gp130 Rezeptors kann *Crosstalk*-vermittelt erfolgen. Oxidativer Stress, LPS, UV-Licht oder proinflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führen zur aktivierenden Phosphorylierung von p38, welche anschließend ihr Substrat, die MAPKAPK2 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2), aktiviert. Die Serin/Threoninkinase MAPKAPK2 phosphoryliert daraufhin gp130 an Serin<sub>780/782</sub>(murin/human). Diese Phosphorylierung und das vorhandene Dileucin-Motiv (murin: Leucin<sub>784</sub>, Leucin<sub>785</sub>; human: Leucin<sub>786</sub>, Leucin<sub>787</sub>), welches als Bindungsstelle für das Adapterprotein AP-2 dient (141-143), begünstigen die Aufnahme von gp130 durch Clathrin-umhüllte Vesikel und infolgedessen seine lysosomale Degradation (111,144,145).

#### **1.4.5 Gp130 Rezeptorstruktur**

Wie bereits beschrieben, wird gp130 ubiquitär exprimiert und bildet mindestens einen Bestandteil des signalisierenden Rezeptorkomplexes der IL-6-Typ Zytokine (146). Das translatierte Glykoprotein besteht aus 917 (murin) bzw. 918 (human) Aminosäuren und hat eine Molekularmasse von 130-150 kDa. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors besteht N-terminal aus einer Ig-ähnlichen Domäne (D1) und fünf Fibronectin-III-Typ (FNIII)-ähnlichen Domänen (D2-D6) (Abb. 5). Das Zytokin-bindende Modul (ZBM) wird durch die Domänen D2 und D3 gebildet. D2 enthält vier konservierte Cysteinreste und D3 weist das für sog. Typ-I Zytokinrezeptoren charakteristische konservierte Tryptophan-Serin-X-Serin-Tryptophan (WSXWS) Motiv auf. D1-D3 sind für die Ligandenbindung essenziell, wohingegen die Transmembrandomäne und D4-D6 an der Signaltransduktion beteiligt sind (92,96,147). Der an die Transmembrandomäne anschließende, intrazelluläre Teil beinhaltet die Box1/Box2 Region, welche die Assoziation mit JAK1, JAK2 und TYK2 ermöglicht (148-150). Die am Rezeptor vorliegenden JAK sind nicht nur für die Initialisierung der Signalkaskaden verantwortlich, sondern spielen vielmehr auch eine Rolle für die Oberflächenexpression der Rezeptoren. Intrazellulär liegen auch die für die Signaltransduktion relevanten Tyrosinreste sowie der Serinrest<sub>780/782</sub>(murin/human) und das proximal dazu gelegene Dileucin Motiv, welche für die Internalisierung des Rezeptors bedeutsam sind (141,142,144).

Untersuchungen mit gp130 defizienten (gp130<sup>-/-</sup>) Mäusen zeigen, dass diese Tiere embryonal letal sind (E12.5). Ursache für die frühe Letalität ist ein pathologisch verändertes, hypoplastisches Myokard sowie eine verringerte Anzahl pluripotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen in Leber und Thymus (151). Untersuchungen mit gp130 *knockout* Mäusen konnten die Notwendigkeit der Zellaktivierung über gp130 nachweisen. Durch die postnatale Deletion des Exons 15, das für die Transmembrandomäne des Rezeptors kodiert, kann in einigen Zellen die membranständige gp130 Variante inhibiert werden, was zur Folge hat, dass die lösliche Variante des gp130 (sgp130) sezerniert wird. Das Fehlen der membranständigen Variante bewirkte gravierende hämatopoetische, immunologische, neuronale, kardiovaskuläre, hepatologische und pulmonale Veränderungen (111,152).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung des murinen gp130 Rezeptors.** Extrazellulär besteht der Rezeptor aus einer Ig-ähnliche Domäne (D1) und fünf Fibronectin-Typ-III (FNIII)-Domänen (D2-D5). D2-D3 bilden das Zytokin-bindende Modul und sind durch konservierte Cystein-Reste und das WSXWS Motiv charakterisiert. Kennzeichnend für die Intrazellulärregion ist eine konservierte Box1/Box2 Region, die in unmittelbarer Nähe zur Transmembran-Domäne (TM) liegt. Die für die Signaltransduktion relevanten Tyrosine sind mit Y bezeichnet. Serin S780(murine) und das Dileucin-Motiv L784/785(murine) sind für die Internalisierung des Rezeptors von Bedeutung (111). (Mit freundlicher Genehmigung von Sabine Hergovits)

#### 1.4.6 Interleukin-6

Als löslicher Mediator hat IL-6 pleiotrope Effekte auf die Immunantwort, Entzündung und Hämatopoese (153). IL-6 wird hauptsächlich von Monozyten/Makrophagen (154), B- und T-Zellen (155-157) sowie Endothelzellen (158), Fibroblasten (159) und Epithelzellen (160) gebildet. Die Expression von IL-6 wird sowohl durch virale und bakterielle Infektionen (161) als auch durch verschiedene Interleukine wie IL-3 (162), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , und IFN $\gamma$  induziert (111,163-165). Das translatierte IL-6 Protein umfasst insgesamt 212 (human)/ 211 (murin) Aminosäuren und enthält ein N-terminales Signalpeptid aus 24 (murin)/ 28 (human) Aminosäuren (166-168). Nach Abspaltung dieser Sequenz wird IL-6 als Protein mit einer Größe von ungefähr 21kDa sezerniert, jedoch kann durch posttranslationale Modifikationen wie N-, O-Glykosylierungen und serinspezifische Phosphorylierungen die reife Proteingröße zwischen 21-28 kDa variieren (168-170).

In den 1980-iger Jahren wurde IL-6 zunächst als BSF2 (*B-cell stimulatory factor 2*) bezeichnet, basierend auf der Fähigkeit, die Differenzierung von aktivierten B-Zellen zu Antikörper produzierenden Plasmazellen zu induzieren (171-173). Das Zytokin ist außerdem an der Induktion der Akutphase-Reaktion beteiligt, indem in der Leber Akutphase-Proteine wie das C-reaktive Protein (CRP), Fibrinogen, Serumamyloid A und Hepsidin vermehrt synthetisiert werden (174-177). Im Knochenmark wird durch IL-6 die Reifung von Megakaryozyten gefördert und infolgedessen die Thrombozytenbildung angeregt (178).

Darüber hinaus begünstigt IL-6 zusammen mit TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) die Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu Th17 Zellen, die vor allem mit der Entstehung von chronischen Entzündungen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz dazu wird die Differenzierung der regulatorischen T-Zellen (Treg) inhibiert (179,180). IL-6 fördert die Differenzierung zu CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen vom Typ2 (TH<sub>2</sub>) und inhibiert gleichzeitig die Entwicklung der Typ1 T-Helferzellen (TH<sub>1</sub>) durch zwei unabhängige molekulare Mechanismen. Die TH<sub>2</sub> Differenzierung ist im Gegensatz zur TH<sub>1</sub> Differenzierung abhängig von IL-4. IL-6 steigert die IL-4 Produktion naiver CD4<sup>+</sup> Zellen durch die Hochregulierung des NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) (181,182). Die Inhibition der TH<sub>1</sub> Entwicklung erfolgt durch IL-6 induzierte Hochregulierung der SOCS-1 Expression, die zur Störung der STAT1 Phosphorylierung, induziert durch IFN- $\gamma$ , führt. Die Inhibition der Rezeptorvermittelten IFN- $\gamma$  Signale durch IL-6 verhindern die Autoregulation der IFN- $\gamma$  Genexpression mittels IFN- $\gamma$  während der CD4<sup>+</sup> T-Zell Aktivierung und verhindern

dadurch die TH<sub>1</sub> Differenzierung (181,183). Ebenso spielt IL-6 eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen (184). Weiterhin fungiert IL-6 als Verbindungselement zwischen der T-Zell- und B-Zell-Immunantwort, indem es das Überleben, die Expansion und die Reifung von B-Zellen und Plasmablasten fördert. Dies wird teilweise auch durch die Förderung der Entwicklung von folliculären T-Helferzellen unterstützt (185). Folliculäre T-Helferzellen befinden sich in B-Zell-Follikeln, wo sie die B-Zell Proliferation und den Immunglobulin-Klassenwechsel fördern (186).

Aufgrund der pleiotropen Aktivität von IL-6 geht eine fehlregulierte IL-6 Produktion mit der Entwicklung von verschiedenen Krankheitsbildern einher. Hierzu gehören u.a. Tumorerkrankungen wie Lymphome, Multiples Myelom und Morbus Castleman, aber auch chronisch-entzündliche Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis und Osteoporose (187-189). Beispielsweise wird durch die Generierung des IL-6 in Knochenmark-Stroma-Zellen mittels des *trans-signaling* in synovialen Fibroblasten die Produktion des RANKL (*Receptor Activator of NF-κB Ligand*) induziert, wodurch es vermehrt zur Differenzierung von Osteoklasten kommt, was zu Knochenresorption und Osteoporose führt (190,191).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die biologische Wirkung des IL-6 ist abhängig von der Dauer und Stärke des induzierten Signals. Die Rezeptorexpression stellt einen bedeutenden Faktor zur Beeinflussung des IL-6 Signals dar. Es ist bereits bekannt, dass der signaltransduzierende gp130 Rezeptor ubiquitär exprimiert wird, allerdings ist nur wenig über seine Regulation auf unterschiedlichen Zelltypen bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das Expressionsprofil des gp130 Rezeptors auf unterschiedlichen B- und T-Lymphozyten-Populationen zu untersuchen und die Relevanz der gp130 Internalisierung für die B- und T-Zell- Differenzierung und Reifung zu analysieren. Da IL-6 generell eine wichtige Rolle bei der Differenzierung hämatopoetischer Zellen spielt, so auch bei T- und B-Zellen, wird der Einfluss der gp130<sup>LLAA</sup> Mutation auf die Homöostase dieser lymphoiden Zellen untersucht. Für die Versuche werden sowohl B- und T-Zellen und jeweilige Subpopulationen aus der Milz von WT Mäusen und Mäusen mit einer internalisierungsdefizienten Mutante (gp130<sup>LLAA</sup>) untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspitzen in verschiedenen Größen	Sarstedt, Nümbrecht
1ml Einmalspritzen	BD Biosciences, Heidelberg
Cellstar® Tubes (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Countess™ cell counting chamber slide	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Deckgläschen	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
FACS®-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filter-Tips	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Multiwell-Zellkulturplatten (96well)	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen (6cm, 10cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Kimtech Präzisionstücher	Kimberly-Clark®
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Zellsieb EASYstrainer™ (70 µM)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

#### 2.1.2 Antikörper

##### 2.1.2.1 Antikörper für die FACS Analyse

**Tabelle 1: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten FACS Antikörper für die Oberflächenfärbung, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.**

Spezifität	Isotyp	Klon	Konzentration	Hersteller
CD16/CD32	Ratte/IgG2a, λ	93	1:200	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD19 APC	Ratte/IgG2a, κ	eBio1D3	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD3e APC	Ratte/IgG2b, κ	17A2	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45 APC	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD95 APC	Maus/IgG1, κ	SA367H8	1:100	BioLegend, San Diego, USA
CD138 APC	Ratte/IgG2a, κ	281-2	1:300	BioLegend, San Diego, USA



CD45 APC-Cy7	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
GL7 FITC	Ratte/IgM, κ	GL7	1:200	BioLegend, San Diego, USA
CD43 FITC	Ratte/IgM	eBioR2/60	1:100	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45 FITC	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD62L FITC	Ratte/IgG2a, κ	MEL-14	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
CD23 PE	Ratte/IgG2a, κ	B3B4	1:100	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45PE	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD130 PE	Ratte/IgG2a, κ	KGP130	1:100	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD130 PE Isotypkontrolle	Ratte/IgG2a, κ	eBR2a	1:100	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD5 PE-Cy7	Ratte/IgG2a, κ	53-7.3	1:100	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD8a PE-Cy7	Ratte/IgG2a, κ	53-6.7	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD19 PE-Cy7	Ratte/IgG2a, κ	eBio1D3	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45 PE-Cy7	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
CD21 PerCP- Cy5.5	Ratte/IgG2a, λ	eBio4E3	1:100	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD44 PerCP- Cy5	Ratte/IgG2b, λ	IM7	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45 PerCP- Cy5.5	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:300	BioLegend, San Diego, USA
B220 V500	Ratte/IgG2a, κ	RA3-6B2	1:300	BD Biosciences, Heidelberg
CD4 V500	Ratte/IgG2a, κ	RM4-5	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.
CD45 PB	Ratte/IgG2b, κ	30-F11	1:300	eBioscience, Frankfurt a.M.

### 2.1.2.2 Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung

**Tabelle 2: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten IHC Antikörper, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.**

<b>Spezifität</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Ki-67	Rabbit	SP6	1:100	Abcam, Cambridge, UK
B220	Ratte/IgG2a, κ	RA3-6B2	1:200	BioLegend, San Diego, USA
Anti-rabbit IgG Dylight488	Goat/IgG		1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-rat IgG Dylight488	Donkey/IgG		1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isotypkontrolle	Rabbit IgG		1:100	Santa Cruz, Dallas, USA
Isotypkontrolle	Ratte/IgG2a, κ	RTK2758	1:200	BioLegend, San Diego, USA

### 2.1.3 Geräte

Automatisierter Zellzähler EVE™	NanoEnTek. Seoul, Südkorea
BD FACS Celesta™	BD Biosciences, Heidelberg
Blutzucker-Messgerät	Bayer AG, Leverkusen
Einkanalpipetten (1µl, 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Kühlgeräte (4°C, -20 °C)	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mehrkanalpipetten (100µl, 200µl, 300µl)	Eppendorf, Hamburg
Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
Reinstwassersystem, Milli-Q®	Merck, Darmstadt
Pipette (5ml, 10ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
pH-Sensor	Mettler Toledo, Columbus, USA
Pipetus® elektrische Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Präzisionswaage	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Sterilbank ESCO®	Envair, Emmendingen
Schnellkochtopf	Fissler, Idar-Oberstein
Vortexer	neoLab®, Heidelberg
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg

#### 2.1.4 Kits

Folgende Reaktionskits wurden gemäß den Herstellerangaben eingesetzt:

LIVE/DEAD® Fixable Dead Cell Stain Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
Vector® TrueVIEW® Autofluorescence Quenching Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

#### 2.1.5 Verwendete Mausstämme

C57BL/6J	Im Weiteren als WT bezeichnet
C57BL/6-TgHII6st <sup>L784A/L785A1Hema</sup>	Eigenzucht; Im Weiteren als gp130 <sup>LLAA</sup> bezeichnet

Alle Versuchstiere wurden in der lokalen Tierhaltung des Rudolf-Virchow-Zentrums oder im Zentrum für Experimentelle Molekulare Medizin der Universität Würzburg gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Hell-Dunkel-Rhythmus von 12h, Standardfutter, Wasser *ad libitum*). Nach Euthanasie der Versuchstiere mit CO<sub>2</sub> wurden ihre Zwischenzehenreflexe überprüft. Vor der Organentnahme erfolgte zusätzlich eine zervikale Dislokation und eine äußerliche Desinfektion mit 70 prozentigem Ethanol. Das Körpergewicht und Organgewicht von Leber, Milz, Niere und Herz der geopferten Mäuse wurde mittels Präzisionswaage bestimmt. Die genetisch veränderte gp130<sup>LLAA</sup> Maus wurde erstmals in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Heike Hermanns von Dr. Christine Mais und Prof. Dr. M. Bösl generiert. Sie weist eine Punktmutation im gp130 Rezeptor auf, bei der das Dileucin-Motiv (L874, L785) im zytoplasmatischen Bereich von gp130 zu Dialanin verändert wurde. Für die Endozytose ist das intrazelluläre Dileucin-Motiv (murin: Leucin<sub>784</sub>, Leucin<sub>785</sub>; human: Leucin<sub>786</sub>, Leucin<sub>787</sub>) erforderlich, da das Adapterprotein AP-2 an dieses Motiv bindet und dadurch den Transport mittels Clathrin-umhüllter Vesikel begünstigt. Aus diesem Grund geht man davon aus, dass die Internalisierung des gp130 Komplexes über die Clathrin-abhängige Endozytose vermittelt wird. Die beschriebene Punktmutation hat zur Folge, dass die veränderte Form von gp130 resistent gegenüber der Liganden- und crosstalk-vermittelten Endozytose ist (141-143,145). Die Integrität des *knock-in* wurde neben *Southern Blotting* und PCR auch durch Sequenzierung überprüft (111).

### 2.1.6 Software

Facs Diva	BD Biosciences FACSDiva Software, Heidelberg, San Jose, USA
FlowJo X	FlowJo LLC Software, Ashland, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung beruht auf zwei gegensätzlich geladenen Komponenten. Das basische Hämalaun färbt alle sauren Zellbestandteile wie Zellkern, Desoxyribonukleinsäure und raues endoplasmatisches Retikulum blau. Der saure Farbstoff Eosin färbt hingegen basische Strukturen, zu denen das Zellplasma und Kollagenfasern gehören, rot. In Paraffin eingebettetes Milzgewebe wurde in einer Dicke von 5µm geschnitten. Um die Schnitte zu entparaffinieren, wurden diese für 45 Min bei 70°C im Heizofen erhitzt und nachfolgend drei Mal für je 10 Min in Roti®-Histol (Roth) getaucht. Nach einem Waschschrift mit reinem Ethanol erfolgte die Inkubation in einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe, wobei die Milzschnitte in jeder Glasküvette 5 Min verblieben:

100% → 100% → 96% → 96% → 96% → 80% → 80% → 70% → 70% → 70% → 50% → 50% → Aqua dest. → Aqua dest.

Erfolgte die Färbung erst am Folgetag, so wurden die Schnitte über Nacht in einer „feuchten Kammer“ bei 4°C gelagert.

Die entparaffinierten Milzschnitte wurden zuerst in Mayers Hämalaunlösung (Roth) für 5 Min gefärbt und anschließend 3 x 5 Min in „*Tap water*“ gewaschen.

#### **Tap water**

3,5g NaHCO<sub>3</sub>

10g MgSO<sub>4</sub>

1l Aqua dest.

Nach 2 Min Verbleib in Aqua dest. folgte die Färbung mit Eosin, wobei pro 100 ml Farbstoff ein Tropfen Eisessig zugesetzt wurde. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe in *Tap water* für jeweils 25 s. Nach je 30 s Inkubation in einer aufsteigenden Ethanolreihe zur Dehydrierung (70%, 96% und 100%) wurden die gefärbten Schnitte 3x für 1 Min in Roti®-Histol getaucht und abschließend mit dem Histo-Kit II und Deckgläschen auf dem Objektträger eingedeckt. Die histologische Auswertung der Schnitte erfolgte lichtmikroskopisch mit dem *Keyence BZ 9000*. Dabei wurden Okulare mit 4facher und 20facher Vergrößerung verwendet.

### 2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung FFPE Schnitte Milz

In Paraffin eingebettetes Milzgewebe wurde in einer Dicke von 4µm geschnitten und zur Deparaffinisierung 45 Min bei 70°C im Heizofen erhitzt. Anschließend verweilten die Schnitte 3x für jeweils 10 Min in Roti®-Histol.

Die Objektträger wurden im nächsten Schritt jeweils für 5 Min in Glasküvetten einer in ihrer Konzentration absteigenden Alkoholreihe getaucht:

100% → 100% → 96% → 96% → 96% → 80% → 80% → 70% → 70% → 70% → 50%  
→ 50% → Aqua dest. → Aqua dest.

Um Antigenstrukturen für die nachfolgenden Antikörper zugänglich zu machen, folgte im nächsten Schritt die hitzeinduzierte Demaskierung des Formalin-fixierten und Paraffin-eingebetteten (FFPE) Gewebes. Die Fixierung mit Formalin und Verarbeitung mit Paraffin führt zur Verkettung von Antigenen. Antigendemaskierungs-Lösungen (*retrieval solutions*) werden eingesetzt, um die fehlende Immunreaktivität durch Renaturierung der Antigene wiederherzustellen.

Für die folgenden Versuche wurden zwei unterschiedliche Antigendemaskierungs-Lösungen verwendet.

Für die Färbung mit Ki-67:

Vorbereitung der Lösungen für Retrieval

Lösung A:

21,01g Zitronensäure (Sigma 33114-500)

1l Aqua dest. aus Millipore Anlage

Lösung B:

29,41g tri-sodiumcitrate (Sodiumcitrate Sigma S4641)

1l Aqua dest. aus Millipore Anlage

**Citrat Retrieval:**

5,4ml Lösung A

24,6ml Lösung B

150µl Tween 20

270µl Aqua dest. aus Milipore Anlage

Für die Färbung mit B220:

**EDTA Retrieval:**

10mM Tris-HCl

1mM EDTA

10%Glycerol

Die Milzschnitte wurden zunächst mit einem Glasschneider umrahmt, damit sich die Antikörperlösungen gleichmäßig auf dem begrenzten Gewebe verteilen konnten. Die Objektträger wurden in der vorgewärmten *retrieval solution* im Schnellkochtopf zum Kochen gebracht und verweilten im Anschluss für 5 Min (Ki-67) bzw. 10 Min (B220) in der jeweiligen Lösung. Bei Raumtemperatur kühlten die Objektträger für 30 Min ab und wurden anschließend 2x5 Min in destilliertem Wasser gewaschen. Im nächsten Schritt inkubierten die Schnitte für 10 Min bei Raumtemperatur in 100µl Permeabilisierungspuffer in einer feuchten Kammer.

**Permeabilisierungspuffer:**

10ml TBS

0,1g BSA

40µl Triton X-100

Nach 5 Min waschen in TBS inkubierten die Schnitte zur Blockierung unspezifischer Bindungen für 30 Min in 100µl Blockingpuffer, bevor dieser langsam von den Schnitten abgekippt wurde.

**Blockingpuffer:**

TBS+1% BSA

Zur Erstantikörperinkubation wurde der Ki-67 Antikörper 1:100 und der B220 Antikörper 1:200 in *Signal Stain Antibody® Diluent* verdünnt. Die Inkubation der Schnitte erfolgte in 100µl Antikörperlösung, bei 4°C in einer feuchten Kammer und im Dunkeln über Nacht. Nach Entfernung des nicht gebundenen Anteils des primären Antikörpers durch zwei zehninütige Waschschrte in TBS erfolgte die Applikation von jeweils 100µl Zweitantikörperlösung für 90 Min im Dunkeln. Für die K-i67 und B220 Färbungen wurden der *anti-rabbit Dylight 488 (Life Technologies A11008)* Antikörper

und der *anti-rat Dylight 488 (SA5-10026)* Antikörper 1:200 in *SignalStain® Antibody Diluent* verdünnt. Auch hier wurde der nicht gebundene Anteil durch dreimaliges Waschen für 2 Min. entfernt und anschließend die Umgebung des Gewebes auf dem Objektträger mit faserfreiem Papier getrocknet.

Der starken Autofluoreszenz des Milzgewebes wurde mithilfe des *Vector®TrueVIEW™ Autofluorescence Quenching Kits* entgegengewirkt. Die Verwendung des *Vector®TrueVIEW™ Autofluorescence Quenching Kits* erfolgte wie im Protokoll angegeben. Die Objektträger wurden abschließend mit dem *VECTASHIELD® Vibrance™ Antifade Mounting Medium* eingedeckt und für eine Stunde im Dunkeln getrocknet, bevor sie zur Auswertung am Fluoreszenz Mikroskop *Keyence BZ 9000* eingelesen wurden.

## **2.2.3 Durchflusszytometrische Analyse**

### **2.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Mithilfe der FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*) Analyse können verschiedene physikalische und molekulare Eigenschaften von Einzelzellen in Suspension simultan gemessen und analysiert werden. Die Zellen werden anhand ihrer Größe, Granularität und Expression intrazellulärer sowie membranständiger Moleküle charakterisiert. Biochemisch charakterisierte Antigene der Zelloberfläche werden als *cluster of differentiation* (CD) in einer internationalen Nomenklatur zusammengefasst. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen in einem laminaren Probenstrom durch Laserstrahlen mit unterschiedlichen Anregungswellen transportiert. Wird das einfallende Laserlicht von einem Partikel abgelenkt, entsteht Lichtstreuung. Durch die Richtungsänderung wird das Licht in ein Vorwärtsstreulicht (FSC, *forward scatter channel*) und ein Seitwärtsstreulicht (SSC, *side scatter channel*) aufgetrennt. Das Vorwärtsstreulicht gilt als Maß für die Lichtbeugung und ist proportional zur Zellgröße. Das Seitwärtsstreulicht gilt als Maß für die Lichtbrechung im rechten Winkel und korreliert mit der Zellgranularität und hängt damit von der Binnenstruktur einer Zelle ab. Zusätzlich zur Streuung wird die relative Fluoreszenzintensität gemessen. Je mehr Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden sind, desto mehr Fluoreszenz wird nach Anregung der Fluorochrome emittiert. Das Vorwärtsstreulichtsignal wird von Photodioden verarbeitet, wohingegen die meist schwächeren Seitwärtsstreulicht- und Fluoreszenzsignale von Photovervielfältiger Röhren (*Photomultipliertubes*) detektiert werden.



Die Spezifität der Detektoren für ein Fluorophor wird durch vorgeschaltete Filter (Bandpass-, Shortpass- und Longpassfilter) optimiert, mit deren Hilfe nur Licht eines spezifischen Wellenlängenbereichs den Detektor erreicht. Auf diese Weise können Fluorochrome mit ähnlichen Emissionsspektren getrennt voneinander detektiert werden.

Die gemessenen Signale wurden durch die BD FACS Diva Software (v8.0.1.1) verarbeitet und gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte im Anschluss mit der FlowJo X 10.0.7 Software (TreeStar Inc., Ashland USA).

### **2.2.3.2 Kompensation**

Durch die Kombination von unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen können sich ihre Emissionsspektren überlappen (*spillover*), sodass jeweils Mischungen mit verschiedenen Anteilen von Farbstoffen in einem Kanal detektiert werden. Mittels Kompensation werden die Messdaten der Fluoreszenzsignale entsprechend der spektralen Überlappung korrigiert. Zur Einstellung des FSC und SSC sowie der Schwellenwerte der jeweiligen Fluoreszenzkanäle wurden zunächst ungefärbte Milzzellen gemessen. Kompensiert wurde mit Einzelfärbungen, bei denen antigenspezifische Fluorochrom-Antikörper-Konjugate verwendet wurden, mit welchen ein starkes Fluoreszenzsignal erwartet wurde. Hierzu eigneten sich für die durchflusszytometrische Analyse von Milzzellen vor allem Antikörper gegen das CD45-Antigen (*Leukocyte Common Antigen, LCA*), welches auf allen Zellen hämatopoetischen Ursprungs, mit Ausnahme von Erythrozyten und Thrombozyten, exprimiert wird (192). Zusätzlich zu den Einzelfärbungen wurden FMO (*fluorescence minus one*) Kontrollen durchgeführt. Die Kontrollfärbungen enthielten alle im Antikörper-Mix vorkommenden Fluorochrome mit Ausnahme des zu untersuchenden Antikörper-Fluorochrom-Konjugats. Die FMO Kontrolle zeigt durch den Vergleich mit einer ungefärbten Kontrolle und einer Gesamtfärbung die positiven Zellen für den jeweiligen Biomarker auf, präsentiert durch die Zellen, die außerhalb der FMO Kontrolle liegen. Nach dem Ende der Messungen erfolgte die automatische Kompensation mit Hilfe der FACS Diva Software (v8 0.1.1).

### 2.2.3.3 Ausschluss von toten Zellen und Doubletten

Tote Zellen neigen dazu, unspezifisch an Reagenzien zu binden, sodass sie in der Durchflusszytometrie häufig zu falsch positiven Ergebnissen führen. Mithilfe des *LIVE/DEAD™ Fixable Dead Cell Stain Kits* können tote Zellen identifiziert und ihre Daten zur präziseren Analyse ausgeschlossen werden. Ein reaktiver fluoreszierender Farbstoff durchdringt die durchlässigen Membranen von nekrotischen Zellen und reagiert mit freien Aminen im Zellinneren und auf der Zelloberfläche, was zu einer intensiven Fluoreszenzfärbung führt. Dahingegen reagieren bei den lebenden Zellen nur die Amine auf der Zelloberfläche, sodass die Fluoreszenzfärbung deutlich schwächer ist. Im Histogramm werden so zwei Peaks deutlich sichtbar.

Passieren zwei Partikel zu dicht hintereinander den Laserstrahl (*interrogation point*), so können sie vom Durchflusszytometer häufig nicht als individuelles Ereignis oder einzelne Partikel unterschieden werden. Die entstandenen Doubletten unterscheiden sich in ihrem Spannungsimpuls von Einzelzellen durch eine größere Signalbreite (*width*) und Signalfäche (*area*), wohingegen die Höhe (*height*) des Impulses sehr ähnlich ist. Um die Doubletten für eine genauere Datenanalyse auszuschließen, wurden FSC-*area* (x-Achse) und FSC-*height* (y-Achse) im Streudiagramm (*dotplot*) gegeneinander aufgetragen und der Bereich der Einzelzellen (in Abschnitt 2.2.3.6 dargestellt) für die weiteren Analysen ausgewählt.

### 2.2.3.4 Isolation von Lymphozyten aus der Milz für die Durchflusszytometrie

Nach der Entnahme der Milz wurde das Fett, welches die Milz umgibt, sorgfältig entfernt und anschließend das Gewicht auf einer Analysewaage bestimmt. Das präparierte Milzgewebe wurde zunächst in eine Kulturschale mit PBS gelegt und zur sofortigen Weiterverarbeitung in ein 70µm Zellsieb überführt, welches zuvor mit 2ml FACS Puffer befeuchtet wurde. Die folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt.

#### **FACS Puffer**

PBS (pH 7,4):

137mM NaCl,

2,7mM KCl,

10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>,

2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

+1% FCS

Mithilfe eines Spritzenstempels wurde das Milzgewebe durch das feinmaschige Zellsieb gestrichen, um die Gewebesuspension in einem 50ml Falcon auffangen zu können. Zur Minimierung des Zellverlustes wurde anschließend mit weiteren 3ml FACS Puffer nachgespült. Die Suspension wurde zentrifugiert (5 Min, 4°C und 400 g), der Überstand verworfen und das entstandene Zellpellet mit 3ml *Red Blood Cell Lysis Buffer* resuspendiert, um die Erythrozyten zu lysieren und eine Zelltrennung zu erreichen.

#### **Red Blood Cell Lysis Buffer**

155mM NH<sub>4</sub>Cl

10mM KHCO<sub>3</sub>

0,1mM EDTA

Nach 7 Min Inkubation bei Raumtemperatur wurden weitere 7ml FACS Puffer hinzugegeben und die Suspension vorsichtig mit einer Pipette gemischt. Die erneute Zentrifugation erfolgte (wie auch zuvor) für 5 Min bei 4°C und 400g. Die Zellen wurden in 10ml RPMI Medium (+1% nicht-essenzielle Aminosäuren, +1%L-Glutamin, +10%FCS) resuspendiert. Zur Trennung verbliebener *Zellcluster* wurde die Zellsuspension erneut mit einem 70µm Zellsieb gefiltert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit dem automatisierten Zellzähler *EVE<sup>TM</sup>*. Dafür wurde eine Verdünnung der Zellsuspension mit PBS vorbereitet. Zum Ausschluss toter Zellen wurde im letzten Verdünnungsschritt Trypan-Blau Lösung verwendet. Die Zellen wurden auf 10.000 Zellen/µl eingestellt, indem sie in dem entsprechenden Volumen FACS Puffer aufgenommen wurden.

#### **2.2.3.5 Färbung von spezifischen Oberflächenmolekülen der Lymphozyten**

Für die Oberflächenfärbung der Milzzellen wurden 1x10<sup>6</sup> Zellen auf eine 96well Rundbodenplatte überführt und zentrifugiert (5 Min, 400g, 4°C). Die Zellen wurden in 50µl FACS Puffer mit anti-CD16/32 (1:200) resuspendiert, um unspezifische Bindungen durch Fc-Rezeptoren zu verhindern und damit falsch positiven Messungen vorzubeugen. Der Fc- Block inkubierte für 10 Min bei 4°C. Nach dem Waschen der Zellen mit 100µl FACS Puffer/well wurden die Zellen in 50µl vorbereiteter Antikörperlösung resuspendiert und für 30 Min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit 100µl FACS Puffer/well gewaschen und für die

Messung erneut in 200µl FACS Puffer/well aufgenommen. Viele Antigene werden auf mehreren Populationen der Milzzellen exprimiert.

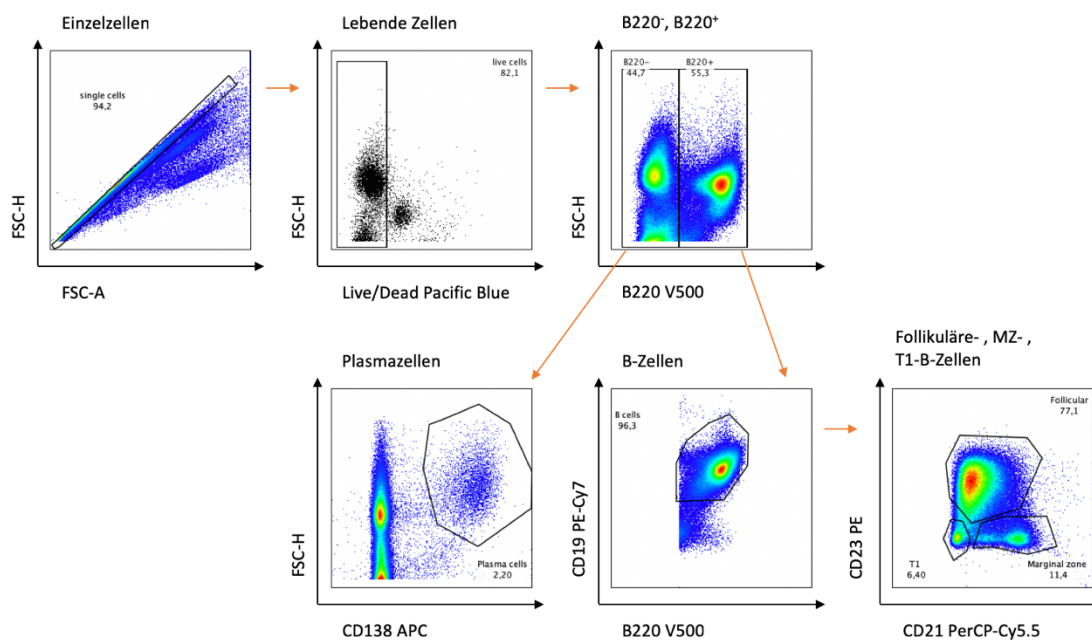
Zur Immunphänotypisierung und eindeutigen Beschreibung der Zellen in dem entsprechenden Probenmaterial ist deshalb eine sinnvolle Kombination von Antikörpern notwendig. Für die Antikörperfärbungen wurden mehrere solcher Antikörperkombinationen in eine Antikörperlösung aus FACS-Färbepuffer (FACS Färbepuffer: PBS (pH 7,4), 2% mouse serum, 2% rabbit serum, 2% BSA) und PBS +1% FCS pipettiert (Verhältnis 1:1). Für die phänotypische Charakterisierung der ausgewählten B-Zell- und T-Zell-Subpopulationen wurde eine Auswahl von Markern bestimmt. Die untersuchten Populationen und ihre Marker werden im folgenden Abschnitt „Antikörper-Mischungen“ vorgestellt.

### 2.2.3.6 Antikörper-Mischungen und Auswertungsstrategien für die Analyse der T- und B-Zell-Populationen

#### 2.2.3.6.1 Follikuläre-, MZ-, T1-B-Zellen und Plasmazellen

Tabelle 3: Verwendete Antikörper-Mischungen zur Analyse der Follikulären-, MZ-, T1-B-Zellen und Plasmazellen.

Spezifität	Fluorophor	Zelltyp
CD23	PE	Reife B-Zellen, folliculäre B-Zellen, aktivierte Makrophagen, Eosinophile Granulozyten, folliculäre-dendritische Zellen, Thrombozyten
CD138	APC	Prä-B-Zellen, unreife B-Zellen, Plasmazellen
CD19	Pe-Cy7	B-Zellen, (B-Zellmarker, human)
B220	V500	B-Zellen, alle Entwicklungsstadien von pro B-Zellen bis zu reifen B-Zellen, aktivierte B-Zellen, (B-Zellmarker, murin)
CD21	PerCP-Cy5.5	B-Zell-Corezeptor, Reife B-Zellen, B-Zellen der marginalen Zone, folliculäre dendritische Zellen
Live/Dead	PB	Identifizierung von lebenden/toten Zellen



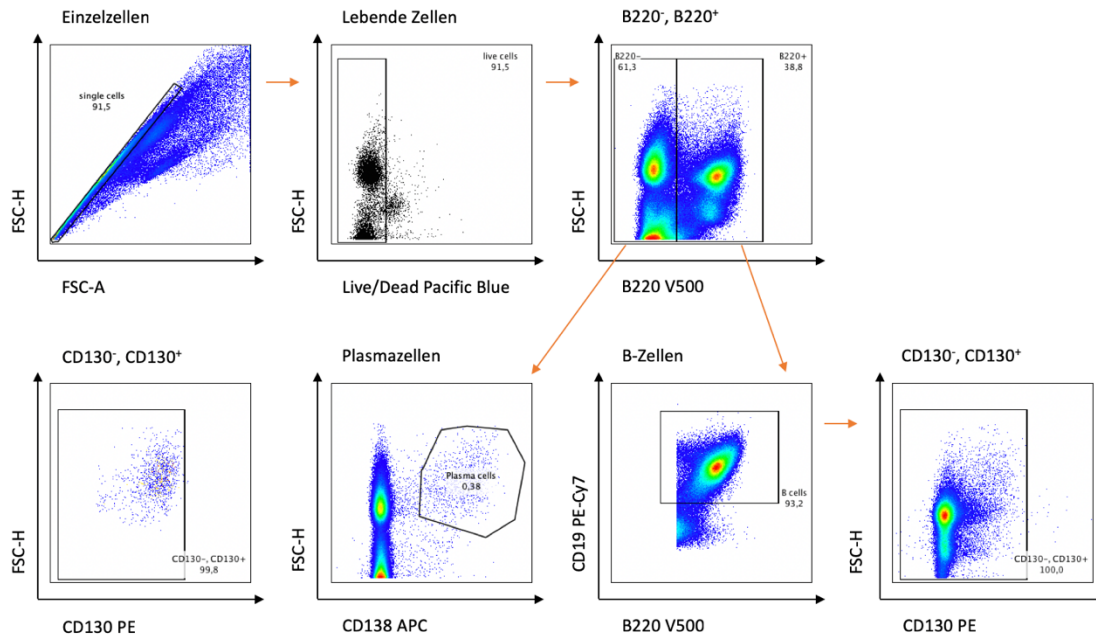
**Abbildung 6: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der Plasmazellen und reifen B-Zellen.** Dargestellt ist die zur Identifizierung der Plasmazellen und der folliculären B-Zellen, B-Zellen der marginalen Zone und T1-B-Zellen verwendete Auswertungsstrategie. Für die Analyse wurden nur lebende Einzelzellen berücksichtigt. B220<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> Zellen wurden als Plasmazellen definiert. B220<sup>+</sup> B-Zellen wurden anhand der Oberflächenmarker CD23 und CD21 in folliculäre B-Zellen, B-Zellen der marginalen Zone und T1-B-Zellen eingeteilt. CD21<sup>-</sup>CD23<sup>+</sup>: folliculäre B-Zellen, CD21<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>: B-Zellen der marginalen Zone und CD21<sup>+</sup>CD23<sup>+</sup>: T1-B-Zellen.

### 2.2.3.6.2 Plasmazellen, B-Zellen und ihre CD130 Expression

**Tabelle 4: Verwendete Antikörper-Mischungen zur Analyse der CD130 Expression auf Plasmazellen und B-Zellen.**

Spezifität	Fluorophor	Zelltyp
CD138	APC	Prä-B-Zellen, unreifen B-Zellen, Plasmazellen
CD19	PE-Cy7	B-Zellen (B-Zellmarker human)
B220	V500	B-Zellen (alle Entwicklungsstadien von pro B-Zellen bis zu reifen B-Zellen, aktivierte B-Zellen, (B-Zellmarker, murin)
CD130	PE	ubiquitär
CD130	PE	

Isotypkontrolle		
Live/Dead	PB	Identifizierung von lebenden/toten Zellen



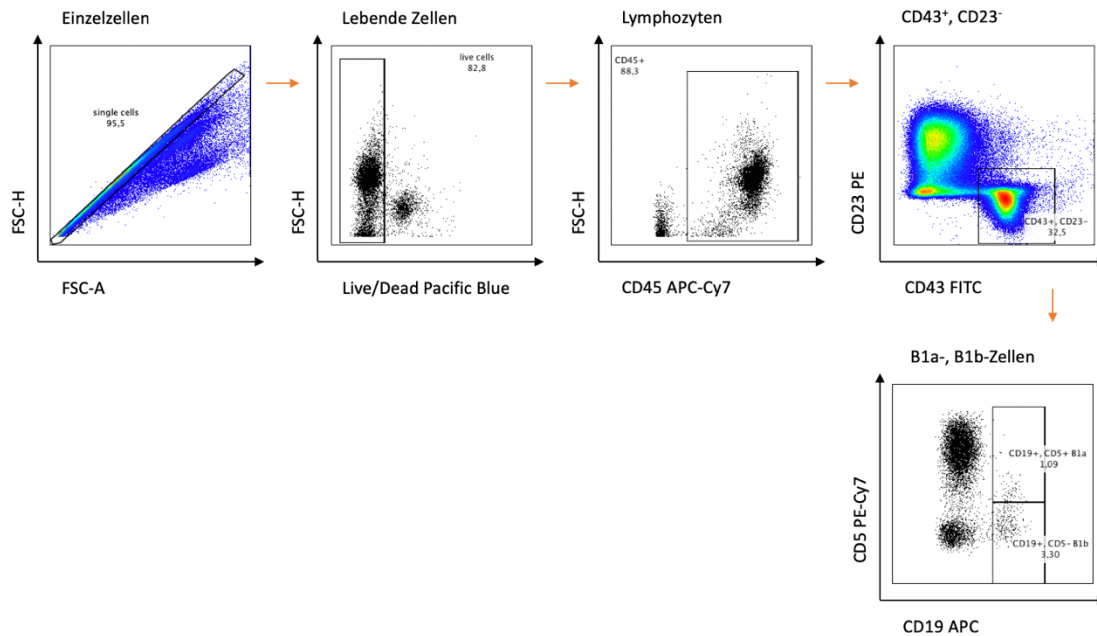
**Abbildung 7: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der Plasmazellen und B-Zellen sowie ihrer CD130 Oberflächenexpression.** Dargestellt ist die zur Identifizierung der Plasmazellen und B-Zellen sowie ihrer CD130 Oberflächenexpression verwendete Auswertungsstrategie. Die Plasmazellen wurden, wie bereits zuvor beschrieben, als B220<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> Zellen definiert und B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> Zellen wurden als B-Zellen definiert. Zur Bestimmung der gp130 Oberflächenexpression wurde für beide Populationen das gleiche Gate gewählt, welches sowohl CD130<sup>-</sup> als auch CD130<sup>+</sup> Zellen umfasste. Anschließend wurde die MFI (*median fluorescence intensity*) bestimmt, um die gp130 MFI Werte von unterschiedlichen Populationen vergleichen zu können.

### 2.2.3.6.3 B1-Zellen

**Tabelle 5: Verwendete Antikörper-Mischung zur Analyse der B1-Zellen.**

Spezifität	Fluorophor	Zelltyp
CD45	APC-Cy7	Leukozyten
CD19	APC	B-Zellen, (B-Zellmarker, human)
CD23	PE	Reife B-Zellen, folliculäre B-Zellen, aktivierte Makrophagen, Eosinophile Granulozyten, folliculäre-dendritische

		Zellen, Thrombozyten
CD43	FITC	Leukozyten, außer ruhende B-Zellen
CD5	PE-Cy7	T-, B-Zell-Subpopulationen
Live/Dead	PB	Identifizierung von lebenden/toten Zellen

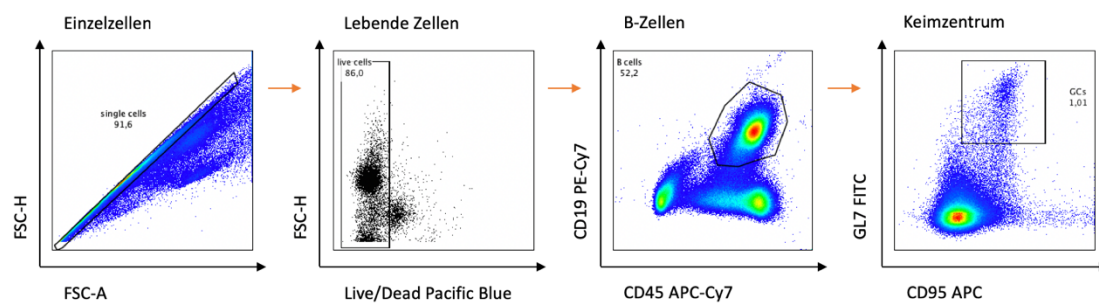


**Abbildung 8: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der B1-Zellen.** Dargestellt ist die zur Identifizierung der B1-Zellen verwendete Auswertungsstrategie. Für die Analyse wurden nur lebende CD45<sup>+</sup> Zellen berücksichtigt. Zunächst wurde eine CD43<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup> Zellpopulation bestimmt, die weiterhin anhand der Oberflächenmarker CD19 und CD5 in B1a-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) und B1b-Zellen (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>-</sup>) unterteilt wurde.

#### 2.2.3.6.4 B-Zellen des Keimzentrums

**Tabelle 6: Verwendete Antikörper-Mischung zur Analyse der B-Zellen des Keimzentrums.**

Spezifität	Fluorophor	Zelltyp
CD45	APC-Cy7	Leukozyten
CD19	PE-Cy7	B-Zellen, (B-Zellmarker human)
GL7	FITC	Keimzentrums B-Zellen
CD95	APC	diverse
Live/Dead	PB	Identifizierung von lebenden/toten Zellen



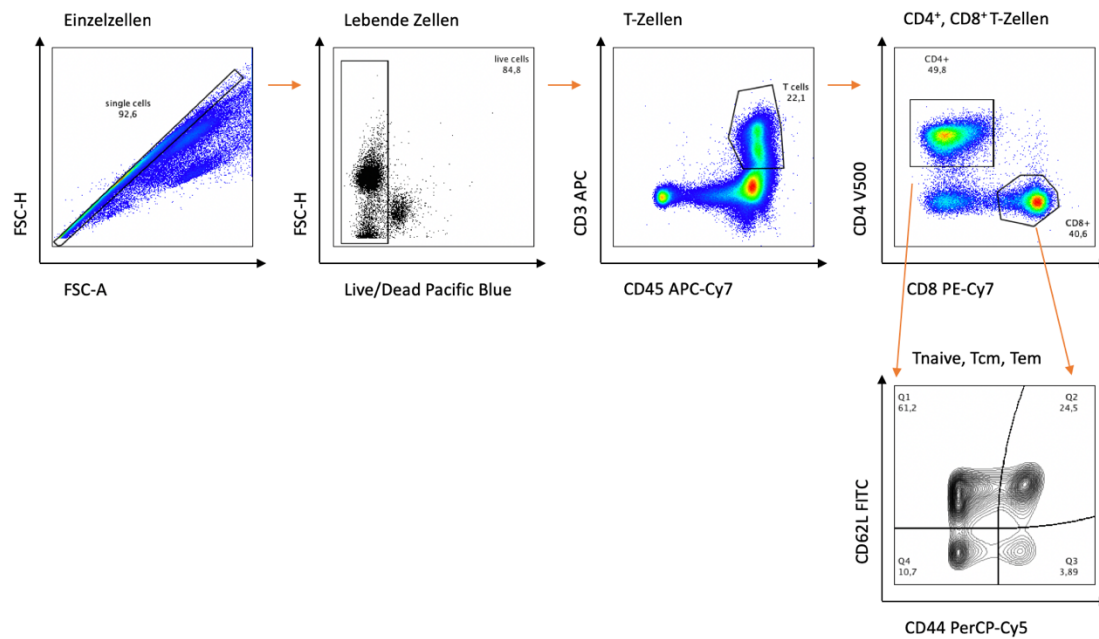
**Abbildung 9: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der Keimzentrums B-Zellen.** Dargestellt ist die zur Identifizierung der Keimzentrums B-Zellen verwendete Auswertungsstrategie. Für die Analyse wurden nur lebende CD45<sup>+</sup> Zellen berücksichtigt. Die CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen wurden im Weiteren auf das Vorkommen der Oberflächenmarker GL7 und CD95 untersucht. Diese beiden Oberflächenmarker gelten als charakteristisch für Keimzentrums B-Zellen.

### 2.2.3.6.5 T-Lymphozyten und ihre CD130 Expression

**Tabelle 7: Verwendete Antikörper-Mischung zur Analyse der T-Zellen und ihrer CD130 Expression.**

Spezifität	Fluorophor	Zelltyp
CD45	APC-Cy7	Leukozyten
CD3	APC	T-Zellen
CD4	V500	T-Helferzellen
CD8	PE-Cy7	Zytotoxische T-Zellen
CD44	PerCP-Cy5	Leukozyten, Erythrozyten, Maus: Gedächtnismarker
CD62L	FITC	B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, Maus: Gedächtnismarker
CD130	PE	ubiquitär
CD130 Isotypkontrolle		
Live/Dead	PB	Identifizierung von lebenden/toten Zellen





**Abbildung 10: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der T-Zellen.** Dargestellt ist die zur Identifizierung der T-Zellen verwendete Auswertungsstrategie. Für die Analyse wurden nur lebende CD45<sup>+</sup> Einzelzellen berücksichtigt. Die CD3<sup>+</sup> Zellen wurden als T-Zellen definiert und im Weiteren in (CD3<sup>+</sup>) CD4<sup>+</sup> und (CD3<sup>+</sup>) CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterteilt. Anschließend wurden die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen anhand der Oberflächenmarker CD62L und CD44 jeweils in vier weitere Subpopulationen unterteilt. Q1: CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup>: Naive T-Zellen ( $T_{naive}$ ), Q2: CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>: *central memory* T-Zellen ( $T_{cm}$ ), Q3: CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>: *effector memory* T-Zellen ( $T_{em}$ ) und Q4: CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> Zellpopulation. Zur Bestimmung der gp130 Oberflächenexpression auf den unterschiedlichen T-Zellen wurde für jede der Populationen das gleiche Gate gewählt, welches sowohl CD130<sup>-</sup> als auch CD130<sup>+</sup> Zellen umfasste. Anschließend wurde die MFI (*median fluorescence intensity*) bestimmt, um die gp130 MFI Werte von den unterschiedlichen Populationen vergleichen zu können (Vgl. Abb. 7).

## 2.2.4 Statistik

Die statische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism8. Die Werte wurden mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung getestet. Zur Berechnung der Signifikanzwerte wurde der ungepaarte t-Test oder der Mann-Whitney-U-Test verwendet. 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.

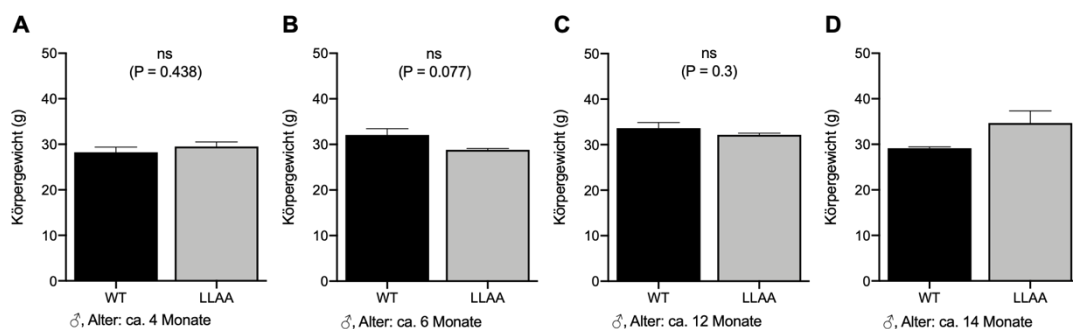
### 3 Ergebnisse

#### Relevanz der gp130 Endozytose für die Differenzierung lymphoider Zellen *in vivo*

Daten aus vorherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die *crossstalk*-Regulation von gp130 einen physiologisch relevanten Mechanismus darstellt, der u.a. auch die Differenzierung und Aktivierung von verschiedenen Immunzellen beeinflussen kann (111,193). Daher wurde zunächst der Einfluss der gp130 *knock-in* Mutation auf die Homöostase von T- und B-Zell-Subpopulationen in gesunden Mäusen (*steady state*) untersucht.

#### 3.1.1 Das Körpergewicht von gp130<sup>LLAA</sup> und WT Mäusen ist vergleichbar

Zunächst wurde untersucht, ob sich gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse hinsichtlich ihres Körpergewichts von WT Mäusen unterscheiden (Abb. 10). Für die Untersuchungen wurden Tiere ähnlichen Alters (4-14 Monate) und gleichen Geschlechts (♂) analysiert, um die beiden Genotypen miteinander vergleichen zu können.



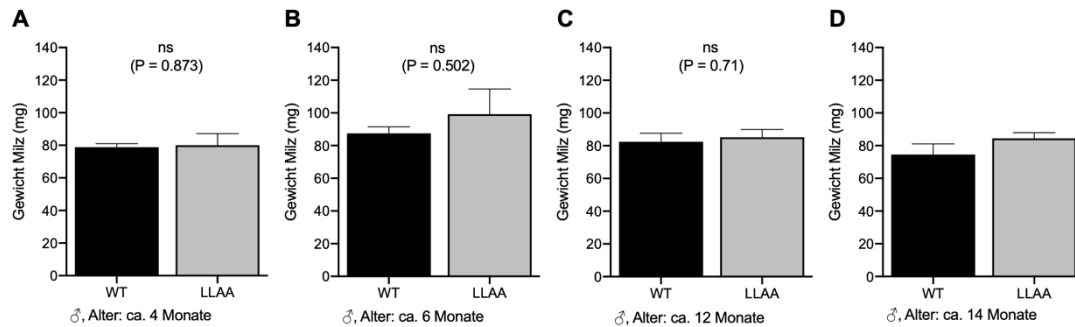
**Abbildung 11: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen Unterschied im Körpergewicht gegenüber WT Mäusen.** (A) n=3 pro Genotyp, (B) n=3 pro Genotyp, (C) n=5 pro Genotyp, (D) n=2 (WT), n=4 (gp130<sup>LLAA</sup>). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p > 0.05.

Die Analyse ergab, dass gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse ein zu WT Mäusen vergleichbares Gesamtkörpergewicht aufwiesen.

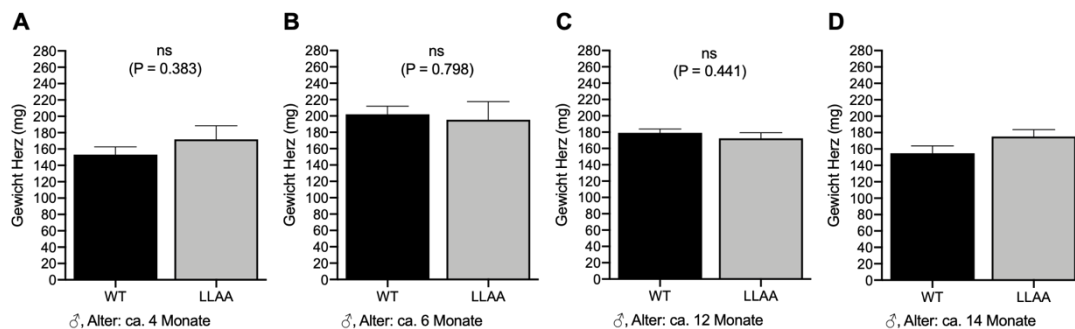
#### 3.1.2 Die Gewichte von Milz, Herz, Niere und Leber von gp130<sup>LLAA</sup> und WT Mäusen sind vergleichbar

Weiterhin wurde untersucht, ob sich gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse hinsichtlich ihres Gewichts der Organe Milz (Abb. 12), Herz (Abb. 13), Niere (Abb. 14) und Leber (Abb. 15) von WT

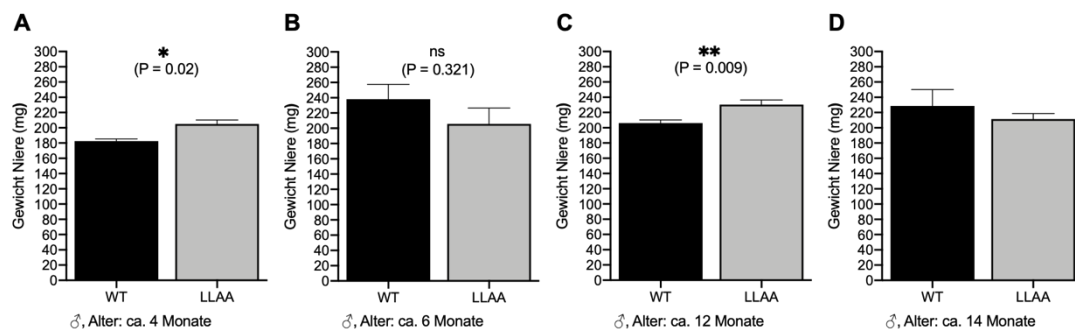
Mäusen unterscheiden. Für die Untersuchung wurden Tiere ähnlichen Alters (4-14 Monate) und gleichen Geschlechts (♂) analysiert, um die beiden Genotypen miteinander vergleichen zu können.



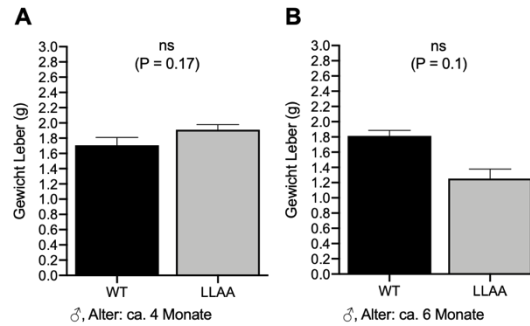
**Abbildung 12: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen Unterschied im Gewicht der Milz gegenüber WT Mäusen.** (A) n=3 pro Genotyp, (B) n=3 pro Genotyp, (C) n=5 pro Genotyp, (D) n=2 (WT), n=4 (gp130<sup>LLAA</sup>). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p > 0.05.



**Abbildung 13: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen Unterschied im Gewicht des Herzens gegenüber WT Mäusen.** (A) n=3 pro Genotyp, (B) n=3 pro Genotyp, (C) n=5 pro Genotyp, (D) n=2 (WT), n=4 (gp130<sup>LLAA</sup>). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p > 0.05.



**Abbildung 14: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen in den Untersuchungsgruppen ♂, Alter ca: 4 und ca. 12 Monate einen signifikanten Unterschied in dem Gewicht der Niere gegenüber WT Mäusen.** (A) n=3 pro Genotyp, (B) n=3 pro Genotyp, (C) n=5 pro Genotyp, (D) n=2 (WT), n=4 (gp130<sup>LLAA</sup>). Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p > 0.05, \*, p ≤ 0.05, \*\*, p ≤ 0.001.

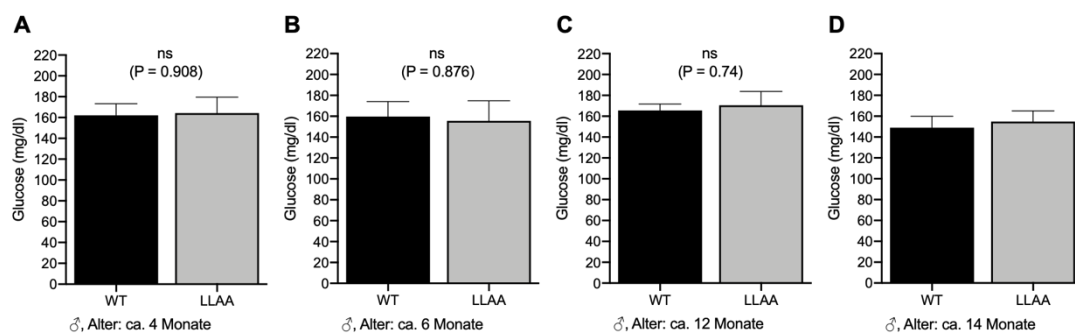


**Abbildung 15: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen signifikanten Unterschied in dem Gewicht der Leber gegenüber WT Mäusen.** (A) n=3 pro Genotyp, (B) n=3 pro Genotyp. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns, p > 0.05, \*, p ≤ 0.05.

Die Analyse ergab, dass gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse ein zu WT Mäusen vergleichbares Milz-, Herz-, Nieren- und Lebergewicht aufwiesen. Ein signifikant erhöhtes Gewicht wurde bei der Niere von männlichen, ca. 4 (Abb. 14A) und ca. 12 (Abb. 14C) Monate alten gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen festgestellt.

### 3.1.3 Die Blutglucosespiegel von gp130<sup>LLAA</sup> und WT Mäusen (nicht nüchtern) sind vergleichbar

Für die Untersuchung des Blutglucosespiegels (Tiere nicht nüchtern) wurde unmittelbar nach Euthanasie Blut aus der Schwanzvene von Mäusen ähnlichen Alters (4-14 Monate) und gleichen Geschlechts (♂) entnommen (Abb. 16).



**Abbildung 16: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen vergleichbare Blutglucosespiegel gegenüber WT Mäusen.** (A) n=3 pro Genotyp, (B) n=3 pro Genotyp, (C) n=5 pro Genotyp, (D) n=2 (WT), n=4 (gp130<sup>LLAA</sup>).

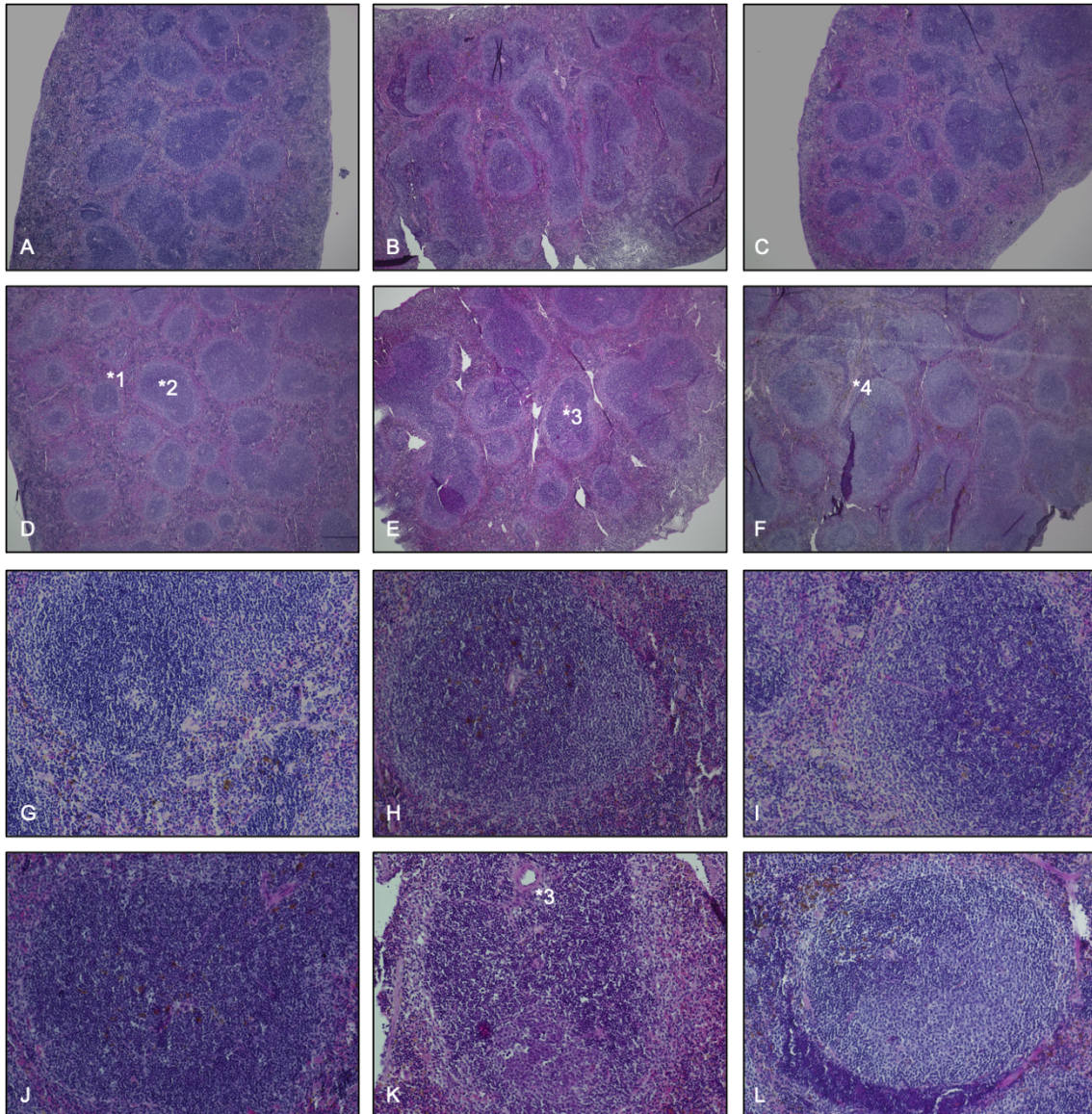
Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns,  $p > 0.05$ .

Die Analyse zeigte, dass  $gp130^{LLAA}$  Mäuse zu WT Mäusen vergleichbare Blutglucosespiegel aufwiesen.

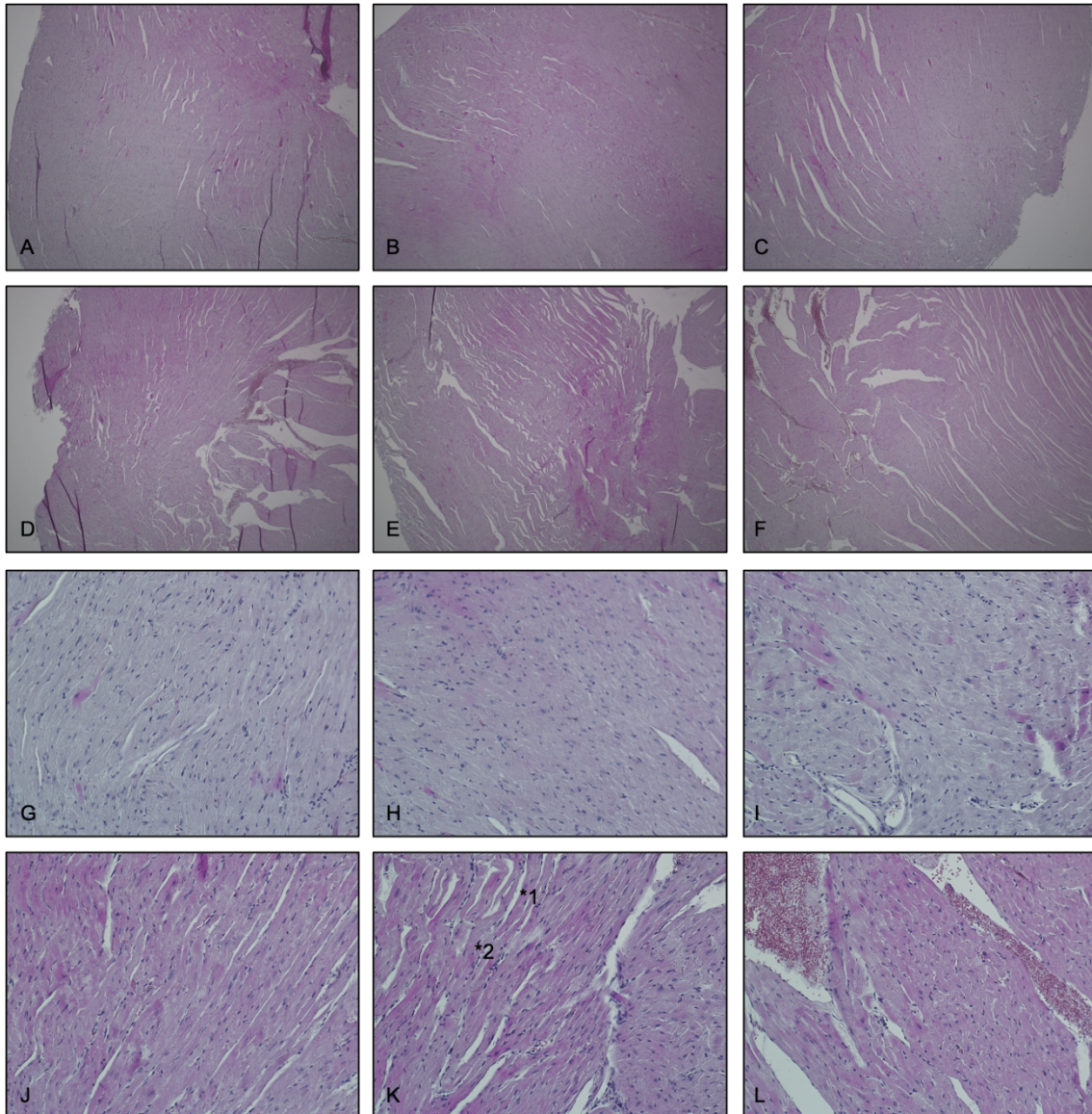
## **3.2 Mikroskopische Befunde**

### **3.2.1 H&E- Organschnitte von $gp130^{LLAA}$ Mäusen und WT Mäusen sind vergleichbar**

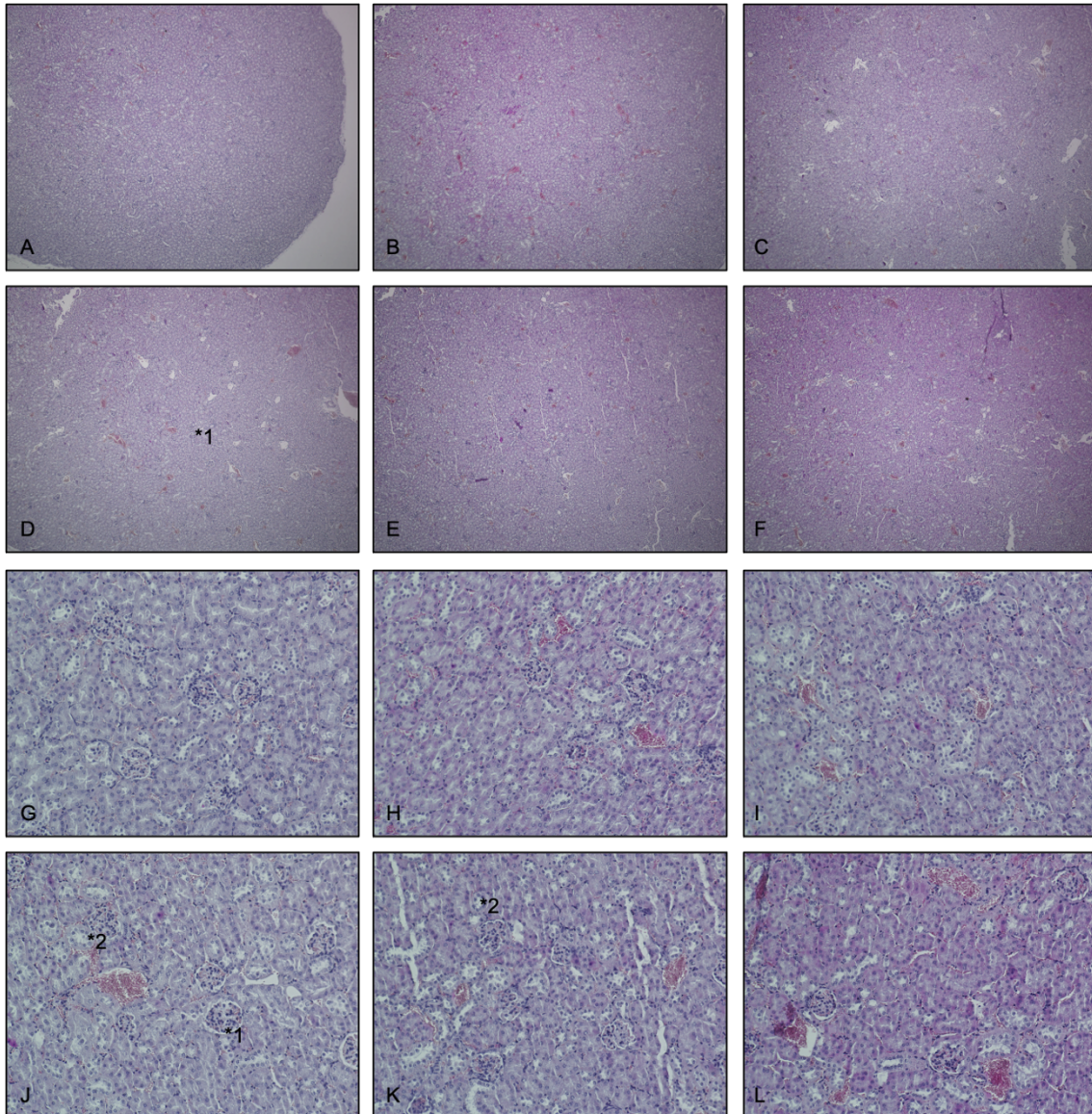
Im Rahmen der histologischen Begutachtung von Milz (Abb. 17), Herz (Abb.18), Niere (Abb. 19) und Leber (Abb. 20) mittels H&E- Färbung, zeigte sich innerhalb der beiden Untersuchungsgruppen (WT/ $gp130^{LLAA}$ ) ein homogenes Bild. Verglichen wurden Organschnitte von männlichen WT und  $gp130^{LLAA}$  Tieren ähnlichen Alters. Zwischen den Tieren einer Gruppe wurden interindividuell keine histomorphologischen Unterschiede festgestellt. Die Tiere mit Punktmutation des  $gp130$  Rezeptors und jene ohne waren auf histologischer Ebene nicht zu unterscheiden. Es ist davon auszugehen, dass die internalisierungsdefiziente Mutante des  $gp130$  Rezeptors keinen mikroskopisch fassbaren Effekt hat.



**Abbildung 17: Milzgewebe von WT Mäusen und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen in der H&E- Färbung vergleichbare Ergebnisse.** (A-C) x4 + (G-I) x20: WT Mäuse, ♂, 9 Monate alt. (D-F) x4 + (J-L) x20: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse, ♂, 8 Monate alt. Darstellung der weißen und roten Milzpulpa. Die rote Pulpa (1) liegt zwischen den Follikeln der weißen Pulpa (2) und wird von einem Netz feiner Spalträume durchzogen, die als kleine „Risse“ erscheinen (Milzsinus). Zu sehen sind Sekundärfollikel (2) und zentralständige Arteriolen mit PALS im Querschnitt (3) und Längsschnitt (4).

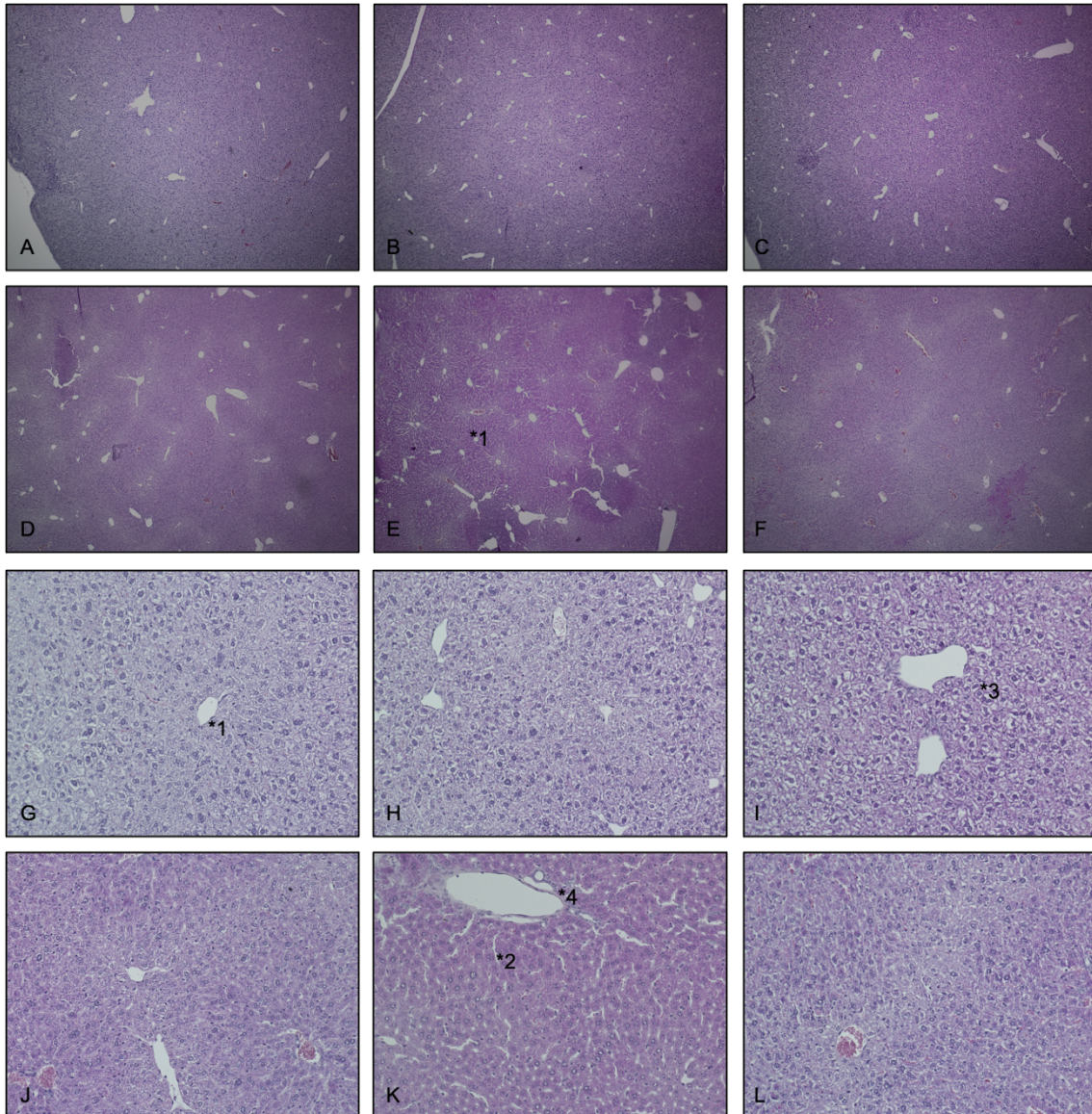


**Abbildung 18: Herzgewebe von WT Mäusen und gp130<sup>LAA</sup> Mäusen zeigen in der H&E- Färbung vergleichbare Ergebnisse.** (A-C) x4 + (G-I) x20: WT Mäuse, ♂, 6 Monate alt. (D-F) x4 + (J-L) x20: gp130<sup>LAA</sup> Mäuse, ♂, 6 Monate alt. Die Muskelwand (Myokard) begrenzt die Ventrikel. Der Großteil der dunkelvioletten Zellkerne im Myokard gehört zu Fibroblasten (2). Die Zellkerne der Herzmuskelzellen (1) sind heller, größer und oft eher oval als die schmalen Zellkerne der Fibroblasten.



**Abbildung 19: Nierengewebe von WT Mäusen und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen in der H&E- Färbung vergleichbare Ergebnisse.** (A-C) x4 + (G-I) x20: WT Mäuse, ♂, 6 Monate alt, (D-F) x4 + (J-L) x20: gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse, ♂, 6 Monate alt. Das Rindenlabyrinth ist durch zahlreiche Nierenkörperchen (1) charakterisiert. Sie bestehen aus kapillarem Gefäßknäuel (Glomerulus) und einer umgebenden Bowman-Kapsel. Nierenkörperchen weisen einen Gefäß- und Harnpol auf. Die Kapillarschlingen gehen aus dem Vas afferens hervor, welches am Gefäßpol in das Nierenkörperchen eindringt und münden in das Vas efferens, welches das Nierenkörperchen ebenfalls am Gefäßpol verlässt. Am Harnpol beginnt das Tubulussystem (2) der Niere. Im Rindenlabyrinth und Nierenmark befinden sich meist querschnittene proximale, distale und intermediäre Tubuli sowie die Sammelrohre.

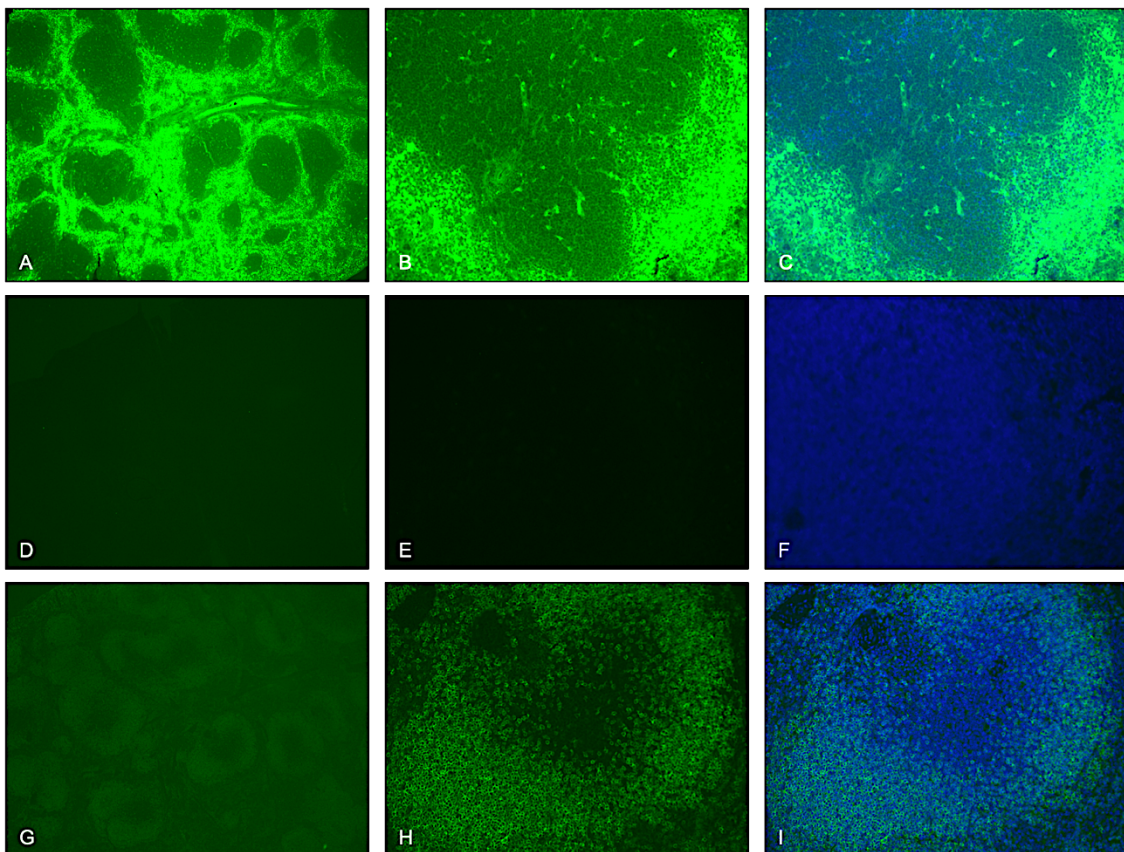




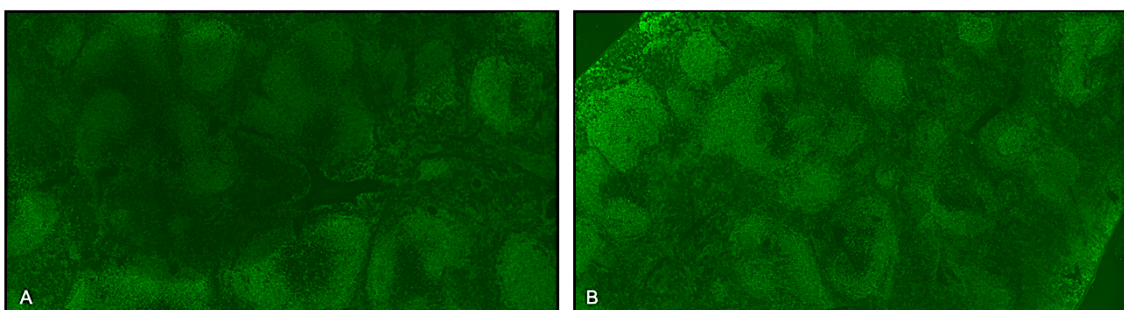
**Abbildung 20: Lebergewebe von WT Mäusen und gp130<sup>LAA</sup> Mäusen zeigen in der H.E.- Färbung vergleichbare Ergebnisse.** (A-C) x4 + (G-I) x20: WT Mäuse, ♂, 6 Monate alt, (D-F) x4 +(J-L) x20: gp130<sup>LAA</sup> Mäuse, ♂, 6 Monate alt. Das interlobuläre Bindegewebe ist bei der Maus schwach ausgebildet, sodass die Läppchengliederung der Leber nicht deutlich hervortritt. Im Zentrum der Leberläppchen befinden sich Zentralvenen (1). Die Lebersinusoiden (2) und die balkenartig angeordneten Hepatozyten (3) verlaufen radiär zur Zentralvene. An den Stellen, wo mehrere Leberläppchen zusammentreffen, befinden sich die Periportalfelder (4), die die *A. interlobularis*, *V. interlobularis* und den *Ductus hepaticus* enthalten. Diese drei Strukturen werden zur Glisson-Trias zusammengefasst.

### 3.2.2 Immunhistochemische Untersuchung des FFPE Milzgewebes von gp130<sup>LLAA</sup> und WT Mäusen zeigt vergleichbare Ergebnisse

Bei der immunhistologischen Untersuchung von unbehandeltem FFPE Milzgewebe wurde zunächst eine starke Autofluoreszenz beobachtet (Abb. 21A-C). Die Hintergrund-Autofluoreszenz des Milzgewebes resultiert einerseits aus den in großer Anzahl vorkommenden Erythrozyten und andererseits aus der Fixierung des Gewebes mit Formaldehyd (194). Erfolgte im Anschluss an die Immunfluoreszenzfärbung eine Behandlung des Milzgewebes mit dem *Vector TrueVIEW Autofluorescence Quenching Kit*, wurde eine Abnahme der grünen Autofluoreszenz beobachtet, während die DAPI Zellkernfärbung im blauen Kanal erhalten blieb (Abb. 21D-I) Das Milzgewebe von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen wurde immunhistochemisch, wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben, mit dem pan-B-Zell-Marker (murin) B220 und dem Proliferationsmarker Ki-67 gefärbt. Beim Vergleich der B220 Färbung des WT und gp130<sup>LLAA</sup> Milzgewebes wurde sowohl in der Übersichtsaufnahme (Abb. 22) als auch in den Einzelaufnahmen (Abb. 23) kein Unterschied festgestellt. Das Ki-67 Protein ist während allen aktiven Phasen des Zellzyklus vorhanden (G1, S, G2 und Mitose), wohingegen das Protein in ruhenden Zellen (G0-Phase) fehlt. Dies macht das Ki-67 Protein zu einem geeigneten Marker für die Wachstumsfraktion einer Zellpopulation (195,196). In der Milz kommt es vor allem in den KMZ zur klonalen Expansion von antigenspezifischen Lymphozyten. Die Färbung mit dem Ki-67 Antikörper zeigt sowohl in WT als auch in gp130<sup>LLAA</sup> Milzgewebe eindeutige Ansammlungen von proliferierenden Zellen. Es wurden keine Unterschiede zwischen WT und gp130<sup>LLAA</sup> Milzgewebe beobachtet (Abb. 24, Abb. 25).

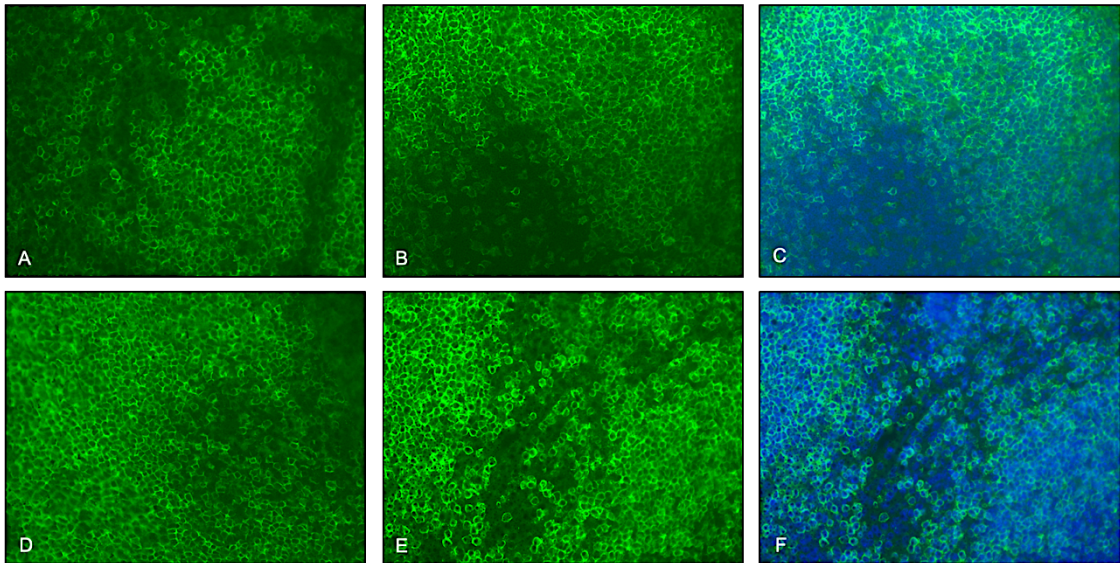


**Abbildung 21: Unbehandeltes FFPE Milzgewebe weist eine starke Autofluoreszenz auf.** Komplet unbehandeltes FFPE Milzgewebe einer WT Maus im grünen Kanal in 4x Vergrößerung (A), 20x Vergrößerung (B) und mit der Überlagerung der DAPI Zellkernfärbung des blauen Kanals (C). (D-F): Milzgewebe der gleichen WT Maus gefärbt mit der Isotypkontrolle (*RatIGg2a*) für den B220 Antikörper unter Verwendung des *VectorTrueVIEW Autofluorescence Quenching Kits*. x4 (D), x20 (E), + DAPI Zellkernfärbung (F). (G-I): Färbung der B-Zellen mit dem B220 Antikörper unter Verwendung des *VectorTrueVIEW Autofluorescence Quenching Kits* für die gleiche WT Maus x4 (G) und x20 (H), + DAPI Zellkernfärbung (I).

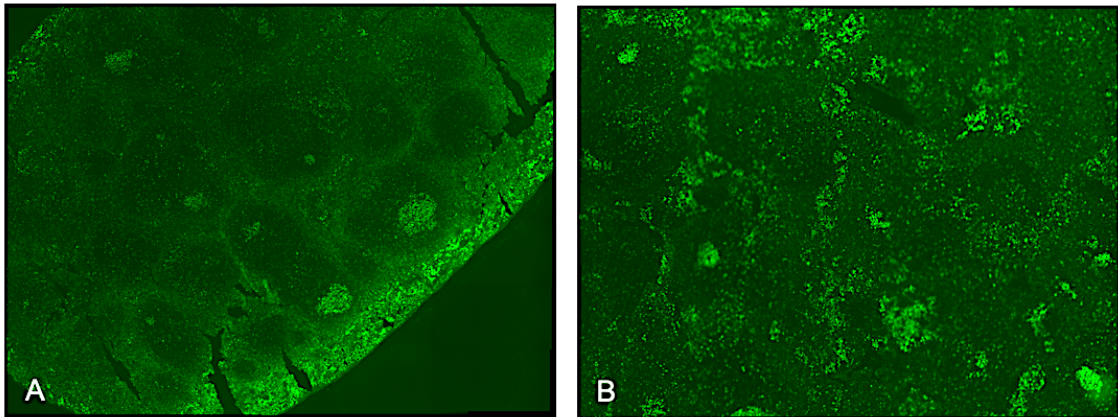


**Abbildung 22: Färbung der B-Zellen mit dem B220 Antikörper in FFPE Milzgewebe von WT Maus und gp130<sup>LLAA</sup> Maus.** Dargestellt sind Verschmelzungen einzelner Aufnahmen in 4x Vergrößerung zur Übersicht über die B-Zell-Färbung mit B220 in Milzgewebe von einer männlichen, 10 Monate alten WT

Maus (A) und einer männlichen, 10 Monate alten gp130<sup>LLAA</sup> Maus (B). Repräsentative Bilder von n=3 pro Genotyp.



**Abbildung 23: Die B-Zell-Färbung mit dem B220 Antikörper zeigt in WT Milzgewebe und gp130<sup>LLAA</sup> Milzgewebe vergleichbare Ergebnisse.** (A+B): Färbung der B-Zellen in Milzgewebe von zwei WT Mäusen (männlich, 10 Monate alt) mit dem B220 Antikörper in 40x Vergrößerung, (C): (B) + Überlagerung der DAPI Zellkernfärbung. (D+E): Färbung der B-Zellen in Milzgewebe von zwei gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen männlich, 10 Monate alt) mit dem B220 Antikörper in 40x Vergrößerung, (F): (E) +Überlagerung der DAPI Zellkernfärbung.

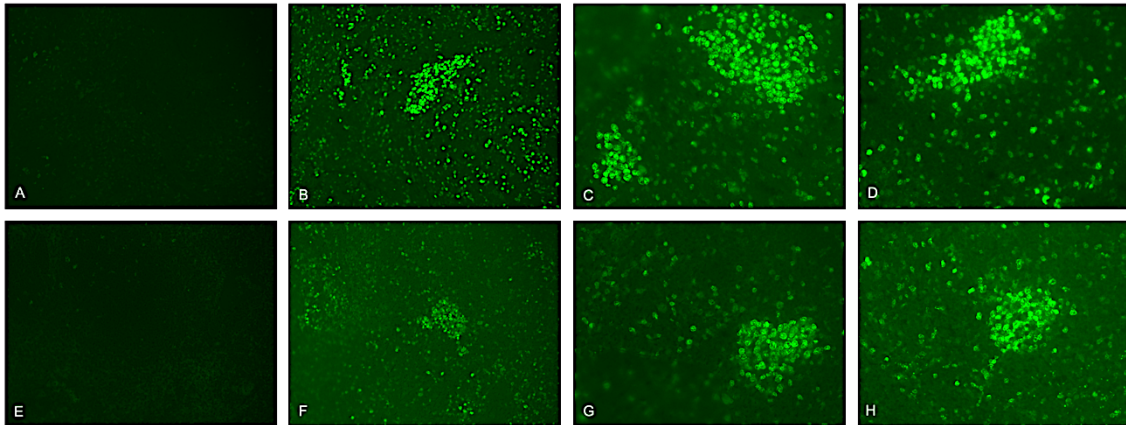


**Abbildung 24: Färbung der proliferierenden Zellen mit dem Ki-67 Antikörper in FFPE Milzgewebe von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Maus.** Dargestellt ist die Verschmelzung einzelner Aufnahmen in 4x Vergrößerung zur Übersicht der Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 in Milzgewebe einer männlichen, 10 Monate alten WT Maus (A) und männlicher, gleichaltriger gp130<sup>LLAA</sup> Maus (B). Beide Schnitte wurden nach der Immunfluoreszenzfärbung mit dem *VectorTrueVIEW Autofluorescence Quenching Kit* behandelt. Obwohl die Anwendung strikt nach dem angegebenen Protokoll erfolgte, lässt sich in Aufnahme (A) vor allem am unteren Geweberand und in Aufnahme (B) im Bereich der Erythrozyten der roten Pulpa eine

Autofluoreszenz feststellen. Dennoch sind in beiden Aufnahmen eindeutige Proliferationszentren zu erkennen, die sich zwischen WT und gp130<sup>LLAA</sup> Maus nicht zu unterscheiden scheinen.

Maus 1

Maus 2



**Abbildung 25: Die Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 zeigt in WT und gp130<sup>LLAA</sup> FFPE Milzgewebe vergleichbare Ergebnisse.** (A-D): Milzgewebe von zwei männlichen, 10 Monate alten WT Mäusen, (E-H): Milzgewebe von zwei männlichen, 10 Monate alten gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen. (A+E): Kontrollaufnahme durch ausschließliche Färbung mit dem Zweitantikörper *anti-rabbit Dylight 488* (*Life Technologies A11008*). (B+F): Ki-67 Färbung der proliferierenden Zellen in 20x Vergrößerung. (C, D, G, H): Ki-67 Färbung in 40x Vergrößerung.

### 3.3 Lymphozyten aus der Milz von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen exprimieren mehr gp130 an der Oberfläche

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass die Mutation des Internalisierungsmotivs von gp130 zu einer erhöhten Expression des Rezeptors führt (111). Im Weiteren wurde überprüft, ob dieser Befund auch für Immunzellen aus der Milz von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen bestätigt werden kann.

Für die Untersuchung der gp130 Expression auf lymphoiden Zellen wurden Zellsuspensionen der Milz für die T-Zell Marker CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L und B-Zell-/ Plasmazell- Marker B220, CD19, CD138 sowie für gp130 gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

CD3 ist ein Transmembranprotein der T-Lymphozyten und als Teil des T-Zell-Antigen-Rezeptor-Komplex (TZR-CD3) an der Aktivierung der T-Lymphozyten beteiligt (197,198). Die aus naiven T-Zellen durch Differenzierung entstandenen Effektorzellen werden anhand ihrer Oberflächenproteine, wie bereits beschrieben, in CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen eingeteilt (16). Die Fähigkeit des Immunsystems mit größerer Intensität auf eine Reinfektion mit demselben Pathogen zu

reagieren, bildet die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses. Die beschleunigte Sekundärantwort ist auf die antigenabhängige Reaktivierung der Gedächtniszellen zurückzuführen.

Die T-Gedächtniszellen lassen sich weiterhin in Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (*effector memory T cells*,  $T_{EM}$ ) und in zentrale Gedächtnis-T-Zellen (*central memory cells*,  $T_{CM}$ ) einteilen (199). Gedächtniszellen werden phänotypisch durch eine hohe Expressionsrate von CD45RO (human) und CD44 (murin) charakterisiert. Die zentralen Gedächtnis-T-Zellen behalten den CCR7 Rezeptor und CD62L (L-Selektin) der naiven T-Zellen bei und zirkulieren durch sekundäre lymphatische Organe wie Milz und Lymphknoten, allerdings zunächst ohne Effektorfunktion am Infektionsherd. Sie können jedoch nach Antigen Stimulation leicht aktiviert werden, um sich zu Effektorzellen zu entwickeln. Im Vergleich zu naiven T-Zellen haben sie eine höhere Sensitivität gegenüber Antigenstimulation und sind weniger abhängig von Co-Stimulation. Effektor-Gedächtnis-T-Zellen werden phänotypisch hauptsächlich dadurch charakterisiert, dass sie eine geringe CD62L Expressionsrate aufweisen. Sie exprimieren diverse *Homing*-Rezeptoren, die ihnen den Eintritt in nicht lymphoides Gewebe ermöglichen. Sie können besonders schnell durch ihr Antigen aktiviert werden und erfüllen u.a. durch die Freisetzung von  $IFN-\gamma$  eine sofortige Effektorfunktion (200-202). Die Analyse der T-Zellen basiert auf der in Abb. 9 beispielhaft dargestellten Auswertungsstrategie.

Zur Identifizierung der B-Zellen wurde der pan-B-Lymphozyten-Marker B220, eine Isoform von CD45, herangezogen (203) sowie CD19 als Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, welches während der Entwicklung auf allen pro-B-Zellen und reifen B-Zellen exprimiert wird. CD19 ist Bestandteil des BZR-Komplexes und moduliert dessen Signale (204-206).

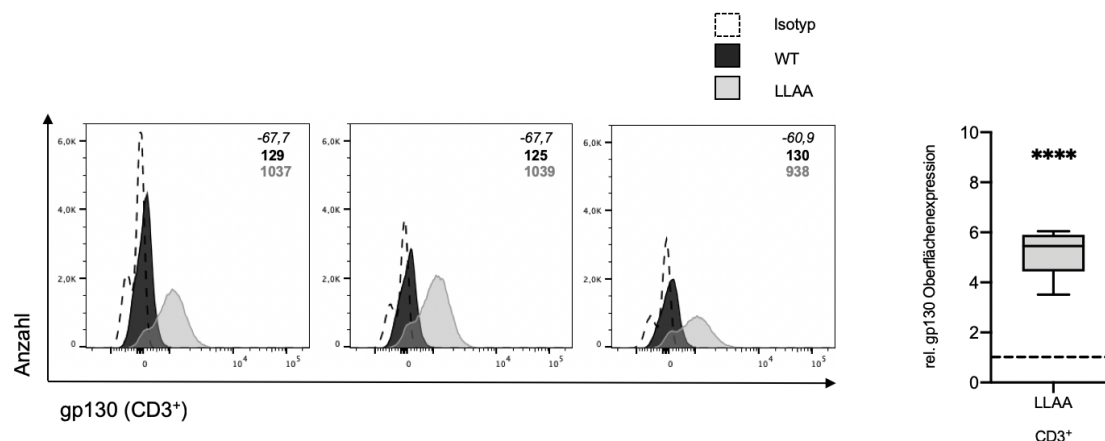
Nach erfolgreicher Reifung und Selektion verlassen die B-Zellen die KMZ entweder als Gedächtnis-B-Zellen oder langlebige Plasmazellen. Die Umwandlung einer B-Zelle in eine Plasmazelle wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren kontrolliert. Der Transkriptionsfaktor Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein 1*) wird in aktivierten B-Zellen hochreguliert und reprimiert B-Zell-typische Faktoren wie Bcl6 und Pax5 (207). Als Folge der Inhibition von Pax5 kommt es zu einer Herunterregulierung von wichtigen Oberflächenrezeptoren der B-Zell-Identität (z.B. CD19) und zur Umleitung in den Plasmazellpfad (208,209). Der Oberflächenmarker CD138 wurde herangezogen, um die Plasmazellen mittels Durchflusszytometrie zu quantifizieren. CD138 ist ein Proteoglykan (Syndecan-1), welches u.a. auf der Oberfläche von frühen

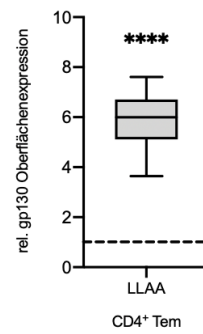
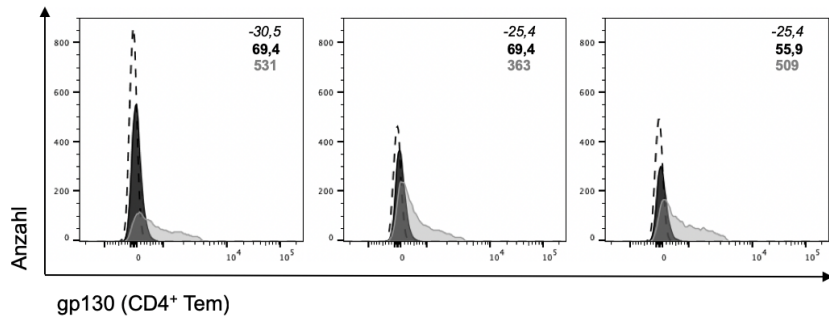
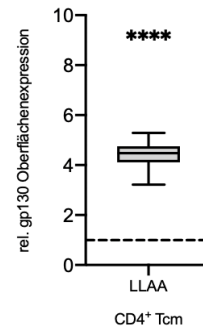
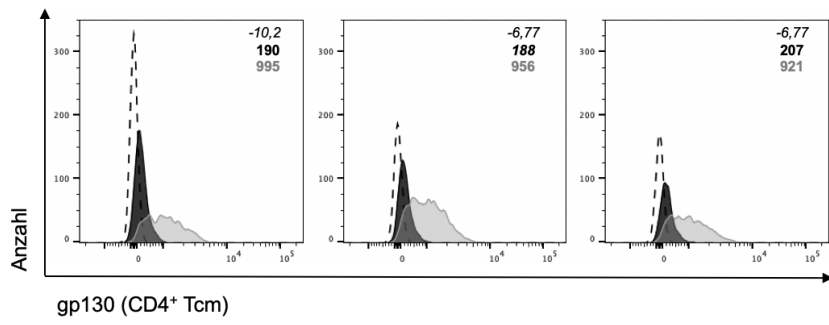
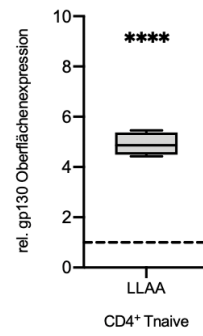
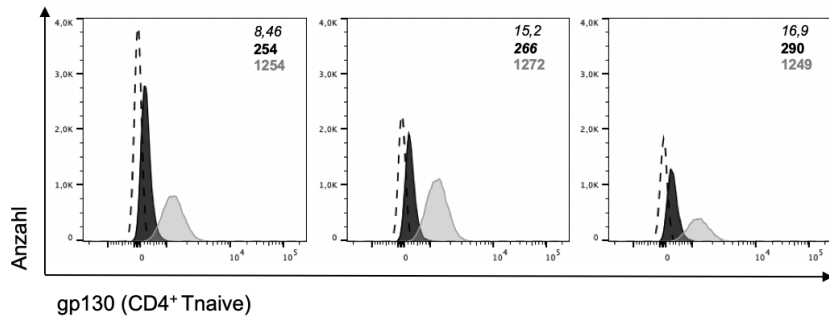
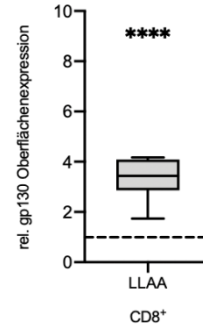
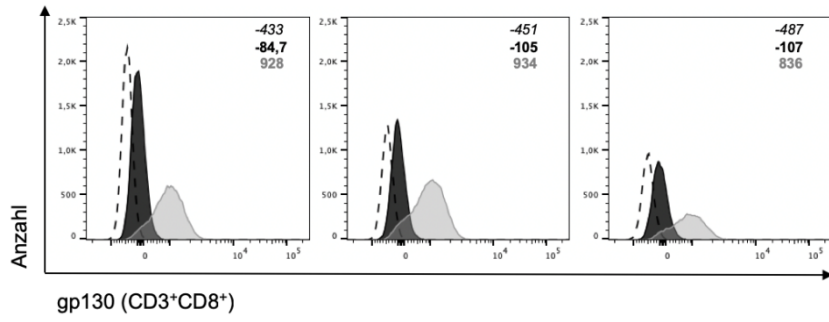
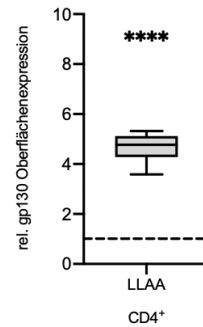
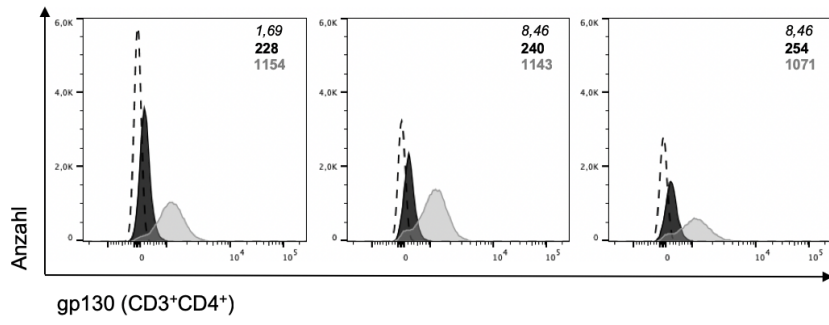
und späten Plasmazell-Stadien exprimiert wird (210,211). Die Analyse der B-Zellen und Plasmazellen basiert auf der in Abb. 6 beispielhaft dargestellten Auswertungsstrategie.

Um WT und gp130<sup>LLAA</sup> Tiere direkt miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst für jede untersuchte Zellpopulation der Mittelwert der auf die Isotypkontrolle korrigierten MFI-Werte der WT Mäuse bestimmt und als 1 definiert. Nachfolgend wurde für jede gp130<sup>LLAA</sup> Maus der korrigierte MFI-Wert ermittelt und ins Verhältnis gesetzt. Abb. 26 und Abb. 27 zeigen, dass auf allen analysierten Immunzellpopulationen eine erhöhte gp130 Expression vorhanden ist. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Mutation des Internalisierungsmotivs generell zu einer stärkeren Oberflächenpräsenz von gp130 in den Immunzellen der Milz führt.

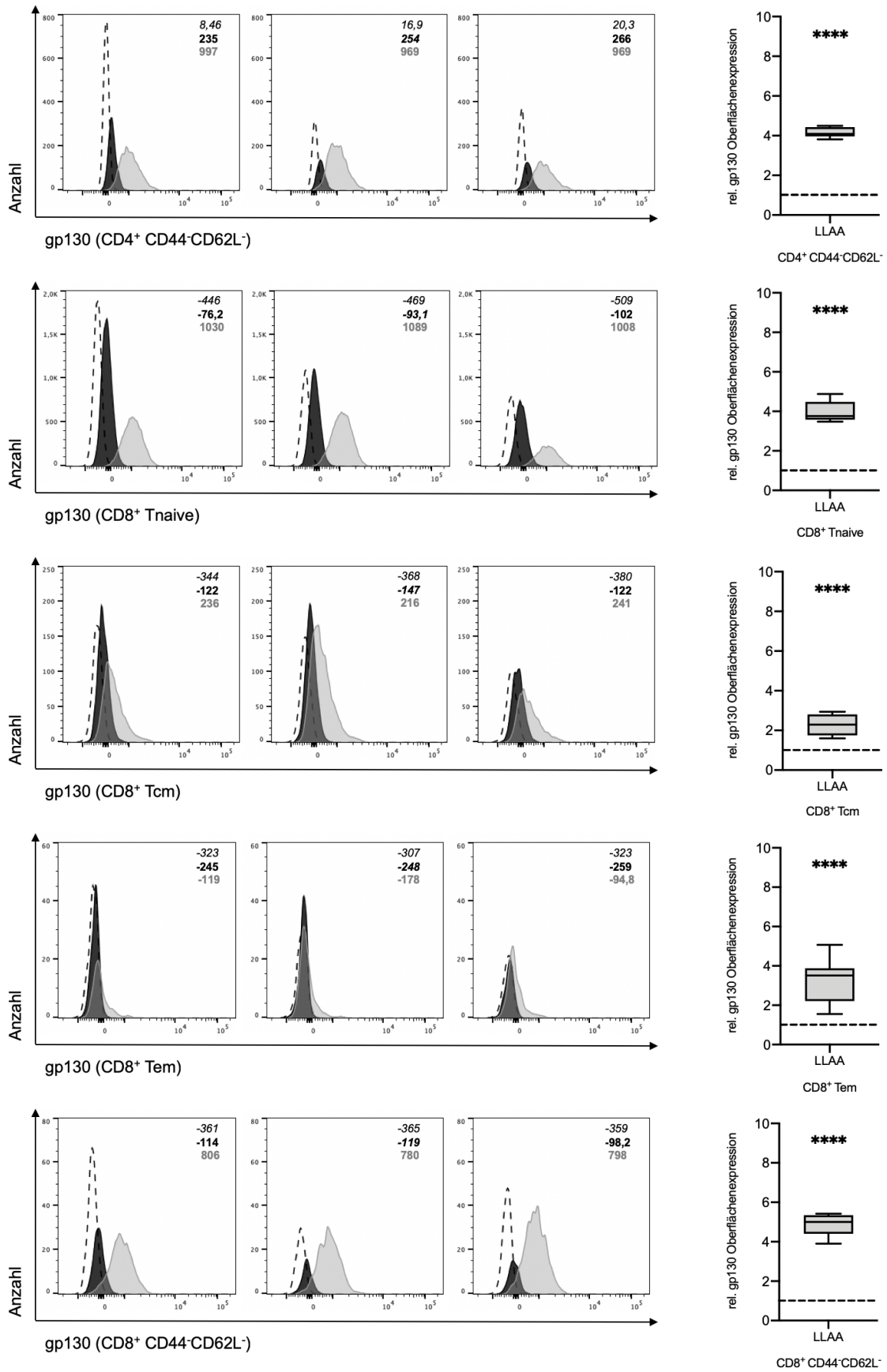
Abb. 26 und Abb. 27 zeigen außerdem, dass der Anstieg der relativen gp130 Oberflächenexpression auf B220-CD138<sup>+</sup> Plasmazellen und B220+CD19<sup>+</sup> B-Zellen am stärksten und auf den CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen am schwächsten war. Außerdem fällt auf, dass es bei den CD4<sup>+</sup> T<sub>cm</sub><sup>-</sup> und T<sub>em</sub><sup>-</sup> Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> heterogene Subpopulationen gibt. Einige Zellen sind durch die Mutation deutlich unbeeinflusst als andere, wodurch im Histogramm kein einheitlicher definierter Peak entsteht.

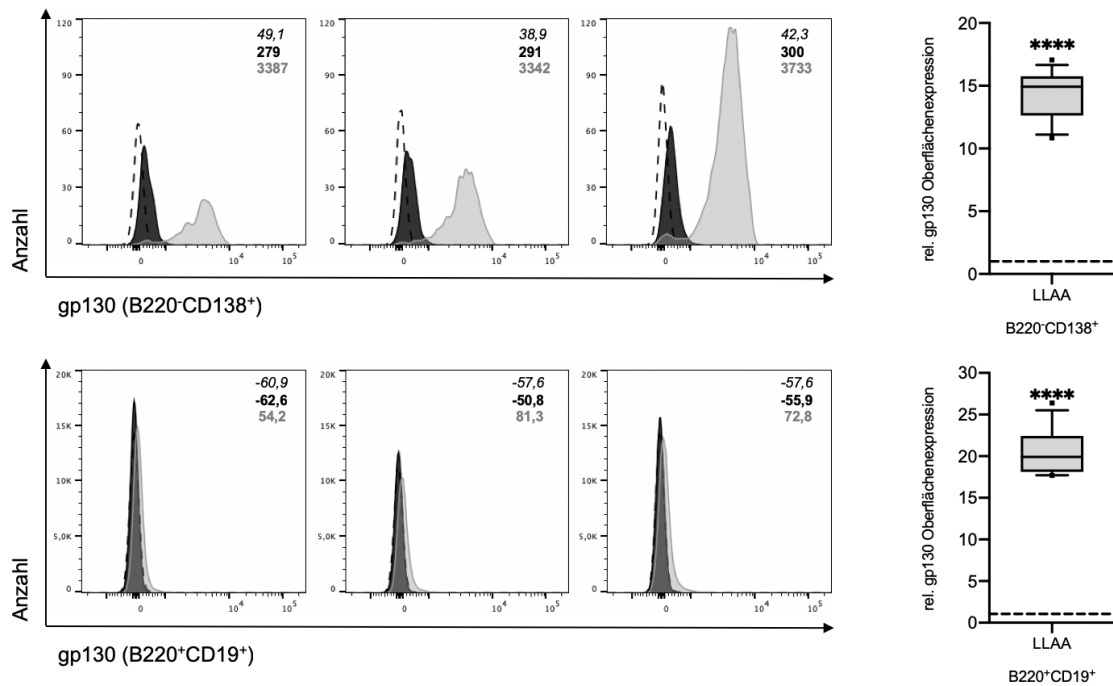
Gp130 wird grundsätzlich auf den Zellen schwach exprimiert, was nicht an einer schlechten Antikörper-Affinität liegt, da bei allen Zellen der gp130<sup>LLAA</sup> ein deutlicher Anstieg der gp130 Expression zu sehen ist.



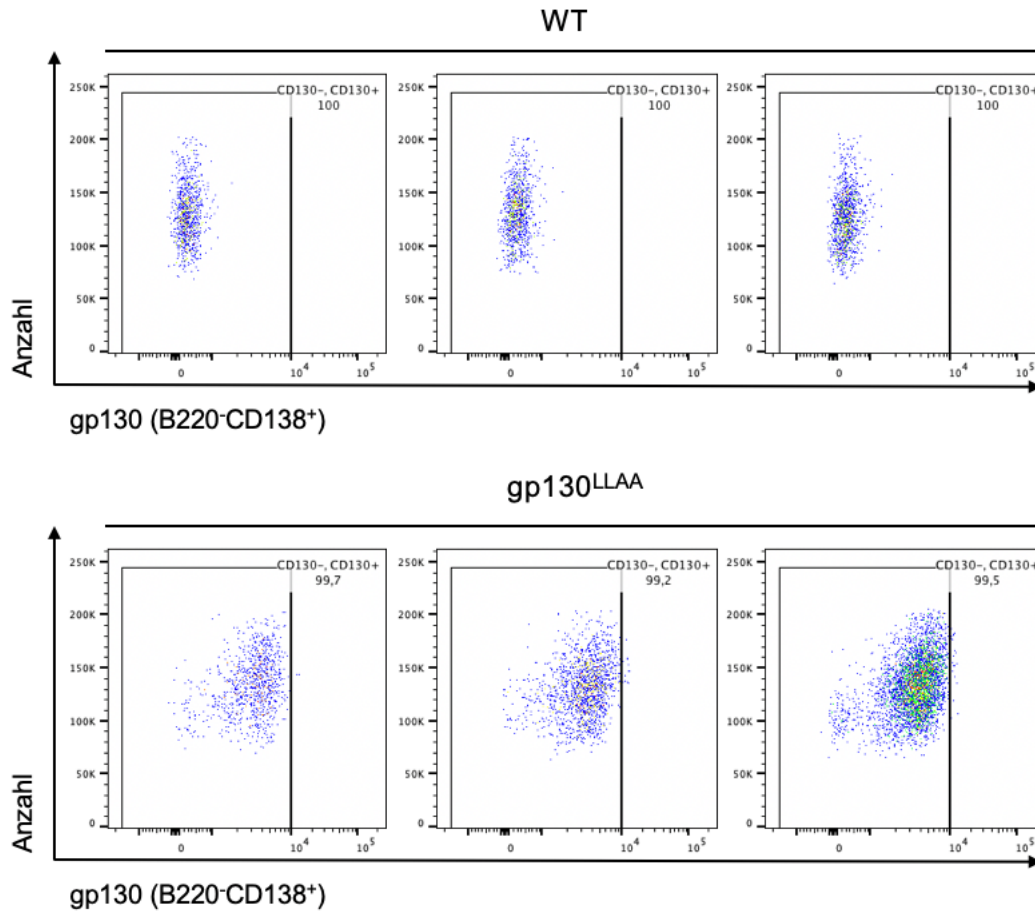








**Abbildung 26: Lymphozyten aus der Milz von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression.** Zellen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen wurden für CD3, CD4, CD8, CD44, CD62L, B220, CD19, CD138 und gp130 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die gp130 Expression auf T-Zellen (CD3<sup>+</sup>), CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und ihren Subpopulationen (Tnaive, Tcm, Tem, CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>) sowie auf B-Zellen (B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>) und Plasmazellen (B220<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) von jeweils 3 WT (schwarz gefüllte Histogramme) und 3 gp130<sup>LLAA</sup> (grau gefüllte Histogramme) Tieren im Vergleich zur Isotypkontrolle (schwarze gestrichelte Linien). Die Zahlen innerhalb der Histogramme geben die MFI (*median fluorescence intensity*) -Werte von WT (schwarz), gp130<sup>LLAA</sup> (grau) und Isotypkontrolle (schwarz kursiv) an. Die für die Analyse verwendeten Auswertungsstrategie sind exemplarisch in Abb. 6 und Abb. 9 dargestellt. Die Diagramme zeigen die relative gp130 Oberflächenexpression der einzelnen Lymphozytenpopulationen von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (B-Zellen, Plasmazellen: n=17, T-Zellen n=9) im Vergleich zu WT Mäusen (B-Zellen, Plasmazellen: n=13, T-Zellen n=5). Die auf die Isotypkontrolle 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; horizontale Linie: Median; Punkte ober-/unterhalb Whiskers: Ausreißerwerte). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder des Mann-Whitney-Tests bestimmt: \*\*\*\*, p ≤ 0.0001.



**Abbildung 27: Plasmazellen aus der Milz von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression gegenüber Plasmazellen aus der WT Milz.** Dargestellt sind exemplarisch CD130<sup>-</sup> und CD130<sup>+</sup> Plasmazellen (B220<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup>) von 6 Monate alten WT Mäusen n=3 (oben) sowie von 6 Monate alten gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen n=3 (unten). Beim direkten Vergleich der WT und gp130<sup>LLAA</sup> Tiere ist auf der x-Achse (gp130 Fluoreszenzintensität) der gp130<sup>LLAA</sup> Tiere eine deutliche Verschiebung nach rechts zu erkennen.

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass naive B- und T-Zellen sowohl gp130 als auch den IL-6R auf ihrer Oberfläche exprimieren (111,212,213). Frühere Untersuchungen zeigten auch, dass CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sich in dem Expressionsniveau beider Rezeptoren unterscheiden (212,214). Entsprechend dieser Befunde wurde im Rahmen dieser Arbeit gp130 auf den T-Zellen und ihren Subpopulation nachgewiesen, während auf den B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen nur ein sehr geringes Expressionsniveau des gp130 Rezeptors festgestellt wurde. Die Analyse der relativen gp130 Oberflächenexpression der gp130<sup>LLAA</sup> B-Zellen zeigte eine 20-fach höhere gp130 Expression im Vergleich zu den WT Kontrollen, wohingegen die Expression auf gp130<sup>LLAA</sup> T-Zellen nur um das ca. 5-fache erhöht war.

Eine genauere Analyse der T-Zellen ergab, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich mehr gp130 als CD8<sup>+</sup> T-Zellen aufwiesen. Die hier dargestellte fache Erhöhung ist immer relativ zu der initialen Expression. Da auf den B-Zellen der WT Mäuse kaum gp130 nachgewiesen wurde, ist der relative Anstieg auf den B-Zellen der gp130<sup>LLAA</sup> Tiere höher. Auch absolut blieb das gp130 Level der gp130<sup>LLAA</sup> B-Zellen geringer als bei den T-Zellen der WT Mäuse.

In den WT Tieren zeigten die Plasmazellen und die T-Zellen ähnliche gp130 Expressionsspiegel.

### **3.4 Der Einfluss der gp130<sup>LLAA</sup> Mutation auf die Homöostase von lymphoiden Zellen der Milz**

IL-6 ist sowohl an dem Überleben, der Expansion und Differenzierung von B-Zellen (156,185,215-218) als auch an dem Überleben, der Proliferation und Polarisation von T-Zellen beteiligt (182,185,218-222). Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, welchen Einfluss die Mutation von gp130 auf die Homöostase von B- und T-Zellen und ausgewählte Subpopulationen hat.

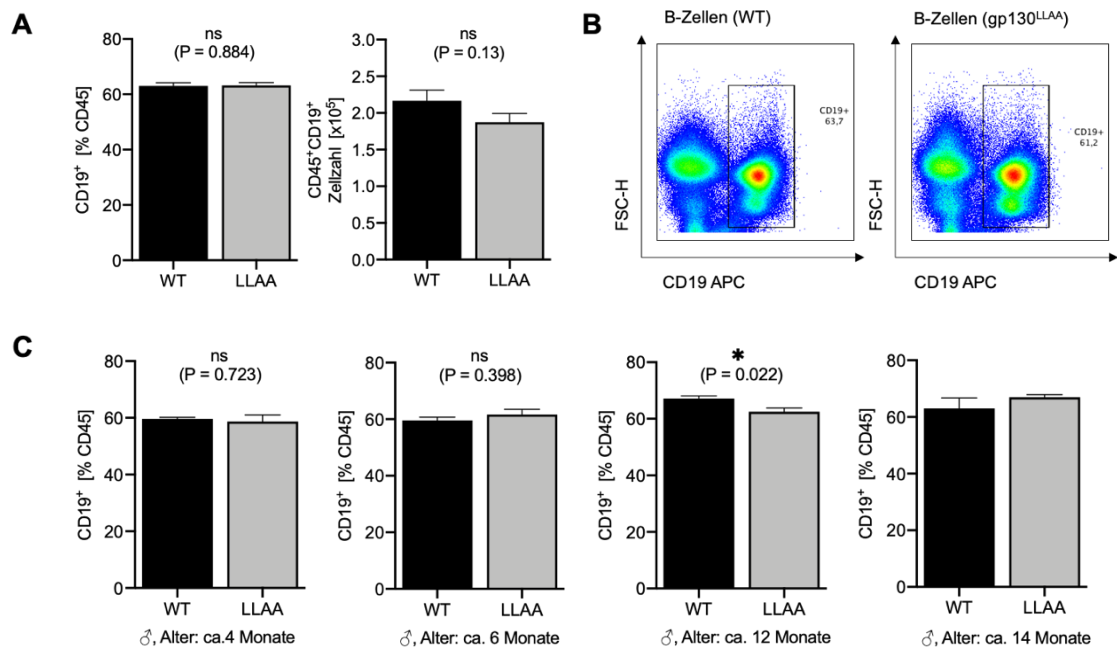
Die B-Lymphozyten bilden eine heterogene Population von Zellen, deren Phänotyp, Ursprung, Funktion und anatomische Lokalisation sich unterscheiden. Zum einen resultiert die Heterogenität aus der B-Zell Differenzierung von Vorläuferzellen über Zellen eines mittleren Reifestadiums zu reifen Plasmazellen oder Gedächtniszellen, zum anderen entsteht sie durch die Präsenz von unterschiedlichen und unabhängigen B-Zell-Linien (223). Nur B-Zellen, die einen funktionellen und monospezifischen BZR auf ihrer Oberfläche aufweisen, können das Knochenmark als sog. *Transitional*-Zellen (IgM<sup>hi</sup>, IgD<sup>lo</sup>) mit dem Blutstrom in Richtung Milz verlassen (224). Die hier untersuchten *Transitional*-Zellen vom Typ1 (T1) weisen einen ((IgM<sup>hi</sup>IgD<sup>lo</sup>)CD21<sup>-</sup>) Phänotyp auf. Die Entwicklung der *Transitional*-Zellen zu reifen B-Zellen findet in der Milz statt. Reife B-Zellen lassen sich in drei Untergruppen einteilen: folliculäre B-Zellen, B-Zellen der marginalen Zone, die zusammen die B2-Zellen bilden und die B1- Zellen (225,226). B1- Zellen werden von unreifen Stammzellen in der Pränatalperiode in der Leber gebildet und unterscheiden sich damit von den B2-Zellen, die im Knochenmark gebildet werden (227).

Die CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup>CD21<sup>-/+</sup>CD23<sup>+</sup> folliculären B-Zellen können Thymus-abhängige Antigene aktivierten T-Zellen präsentieren und dadurch die T-Zell abhängige Immunantwort gegen Protein-Antigene vermitteln (228-230).

Zusammen mit den B1-Zellen sind die B-Zellen der MZ ein wichtiger Bestandteil der frühen Immunantwort gegen T-unabhängige Pathogene im Blut (225). Zu diesen Antigenen gehören beispielsweise auch bakterielle Kapsel-Polysaccharide, die durch multivalente Quervernetzung (*cross linking*) der B-Zell-Rezeptoren zur Aggregation der BZR-Komplexe führen und durch nachfolgende Aktivierung der Zelle eine schnelle IgM Antwort auslösen (231-233). Die Schnelligkeit und Intensität dieser Immunantwort mithilfe der IgM Antikörperproduktion macht die MZ-B-Zellen und B1-Zellen zu Zellen, die eine Brücke zwischen dem angeborenem und erworbenem Immunsystem bilden (46,56,225,234).

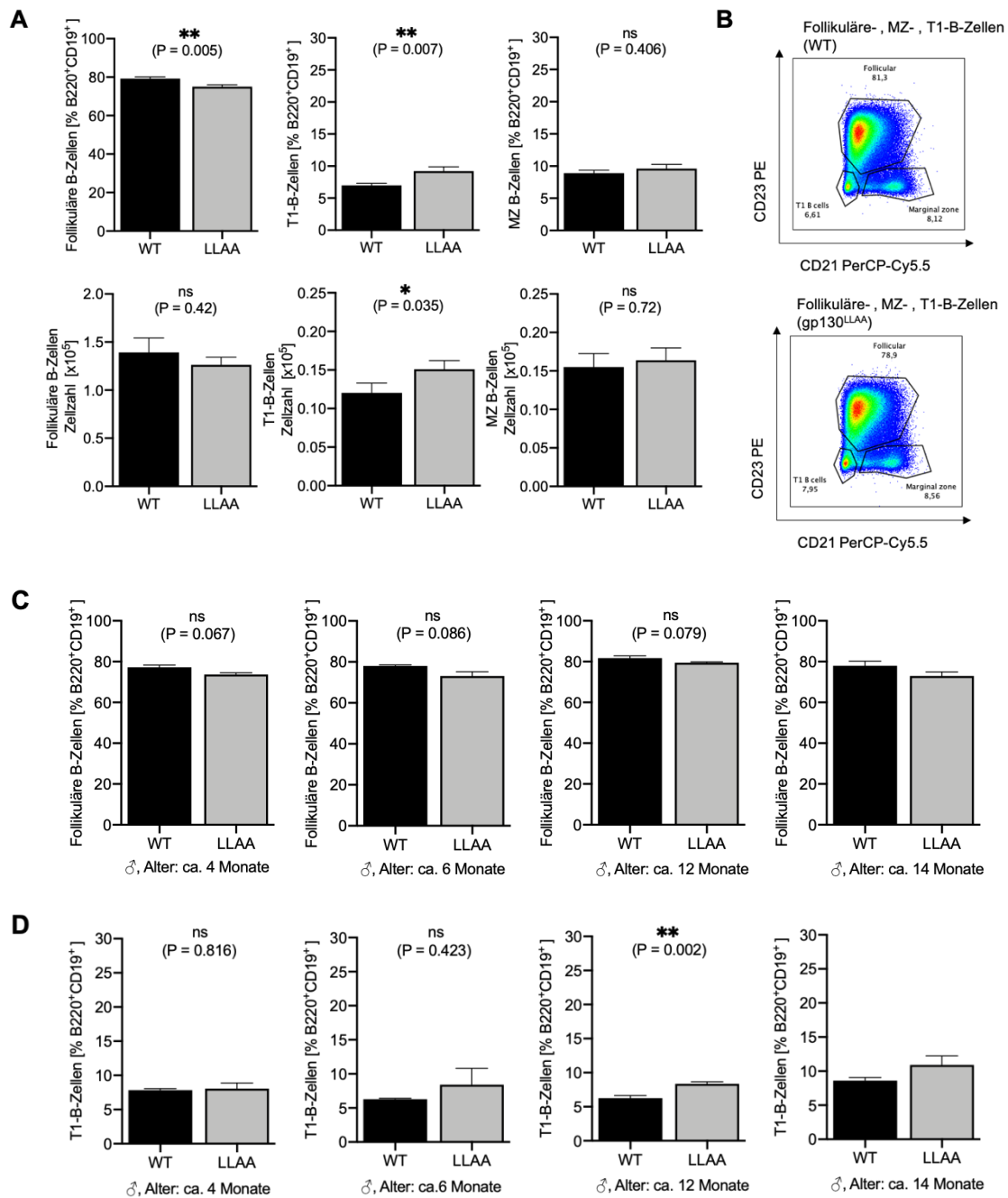
Jedoch gibt es Studien, die für MZ-B-Zellen eine umfassende Rolle sowohl in der T-unabhängigen als auch in der T-abhängigen Immunantwort beschreiben (57,235). Die B-Zellen der marginalen Zone sind durch einen  $CD19^+B220^+CD21^{hi}CD23^-$  Phänotyp gekennzeichnet (228-230).

Wie in Abb. 28 zu erkennen ist, zeigte die Analyse aller untersuchten Tiere keinen signifikanten Frequenzunterschied zwischen den  $CD19^+$  B-Zellen der  $gp130^{LAA}$  Mäuse und denen der Kontrollmäuse. Durch die altersspezifische Analyse wurde eine signifikante Abnahme der B-Zellfrequenz ( $CD19^+$ ) in der Untersuchungsgruppe der 12 Monate alten  $gp130^{LAA}$  Mäuse im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrollgruppe nachgewiesen (Abb. 28C). Eine Abnahme war auch für die Gesamtzellzahl zu beobachten (Abb. 28A). Diese Beobachtung muss allerdings relativiert werden, da in der älteren Untersuchungsgruppe (14 Monate) ein gegenläufiger Trend beobachtet wurde.



**Abbildung 28: Gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen einen geringen Unterschied in der Frequenz der CD19<sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen.** Für die Untersuchung der B-Zellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression des Oberflächenmarkers CD19 analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil bezogen auf die CD45<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen innerhalb des FSC/SSC von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau) sowie die absolute Zellzahl der CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen. Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der CD19<sup>+</sup> B-Zellen von 12 Monate alten, männlichen Versuchstieren. (C) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils der CD19<sup>+</sup> B-Zellen bezogen auf die CD45<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen. C.1 n=3 pro Genotyp, C.2 n=3 pro Genotyp, C.3 n=5 pro Genotyp, C.4 n=2 (WT), n=4 (gp130<sup>LLAA</sup>). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p> 0.05; \*, p≤ 0.05.

Abb. 29A zeigt, dass die Frequenz der folliculären B-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup>Milz im Vergleich zu den Kontrollmäusen minimal, aber dennoch signifikant verringert war. Die altersspezifische Analyse bestätigt die Tendenz zur Frequenzabnahme in allen Untersuchungsgruppen, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 29C). Umgekehrt war die Frequenz der T1 B-Zellen in der Milz der gp130<sup>LLAA</sup> Tiere im Vergleich zu den Kontrollmäusen im gleichen Maße signifikant erhöht (Abb. 29A). Die altersspezifische Analyse bestätigt die signifikant erhöhte Frequenz der gp130<sup>LLAA</sup> Tiere in der 12 Monate alten Untersuchungsgruppe (Abb. 29D). Die B-Zellen der marginalen Zone zeigten in der gp130<sup>LLAA</sup> Maus keinen signifikanten Unterschied in der Frequenz gegenüber den Kontrollmäusen. Vergleichbare Ergebnisse waren auch für die Gesamtzellzahlen der drei Populationen zu beobachten.

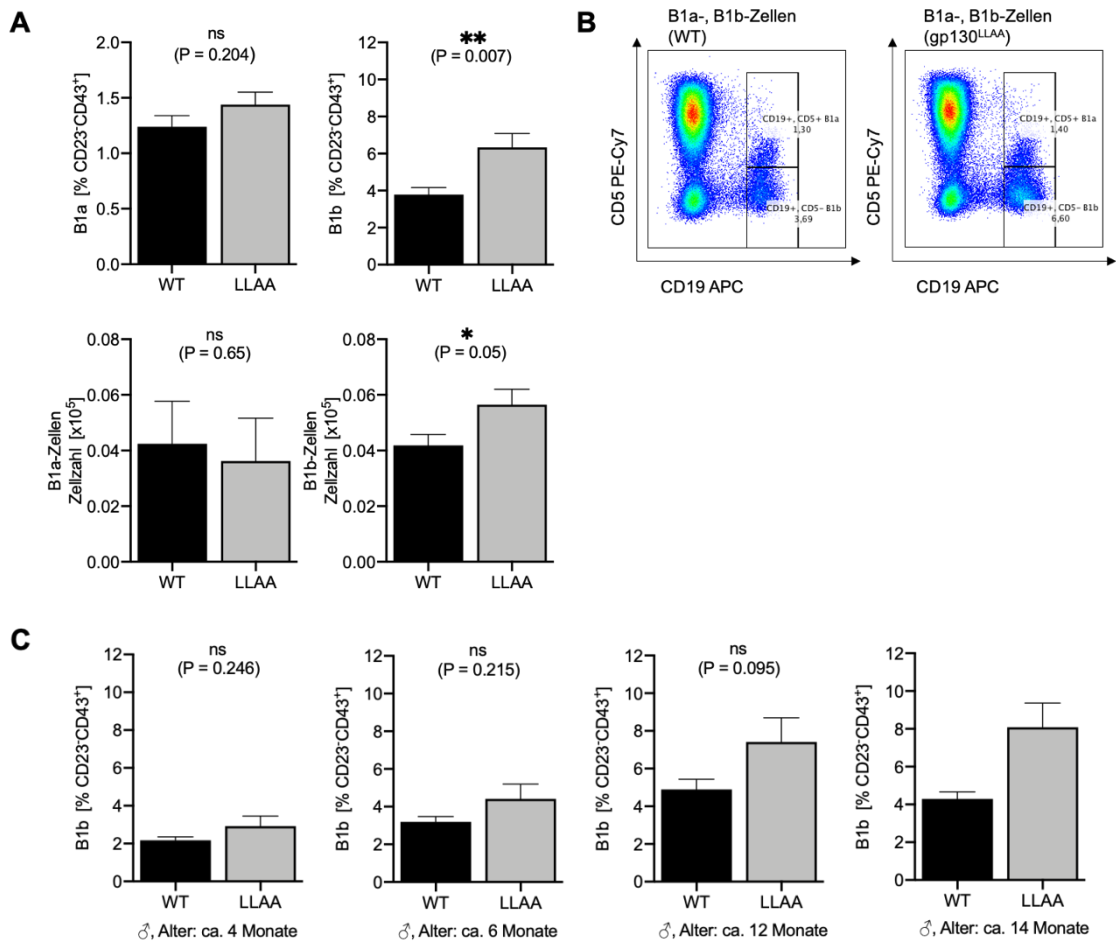


**Abbildung 29: Gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der Follikulären-, MZ- und T1-B-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen.** Für die Untersuchung der reifen B-Zellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD19, B220, CD23 und CD21 analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Follikulären-, T1- und MZ- B-Zellen bezogen auf die CD19<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau) sowie die absoluten Zellzahlen. Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der Follikulären-, T1- und MZ- B-Zellen von 12 Monate alten, männlichen Versuchstieren. (C) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils der Follikulären B-Zellen, bezogen auf die B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen. (D) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils der T1 B-Zellen bezogen auf die B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>

Einzelzellen. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns,  $p > 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ .

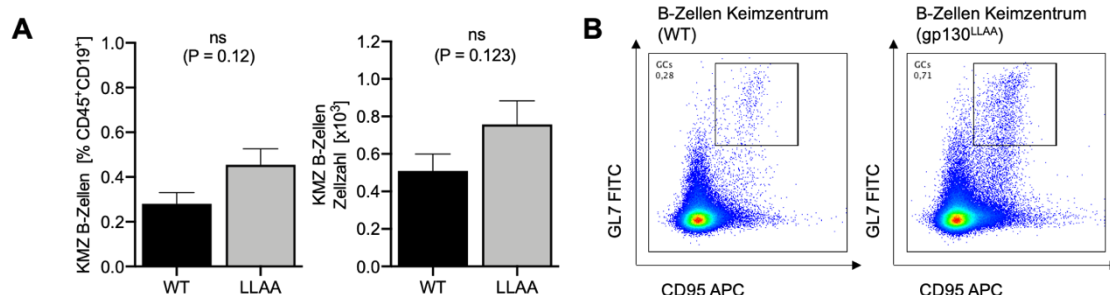
B1-Lymphozyten repräsentieren eine B-Zell Population, die hauptsächlich in der Peritoneal- und Pleurahöhle zu finden ist. In der Milz machen sie von den B-Zellen nur einen Anteil von etwa 5 Prozent aus. Im Gegensatz zu B2-Zellen tragen B1-Zellen kein CD23, aber CD43 auf ihrer Oberfläche (CD45+B220loCD23-CD43+). Weiterhin lassen sich die B1-Zellen anhand der Oberflächenexpression von CD5 in B1a- (CD5+) und B1b-(CD5-) Subpopulationen unterteilen (223,225,234,236-239). B1a-Zellen produzieren ebenso wie MZ-B-Zellen natürliche, polyspezifische IgM Antikörper mit niedriger Affinität gegenüber einem breiten Antigenpektrum und tragen damit zum angeborenen Immunsystem bei (225,240). B1b- Zellen sind hauptsächlich für die adaptive Immunantwort gegen T-unabhängige Antigene verantwortlich und erfüllen eine Gedächtnisfunktion (241,242). Wie in Abb. 30 zu erkennen ist, wurde in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz ein signifikanter Anstieg der Frequenz der B1b-Zellen nachgewiesen. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Gesamtzellzahl beobachtet. Eine genauere Betrachtung der Altersgruppen bestätigt den Anstieg, wenn auch ohne statistische Signifikanz (Abb. 30C). Weder die Frequenz der B1a-Zellen noch die Gesamtzellzahl zeigten in der gp130<sup>LLAA</sup> einen signifikanten Unterschied (Abb. 30A).





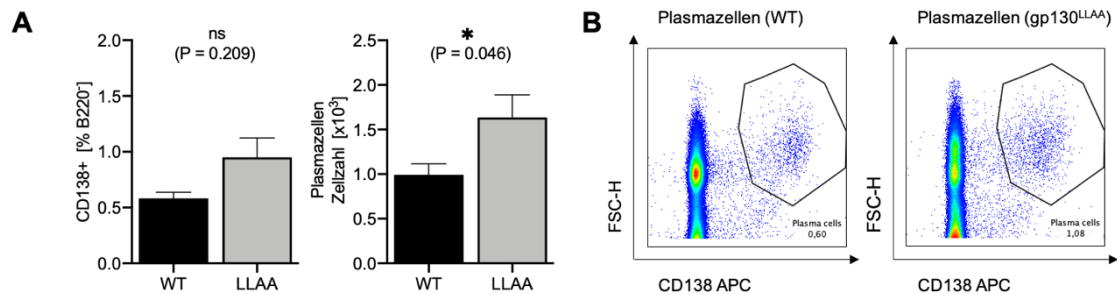
**Abbildung 30: Gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der B1-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen.** Für die Untersuchung der B1-Zellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD23, CD43, CD5 und CD19 analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von B1a- und B1b-Zellen bezogen auf die CD23<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau) sowie die absoluten Zellzahlen. Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der B1a- und B1b-Zellen von 12 Monate alten, männlichen Versuchstieren. (C) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils der B1b-Zellen, bezogen auf die CD23<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01.

Wie bereits ausgeführt, zeichnen sich die B-Zellen des Keimzentrums durch starke Proliferation, somatische Hypermuation und klonale Expansion aus. Durch Isotypen-Klassenwechsel können sie hochaffine Antikörper produzieren oder sich zu langlebigen Gedächtniszellen entwickeln. Der Fas (CD95) Rezeptor induziert nach Ligandenbindung (FasL) die Apoptose der betreffenden Zelle und spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in den peripheren lymphoiden Organen. CD95 wird stark auf aktivierten und Keimzentrums B-Zellen exprimiert (218,243), sodass er als Marker für diese Zellen herangezogen wurde. Ein ebenfalls weit verbreiteter Marker für Keimzentrums B-Zellen ist GL7 (244). Das Epitop von GL7 wurde als Neu5Ac (N-Acetylneuraminsäure) identifiziert, eine Sialinsäure, die Bestandteil der Glykokalyx ist und von CD22 erkannt wird (245). Die durchflusszytometrische Analyse der Keimzentrums B-Zellen weist auf eine geringe Frequenz sowohl in der WT- als auch in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz hin. Ein Trend zur Erhöhung war bei den Keimzentrums B-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz zu beobachten, wenn auch keine Signifikanz erreicht wurde. Ein vergleichbares Ergebnis wurden bei der Gesamtzellzahl beobachtet (Abb. 31)



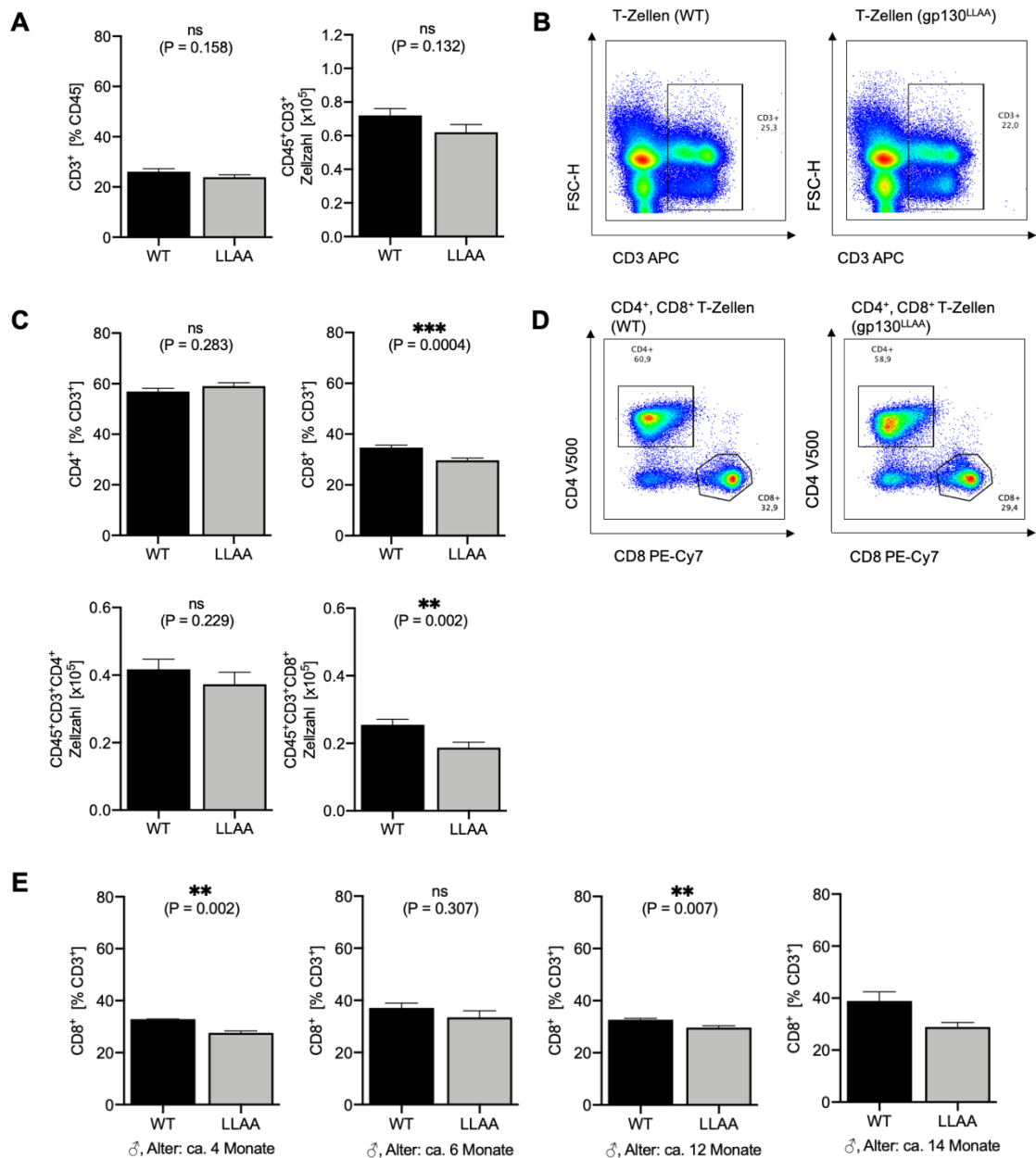
**Abbildung 31: Gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der Keimzentrums B-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen.** Für die Untersuchung der Keimzentrums B-Zellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD45, CD19, CD95 und GL7 analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Keimzentrums B-Zellen bezogen auf die CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau) sowie die absolute Zellzahl. Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). Die Signifikanzwerte wurden anhand des Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns, p > 0.05 (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung Keimzentrums B-Zellen von 4 Monate alten, männlichen Versuchstieren.

Auch für die CD138<sup>+</sup> Plasmazellen wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse ein niedriges Frequenzniveau in der WT und gp130<sup>LLAA</sup> Milz nachgewiesen. Ein leichter Anstieg der CD138<sup>+</sup> Plasmazellen wurde in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz festgestellt, der sich ebenfalls bei der Gesamtzellzahl zeigte (Abb. 32).



**Abbildung 32: Gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der Plasmazellen im Vergleich zu WT Mäusen.** Für die Untersuchung der Plasmazellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression des Oberflächenmarkers CD138 analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Plasmazellen bezogen auf die B220<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau) sowie die absolute Zellzahl. Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05. (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der Keimzentrums B-Zellen von 6 Monate alten, männlichen Versuchstieren.

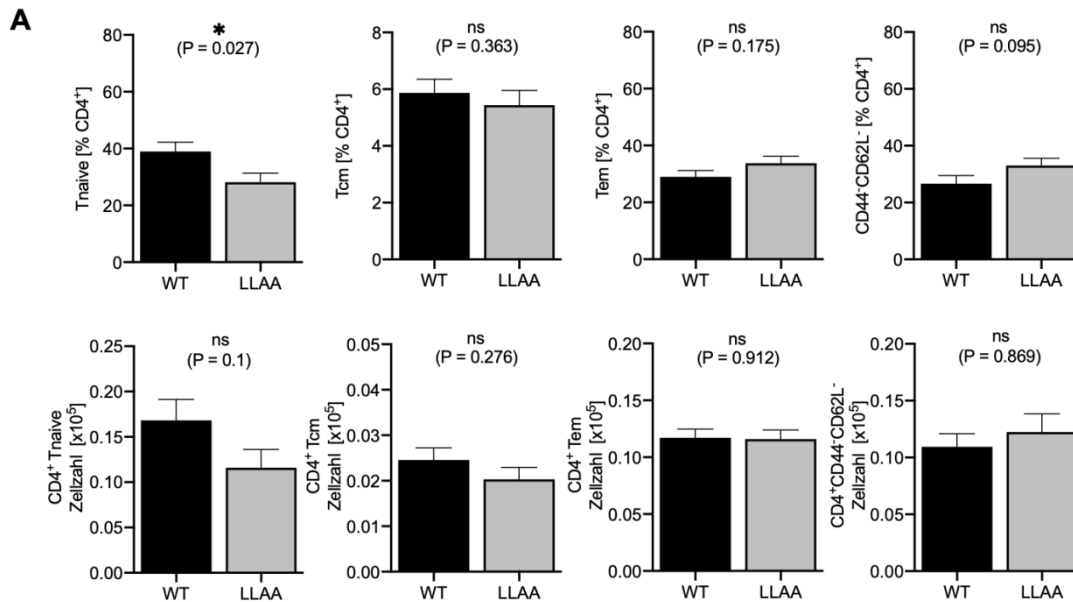
Weiterhin wurde in der Milz der gp130<sup>LLAA</sup> Maus eine Tendenz zur Frequenzabnahme der CD3<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet (Abb. 33A). Eine genauere Betrachtung zeigt, dass die Abnahme nicht gleichermaßen aus einem Rückgang der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen hervorging, sondern eher auf eine signifikante Verringerung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen war (Abb. 33C). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für die CD3<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Gesamtzellzahlen beobachtet. Die altersspezifische Analyse legt die Tendenz zur Frequenzabnahme in allen Untersuchungsgruppen dar und weist eine signifikante Reduktion der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz von 4 und 12 Monate alten Tieren gegenüber gleichaltrigen Kontrollmäusen nach (Abb. 33E). Im Gegensatz dazu wurde für die CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen, gemessen an dem Anteil der CD3<sup>+</sup> T-Zellen, eine leichter Frequenzanstieg beobachtet. Die absolute Zellzahl war jedoch auch verringert (Abb. 33C).

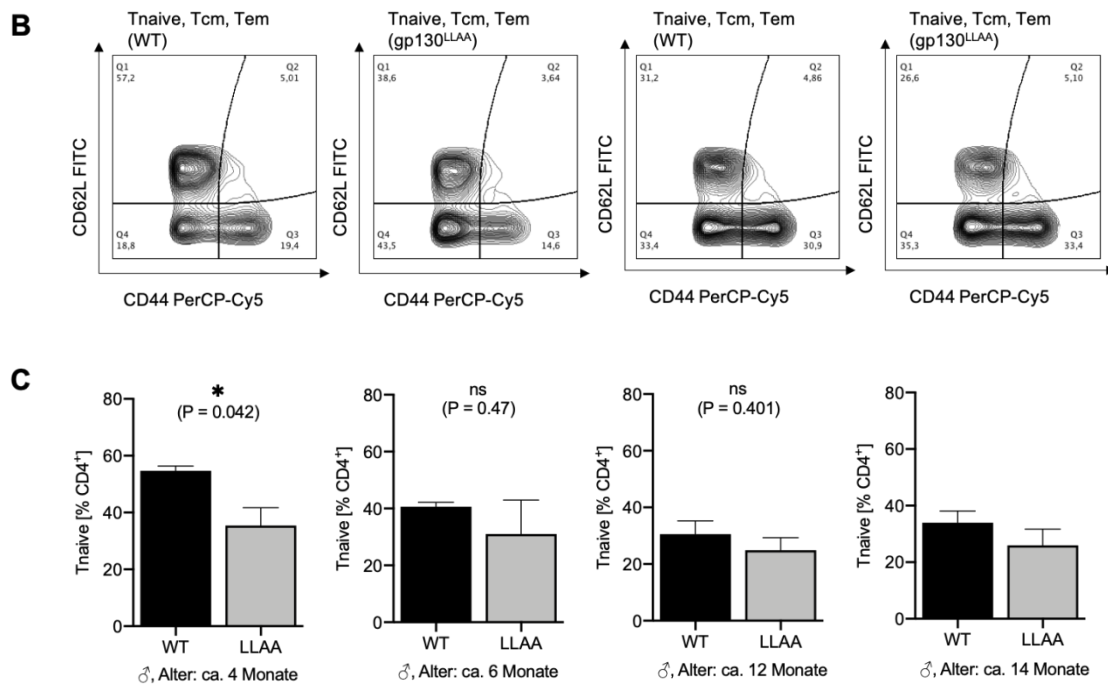


**Abbildung 33: Gp130<sup>LLAA</sup> Tiere zeigen Unterschiede in der Frequenz der T-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen.** Für die Untersuchung der T-Zellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD45, CD3, CD4 und CD8 analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD3<sup>+</sup> T-Zellen bezogen auf die CD45<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau). Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der CD3<sup>+</sup> T-Zellen von 12 Monate alten, männlichen Versuchstieren. (C) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen bezogen auf die CD3<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau) sowie die absoluten Zellzahlen. Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). (D) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von 12 Monate alten, männlichen Versuchstieren. (E) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bezogen auf die CD3<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen

(grau). Zu sehen sind die Mittelwerte  $\pm$ SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns,  $p > 0.05$ ; \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.001$ .

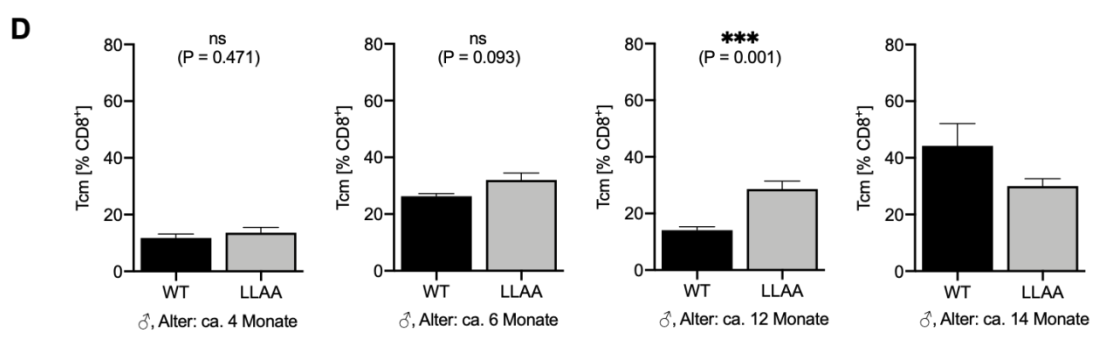
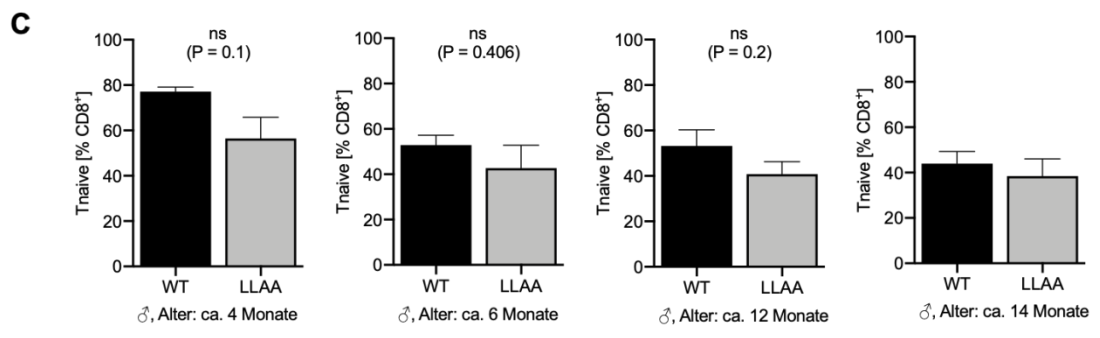
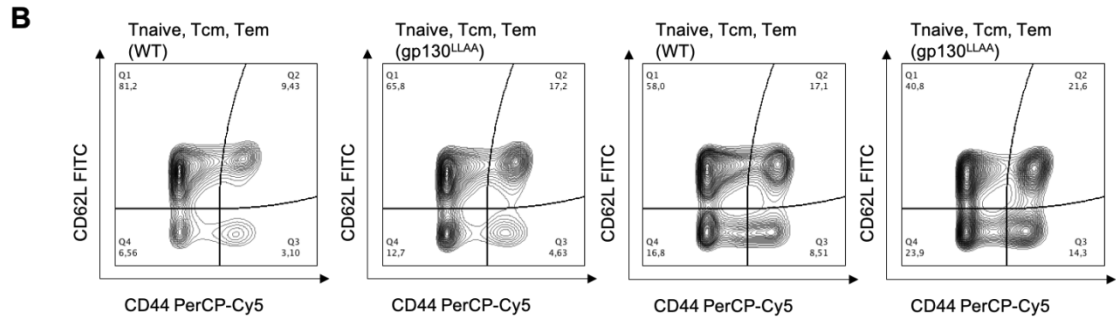
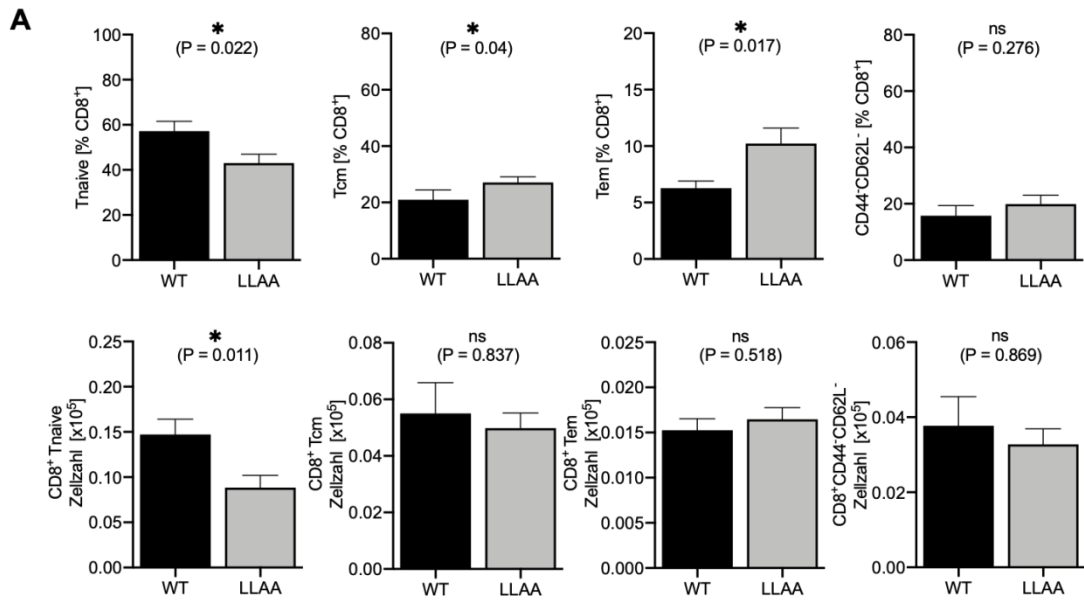
Für die Analyse der hier definierten T-Zellpopulationen wurden die Marker CD4, CD8, CD62L sowie CD44 herangezogen. In Abb. 34A ist zu erkennen, dass die Frequenz der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant verringert war. In Übereinstimmung mit diesem Befund wurde eine Frequenzabnahme in der altersspezifischen Analyse in allen Untersuchungsgruppen nachgewiesen. Eine signifikante Abnahme wurde nur in der Gruppe der 4 Monate alten Tiere beobachtet. Beim Vergleich der jüngsten Untersuchungsgruppe (4 Monate alt) mit der ältesten Untersuchungsgruppe (14 Monate alt) wurde weiterhin eine Abnahme der naiven CD4<sup>+</sup> Zellen in der WT- und gp130<sup>LLAA</sup> Milz beobachtet (Abb. 34C). Bei den CD4<sup>+</sup> T<sub>cm</sub>-Zellen wurde ein Trend zur Frequenzabnahme in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz festgestellt, wohingegen für die CD4<sup>+</sup> T<sub>em</sub>- und CD4<sup>+</sup>CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup>-Zellen ein Trend zum Frequenzanstieg nachgewiesen wurde. Vergleichbare Ergebnisse wurden bei den Gesamtzellzahlen beobachtet.

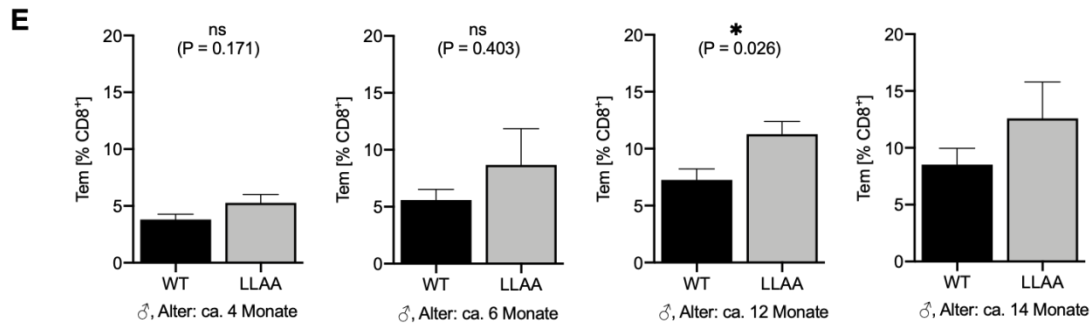




**Abbildung 34: Gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen Unterschiede in der Frequenz der (CD4<sup>+</sup>) T-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu WT Mäusen.** Für die Untersuchung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup> T<sub>naive</sub>, T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub> und CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T-Zellen bezogen auf die CD4<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau). Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der CD4<sup>+</sup> T<sub>naive</sub>, T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub> und CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T-Zellen von 4 Monate alten (1+2) und 12 Monate alten (3+4), männlichen Versuchstieren. (C) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD4<sup>+</sup> T<sub>naive</sub> bezogen auf die CD4<sup>+</sup> lebenden Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau). Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05.

Eine genauere Analyse der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigt, dass die Frequenz der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz der gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant verringert war. Im Gegensatz dazu wurde ein signifikanter Frequenzanstieg der T<sub>cm</sub>- und T<sub>em</sub>-Zellen nachgewiesen (Abb. 35A). Die altersspezifische Analyse bestätigt die Tendenz zur Frequenzabnahme der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz in allen Untersuchungsgruppen, wenn auch ohne Signifikanz (Abb. 35C). Ein signifikanter Anstieg der Frequenz der T<sub>cm</sub>- und T<sub>em</sub>-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz gegenüber der Kontrollgruppe wurde nur in der 12 Monate alten Untersuchungsgruppe nachgewiesen (Abb. 35 D+E).





**Abbildung 35: Gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der (CD8<sup>+</sup>) T-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu WT Tieren.** Für die Untersuchung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz wurden Zellsuspensionen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD44 und CD62L analysiert. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD8<sup>+</sup> T<sub>naive</sub>, T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub> und CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T-Zellen bezogen auf die CD8<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau). Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17) (B) Repräsentative FACS Analyse zur prozentualen Verteilung der CD8<sup>+</sup> T<sub>naive</sub>, T<sub>cm</sub>, T<sub>em</sub> und CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T-Zellen von 4 Monate alten (1+2) und 12 Monate alten (3+4), männlichen Versuchstieren. (C) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils von CD8<sup>+</sup> T<sub>naive</sub> bezogen auf die CD8<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau). (D) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils von CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> bezogen auf die CD4<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau). (E) Altersspezifische Analyse des prozentualen Anteils von CD8<sup>+</sup> T<sub>em</sub> bezogen auf die CD8<sup>+</sup> Einzelzellen von WT (schwarz) und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen (grau). Zu sehen sind die Mittelwerte +SEM (WT: n=13, gp130<sup>LLAA</sup>: n=17). Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte gp130 Expression die Homöostase der Lymphozyten in der Milz unterschiedlich beeinflusst. Die erhöhte gp130 Expression fördert die Expansion von B1-Zellen, T1-B-Zellen sowie B-Zellen der MZ und führt umgekehrt zu einer Abnahme der folliculären B-Zellen. Die Expansion von Keimzentrums B-Zellen und Plasmazellen wird durch die gp130<sup>LLAA</sup> Mutation gefördert, auch wenn sie ein insgesamt sehr niedriges Frequenzniveau in der Milz aufweisen. Weiterhin führt die erhöhte gp130 Oberflächenexpression zu einer Abnahme der CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Die Frequenz der naiven CD4<sup>+</sup> und der naiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen nimmt ab, wohingegen CD8<sup>+</sup> *central memory* und *effector memory* T-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz vermehrt auftreten.



## 4 Diskussion

### 4.1 Die gp130<sup>LLAA</sup> *knockin* Mauslinie zur Untersuchung der gp130 Endozytose

Die *Crosstalk*- (144) und Liganden- vermittelte Endozytose (142,143) des gp130 Rezeptors erfordert das Dileucin-Motiv (human: L<sub>786</sub>L<sub>787</sub>; murin: L<sub>784</sub>L<sub>785</sub>) in der zytoplasmatischen Domäne von gp130. Vorherige Studien mit Hepatozyten (144) und Monozyten (193) haben gezeigt, dass gp130 über einen p38/MK2-vermittelten Signalweg an Serin<sub>782</sub> phosphoryliert wird, wodurch vermutlich die Bindung des Adapterproteins 2 (AP2) an das Dileucin-Motiv von gp130 gefördert wird (111,141,246). Dieses Adapterprotein ist dafür bekannt, dass es an der Clathrin-vermittelten Endozytose beteiligt ist (247), sodass es folglich zu einer beschleunigten Internalisierung und Degradation des Rezeptors kommt (111). Sowohl Dittrich *et al.* (143) als auch Radtke *et al.* (144) konnten zeigen, dass eine Punktmutation des Dileucin-Motivs zu Dialanin die Endozytose von gp130 verhindert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde mittels einer *knockin*-Strategie eine neue Mauslinie generiert. Bei dieser wurde die für das beschriebene Dileucin-Motiv (L<sub>784</sub>L<sub>785</sub>) kodierende Basenfolge im *Il6st* Gen zu einer für ein Dialanin kodierenden verändert. Aus diesem Grund ist die Mauslinie vermutlich resistent gegenüber der Liganden- und *Crosstalk*- vermittelten Internalisierung, jedoch kann sie weiterhin durch die beschriebenen Regulationsmechanismen (Rekrutierung von SOCS1/SOCS3 oder SHP-2) beeinflusst werden (111).

### 4.2 Probleme bei der Immunfluoreszenzfärbung von CD3 und pSTAT3 in WT und gp130<sup>LLAA</sup> FFPE Milzgewebe

Mit den angewandten Auswertemethoden konnten bei den erfolgreich durchgeführten Färbungen mit Ki-67 und B220 keine Unterschiede zwischen murinem Milzgewebe von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Tieren festgestellt werden. Eventuell wäre es sinnvoll, automatisierte Auswerteprogramme einzusetzen und mehr Färbungen durchzuführen, da die Bilder sich bezüglich der Qualität sehr stark unterschieden. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Immunfluoreszenzfärbungen für CD3 und pStat3 in FFPE Milzgewebe durchgeführt. Trotz der Verwendung von unterschiedlichen *retrieval*-Lösungen (Citrat, EDTA) und Varianz bei der Dauer der hitzeinduzierten Demaskierung in Schnellkochtopf, Mikrowelle und Wasserbad führte keine Methode zur spezifischen Färbung der genannten Antigene auf FFPE Milzgewebe.

Die Ursache könnte möglicherweise darin liegen, dass einige Epitope den Prozess der Formalin-Gewebefixierung und Paraffineinbettung nicht ohne Vernetzung überstehen und aus diesem Grund nicht in FFPE Gewebe detektiert werden können. Zu diesen Fixierungs-sensitiven Epitopen gehören auch CD4, CD8 und CD19, die deshalb häufig auf gefrorenem Gewebe detektiert werden (248,249). Für den Erhalt solcher Epitope eignet sich ein Zink-basierter Fixierungspuffer mit einem pH-Wert von 6.5-7. Feng *et al.* haben gezeigt, dass die Fixierung von Milzgewebe mit Zink-basiertem Fixierungspuffer (ohne Demaskierungsschritt) zur verbesserten Detektion der CD3, CD4 und CD8 Epitope im Vergleich zur Formalin-Fixierung (mit hitzeinduzierter Demaskierung in der Mikrowelle und Citrat-*Retrieval*) führte (248,250). Um zu verifizieren, dass der IL-6/STAT3 Signalweg auch für die Immunzellen in der Milz eine Rolle spielt, wäre eine Immunfluoreszenzfärbung für pSTAT3 geeignet. Außerdem wäre es interessant gewesen zu untersuchen, ob sich die pSTAT3 Färbung in dem Milzgewebe der gp130<sup>LLAA</sup> und der WT Tiere unterscheidet. Shi *et al.* beschreiben eine Methode zur immunhistochemischen pSTAT3 Färbung in Formalin-fixiertem murinem Milzgewebe, bei der die Gewebeschnitte für 25 Min in einer Mikrowelle in 100mM Tris-5% Urea *retrieval*-Lösung mit einem pH-Wert von 9 erhitzt wurden (251). Vermutlich würde gefrorenes Milzgewebe die Detektion von pSTAT3 erleichtern (252).

#### 4.3 Die gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeichnen sich durch eine erhöhte gp130 Expression aus

Zunächst wurde untersucht, ob die *knockin* Mutation einen Einfluss auf die gp130 Expression der gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse hat. Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch die durchflusszytometrische Analyse von B- und T-Lymphozyten aus der Milz gezeigt, dass alle untersuchten Zellpopulationen von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen eine im Vergleich zu WT Mäusen verstärkte gp130 Expression aufwiesen. Auffallend war vor allem der Befund, dass sich die Zunahme der relativen gp130 Oberflächenexpression nicht nur zwischen den B- (20,5-fach) und T-Lymphozyten (5,1-fach) unterschied, sondern auch zwischen den untersuchten Subpopulationen (CD4<sup>+</sup> - 4,7-fach; T<sub>naive</sub> - 5-fach; T<sub>cm</sub> - 4,4-fach; T<sub>em</sub> - 5,9-fach; T<sup>CD44-CD62L-</sup> - 4,2-fach; CD8<sup>+</sup> - 3,4-fach; T<sub>naive</sub> - 4-fach; T<sub>cm</sub> - 2,3-fach; T<sub>em</sub> - 3,2-fach, T<sup>CD44-CD62L-</sup> - 4,9-fach; CD138<sup>+</sup> Plasmazellen - 14,3-fach). Dies könnte auf eine unterschiedliche Regulation auf Transkriptionsebene (mRNA Expression von *Il6st* (151)) oder auch auf Unterschiede des Rezeptor *trafficking* (Recycling, lysosomale Degradation) zurückzuführen sein (111). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wurde eine erhöhte relative gp130 Oberflächenexpression der CD3<sup>+</sup>,

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie der CD19<sup>+</sup> B-Zellen in der Milz der gp130<sup>LLAA</sup> bereits in der Arbeitsgruppe durch Sabine Hergovits an 8-12 Wochen alten Mäusen gezeigt.

Auch im Rahmen ihrer Untersuchungen zeigten die B-Zellen ein geringes gp130 Expressionsniveau.

Die T-Zellen weisen basal eine hohe gp130 Expression auf, sodass im Vergleich T-Zellen einer WT Maus absolut viel mehr gp130 exprimieren als B-Zellen einer gp130<sup>LLAA</sup> Maus. Die B-Zellen, mit Ausnahme der Plasmazellen, können damit effektiv nicht responsiv für das klassische IL-6 Signal sein, da die gp130 Fluoreszenz in den B-Zellen gegen null geht. Für WT B-Zellen kann eine IL-6 Responsivität vermutlich nur durch *trans-signaling* ausgelöst werden. Da IL-6 als Differenzierungsfaktor für B-Zellen gilt, war das niedrige gp130 Expressionsniveau auf den B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen ein unerwartetes Ergebnis. Interessant wäre zu untersuchen, ob auch auf B-Zellen in einem früheren Entwicklungsstadium bereits ein niedriges gp130 Expressionsniveau nachgewiesen werden kann. Es wurde davon ausgegangen, dass die MFI reflektiert, wie viel gp130 auf der Oberfläche der jeweiligen Zellen vorhanden ist. Eine mögliche Erklärung für die geringe gp130 Expression auf den B-Zellen wäre, dass Unterschiede in der Komposition der Rezeptorarchitektur gegenüber den Plasmazellen und T-Zellen dazu führen, dass möglicherweise der Zugang des Antikörpers zum Rezeptorkomplex erschwert wird. In den B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen der gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse konnten jedoch deutlich messbare gp130 Spiegel nachgewiesen werden.

#### **4.4 Präzisere Identifizierung von Plasmazellen erfordert möglicherweise eine neue Auswertungsstrategie**

Der effektiv höchste Anstieg der gp130 Expression wurde auf den B220<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> Plasmazellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz beobachtet. Da langlebige Plasmazellen in der Milz nur in geringer Anzahl vorhanden sind und sich hauptsächlich im Knochenmark befinden (253-255), wäre eine weiterführende Untersuchung von Knochenmark und peripherem Blut anstatt Milzgewebe denkbar, um zu untersuchen, ob sich der Effekt auch bei größerer Plasmazellpopulation bestätigt. Interessant wäre zu analysieren, ob eine erhöhte gp130 Expression auch schon auf Plasmazell-Vorläufern beobachtet werden kann. Plasmablasten weisen im Vergleich zu Plasmazellen eine höhere B220- und eine ähnliche CD138 Expression auf (211). Anhand dieser Auswertungsmethode, basierend auf nur zwei Oberflächenmarkern, können frühe, B220<sup>+</sup> proliferierende Plasmablasten von späten, B220<sup>-</sup> nicht proliferierenden Plasmazellen vermeintlich

unterschieden werden. Kallies *et. al* entwickelten ein Blimp1 (*B lymphocyte-induced maturation protein-1*; Transkriptionsfaktor):GFP (grünes fluoreszierendes Protein) Maus-Reportersystem, welches durch das- wenn auch unterschiedlich starke Vorkommen des GFP- in allen Antikörper-sezernierenden-Zellen *in vivo* und *in vitro* zeigt, dass die Reifung vom Plasmablast zur langlebigen Plasmazelle im Knochenmark auf einem Anstieg der Blimp-1 Expression basiert (256). Unter Verwendung dieses Blimp1:GFP Reportersystems zeigten Pracht *et. al* , dass die B220<sup>lo</sup>/CD138<sup>hi</sup> Plasmazellpopulation im Knochenmark einen erheblichen Anteil an Blimp1- negativen Zellen und damit Nicht-Plasmazellen beinhaltet (257). Aus diesem Grund ist eine durchflusszytometrische Identifizierung der Plasmazellen und eine Differenzierung zwischen Plasmablasten und Plasmazellen ausschließlich anhand der hier verwendeten Oberflächenmarker B220 und CD138 vermutlich nicht ausreichend. Um dieses Problem zu lösen, entwickelten Pracht *et al.* eine durchflusszytometrische Strategie zur Unterscheidung von drei Plasmazell-Differenzierungsstadien mithilfe der Oberflächenmarker CD138, B220, CD19 und TACI (*transmembrane activator and CAML interactor*) (Abb. 36). TACI ist ein Oberflächenrezeptor der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie und bindet die Liganden APRIL (*A proliferation-inducing ligand*) und BAFF (*B-cell activating factor*) (209,258). Unter Verwendung des Blimp1:GFP Reportersystems konnte gezeigt werden, dass 98% der TACI<sup>hi</sup>/CD138<sup>hi</sup> -Population in Milz und Knochenmark den Blimp1:GFP Reporter produzierten, weshalb dies eine Identifizierung von CD138<sup>hi</sup>/TACI<sup>hi</sup>/B220<sup>hi</sup> Plasmablasten und späteren CD138<sup>hi</sup>/TACI<sup>hi</sup>/B220<sup>lo</sup> Plasmazellen ermöglicht (257). Zusätzlich unterscheiden Pracht *et.al* drei verschiedene Plasmazell-Subpopulationen. Die erste Population P1 (CD138<sup>hi</sup>/TACI<sup>hi</sup>/B220<sup>int</sup>/CD19<sup>int</sup>) beinhaltet 60-70% Ki-67<sup>+</sup> proliferierende Zellen und gehört zu den Plasmablasten. Die zweite Fraktion P2 (CD138<sup>hi</sup>/TACI<sup>hi</sup>/B220<sup>lo</sup>/CD19<sup>int</sup>) beinhaltet deutlich weniger (9-29%) proliferierende Ki-67<sup>+</sup> Zellen. In der dritten Populationen P3 mit der höchsten Blimp1 Expression (CD138<sup>hi</sup>/TACI<sup>hi</sup>/B220<sup>lo</sup>/CD19<sup>lo</sup>) befinden sich kaum proliferierende Ki-67<sup>+</sup> Zellen, sodass diese Fraktion die nicht-proliferierenden, späten Plasmazellen enthält, die vorwiegend im Knochenmark angereichert sind (257).

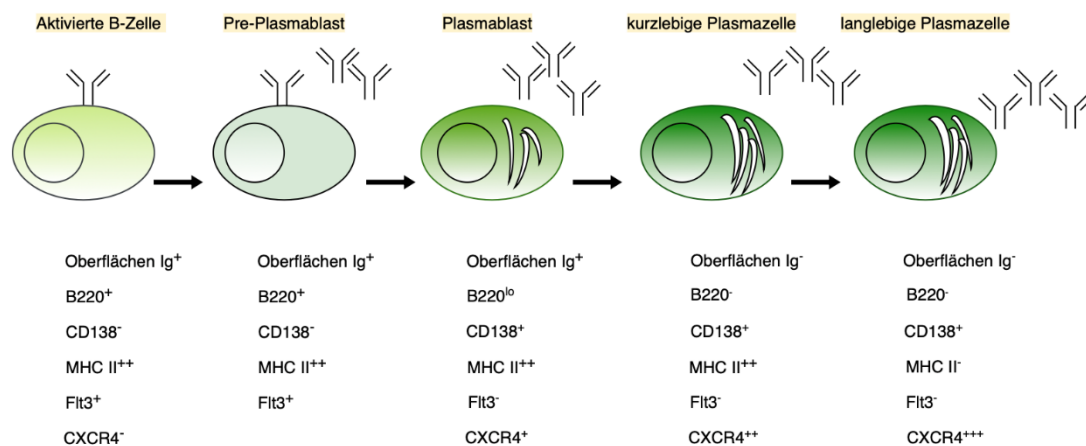
Organ	Fraction	CD138	TACI	B220	CD19	Blimp1	% Ki-67 <sup>hi</sup>	Subpopulation
Spleen (Sp)	P1	hi	hi	int	int	int	70	dividing plasmablast
	P2	hi	hi	low	int	int/hi	29	early PC
	P3	hi	hi	low	low	int/hi	8	mature resting PC
Bone Marrow (BM)	P1	hi	hi	int	int	int	60	dividing plasmablast
	P2	hi	hi	low	int	int/hi	9	early PC
	P3	hi	hi	low	low	hi	4	mature resting PC

hi, high; int, intermediate; neg, negative

**Abbildung 36: Ein von Pracht. et. al. entwickeltes Färbeprotokoll für die Erkennung muriner Antikörper-sezernierender Plasmablasten/Plasmazellen mittels Durchflusszytometrie.**

Zusammenfassung der Expression von den B-Zell-Markern CD19 (APC-Cy7) und B220 (PerCP-Cy5.5), dem Zellzyklus-Marker Ki-67 (APC) und des Plasmazell-Transkriptionsfaktors Blimp1 in den Subpopulationen P1, P2 und P3 in CD138<sup>hi</sup>/TACI<sup>hi</sup> (*Brilliant Violet 421/PE*) Zellen. Pracht et. al definieren reife Plasmazellen für dieses Färbeprotokoll als sich nicht teilende, Ig-sezernierende Zellen mit einer hohen Oberflächenexpression von CD138 und TACI, niedrige bis negative B220, und mittlere oder niedrig/negative CD19 Expression. Dargestellte Abb. Ausschnitt aus (257) Copyright Wiley-VCH GmbH. Reproduziert mit Erlaubnis.

Eine durchflusszytometrische Analyse von WT und gp130<sup>LAA</sup> Milzzellen anhand dieser Färbemethode unter zusätzlicher Verwendung des Oberflächenmarkers gp130 könnte eine eindeutigere Identifizierung der Plasmazellpopulationen ermöglichen und folglich präzisere Ergebnisse über die gp130 Expression auf diesen Zellen liefern. ASZ der murinen Milz werden auch durch CXCL12, den Liganden für CXCR4, angezogen (259). CXCL12 wird in der roten Milzpulpa, der Markschnur der Lymphknoten und im Knochenmarkstroma exprimiert. Eine chemotaktische Wirkung hat CXCL12 jedoch nur auf Plasmablasten, wohingegen Plasmazellen durch CXCL12 eine längere Überlebensdauer haben (88,260). Abb. 37 zeigt die Entwicklungsstadien von der aktivierten B-Zelle bis zur reifen Plasmazelle und führt weitere Oberflächenmarker wie CXCR4, MHCII und Flt3 auf, die zu einer besseren Plasmazell-Differenzierung herangezogen werden könnten (211,261,262).



**Abbildung 37: Expression von Oberflächenmarkern während der Plasmazell-Entwicklung.** Anhand der Oberflächenmarker B220, CD138, MHCII, Flt3 und CXCR4 können Zellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien der Plasmazell-Reifung identifiziert werden. Im Gegensatz zu Plasmazellen tragen B-Zellen „membranverankerte“ Antikörper, die B-Zellrezeptoren (BZR) auf ihrer Oberfläche. Im Laufe der Differenzierung vergrößert sich die B-Zelle und ihr Endoplasmatisches Retikulum expandiert. Abbildung modifiziert nach Oracki *et. al* (211). Mit freundlicher Genehmigung von „John Wiley and Sons“.

#### 4.5 Gp130<sup>LAA</sup> Plasmazellen reagieren möglicherweise sensitiver auf IL-6

Die Differenzierung naiver B-Zellen zu Plasmablasten und Plasmazellen ist essenziell für die Bildung protektiver Antikörper, die das Bekämpfen von Infektionen ermöglichen. Der IL-6/STAT3 Signalweg ist für die Differenzierung der Plasmazellen unerlässlich und fördert darüber hinaus auch das Überleben dieser Zellen (263,264). Die Rolle von IL-6 in diesem Zusammenhang wurde auch durch Untersuchungen von Brandt *et al.* und Suematsu *et al.* bestätigt, die durch zwei transgene Mausmodelle zeigten, dass eine Überproduktion von IL-6 zu Splenomegalie und Hypergammaglobulinämie führte (265,266). Dahingegen untersuchten Kopf *et al.* die Immunantwort IL-6 defizitärer Mäuse auf T-Zell abhängige Antigene und stellten fest, dass der Antigen-spezifische IgM Serumspiegel im Vergleich zu WT Kontrollmäusen unberührt blieb, wohingegen bei allen IgG Isotypen Veränderungen in unterschiedlichem Ausmaß auffielen (267). In transgenen Mäusen mit einer zytoplasmatisch verkürzten gp130 Form und folglich beeinträchtigtem gp130 Signal machten Kumanogoh *et al.* ähnliche Beobachtungen (268). Aufgrund der verstärkten gp130 Expression auf den hier definierten gp130<sup>LAA</sup> Plasmazellen kann man vermuten, dass diese Zellen möglicherweise sensitiver auf IL-6 reagieren und unter Entzündungsbedingungen gegebenenfalls größere Mengen

protektiver Antikörper zur schnellen und effektiven Beseitigung von Infektionen sezernieren können.

Im Falle von einer Antikörper-vermittelten Autoimmunerkrankung könnte eine erhöhte Sensitivität jedoch zu einer stärkeren Schädigung der Gewebe durch Autoantikörper führen. Demzufolge wäre es interessant, die Zusammensetzung der Ig Isotypen im Serum von WT und gp130<sup>LAA</sup> Mäusen zu bestimmen und zu vergleichen. Zur Identifizierung der verschiedenen Ig Isotypen (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA und IgM) könnte ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, die ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) – Methode, herangezogen werden. Hierbei werden die nachzuweisenden Antigene zunächst über einen Erstantikörper (*coat antibody*) an eine Mikrotiterplatte adsorptiv gebunden und angereichert. Im nächsten Schritt führt ein Detektionsantikörper, der an ein Enzym gekoppelt ist, zu einer Reaktion eines Farbstoffsubstrates, die als Nachweis für das Vorhandensein des Antigens dient. Als „Reporterenzym“ eignet sich beispielsweise die Meerrettichperoxidase (HRP, *horseradish peroxidase*). Mithilfe eines Photometers lässt sich die Signalstärke bestimmen, die wiederum Aufschluss über die Konzentration des untersuchten Antigens gibt. Die erhöhte gp130 Expression auf den hier definierten gp130<sup>LAA</sup> Plasmazellen könnte nicht nur Einfluss auf die Antikörpersekretionsrate haben, sondern auch auf das Überleben der gp130<sup>LAA</sup> Plasmazellen. Cassese *et al.* haben gezeigt, dass das Plasmazellüberleben von Faktoren und Signalen abhängig ist, die ihnen im Gewebe zur Verfügung gestellt werden. Eine Isolierung von Plasmazellen aus dem Gewebe und Versuche, sie *in vitro* zu kultivieren, führten zum Sterben der Plasmazellen, sodass man nicht von intrinsischer Langlebigkeit sprechen kann. Die Zugabe von IL-6 direkt nach der Plasmazell-Isolierung führte dazu, dass 70% der Plasmazellen bis zum dritten Tag in Kultur überlebten, wohingegen die spätere Zugabe von IL-6 keinen positiven Effekt mehr auf das Plasmazellüberleben hatte (88). Unterschiedliche Studien beschreiben zwar, dass IL-6 die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten verstärkt und das Wachstum maligner Plasmazellen fördert (269,270), jedoch wird dabei meistens nicht differenziert, ob IL-6 als Faktor das Überleben, die Proliferation oder die Differenzierung fördert. Cassese *et al.* konnten in ihren Experimenten zeigen, dass IL-6 als Überlebensfaktor für reife Plasmazellen dient, da die Aufrechterhaltung der Plasmazellzahl nicht auf der DNA Synthese beruht. Basierend auf diesen Ergebnissen analysierten Cassese *et al.* die Bedeutung von IL-6 für die Plasmazell-Homöostase *in vivo*. Sie stellten fest, dass in IL-6<sup>-/-</sup> Mäusen IL-6 zwar für eine normale Induktion, jedoch nicht zur Aufrechterhaltung der

Plasmazellantwort *in vivo* erforderlich ist. Romani *et al.* beobachteten in IL-6 defizitären Mäusen mit systemischer Candidose erhöhte Candida-spezifische IgG2a Antikörperspiegel im Vergleich zu IL-6 WT Kontrollmäusen (271).

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass IL-6 nicht essenziell für das Überleben von Plasmazellen *in vivo* zu sein scheint (88,272). Ergebnisse dieser Art schließen jedoch nicht aus, dass IL-6 eine bedeutende Rolle bei der Unterstützung des Überlebens und der Proliferation von Plasmablasten spielen könnte, die die Voraussetzung für die Entstehung der Plasmazellen bilden. Auch aus diesem Grund wäre eine nachfolgende Untersuchung der gp130 Expression auf gp130<sup>LLAA</sup> Plasmablasten sinnvoll. Eine alternative Methode, um zu überprüfen, ob gp130<sup>LLAA</sup> Plasmazellen sensitiver auf IL-6 reagieren, wäre, gp130<sup>LLAA</sup> und WT Plasmazell-Kulturen mit aufsteigender IL-6 Konzentration zu stimulieren und anschließend die STAT3 Tyrosinphosphorylierung (pY<sub>705</sub>) mittels Western Blot zu untersuchen. Eine quantitative Bestimmung der Y<sub>705</sub>-STAT3 Phosphorylierung könnte mittels densitometrischer Analyse erfolgen. Cassese *et al.* haben gezeigt, dass Untersuchungen an isolierten Plasmazellen für optimales Überleben der Zellen eine Stimulation mit einer Reihe von synergistisch wirkenden Faktoren erfordern, darunter auch IL-6 (88). Unklar ist, welche Auswirkungen eine sofortige IL-6 Stimulation nach der Plasmazell-Isolierung auf einen präzisen IL-6 Sensitivitätsvergleich zwischen WT und gp130<sup>LLAA</sup> Plasmazellen hätte. Um Plasmazellen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen weiterführend vergleichen zu können, wäre auch eine Analyse der Blimp-1 mRNA Spiegel mittels qRT-PCR (*quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction*) denkbar. Die vorliegenden Untersuchungen haben gezeigt, dass gp130<sup>LLAA</sup> Plasmazellen deutlich mehr gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da IL-6 zu gp130 nur eine geringe Affinität besitzt, bindet es zunächst an den IL-6R. Daraufhin erhöht sich die Affinität und es kommt zu einer Rekrutierung von gp130 an den bestehenden IL-6/IL-6R-Komplex (107).

Die Expression des bindenden IL-6R auf diesen Zellen müsste noch genauer untersucht werden (273). Eine geringere IL-6R Expression auf den gp130<sup>LLAA</sup> Plasmazellen hätte eine Limitation des IL-6 Signals zur Folge und könnte einen Kompensationseffekt für die verstärkte gp130 Expression darstellen. Wie sich die fehlende gp130 Endozytose auf die Dauer des IL-6 Signals der Plasmazellen auswirkt, müsste in Zukunft noch untersucht werden.



#### 4.6 Relevanz der gp130 Endozytose für die Homöostase lymphoider Zellen

IL-6 spielt generell eine wichtige Rolle bei der Entwicklung hämatopoetischer Zellen (274). In diesem Zusammenhang entstand auch die gp130<sup>F759</sup> *knockin* Mutation, bei der das murine *Il6st* Gen durch humane mutierte cDNA ersetzt wurde, sodass die Rekrutierung von SHP2/SOCS3 verhindert, das Ras/Raf/ERK Signal gestört und das STAT3 Signal verlängert wird.

Aus Untersuchungen mit gp130<sup>F759</sup> Mäusen war bekannt, dass ein gestörtes gp130/STAT3 Signal zu Splenomegalie und Lymphadenopathie führt. Darüber hinaus konnten Ohtani *et al.* in den vergrößerten lymphatischen Organen einen Anstieg von CD3<sup>+</sup> T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>), B-Zellen sowie myeloider Zellen feststellen (275). Entgegen dieser Beobachtungen wurden bei gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen keine signifikanten Veränderungen beim Gewicht der untersuchten Organe Milz, Leber, Niere und Herz nachgewiesen. Bei der durchflusszytometrischen Analyse von verschiedenen Immunzellpopulationen konnten allerdings Veränderungen bei der Zellzusammensetzung von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Tieren nachgewiesen werden. IL-6 spielt eine wichtige Rolle für das Überleben, die Expansion und die Differenzierung von B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen (185,276). Wider Erwarten konnte in der Milz von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen kein Trend zur Zunahme von CD19<sup>+</sup> B-Zellen nachgewiesen werden. CD19 wird sowohl auf naiven B-Zellen als auch auf differenzierten Plasmazellen exprimiert (277,278), sodass dieser Marker für die B-Zell-Identifizierung herangezogen werden kann. Der größte Anstieg der gp130 Expression wurde beim Vergleich von WT und gp130<sup>LLAA</sup> B220<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> B-Zellen nachgewiesen. Diese Beobachtung muss allerdings, wie bereits beschrieben, relativiert werden, da die gp130 Fluoreszenz auf diesen Zellen in WT Mäusen effektiv gegen null geht. Aus diesem Grund ist davon auszugehen, dass B-Zellen für das klassische IL-6 Signal nicht responsiv sind. Der größte effektive Anstieg der gp130 Expression wurde beim Vergleich von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen auf Plasmazellen festgestellt, deren Frequenz in der Milz von gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen einen Trend zum Anstieg zeigte. Diese Beobachtung müsste durch Untersuchungen an einem größeren Stichprobenumfang verifiziert werden. Interessant wäre zu überprüfen, ob ein verstärktes IL-6 Signal als Ursache in Frage käme, da die gesteigerte gp130 Expression auf den Plasmazellen der gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen zu einer erhöhten Responsivität und beschleunigter Differenzierung geführt haben könnte. Außerdem wurde eine signifikante Zunahme der T1-B-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz nachgewiesen, wohingegen die folliculären B-Zellen in der Milz dieser Tiere signifikant verringert waren. Auch bei den B1a- sowie B1b-

Zellen wurde ein Anstieg in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz nachgewiesen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die gp130 Expression und seine Regulation die Homöostase der verschiedenen B-Zellpopulationen auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen kann.

Aus diesem Grund wäre eine weiterführende Untersuchung der gp130- sowie IL-6R Expression auf den verschiedenen Reifungsstadien der B-Zellen sinnvoll.

Auch bei den CD45<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup>GL7<sup>+</sup>CD95<sup>+</sup> B-Zellen des Keimzentrums wurde in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz ein Frequenzanstieg nachgewiesen. Untersuchungen von Kopf *et al.* an IL-6 defizitären Mäusen haben gezeigt, dass die Keimzentrumsreaktionen auch unter diesen Bedingungen in Lymphknoten stattfinden können. Allerdings wurde mittels morphometrischer Analyse von immunhistochemischen Färbungen nachgewiesen, dass die Durchschnittsgröße der Keimzentren der IL-6 defizitären Mäuse deutlich kleiner war als jene der WT Kontrollmäuse. Eine weitere Beobachtung war, dass die *in vitro* Zugabe von IL-6 zu IL-6 defizitären Keimzentrumszellen sowohl die Proliferation der Keimzentrumszellen als auch die Antikörperproduktion förderte (267). Es ist bekannt, dass Keimzentrums B-Zellen IL-6 Rezeptoren exprimieren, aber im Gegensatz zu anderen B-Zellen kein IL-6 produzieren können. Der Wandel von der autokrinen (z.B naïve B-Zellen) zur parakrinen IL-6 Antwort der Keimzentrums B-Zellen könnte zur verbesserten Kontrolle des B-Zell Wachstums und der Differenzierung während der Keimzentrumsreaktion dienen (279). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass IL-6 direkt über IL-6R und gp130 auf die Keimzentrums B-Zellen wirkt. Für die Induktion von Keimzentren und die Regulierung der im Keimzentrum ablaufenden Reifungsprozesse sind die folliculären T-Helferzellen (T<sub>FH</sub>) spezialisiert (280,281). IL-6 gilt als starker Induktor der murinen T<sub>FH</sub> Differenzierung (282-284), sodass eine genauere Untersuchung der IL-6R und gp130 Expression von T<sub>FH</sub> Zellen in der WT und gp130<sup>LLAA</sup> Milz Aufschluss darüber geben könnte, ob diese Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz möglicherweise sensitiver auf das IL-6 Signal reagieren und damit indirekt die Differenzierung zu Keimzentrums B-Zellen fördern können.

IL-6 kann die Homöostase von T-Zellen sowohl direkt als auch indirekt beeinflussen. Hong *et al.* haben eine IL-6 transgene (IL-6<sup>T9</sup>) Mauslinie entwickelt, in der die Überexpression von IL-6 nicht zur B-Zell Hyperaktivierung und Plasmazytose führt, da diesen Mäusen die schwere Immunglobulinkette (IgH<sup>KO</sup>) fehlt und sie somit B-Zell defizitär sind (285). Ihre Untersuchungen zeigen, dass das IL-6 Signal die Expression von anti-apoptotischen Zielgenen (*Mcl1*) in T-Zellen induziert und die Expression von pro-metabolischen Zielgenen (*Pim1*, *Pim2*) in T-Zellen hochreguliert, wodurch das

Überleben der T-Zellen gefördert, ihre Zusammensetzung in den peripheren Organen aber nicht verändert wird (222,286). Die T-Zellen in den IgH<sup>KO</sup>IL6<sup>Tg</sup> Mäusen behalten nach einem IL-6 Signal den naiven Phänotyp bei und exprimieren keine Aktivierungs-/Gedächtnismarker, sodass der beobachtete Anstieg der T-Zellen eher auf das verbesserte Überleben der T-Zellen als auf die Expansion aktivierter T-Zellen zurückgeführt wurde (222).

Entgegen dieser Beobachtungen wurde in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz eine signifikant verringerte Frequenz der naiven T-Zellen (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>) und eine signifikant erhöhte Frequenz der CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> und T<sub>em</sub> Zellen nachgewiesen. Hong *et al.* gehen davon aus, dass die Immunpathologie transgener IL-6 Mäuse B-Zell-abhängig ist und eine IL-6 Überexpression keinen direkten stimulierenden Effekt auf die T-Zellen hat (222). Da IL-6 die Aktivierung von B- und T-Zellen induziert, ist es möglich, dass auch die veränderte Frequenz der naiven T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> und T<sub>em</sub> in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz nicht nur ein durch IL-6 und gp130 vermittelter Effekt auf die T-Zellen ist, sondern vielmehr auch durch B-Zell abhängige Faktoren ausgelöst wurde, die die T-Zell Aktivierung in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz fördern. In einer vorherigen Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe wurde festgestellt, dass die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen von gp130<sup>LLAA</sup> Tieren signifikant weniger IL-6R exprimierten als T-Zellen von WT Tieren (111). Es ist bekannt, dass die Aktivierung des TZR und Reifung von bestimmten Effektor-T-Zellen mit einem Verlust des IL-6R verbunden ist (111,212,221,287). Der Verlust der IL-6R Expression auf aktivierten T-Zellen könnte zur Folge haben, dass diese Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz eine erhöhte IL-6 Responsivität über das IL-6 *trans*-Signal erlangen. Diese Vermutung könnte dadurch gestützt werden, dass der größte Anstieg der relativen gp130 Oberflächenexpression im Vergleich zur WT Kontrolle innerhalb der untersuchten T-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz bei der CD4<sup>+</sup> T<sub>em</sub> Population nachgewiesen wurde. Nach den Beobachtungen von Jones *et al.* scheint sich das klassische IL-6 Signal über den membrangebundenen IL-6R auf die naiven T-Zellen und T<sub>cm</sub> Zellen zu beschränken (287). Unklar bleibt weiterhin, warum sich die Frequenz der naiven T-Zellen in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz verringert und die der CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> signifikant erhöht. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll zu untersuchen, ob sich das IL-6R Expressionsniveau auf diesen Zellen möglicherweise unterscheidet.

Weitere Studien deuten darauf hin, dass IL-6 einen supprimierenden Effekt auf die Differenzierung von CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T<sub>reg</sub> Zellen hat, eine Rolle bei der Generierung der TH<sub>17</sub> Zellen spielt (179) und außerdem die Produktion von IL-7, welches auch die naive CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation fördert, in nicht-hämatopoetischen Zellen induziert (288-290).

Park *et al.* zeigten, dass IL-6 die IL-7R Expression *in vitro* unterdrückt (291). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wiesen Hong *et al.* eine Herunterregulierung der IL-7R Expression durch IL-6 auch *in vivo* nach. Dies könnte einen wichtigen Mechanismus darstellen, um zu verhindern, dass Zellen, die auf ein IL-6 Signal reagieren können, ein redundantes überlebensförderndes Signal durch IL-7 erhalten. IL-7 könnte allerdings einen größeren anti-apoptotischen Effekt als IL-6 haben, da nur IL-7 die *Bcl2* mRNA Expression induziert (222).

Es besteht die Möglichkeit, dass die gp130 Überexpression auf den gp130<sup>LLAA</sup> naiven T-Zellen ebenfalls einen supprimierenden Effekt auf die IL-7R Expression hat und infolgedessen fehlende überlebensfördernde Signale, wie die Induktion der *Bcl-2* Expression, zu einer Frequenzabnahme der naiven T-Zellen führt (292).

Interessant ist jedoch, dass in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz die Frequenz der CD3<sup>+</sup> T-Zellen abnimmt. Bei genauerem Betrachten der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen ist die Abnahme auf die signifikante Verringerung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen. Dieser Befund lässt vermuten, dass sich eine fehlende gp130 Endozytose ungünstiger auf die Proliferation der CD8<sup>+</sup> T-Zellen als auf die der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt. Zudem könnte ein Zusammenhang zu der nachgewiesenen relativen gp130 Oberflächenexpression bestehen, die auf den CD4<sup>+</sup> T-Zellen deutlich höher als bei den CD8<sup>+</sup> T-Zellen der gp130<sup>LLAA</sup> Milz war. Bei der Analyse der untersuchten Subpopulationen hat es außerdem den Anschein, dass sich die fehlende gp130 Endozytose günstiger auf die Differenzierung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T<sub>cm</sub> und T<sub>em</sub> Zellen auswirkt als auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> naiven T-Zellen. Im Menschen gibt es eine interessante Mutante, bei der sowohl das gp130 Endozytosemotiv als auch alle vier STAT3-rekrutierenden Tyrosinreste fehlen. Bei der Analyse von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> naiven, *central memory* und *effector memory* T-Zellen wurden genau reziproke Ergebnisse erzielt (293). Aufgrund der Mutation kann gp130 keine STAT Signalwege aktivieren, was zu einem Anstieg der naiven T-Zellen führt. Wenn nur das Dileucin Motiv fehlt (gp130<sup>LLAA</sup>), scheint der Einfluss auf die Signalwege verstärkt zu sein, sodass die Frequenz der naiven T-Zellen sinkt und die der T<sub>cm</sub> und T<sub>em</sub> steigt.

Die hier nachgewiesenen Frequenzen von B-Zellen, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz wurden in ähnlichem Frequenzverhältnis zueinander auch in anderen Studien beobachtet (294,295).

Zusammengefasst legen diese Ergebnisse dar, dass eine fehlende gp130 Endozytose die Homöostase von B- und T-Zellpopulationen bereits in gesunden Tieren auf verschiedene Art und Weise und in unterschiedlichem Ausmaß beeinflussen kann. Es

sind jedoch weiterführende Experimente notwendig, um zu ergründen, welche der diskutierten Faktoren für die veränderte Zellzusammensetzung in der Milz der gp130<sup>LLAA</sup> Tiere verantwortlich sind. Die Untersuchungen sollten noch weitere Zellpopulationen einschließen, für deren Homöostase IL-6 und seine signaltransduzierende Rezeptoreinheit gp130 eine Rolle spielen (z.B. TH<sub>17</sub> Zellen). Zusätzlich zur Untersuchung der gp130 und IL-6R Rezeptorexpression auf den unterschiedlichen Immunzellen in der WT und gp130<sup>LLAA</sup> Maus wäre es sinnvoll zu analysieren, ob die Expressionsunterschiede auch veränderte IL-6 Signale für die Zellen zur Folge haben. Ein Untersuchungsindikator hierfür wäre die IL-6 induzierte STAT3 Phosphorylierung, die mithilfe intrazellulärer Färbung der Phosphoproteine und anschließender Durchflusszytometrie nachgewiesen werden könnte (296). Darüber hinaus ist zu klären, welche Relevanz die veränderte Zellzusammensetzung bei dem Verlauf einer IL-6 assoziierten Krankheit oder einer Infektion hat.

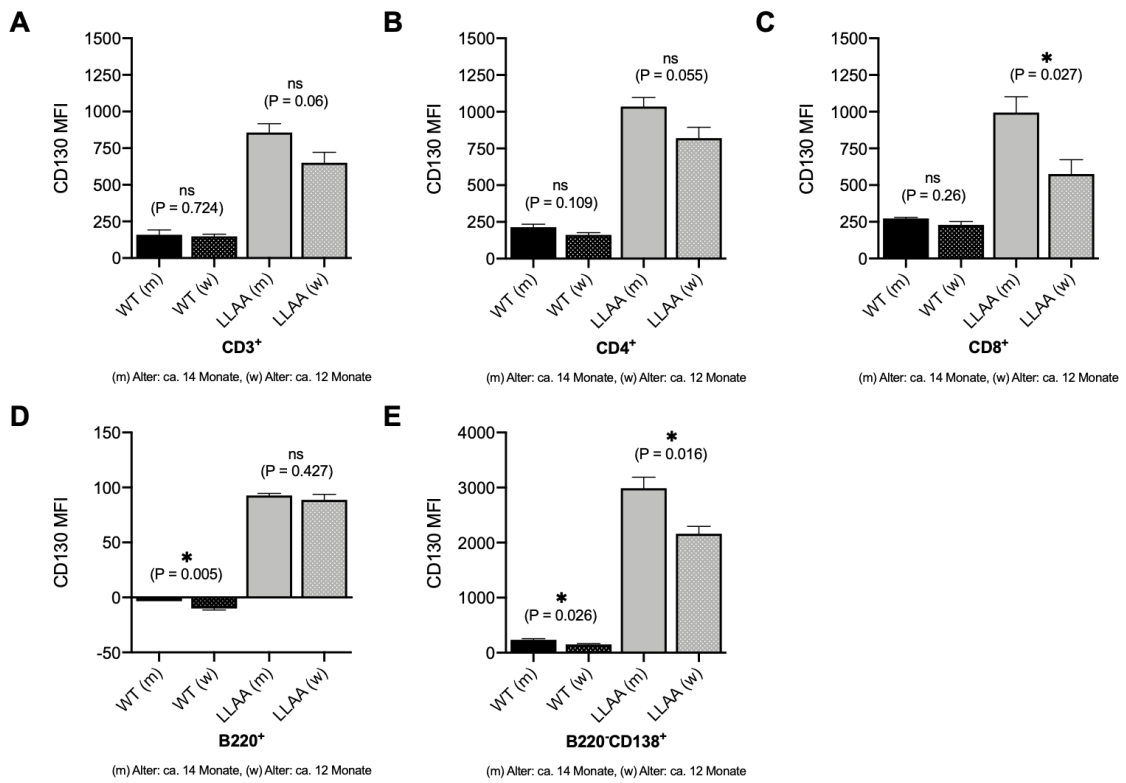
#### **4.7 Die Rolle des Geschlechts bei der gp130 Rezeptorexpression**

Abb. 38 (A-E) zeigt CD130 MFI Werte von unterschiedlichen Immunzellen in der WT- und gp130<sup>LLAA</sup> Milz. Beim Vergleich der CD130 MFI Werte zwischen männlichen/weiblichen WT Tieren und männlichen/weiblichen gp130<sup>LLAA</sup> Tieren ähnlichen Alters fällt auf, dass die gp130 Expression auf allen untersuchten Immunzellen der weiblichen gp130<sup>LLAA</sup> Milz deutlich niedriger war als auf vergleichbaren Immunzellen der männlichen gp130<sup>LLAA</sup> Milz. Einen Trend zu geringerer Expression gibt es bereits auf den Immunzellen der weiblichen WT Milz. Dieser könnte sich möglicherweise durch die Punktmutation verstärkt darstellen. Je nach Immunzellpopulation wurden unterschiedlich starke Geschlechtsunterschiede bei der gp130 Expression festgestellt. Signifikante Geschlechtsunterschiede der gp130 MFI wurden auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 40C), B220<sup>+</sup> (Abb. 40D) und auf B220<sup>-</sup>CD138<sup>+</sup> Plasmazellen (Abb. 40E) der gp130<sup>LLAA</sup> Milz nachgewiesen. Zhou *et al.* zeigten an Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC, *human umbilical vein endothelial cells*), dass Östrogen die gp130 Expression auf diesen Zellen herunterreguliert, indem es ADAM10 und ADAM17 durch den Östrogenrezeptor reguliert (297). Ob die höhere Östrogenkonzentration in den weiblichen Tieren zu einer verringerten gp130 Expression auf Immunzellen führt, ist unklar.

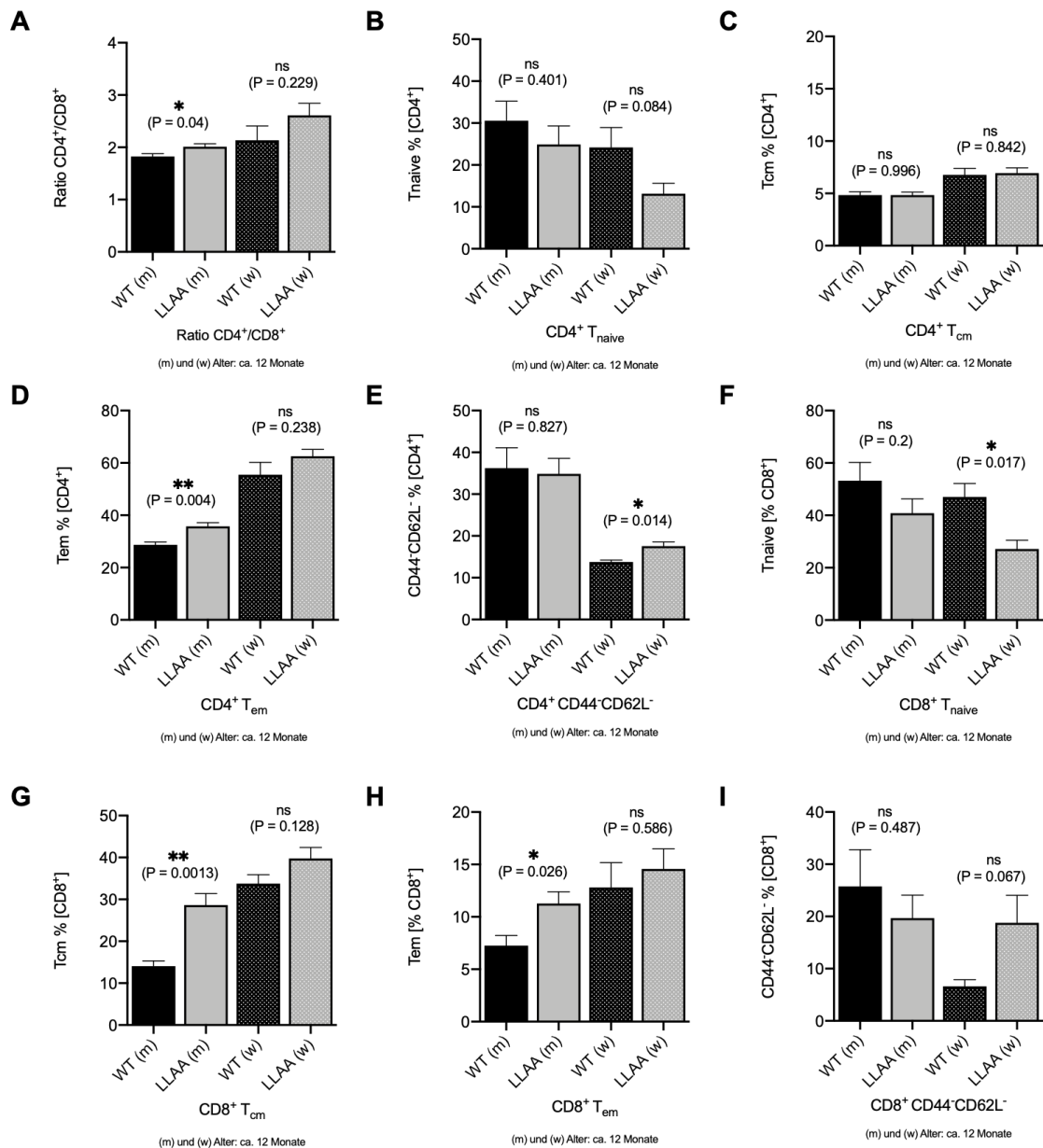
Vorläufige Daten bei der Analyse des CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Verhältnisses deuten darauf hin, dass sich die fehlende gp130 Endozytose auch in der Milz der weiblichen Tiere günstiger auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt (Abb. 39A). Bei der Analyse der untersuchten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulationen fiel auf, dass sowohl die weiblichen WT

als auch die weiblichen gp130<sup>LLAA</sup> Tiere eine geringere Frequenz der naiven T-Zellen (Abb. 39B) sowie der CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> Zellpopulation (Abb. 39E) aufwiesen, wohingegen die Frequenz der *central memory* (Abb. 39C) und *effector memory* (Abb. 39D) T-Zellen in der Milz der Weibchen beider Gruppen erhöht war. Für die CD8<sup>+</sup> naiven T-Zellen wurde in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz der weiblichen Tiere eine signifikante Verringerung im Vergleich zu der WT Milz festgestellt (Abb. 39F) und für die CD44<sup>-</sup>CD62L<sup>-</sup> Zellpopulation ein signifikanter Anstieg beobachtet (Abb. 39I). Obwohl sich das Frequenzniveau der einzelnen Zellpopulationen zwischen den weiblichen und männlichen Tieren unterschied, wurde beim Vergleich von weiblichen WT und gp130<sup>LLAA</sup> Tieren eine zu den männlichen Tieren vergleichbare Tendenz zur Frequenzabnahme/-zunahme von einigen der untersuchten T-Zell-Subpopulationen festgestellt (Abb. 39B,C,D,F,H).

Weiterführende Untersuchungen sind notwendig, um zu analysieren, ob die fehlende gp130 Endozytose zu geschlechtsspezifischen Unterschieden bei der Homöostase von B- und T-Zellen führt.



**Abbildung 38: Weibliche Tiere zeigen Unterschiede in der gp130 Expression auf Immunzellen der Milz im Vergleich zu männlichen Tieren.** Abgebildet sind die korrigierten CD130 MFI Werte auf verschiedenen Immunzellen der Milz. Vergleich der CD130 MFI Werte zwischen WT (m. u. w.) und gp130<sup>LLAA</sup> (m. u. w.). (A-E) WT (m) n=2, WT (w) n=4, gp130<sup>LLAA</sup> (m) n= 6, gp130<sup>LLAA</sup> (w) n= 4. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05.



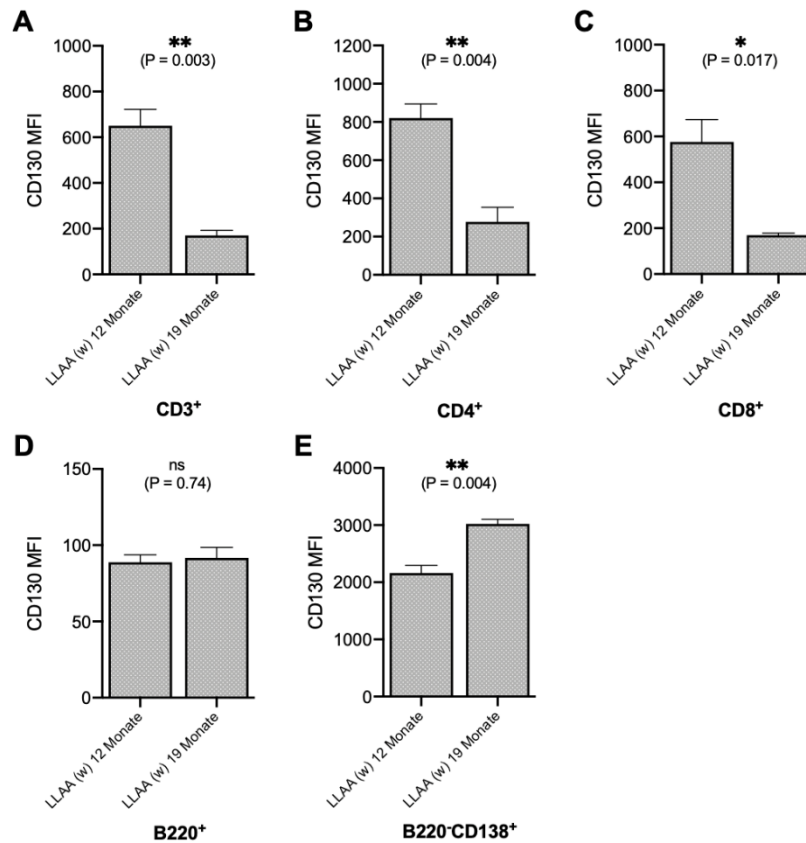
**Abbildung 39: Weibliche Tiere zeigen Unterschiede in der Frequenz von T-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu männlichen Tieren.** (A-I) WT (m) n=5, WT (w) n=4, gp130<sup>LLAA</sup> (m) n=5, gp130<sup>LLAA</sup> (w) n= 4. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests oder Mann-Whitney-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01.

Untersuchungen von Wang *et al.* haben gezeigt, dass die gp130 Expression auf T-Zellen der Milz von älteren Mäusen herunterreguliert wird. Da in diesen Tieren erhöhte IL-6 und sIL-6R Serumspiegel festgestellt wurden, könnte die Herunterregulierung der gp130 Expression eine Reaktion auf die kontinuierliche gp130 Aktivierung durch



erhöhte IL-6 Serumspiegel sein (214). Im Folgenden wurde untersucht, ob sich diese Beobachtung auch für die gp130<sup>LLAA</sup> Tiere bestätigt.

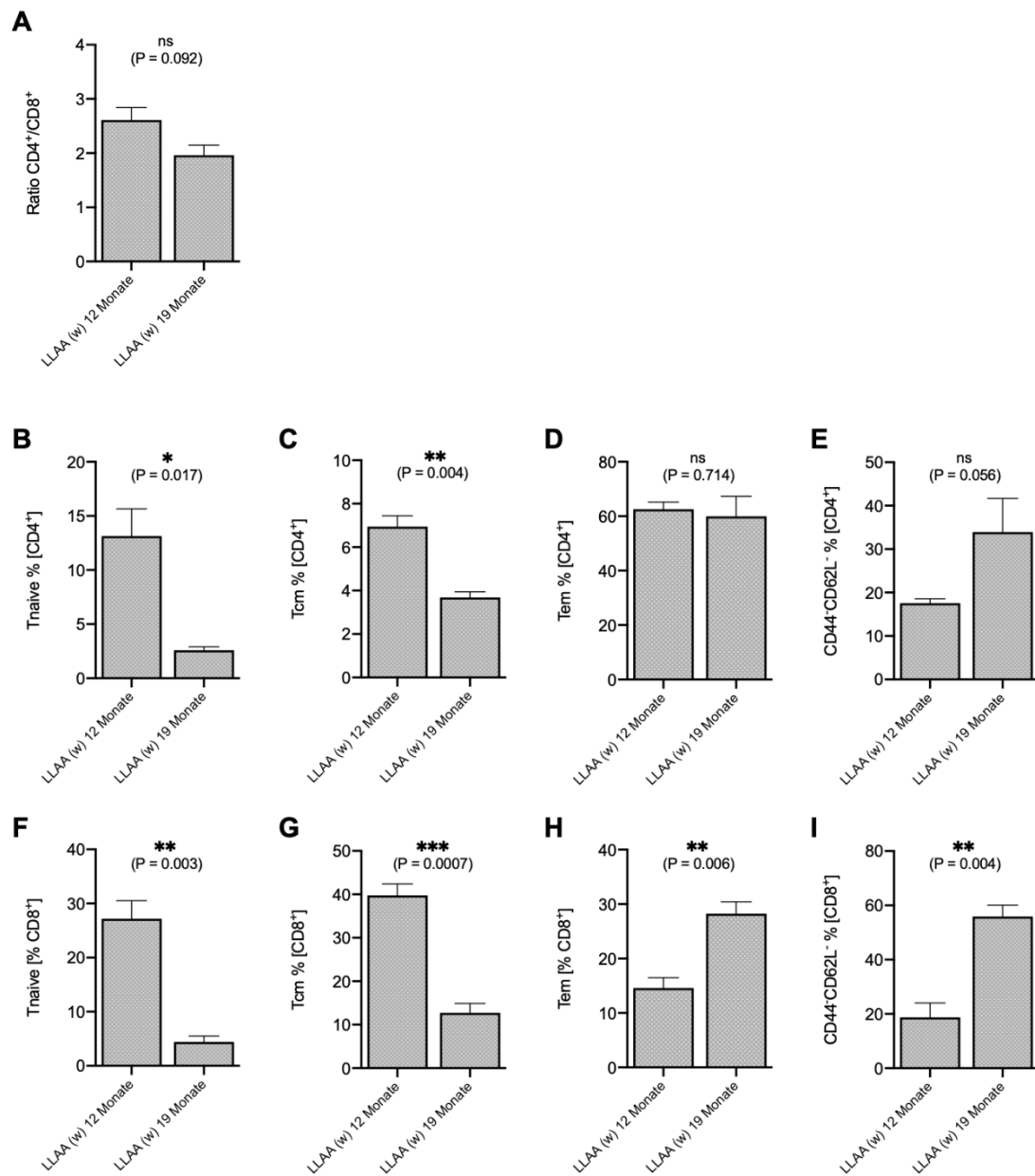
In Abb. 40A ist zu erkennen, dass die CD130 MFI auf den CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz der 19 Monate alten Tiere im Vergleich zu der auf den CD3<sup>+</sup> T-Zellen der 12 Monate alten Tiere signifikant verringert war. Für diese Reduktion ist wohl nicht die Endozytose verantwortlich, sondern es greifen Mechanismen, die auch in der gp130<sup>LLAA</sup> Maus erhalten sind. Bei der Analyse der CD130 MFI auf den CD4<sup>+</sup> (Abb. 40B) und CD8<sup>+</sup> (Abb. 40C) T-Zellen fällt auf, dass die Abnahme der CD130 MFI auf den CD4<sup>+</sup> Zellen in der Milz der 19 Monate alten Tiere stärker war als jene auf den CD8<sup>+</sup> Zellen. Interessanterweise wurde keine deutliche Veränderung der CD130 MFI beim Vergleich von B220<sup>+</sup> B-Zellen aus der Milz der 12 Monate alten und 19 Monate alten Tiere festgestellt (Abb. 40D). Entgegen der Erwartungen wurde auf B220<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup> Plasmazellen aus der Milz der älteren Mäuse ein signifikanter Anstieg der CD130 MFI im Vergleich zu den jüngeren Mäusen festgestellt. Weiterführende Untersuchungen mit einem größeren gp130<sup>LLAA</sup> Stichprobenumfang und dem Vergleich zwischen jüngeren und älteren WT Mäusen könnten zeigen, ob es sich hierbei um einen gp130<sup>LLAA</sup>-Effekt handelt.



**Abbildung 40: Ältere gp130<sup>LLAA</sup> Tiere zeigen gegenüber jüngeren gp130<sup>LLAA</sup> Tieren Veränderungen der CD130 MFI Werte auf verschiedenen Immunzellen der Milz.** (A-E) gp130<sup>LLAA</sup> (12 Monate) n= 5, gp130<sup>LLAA</sup> (19 Monate) n=3. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01.

Es ist bekannt, dass der Thymus junger Tiere jeden Tag eine große Anzahl naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen generiert, die die Mehrheit der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Peripherie bilden. Im Alter führt die Thymusinvolution zu einer reduzierten Generierung von naiven T-Zellen, sodass in der Peripherie eine Verschiebung entsteht, da der größte Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nun aus akkumulierten Gedächtniszellen besteht (298-300). Man könnte untersuchen, wie sich die fehlende gp130 Endozytose in den gp130<sup>LLAA</sup> Tieren auf die Homöostase der B- und T-Zellen von älteren Tieren im Vergleich zu der Homöostase von älteren WT Tieren auswirkt. Vorläufige Daten von T-Zellen aus der Milz von 12 Monate alten und 19 Monate alten weiblichen gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen ein kleineres CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> Verhältnis in der deutlich älteren Untersuchungsgruppe (Abb.43 A). Außerdem wurde eine signifikante Verringerung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> naiven T-Zellen in der Milz der 19 Monate alten Mäuse nachgewiesen (Abb.43 B+F). Die Frequenz der *central memory* T-Zellen war in der älteren Gruppe signifikant verringert (Abb.43 C+G),

wohingegen die Frequenz der CD8<sup>+</sup> *effector memory* T-Zellen einen signifikanten Anstieg zeigte (Abb. 43H). Die Frequenz der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> T-Zellpopulation war in der Milz der älteren Tiere deutlich erhöht (Abb. 43 E+I). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass sich die Zusammensetzung der T-Zellen auch in älteren gp130<sup>LLAA</sup> Tieren verändert. In älteren Mäusen wurde außerdem eine verringerte Antikörperantwort beobachtet, die im Zusammenhang mit reduzierter Keimzentrumsbildung, somatischer Hypermutation und Produktion von hochaffinen Antikörpern steht (301,302). Vorläufige Daten deuten darauf hin, dass die gp130 Expression auf den Plasmazellen der gp130<sup>LLAA</sup> Milz im Gegensatz zu der gp130 Expression auf T-Zellen im Alter zunimmt. Sollten die gp130<sup>LLAA</sup> Plasmazellen sensitiver auf IL-6 reagieren können, wäre es möglich, dass gp130<sup>LLAA</sup> Tiere deutlich mehr Ak produzieren können und damit zu einer verbesserten Immunantwort beitragen könnten. Unklar ist jedoch weiterhin, wie genau sich die fehlende gp130 Endozytose auf die Homöostase der B- und T-Zellen von älteren Tieren auswirkt, da zur Beantwortung dieser Frage weiterführende Untersuchungen an einem größeren Stichprobenumfang und Vergleiche zwischen älteren WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen notwendig wären.



**Abbildung 41: Ältere gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen gegenüber jüngeren gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen Unterschiede in der Frequenz der T-Zell-Subpopulationen in der Milz. (A-I) gp130<sup>LLAA</sup> (12 Monate) n=5, gp130<sup>LLAA</sup> (19 Monate) n= 3. Dargestellt sind die Mittelwerte + SEM. Die Signifikanzwerte wurden anhand des ungepaarten t-Tests bestimmt: ns, p > 0.05; \*, p ≤ 0.05; \*\*, p ≤ 0.01.**

#### **4.8 Ausblick**

Die vorliegende Arbeit hat einen ersten Überblick über die gp130 Expression auf verschiedenen Lymphozytenpopulationen in der Milz gegeben. Durchflusszytometrische Analysen von Zellsuspensionen aus der Milz von WT Mäusen und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen konnten zeigen, dass die internalisierungsdefiziente Mutante die Frequenz von B- und T-Zell-Subpopulationen unterschiedlich beeinflusst. Um der Frage nachzugehen, ob die gesteigerte gp130 Expression auf einigen Zellen möglicherweise zu einer erhöhten IL-6 Responsivität führt, sind weiterführende Untersuchungen notwendig, die neben der gp130 Expression auch das Expressionsniveau des IL-6R auf verschiedenen Immunzellen bestimmen sollten. Biochemische Analysen von Zelllysaten mittels Western Blot und weitere immunhistochemischen Färbungen von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Milzgewebe werden wichtige Informationen liefern, um die Rolle der gp130 Endozytose für die B- und T-Zell-Differenzierung genauer zu definieren. Die Detektion von STAT3/pSTAT3 wäre von besonderem Interesse, da der Transkriptionsfaktor über den IL-6/JAK/STAT Signalweg am Immunsystem beteiligt ist und bei der Differenzierung und Proliferation eine Rolle spielt. Darüber hinaus ist zu klären, welche Relevanz die beobachtete veränderte Zellzusammensetzung in der Milz der gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse bei dem Verlauf einer IL-6 assoziierten Krankheit oder einer Infektion hat.

## 5 Zusammenfassung

Die Interleukin-6-Typ Zytokine haben pleiotrope Eigenschaften und sind an vielen biologischen Prozessen beteiligt. IL-6 spielt eine wichtige Rolle bei der Initialisierung von Entzündungsreaktionen des Organismus und bei damit einhergehenden immunologischen Prozessen. Darüber hinaus beeinflusst IL-6 die Differenzierung und das Zellwachstum einer Vielzahl verschiedener Zelltypen. Alle IL-6-Typ Zytokine vermitteln ihre biologische Wirkung über einen multimeren Rezeptorkomplex, der aus mindestens einer Einheit des signaltransduzierenden Glykoproteins gp130 besteht. Für IL-6 weist der Rezeptor einen hexameren Aufbau auf, der aus je zwei Molekülen IL-6, des IL-6  $\alpha$ -Rezeptors (IL-6R) und des gp130 besteht. Die IL-6-Typ Zytokine vermitteln ihre Wirkung über die Induktion des JAK/STAT (Januskinase/*signal transducer and activator of transcription*), MAPK (mitogenaktivierte Proteinkinase) und PI3K/Akt (Phosphoinositid-3-Kinasen/*AKR thymoma oncogene homolog*) Signalwegs. Physiologische Regulationsmechanismen der Signalwege sind notwendig, um die Entstehung von chronischen Entzündungen und Tumorstadium durch kontinuierliche Aktivierung der Signalkaskaden zu verhindern. Tyrosinphosphatasen und Proteine der SOCS (*suppressors of cytokine signaling*) - Familie fungieren als inhibierende, klassische Rückkopplungsmechanismen. Neben diesen stellt auch die Rezeptorinternalisierung einen wichtigen Mechanismus dar, um das IL-6 Signal zu regulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die gp130 Expression auf verschiedenen Lymphozyten in der Milz untersucht und der Frage nachgegangen, wie sich die Mutation des gp130 Endozytosemotivs (Leucin<sub>784</sub>, Leucin<sub>785</sub> mutiert zu Dialanin; gp130<sup>LLAA</sup>) auf die Homöostase von B- und T-Zell-Subpopulationen auswirkt. Hierzu wurden Zellsuspensionen aus der Milz von WT und gp130<sup>LLAA</sup> Mäusen durchflusszytometrisch untersucht. In der gp130<sup>LLAA</sup> Untersuchungsgruppe wurde auf der Oberfläche von allen untersuchten Immunzellen der Milz mehr gp130 nachgewiesen. Zudem wurde in der gp130<sup>LLAA</sup> Milz bei den B-Zellen der marginalen Zone, *Transitional*-B-Zellen (Typ1), B1-Zellen, B-Zellen des Keimzentrums und Plasmazellen ein Anstieg der Frequenz nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde bei den folliculären B-Zellen eine Frequenzabnahme beobachtet. Außerdem wurde eine Abnahme in der Frequenz von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. Darüber hinaus wurde eine Frequenzabnahme bei den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> naiven T-Zellen beobachtet,

wohingegen CD8<sup>+</sup> *central memory* (T<sub>cm</sub>) und *effector memory* (T<sub>em</sub>) T-Zellen eine erhöhte Frequenz aufwiesen.

Unklar ist weiterhin, welche Relevanz die veränderte Zellzusammensetzung in der Milz der gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse bei einer Infektion hat und wie sich die erhöhte gp130 Expression auf den untersuchten Immunzellen der gp130<sup>LLAA</sup> Mäuse auf den Verlauf einer IL-6-assoziierten Krankheit auswirkt.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Soares, M. P., Teixeira, L., and Moita, L. F. (2017) Disease tolerance and immunity in host protection against infection. *Nature Reviews Immunology* **17**, 83-96
2. Leysen, S., Vanderkelen, L., Weeks, S. D., Michiels, C. W., and Strelkov, S. V. (2013) Structural basis of bacterial defense against g-type lysozyme-based innate immunity. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **70**, 1113-1122
3. Kouwaki, T., Fukushima, Y., Daito, T., Sanada, T., Yamamoto, N., Mifsud, E. J., Leong, C. R., Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Seya, T., and Oshiumi, H. (2016) Extracellular Vesicles Including Exosomes Regulate Innate Immune Responses to Hepatitis B Virus Infection. *Front Immunol* **7**, 335
4. Mortensen, S. A., Sander, B., Jensen, R. K., Pedersen, J. S., Golas, M. M., Jensenius, J. C., Hansen, A. G., Thiel, S., and Andersen, G. R. (2017) Structure and activation of C1, the complex initiating the classical pathway of the complement cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, 986-991
5. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015) Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature immunology* **16**, 343-353
6. Kelly, B., and O'Neill, L. A. (2015) Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity. *Cell research* **25**, 771-784
7. Aderem, A., and Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787
8. Mogensen, T. H. (2009) Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews* **22**, 240-273, Table of Contents
9. Picker, L. J. (1993) Regulation of tissue-selective T-lymphocyte homing receptors during the virgin to memory/effector cell transition in human secondary lymphoid tissues. *The American review of respiratory disease* **148**, S47-54
10. Carsetti, R. (2000) The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *The Journal of experimental medicine* **191**, 5-8
11. Mackay, C. R., Marston, W. L., and Dudler, L. (1990) Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *The Journal of experimental medicine* **171**, 801-817
12. Reth, M. (1992) Antigen receptors on B lymphocytes. *Annual review of immunology* **10**, 97-121
13. Hess, J., Laumen, H., Müller, K. B., and Wirth, T. (1998) Molecular genetics of the germinal center reaction. *Journal of cellular physiology* **177**, 525-534
14. Moura Rosa, P., Gopalakrishnan, N., Ibrahim, H., Haug, M., and Halaas, Ø. (2016) The intercell dynamics of T cells and dendritic cells in a lymph node-on-a-chip flow device. *Lab on a chip* **16**, 3728-3740
15. Krützmann, S. A.-C. (2002) *Die späten Phasen der B-Zell-Entwicklung des Menschen und die Beschreibung der zentralen Rolle der Milz in der Ausbildung und dem Erhalt des B-Zell-Gedächtnisses*, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
16. Parnes, J. R. (1989) Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Advances in immunology* **44**, 265-311
17. Kragten, N. A. M., Behr, F. M., Vieira Braga, F. A., Remmerswaal, E. B. M., Wesselink, T. H., Oja, A. E., Hombrink, P., Kallies, A., van Lier, R. A. W., Stark, R., and van Gisbergen, K. (2018) Blimp-1 induces and Hobit maintains the



- cytotoxic mediator granzyme B in CD8 T cells. *European journal of immunology* **48**, 1644-1662
18. König, R., Huang, L. Y., and Germain, R. N. (1992) MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8. *Nature* **356**, 796-798
  19. Reiner, S. L., Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2007) Division of labor with a workforce of one: challenges in specifying effector and memory T cell fate. *Science (New York, N.Y.)* **317**, 622-625
  20. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology* **136**, 2348
  21. Cortes-Selva, D., Ready, A., Gibbs, L., Rajwa, B., and Fairfax, K. C. (2019) IL-4 promotes stromal cell expansion and is critical for development of a type-2, but not a type 1 immune response. *European journal of immunology* **49**, 428-442
  22. Seder, R. A., and Paul, W. E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annual review of immunology* **12**, 635-673
  23. Bettelli, E., Korn, T., and Kuchroo, V. K. (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Current opinion in immunology* **19**, 652-657
  24. Coutaz, M., Hurrell, B. P., Auderset, F., Wang, H., Siegert, S., Eberl, G., Ho, P. C., Radtke, F., and Tacchini-Cottier, F. (2016) Notch regulates Th17 differentiation and controls trafficking of IL-17 and metabolic regulators within Th17 cells in a context-dependent manner. *Scientific reports* **6**, 39117
  25. Cruz, L. O., Hashemifar, S. S., Wu, C. J., Cho, S., Nguyen, D. T., Lin, L. L., Khan, A. A., and Lu, L. F. (2017) Excessive expression of miR-27 impairs Treg-mediated immunological tolerance. *The Journal of clinical investigation* **127**, 530-542
  26. Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nature immunology* **4**, 330-336
  27. MacNeal, W. J. (1929) The circulation of blood through the spleen pulp. *Arch. Pathol. (Chic)* **7**, 215-227
  28. Steiniger, B. S. (2015) Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology* **145**, 334-346
  29. Groom, A. C., Schmidt, E. E., and MacDonald, I. C. (1991) Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scanning microscopy* **5**, 159-173; discussion 173-154
  30. Drenckhahn, D., and Wagner, J. (1986) Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. *The Journal of cell biology* **102**, 1738-1747
  31. MacDonald, I. C., Ragan, D. M., Schmidt, E. E., and Groom, A. C. (1987) Kinetics of red blood cell passage through interendothelial slits into venous sinuses in rat spleen, analyzed by in vivo microscopy. *Microvascular research* **33**, 118-134
  32. Bratosin, D., Mazurier, J., Tissier, J. P., Estaquier, J., Huart, J. J., Ameisen, J. C., Aminoff, D., and Montreuil, J. (1998) Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. *Biochimie* **80**, 173-195
  33. Nieuwenhuis, P., and Ford, W. L. (1976) Comparative migration of B- and T-Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cellular immunology* **23**, 254-267

34. Vremec, D., and Shortman, K. (1997) Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **159**, 565-573
35. Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumppfeller, C., Yamazaki, S., Cheong, C., Liu, K., Lee, H. W., Park, C. G., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2007) Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (New York, N.Y.)* **315**, 107-111
36. Sancho, D., Joffre, O. P., Keller, A. M., Rogers, N. C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I., and Reis e Sousa, C. (2009) Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* **458**, 899-903
37. Ansel, K. M., Ngo, V. N., Hyman, P. L., Luther, S. A., Forster, R., Sedgwick, J. D., Browning, J. L., Lipp, M., and Cyster, J. G. (2000) A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature* **406**, 309-314
38. Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999) Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *The Journal of experimental medicine* **189**, 451-460
39. Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999) CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* **99**, 23-33
40. Cyster, J. G., and Goodnow, C. C. (1995) Pertussis toxin inhibits migration of B and T lymphocytes into splenic white pulp cords. *The Journal of experimental medicine* **182**, 581-586
41. Mebius, R. E., and Kraal, G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nature reviews. Immunology* **5**, 606-616
42. Elomaa, O., Kangas, M., Sahlberg, C., Tuukkanen, J., Sormunen, R., Liakka, A., Thesleff, I., Kraal, G., and Tryggvason, K. (1995) Cloning of a novel bacteria-binding receptor structurally related to scavenger receptors and expressed in a subset of macrophages. *Cell* **80**, 603-609
43. Munday, J., Floyd, H., and Crocker, P. R. (1999) Sialic acid binding receptors (siglecs) expressed by macrophages. *Journal of leukocyte biology* **66**, 705-711
44. Kang, Y. S., Yamazaki, S., Iyoda, T., Pack, M., Bruening, S. A., Kim, J. Y., Takahara, K., Inaba, K., Steinman, R. M., and Park, C. G. (2003) SIGN-R1, a novel C-type lectin expressed by marginal zone macrophages in spleen, mediates uptake of the polysaccharide dextran. *International immunology* **15**, 177-186
45. Yu, P., Wang, Y., Chin, R. K., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., Kosco-Vibois, M. H., Cyster, J., and Fu, Y. X. (2002) B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **168**, 5117-5123
46. Martin, F., and Kearney, J. F. (2002) Marginal-zone B cells. *Nature reviews. Immunology* **2**, 323-335
47. Cinamon, G., Matloubian, M., Lesneski, M. J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R. L., and Cyster, J. G. (2004) Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone. *Nature immunology* **5**, 713-720
48. Arnon, T. I., Horton, R. M., Grigorova, I. L., and Cyster, J. G. (2013) Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular B-cell egress. *Nature* **493**, 684-688
49. Arnon, T. I., Xu, Y., Lo, C., Pham, T., An, J., Coughlin, S., Dorn, G. W., and Cyster, J. G. (2011) GRK2-dependent S1PR1 desensitization is required for

- lymphocytes to overcome their attraction to blood. *Science (New York, N.Y.)* **333**, 1898-1903
50. Barral, P., Sanchez-Nino, M. D., van Rooijen, N., Cerundolo, V., and Batista, F. D. (2012) The location of splenic NKT cells favours their rapid activation by blood-borne antigen. *EMBO J* **31**, 2378-2390
  51. Gordon, S. (2002) Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927-930
  52. Koppel, E. A., Ludwig, I. S., Hernandez, M. S., Lowary, T. L., Gadikota, R. R., Tuzikov, A. B., Vandenbroucke-Grauls, C. M., van Kooyk, Y., Appelmelk, B. J., and Geijtenbeek, T. B. (2004) Identification of the mycobacterial carbohydrate structure that binds the C-type lectins DC-SIGN, L-SIGN and SIGNR1. *Immunobiology* **209**, 117-127
  53. Kang, Y. S., Kim, J. Y., Bruening, S. A., Pack, M., Charalambous, A., Pritsker, A., Moran, T. M., Loeffler, J. M., Steinman, R. M., and Park, C. G. (2004) The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 215-220
  54. Lanoue, A., Clatworthy, M. R., Smith, P., Green, S., Townsend, M. J., Jolin, H. E., Smith, K. G., Fallon, P. G., and McKenzie, A. N. (2004) SIGN-R1 contributes to protection against lethal pneumococcal infection in mice. *The Journal of experimental medicine* **200**, 1383-1393
  55. Balázs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002) Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* **17**, 341-352
  56. Lopes-Carvalho, T., and Kearney, J. F. (2004) Development and selection of marginal zone B cells. *Immunological reviews* **197**, 192-205
  57. Attanavanich, K., and Kearney, J. F. (2004) Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **172**, 803-811
  58. Nolte, M. A., Hoen, E. N., van Stijn, A., Kraal, G., and Mebius, R. E. (2000) Isolation of the intact white pulp. Quantitative and qualitative analysis of the cellular composition of the splenic compartments. *European journal of immunology* **30**, 626-634
  59. Hart, D. N. (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* **90**, 3245-3287
  60. Chesnut, R. W., and Grey, H. M. (1981) Studies on the capacity of B cells to serve as antigen-presenting cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **126**, 1075-1079
  61. Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. (1994) How B and T cells talk to each other. *Nature* **367**, 425-428
  62. Lanzavecchia, A. (1990) Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Annual review of immunology* **8**, 773-793
  63. Hiramane, C., and Hojo, K. (1980) Augmentation of guinea pig T lymphocyte proliferative response to antigens in the presence of purified B cells. *International archives of allergy and applied immunology* **61**, 329-336
  64. Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G., and Cyster, J. G. (1999) In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *The Journal of experimental medicine* **190**, 1123-1134

65. Reif, K., Ekland, E. H., Ohl, L., Nakano, H., Lipp, M., Forster, R., and Cyster, J. G. (2002) Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94-99
66. Liu, Y. J., Johnson, G. D., Gordon, J., and MacLennan, I. C. (1992) Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunology today* **13**, 17-21
67. Parker, D. C. (1991) Cytokines and B lymphocytes: Edited by R. E. Callard. San Diego: Academic Press. (1990). 374 pp. \$57.00. *Cell* **67**, 649-650
68. Parker, D. C. (1993) T cell-dependent B cell activation. *Annual review of immunology* **11**, 331-360
69. Armitage, R. J., Fanslow, W. C., Strockbine, L., Sato, T. A., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Anderson, D. M., Gimpel, S. D., Davis-Smith, T., Maliszewski, C. R., and et al. (1992) Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357**, 80-82
70. Hollenbaugh, D., Grosmaire, L. S., Kullas, C. D., Chalupny, N. J., Braesch-Andersen, S., Noelle, R. J., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A., and Aruffo, A. (1992) The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of a soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J* **11**, 4313-4321
71. Clark, E. A., and Ledbetter, J. A. (1986) Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 4494-4498
72. Liu, Y. J., Joshua, D. E., Williams, G. T., Smith, C. A., Gordon, J., and MacLennan, I. C. (1989) Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* **342**, 929-931
73. Jabara, H. H., Fu, S. M., Geha, R. S., and Vercelli, D. (1990) CD40 and IgE: synergism between anti-CD40 monoclonal antibody and interleukin 4 in the induction of IgE synthesis by highly purified human B cells. *The Journal of experimental medicine* **172**, 1861-1864
74. Ho, F., Lortan, J. E., MacLennan, I. C., and Khan, M. (1986) Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations. *European journal of immunology* **16**, 1297-1301
75. Gray, D. (1988) Recruitment of virgin B cells into an immune response is restricted to activation outside lymphoid follicles. *Immunology* **65**, 73-79
76. Jacob, J., Kassir, R., and Kelsoe, G. (1991) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. I. The architecture and dynamics of responding cell populations. *The Journal of experimental medicine* **173**, 1165-1175
77. Smith, K. G., Hewitson, T. D., Nossal, G. J., and Tarlinton, D. M. (1996) The phenotype and fate of the antibody-forming cells of the splenic foci. *European journal of immunology* **26**, 444-448
78. Jacob, J., and Kelsoe, G. (1992) In situ studies of the primary immune response to (4-hydroxy-3-nitrophenyl)acetyl. II. A common clonal origin for periarteriolar lymphoid sheath-associated foci and germinal centers. *The Journal of experimental medicine* **176**, 679-687
79. Kroese, F. G., Wubbena, A. S., Seijen, H. G., and Nieuwenhuis, P. (1987) Germinal centers develop oligoclonally. *European journal of immunology* **17**, 1069-1072
80. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K., and Weiss, U. (1991) Intracлонаl generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**, 389-392
81. Kallberg, E., Gray, D., and Leanderson, T. (1993) Analysis of somatic mutation activity in multiple V kappa genes involved in the response to 2-phenyl-5-oxazolone. *International immunology* **5**, 573-581

82. Kosco-Vilbois, M. H., Bonnefoy, J. Y., and Chvatchko, Y. (1997) The physiology of murine germinal center reactions. *Immunological reviews* **156**, 127-136
83. Kosco, M. H., Szakal, A. K., and Tew, J. G. (1988) In vivo obtained antigen presented by germinal center B cells to T cells in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **140**, 354-360
84. Tew, J. G., DiLosa, R. M., Burton, G. F., Kosco, M. H., Kupp, L. I., Masuda, A., and Szakal, A. K. (1992) Germinal centers and antibody production in bone marrow. *Immunological reviews* **126**, 99-112
85. Benner, R., Hijmans, W., and Haaijman, J. J. (1981) The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clinical and experimental immunology* **46**, 1-8
86. Klaus, G. G., Humphrey, J. H., Kunkl, A., and Dongworth, D. W. (1980) The follicular dendritic cell: its role in antigen presentation in the generation of immunological memory. *Immunological reviews* **53**, 3-28
87. Coico, R. F., Bhogal, B. S., and Thorbecke, G. J. (1983) Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. VI. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **131**, 2254-2257
88. Cassese, G., Arce, S., Hauser, A. E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., and Manz, R. A. (2003) Plasma Cell Survival Is Mediated by Synergistic Effects of Cytokines and Adhesion-Dependent Signals. *The Journal of Immunology* **171**, 1684
89. Steiniger, B. S. (2015) Human spleen microanatomy: why mice do not suffice. *Immunology* **145**, 334-346
90. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* **334 ( Pt 2)**, 297-314
91. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F., and Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* **334 ( Pt 2)**, 297-314
92. Bazan, J. F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 6934-6938
93. Devergne, O., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1997) 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* **94**, 12041-12046
94. Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D., and Kastelein, R. A. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4+ T cells. *Immunity* **16**, 779-790
95. Collison, L. W., Delgoffe, G. M., Guy, C. S., Vignali, K. M., Chaturvedi, V., Fairweather, D., Satoskar, A. R., Garcia, K. C., Hunter, C. A., Drake, C. G., Murray, P. J., and Vignali, D. A. (2012) The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional. *Nature immunology* **13**, 290-299
96. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal* **374**, 1-20
97. Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1993) IL-6-induced

- homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science (New York, N.Y.)* **260**, 1808-1810
98. Hilton, D. J., Hilton, A. A., Raicevic, A., Rakar, S., Harrison-Smith, M., Gough, N. M., Begley, C. G., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Willson, T. A. (1994) Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J* **13**, 4765-4775
  99. Davis, S., Aldrich, T. H., Valenzuela, D. M., Wong, V. V., Furth, M. E., Squinto, S. P., and Yancopoulos, G. D. (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science (New York, N.Y.)* **253**, 59-63
  100. Vlotides, G., Zitzmann, K., Stalla, G. K., and Auernhammer, C. J. (2004) 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* **15**, 325-336
  101. Hilton, D. J., and Nicola, N. A. (1992) Kinetic analyses of the binding of leukemia inhibitory factor to receptor on cells and membranes and in detergent solution. *The Journal of biological chemistry* **267**, 10238-10247
  102. Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S., and Cosman, D. (1996) Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *The Journal of biological chemistry* **271**, 32635-32643
  103. Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., and et al. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science (New York, N.Y.)* **255**, 1434-1437
  104. Taga, T., Kawanishi, Y., Hardy, R. R., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1987) Receptors for B cell stimulatory factor 2. Quantitation, specificity, distribution, and regulation of their expression. *The Journal of experimental medicine* **166**, 967-981
  105. Wolf, J., Rose-John, S., and Garbers, C. (2014) Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine* **70**, 11-20
  106. Rose-John, S. (2012) IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences* **8**, 1237-1247
  107. Ward, L. D., Howlett, G. J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R. L., and Simpson, R. J. (1994) 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* **269**, 23286-23289
  108. Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988) Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science (New York, N.Y.)* **241**, 825-828
  109. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149-1157
  110. Thiem, S., Pierce, T. P., Palmieri, M., Putoczki, T. L., Buchert, M., Preaudet, A., Farid, R. O., Love, C., Catimel, B., Lei, Z., Rozen, S., Gopalakrishnan, V., Schaper, F., Hallek, M., Boussioutas, A., Tan, P., Jarnicki, A., and Ernst, M. (2013) mTORC1 inhibition restricts inflammation-associated gastrointestinal tumorigenesis in mice. *The Journal of clinical investigation* **123**, 767-781
  111. Hergovits, S. (2017) *Relevanz der gp130 Endozytose bei der Maturierung und Differenzierung dendritischer Zellen sowie Charakterisierung des molekularen*

- Mechanismus der OSM-vermittelten Induktion antiviraler Gene*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
112. Rose-John, S., and Heinrich, P. C. (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *The Biochemical journal* **300** ( Pt 2), 281-290
  113. Mullberg, J., Althoff, K., Jostock, T., and Rose-John, S. (2000) The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *European cytokine network* **11**, 27-38
  114. Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1992) Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **149**, 2021-2027
  115. Rose-John, S. (2003) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors. *Acta biochimica Polonica* **50**, 603-611
  116. Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Muller-Newen, G., Grotzinger, J., Rose-John, S., and Scheller, J. (2012) Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. *Cytokine & growth factor reviews* **23**, 85-97
  117. Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. F., and Rose-John, S. (2001) Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *European journal of biochemistry* **268**, 160-167
  118. Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993) The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European journal of immunology* **23**, 473-480
  119. Lust, J. A., Donovan, K. A., Kline, M. P., Greipp, P. R., Kyle, R. A., and Maihle, N. J. (1992) Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**, 96-100
  120. Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., and Rose-John, S. (2011) ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends in immunology* **32**, 380-387
  121. Chung, S. J., Kwon, Y. J., Park, M. C., Park, Y. B., and Lee, S. K. (2011) The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients. *Yonsei medical journal* **52**, 113-120
  122. Ridker, P. M., Rifai, N., Stampfer, M. J., and Hennekens, C. H. (2000) Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. *Circulation* **101**, 1767-1772
  123. Bellone, S., Watts, K., Cane, S., Palmieri, M., Cannon, M. J., Burnett, A., Roman, J. J., Pecorelli, S., and Santin, A. D. (2005) 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. *Gynecologic oncology* **98**, 92-98
  124. Leu, C. M., Wong, F. H., Chang, C., Huang, S. F., and Hu, C. P. (2003) Interleukin-6 acts as an antiapoptotic factor in human esophageal carcinoma cells through the activation of both STAT3 and mitogen-activated protein kinase pathways. *Oncogene* **22**, 7809-7818
  125. Narazaki, M., Tanaka, T., and Kishimoto, T. (2017) The role and therapeutic targeting of IL-6 in rheumatoid arthritis. *Expert Review of Clinical Immunology* **13**, 535-551
  126. Krebs, D. L., and Hilton, D. J. (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **19**, 378-387
  127. Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., and Hilton, D. J.

- (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-921
128. Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007) SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nature Reviews Immunology* **7**, 454-465
  129. Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Baca, M. (2000) 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* **97**, 6493-6498
  130. Nicholson, S. E., Willson, T. A., Farley, A., Starr, R., Zhang, J. G., Baca, M., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J., and Nicola, N. A. (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J* **18**, 375-385
  131. Kershaw, N. J., Laktyushin, A., Nicola, N. A., and Babon, J. J. (2014) Reconstruction of an active SOCS3-based E3 ubiquitin ligase complex in vitro: identification of the active components and JAK2 and gp130 as substrates. *Growth factors (Chur, Switzerland)* **32**, 1-10
  132. Shuai, K., and Liu, B. (2005) Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **5**, 593-605
  133. Schmidt, D., and Müller, S. (2003) PIAS/SUMO: new partners in transcriptional regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **60**, 2561-2574
  134. Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D., and Shuai, K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10626-10631
  135. Rogers, R. S., Horvath, C. M., and Matunis, M. J. (2003) SUMO modification of STAT1 and its role in PIAS-mediated inhibition of gene activation. *The Journal of biological chemistry* **278**, 30091-30097
  136. Dittrich, A., Quaiser, T., Khouri, C., Görtz, D., Mönnigmann, M., and Schaper, F. (2012) Model-driven experimental analysis of the function of SHP-2 in IL-6-induced Jak/STAT signaling. *Molecular bioSystems* **8**, 2119-2134
  137. Barford, D., and Neel, B. G. (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2. *Structure (London, England : 1993)* **6**, 249-254
  138. Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R. M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B. G., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2003) SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *The Journal of biological chemistry* **278**, 661-671
  139. Ehlting, C., Lai, W. S., Schaper, F., Brenndorfer, E. D., Matthes, R. J., Heinrich, P. C., Ludwig, S., Blackshear, P. J., Gaestel, M., Haussinger, D., and Bode, J. G. (2007) Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**, 2813-2826
  140. Yang, X. P., Albrecht, U., Zakowski, V., Sobota, R. M., Haussinger, D., Heinrich, P. C., Ludwig, S., Bode, J. G., and Schaper, F. (2004) Dual function of interleukin-1beta for the regulation of interleukin-6-induced suppressor of cytokine signaling 3 expression. *The Journal of biological chemistry* **279**, 45279-45289
  141. Thiel, S., Behrmann, I., Dittrich, E., Muys, L., Tavernier, J., Wijdenes, J., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1998) Internalization of the interleukin 6 signal



- transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal* **330 ( Pt 1)**, 47-54
142. Dittrich, E., Rose-John, S., Gerhartz, C., Mullberg, J., Stoyan, T., Yasukawa, K., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1994) Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *The Journal of biological chemistry* **269**, 19014-19020
  143. Dittrich, E., Haft, C. R., Muys, L., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1996) A dileucine 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* **271**, 5487-5494
  144. Radtke, S., Wuller, S., Yang, X. P., Lippok, B. E., Mutze, B., Mais, C., de Leur, H. S., Bode, J. G., Gaestel, M., Heinrich, P. C., Behrmann, I., Schaper, F., and Hermanns, H. M. (2010) Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation. *Journal of cell science* **123**, 947-959
  145. Hermanns, H. M., Wohlfahrt, J., Mais, C., Hergovits, S., Jahn, D., and Geier, A. (2016) Endocytosis of pro-inflammatory cytokine receptors and its relevance for signal transduction. *Biological chemistry* **397**, 695-708
  146. Rose-John, S., Scheller, J., and Schaper, F. (2015) "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* **26**, 471-474
  147. Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Kuster, A., Dahmen, H., Tacke, I., Heinrich, P. C., and Muller-Newen, G. (2000) Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **164**, 273-282
  148. Luticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., and et al. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 89-92
  149. Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., and et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science (New York, N.Y.)* **263**, 92-95
  150. Radtke, S., Hermanns, H. M., Haan, C., Schmitz-Van De Leur, H., Gascan, H., Heinrich, P. C., and Behrmann, I. (2002) Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression. *The Journal of biological chemistry* **277**, 11297-11305
  151. Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N., and Kishimoto, T. (1996) 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* **93**, 407-411
  152. Betz, U. A., Bloch, W., van den Broek, M., Yoshida, K., Taga, T., Kishimoto, T., Addicks, K., Rajewsky, K., and Müller, W. (1998) Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *The Journal of experimental medicine* **188**, 1955-1965
  153. Hirano, T., Taga, T., Matsuda, T., Hibi, M., Suematsu, S., Tang, B., Murakami, M., and Kishimoto, T. (1990) Interleukin 6 and its receptor in the immune

- response and hematopoiesis. *International journal of cell cloning* **8 Suppl 1**, 155-166; discussion 166-157
154. Aarden, L. A., De Groot, E. R., Schaap, O. L., and Lansdorp, P. M. (1987) Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *European journal of immunology* **17**, 1411-1416
  155. Van Snick, J., Cayphas, S., Vink, A., Uyttenhove, C., Coulie, P. G., Rubira, M. R., and Simpson, R. J. (1986) Purification and NH<sub>2</sub>-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* **83**, 9679-9683
  156. Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H., and Kishimoto, T. (1985) 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* **82**, 5490-5494
  157. Horii, Y., Muraguchi, A., Suematsu, S., Matsuda, T., Yoshizaki, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988) Regulation of BSF-2/IL-6 production by human mononuclear cells. Macrophage-dependent synthesis of BSF-2/IL-6 by T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **141**, 1529-1535
  158. Corbel, C., and Melchers, F. (1984) The synergism of accessory cells and of soluble alpha-factors derived from them in the activation of B cells to proliferation. *Immunological reviews* **78**, 51-74
  159. Van Damme, J., Cayphas, S., Opdenakker, G., Billiau, A., and Van Snick, J. (1987) Interleukin 1 and poly(rl).poly(rC) induce production of a hybridoma growth factor by human fibroblasts. *European journal of immunology* **17**, 1-7
  160. Baumann, H., Jahreis, G. P., Sauder, D. N., and Koj, A. (1984) 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* **259**, 7331-7342
  161. Cayphas, S., Van Damme, J., Vink, A., Simpson, R. J., Billiau, A., and Van Snick, J. (1987) Identification of an interleukin HP1-like plasmacytoma growth factor produced by L cells in response to viral infection. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **139**, 2965-2969
  162. Miyashita, M., Sugimoto, K., Suzuki, J., Taniguchi, S., Aramaki, K., and Mori, K. J. (1991) 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). *Leukemia research* **15**, 1125-1131
  163. Sanceau, J., Kaisho, T., Hirano, T., and Wietzerbin, J. (1995) 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* **270**, 27920-27931
  164. Zhang, Y. H., Lin, J. X., and Vilcek, J. (1990) Interleukin-6 induction by tumor necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts involves activation of a nuclear factor binding to a kappa B-like sequence. *Molecular and cellular biology* **10**, 3818-3823
  165. Fujisawa, H., Wang, B., Sauder, D. N., and Kondo, S. (1997) 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* **17**, 347-353
  166. Clogston, C. L., Boone, T. C., Crandall, B. C., Mendiaz, E. A., and Lu, H. S. (1989) Disulfide structures of human interleukin-6 are similar to those of human

- granulocyte colony stimulating factor. *Archives of biochemistry and biophysics* **272**, 144-151
167. Simpson, R. J., Moritz, R. L., Van, R., and Van Snick, J. (1988) Characterization of a recombinant murine interleukin-6: assignment of disulfide bonds. *Biochemical and biophysical research communications* **157**, 364-372
  168. Gross, V., Andus, T., Castell, J., Vom Berg, D., Heinrich, P. C., and Gerok, W. (1989) O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. *FEBS letters* **247**, 323-326
  169. May, L. T., Ghrayeb, J., Santhanam, U., Tatter, S. B., Sthoeger, Z., Helfgott, D. C., Chiorazzi, N., Grieneringer, G., and Sehgal, P. B. (1988) 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* **263**, 7760-7766
  170. Tagliabracci, V. S., Wiley, S. E., Guo, X., Kinch, L. N., Durrant, E., Wen, J., Xiao, J., Cui, J., Nguyen, K. B., Engel, J. L., Coon, J. J., Grishin, N., Pinna, L. A., Pagliarini, D. J., and Dixon, J. E. (2015) A Single Kinase Generates the Majority of the Secreted Phosphoproteome. *Cell* **161**, 1619-1632
  171. Yoshizaki, K., Nakagawa, T., Fukunaga, K., Tseng, L. T., Yamamura, Y., and Kishimoto, T. (1984) Isolation and characterization of B cell differentiation factor (BCDF) secreted from a human B lymphoblastoid cell line. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **132**, 2948-2954
  172. Yasukawa, K., Hirano, T., Watanabe, Y., Muratani, K., Matsuda, T., Nakai, S., and Kishimoto, T. (1987) Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. *EMBO J* **6**, 2939-2945
  173. Kishimoto, T. (1987) B-cell stimulatory factors (BSFs): molecular structure, biological function, and regulation of expression. *Journal of clinical immunology* **7**, 343-355
  174. Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T., and Heinrich, P. C. (1987) 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* **221**, 18-22
  175. Ramadori, G., Van Damme, J., Rieder, H., and Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1988) Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *European journal of immunology* **18**, 1259-1264
  176. Ganapathi, M. K., May, L. T., Schultz, D., Brabenec, A., Weinstein, J., Sehgal, P. B., and Kushner, I. (1988) Role of interleukin-6 in regulating synthesis of C-reactive protein and serum amyloid A in human hepatoma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* **157**, 271-277
  177. Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *The Biochemical journal* **265**, 621-636
  178. Ishibashi, T., Kimura, H., Shikama, Y., Uchida, T., Kariyone, S., Hirano, T., Kishimoto, T., Takatsuki, F., and Akiyama, Y. (1989) Interleukin-6 is a potent thrombopoietic factor in vivo in mice. *Blood* **74**, 1241-1244
  179. Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235-238
  180. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M., and Stockinger, B. (2006) TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179-189

181. Diehl, S., and Rincón, M. (2002) The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Molecular immunology* **39**, 531-536
182. Rincón, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., and Flavell, R. A. (1997) Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. *The Journal of experimental medicine* **185**, 461-469
183. Rincon, M. (2012) Interleukin-6: from an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in immunology* **33**, 571-577
184. Okada, M., Kitahara, M., Kishimoto, S., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1988) IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **141**, 1543-1549
185. Hunter, C. A., and Jones, S. A. (2015) IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology* **16**, 448-457
186. Ma, J., Zhu, C., Ma, B., Tian, J., Baidoo, S. E., Mao, C., Wu, W., Chen, J., Tong, J., Yang, M., Jiao, Z., Xu, H., Lu, L., and Wang, S. (2012) Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical & developmental immunology* **2012**, 827480
187. Tanaka, T., and Kishimoto, T. (2014) The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunology Research* **2**, 288
188. Scheller, J., and Rose-John, S. (2006) Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Medical microbiology and immunology* **195**, 173-183
189. Hong, D. S., Angelo, L. S., and Kurzrock, R. (2007) Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for translational therapeutics. *Cancer* **110**, 1911-1928
190. Hashizume, M., Hayakawa, N., and Mihara, M. (2008) IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford, England)* **47**, 1635-1640
191. Kotake, S., Sato, K., Kim, K. J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T., and Kashiwazaki, S. (1996) Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **11**, 88-95
192. Dalchau, R., Kirkley, J., and Fabre, J. W. (1980) Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *European journal of immunology* **10**, 737-744
193. Honke, N., Ohl, K., Wiener, A., Bierwagen, J., Peitz, J., Di Fiore, S., Fischer, R., Wagner, N., Wüller, S., and Tenbrock, K. (2014) 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 & rheumatology (Hoboken, N.J.)* **66**, 470-478
194. Jakubovský, J., Guller, L., Cerná, M., Balázová, K., Polák, S., Jakubovská, V., and Babál, P. (2002) Fluorescence of hematoxylin and eosin-stained histological sections of the human spleen. *Acta histochemica* **104**, 353-356
195. Gerdes, J., Lemke, H., Baisch, H., Wacker, H. H., Schwab, U., and Stein, H. (1984) Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **133**, 1710-1715
196. Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* **182**, 311-322

197. Oettgen, H. C., Pettey, C. L., Maloy, W. L., and Terhorst, C. (1986) A T3-like protein complex associated with the antigen receptor on murine T cells. *Nature* **320**, 272-275
198. Alarcón, B., Swamy, M., van Santen, H. M., and Schamel, W. W. (2006) T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. *EMBO reports* **7**, 490-495
199. Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712
200. Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual review of immunology* **22**, 745-763
201. Baaten, B. J., Li, C. R., Deiro, M. F., Lin, M. M., Linton, P. J., and Bradley, L. M. (2010) CD44 regulates survival and memory development in Th1 cells. *Immunity* **32**, 104-115
202. Seder, R. A., and Ahmed, R. (2003) Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nature immunology* **4**, 835-842
203. Coffman, R. L., and Weissman, I. L. (1981) B220: a B cell-specific member of the T200 glycoprotein family. *Nature* **289**, 681-683
204. Sato, S., Ono, N., Steeber, D. A., Pisetsky, D. S., and Tedder, T. F. (1996) CD19 regulates B lymphocyte signaling thresholds critical for the development of B-1 lineage cells and autoimmunity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **157**, 4371-4378
205. Sato, S., Steeber, D. A., Jansen, P. J., and Tedder, T. F. (1997) CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *The Journal of Immunology* **158**, 4662
206. Carter, R. H., and Fearon, D. T. (1992) CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)* **256**, 105-107
207. Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M., and Corcoran, L. M. (2015) The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nature reviews. Immunology* **15**, 160-171
208. Jego, G., Bataille, R., and Pellat-Deceunynck, C. (2001) Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* **97**, 1817-1822
209. Tellier, J., and Nutt, S. L. (2017) Standing out from the crowd: How to identify plasma cells. *European journal of immunology* **47**, 1276-1279
210. Reijmers, R. M., Groen, R. W., Kuil, A., Weijer, K., Kimberley, F. C., Medema, J. P., van Kuppevelt, T. H., Li, J. P., Spaargaren, M., and Pals, S. T. (2011) Disruption of heparan sulfate proteoglycan conformation perturbs B-cell maturation and APRIL-mediated plasma cell survival. *Blood* **117**, 6162-6171
211. Oracki, S. A., Walker, J. A., Hibbs, M. L., Corcoran, L. M., and Tarlinton, D. M. (2010) Plasma cell development and survival. *Immunological reviews* **237**, 140-159
212. Betz, U. A., and Müller, W. (1998) Regulated expression of gp130 and IL-6 receptor alpha chain in T cell maturation and activation. *International immunology* **10**, 1175-1184
213. Kobayashi, I., Matsuda, T., Saito, T., Yasukawa, K., Kikutani, H., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1992) Abnormal distribution of IL-6 receptor in aged MRL/lpr mice: elevated expression on B cells and absence on CD4+ cells. *International immunology* **4**, 1407-1412
214. Wang, X. J., Taga, T., Yoshida, K., Saito, M., Kishimoto, T., and Kikutani, H. (1998) gp130, the cytokine common signal-transducer of interleukin-6 cytokine family, is downregulated in T cells in vivo by interleukin-6. *Blood* **91**, 3308-3314

215. Barr, T. A., Shen, P., Brown, S., Lampropoulou, V., Roch, T., Lawrie, S., Fan, B., O'Connor, R. A., Anderton, S. M., Bar-Or, A., Fillatreau, S., and Gray, D. (2012) B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *The Journal of experimental medicine* **209**, 1001-1010
216. Rosser, E. C., Oleinika, K., Tonon, S., Doyle, R., Bosma, A., Carter, N. A., Harris, K. A., Jones, S. A., Klein, N., and Mauri, C. (2014) Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 production. *Nature medicine* **20**, 1334-1339
217. Yoshizaki, K., Matsuda, T., Nishimoto, N., Kuritani, T., Taeho, L., Aozasa, K., Nakahata, T., Kawai, H., Tagoh, H., Komori, T., and et al. (1989) Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood* **74**, 1360-1367
218. Sebina, I., Fogg, L. G., James, K. R., Soon, M. S. F., Akter, J., Thomas, B. S., Hill, G. R., Engwerda, C. R., and Haque, A. (2017) IL-6 promotes CD4(+) T-cell and B-cell activation during Plasmodium infection. *Parasite immunology* **39**
219. Uyttenhove, C., Coulie, P. G., and Van Snick, J. (1988) T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor. *The Journal of experimental medicine* **167**, 1417-1427
220. Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Köhler, G. (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**, 339-342
221. Liao, W., Lin, J. X., Wang, L., Li, P., and Leonard, W. J. (2011) Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nature immunology* **12**, 551-559
222. Hong, C., Nam, A. S., Keller, H. R., Ligons, D. L., Park, J. Y., Yoon, H. W., Park, J. J., Luckey, M. A., and Park, J. H. (2013) Interleukin-6 expands homeostatic space for peripheral T cells. *Cytokine* **64**, 532-540
223. KROESE, F. G. M., AMMERLAAN, W. A. M., and DEENEN, G. J. (1992) Location and Function of B-Cell Lineages. *Annals of the New York Academy of Sciences* **651**, 44-58
224. Carsetti, R., Köhler, G., and Lamers, M. C. (1995) Transitional B cells are the target of negative selection in the B cell compartment. *The Journal of experimental medicine* **181**, 2129-2140
225. Martin, F., and Kearney, J. F. (2000) B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunological reviews* **175**, 70-79
226. Martin, F., and Kearney, J. F. (2000) Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity* **12**, 39-49
227. Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R., and Herzenberg, L. A. (1983) The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice. *The Journal of experimental medicine* **157**, 202-218
228. Waldschmidt, T. J., Kroese, F. G., Tygrett, L. T., Conrad, D. H., and Lynch, R. G. (1991) The expression of B cell surface receptors. III. The murine low-affinity IgE Fc receptor is not expressed on Ly 1 or 'Ly 1-like' B cells. *International immunology* **3**, 305-315
229. Oliver, A. M., Martin, F., Gartland, G. L., Carter, R. H., and Kearney, J. F. (1997) Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *European journal of immunology* **27**, 2366-2374

230. Pillai, S., and Cariappa, A. (2009) The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nature reviews. Immunology* **9**, 767-777
231. Dintzis, R. Z., Middleton, M. H., and Dintzis, H. M. (1983) Studies on the immunogenicity and tolerogenicity of T-independent antigens. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **131**, 2196-2203
232. Vos, Q., Lees, A., Wu, Z. Q., Snapper, C. M., and Mond, J. J. (2000) B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological reviews* **176**, 154-170
233. Mond, J. J., Vos, Q., Lees, A., and Snapper, C. M. (1995) T cell independent antigens. *Current opinion in immunology* **7**, 349-354
234. Martin, F., Oliver, A. M., and Kearney, J. F. (2001) Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* **14**, 617-629
235. Song, H., and Cerny, J. (2003) Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *The Journal of experimental medicine* **198**, 1923-1935
236. Marcos, M. A., Huetz, F., Pereira, P., Andreu, J. L., Martinez, A. C., and Coutinho, A. (1989) Further evidence for coelomic-associated B lymphocytes. *European journal of immunology* **19**, 2031-2035
237. Berland, R., and Wortis, H. H. (2002) Origins and Functions of B-1 Cells with Notes on the Role of CD5. *Annual review of immunology* **20**, 253-300
238. Wardemann, H., Boehm, T., Dear, N., and Carsetti, R. (2002) B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. *The Journal of experimental medicine* **195**, 771-780
239. Allman, D., and Pillai, S. (2008) Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology* **20**, 149-157
240. Genestier, L., Taillardet, M., Mondiere, P., Gheit, H., Bella, C., and Defrance, T. (2007) TLR Agonists Selectively Promote Terminal Plasma Cell Differentiation of B Cell Subsets Specialized in Thymus-Independent Responses. *The Journal of Immunology* **178**, 7779
241. Alugupalli, K. R., Leong, J. M., Woodland, R. T., Muramatsu, M., Honjo, T., and Gerstein, R. M. (2004) B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* **21**, 379-390
242. Haas, K. M., Poe, J. C., Steeber, D. A., and Tedder, T. F. (2005) B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* **23**, 7-18
243. Hao, Z., Duncan, G. S., Seagal, J., Su, Y.-W., Hong, C., Haight, J., Chen, N.-J., Elia, A., Wakeham, A., Li, W. Y., Liepa, J., Wood, G. A., Casola, S., Rajewsky, K., and Mak, T. W. (2008) Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. *Immunity* **29**, 615-627
244. Dahdah, A., Habir, K., Nandakumar, K. S., Saxena, A., Xu, B., Holmdahl, R., and Malin, S. (2018) Germinal Center B Cells Are Essential for Collagen-Induced Arthritis. *Arthritis & Rheumatology* **70**, 193-203
245. Naito, Y., Takematsu, H., Koyama, S., Miyake, S., Yamamoto, H., Fujinawa, R., Sugai, M., Okuno, Y., Tsujimoto, G., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Itoharu, S., Kawasaki, T., Suzuki, A., and Kozutsumi, Y. (2007) Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation. *Molecular and cellular biology* **27**, 3008-3022
246. Thiel, S., Dahmen, H., Martens, A., Muller-Newen, G., Schaper, F., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1998) Constitutive internalization and association with

- adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS letters* **441**, 231-234
247. McMahon, H. T., and Boucrot, E. (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 517-533
  248. Feng, Z., Jensen, S. M., Messenheimer, D. J., Farhad, M., Neuberger, M., Bifulco, C. B., and Fox, B. A. (2016) Multispectral Imaging of T and B Cells in Murine Spleen and Tumor. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **196**, 3943-3950
  249. Winter, H., van den Engel, N. K., Rüttinger, D., Schmidt, J., Schiller, M., Poehlein, C. H., Löhe, F., Fox, B. A., Jauch, K. W., Hatz, R. A., and Hu, H. M. (2007) Therapeutic T cells induce tumor-directed chemotaxis of innate immune cells through tumor-specific secretion of chemokines and stimulation of B16BL6 melanoma to secrete chemokines. *Journal of translational medicine* **5**, 56
  250. Hicks, D. J., Johnson, L., Mitchell, S. M., Gough, J., Cooley, W. A., La Ragione, R. M., Spencer, Y. I., and Wangoo, A. (2006) Evaluation of zinc salt based fixatives for preserving antigenic determinants for immunohistochemical demonstration of murine immune system cell markers. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission* **81**, 23-30
  251. Shi, X., Qin, L., Liu, G., Zhao, S., Peng, N., and Chen, X. (2008) Dynamic balance of pSTAT1 and pSTAT3 in C57BL/6 mice infected with lethal or nonlethal *Plasmodium yoelii*. *Cellular & molecular immunology* **5**, 341-348
  252. Wittkopf, N., Pickert, G., Billmeier, U., Mahapatro, M., Wirtz, S., Martini, E., Leppkes, M., Neurath, M. F., and Becker, C. (2015) Activation of intestinal epithelial Stat3 orchestrates tissue defense during gastrointestinal infection. *PLoS One* **10**, e0118401
  253. Ellyard, J. I., Avery, D. T., Phan, T. G., Hare, N. J., Hodgkin, P. D., and Tangye, S. G. (2004) Antigen-selected, immunoglobulin-secreting cells persist in human spleen and bone marrow. *Blood* **103**, 3805-3812
  254. Haaijman, J. J., Schuit, H. R., and Hijmans, W. (1977) Immunoglobulin-containing cells in different lymphoid organs of the CBA mouse during its lifespan. *Immunology* **32**, 427-434
  255. Manz, R. A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997) Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* **388**, 133-134
  256. Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D. M., Dietrich, W., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., and Nutt, S. L. (2004) Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *The Journal of experimental medicine* **200**, 967-977
  257. Pracht, K., Meinzingler, J., Daum, P., Schulz, S. R., Reimer, D., Hauke, M., Roth, E., Mielenz, D., Berek, C., Côte-Real, J., Jäck, H.-M., and Schuh, W. (2017) A new staining protocol for detection of murine antibody-secreting plasma cell subsets by flow cytometry. *European journal of immunology* **47**, 1389-1392
  258. Tran, N. L., Schneider, P., and Santiago-Raber, M. L. (2017) TACI-dependent APRIL signaling maintains autoreactive B cells in a mouse model of systemic lupus erythematosus. *European journal of immunology* **47**, 713-723
  259. Hargreaves, D. C., Hyman, P. L., Lu, T. T., Ngo, V. N., Bidgol, A., Suzuki, G., Zou, Y.-R., Littman, D. R., and Cyster, J. G. (2001) A Coordinated Change in Chemokine Responsiveness Guides Plasma Cell Movements. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 45-56
  260. Hauser, A. E., Debes, G. F., Arce, S., Cassese, G., Hamann, A., Radbruch, A., and Manz, R. A. (2002) Chemotactic Responsiveness Toward Ligands for



- CXCR3 and CXCR4 Is Regulated on Plasma Blasts During the Time Course of a Memory Immune Response. *The Journal of Immunology* **169**, 1277
261. Kallies, A., Hasbold, J., Tarlinton, D. M., Dietrich, W., Corcoran, L. M., Hodgkin, P. D., and Nutt, S. L. (2004) Plasma cell ontogeny defined by quantitative changes in blimp-1 expression. *The Journal of experimental medicine* **200**, 967-977
  262. Ray, R. J., Paige, C. J., Furlonger, C., Lyman, S. D., and Rottapel, R. (1996) Flt3 ligand supports the differentiation of early B cell progenitors in the presence of interleukin-11 and interleukin-7. *European journal of immunology* **26**, 1504-1510
  263. Minges Wols, H. A., Underhill, G. H., Kansas, G. S., and Witte, P. L. (2002) The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **169**, 4213-4221
  264. Tarlinton, D., Radbruch, A., Hiepe, F., and Dörner, T. (2008) Plasma cell differentiation and survival. *Current opinion in immunology* **20**, 162-169
  265. Brandt, S. J., Bodine, D. M., Dunbar, C. E., and Nienhuis, A. W. (1990) Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice. *The Journal of clinical investigation* **86**, 592-599
  266. Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989) IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 7547-7551
  267. Kopf, M., Herren, S., Wiles, M. V., Pepys, M. B., and Kosco-Vilbois, M. H. (1998) Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *The Journal of experimental medicine* **188**, 1895-1906
  268. Kumanogoh, A., Marukawa, S., Kumanogoh, T., Hirota, H., Yoshida, K., Lee, I. S., Yasui, T., Yoshida, K., Taga, T., and Kishimoto, T. (1997) Impairment of antigen-specific antibody production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 2478-2482
  269. Roldán, E., and Brieva, J. A. (1991) Terminal differentiation of human bone marrow cells capable of spontaneous and high-rate immunoglobulin secretion: role of bone marrow stromal cells and interleukin 6. *European journal of immunology* **21**, 2671-2677
  270. Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., and et al. (1988) Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* **332**, 83-85
  271. Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F., and Poli, V. (1996) Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *The Journal of experimental medicine* **183**, 1345-1355
  272. Manz, R. A., Löhning, M., Cassese, G., Thiel, A., and Radbruch, A. (1998) Survival of long-lived plasma cells is independent of antigen. *International immunology* **10**, 1703-1711
  273. Brynjolfsson, S. F., Persson Berg, L., Olsen Ekerhult, T., Rimkute, I., Wick, M.-J., Mårtensson, I.-L., and Grimsholm, O. (2018) Long-Lived Plasma Cells in Mice and Men. *Frontiers in Immunology* **9**
  274. Peters, M., Müller, A. M., and Rose-John, S. (1998) Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* **92**, 3495-3504
  275. Ohtani, T., Ishihara, K., Atsumi, T., Nishida, K., Kaneko, Y., Miyata, T., Itoh, S., Narimatsu, M., Maeda, H., Fukada, T., Itoh, M., Okano, H., Hibi, M., and Hirano,

- T. (2000) Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses. *Immunity* **12**, 95-105
276. Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K., and Kishimoto, T. (1988) The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *The Journal of experimental medicine* **167**, 332-344
277. Mei, H. E., Schmidt, S., and Dörner, T. (2012) Rationale of anti-CD19 immunotherapy: an option to target autoreactive plasma cells in autoimmunity. *Arthritis research & therapy* **14 Suppl 5**, S1
278. Tedder, T. F. (2009) CD19: a promising B cell target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* **5**, 572-577
279. Burdin, N., Galibert, L., Garrone, P., Durand, I., Banchereau, J., and Rousset, F. (1996) Inability to produce IL-6 is a functional feature of human germinal center B lymphocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **156**, 4107-4113
280. Crotty, S. (2015) A brief history of T cell help to B cells. *Nature reviews. Immunology* **15**, 185-189
281. Vinuesa, C. G., Linterman, M. A., Yu, D., and MacLennan, I. C. (2016) Follicular Helper T Cells. *Annual review of immunology* **34**, 335-368
282. Crotty, S. (2019) T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132-1148
283. Choi, Y. S., Eto, D., Yang, J. A., Lao, C., and Crotty, S. (2013) Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **190**, 3049-3053
284. Nurieva, R. I., Chung, Y., Martinez, G. J., Yang, X. O., Tanaka, S., Matskevitch, T. D., Wang, Y. H., and Dong, C. (2009) Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science (New York, N.Y.)* **325**, 1001-1005
285. Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989) IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 7547-7551
286. Teague, T. K., Marrack, P., Kappler, J. W., and Vella, A. T. (1997) IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **158**, 5791-5796
287. Jones, G. W., McLoughlin, R. M., Hammond, V. J., Parker, C. R., Williams, J. D., Malhotra, R., Scheller, J., Williams, A. S., Rose-John, S., Topley, N., and Jones, S. A. (2010) 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. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **184**, 2130-2139
288. Sawa, S., Kamimura, D., Jin, G. H., Morikawa, H., Kamon, H., Nishihara, M., Ishihara, K., Murakami, M., and Hirano, T. (2006) Autoimmune arthritis associated with mutated interleukin (IL)-6 receptor gp130 is driven by STAT3/IL-7-dependent homeostatic proliferation of CD4+ T cells. *The Journal of experimental medicine* **203**, 1459-1470
289. Niu, N., and Qin, X. (2013) New insights into IL-7 signaling pathways during early and late T cell development. *Cellular & molecular immunology* **10**, 187-189
290. Tan, J. T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K. I., and Surh, C. D. (2001) 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* **98**, 8732-8737

291. Park, J. H., Yu, Q., Erman, B., Appelbaum, J. S., Montoya-Durango, D., Grimes, H. L., and Singer, A. (2004) Suppression of IL7 $\alpha$  transcription by IL-7 and other prosurvival cytokines: a novel mechanism for maximizing IL-7-dependent T cell survival. *Immunity* **21**, 289-302
292. Wojciechowski, S., Tripathi, P., Bourdeau, T., Acero, L., Grimes, H. L., Katz, J. D., Finkelman, F. D., and Hildeman, D. A. (2007) Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naive and memory T cell homeostasis. *The Journal of experimental medicine* **204**, 1665-1675
293. Béziat, V., Tavernier, S. J., Chen, Y. H., Ma, C. S., Materna, M., Laurence, A., Staal, J., Aschenbrenner, D., Roels, L., Worley, L., Claes, K., Gartner, L., Kohn, L. A., De Bruyne, M., Schmitz-Abe, K., Charbonnier, L. M., Keles, S., Nammour, J., Vladikine, N., Maglorius Renkilaraj, M. R. L., Seeleuthner, Y., Migaud, M., Rosain, J., Jeljeli, M., Boisson, B., Van Braeckel, E., Rosenfeld, J. A., Dai, H., Burrage, L. C., Murdock, D. R., Lambrecht, B. N., Avettand-Fenoel, V., Vogel, T. P., Esther, C. R., Haskologlu, S., Dogu, F., Ciznar, P., Boutboul, D., Ouachée-Chardin, M., Amourette, J., Lebras, M. N., Gauvain, C., Tcherakian, C., Ikinciogullari, A., Beyaert, R., Abel, L., Milner, J. D., Grimbacher, B., Couderc, L. J., Butte, M. J., Freeman, A. F., Catherinot, É., Fieschi, C., Chatila, T. A., Tangye, S. G., Uhlig, H. H., Haerynck, F., Casanova, J. L., and Puel, A. (2020) Dominant-negative mutations in human IL6ST underlie hyper-IgE syndrome. *The Journal of experimental medicine* **217**
294. Chen, Z., Huang, A., Sun, J., Jiang, T., Qin, F. X., and Wu, A. (2017) Inference of immune cell composition on the expression profiles of mouse tissue. *Scientific reports* **7**, 40508
295. Hensel, J. A., Khattar, V., Ashton, R., and Ponnazhagan, S. (2019) Characterization of immune cell subtypes in three commonly used mouse strains reveals gender and strain-specific variations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **99**, 93-106
296. Krutzik, P. O., and Nolan, G. P. (2003) Intracellular phospho-protein staining techniques for flow cytometry: monitoring single cell signaling events. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* **55**, 61-70
297. Zhou, M., Dai, W., Cui, Y., and Li, Y. (2020) Estrogen downregulates gp130 expression in HUVECs by regulating ADAM10 and ADAM17 via the estrogen receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **523**, 753-758
298. Kovaïou, R. D., Weiskirchner, I., Keller, M., Pfister, G., Cioca, D. P., and Grubeck-Loebenstien, B. (2005) Age-related differences in phenotype and function of CD4<sup>+</sup> T cells are due to a phenotypic shift from naive to memory effector CD4<sup>+</sup> T cells. *International immunology* **17**, 1359-1366
299. Lefebvre, J. S., and Haynes, L. (2012) Aging of the CD4 T Cell Compartment. *Open Longevity Science* **6**, 83-91
300. Timm, J. A., and Thoman, M. L. (1999) Maturation of CD4<sup>+</sup> lymphocytes in the aged microenvironment results in a memory-enriched population. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **162**, 711-717
301. Yang, X., Stedra, J., and Cerny, J. (1996) Relative contribution of T and B cells to hypermutation and selection of the antibody repertoire in germinal centers of aged mice. *The Journal of experimental medicine* **183**, 959-970
302. Zheng, B., Han, S., Takahashi, Y., and Kelsoe, G. (1997) Immunosenescence and germinal center reaction. *Immunological reviews* **160**, 63-77

## Appendix

### I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AP2	Adapterprotein 2
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
Aqua dest.	Aqua destillata
B-CSF-2	<i>B-cell stimulatory factor 2</i>
Blimp1	<i>B lymphocyte-induced maturation protein-1</i>
BSA	bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
CY	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DZ	dendritische Zellen
EDTA	Etylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FDZ	follikuläre dendritische Zellen
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FMO	<i>fluorescence minus one</i>
g	Gramm

Gab	<i>Grb-2-associated-binder</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gp80	Glykoprotein 80
gp130	Glykoprotein 160
GRK2	<i>guanine nucleotide-binding protein-coupled receptor kinase-2</i>
h	Stunde (engl. <i>hour</i> )
h	human
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
Jak	Januskinase
kDa	Kilodalton
ki	<i>knock-in</i>
KMZ	Keimzentrum
l	Liter
LIF	<i>leukemia inhibitor factor</i>
LLAA	Leucin, Leucin $\rightarrow$ Alanin, Alanin
LPS	Lipopolysaccharid
m	männlich
MAP	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
MFI	<i>median fluorescence intensity</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Min	Minute
MK2	<i>MAPK-activated kinase 2</i>
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MMM	Metallophile Makrophagen der Marginalen Zone
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MZ	Marginale Zone
MZM	Marginale Zone- Makrophagen
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NK	natürliche Killerzellen

NP	<i>neuropoetin</i>
OSM	<i>oncostatin M</i>
p	Signifikanzwert (engl. <i>probability-value</i> )
p38	Stress-aktivierte Proteinkinase 39kDa
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PALS	Periarterielle Lymphozytenscheide
PB	Pacific Blue
PBS	<i>phosphate-buffered solution</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
pH	negativ-dekadischer Logarithmus d. Protonenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3 -Kinase
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PTP	Proteintyrosinphosphatasen
pY	Phospho-Tyrosin
R	Rezeptor
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rcf	<i>relative centrifugal force</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
Ser (S)	Serin
SHP	<i>Small heterodimer partner</i>
SOCS	<i>supressor of cytokine signaling</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
S1P	<i>spingosine-1-phosphate</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
STAT1	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAC1	<i>transmembrane activator and CAML interactor</i>
T1-Zelle	<i>Transitional-Zelle vom Typ1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
T <sub>cm</sub>	<i>central memory T-Zelle</i>
T <sub>em</sub>	<i>effector memory T-Zelle</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor-beta</i>

TH-Zelle	T-Helferzelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
T <sub>naive</sub>	naive T-Zelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zelle
Tyr (Y)	Tyrosin
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	ultraviolett
w	weiblich
WT	Wildtyp

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Struktur der murinen Milz. ....	6
Abbildung 2: Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Zytokine. ....	8
Abbildung 3: Schematische Darstellung des IL-6 Signalwegs. ....	9
Abbildung 4: Schematische Darstellung des klassischen IL-6 Signals und des IL-6 <i>trans</i> -Signals. ....	11
Abbildung 5: Schematische Darstellung des murinen gp130 Rezeptors. ....	14
Abbildung 6: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der Plasmazellen und reifen B-Zellen. ....	31
Abbildung 7: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der Plasmazellen und B-Zellen sowie ihrer CD130 Oberflächenexpression. ....	32
Abbildung 8: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der B1-Zellen. ....	33
Abbildung 9: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der Keimzentrums B-Zellen. ....	34
Abbildung 10: Auswertungsstrategie zur Identifizierung der T-Zellen. ....	35
Abbildung 11: gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen Unterschied im Körpergewicht gegenüber WT Mäusen. ....	36
Abbildung 12: gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen Unterschied im Gewicht der Milz gegenüber WT Mäusen. ....	37
Abbildung 13: gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen Unterschied im Gewicht des Herzens gegenüber WT Mäusen. ....	37
Abbildung 14: gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen in den Untersuchungsgruppen ♂, Alter ca: 4 und ca. 12 Monate einen signifikanten Unterschied in dem Gewicht der Niere gegenüber WT Mäusen. ....	38
Abbildung 15: gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen keinen signifikanten Unterschied in dem Gewicht der Leber gegenüber WT Mäusen. ....	38
Abbildung 16: gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen vergleichbare Blutglucosespiegel gegenüber WT Mäusen. ....	38
Abbildung 17: Milzgewebe von WT Mäusen und gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen in der H&E-Färbung vergleichbare Ergebnisse. ....	40
Abbildung 18: Herzgewebe von WT Mäusen und gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen in der H&E-Färbung vergleichbare Ergebnisse. ....	41
Abbildung 19: Nierengewebe von WT Mäusen und gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen in der H&E-Färbung vergleichbare Ergebnisse. ....	42



Abbildung 20: Lebergewebe von WT Mäusen und gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen in der H.E.- Färbung vergleichbare Ergebnisse. ....	43
Abbildung 21: Unbehandeltes FFPE Milzgewebe weist eine starke Autofluoreszenz auf.....	45
Abbildung 22: Färbung der B-Zellen mit dem B220 Antikörper in FFPE Milzgewebe von WT Maus und gp130 <sup>LLAA</sup> Maus.....	45
Abbildung 23: Die B-Zell-Färbung mit dem B220 Antikörper zeigt in WT Milzgewebe und gp130 <sup>LLAA</sup> Milzgewebe vergleichbare Ergebnisse.....	46
Abbildung 24: Färbung der proliferierenden Zellen mit dem Ki-67 Antikörper in FFPE Milzgewebe von WT und gp130 <sup>LLAA</sup> Maus.....	46
Abbildung 25: Die Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 zeigt in WT und gp130 <sup>LLAA</sup> FFPE Milzgewebe vergleichbare Ergebnisse. ....	47
Abbildung 26: Lymphozyten aus der Milz von gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression.....	52
Abbildung 27: Plasmazellen aus der Milz von gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen eine erhöhte gp130 Oberflächenexpression gegenüber Plasmazellen aus der WT Milz. ....	53
Abbildung 28: Gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen zeigen einen geringen Unterschied in der Frequenz der CD19 <sup>+</sup> B-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen.....	56
Abbildung 29: Gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der Follikulären-, MZ- und T1-B-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen.....	57
Abbildung 30: Gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der B1-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen. ....	59
Abbildung 31: Gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der Keimzentrums B-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen. ....	60
Abbildung 32: Gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der Plasmazellen im Vergleich zu WT Mäusen. ....	61
Abbildung 33: Gp130 <sup>LLAA</sup> Tiere zeigen Unterschiede in der Frequenz der T-Zellen im Vergleich zu WT Mäusen. ....	62
Abbildung 34: Gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen Unterschiede in der Frequenz der (CD4 <sup>+</sup> ) T-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu WT Mäusen.....	64
Abbildung 35: Gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen einen Unterschied in der Frequenz der (CD8 <sup>+</sup> ) T-Zell-Subpopulationen Im Vergleich zu WT Tieren.....	66
Abbildung 36: Ein von Pracht. et. al. entwickeltes Färbeprotokoll für die Erkennung muriner Antikörper-sezernierender Plasmablasten/Plasmazellen mittels Durchflusszytometrie. ....	71

Abbildung 37: Expression von Oberflächenmarkern während der Plasmazell-Entwicklung. ....	72
Abbildung 38 Weibliche Tiere zeigen Unterschiede in der gp130 Expression auf Immunzellen der Milz im Vergleich zu männlichen Tieren. ....	81
Abbildung 39: Weibliche Tiere zeigen Unterschiede in der Frequenz von T-Zell-Subpopulationen im Vergleich zu männlichen Tieren. ....	82
Abbildung 40: Ältere gp130 <sup>LLAA</sup> Tiere zeigen gegenüber jüngeren gp130 <sup>LLAA</sup> Tieren Veränderungen der CD130 MFI Werte auf verschiedenen Immunzellen der Milz. ....	84
Abbildung 41: Ältere gp130 <sup>LLAA</sup> Mäuse zeigen gegenüber jüngeren gp130 <sup>LLAA</sup> Mäusen Unterschiede in der Frequenz der T-Zell-Subpopulationen in der Milz. ....	86

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten FACS Antikörper für die Oberflächenfärbung, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.....	18
Tabelle 2: Bezeichnung und Beschreibung der verwendeten IHC Antikörper, deren Herkunft und jeweils eingesetzte Konzentration.....	20
Tabelle 3: Verwendete Antikörper-Mischungen zur Analyse der Follikulären-, MZ-, T1-B-Zellen und Plasmazellen.....	30
Tabelle 4: Verwendete Antikörper-Mischungen zur Analyse der CD130 Expression auf Plasmazellen und B-Zellen.....	31
Tabelle 5: Verwendete Antikörper-Mischung zur Analyse der B1-Zellen. ....	32
Tabelle 6: Verwendete Antikörper-Mischung zur Analyse der B-Zellen des Keimzentrums.....	33
Tabelle 7: Verwendete Antikörper-Mischung zur Analyse der T-Zellen und ihrer CD130 Expression.....	34

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Geier und Frau PD Dr. Heike Hermanns dafür, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, diese Arbeit unter ihrer Leitung durchzuführen.

Ein großes Dankeschön geht an PD Dr. Heike Hermanns für die Betreuung dieser Arbeit. Heike hat mir dieses interessante Promotionsthema überhaupt ermöglicht und mit ihrer kompetenten Art ganz wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Bei Problemen hatte sie immer einen zuverlässigen Ratschlag parat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Andreas Beilhack für die freundliche und engagierte Übernahme des Korreferats.

Außerdem möchte ich Donata für die tatkräftige Unterstützung im Labor danken. Der gesamten Arbeitsgruppe danke ich für das überaus angenehme Arbeitsklima.

Auch danke ich Ivana für ihre Hilfsbereitschaft und Geduld bei der Einführung in die FACS-Methode.

Zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglicht haben und mir immer mit Rat und Tat beiseite standen. Für eure liebevolle und vielseitige Unterstützung bin ich sehr dankbar.