

**Die Rolle des Interleukin-6 Trans-Signalweges
bei einer akuten LCMV-Infektion und
Beteiligung am Leberschaden**



Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Robin Thomas Siegfried Polz
aus Düsseldorf

Düsseldorf, Dezember 2019

aus dem Institut für
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichtersteller:

1. Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

2. Prof. Dr. Philipp A. Lang

Tag der mündlichen Prüfung: 20.05.2020

Gewidmet Dr. Karl Ditgens.

„Success is not final, failure is not fatal – it is the courage to continue that counts.“

Winston Churchill

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	1
II. Tabellenverzeichnis	4
III. Abkürzungen	5
1. Einleitung	8
1.1 Zytokine	8
1.2 Zytokine der Interleukin-6 Familie	8
1.3 Interleukin-6	9
1.4.1 Signaltransduktion durch Interleukin-6	9
1.4.2 Die Klassische Interleukin-6 Signaltransduktion	10
1.4.3 Der Trans-Signalweg von Interleukin-6	12
1.4.4 Zell-Zell vermittelte Signaltransduktion	13
1.5 Die physiologische Rolle von Interleukin-6 und der Signaltransduktion	13
1.6 Pathologie von Interleukin-6	14
1.6.1 Therapeutische Ansätze der IL-6 induzierten Pathologie	15
1.7 Die Rolle von T-Zell im Immunsystem und IL-6	17
1.8 Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus	18
1.8.1 LCMV als Infektionsmodell zur Leberschädigung	20
1.9 Die Beteiligung von IL-6 bei Infektionen mit LCMV	21
1.10 Zielsetzung	23
2. Material und Methoden	24
2.1 Material	24
2.1.1 Primäre Antikörper	24
2.1.2 Sekundäre Antikörper	24
2.1.3 Chemikalien	25
2.1.4 Geräte	26
2.1.5 Kits	27

2.1.6 Peptide und Zytokine.....	27
2.1.7 Medium.....	27
2.1.8 Materialien.....	28
2.1.9 Lösungen.....	28
2.1.10 Primer.....	30
2.2 Tierexperimentelle Methoden.....	30
2.2.1 Tiere und Tierhaltung	30
2.2.2 Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen.....	30
2.2.3 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR.....	31
2.2.4 Vorbereitung der Mäuse	31
2.2.5 Behandlung der Mäuse mit rekombinanten Proteinen oder Antikörpern ..	32
2.2.6 Blutentnahme aus der Maus.....	32
2.2.7 Aufarbeitung der Tiere.....	33
2.3 Virus.....	33
2.4 Biochemische Methoden.....	33
2.4.1 Serumanalyse.....	33
2.4.2 ELISA	34
2.4.3 Histologie.....	34
2.4.4 Kultivierung von adhärennten Zellen	34
2.4.5 Plaqueassay	35
2.4.6 Tetramerfärbung für Durchflusszytometrie	36
2.4.7 Intrazelluläre Zytokinfärbung für Durchflusszytometrie.....	37
2.4.8 <i>Rollerbottle</i> -Kultivierung von CHO Zellen	37
2.4.9 Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Zellkulturüberständen.....	38
2.4.10 Zellzahlbestimmung.....	38
2.4.11 Proliferationsassay	39
2.4.12 SDS-Gelelektrophorese.....	39
2.4.13 Coomassie-Gel Präparation	40

2.5 Statistische Analyse	40
3. Ergebnisse.....	41
3.1 Der IL-6 Trans-Signalweg vermittelt Leberregeneration.....	41
3.2 T-Zellentwicklung bei Inhibition der IL-6 vermittelten Signaltransduktion	49
3.3 Einfluss des Trans-Signalweges auf virus-induzierte Leberpathologie	54
3.4 T-Zellentwicklung durch verstärktes IL-6 <i>Trans-Signaling</i>	63
3.5 Auswirkungen der IL-6R Deletion in Mäusen nach Infektion mit LCMV WE ...	68
3.6 Stimulation des Trans-Signalweges verstärkt Leberschädigung nach Infektion mit LCMV	73
4. Diskussion	80
4.1 Auswirkungen der Blockade des IL-6 vermittelten Signals im Modell zur virusinduzierten Leberschädigung	81
4.2 Kompensatorische Kapazität des Trans-Signals in transgenen Mäusen	86
4.3 Übermäßige Aktivierung durch Hyper-IL-6 verhindert vollständige Leberregeneration nach virusinduzierter Schädigung	90
5. Ausblick	94
6. Zusammenfassung	96
7. Summary	97
8. Literaturverzeichnis.....	98
9. Publikationen	114
10. Danksagung	115
11. Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation	117

I. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zusammensetzung der Rezeptoren und Rezeptorkomplex.....	10
Abbildung 2: Varianten der IL-6 Signaltransduktion.....	12
Abbildung 3: Inhibitoren zur therapeutischen Blockade der IL-6 Signaltransduktion.	16
Abbildung 4: Aufbau von LCMV.....	19
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Hepatozyteninfektion und Entstehung des Leberschadens.	21
Abbildung 6: Serumlevel von IL-6 und sIL-6R nach LCMV-Infektion in Wildtyp-Mäusen.....	42
Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Blockade des klassischen und des Trans-Signalweges.....	43
Abbildung 8: Serumlevel von ALT und AST nach Infektion in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Tieren.	44
Abbildung 9: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von Mäusen behandelt mit sgp130Fc oder IL-6 mAb.....	45
Abbildung 10: Viruslast im Gewebe von Mäusen nach Behandlung mit sgp130Fc oder IL-6 mAb.....	46
Abbildung 11: Collagenexpression in der Leber nach virus-induzierter Schädigung in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Mäusen.....	47
Abbildung 12: α -SMA Expression in der Leber nach Schädigung in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Mäusen.....	48
Abbildung 13: T-Zellentwicklung in Abhängigkeit der IL-6 vermittelten Signalinduktion in behandelten Mäusen.	50
Abbildung 14: Intrazelluläre Zytokinfärbung zur Ermittlung der T-Zellfunktion in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Mäusen.....	52
Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Infektion der transgenen Mäuse sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+}	55
Abbildung 16: Serumlevel von IL-6 und sIL-6R in naiven sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} Mäusen.....	56
Abbildung 17: Serumlevel von IL-6 und sIL-6R nach LCMV-Infektion in sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} Mäusen.....	56
Abbildung 18: Leberschädigungsmarker ALT und AST in sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} Mäusen nach Infektion.....	58

Abbildung 19: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} Mäusen nach Infektion.....	59
Abbildung 20: Viruslast im Gewebe nach Infektion von sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} Mäusen.....	60
Abbildung 21: Collagenexpression in der Leber nach Schädigung in sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} Mäusen.....	61
Abbildung 22: α-SMA Expression in der Leber nach Schädigung in sIL-6R ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} Mäusen.....	62
Abbildung 23: Effekt des Trans-Signals auf die T-Zellentwicklung.	64
Abbildung 24: Intrazelluläre Zytokinfärbung in sIL-6 ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+} zur Ermittlung der T-Zellfunktion.....	65
Abbildung 25: SLEC-Population im Blut von sIL-6 ^{fl/fl} und sIL-6R ^{+/+}	67
Abbildung 26: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Infektion von BL/6N und IL-6R ^{-/-}	69
Abbildung 27: Leberschädigungsmarker ALT und AST in BL/6N und IL-6R ^{-/-} Mäusen nach Infektion.	70
Abbildung 28: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von BL/6N und IL-6R ^{-/-} Mäusen nach Infektion.....	71
Abbildung 29: Viruslast im Gewebe nach Infektion von BL/6N und IL-6R ^{-/-} Mäusen.	72
Abbildung 30: Collagenexpression in der Leber nach Virusinfektion in BL/6N und IL-6R ^{-/-} Mäusen.....	72
Abbildung 31: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Aktivierung des Trans-Signalweges mit Hyper-IL-6 in Kombination mit LCMV WE-Infektion.....	74
Abbildung 32: Leberschädigungsmarker ALT und AST in Hyper-IL-6 behandelten Mäusen nach Infektion.....	75
Abbildung 33: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von Hyper-IL-6 behandelten Mäusen nach Infektion.....	76
Abbildung 34: Viruslast im Gewebe von Hyper-IL-6 behandelten Mäusen nach Infektion.....	77
Abbildung 35: Collagenexpression in der Leber nach Virusinfektion in Hyper-IL-6 behandelten Mäusen.	78
Abbildung 36: Expression von α-SMA in der Leber nach Virusinfektion in Hyper-IL-6 behandelten Mäusen.	79

Abbildung 37: Schematische Darstellung der Leberfibrose nach virusinduzierter Schädigung in Abhängigkeit vom IL-6 Signal (I).....	83
Abbildung 38: Schematische Darstellung der Leberfibrose nach virusinduzierter Schädigung in Abhängigkeit vom IL-6 Signal (II).....	89
Abbildung 39: Schematische Darstellung der Leberfibrose nach virusinduzierter Schädigung in Abhängigkeit vom IL-6 Signal (III).....	91

II. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der primären Antikörper.....	24
Tabelle 2: Auflistung der sekundären Antikörper	24
Tabelle 3: Auflistung der Chemikalien	25
Tabelle 4: Auflistung der Geräte	26
Tabelle 5: Auflistung der Kits	27
Tabelle 6: Auflistung der Peptide und Fusionsproteine	27
Tabelle 7: Zusammensetzung der Medien.....	27
Tabelle 8: Auflistung der Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer.....	28
Tabelle 10: Auflistung der Primersequenzen	30
Tabelle 11: Zusammensetzung der Genotypisierungs-PCR-Primer	31
Tabelle 12: Schritte des PCR-Ablaufs	31

III. Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ALT	Alanin Aminotransferase
APC	Allophycocyanin
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
AST	Aspartat Aminotransferase
BDL	Gallengangligatur
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-2	B-Zellstimulationsfaktor-2
BZL-2	B-Zell Lymphoma 2
CD	Cluster of Differentiation
CLC	Cardiotrophin-like cytokine
CMV	Cytomegalovirus
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Cre/loxP	Cre-Rekombinase/ loxP-DANN-Sequenz
CRP	C-Rekatives Protein
CT-1	Cardiotrophin-1
Cy3	Cyanin-Farbstoff-3
D	Domäne
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorban Assay
em	Emission
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ex	Extension
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	Fragment Crystallizable
FDA	Food and Drug Administration
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm oder Vielfaches der Erdbeschleunigung
gp	Glykoprotein
gp130	Glykoprotein 130
GzmB	Granzym B
Hanks's BSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCV	Hepatitis-C-Virus
HGF	hepatocyte growth factor
HSZ	Hepatische Sternzellen
Hyper-IL-6	Hyper-Interleukin-6
IF	Immunfluoreszenz
IFN-β2	Interferone-β2
IFN-γ	Interferone-γ
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin-G

IL	Interleukin
IL-12	Interleukin-12
IL-6	Interleukin-6
IL-6 ^{-/-}	Interleukin-6 deletierte Mauslinie
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IL-6R ^{-/-}	Interleukin-6 Rezeptor deletierte Mauslinie
IL-6R ^{+/+}	Lösliche Interleukin-6 Rezeptor Mauslinie
IL-6R ^{fl/fl}	Interleukin-6 Rezeptor gefloxt Mauslinie
IL-7R	Interleukin-7 Rezeptor
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IZD	Intrazelluläre Domäne
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
KLRG1	Killer cell lectin-like receptor G1
KO	Knock-out
KZ	Kupffer Zellen
L	Liter
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LCMV	Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus
LIF	Leukemia-inhibitory-factor
M	Molar
m/V	Masse pro Volumen
mAb	Monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
mHz	Megahertz
Min	Minuten
Mio	Millionen
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
np	Nukleoprotein
OSM	Onkostatin M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PerCP	Peridinin-chlorophyll-protein complex
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque Forming Unit
pg	Pikogramm
pH	Potential Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
POD	Peroxidase
RA	Rheumatoide Arthritis
RLU	Relativ Light Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SEM	<i>standard error of the mean</i>
sgp130	Soluble (löslicher) Glykoprotein 130
SHP-2	Src Homology-2 domain-containing Phosphatase
sIL-6R	Soluble (löslicher) Interleukin-6 Rezeptor
SLECs	short-lived effector cells
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOCS	Suppressor Of Cytokine
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl ethylendiamin
Tet	Tetramer
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TH2	T-Helfer-2-Zellen
TMD	Transmembrandomäne
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
Tsd	Tausend
TZR	T-Zellrezeptor
U	Units
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i>
WT	Wildtyp
ZBM	Zytokinbindungsmodul
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
α -DG	α -Dystroglycan
α -SMA	α -smooth muscle actin

1. Einleitung

1.1 Zytokine

Als Zytokine werden kleine, mehrfach glykosylierte Proteine bezeichnet, die Proliferation und Differenzierung von Zielzellen regulieren oder auslösen. Weiter unterteilt werden Zytokine und Zytokinrezeptoren in sieben große Familien: Rezeptor Tyrosine Kinase Familie, Klasse I und II Zytokine Rezeptoren, Tumornekrosefaktor Zytokin und Rezeptor Superfamilie, Interleukin-1 Rezeptor Familie, Interleukin-17 Rezeptor Familie, *Transforming growth factor- β* (TGF- β) Rezeptor Familie und Chemokinrezeptoren.¹ Eine Vielzahl von Zellen sezernieren Zytokine, welche von spezifischen Zytokinrezeptoren auf der Oberfläche der Zielzelle erkannt werden. Dabei wirken die Zytokine lokal autokrin oder parakrin bis hin zu systemisch endokrin.^{2,3}

Im Weiteren können Zytokine in verschiedene Familien eingeteilt werden, basierend auf ihrer Struktur und ihres Rezeptors. Hervorstechend und bereits eingehend untersucht ist dabei die Gruppe der Interleukin-6 (IL-6) artigen Zytokine. Mitglieder dieser Familie sind beteiligt sowohl an anti- als auch pro-inflammatorischen Prozessen. Durch diese Vielfalt an Mechanismen stehen einzelne Mitglieder der IL-6 Familie im Fokus klinischer Studien.⁴

1.2 Zytokine der Interleukin-6 Familie

Zu den Mitgliedern dieser Familie gehören neben dem namensgebenden IL-6 auch IL-11, IL-27, IL-31, oncostatin M (OSM), cardiotrophin-1 (CT-1), cardiotrophin-like cytokine (CLC), ciliary neurotrophic factor (CNTF) und leukemia-inhibitor-factor (LIF).³ Neben geringfügigen Homologien in der Proteinsequenz ist vor allem die *up-up-down-down* Topologie der α -Helices in diesen Zytokinen konserviert.^{3,5,6} Die Initiation der Signaltransduktion erfolgt durch Bindung des Zytokins an seinen α -Rezeptor, gefolgt von weiterer Interaktion mit zwei β -Rezeptoren.² Interessanterweise assoziieren hierbei Homo- und Heterodimere des β -Rezeptors zur Bildung des Signalkomplexes.⁷ Als dominant vorkommender β -Rezeptor ist hierbei das Glykoprotein 130 (gp130) zu nennen. Außer IL-31 signalisieren alle Zytokine dieser Familie über einen Rezeptorkomplex bestehend aus mindestens

einem gp130.⁸ Für die Signalweitergabe durch IL-6 und IL-11 wird ein homodimerer Rezeptorkomplex aus gp130 und dem spezifischen α -Rezeptor gebildet.²

Im Fokus dieser Arbeit steht IL-6 als wichtiger Regulator von physiologischen Prozessen, die insbesondere zu Regeneration und Immunantwort beitragen.

1.3 Interleukin-6

Interleukin-6 ist ein 21-28 kDa großes Protein, bestehend aus vier α -Helices mit einer *up-up-down-down* Topologie.^{5,9} Die variable Größe lässt sich durch verschiedene Glykosylierungen erklären. Diese beeinflussen weniger die Funktionalität, sondern dienen vermutlich der Stabilisierung und damit verlängerter Halbwertszeit im Serum.^{10,11} In ersten Berichten wurde IL-6 *mRNA* in Fibroblasten identifiziert und als Interferon- β 2 (IFN- β 2) benannt.¹² Weitere Arbeiten an IL-6 durch Hirano *et al.* 1986 gaben dem Zytokin den Namen B-Zell-Stimulationsfaktor 2 (BSF-2) als notwendiger finaler Stimulus zur Reifung von B-Zellen in Immunglobulin-(Ig) sekretierenden Plasmazellen.¹³ Letztendlich wurde der Name „IL-6“ direkt in Zusammenhang mit IFN- β 2 genannt und damit zugeordnet.¹⁴ IL-6 hat ein breites Wirkungsspektrum, zu dem die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und Thymozyten, Initiation der Akute-Phase-Reaktion, Regeneration von beschädigtem Gewebe und Vermittlung von anti- und pro-inflammatorischen Prozessen zählen.

1.4.1 Signaltransduktion durch Interleukin-6

Die Signaltransduktion von IL-6 erfolgt mit dem IL-6 Rezeptor (IL-6R), sowie einem Homodimer aus gp130. Die Größe des IL-6R beträgt etwa 80 kDa, er ist glykosyliert und zählt zu den Typ-I Transmembranrezeptoren. Der Rezeptor ist aus drei extrazellulären Domänen zusammengesetzt: einer Ig-ähnlichen Domäne (D1) und zwei Fibronectin Typ-III Domänen (D2 und D3), auch Zytokinbindemotiv (CBM) genannt. Weiter folgen eine Stalk-Region, eine Transmembrandomäne (TMD) und eine intrazelluläre Domäne (IZD) (Abb. 1A). Das nahezu ubiquitär exprimierte gp130 hat eine Größe von 130 kDa, ist ein Typ-I Transmembranrezeptor und besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne (D1) gefolgt von fünf Fibronectin Typ-III Domänen (D2 bis

D6) einer TMD und einer IZD. Dabei kann die Signaltransduktion auf drei unterschiedliche Arten erfolgen (Abb. 1B).

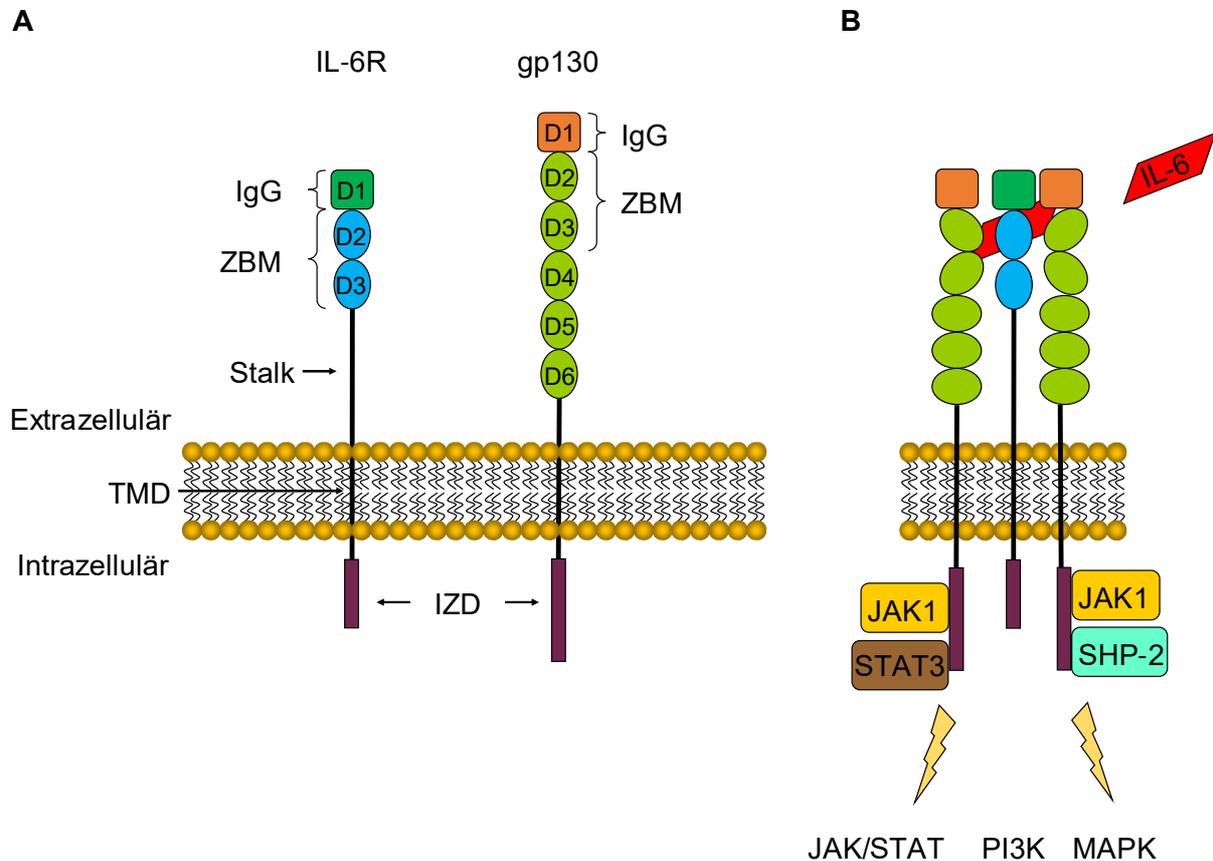


Abbildung 1: Zusammensetzung der Rezeptoren und Rezeptorkomplex. (A) Der IL-6 Rezeptor besteht aus einer IgG-Domäne (D1, grün), dem Zytokinbindemodul (zwei Fibronectin Typ III Domänen, D2 und D3, blau), der Stalk-Region (schwarz), der Transmembrandomäne (TMD, schwarz) und der intrazellulären Domäne (IZD, dunkelrot). Gp130 besteht aus einer IgG-Domäne (D1, orange), dem Zytokinbindemodul (zwei Fibronectin Typ III Domänen, D2 und D3, hellgrün), drei weiteren Fibronectin Typ III Domänen (D4 bis D6), der Transmembrandomäne (TMD, schwarz) und der intrazellulären Domäne (IZD, dunkelrot). (B) Der Rezeptorkomplex wird assoziiert durch Bindung von IL-6 (rot) an den IL-6R. Dies führt zur Rekrutierung von zwei gp130 Rezeptoren und intrazellulärer Signaltransduktion. Primär wird der JAK/STAT Signalweg aktiviert, wodurch STAT3 phosphoryliert wird und in den Zellkern transloziert. Dort sorgt das Dimer für die Transkription von STAT-Zielgenen. Als weitere Signalwege können der PI3K- und MAPK-Signalweg aktiviert werden durch Rekrutierung des Adapterproteins SHP-2.

1.4.2 Die Klassische Interleukin-6 Signaltransduktion

Bei der klassischen Signaltransduktion bindet IL-6 über die Domänen D2 und D3 an den IL-6R gefolgt von weiterer Interaktion mit zwei gp130-Rezeptoren (Abb. 2A). Die Länge des Stalk vom IL-6R ist dabei für eine korrekte Interaktion mit gp130

essentiell.¹⁵ Des Weiteren kann nur ein Komplex aus IL-6/IL-6R mit gp130 interagieren, da weder IL-6 noch der IL-6R alleine eine Affinität zu gp130 vorweisen.¹⁶ Durch Homodimerisierung von gp130 werden die Janus-kinase/signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) Signalkaskade, die phosphatidyl-inositol-3-kinase (PI3K) Signalkaskade und die mitogen-activated protein kinase (MAPK) Signalkaskade initiiert.

Nach Phosphorylierung von gp130 durch JAKs werden STAT1 und STAT3 an phosphorylierte Tyrosine rekrutiert. Dabei bindet STAT1 an die Tyrosinreste Y905 und Y915.¹⁷ STAT3 bindet an die Tyrosinreste Y767, Y814, Y905 und Y915.¹⁷⁻¹⁹ Im Anschluss werden durch aktive JAKs die rekrutierten STAT-Proteine phosphoryliert. Diese bilden Homo- oder Heterodimere und translozieren in den Zellkern. Dort können die STAT-Proteine an spezifischen Bindungsstellen von Promotoren ihrer Zielgene binden und die Transkription von Akute-Phase-Genen, anti-apoptotischen Genen oder proliferatorischen Genen auslösen. Zur Unterbindung einer kontinuierlichen IL-6 induzierten Genexpression werden zusätzlich suppressor of cytokine signaling (SOCS) Gene transkribiert. Die resultierenden Proteine sind *Feedback*-Inhibitoren.²⁰

Der PI3K- und MAPK-Signalweg wird durch Rekrutierung von *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2* (SHP-2) an die phosphorylierten Tyrosinreste Y759 bzw. Y757 in der Maus des gp130 fortgesetzt.^{19,21} An SHP-2 kann das Adapterprotein Gab1 binden, welches die PI3-Kinase aktiviert und somit den PI3K-Signalweg. Zusätzlich kann an SHP-2 ein Komplex aus Grb2-SOS binden, welcher wiederum Ras aktiviert und somit den MAPK-Signalweg induziert.

Die Expression des IL-6R ist im Gegensatz zu gp130 hauptsächlich limitiert auf B- und T-Zellen, Neutrophile, Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Hepatozyten. Jedoch gibt es in der Stalk-Region des IL-6R Erkennungssequenzen für α -Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 10 und ADAM17.²² Diese sind in der Lage, durch proteolytische Spaltung eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R) zu generieren. Eine weitere Quelle für den sIL-6R im Menschen ist alternatives Splicing, welches jedoch nur zwischen 1-10% zu der Gesamtmenge an sIL-6R im Serum beiträgt.

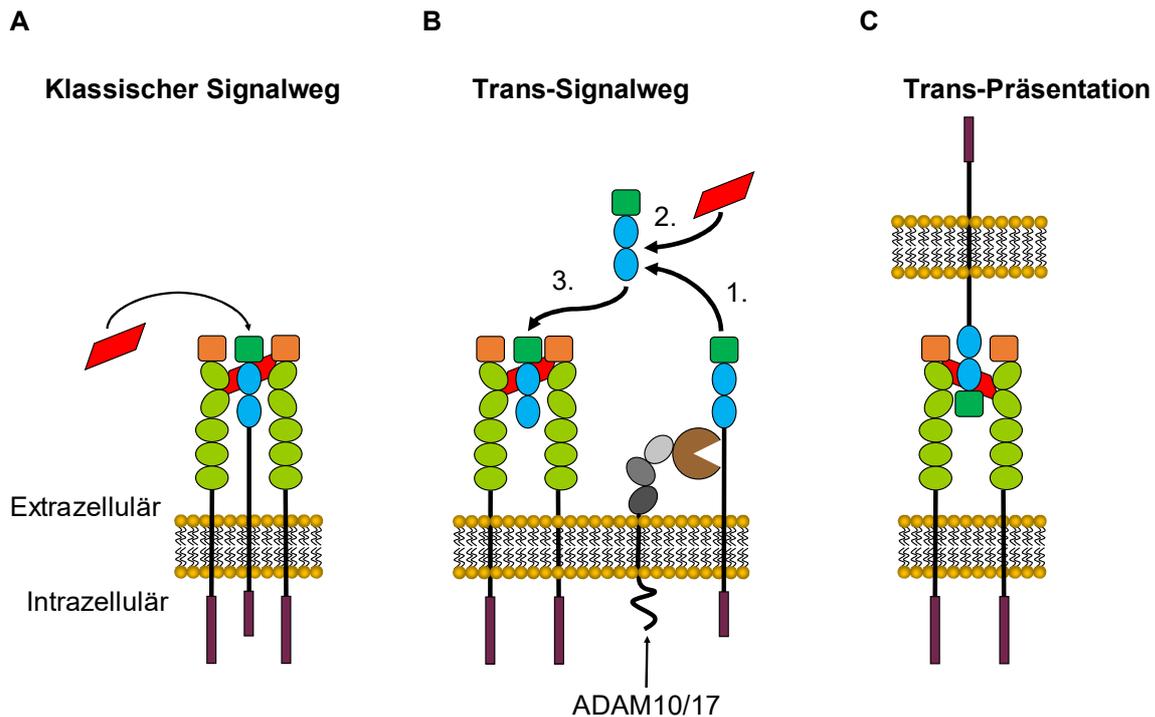


Abbildung 2: Varianten der IL-6 Signaltransduktion. (A) Bei der klassischen Signaltransduktion bindet IL-6 an den membrangebundenen IL-6R. Damit erhöht sich die Affinität zu gp130 und eine Rekrutierung von zwei gp130 Rezeptoren findet statt. Dadurch wird die intrazelluläre Signalkaskade gestartet. **(B)** Durch ADAM-Proteasen kann der membrangebundene IL-6R mittels proteolytischer Spaltung in der Stalk-Region in die lösliche Form überführt werden (1.). An den sIL-6R bindet IL-6 aus dem Serum und bildet den IL-6/sIL-6R Komplex (2.). Dieser Komplex kann an gp130 auf der Zelloberfläche binden, wodurch der Trans-Signalweg initiiert wird (3.). **(C)** Nach Bindung von IL-6 an den membrangebundenen IL-6R der Ausgangszelle kann der Komplex an gp130 der Empfängerzelle binden. Durch diese Trans-präsentation wird eine gp130 Dimerisierung hervorgerufen, welche die intrazelluläre Signalkaskade anstößt.

1.4.3 Der Trans-Signalweg von Interleukin-6

Der Trans-Signalweg unterscheidet sich im Wesentlichen vom klassischen Signalweg durch die Initiation an der Zelloberfläche (Abb. 2B). Wie bereits angesprochen tragen, nur wenige Zellen den IL-6R auf ihrer Oberfläche, aber fast alle Zellen gp130. Durch ADAMs liegt im Serum von gesunden Menschen eine basale Konzentration von 30-75 ng/mL sIL-6R vor, welche Krankheitsbedingt um bis das dreifache ansteigen kann.²³⁻²⁵ Bei Mäusen liegt die Konzentration zwischen 10-14 ng/mL. Etwa 70% davon wird durch Hepatozyten und myeloischen Zellen gebildet.²⁶ Im Serum formt sich ein Komplex aus IL-6 und sIL-6R (IL-6/sIL-6R), da die Bindung von IL-6 an den sIL-6R mit der gleichen Affinität stattfindet wie zu dem membrangebundenen IL-6R.²⁷ Dieser Komplex kann an gp130 auf der Zelloberfläche

binden und eine Homodimerisierung des gp130 initiieren, wodurch die JAK/STAT-, MAPK- und PI3K-Signalkaskaden angestoßen werden.²⁸

Da ein Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R allein durch die Affinität zusammengehalten wird, wurde für Untersuchungen des Trans-Signalwegs ein Fusionsprotein verwendet. Durch Fusion des N-Terminus von IL-6 mit dem C-Terminus von sIL-6R über einen flexiblen Peptidlinker wurde das Designerprotein Hyper-IL-6 generiert. Für Hyper-IL-6 konnte eine 100-1000-fach höhere Aktivität zu gp130 als durch den physiologischen Komplex IL-6/sIL-6R gefunden werden.²⁹

1.4.4 Zell-Zell vermittelte Signaltransduktion

Für dendritische Zellen (DCs) wurde ein weiterer IL-6 Signalweg beschrieben (Abb. 2C).³⁰ Dieser bedarf membrangebunden IL-6R auf DCs an den IL-6 bindet. Mit diesem IL-6/IL-6R-Komplex können die DCs mit gp130 Dimeren auf T-Zellen interagieren. Diese Zell-Zell Signalvermittlung führt zur Inhibition der Interferon- γ (IFN- γ) Produktion in unreifen T-Zellen und zur Differenzierung von T-Zellen zu T_H17-Zellen.

1.5 Die physiologische Rolle von Interleukin-6 und der Signaltransduktion

Interleukin 6 ist ein pleiotropes Zytokin. Aufgrund des großen Wirkspektrums ist IL-6 an sehr vielen Prozessen beteiligt. Zudem sollte unterschieden werden, ob es sich bei der Signaltransduktion um die klassische Variante oder um die Trans-Signalinduktion handelt. Der klassische Signalweg initiiert überwiegend positive Effekte wie die Zellproliferation im Darm, Aktivierung des Immunsystems, Differenzierung von B-Zellen und Einleitung der anti-inflammatorischen Zellantwort.^{31,32}

Die Trans-Signalinduktion hingegen löst die pro-inflammatorische Zellantwort aus, inhibiert die T-Zell-Apoptose und verhindert die Differenzierung von T-regulatorischen (T_{reg}) Zellen. Durch Behandlung von Mäusen mit HIL-6 nach partieller Hepatektomie oder im Modell zur D-Galactosamin induzierten Leberschädigung konnte gezeigt werden, dass die Trans-Signalinduktion einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf hat.³³⁻³⁵ Vor kurzem konnte im Speziellen der Trans-Signalweg für

die Leberregeneration definiert werden. Im Modell zur Leberregeneration nach partieller Hepatektomie wurde gezeigt, dass der Trans-Signalweg und nicht der klassische Signalweg essentiell für die Leberregeneration ist.²⁶ Weiterhin ist zu nennen, dass im Vergleich zum IL-6R die Expression von gp130 auf der Zelloberfläche höher ist. Dadurch ist wahrscheinlich die klassische Signaltransduktion schwächer als die IL-6/sIL-6R vermittelte Signalamplitude.³⁶

Zu den Zelltypen, die IL-6 sekretieren gehören Fibroblasten, Endothelzellen, B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und Monocyten.⁷ Gesunde Menschen haben eine basale Serumkonzentration von 1-10 pg/mL.³⁷ Bei einer Sepsis kann die Serumkonzentration bis auf einige µg/mL ansteigen und führt in diesem Extrem auch zum Tod.³⁸ In der Leber sorgt IL-6 für die Akute-Phase-Reaktion (APR), ist beteiligt an der Leberregeneration, inhibiert die Gluconeogenese, wirkt anti-inflammatorisch und einer Fettleber entgegen.^{4,39-41} Besonders wichtig ist die Initiation der APR durch Hepatozyten bei Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen.⁴²⁻⁴⁴ Durch IL-6 Blockade mittels Antikörper gegen IL-6 und in IL-6 *knock out* (KO) Mäusen wurde bei Infektion mit *Listeria monocytogenes* eine erhöhte Pathogenlast in Milz und Leber gefunden.⁴⁵ Ferner konnten die Autoren den Phänotyp der fehlenden klassischen Signaltransduktion zuschreiben. Im Gehirn bewirkt IL-6 die Aufrechterhaltung der Mikroglia population.⁴⁶ In Skelettmuskeln sorgt IL-6 für die Erhöhung der Glykolyse und unterstützt im Pankreas die Freisetzung von Insulin.³⁹ Weitere Funktionen sind der Schutz der Muskelfasern vor oxidativem Stress und die Aufrechterhaltung des kardiovaskulären Systems.⁴⁷

1.6 Pathologie von Interleukin-6

Neben der Erhaltung einer Homöostase im Körper und gezielter Regulation von IL-6 im Fall einer Erkrankung, führt eine Dysregulation zu erheblicher Pathologie.^{48,49}

Unter pathophysiologischen Bedingungen steigt die IL-6 Konzentration im Serum.^{7,37} Auch für den sIL-6R ist ein Anstieg bei einer Vielzahl von Krankheiten bekannt.⁵⁰⁻⁵² Dadurch findet vermehrt eine Komplexbildung von IL-6 mit dem sIL-6R statt, verbunden mit erhöhter Induzierung des Trans-Signalwegs.

Für den IL-6R wurde ein *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) gefunden, der zu erhöhten Serumkonzentration von IL-6R führt.^{53,54} Dadurch sind die Zellen weniger responsive gegenüber IL-6 und damit Träger des homozygoten SNP geschützt vor dem Ausbruch von rheumatoide Arthritis (RA) oder kardiovaskulären Erkrankungen.⁵⁵ Andererseits bindet der sIL-6R auch freies IL-6 wodurch der pro-inflammatorische Einfluss von IL-6 weiter abgemildert wird.⁵⁶

Die Rolle von IL-6 bei RA war bereits im Fokus einiger Studien, wodurch Zusammenhänge aufgeklärt werden konnten.⁵⁷ Bei dieser Krankheit treten chronische Entzündungen an der Synovia, besonders von kleinen Gelenken auf. Damit verbunden ist die Zerstörung der Gelenkpfanne und des Gelenkbeins. Verbleibt IL-6 zu lang im System, treten hohe Konzentrationen des C-reaktiven Proteins (CRP) auf und pro-inflammatorische TH₁₇ Lymphozyten werden generiert.⁵⁸ Durch weitere komplexe Reaktionen, bei denen neben IL-6 auch andere Zytokine beteiligt sind, werden die Gelenke angegriffen. Häufig wird bei Patienten mit RA auch eine Anämie und Osteoporose beobachtet, welche ebenfalls im Zusammenhang mit dauerhaft erhöhten IL-6 Serumkonzentrationen stehen.^{59,60}

Aufgrund der Beteiligung von IL-6 an physiologischen und pathologischen Prozessen rückte das Zytokin in den Fokus der klinischen Therapie.

1.6.1 Therapeutische Ansätze der IL-6 induzierten Pathologie

Eine distinkte Regulation von IL-6 und der damit verbundenen Signalwege sind essentiell für zelluläre Prozesse und Einstellung einer Homöostase nach einer Erkrankung. Fehlregulation führt zu Erkrankungen wie RA, Multiple Sklerose oder chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen.^{24,61,62}

Gezielte Blockaden von IL-6 oder dem Komplex IL-6/sIL-6R sind von therapeutischem Interesse, um den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen (Abb. 3). Es gibt bereits einige Ansätze, die sich entweder noch in klinischen Studien befinden oder sogar schon für die Behandlung zugelassen sind.⁶³ Für die Behandlung der Castleman-Krankheit wurde Siltuximab zugelassen.⁶⁴ Dieser Antikörper blockiert die Interaktion von IL-6 mit dem IL-6R. Weitere Medikamente sind EBI-029 und Olokizumab, die zur Behandlung von RA, Prostatakrebs und

multiplen Myeloma getestet werden.^{65–68} Diese beiden Medikamente blockieren spezifisch die Interaktion zwischen gp130 und dem IL-6/sIL-6R-Komplex. Ein weiteres Ziel für die Behandlung ist der IL-6R. Tocilizumab und Sarilumab binden an den IL-6R, blockieren die IL-6 Bindung und ermöglichen die Therapie von RA, juvenile idiopathische Arthritis und Castleman-Krankheit.^{69–71} Durch die globale Blockierung des IL-6 Signalweges konnten genannte Krankheiten zwar therapiert werden, jedoch wird auch die physiologische Rolle von IL-6 unterdrückt. Dies führte beispielsweise bei Patienten, die mit Tocilizumab behandelt wurden, zu erhöhtem Infektionsrisiko.^{72,73} Aus dem Grund ist der Trans-Signalweg ein weiteres Ziel für eine spezifische Therapie.

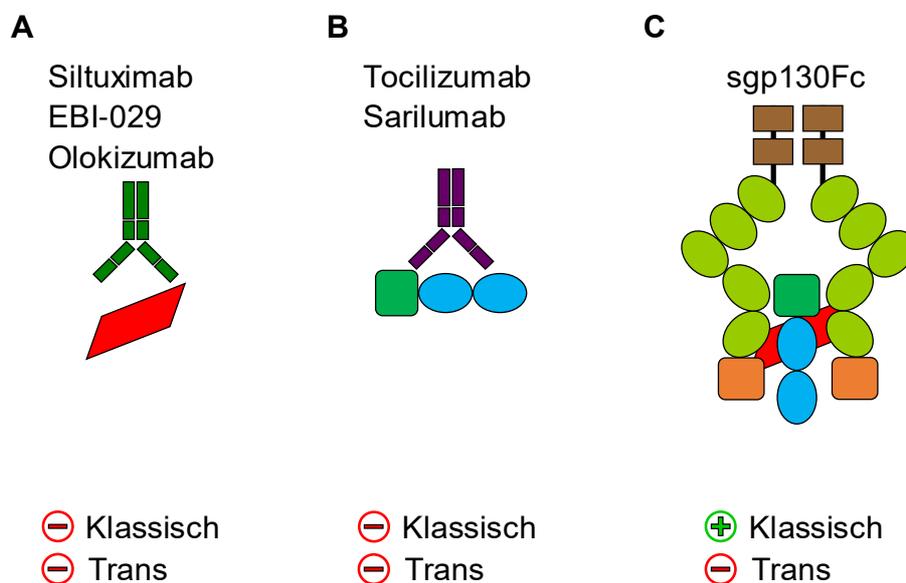


Abbildung 3: Inhibitoren zur therapeutischen Blockade der IL-6 Signaltransduktion. Die Inhibition der IL-6 Signaltransduktion hat bislang 3 verschiedene Ansätze. **(A)** Durch direkte Blockade von IL-6 mit monoklonalen Antikörpern werden beide Signalwege unterbunden. **(B)** Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen membrangebundenen und löslichen IL-6R wird die IL-6 Bindung verhindert und ebenfalls beide Signalwege blockiert. **(C)** Die selektive Blockade des Trans-Signalweges erfolgt mit sgp130Fc durch spezifische Bindung an den IL-6/sIL-6R-Komplex.

Die negativen Auswirkungen des Trans-Signalweges können mit einer löslichen Form des gp130 (sgp130) neutralisiert werden. Im Serum von Menschen konnten Konzentrationen zwischen 100-400 ng/mL sgp130 nachgewiesen werden, die durch alternatives Spleißen der gp130 mRNA entstehen.⁷⁴ Durch die hohe Affinität von sgp130 zu dem IL-6/sIL-6R Komplex ist eine Blockade des Trans-Signalweges

möglich.¹⁶ Ausgehend von dieser Entdeckung wurde ein Fusionsprotein mit dem Namen sgp130Fc generiert. Dieses Protein besteht aus der extrazellulären Domäne des gp130 und der Fc-Region des humanen IgG Antikörpers. Über die Fc-Region dimerisiert das Protein, womit die Affinität zum IL-6/sIL-6R Komplex um den Faktor 10 – 100 zum Monomer gesteigert wird.¹⁶ In Mausmodellen zu Asthma, RA oder neurodegenerativen Krankheiten konnte die spezifische Blockade des Trans-Signalwegs bereits zu einem positiven Krankheitsverlauf beitragen.^{75,76}

1.7 Die Rolle von T-Zell im Immunsystem und IL-6

Das Immunsystem besteht aus angeborener und erworbener Immunität.⁷⁷ Durch Erkennung fremder Antigene ist es möglich, den Wirt vor Viren, Bakterien, Pilzen oder Parasiten zu schützen. Zum angeborenen Immunsystem gehören mechanische Barrieren, Zellen wie Granulozyten oder natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und lösliche Bestandteile wie Interleukine. Die erworbene Immunität setzt sich zusammen aus spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APZ) wie DCs, T-Zellen und B-Zellen. Durch einen komplexen Lernprozess können T-Zellen fremde Antigene mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR) erkennen. B-Zellen hingegen können spezifische Antikörper sezernieren, welche sich gegen Fremdkörper richten.

Vorläufer-T-Zellen ohne CD4 oder CD8 Expression durchlaufen genetische Rekombinationen der α - und β -Ketten des TZR. Durch eine positive Selektion wird gewährleistet, dass der TZR an Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) Klasse I oder Klasse II binden kann. Entsprechend der Interaktion mit einem der beiden MHC wird beispielsweise CD8 exprimiert und CD4 Expression unterdrückt. Bei der anschließenden negativen Selektion werden T-Zellen, die körpereigene Antigene und entsprechendes MHC mit hoher Affinität binden, apoptotisch abgebaut, um Autoimmunität zu verhindern. Reife naive T-Zellen verbleiben inaktiv bis zum Kontakt mit entsprechendem Antigen.⁷⁷

Auch im Immunsystem hat IL-6 weitreichende Funktionen. Für die Differenzierung von T-Zellen zu T-Helfer-2-Zellen (TH2) wird IL-6 benötigt.⁷⁸ Durch Interleukin-4 (IL-4) Induktion erfolgt die Differenzierung aus naiven CD4⁺ T-Zellen. Gleichzeitig beeinträchtigt IL-6 durch Induktion von SOCS-1 die Expression von IFN- γ .⁷⁹ Dadurch wird die Differenzierung zu TH1-Zellen unterdrückt. Eine anhaltend hohe

Konzentration an IL-6 im Serum inhibiert TGF- β und führt zur Differenzierung von CD4⁺-T-Zellen zu Th₁₇-Zellen und verhindert die Bildung von T_{reg}-Zellen.^{80,81} Eine anhaltende Dysregulation fördert dadurch zunehmend die Manifestierung von Autoimmunerkrankungen wie der RA. Dabei findet eine Infiltration von Neutrophilen statt die durch IL-6 aktiviert werden, an die Endothelzellen anheften und proteolytische Enzyme freisetzen, die zur Zerstörung des Gewebes und des Gelenks führen.⁸²

Besonders bei viralen Infektionen haben IL-6 und STAT3 wichtige Funktionen in T-Zellen. Ohne STAT3 ist die Reifung von Gedächtnis CD8⁺ T-Zellen (T_{MEM}), sowie die Entstehung von T-follikulären Helferzellen (T_{FH}) gestört.^{83,84} Nach viraler Infektion ist im Besonderen ein später Stimulus durch IL-6 in virus-spezifischen CD4⁺ T Zellen für die Reifung von B-Zellen im Keimzentrum notwendig.^{85,86} Im Zusammenhang mit akuten viralen Infektionen konnte bislang noch keine Beeinträchtigung durch fehlende IL-6 Signaltransduktion gefunden werden.^{85,87} Bei Infiltration und Aktivierung von Leukozyten zu Entzündungsherden ist die Trans-Signalinduktion ausschlaggebend.^{88,89} Durch gezielte Kontrolle des entzündlichen Infiltrats, Leukozytenapoptose und die Expression entzündlicher Chemokine und Adhäsionsmoleküle dirigiert diese Signalkaskade die Auflösung der inflammatorischen Antwort und den Wechsel von angeborener zu erworbener Immunität.⁹⁰⁻⁹⁶ Für antigenpräsentierende sinusoidale Endothelzellen der Leber konnte gezeigt werden, dass naive T-Zellen, durch Stimulation über den Trans-Signalweg, eine Differenzierung zu Granzym B exprimierenden zytotoxischen T-Zellen durchlaufen.⁹⁷ Besonders diese Effektorfunktion der T-Zellen ist wichtig zur Abtötung infizierter Zellen und Elimination der Viren aus dem System.

1.8 Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus

Der Lymphozytäre-Choriomeningitis-Virus (LCMV) wurde 1933 von Charles Armstrong und R. D. Lillie beschrieben.⁹⁸ Bei Arbeiten an Proben der St. Louis encephalitis Epidemie isolierten die Forscher LCMV als stark abweichenden Stamm im Vergleich zu den bereits beschriebenen Virusstämmen. Später wurde der Stamm als Auslöser für aseptische Meningitis identifiziert und gleichgesetzt mit einem Erreger, der Mausekolonien chronisch infiziert.^{99,100} Der natürliche Wirt für LCMV ist

Mus musculus und *Mus domesticus*. Es kann jedoch auch eine Übertragung auf den Menschen stattfinden, bei der Schäden am zentralen Nervensystem beobachtet werden.¹⁰¹

LCMV gehört zu der Familie der *Arenaviridae* und besteht aus negativer Einzelstrang RNA die in zwei unterschiedlich große Genome (S: etwa 3,5 kb; L: etwa 7.2 kb) unterteilt ist.¹⁰² Dabei kodiert das S-Genom das virale Nukleoprotein (NP), sowie die Vorstufe der Glykoproteine. Das L-Genom kodiert für die virale RNA-abhängige RNA Polymerase (L) und das Z-Protein. Es wurden runde Viruspartikel zwischen 40 und 200 nm gefunden, die eine Lipidhülle besitzen. In dieser Membran befinden sich gleichmäßig verteilt die Glykoproteine. Unterhalb, im Inneren des Virus, sind die Z-Proteine angeordnet (Abb. 4).

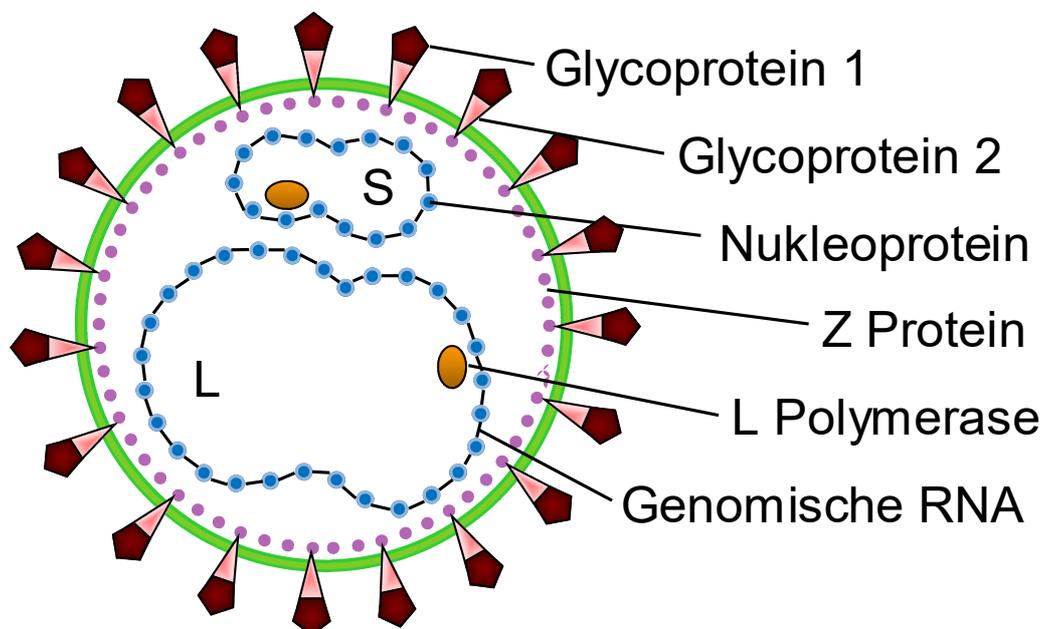


Abbildung 4: Aufbau von LCMV. Der Virus besteht aus zwei Genomen (schwarz) mit assoziierten Nukleoproteinen (blau), der L-Polymerase (orange), dem Matrixprotein Z (lila), einer Lipidhülle (grün) und den darin befindlichen Glykoprotein 2 (rosa) assoziiert an Glycoprotein 1 (rot).

Durch Interaktion von LCMV mit alpha-Dystroglycan (α -DG) auf der Zelloberfläche beginnt die Infektion.¹⁰³ Dabei wird das Glykoprotein gebunden und der Viruspartikel durch Endozytose aufgenommen. Die Vesikel werden zum Endosom transportiert, bei dem der Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) durch pH-abhängige Membranfusion in das Zytoplasma der Zelle gelangt.¹⁰⁴ Im Anschluss dient das RNP als Vorlage für Transkription und Replikation durch die LCMV Polymerase.^{105,106} Als kleinste

infektiöse Einheit ist das NP und die Polymerase L essentiell für eine effiziente RNA-Synthese.¹⁰⁷ Neue Viruspartikel entstehen durch Ansammlung der synthetisierten RNP Komplexe an der Zellmembran zusammen mit Anreicherung des reifen viralen Glykoproteins in der Zellmembran. Schlüsselkomponente zur Abschnürung der neuen Partikel ist das RING-finger Z-Protein, welches auch als Matrixprotein der Viren dient.^{108,109}

Durch die Verwendung von LCMV als Modell zur Erforschung des Immunsystems und antiviraler Mechanismen konnte ein breites Verständnis der heutigen viralen Pathologie und viraler Persistenz geschaffen werden. Des Weiteren konnten Bereiche der Immunologie aufgeklärt werden, wie die Erkennung des MHC durch T-Zellen, Immuntoleranz, CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell-Aktivität und Beteiligung an Immunpathologie und Viruskontrolle, T-Zell-Erschöpfung und Mechanismen nicht-zytolytischer Viren zur Tarnung.^{110,111}

1.8.1 LCMV als Infektionsmodell zur Leberschädigung

Abhängig von der infizierten Dosis, dem Alter der Tiere und Art der Infektion ist es möglich, unterschiedliche Ausprägungen und Immunantworten in der Maus hervorzurufen. Dabei kann weiter zwischen einem akuten und einem chronischen Infektionsverlauf unterschieden werden. Ferner werden dafür definierte LCMV Stämme verwendet. So können persistierende Infektionen mit dem LCMV Docile Stamm ausgelöst werden bei intravenöser Infektion bei Mäusen.^{112,113} Dabei tritt zuerst die T-Zell-Erschöpfung ein, wodurch der Virus in verschiedenen Organen persistiert.¹¹⁴

Durch Infektion von Mäusen mit LCMV WE treten Leberschäden auf, die durch zytotoxische T-Zellen verursacht werden (Abb. 5).¹¹⁵ Dieser hepatotrope Virusstamm sorgt für eine Hepatitis ähnliche Pathologie in Mäusen, die klar von einer Beteiligung durch B-Zellen und Antikörper abzutrennen ist. Während in primär infizierten Organen wie der Milz und der Leber nach 12 Tagen keine Viruslast mehr zu messen ist, persistiert das Virus in peripheren Organen wie der Lunge und der Niere.¹¹⁶

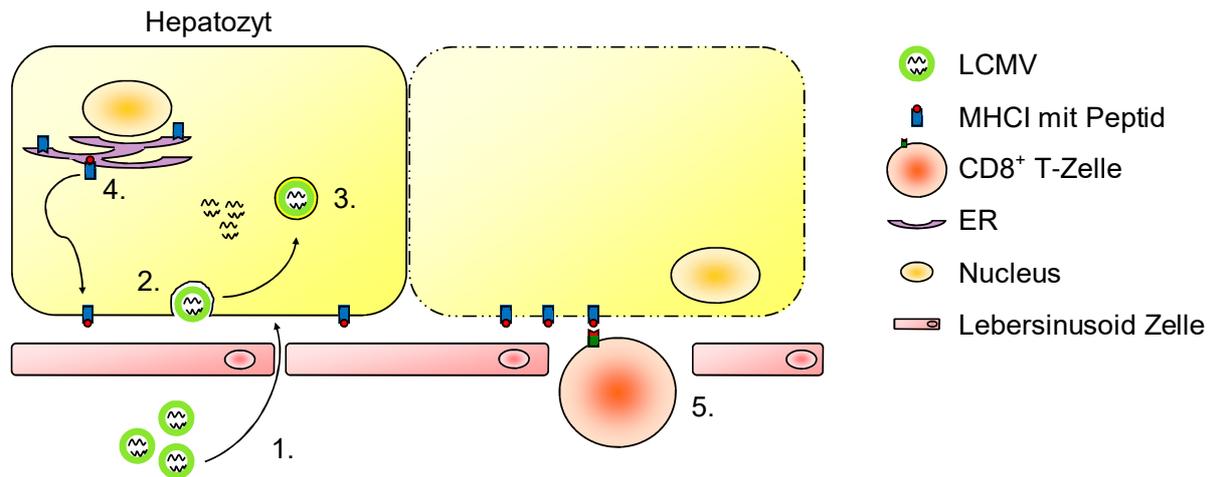


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Hepatozyteninfektion und Entstehung des Leberschadens. Durch Infektion von Mäusen mit mehr als 2×10^5 PFU wird LCMV auch von Hepatozyten aufgenommen. Über die Blutbahn gelangt der Virus in die Leber (1.) und wird dort durch Endozytose aufgenommen (2.). Die Vesikel werden zu den Endosomen transportiert und die RNA zusammen mit den Nukleoproteinen ins Zytosol entlassen (3.). Neu synthetisierte Viruspeptide werden ins endoplasmatische Retikulum transportiert und auf MHC I geladen (4.). Hepatozyten präsentieren die Viruspeptide auf ihrer Oberfläche und werden durch spezifische zytotoxische T-Zellen abgetötet (5.).

1.9 Die Beteiligung von IL-6 bei Infektionen mit LCMV

Ein erster Zusammenhang zwischen IL-6 und LCMV wurde nach Infektion von Mäusen in der Zerebrospinalflüssigkeit festgestellt.¹¹⁷ Zusätzlich konnte der verzeichnete Anstieg ebenfalls in Patientenproben nach einer akuten viralen Infektion festgestellt werden. Wenig später wurden infizierte Mikrogliazellen und Astrozyten als Quelle für IL-6 ausgemacht.^{118,119} Durch weitere Verwendung von LCMV als Modell zur Untersuchung von Infektionen des zentralen Nervensystems (ZNS) konnte die Sezernierung von IL-6 in Korrelation zur Produktion von zufälligen Antikörperklassen gesetzt werden.¹²⁰ Mit Generierung einer IL-6 *knock-out* (IL-6^{-/-}) Mauslinie wurde der bisherige Phänotyp weiter analysiert. Erhöhte Virustiter, sowie verringerte neutralisierende Antikörpertiter konnten nach Infektion mit *vesicular stomatitis virus* (VSV) in den IL-6^{-/-} gefunden werden.⁸⁷ Darauf folgend wurde die Hämatopoese in IL-6^{-/-} Mäusen untersucht, sowie die Aktivität der zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTLs) nach Infektion mit LCMV, die sich nicht wesentlich von Wildtyp-Tieren unterschied.¹²¹ Jedoch konnte im Vorfeld eine Beteiligung von IL-6 bei der Differenzierung der ZTLs beschrieben werden.¹²²

Neben der Beteiligung von IL-6 bei Krankheiten des ZNS wie der *chronic wasting disease* wurde konkret in Rhesusaffen nach Infektion mit LCMV-WE ein Anstieg von IL-6 und sIL-6R gefunden zusammen mit Markern zur Leberschädigung und Leberregeneration.^{123–125}

Dominant verbleibt jedoch die Beteiligung von IL-6 in Kombination mit LCMV-Infektion bei T_{FH} und B-Zellen in der Etablierung einer humoralen Immunantwort. Bei Deletion von IL-6 fehlte nach LCMV-WE-Infektion der erste Anstieg an Immunglobulinen um Tag 12 – 20 nach Infektion.¹²⁶ Durch weitere Experimente in diesem Kontext wurde gezeigt, dass sowohl IL-6 als auch IL-21 zur Differenzierung von T_{FH}-Zellen benötigt werden.¹²⁷ Insbesondere bei chronischen Infektionen ist ein IL-6 Anstieg zwischen Tag 20 und 30 nach Infektion essentiell für die Kontrolle der Viren, sowie das Signal über STAT3 für eine Keimzentrumreaktion zum Erhalt der humoralen Immunantwort.^{84,85} Zuletzt zeigte sich, dass selbst nach akuter LCMV-Infektion das gp130-Signal in T-Zellen die Quantität und Qualität einer lang anhaltenden CD4⁺ T-Zellantwort beeinflusst, sowie die CD8⁺ T-Zell- und Antikörpervermittelte Immunität aus macht.⁸⁶

1.10 Zielsetzung

Das breite Wirkungsspektrum von IL-6 erstreckt sich über die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen und Thymozyten, Initiation der Akute-Phase-Reaktion, Regeneration von beschädigtem Gewebe hinzu der Vermittlung von anti- und pro-inflammatorischen Prozessen. IL-6 und die angeschlossenen Signalkaskaden unter anderem mit STAT3 ist darüber hinaus ein wichtiger Faktor zur Differenzierung von B-Zellen. Damit spielt IL-6 eine entscheidende Rolle bei der Immunantwort gegen Fremdkörper. Im komplexen Zusammenspiel des klassischen, des Trans- und des Cluster-Signalweges von IL-6 ist jedoch in vielen Fällen noch unklar, welchen Beitrag die Signalwege zu den physiologischen Prozessen leisten.

Ziel dieses Projektes ist es daher, in murinen *in vivo* Modellen die Virusabwehr bei einer Infektion mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV) im Hinblick auf den IL-6 Trans-Signalweg zu charakterisieren. Im Weiteren soll im Modell zur virusinduzierten Leberschädigung geklärt werden, welchen Beitrag der Trans-Signalweg zu der Leberregeneration leistet.

Zu diesem Zweck haben wir eine neuartige transgene Maus entwickelt, bei der spezifisch nur der Trans-Signalweg aktiviert werden kann (IL-6 *Trans-signaling* Maus). Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur globalen IL-6 Blockade oder des spezifischen Inhibitors sgp130Fc kann in Wildtyp-Tieren zwischen den beteiligten Signalwegen unterschieden werden. Zuletzt war für dieses Projekt von Interesse, welchen Einfluss eine Stimulation des Trans-Signalwegs auf den Krankheitsverlauf hat und ob damit die Leberregeneration positiv beeinflusst werden kann.

Durch Analyse der T-Zellen, ihrer Funktion, der Viruslast und des Leberschadens ist es im Anschluss möglich, die Beteiligung des Trans-Signalweges im Kontext der virusinduzierten Leberschädigung zu beschreiben.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Primäre Antikörper

Tabelle 1: Auflistung der primären Antikörper

Antikörper	Hersteller	Catalog#	Verdünnung	Anwendung
CD127-FITC	Thermo Fisher	11-1271-85	1:300 (0,5 mg/mL)	FACS
CD8a-PerCP	Thermo Fisher	45-0081-82	1:300 (0,2 mg/mL)	FACS
CD8-PE	Thermo Fisher	12-0083-82	1:300 (0,5 mg/mL)	FACS
Collagen I	Thermo Fisher	PA1-85319	1:200	IF
IFN- γ -APC	Thermo Fisher	17-7311-82	1:300 (0,2 mg/mL)	FACS
IgG1	Bio X Cell	BP0290		Behandlung
IL-6 (20F3)	InVivo Bio Tech Services GmbH			Behandlung
KLRG1-eFlour 450	Thermo Fisher	48-5893-82	1:300 (0,2 mg/mL)	FACS
TNF- α -eFlour 450	Thermo Fisher	48-7321-80	1:300 (0,2 mg/mL)	FACS
VL-4	Hergestellt im Institut für Molekulare Medizin II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf		1:10	Plaque-Assay
α -SMA	Abcam	ab32575	1:200 (25 μ g/mL)	IF
Tet-gp33-APC	Hergestellt im Institut für Molekulare Medizin II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf		1:10	FACS
Tet-np396-APC	Hergestellt im Institut für Molekulare Medizin II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf		1:10	FACS

2.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Auflistung der sekundären Antikörper

Antikörper	Hersteller	Catalog#	Verdünnung	Anwendung
Human IgG, Fcy fragment specific	Jackson Immuno Research	109-035-008	1:500 (0,8 mg/mL)	Plaque-Assay
Rabbit IgG-Cy3	Jackson Immuno Research	111-165-144	1:200 (1,5 mg/mL)	IF

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Auflistung der Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
Alpha MEM	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BM Blue POD	Roche Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Brefeldin A	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Brilliant Blue R	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
Dako Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, USA
DAPI	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Direkt PCR-Tail Lösung	Peqlab, Erlangen, , Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l), mit stabilem Glutamine	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiaminetetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACS Clean	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FACS Shutdown	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Agilent, Santa Clara, USA
Formalin	VWR, Radnor, USA
Fötale Kälber Serum (FKS)	Invitrogen, Oregon, USA
Fötale Kälber Serum ultra low IgG (FKS)	Invitrogen, Oregon, USA
Geneticin, G418	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Hanks' Balanced Salt Solution (Hanks's BSS)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
HD Green	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Isofluran	Piramal, Andhra Pradesh, Indien
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Lysing Solution 10X Concentrate	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylzellulose	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ortho-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS)	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Salzsäure	VWR, Radnor, USA
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Schwefelsäure	VWR, Radnor, USA
Streptavidin-HRP Solution	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue Dye, 0,4%	Bio-Rad, München, Deutschland
Trypsin/EDTA	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Geräte

Tabelle 4: Auflistung der Geräte

Gerät	Hersteller
Äkta Start	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
AXIO Lab A1 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
BD LSRF Fortessa	Becton Dickson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Cryostat	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Gefrierschrank -20°C	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Heracell VIOS 250i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Function Line T6 Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
IVIS Lumina-II Imaging System	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Kühlschrank 4°C	Liebherr GmbH, Rostock, Deutschland
Laborfuge 400R	Heraeus GmbH, Hanau, Deutschland
Licht Mikroskop	VWR, Pennsylvania, USA
LSM510 Laser Scanning Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Multichannel Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nano drop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Observer Z1 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Olympus BX61 Mikroskope	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Pegstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd, Crableck Lane, Großbritannien
pH-Meter	Sartorius, Göttingen Plate, Deutschland
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pumpe für die Sterilbank	HLC BioTech, Göttingen, Deutschland
Rollerbottle System	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg, Deutschland
Schüttler CH-4103	INFORS AG, Bottmingen, Deutschland
Spotchem EZ: SP-4430	Axonlab, Stuttgart, Deutschland
Stuart Block Heater	Bibby Scientific, Staffordshire, Großbritannien
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tecan Infinite M200 PRO Reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
Thermoblock	Eppendorf GmbH, Hamburg
Tissue Lyser II	Qiagen, Hilden, Deutschland
Vortexer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen, Deutschland
Waage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Wasserbad	Aqualine Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland

2.1.5 Kits

Tabelle 5: Auflistung der Kits

Kit	Catalog#	Hersteller
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	G8081	Promega, Walldorf, Deutschland
Mouse IL-6 ELISA	DY406	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mouse sIL-6Ra ELISA	DY1830	R&D Systems, Minneapolis, USA
TopTaq Master Mix Kit	200403	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.6 Peptide und Zytokine

Tabelle 6: Auflistung der Peptide und Fusionsproteine

Peptid	Hersteller
Hyper-IL-6	Hergestellt im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Abschnitt 2.4.9)
sgp130Fc	Hergestellt im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Abschnitt 2.4.9)
gp33	Erhalten vom Institut für Molekulare Medizin II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
np396	Erhalten vom Institut für Molekulare Medizin II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

2.1.7 Medium

Tabelle 7: Zusammensetzung der Medien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Alpha MEM-2 ^{+/+/+}	Alpha MEM + 10 mL FKS + 5 mL Pen/Strep + 5 mL GlutaMAX
Alpha MEM-5 ^{+/+/+}	Alpha MEM + 25 mL FKS + 5 mL Pen/Strep + 5 mL GlutaMAX
DMEM ^{+/+}	DMEM + 50 mL FKS + 5 mL Pen/Strep
DMEM ^{+/+/+}	DMEM + 50 mL FKS + 5 mL Pen/Strep + 5 mL G418
DMEM-P ^{+/+/+}	DMEM + 25 mL FKS ultra low IgG + 5 mL Pen/Strep + 5 mL G418
Hanks's BSS	Ohne Zusätze
Hanks's BSS 1% Triton-X100	Hanks's BSS + 1% Triton-X100
IMDM ^{+/+/+}	DMEM + 50 mL FKS + 5 mL Pen/Strep + 5 mL GlutaMAX

2.1.8 Materialien

Tabelle 8: Auflistung der Verbrauchsmaterialien

Art	Hersteller
24 Well Platten	Starlab, Hamburg, Deutschland
96 Well U bottom Platte	TTP, Trasadingen, Schweiz
Eppendorf Reaktionsgefäße (1,5 mL und 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
FACS 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Biosciences, Franklin Lake, USA
Falcon (15 mL und 50 mL)	BD Biosciences, Franklin Lake, USA
HiTrap MabSelect SuRe	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
illustra™ NAP™ Säulen	GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien
Kryotubes	Fisherbrand, Schwerte, Deutschland
Liquid Blocker	Science Services GmbH, München, Deutschland
Microvette® 500 µl, Lithium-Heparin	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Mikrotiterplatte ELISA (96-Well)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Nitra-Tex Handschuhe	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgium
OMNICAN Insulinspritze 1 ml U100 m.Kan. 0,30x8 mm	B. Braun Melsungen AG, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Roller Bottles	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spotchem II Liver-1 (Teststreifen)	Arkray, Amstelveen, Niederlande
Spotchem-Probencup	Axonlab, Stuttgart, Deutschland
Spotchem-Spitzen	Axonlab, Stuttgart, Deutschland
Stainless Stahl Kugeln	Qiagen, Hilden, Deutschland
StarFrost Glasträger	VWR, Darmstadt, Deutschland
Strippeten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Corning Incorporated, Coming, USA
TC10 System Counting Slides Dual Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflaschen	TTP, Trasadingen, Schweiz

2.1.9 Lösungen

Tabelle 9: Zusammensetzung der Puffer

Lösung	Zusammensetzung
2x Überdeckungslösung (für Plaqueassay)	50 mL IMDM (9x) 175 mL dH ₂ O pH 7,4 sterilfiltriert (0,22 µm) 25 mL FKS 5 mL Pen/Strep, L-Glutamin
Antikörper Verdünnung (für Plaqueassay)	PBS 1% FCS
Blockierungspuffer (für Plaqueassay)	PBS 10% FCS
Coomassie-Entfärbelösung	20% (V/V) Methanol 7% (V/V) Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	0,5% (w/V) Coomassie Brilliant Blue R 50% (V/V) Methanol 7% (V/V) Essigsäure
DNA-Probenpuffer 6x	30% (m/V) Glycerol in TAE-Puffer 50 mM EDTA

	0,25% Orange-G
ELISA Blockierungspuffer	PBS 1% BSA sterilfiltriert (0,22 µm)
ELISA Waschpuffer	PBS 0,05% Tween-20
FACS Puffer	PBS 0,5 mM EDTA 1% FKS
Färbelösung (für Plaqueassay)	12,5 mL Farbreagenz A 12,5 mL Farbreagenz B 25 mL dH ₂ O 30 mg Ortho-Phenyldiamin 0,1% H ₂ O ₂ (30%)
Farbreagenz A (für Plaqueassay)	dH ₂ O 0,2 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
Farbreagenz B (für Plaqueassay)	dH ₂ O 0,1 M C ₆ H ₈ O ₇
Fixierpuffer (für Plaqueassay)	PBS 4% Formalin
Histologie Blockierungspuffer	PBS 10% FCS
Histologie Waschpuffer	PBS 0,05% Tween-20
Lämmli-Puffer 5x	10% (m/V) SDS 5% (m/V) β-Mercaptoethanol 50% (m/V) Glycerol 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Methylcellulose (für Plaqueassay)	dH ₂ O 2% Methylcellulose
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
Permeabilisierungspuffer (für FACS)	PBS 0,5 mM EDTA 1% FKS 1% Saponinlösung
Permeabilisierungspuffer (für Plaqueassay)	Hanks BSS 1% Triton X-100
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4% (m/V) SDS
Saponinlösung	PBS 1% Saponin, von Quillaja
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1% (m/V) SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,4% SDS
Zellfixierung (für FACS)	PBS 2% Formalin

2.1.10 Primer

Tabelle 10: Auflistung der Primersequenzen

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
Ex3 Ende p10	GGGTAGGCCCTGCTACCATGAAG
Ex6 intr fw	GGTCACGGGCACTCCTTGGATAGGTACC
IL-6R flox rev	CCCAGTGAGCTCCACCATCAAA
Lox1-sIL-6R	TAGGAAAGGTAGACAGAACACTCTGG
NDEL1-sIL-6R	CCTGTCCATGCTCTGCTTCA
NDEL2-sIL-6R	CCTCGGTGACCACTAACATCAC

2.2 Tierexperimentelle Methoden

2.2.1 Tiere und Tierhaltung

Wildtyp Mäuse (BL/6N) wurden von Janvier (Frankreich) gekauft. Die sIL-6R^{fl/fl} Mäuse wurden von inGenious targeting laboratory (www.genetargeting.com) generiert und zuvor beschrieben.²⁶ Die IL-6R^{-/-} stammen von The Jackson Laboratory (USA). Die Tiere wurden in der ZETT für 10 Generationen zurückgekreuzt auf den C57BL/6N-Hintergrund. Alle Experimente dieser Studie wurden nach den Vorschriften des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), Deutschland, Nordrhein-Westfalen, Recklinghausen entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Das Aktenzeichen lautet 84-02.04.2015.G460. Projekt G460/15.

Alle Mäuse wurden unter pathogenfreien Bedingungen gehalten. Die Versorgung wurde nach den Vorgaben definiert durch FELASA und die Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) (www.gv-solas.de) gestaltet. Die transgenen Mäuse basieren auf dem C57BL/6N Hintergrund. Die Mäuse wurden mit einer Standard Labordiet gefüttert und hatten Zugang zu autoklaviertem Wasser *ad libitum*. Die Mäuse wurden in einem klimatisierten Raum (20 – 24 °C) mit kontrollierter Luftfeuchtigkeit (45 – 65%) und einem Tag-Nacht-Zyklus von jeweils 12 Stunden gehalten.

2.2.2 Isolierung der DNA aus Schwanzspitzen

Die DNA der Mäuse wurde aus Schwanzspitzenbiopsien oder Ohrstanzen gewonnen. Dazu wurde das Gewebestück einer Maus lysiert. In einem Reaktionsgefäß mit dem jeweiligen Gewebestück wurde 200 µl Direkt PCR-Tail

Lösung und 2 µl Proteinase K (0,2 mg/ml) gegeben. Durch die proteolytische Verdauung der Zellen wurde die genomische DNA freigelegt. Dazu wurde die Probe bei 55 °C im Thermoblock über Nacht inkubiert. Ständiges Schütteln gewährleistete eine gleichmäßige Lyse. Am folgenden Tag wurde die Proteinase K bei 95 °C für 15 Min im Thermoblock hitzeinaktiviert. Verbliebene Haare wurden durch Zentrifugation bei 20000 g für 10 Min bei 4 °C sedimentiert und die Probe bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3 Genotypisierung der Mäuse mittels PCR

Zur Validierung des Genotyps der transgenen Mäuse wurde die *polymerase chain reaction* (PCR) verwendet. Für eine Probe wurde 2 µl Template-DNA, jeweils 0,5 µl 5'- und 3'- Primer (100 pM), 10 µl TopTaq-Mix und 7 µl dH₂O eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in der Tabelle 10 aufgelistet. Die eingesetzten Primerkombinationen sind in Tabelle 11 aufgelistet. Das verwendete PCR-Programm der Genotypisierungen ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 11: Zusammensetzung der Genotypisierungs-PCR-Primer

Name der Reaktion	Primerkombination	Resultat
IL-6R KO Typisierung	Ex6 intr fw Ex3 Ende p10 IL-6R flox rev	Wildtyp: 364 bp KO: 623 bp
sIL-6R Typisierung	NDEL1-sIL-6R NDEL2-sIL-6R Lox1-sIL-6R	sIL-6RWT/WT: 181 bp sIL-6Rfl/fl: 358 bp sIL-6R+/+: 480 bp

Tabelle 12: Schritte des PCR-Ablaufs

Schritt	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 Min	95 °C
Denaturierung	30 sek	95 °C
Annealing	1 Min	60 °C
Elongation	1 Min	72 °C
Elongation	5 Min	72 °C

} 35x

2.2.4 Vorbereitung der Mäuse

Die bestellten Wildtyp-Mäuse von Janvier wurden mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn im Versuchsraum zur Akklimatisierung gehalten. Tiere aus der ZETT

wurden für mindestens 3 Tage im Versuchsraum zur Akklimation gehalten. Vor der Infektion oder der Behandlung wurden alle Mäuse gewogen. Danach erfolgte ein weiteres Wiegen nach 7 Tagen. Nur Mäuse mit einem Gewicht über 20 g wurden für die Experimente verwendet.

2.2.5 Behandlung der Mäuse mit rekombinanten Proteinen oder Antikörpern

Allen Mäusen wurden die rekombinanten Proteine oder monoklonale Antikörper intraperitoneal injiziert. Bezüglich sgp130Fc wurde 16 Stunden vor der Infektion 50 µg/ Maus in 200 µL PBS injiziert. Von den Antikörpern Isotyp IgG und IL-6 mAb wurde 16 Stunden vor der Infektion 500 µg/ Maus in 200 µL PBS injiziert. Nach 48 Stunden wurde die Behandlung mit 250 µg/ Maus Isotyp IgG oder IL-6 mAb oder 50 µg/ Maus sgp130Fc in 200 µL PBS wiederholt. Diese Behandlung wurde im Anschluss bis zum Ende des Experiments alle 48 Stunden wiederholt.

Von dem rekombinanten Protein HIL-6 wurde immer 10 µg/ Maus in 200 µL PBS injiziert. Die PBS-Gruppe erhielt durchgängig nur eine Behandlung mit PBS. Wurde einer Kohorte in der gleichen Experimentreihe kein Hyper-IL-6 verabreicht, so wurde nur 200 µL PBS in die Tiere gespritzt. Neben der Kontrollgruppe gab es drei weitere Gruppen. Die Hyper-IL-6 *post*-Gruppe erhielt 16 Stunden vor und am Tag der Infektion eine Behandlung mit 200 µL PBS. Im Anschluss wurde den Tieren täglich Hyper-IL-6 appliziert. Die Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe erhielt 16 Stunden vor der Infektion und danach täglich eine Dosis von 10 µg/ Maus in 200 µL PBS. Die Hyper-IL-6 *prä*-Gruppe erhielt nur 16 Stunden vor und am Tag der Infektion eine Behandlung mit Hyper-IL-6. An den Folgetagen wurde zum Ausgleich nur PBS in die Tiere gespritzt.

2.2.6 Blutentnahme aus der Maus

Zur Blutentnahme wurden die Tiere mittels Inhalations-Narkosekammer betäubt. Dazu wurde die Luft in der Narkosekammer mit 40% Sauerstoff angereichert und mit 2% Vol. Isofluran versetzt. Dem so betäubten Tier wurde retrobulbär mit einer Kanüle Blut entnommen. Dabei wurde maximal 100 µL Blut entnommen und in Microvette 500 Li-Hep Gelgefäßen aufgefangen. Aufgrund mehrfacher Entnahme während des

Untersuchungszeitraums wurde abwechselnd aus dem linken und dem rechten Auge Blut entnommen. Das Blut wurde auf Eis transportiert und für die Experimente aliquotiert. Restliches Blut wurde am gleichen Tag mittels Zentrifugation (8000 g, 10 Min, 4 °C) separiert und das Serum bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.7 Aufarbeitung der Tiere

Nach der Blutentnahme wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Es wurden Gewebeproben der Leber, der Lunge, der Milz, des Gehirns und des Spinalkanals entnommen. Gewebeproben für die FACS-Analyse wurden in 1 mL IMDM (10% FCS, 1% Penicillin-Streptomycin, L-Glutamin) aufgenommen und im Eisbad zwischengelagert. Proben für den Plaque-Assay wurden in 1 mL Hank's BSS aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gewebeproben für Immunfluoreszenz wurden in Wachs eingebettet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.3 Virus

Lymphozytärer-Choriomeningitis-Virus (LCMV) WE Stamm war ein Geschenk von F. Lahmann-Grube (Heinrich Pette Institut). Vermehrt wurde LCMV WE in L929 Zellen wie zuvor beschrieben.¹²⁸ Der Virus wurde durch Schwanzveneninjektion den Mäusen appliziert.

2.4 Biochemische Methoden

2.4.1 Serumanalyse

Aspartat Aminotransferase (AST) und Alanin Aminotransferase (ALT) wurden mittels Spotchem EZ SP-4430 und Liver-1 Teststreifen bestimmt. Dafür wurde das Serum auf Raumtemperatur gebracht und mit PBS verdünnt.

2.4.2 ELISA

Die Konzentration von murinem Interleukin-6 und löslichem Interleukin-6 Rezeptor im Serum wurden mit Kits von R&D (DY406, DY1830) nach Herstellerangaben quantifiziert, ausgenommen der Farbreaktion. Nach dem letzten Waschschrift wurde 100 µL BM blue POD Substrat in die Wells pipettiert und die Platte für 10 – 20 Min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 50 µL 1,8 M H₂SO₄ wurde die Reaktion gestoppt. Die Messung erfolgte innerhalb von 20 Min am Tecan Infinite M200 PRO Reader.

2.4.3 Histologie

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden Organe nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff, eingebettet in Tissue-Tek und schockgefroren. Es wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte auf Glasträgern platziert und an der Luft getrocknet. Die Schnitte wurden für 10 Min in Aceton fixiert und anschließend mit einem Fatpen umzeichnet. Im Anschluss wurden die Schnitte für 1 Stunde mit 10% FKS in PBS blockiert. Die Schnitte wurden mit 0.05% Tween-20 in PBS gewaschen und anschließend für 1 Stunde mit Col1A1 (1:200, Intvitrogen) oder α-SMA (1:200, abcam) in 2% fötalem Kälberserum in PBS gefärbt. Danach wurden die Proben mit 0.05% Tween-20 in PBS gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper Cy3 (1:200, Jackson Immuno Research) mit zusätzlich DAPI (1:1000) in 2% FKS in PBS für 1 Stunde inkubiert. Die Schnitte wurden 0.05% Tween-20 in PBS gewaschen und mit Fluoreszenzeindeckmedium konserviert. Die Bilder wurden mit einem Zeiss ApoTome 2-System Mikroskop, an dem eine Axiocam 506-Digitalkamera angeschlossen ist, aufgenommen. Die Bilder wurden mit der Bildgebungssoftware ZEN 2.3 und der Image-J-Software (1.49v) analysiert.

2.4.4 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die MC57 Zellen wurden in T175 Zellkulturflaschen kultiviert. Dazu wurde 20 mL alpha MEM-5^{+/+/+} (5% FKS, 1% Pen/Strep, 1% GlutaMAX) verwendet. Die Zellen wurden in einem Heracell VIOS 250i CO₂ Inkubator kultiviert. Dieser wurde auf 37 °C und 5% CO₂-Gehalt eingestellt und hatte eine gesättigte Wasserdampfatosphäre. Die Zellen wurden je nach Konfluenz alle 2 – 3 Tage im Verhältnis 1:5 aufgeteilt.

Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellschicht 2 Mal mit je 5 mL PBS gewaschen. Überschüssiges PBS wurde nach jedem Schritt abgesaugt. Zu den Zellen wurde zur Ablösung 4 mL Trypsin/EDTA gegeben und die Zellkulturflasche für etwa 5 Min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Wirkung von Trypsin/EDTA wurde durch Zugabe von 10 mL alpha MEM-5^{+/+/+} gestoppt. Die Zellen wurden in ein Falcon überführt und bei 300 g für 5 Min sedimentiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 mL PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 300 g für 5 Min wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in alpha MEM-5^{+/+/+} aufgenommen. Entsprechend dem Verhältnis von 1:5 wurden die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt und 20 mL alpha MEM zugegeben.

CHO-Zellen wurden nach dem gleichen Verfahren kultiviert. Dabei wurde jedoch DMEM^{+/+/+} (10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% G418 (50 mg/mL)) verwendet und die Zellen alle 4 Tage im Verhältnis 1:100 aufgeteilt.

2.4.5 Plaqueassay

Die Bestimmung der Viruslast in Organen oder im Serum wurde mittels Plaqueassay ermittelt. Nach Entnahme der Organe wurden diese in 1 mL Hanks' BSS in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Vollblut wurde nach Entnahme zentrifugiert (1000 g, 10 Min, 4 °C) und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Vorbereitung wurden genügend MC57 Zellen kultiviert, abgelöst mit Trypsin/EDTA, gewaschen mit PBS (300 g, 5 Min) und auf 1×10^6 Zellen/mL in alpha MEM-2^{+/+/+} (2% FKS, 1% Pen/Strep, 1% GlutaMAX) eingestellt. Die gefrorenen Proben wurden vor der Auftragung aufgetaut. Zu den Organen wurde eine Metallkugel gegeben und diese im Tissue Lyser für 3 Min bei 30 Hz homogenisiert. Die aufgetauten Proben wurden im Anschluss auf Eis aufbewahrt. Für die Verdünnungsreihe wurde in 96-Well Platten 130 µL alpha MEM-2^{+/+/+} in den Spalten 2 – 12 vorgelegt. Bei der Titration von Serum wurde zusätzlich 63 µL alpha MEM-2^{+/+/+} in Spalte 1 vorgelegt. Von den Organhomogenisaten wurde in Duplikaten (A-B, C-D, etc.) 90 µL in die erste Spalte vorgelegt. Vom Serum wurde 7 µL in die erste Spalte pipettiert. Die Proben wurden von links nach rechts, entsprechend einer Verdünnungsreihe, mit 60 µL je Probe transferiert. Nach Erreichen von Spalte 7 wurden die Spitzen gewechselt. Im Anschluss wurde 100 µL jeder Verdünnung aus den Spalten 2, 4, 6, 8, 10 und 12 in eine 24-Well Platte in die Spalten 1, 2, 3, 4, 5 und 6 transferiert. Zu den verdünnten

Proben wurden jeweils 200 μL der MC57 Zellsuspension gegeben und die Platte im Inkubator (37 °C, 5% CO_2) mindestens 2 Stunden inkubiert. Nachdem sich alle Zellen abgesetzt hatten, wurde in jedes Well 200 μL von einem 1:1 Gemisch aus der 2% Methylcellulose und der 2x Überdeckungslösung gegeben. Die Platten wurden im Inkubator für zwei Tage aufbewahrt.

Hat sich nach zwei Tagen eine vollständige Einzelzellschicht gebildet, wurde mit der Färbung der infizierten Zellen begonnen. Dazu wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 200 μL Fixierpuffer (4% Formalin in PBS) für 30 Min bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wurde der Überstand entfernt und die Zellen mit 200 μL Permeabilisierungspuffer (1% Triton X-100 in Hanks' BSS) bei Raumtemperatur für 20 Min permeabilisiert. Der Überstand wurde entfernt und die Platten zwei Mal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von 200 μL Blockierungspuffer (10% FKS in PBS) wurden die Platten für mehr als eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen mit 200 μL Primärantikörperüberstand VL-4 (1:10 verdünnt in 1% FKS in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die Platten zwei Mal mit PBS gewaschen. Als nächstes wurde zu den Zellen 200 μL rat HRP Sekundärantikörper (1:500 in 1% FKS in PBS) gegeben und die Platten für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten zwei Mal mit PBS gewaschen und in jedes Well 200 μL Färbelösung pipettiert. Die Platten wurden für etwa 15 Min bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktion durch Waschen mit Leitungswasser gestoppt. Nachdem die Platten getrocknet waren, konnten die Plaques ausgezählt werden.

2.4.6 Tetramerfärbung für Durchflusszytometrie

Zur Färbung von Vollblut wurde 20 μL heparinisertes Blut verwendet. Einzelzellsuspensionen von Milz- und Leberzellen wurden durch Terreiben von einem Drittel Milz oder einem kleinen Leberlappen in 1 mL IMDM^{+/+/+} (10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% GlutaMAX) hergestellt. Davon wurden jeweils 10 μL zur Färbung verwendet (entspricht etwa 5×10^5 Zellen). Nach der Zugabe von 50 μL Tetramerverdünnung (tet-gep33, tet-np396) wurden die Proben für 15 Min im Inkubator (37 °C, 5% CO_2) aufbewahrt. Zu jeder Probe wurde 50 μL

Antikörperverdünnung zur Oberflächenfärbung hinzugefügt und für 30 Min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert.

Das Vollblut wurde einmal mit 1x BD FACS™ lysing solution gewaschen (300 g, 5 Min) und erneut in 200 µL 1x BD FACS™ lysing solution resuspendiert. Das Blut wurde für 10 Min im Dunkeln bei Raumtemperatur lysiert. Im Anschluss wurden die Zellen zentrifugiert (300 g, 5 Min, 4 °C) und in FACS Puffer resuspendiert. Die gefärbten Zellen aus Milz und Leber wurden nach der Oberflächenfärbung mit FACS Puffer gewaschen (300 g, 5 Min, 4 °C) und erneut in FACS Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden im Anschluss am Durchflusszytometer analysiert.

2.4.7 Intrazelluläre Zytokinfärbung für Durchflusszytometrie

Zur Färbung von intrazellulären Zytokinen wurden Einzelzellsuspensionen aus Milz und Leber verwendet. Dafür wurden 10^6 Zellen in 100 µL IMDM^{+/+/+} (10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% GlutaMAX) vorgelegt und 100 µL verdünnte Peptide (gp33, np396, 1 µg/mL in IMDM^{+/+/+}) hinzu pipettiert. Die Zellen wurden für eine Stunde im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) stimuliert. Im Anschluss wurde 20 µL Brefeldin A (1:100 Verdünnung) hinzugegeben und die Zellen für 5 Stunden im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) stimuliert. Der Überstand wurde entfernt und die Oberflächenmarker der Zellen wurden in 50 µL Antikörperverdünnung über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank gefärbt.

Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst mit 2% Formalin in PBS gewaschen (300 g, 5 Min) und mit der gleichen Lösung im Dunkeln für 10 Min bei RT fixiert. Die Zellen wurden zwei Mal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (300 g, 5 Min, RT) und anschließend in 50 µL Permeabilisierungspuffer mit Antikörperverdünnung aufgenommen. Die intrazellulären Zytokine wurden bei 4 °C im Kühlschrank für 30 Min gefärbt. Die gefärbten Zellen wurden mit Permeabilisierungspuffer gewaschen (300 g, 5 Min, RT), in frischem Permeabilisierungspuffer aufgenommen und am Durchflusszytometer analysiert.

2.4.8 Rollerbottle-Kultivierung von CHO Zellen

Zur Generierung großer Mengen an Zellkulturüberstand mit sezernierten rekombinanten Proteinen aus adhärennten Zellen können *Rollerbottles* eingesetzt

werden. Für die Inokulation wurden in einer Vorkultur 14 Schalen (\varnothing 15 cm) eines CHO-Zellklons kultiviert in DMEM^{+/+/+} (10% FKS, 1% Pen/Strep, 1% G418 (50 mg/mL)) vorbereitet. Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA abgelöst und in die *Rollerbottle* überführt. Nach Zugabe von 400 mL DMEM^{+/+/+} wurden die Zellen für 84 Stunden im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) unter ständiger Rotation kultiviert. Nach dieser Zeit wurde das Medium gegen 400 mL DMEM-P^{+/+/+} (5% FKS *ultra low IgG*, 1% Pen/Strep, 1% G418 (50 mg/mL)) ausgetauscht und die Zellen für weitere 84 Stunden im Inkubator kultiviert. Danach wurde das Medium abgenommen, verworfen und frisches DMEM-P^{+/+/+} zugefügt. Nach einem weiteren Zyklus wurde das abgenommene Medium mit den sezernierten rekombinanten Proteinen in zwei Schritten zentrifugiert. Zuerst bei 1000 g für 15 Min bei 4 °C, das Pellet entfernt und erneut zentrifugiert bei 10000 g für 30 Min bei 4 °C. Der klare Überstand wurde durch ein Sterilfilter (Porengröße 0,45 μ m) gesaugt und bei -80 °C gelagert.

2.4.9 Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Zellkulturüberständen

Zur Reinigung von Fc-Fusionsproteinen wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurden die vorbereiteten Überstände aus Abschnitt 2.4.8 aufgetaut und mit einer EDTA-freien Protease Inhibitor Cocktail Tablette versetzt. Der Überstand wurde mithilfe des ÄKTA Start-Systems über eine Protein A Säule geleitet, in der die Fc-Fusionsproteine binden. Nach einem Waschschriff mit PBS wurden die Proteine mittels Citrat-Puffer (pH 3,5) von der Säule eluiert und der pH-Wert im Eluat auf etwa 7 eingestellt. Die Proteinlösung wurde konzentriert und für einen Pufferaustausch über eine NAP-Säule geleitet. Das gereinigte rekombinante Protein wurde aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.4.10 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mithilfe des automatischen Zellzählers TC10 durchgeführt. Dazu wurde von der Einzelzellsuspension 10 μ L in ein Reaktionsgefäß pipettiert und 10 μ L Trypan Blue Dye hinzugegeben. Die Suspension wurde vermischt und anschließend 10 μ L in ein TC10 System Counting Slide Dual Chamber pipettiert. Der Träger wurde zur Zellzahlbestimmung in dem Zellzähler TC10 platziert.

2.4.11 Proliferationsassay

Zur Aktivitätsbestimmung von sgp130Fc und HIL-6 wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Ba/F3-gp130 Zellen wurden sedimentiert (300 g, 5 Min, RT) und drei Mal mit PBS gewaschen (300 g, 5 Min, RT). Die Zellen wurden in DMEM^{+/+} (10% FKS, 1% Pen/Strep) resuspendiert und auf 5×10^4 Zellen/mL eingestellt. Von dieser Verdünnung wurden 100 μ L in ein Well einer 96-Well Platte pipettiert. Die Zellen wurden mit den zu testenden rekombinanten Proteinen entsprechend in einer Verdünnungsreihe versetzt. Im Anschluss wurden die Zellen für 72 Stunden im Inkubator (37 °C, 5% CO₂) kultiviert und die Proliferation mithilfe des CellTiter-Blue Cell Viability Kits bestimmt. Dazu wurden 20 μ L des CellTiter-Blue-Reagenz in jedes Well pipettiert und die Proliferation anhand des Farbumschlags in *relative light units* (RLU) gemessen. Lebende Zellen reduzieren den Farbstoff Resazurin zu Resorufin, wodurch eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 605 nm hinzu 573 nm erfolgt. Die 96-Well Platte wurde dazu im Tecan Infinite M200 PRO Reader (ex-Filter 530/25, em-Filter 590/35) direkt nach Zugabe des CellTiter-Blue und nach 60 Min gemessen. Von allen Werten wurden Triplikate gemessen.

2.4.12 SDS-Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle nach der Reinigung wurden die rekombinanten Proteine mittels einer diskontinuierlichen SDS-PAGE Gelelektrophorese anhand ihres Molekulargewichts analysiert. Dazu wurden Proben jeder Fraktion genommen, mit 5x Lämmli versetzt bei 95 °C für 10 Min gekocht. Dadurch wurden die Proteine denaturiert. Es wurden Polyacrylamidgele, Sammelgel gefolgt von 10%igem Trenngel, mit einer Stärke von 1,5 mm und 10 Probenkammern hergestellt. In der Gelelektrophoresekammer Mini-PROTEAN Tetra System erfolgte die Größentrennung bei einer Spannung von 120 V und einem konstanten Amperewert. Der verwendete Größenmarker PageRuler Prestained Protein Ladder diente hierbei zur Abschätzung des Molekulargewichts.

2.4.13 Coomassie-Gel Präparation

Zur unspezifischen Anfärbung aller Proteine in einem Polyacrylamidgel wurde die Coomassiefärbung verwendet. Nach vollständiger Größentrennung der Proteine wurde das Polyacrylamidgel in die Coomassie-Färbelösung gegeben und für 15 Min vorsichtig geschüttelt. Im Anschluss wurde die Färbelösung entfernt, das Polyacrylamidgel mit Leitungswasser gewaschen und Entfärbelösung zugegeben. Das Gel wurde über Nacht geschüttelt und die Entfärbelösung am nächsten Tag erneuert. Die Entfärbung wurde fortgesetzt, bis sich deutliche Proteinbanden abzeichneten.

2.5 Statistische Analyse

Die Daten werden dargestellt als Mittelwert \pm SEM (*standard errors of the mean*). Zur Bestimmung statistischer Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde der *Student's t*-Test verwendet. Wurden mehrere Gruppen verglichen, so wurde die Signifikanz mittels *one-way* ANOVA und anschließendem Tukey's Test oder Dunnett's Test festgestellt. Wurden Zeitpunkte und mehrere Gruppen verglichen, so wurde die Signifikanz mittels *two-way* ANOVA mit anschließendem Tukey's Test festgestellt. Abweichungen davon sind einzeln genannt in der Abbildungsbeschreibung. Statistisch signifikant waren P-Werte kleiner als 0,05.

3. Ergebnisse

3.1 Der IL-6 Trans-Signalweg vermittelt Leberregeneration

IL-6 ist allgemein als Regulator für die Akute-Phase-Reaktion, die Leberregeneration und die Differenzierung von T-Zellen bekannt. Besonders im Kontext von chronischen Virusinfektionen konnte für IL-6 und STAT3 eine essentielle Beteiligung an der humoralen Immunantwort beschrieben werden.^{84,85} Abgesehen von der Akute-Phase-Reaktion ist wenig bezüglich IL-6 über die Immunantwort bei einer akuten Virusinfektion bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Virusabwehr bei akuter Infektion mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV) im *in vivo* Modell Maus in Hinblick auf die IL-6 Signalinduktion zu charakterisieren. Im Weiteren soll speziell der Trans-Signalweg im Focus der Arbeit stehen. Im Modell zur virusinduzierten Leberschädigung kann neben der Immunantwort ebenfalls die Leberregeneration betrachtet werden. So soll geklärt werden, welchen Beitrag das klassische bzw. der Trans-Signalweg zu der Leberregeneration leistet.

In Folge einer Infektion findet häufig ein Anstieg von IL-6 im Serum statt. Ebenfalls konnte ein Anstieg des löslichen IL-6R bei einer Reihe von Erkrankungen gefunden werden. Da IL-6 und sIL-6R im Serum einen Komplex bilden können, der den Trans-Signalweg aktiviert, war es von Interesse, diesen Sachverhalt bei einer LCMV-Infektion zu untersuchen.¹²⁹ Während einer Virusinfektion durch LCMV steigt der IL-6-Serumspiegel am Tag 3 als Reaktion auf den Erreger in einer ersten Immunreaktion des angeborenen Immunsystems.⁸⁵ Nach Infektion von Wildtyp-Mäusen mit einer hohen Dosis (2×10^6 PFU) des nicht-zytolytischen LCMV WE, wurde in regelmäßigen Zeitabständen retrobulbär Blut entnommen (siehe 2.2.6). Vom Vollblut wurde mittels Zentrifugation das Serum abgetrennt und die Proben mittels ELISA (siehe 2.4.2) analysiert (Abb. 6A). Wie bereits in der Literatur beschrieben, konnte ein signifikanter Anstieg von IL-6 an Tag 3 nach Infektion gefunden werden. Als weiterer Ansatz wurde der sIL-6R im Serum der gleichen Mäuse mittels ELISA analysiert (Abb. 6B). Ab Tag 2 nach Infektion ist die sIL-6R Konzentration im Vergleich zu naiven Mäusen signifikant erhöht. Die Kinetik zeigt einen sukzessiven Anstieg des sIL-6R-Spiegel bis etwa Tag 7 nach Infektion. Im Anschluss sinkt die Serumkonzentration bis zum Ende der Infektion an Tag 12, bleibt jedoch signifikant erhöht im Vergleich zu nicht infizierten Mäusen. Auf Basis dieses

Fundes konnte daher angenommen werden, dass der klassische und der Trans-Signalweg der Mäuse an Tag 3 aktiviert wird.

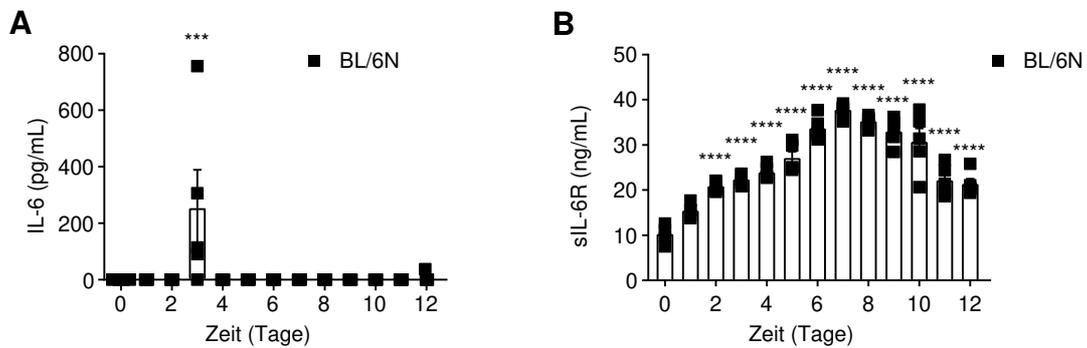


Abbildung 6: Serumlevel von IL-6 und sIL-6R nach LCMV-Infektion in Wildtyp-Mäusen. BL/6N Mäuse wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen. Die Konzentration von IL-6 (A) oder sIL-6R (B) wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 5$ Tieren aus einem Experiment. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Dunnett's Test durchgeführt ($p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,0001 = ****$).

In Anbetracht dieser Physiologie und unseren Beobachtungen stellte sich die Frage, welche Tragweite der klassische- und der Trans-Signalweg in Bezug auf die viral induzierte Leberschädigung haben. Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 können beide Signalwege blockiert werden.¹²⁹ Durch Verwendung des spezifischen Inhibitors sgp130Fc ist es möglich, spezifisch den Trans-Signalweg zu blockieren.¹⁶

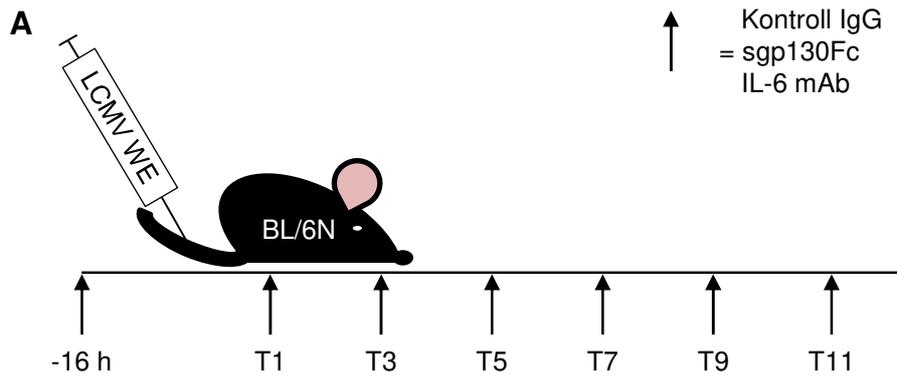


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Blockade des klassischen und des Trans-Signalweges. BL/6N Mäusen wurde 16 Stunden vor Infektion 500 μg Isotyp IgG, 50 μg sgp130Fc oder 500 μg Anti-IL-6 mAb *i.p.* verabreicht und anschließend mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. Die Behandlung wurde jeden zweiten Tag wiederholt (schwarze Pfeile), wobei 250 μg Isotyp IgG, 50 μg sgp130Fc oder 250 μg Anti-IL-6 mAb *i.p.* injiziert wurden. Am Tag 12 nach Infektion endete das Experiment.

Es wurden drei Mausgruppen verwendet, die vor Infektion und kontinuierlich jeden zweiten Tag mit Kontrollantikörper IgG, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt wurden (Abb. 7, siehe 2.2.5). Durch diesen Versuchsaufbau war es möglich, zwischen den Einflüssen des klassischen und des Trans-Signalweges zu unterscheiden. Die Infektion mit LCMV WE verursacht Leberschäden, nachvollziehbar durch den Anstieg der Leberenzyme ALT und AST im Serum.¹¹⁵ Nach Infektion der drei Gruppen wurde an Tag 6, 8 und 12 retrobulbär Blut abgenommen (siehe 2.2.6). Im Serum wurden die Marker für Leberschädigung mittels Teststreifen analysiert (siehe 2.4.1). An Tag 6 nach Infektion konnte bereits ein erhöhtes ALT-Level im Serum der Tiere gemessen werden (Abb. 8A). Mit fortschreitendem Krankheitsverlauf erhöhte sich die Menge an gemessenem ALT im Serum in allen Gruppen. Dabei fällt auf, dass es zwischen den Gruppen keinen Unterschied gibt an allen gemessenen Zeitpunkten.

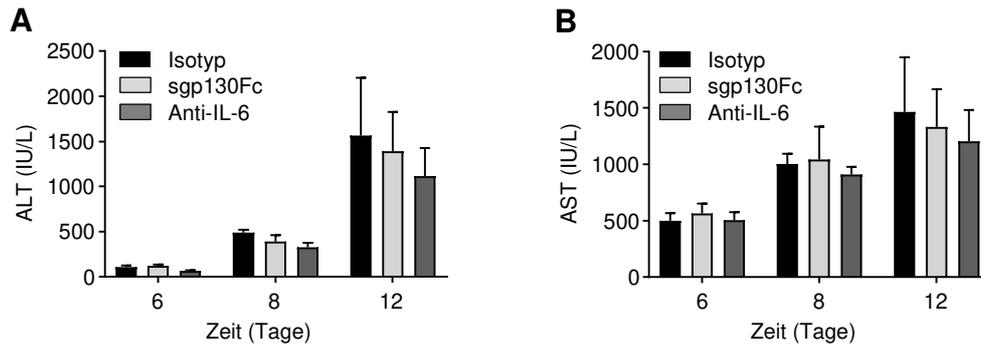


Abbildung 8: Serumlevel von ALT und AST nach Infektion in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Tieren. BL/6N Mäuse wurden mit Isotyp IgG, sgp130Fc oder Anti-IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen. Die Konzentration von ALT (A) oder AST (B) wurde mittels Trockenchemie-Analyser und Teststreifen im Serum bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way ANOVA*-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt.

In den gleichen Tieren wurde auch die Serumkonzentration von AST gemessen (Abb. 8B). Im Vergleich der drei Gruppen an den Tagen 6, 8 und 12 nach Infektion konnte wie zuvor für ALT kein Unterschied gefunden werden. Jedoch konnte mit diesem zweiten Marker ebenfalls ein Fortschreiten der Leberpathologie nachgewiesen werden. Die Werte stiegen etwa um den Faktor 2 für Tag 8 bzw. Faktor 3 für Tag 12 verglichen mit Tag 6 nach Infektion. Dieser Befund lässt anfangs vermuten, dass weder der klassische- noch der Trans-Signalweg eine Auswirkung auf die Leberpathologie hat.

Zur Kontrolle der Infektion und der Viruslast wurde ein Plaque-Assay durchgeführt werden (siehe 2.4.5). Dabei wird über eine Verdünnungsreihe die Viruslast in Geweben oder im Blut festgestellt. Bei einer akuten Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE wird der Virus bei Wildtyp Mäusen zwischen Tag 12 und 14 nach Infektion aus dem Blut, der Milz und der Leber eliminiert.¹¹⁵ In peripheren Geweben wie der Niere, der Lunge, dem Gehirn und dem Spinalkanal persistiert der Virus länger. Durch diese Gegebenheiten können die Infektion und der Verlauf nachvollzogen werden.

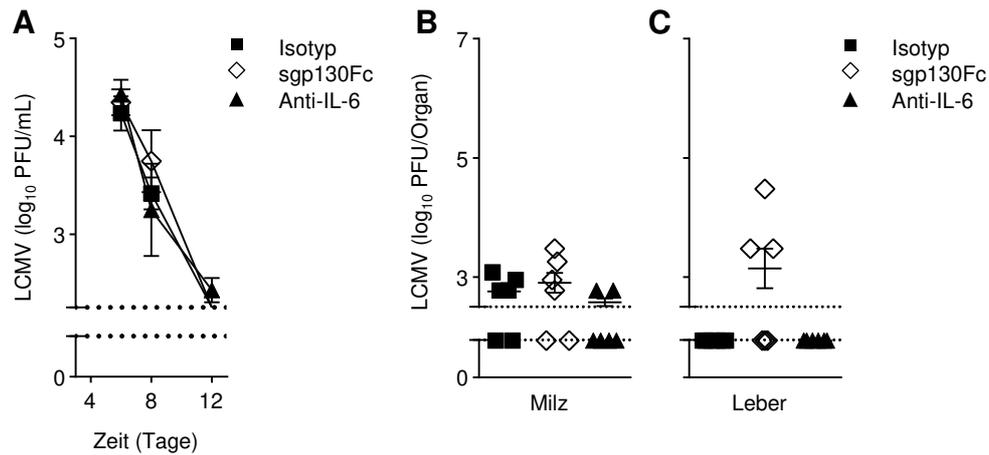


Abbildung 9: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von Mäusen behandelt mit sgp130Fc oder IL-6 mAb. BL/6N Mäuse wurden mit Isotyp IgG, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. **(A)** Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen. Die Viruslast wurde mittels Plaque-Assay im Serum ermittelt. **(B)** Die Viruslast wurde an Tag 12 nach Infektion in der Milz gemessen. **(C)** Viruslast in der Leber an Tag 12 nach Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM oder das Streudiagramm \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test oder *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt.

In den drei Gruppen konnte für die Viruslast im Serum kein Unterschied gefunden werden (Abb. 9A). An Tag 6 nach Infektion liegt die Viruslast bei etwa $4 \log_{10}$ PFU/mL und fällt bereits an Tag 8 nach Infektion ab. Am Ende der Kinetik, 12 Tage nach Infektion, ist kaum noch Virus im Serum nachweisbar. Dabei repräsentiert die gepunktete Linie das Detektionslimit. Dies spricht für einen erwarteten Krankheitsverlauf und konnte im Weiteren durch die Viruslast in den primär infizierten Organen bestätigt werden. Analysen der Milz (Abb. 9B) und der Leber (Abb. 9C) 12 Tage nach Infektion tragen nur noch wenige Individuen eine Viruslast.

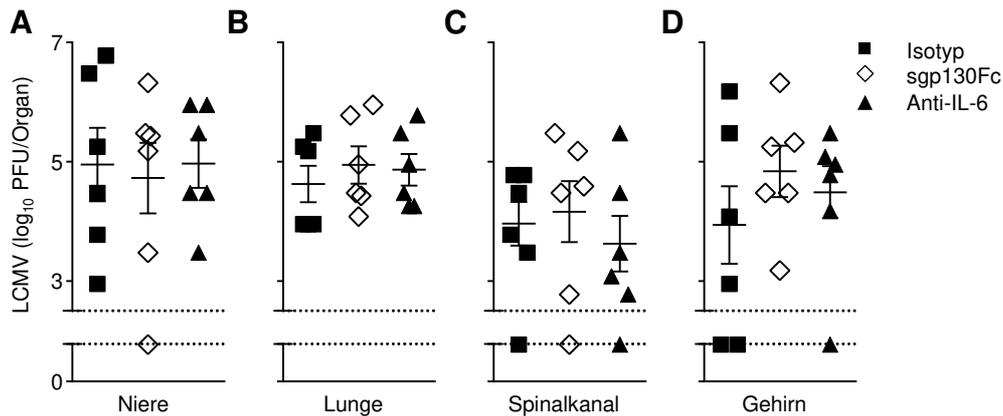


Abbildung 10: Viruslast im Gewebe von Mäusen nach Behandlung mit sgp130Fc oder IL-6 mAb. BL/6N Mäuse wurden mit Isotyp IgG, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. An Tag 12 nach Infektion wurden Gewebeprouben entnommen und die Viruslast mittels des Plaque-Assays in Niere (A), Lunge (B), Spinalkanal (C) und Gehirn (D) gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM als Streudiagramm von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt.

In Niere (Abb. 10A), Lunge (Abb. 10B), Spinalkanal (Abb. 10C) und Gehirn (Abb. 10D) konnte ein erhöhter Virustiter an Tag 12 bestimmt werden. Auch wurde in diesem Fall erneut kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden. Mit diesen Befunden konnte zum einen ein erwarteter Infektionsverlauf bestätigt werden, als auch erneut ein Rückschluss zu den Signalwegen gemacht werden. Da kein deutlicher Unterschied in den Gruppen gefunden wurde, ist anzunehmen, dass weder der klassische- noch der Trans-Signalweg eine Auswirkung auf die Virusvermehrung oder Elimination aus dem Blutstrom bzw. den primär infizierten Organen hat.

Im Vorfeld konnte anhand von AST und ALT ein deutlicher Leberschaden nach Virusinfektion festgestellt werden (Abb. 8). Die IL-6 Signaltransduktion spielt bei der Leberregeneration eine entscheidende Rolle.^{26,35} Aus diesem Grund war es von Interesse, die induzierte Fibrose in unserem Modell näher zu untersuchen. In Folge sterbender Hepatozyten und sezernierter Zytokine und Chemokine werden Kupffer Zellen (KZ) und hepatische Sternzellen (HSZ) aktiviert.¹³⁰ Mit der Produktion von *transforming growth factor- β* (TGF- β) durch aktivierte KZ und HSZ erfolgt die weitere Differenzierung der HSZ sowie Ablagerung von extrazellulärer Matrix, Collagen und

α -SMA.^{131,132} Somit kann eine erhöhte Leberfibrose mit dem Anstieg von Collagen und α -SMA in der Leber charakterisiert werden.

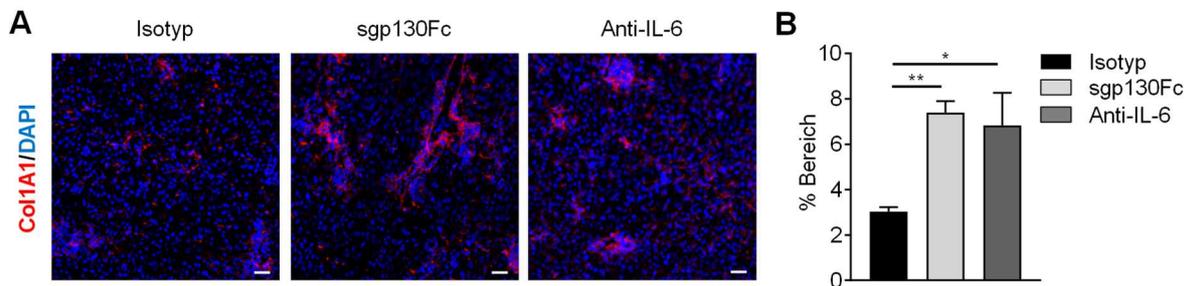


Abbildung 11: Collagenexpression in der Leber nach virus-induzierter Schädigung in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Mäusen. BL/6N Mäuse wurden mit Isotyp IgG, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. **(A)** An Tag 12 nach Infektion wurden ein Teil der Leber entnommen und die Collagenexpression (rot), sowie Zellkerne (blau) mittels Immunfluoreszenz abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Vergrößerung: 20-fach, Maßstab: 100 μ m. **(B)** Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$).

Zur Evaluation wurde den Mäusen an Tag 12 nach Virusinfektion Leberproben entnommen (siehe 2.2.7) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Von diesen, in Wachs eingebetteten, Proben wurden 7 μ m dicke Schnitte angefertigt und Collagen 1A auf Proteinebene gefärbt (siehe 2.4.3). Für die Gruppe mit der sgp130Fc-Behandlung, sowie für die Gruppe mit der IL-6 mAb-Behandlung wurde ein erhöhtes Signal im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (Abb. 11A). Die Aufnahmen wurden statistisch ausgewertet, wodurch die Beobachtung bestätigt werden konnte (Abb. 11B). Der signifikante Anstieg an Collagen in der Leber weist auf eine verminderte Regeneration bzw. erhöhte Leberfibrose hin. Durch die spezifische Blockade des Trans-Signalweges und der gleichen Pathologie bei Blockade beider Signalwege ist anzunehmen, dass primär der Trans-Signalweg für die Regeneration der Leber benötigt wird.

Der gleiche Sachverhalt konnte bei Färbung von α -SMA gefunden werden (Abb. 12A). Tiere, behandelt mit sgp130Fc oder mit IL-6 mAb, zeigten in den Aufnahmen ein stärkeres Signal. Statistische Auswertung der Daten ergab einen signifikanten Anstieg der α -SMA Expression in der Leber (Abb. 12B).

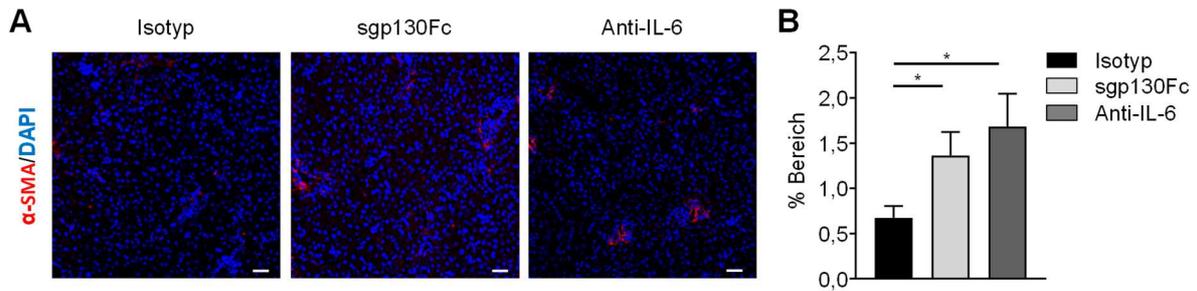


Abbildung 12: α -SMA Expression in der Leber nach Schädigung in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Mäusen. BL/6N Mäuse wurden mit Isotyp IgG, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. **(A)** An Tag 12 nach Infektion wurde ein Teil der Leber entnommen und die α -SMA Expression (rot), sowie Zellkerne (blau) mittels Immunfluoreszenz abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Vergrößerung: 20-fach, Maßstab: 100 μ m. **(B)** Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$).

Zusammengenommen wurde im Serum ein Anstieg von IL-6 und dem sIL-6R nach Infektion mit dem nicht-zytolytischen LCMV WE Stamm gefunden. Mit dem Komplex aus IL-6/sIL-6R können in allen Zellen mit membranständigem gp130 eine Signalkaskade ausgelöst werden. Durch gezielte Blockade des Trans-Signalweges oder dem klassischen- und des Trans-Signalweges konnte kein Unterschied in den Serummarkern AST und ALT für Leberschädigung gefunden werden. Auch die Viruslast im Serum oder den untersuchten Geweben zeigte keinen Unterschied. In Anbetracht der anschließenden Regeneration der Leber wurden signifikante Unterschiede in der Collagen und α -SMA Expression festgestellt, die höchstwahrscheinlich auf fehlende Induktion des Trans-Signalweges zurückzuführen sind.

In dem verwendeten Modell sorgen zytotoxische T-Zellen für eine Leberschädigung.¹¹⁵ Durch Präsentation von Viruspeptiden in MHC Klasse I Molekülen auf der Oberfläche von Hepatozyten töten die T-Zellen infizierte Zellen gezielt ab (Abb. 5). Darüber hinaus wurde in vielen Berichten eine entscheidende Rolle für IL-6 bei chronisch virus-infizierten Mäusen beschrieben.^{85,87} Aus diesem Grund wurde die T-Zell-Entwicklung und Funktion analysiert, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

3.2 T-Zellentwicklung bei Inhibition der IL-6 vermittelten Signaltransduktion

Wird IL-6 in Mäusen deletiert oder mittels Antikörper blockiert, beeinträchtigt dies die Kontrolle einer bakteriellen Infektion.⁴⁵ Im Weiteren wird IL-6 und das nachgeschaltete STAT3 zur Abwehr chronischer Virusinfektionen benötigt.^{84,85} Parallel dazu wurde in klinischen Studien mit monoklonalen Antikörper gegen IL-6R in den behandelten Patienten eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen beschrieben.^{72,73} Durch spezifische Blockade einzig des Trans-Signalweges konnte in Mäusen keine Beeinträchtigung bei der Kontrolle von *Listeria monocytogenes* gefunden werden.⁴⁵ Bei einer akuten viralen Infektion wurde bislang noch kein direkter Einfluss von IL-6 gefunden.^{85,87} Besonders der Einfluss des Trans-Signalweges auf T-Zellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Dies führte zu der Fragestellung, ob der erhöhte Leberschaden bedingt durch Blockade mit sgp130Fc einen Einfluss auf T-Zellentwicklung und Funktion hat.

Zur Beurteilung der virusspezifischen T-Zellexpansion wurden BL/6N Mäuse mit IgG Kontrollantikörpern, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert (Abb. 7, siehe 2.2.5). An den Tagen 6, 8 und 12 nach Infektion wurde den Mäusen retrobulbär Blut abgenommen und die T-Zellexpansion im Vollblut gemessen. Zusätzlich wurden Proben von Milz und Leber an Tag 12 nach Infektion genommen. Die Organe wurden zerrieben, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten (siehe 2.2.7). Zur Erkennung der virus-spezifischen T-Zellen wurde der TZR gefärbt, welcher sich gegen spezifische Epitope der Viruspeptide richtet (siehe 2.4.6).¹³³ Zusammen mit dem Oberflächenmarker CD8 ist es möglich, die virusspezifischen T-Zellen von den restlichen T-Zellen zu unterscheiden. Um das Hintergrundsignal zu vermindern, wurden nach der Färbung die Erythrozyten lysiert. Mittels durchflusszytometrischer Messung konnten die Zellen im Anschluss anhand der Oberflächenexpression gezählt und analysiert werden.

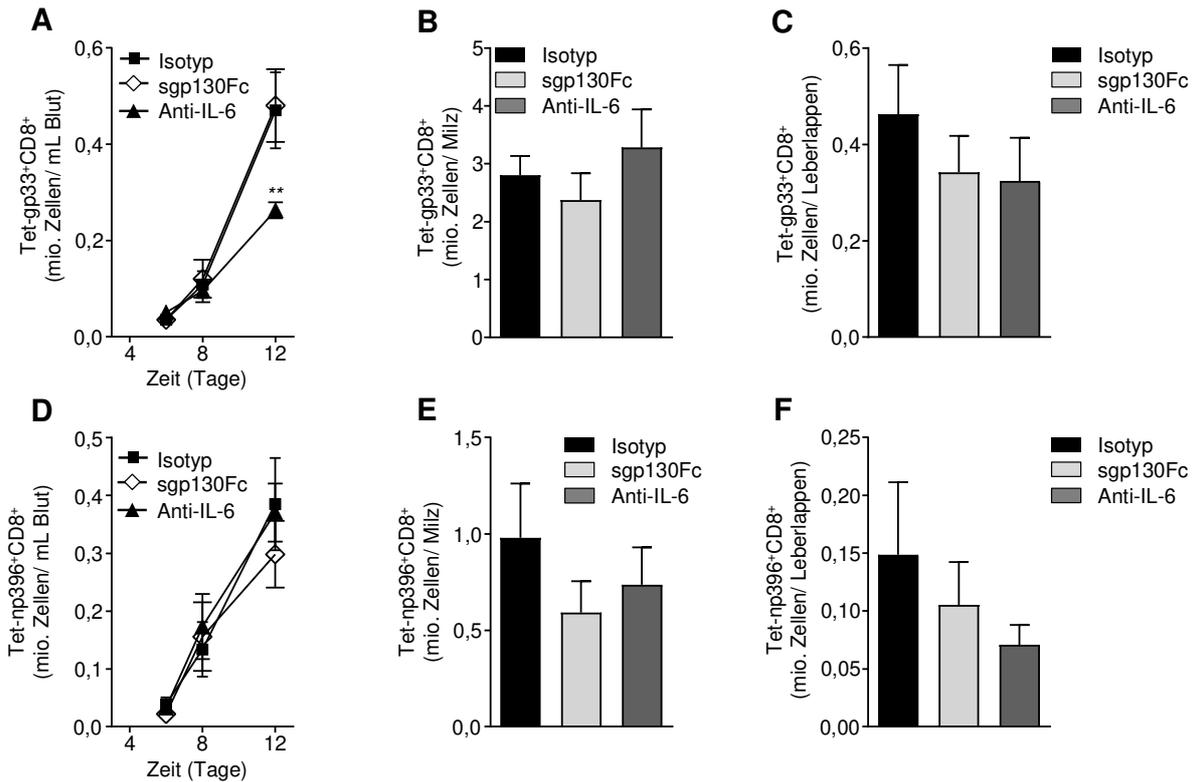


Abbildung 13: T-Zellentwicklung in Abhängigkeit der IL-6 vermittelten Signalinduktion in behandelten Mäusen. BL/6N Mäuse wurden mit Isotyp IgG, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. **(A)** An Tag 6, 8 und 12 nach Infektion wurde Blut entnommen und die gp33-spezifischen T-Zellen gemessen. **(B)** An Tag 12 nach Infektion wurden die gp33-spezifischen T-Zellen in der Milz gemessen. **(C)** An Tag 12 nach Infektion wurden die gp33-spezifischen T-Zellen in der Leber gemessen. **(D)** An Tag 6, 8 und 12 nach Infektion wurde Blut entnommen und die np396-spezifischen T-Zellen gemessen. **(E)** An Tag 12 nach Infektion wurden die np396-spezifischen T-Zellen in der Milz gemessen. **(F)** An Tag 12 nach Infektion wurden die np396-spezifischen T-Zellen in der Leber gemessen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test oder des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,01 = **$).

Bereits an Tag 6 nach Infektion ließen sich virusspezifische T-Zellen, gerichtet gegen gp33, im Blut feststellen (Abb. 13A). Bis Tag 8 nach Infektion konnte kein Unterschied in der Expansion der T-Zellen festgestellt werden. Kontrolle, sowie sgp130Fc und IL-6 mAb Behandlung hatten keinen Einfluss auf die Entwicklung. An Tag 12 nach Infektion konnte ein deutlicher Unterschied in der T-Zellzahl gefunden werden. Mäuse behandelt mit IL-6 mAb zeigten signifikant weniger gp33⁺-CD8⁺ T-Zellen als die Kontrollgruppe und die sgp130Fc-behandelte Gruppe. Somit kann angenommen werden, dass durch Inhibition des klassischen IL-6 Signalweges die

T-Zellexpansion vermindert wurde bzw. der Trans-Signalweg keinen direkten Einfluss auf die Zellzahl hatte.

Zusätzlich wurde die gp33⁺CD8⁺ T-Zellzahl in der Milz (Abb. 13B) und in der Leber (Abb. 13C) gemessen. Sowohl für die T-Zellen in der Milz, als auch in der Leber konnte kein Unterschied im Vergleich der behandelten Gruppen gefunden werden. Neben der gp33⁺ T-Zellpopulation kann eine weitere virusspezifische T-Zellpopulation gemessen werden. T-Zellen, welche das virusspezifische Nukleoprotein 396 (np396) erkennen, wurden ebenfalls bereits in geringer Zahl an Tag 6 nach Infektion im Blut gefunden (Abb. 13D). Im Verlauf der Kinetik konnte eine Expansion der T-Zellen gemessen werden, welche sich nicht zwischen der Kontrollgruppe und den behandelten Gruppen unterschied. Somit scheint der zuvor beschriebene Unterschied sich einzig auf T-Zellen zu beschränken, die das Virusantigen gp33 erkennen. Die Anzahl der gemessenen np396⁺ T-Zellen in Milz (Abb. 13E) und Leber (Abb. 13F) zeigten im Einklang mit dem Fund aus dem Blut keinen Unterschied.

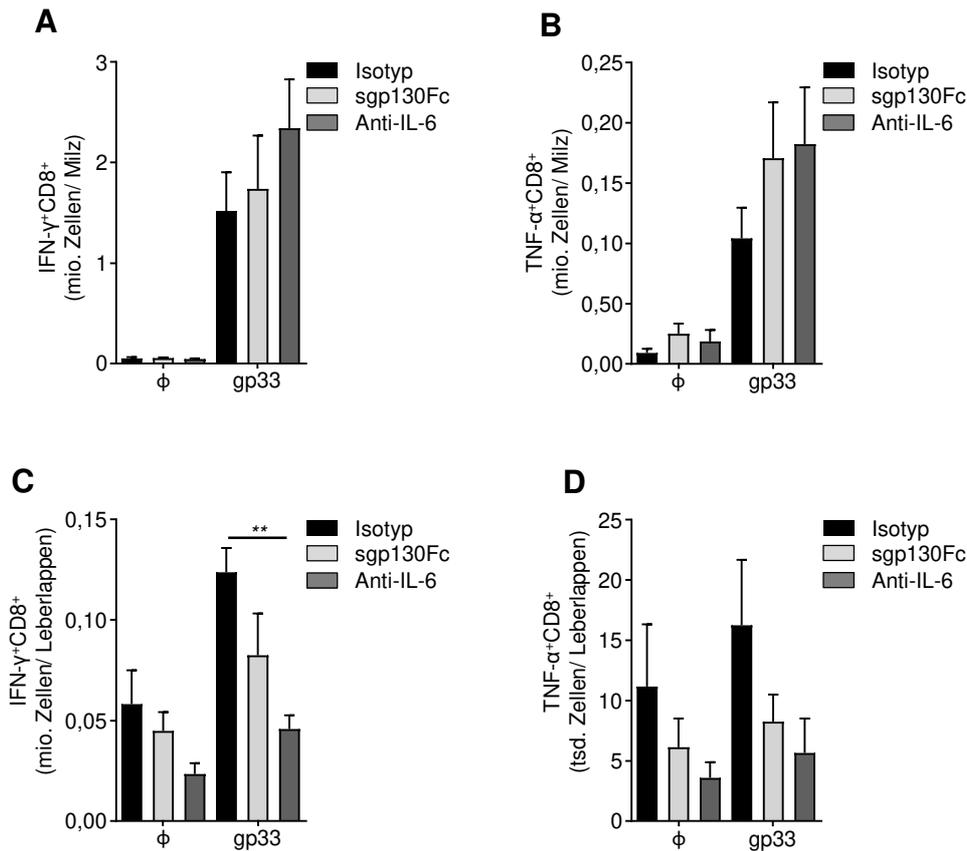


Abbildung 14: Intrazelluläre Zytokinfärbung zur Ermittlung der T-Zellfunktion in sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelten Mäusen. BL/6N Mäuse wurden mit Isotyp IgG, sgp130Fc oder IL-6 mAb behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. An Tag 12 nach Infektion wurden Teile der Milz und der Leber entnommen und eine Einzelzellsuspension *in vitro* mit gp33 Peptid stimuliert. **(A)** IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz. **(B)** TNF- α Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz. **(C)** IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Leber. **(D)** TNF- α Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Leber. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,01 = **$).

Um der Immunantworten im Wirt zu entkommen, entwickelten Viren verschiedene Strategien. Beispielsweise zeigen virusspezifische T-Zellen während einer chronischen Virusinfektion verschiedene Erschöpfungsgrade. Die CD8-T-Zell-Erschöpfung besteht aus mehreren Phasen. Grad I und II einer Teilerschöpfung, vollständige Erschöpfung und Deletion.^{134–136} Während des Erschöpfungsstadiums verlieren CD8-T-Zellen die Fähigkeit zur Produktion von Effektorzytokinen wie IL-2, TNF- α und IFN- γ . Darüber hinaus zeigen erschöpfte CD8-T-Zellen auch eine verringerte Antigen-unabhängige Proliferation, sprechen schlecht auf IL-7 und IL-15 an und zeigen metabolische Mängel.^{137,138}

Zur Analyse der T-Zellfunktion wurden die T-Zellen in der Milz und der Leber mit dem Viruspeptid gp33 an Tag 12 nach Infektion *in vitro* stimuliert und die Effektorzytokinproduktion intrazellulär gemessen (siehe 2.4.7). T-Zellen aus der Milz zeigen eine deutliche Produktion von IFN- γ , jedoch konnte kein Unterschied durch Behandlung mit sgp130Fc oder IL-6 mAb festgestellt werden (Abb. 14A). Ebenso konnte für die Produktion von TNF- α durch virusspezifische T-Zellen aus der Milz kein Unterschied gefunden werden (Abb. 14B). Durch Blockade des klassischen oder des Trans-Signalweges tritt keine Beeinträchtigung in der Produktion dieser Effektorzytokine durch T-Zellen auf.

Bei der *in vitro* Stimulation von T-Zellen aus der Leber ist im Besonderen das erhöhte Hintergrundsignal für nicht stimulierte Zellen auffällig. Die Kontrollen werden in diesem Experiment gleichbehandelt, mit Ausnahme des Stimulus gp33. Trotz kaum noch nachweisbarer Viruslast in der Leber (Abb. 9C) verbleiben Viruspeptide noch in der Leber und sorgen dort für die Stimulation der T-Zellen. Für die Produktion von IFN- γ in der Leber konnte ein signifikanter Unterschied bei Vergleich der Kontrollgruppe mit der IL-6 mAb behandelten Gruppe gefunden werden (Abb. 14C). Im Weiteren ist ein Trend zu erkennen, sowohl in den nicht stimulierten Proben als auch in den stimulierten Proben. Durch Blockade des Trans-Signalweges mit sgp130Fc ist die Produktion von IFN- γ im Vergleich zur Kontrollgruppe tendenziell leicht reduziert. Das gleiche Muster ergibt sich ebenfalls für die nicht stimulierten Proben und lässt damit zumindest einen minimalen Effekt durch die Behandlung vermuten, der ebenfalls nur in der Leber gefunden wurde. Da jedoch zuvor gemessene Parameter wie die Leberschädigung (Abb. 8), die Viruslast (Abb. 9, 10) oder die Entwicklung der virusspezifischen T-Zellen (Abb. 13) unauffällig waren, scheint der Einfluss des IL-6 vermittelten Signals nicht direkt mit der Pathologie in Zusammenhang zu stehen.

Bei Analyse der TNF- α Produktion in der Leber konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Abb. 14D). Zum einen ist jedoch erneut das zuvor beschriebene Muster zu erkennen, zum anderen hat die TNF- α Produktion in der Kontrolle in etwa die gleiche Amplitude wie in den stimulierten Proben. Somit kann bei dieser Messung von keinem direkten Effekt gesprochen werden.

Zusammengefasst wurde einzig im Blut durch Inhibition des klassischen und des Trans-Signalweges durch einen monoklonalen Antikörper gegen IL-6 eine verringerte

Expansion der gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen gefunden. Für np396⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde dies nicht beobachtet. Sowohl in der Milz, als auch in der Leber konnte kein Unterschied in der T-Zellexpansion für virusspezifische gp33⁺ und np396⁺ CD8⁺ T-Zellen gefunden werden. Bezüglich der T-Zellfunktion konnte kein Unterschied bei der Produktion von IFN- γ oder TNF- α von *in vitro* stimulierten virusspezifischen T-Zellen aus der Milz detektiert werden. In Anbetracht der virusspezifischen T-Zellen aus der Leber wurde ein Unterschied bei der IFN- γ Produktion durch globale IL-6 Blockade im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. In diesem Teil des Experiments ist jedoch auch ein hohes Signal für nicht stimulierte T-Zellen gemessen worden. Dies beschränkt die Aussagekraft des Fundes. Bezüglich der TNF- α Produktion von T-Zellen aus der Leber konnte kaum eine Induktion durch Stimulation mit gp33-Peptid festgestellt werden. Es ergab sich ein Muster ähnlich der IFN- γ Produktion mit abfallender Zytokinproduktion durch Blockade des Trans-Signalweges und weiter abfallend durch globale IL-6 Blockade.

Zur näheren Untersuchung des Trans-Signalweges in Bezug auf virusvermittelte Leberschädigung wurde ein neues Mausmodell verwendet. In dieser Maus ist einzig die Stimulation der Zellen über den Trans-Signalweg möglich.²⁶ Im nächsten Abschnitt wird näher auf die Pathologie dieser transgenen Maus eingegangen.

3.3 Einfluss des Trans-Signalweges auf virus-induzierte Leberpathologie

IL-6 wird eine wesentliche Rolle bei der Leberregeneration zugeschrieben.⁴⁰ Darüber hinaus wurde in vielen Berichten die Aufgabe von IL-6 beim Wechsel zwischen angeborenen und erworbenen Immunantworten hervorgehoben.^{88,89} Im Vergleich dazu sind die Auswirkungen bei Abwesenheit des IL-6R auf der Zelloberfläche weniger erforscht. Besonders im Kontext des Immunsystems kann der IL-6R unter anderem auf der Oberfläche von Makrophagen, T-Zellen oder Monozyten gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass die klassische IL-6 Signalweiterleitung auch bei der Immunantwort eine essentielle Rolle hat. Daraus ergab sich die Fragestellung, auf welche Weise die klassische IL-6 Signalweiterleitung bei einer viralen Hepatitis zum Tragen kommt und ob der Trans-Signalweg eine mögliche kompensatorische Funktion übernehmen kann.

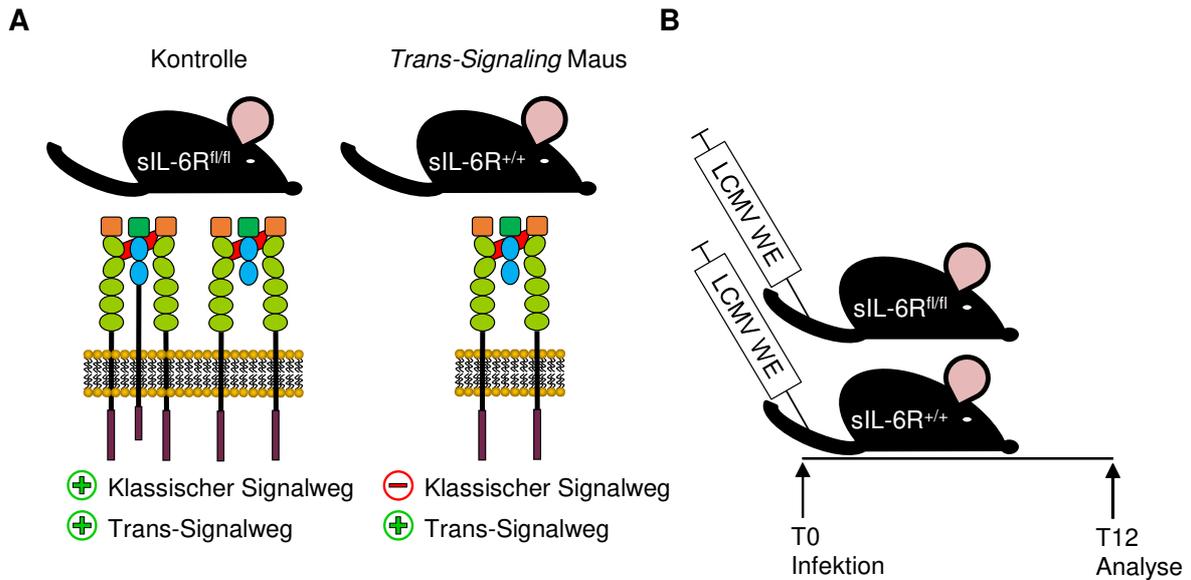


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Infektion der transgenen Mäuse sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+}. (A) In den Kontrollmäusen (sIL-6R^{fl/fl}) kann über den klassischen und den Trans-Signalweg noch die IL-6 vermittelte Signalweiterleitung erfolgen. Nach Verpaarung mit Tieren in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird, können die Zellen in den Nachkommen nur noch über den Trans-Signalweg stimuliert werden. (B) Die transgenen Mäuse wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und über 12 Tage beobachtet. An Tag 12 nach Infektion wurden die Mäuse geopfert.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde eine neue transgene Maus erzeugt und charakterisiert.²⁶ Kurz beschrieben wurde der IL-6R mit dem Cre/loxP-System modifiziert, so dass alle neu synthetisierten IL-6R nach Rekombination direkt in die lösliche Form (sIL-6R) übergehen. Im Genom der Kontrollmäuse (sIL-6R^{fl/fl}) wurden Exon 9, das Intron und Exon 10 mit der loxP-Sequenz flankiert. Durch Verpaarung der sIL-6R^{fl/fl} Mäuse mit Tieren, welche die Cre-Rekombinase exprimieren, konnte somit die TMD in allen Zellen deletiert werden. In den Nachkommen, die so genannten *Trans-signaling* Mäuse (sIL-6R^{+/+}), ist der klassische IL-6 Signalweg nicht mehr vorhanden. In den sIL-6R^{+/+} Mäusen kann IL-6 die Zielzellen nur noch über den Trans-Signalweg aktivieren (Abb. 15A).

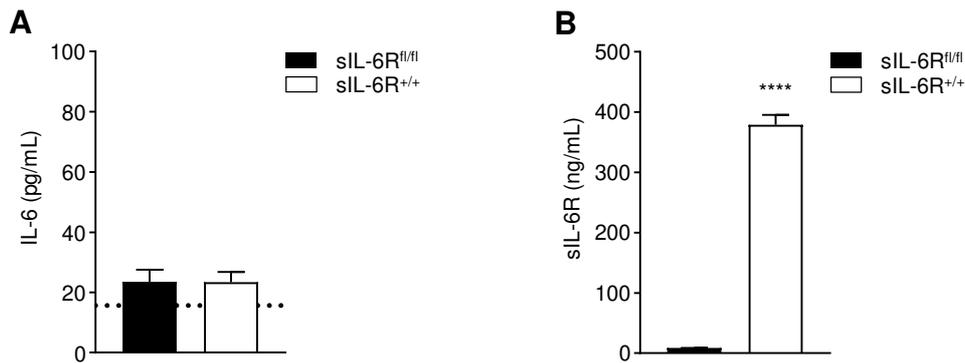


Abbildung 16: Serumlevel von IL-6 und sIL-6R in naiven sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen. Naiven transgenen Mäusen wurde Blut abgenommen und die Serumkonzentration von IL-6 (**A**) und sIL-6R (**B**) mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *Student's t*-Tests durchgeführt ($p \leq 0,0001 = ****$).

Naive, nicht infizierte Tiere zeigen im ELISA keinen Anstieg für IL-6 (siehe 2.4.2, Abb. 16A). Herausstechend ist jedoch die Serumkonzentration von sIL-6R in den naiven sIL-6R^{+/+} Tieren (Abb. 16B). Für sIL-6R^{fl/fl} Mäuse konnte eine Konzentration von etwa 9 ng/mL sIL-6R gefunden werden und entspricht bereits veröffentlichten Daten.¹³⁹ Bei den sIL-6R^{+/+} Mäusen liegt die Konzentration im Serum bei etwa 380 ng/mL. Dieser mehr als 40-Fach erhöhte Wert spiegelt die gesamte IL-6R Produktion in der Maus wider und bestätigt die Verpaarung.

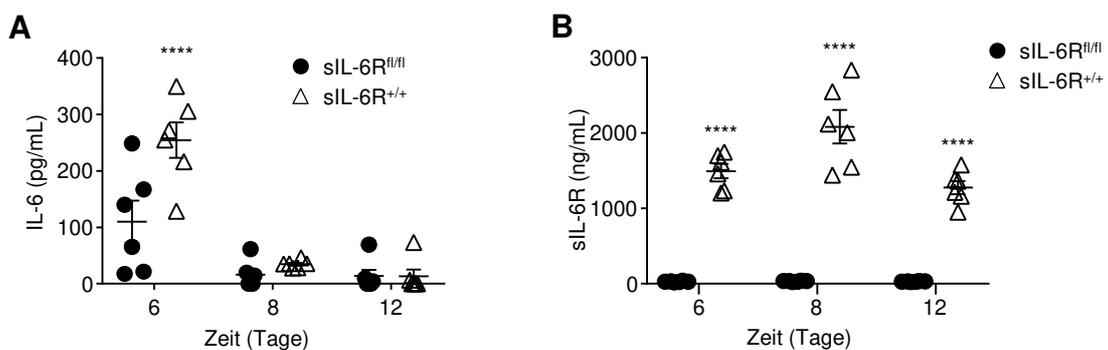


Abbildung 17: Serumlevel von IL-6 und sIL-6R nach LCMV-Infektion in sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen. Die transgenen Mäuse sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und zu angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen. Die Konzentration von IL-6 (**A**) oder sIL-6R (**B**) wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way ANOVA*-Tests mit anschließendem Sidak's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,0001 = ****$).

Für die transgene Maus sIL-6R^{+/+} wird die Vorläufermaus sIL-6R^{fl/fl} als Kontrolle genutzt. Gruppen beider Genotypen wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und

anschließend für den Zeitraum von 12 Tagen überwacht (Abb. 15B). Den Tieren wurde an Tag 6, 8 und 12 nach Virusinfektion Blut abgenommen (siehe 2.2.6) und die Serumkonzentration von IL-6 mittels ELISA bestimmt (siehe 2.4.2). Sowohl für sIL-6R^{fl/fl} als auch für sIL-6R^{+/+} konnte an Tag 6 nach Infektion noch IL-6 im Serum detektiert werden (Abb. 17A). Der Anstieg in den sIL-6R^{fl/fl} Mäusen ist ungewöhnlich, da für BL/6N Tiere ein Anstieg nur an Tag 3 nach Infektion detektiert werden konnte (Abb. 6A). Eine Verschiebung der Sekretion bzw. längere Serumhalbwertszeit von IL-6 lässt sich auch nur begrenzt mit der genetischen Manipulation dieser Tiere erklären. Im Vergleich dazu gibt es einen signifikanten Anstieg der IL-6 Serumkonzentration in sIL-6R^{+/+} Mäusen. Zusammen mit der extrem erhöhten Serumkonzentration allein in naiven Tieren ist hierbei ein stabilisierender Effekt durch den sIL-6R in Betracht zu ziehen.^{140,141} Für 8 und 12 Tage nach Infektion wurde, ähnlich wie in den BL/6N Mäusen, kaum bis kein IL-6 im Serum detektiert. Bezüglich des sIL-6R wurden für sIL-6R^{fl/fl} Tiere ein ähnlicher Anstieg wie in BL/6N Tieren an Tag 6 und 8 nach Infektion mit etwa 29 ng/mL bzw. etwa 33 ng/mL verzeichnet, sowie eine leichte Senkung an Tag 12 nach Infektion mit 30 ng/mL (Abb. 17B). Enorm ist dazu im Vergleich der Anstieg des sIL-6R in den *Trans-signaling* Mäusen. An Tag 6 nach Infektion konnte fast 1,5 µg/mL sIL-6R gefunden werden, gefolgt von 2,1 µg/mL an Tag 8 und etwa 1,3 µg/mL an Tag 12. In diesen Mäusen ist der Anstieg des sIL-6R nicht mit erhöhter proteolytischer Spaltung durch ADAM-Proteasen zu erklären, da alle neu synthetisierten Rezeptoren direkt sezerniert werden. Vielmehr ist der Anstieg durch eine erhöhte Transkription und Translation des IL-6R in den Zellen zu erklären. Somit kann davon ausgegangen werden, dass infolge einer Infektion nicht nur ADAM-Proteasen aktiviert werden, sondern auch der zelluläre Syntheseapparat angestoßen wird. Zu dem kann für sIL-6R^{+/+} Mäuse angenommen werden, dass durch die Kombination aus erhöhtem IL-6- und sIL-6R-Spiegel im Serum vermehrt Komplexbildung stattfindet und verstärkt der Trans-Signalweg auf den Zellen angesprochen wird.

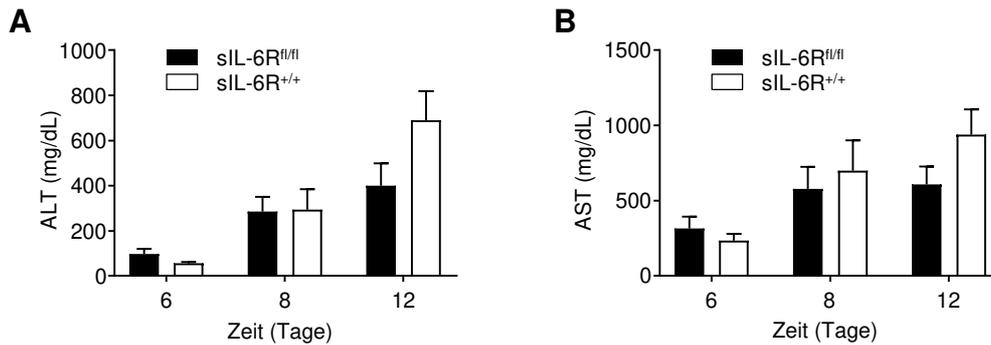


Abbildung 18: Leberschädigungsmarker ALT und AST in sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen nach Infektion. Nach Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE wurde den transgenen Mäusen sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} zu den angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen. Die Serumkonzentration von ALT (**A**) oder AST (**B**) wurde mittels Trockenchemie-Analyser und Teststreifen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n=6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Sidak's *multiple comparisons* Test durchgeführt.

Zum Nachweis der induzierten Leberschädigung und zur Ermittlung möglicher Differenzen im Krankheitsverlauf wurde AST und ALT im Serum der sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäuse mittels Trockenchemie-Analyser und Teststreifen gemessen (siehe 2.4.1). Mit zunehmendem Virusinfektionsdauer stieg die Serumkonzentration von ALT in beiden Mausgruppen an (Abb. 18A). Dabei konnte zwischen sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen kein Unterschied gefunden werden. Ebenso wurde für AST ein Anstieg im Serum detektiert (Abb. 18B). Auch für diesen Marker war kein Unterschied zwischen sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen festzustellen. Somit ist entweder das klassische IL-6 Signal nicht direkt an der Leberschädigung beteiligt oder das Trans-Signal, vermittelt über den Komplex aus IL-6/sIL-6R, kompensiert das fehlende klassische Signal.

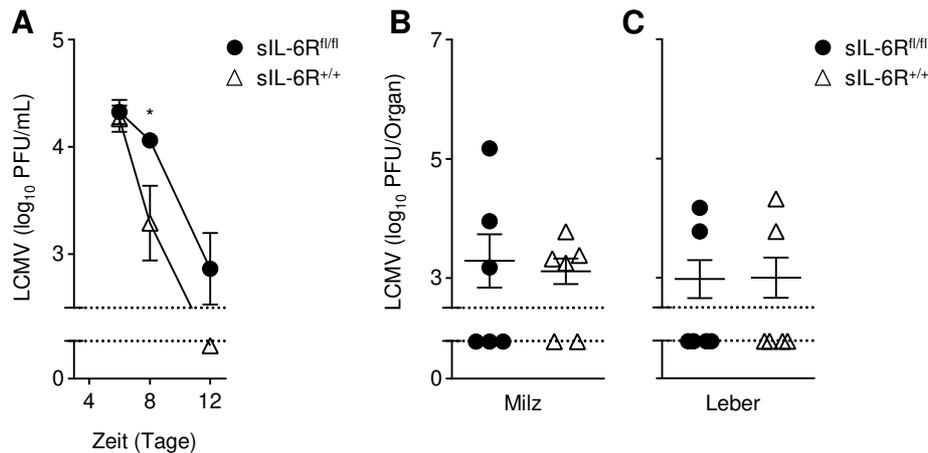


Abbildung 19: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen nach Infektion. Die transgenen Mäuse sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und zu angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen bzw. an Tag 12 nach Infektion die Organe. **(A)** Serumkinetik der Viruslast bestimmt mittels Plaque-Assay. **(B)** Viruslast in der Milz an Tag 12 nach Infektion. **(C)** Viruslast in der Leber an Tag 12 nach Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM oder das Streudiagramm \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test oder *Student's t*-Tests durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$).

Im direkten Zusammenhang zu dem verwendeten Modell wurde in sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen die Viruslast im Serum und verschiedenen Geweben mittels Plaque-Assay festgestellt (siehe 2.4.5). In der Serumkinetik wurde, wie zuvor bei Wildtyp-Mäusen, an Tag 6 eine Viruslast von etwa $4 \log_{10}$ PFU/mL gefunden (Abb. 19A). An Tag 8 nach Infektion verbleibt in sIL-6R^{fl/fl} Mäusen die Viruslast wie an Tag 6 nach Infektion. Bei den sIL-6R^{+/+} Mäusen wurde eine signifikant geringere Viruslast an Tag 8 gefunden. Diese frühzeitige Dezimierung der Viruslast im Serum spricht für einen Vorteil ausgelöst durch erhöhte Zellaktivierung über den Trans-Signalweg. An Tag 12 nach Infektion ist kaum Viruslast im Serum in beiden Gruppen mehr festzustellen. Somit können die sIL-6R^{+/+} Tiere unabhängig vom klassischen IL-6 Signalweg den Virus aus dem Serum nicht nur eliminieren, sondern dies auch offenbar effektiver als sIL-6R^{fl/fl} Kontrollmäuse.

Des Weiteren war von Interesse, ob ein gleicher Phänotyp wie im Serum auch in den primär infizierten Organen Milz und Leber zu finden ist. Dazu wurden Gewebeproben an Tag 12 nach Infektion aus der Maus entnommen und mittels Plaque-Assay analysiert. Für die Milz konnte nur vereinzelt Viruslast in beiden Gruppen festgestellt werden (Abb. 19B). Die Leber zeigte auch kaum noch Viruslast in beiden Gruppen (Abb. 19C). Dieses Ergebnis zeigt zum einen, dass die Infektion bzw. das Modell

erfolgreich war, da nach Infektion im 2×10^6 PFU LCMV WE der Virus aus Milz und Leber eliminiert wurde.¹³³ Auf der anderen Seite konnte hier ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Damit zeigte sich erneut, dass die Viruselimination unabhängig vom klassischen IL-6 Signalweg auch in Geweben stattfindet.

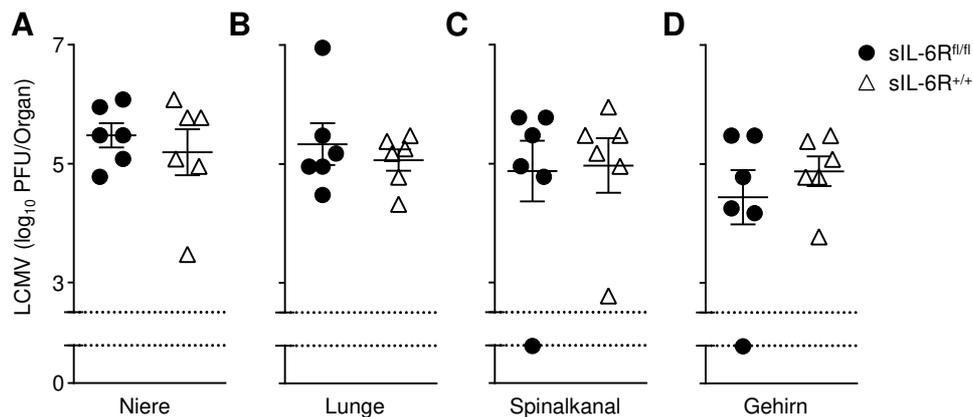


Abbildung 20: Viruslast im Gewebe nach Infektion von sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen. Die transgenen Mäuse sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und an Tag 12 nach Infektion Gewebeproben entnommen. Die Viruslast wurde mittels Plaque-Assay in Niere (A), Lunge (B), Spinalkanal (C) und Gehirn (D) gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM als Streudiagramm von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *Student's t*-Tests durchgeführt.

Weitere überprüfte Organe zeigten wie erwartet noch Viruslast. In der Niere (Abb. 20A), der Lunge (Abb. 20B), dem Spinalkanal (Abb. 20C) und dem Gehirn (Abb. 20D) wurden ähnliche Virustiter detektiert. Anders als im Serum an Tag 8 nach Infektion ist am Ende des Experiments kein Unterschied zu verzeichnen. Dies spricht ebenso wie für Milz und Leber entweder für eine vom klassischen IL-6 Signal unabhängige Viruselimination oder für einen kompensatorischen Effekt durch den IL-6 Trans-Signalweg.

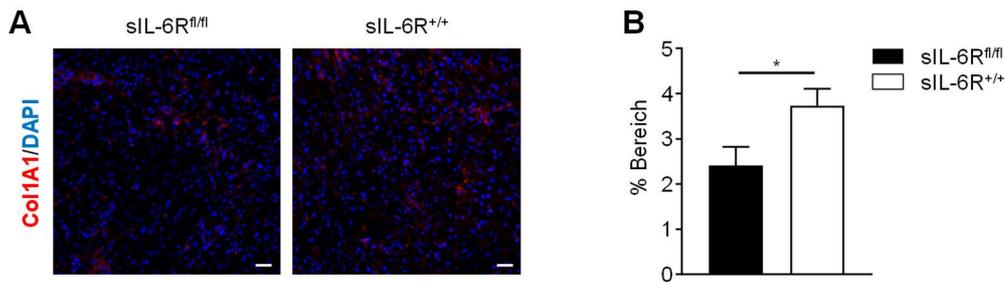


Abbildung 21: Collagenexpression in der Leber nach Schädigung in sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen. Die transgenen Mäuse sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und an Tag 12 nach Infektion geopfert zur Beurteilung des Leberschadens. **(A)** Ein Teil der Leber wurde entnommen und die Collagenexpression (rot), sowie Zellkerne (blau) mittels Immunfluoreszenz abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Vergrößerung: 20-fach, Maßstab: 100 μ m. **(B)** Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen von Collagen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *Student's t*-Tests durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$).

In Anbetracht der Leberregeneration nach LCMV-induzierter Schädigung wurden Leberschnitte mittels Immunfluoreszenzfärbung auf Collagenexpression untersucht (siehe 2.4.3). Im Besonderen ist der Trans-Signalweg essentiell für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie.²⁶ Zudem konnte zuvor in den Serummarkern AST und ALT (Abb. 17), sowie in der Viruslast (Abb. 18, 19) kein Unterschied gefunden werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass auch bei Fibrosemarkern kein Unterschied besteht. Nach Auswertung der Collagenfärbung konnte ein leicht erhöhtes Signal in sIL-6R^{+/+} Tieren im Vergleich zu sIL-6R^{fl/fl} gefunden werden (Abb. 21A). Weitere statistische Auswertungen der Aufnahmen konnten diesen Sachverhalt zusätzlich empirisch stützen und zeigten einen signifikanten Anstieg der Collagenexpression (Abb. 21B). Als weiterer Marker wurde die Expression von α -SMA untersucht. Ähnlich zu dem Fund für Collagen wurde auch für α -SMA ein leicht erhöhtes Signal in Immunfluoreszenzaufnahmen von sIL-6R^{+/+} Tieren im Vergleich zu sIL-6R^{fl/fl} Mäusen gefunden (Abb. 22A). Analyse des betroffenen Bereichs zeigte einen signifikanten Anstieg in der Expression von α -SMA in den *Trans-Signaling* Mäusen (Abb. 22B). Somit kann zumindest für den viral induzierten Leberschaden nicht von einer vollständigen Kompensation durch den Trans-Signalweg gesprochen werden.

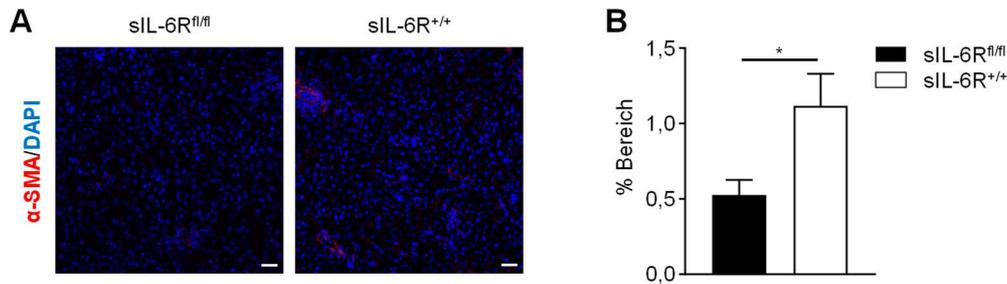


Abbildung 22: α -SMA Expression in der Leber nach Schädigung in sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen. Die transgenen Mäuse sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und an Tag 12 nach Infektion geopfert zur Beurteilung des Leberschadens. **(A)** Ein Teil der Leber wurde entnommen und die α -SMA Expression (rot), sowie Zellkerne (blau) mittels Immunfluoreszenz abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Vergrößerung: 20-fach, Maßstab: 100 μ m. **(B)** Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen von α -SMA. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *Student's t*-Tests durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$).

Zusammengenommen konnte gezeigt werden, dass durch Deletion der Transmembrandomäne des IL-6R in Mäusen etwa die 40-Fache Menge des IL-6R aus den Zellen mobilisiert werden kann. Verbunden damit konnte auch eine signifikant erhöhte Konzentration von IL-6 im Serum von sIL-6R^{+/+} Tieren gefunden werden nach Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE. Ebenso wie in den sIL-6R^{fl/fl} Vorläufermäusen steigt die Serumkonzentration des IL-6R bis Tag 8 nach Infektion an und fällt danach leicht ab. Im Vergleich der zwei Gruppen konnte für Leberschädigungsmarker ALT und AST kein Unterschied festgestellt werden. Auffällig war ein Unterschied in der Viruslast im Serum der untersuchten Tiere. Durch fehlendes klassisches IL-6 Signal und erhöhtes Trans-Signal eliminierten die *Trans-Signaling* Mäuse bereits an Tag 8 nach Infektion den Virus effektiver als die sIL-6R^{fl/fl} Tiere. Abgesehen davon konnte für die Elimination des Virus in primär infizierten Geweben, sowie peripheren Geweben kein Unterschied gefunden werden. Durch Analyse der Leberfibrose mittels Collagen- und α -SMA-Expression wurde erneut ein Unterschied deutlich. In den sIL-6R^{+/+} Mäusen wurde eine signifikante Erhöhung beider Marker festgestellt. Somit zeigte sich, dass auf Ebene der Regeneration nach virusinduzierte Schädigung einzig das IL-6 Trans-Signal nicht ausreichend ist.

Auch in diesem Fall ist der Leberschaden ausgelöst durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen. Zum besseren Verständnis der gefundenen Unterschiede wurden daher die Funktion und die Entwicklung der T-Zellen näher untersucht.

3.4 T-Zellentwicklung durch verstärktes IL-6 *Trans-Signaling*

Wie zuvor (Abschnitt 3.2) beschrieben, kommt dem IL-6 Signalweg eine wichtige Rolle bei der Immunantwort zu. Im Serum von infizierten sIL-6R^{+/+} Mäusen wurde eine effektivere Elimination des Virus an Tag 8 nach Infektion gefunden (Abb. 19A). Jedoch verblieb der Gewebeschaden vergleichbar mit dem der Kontrolltiere sIL-6R^{fl/fl} (Abb. 18). Interessanterweise wurde wiederum für die Fibrosemarker Collagen und α -SMA ein erhöhtes Signal in der Leber an Tag 12 nach Infektion gefunden (Abb. 21, 22). Es ergab sich daraus die Fragestellung, ob erhöhtes IL-6 *Trans-Signaling* die T-Zellentwicklung und Funktion begünstigt oder fehlendes klassisches IL-6 Signal die Entwicklung und Funktion beeinträchtigt.

Zur Analyse der T-Zellentwicklung wurde an den Tagen 6, 8 und 12 nach Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE den transgenen Mäusen sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} retrobulbär Blut abgenommen (siehe 2.2.6). Die Oberfläche der T-Zellen im Vollblut wurde zur Analyse im Durchflusszytometer gefärbt und die virusspezifischen T-Zellen anhand des T-Zellrezeptors identifiziert (siehe 2.4.6). Im Blut konnten gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen bereits an Tag 6 und 8 nach Infektion gefunden werden (Abb. 23A). In diesem Zeitraum fand keine deutliche Expansion statt und die Werte blieben vergleichbar in beiden Gruppen. An Tag 12 nach Infektion konnte in beiden Gruppen eine deutlich höhere Zellzahl gemessen werden, die jedoch in beiden Gruppen ähnlich ausfiel. Zusätzlich wurde an Tag 12 nach Infektion in Milz und Leber die virusspezifische T-Zellzahl bestimmt. In der Milz wurde eine deutliche Population von gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen gefunden, welche in den sIL-6R^{+/+} Mäusen tendenziell reduziert war ($p = 0.08$) (Abb. 23B). Auch in der Leber wurden gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen detektiert (Abb. 23C). In sIL-6R^{+/+} Mäusen wurden jedoch signifikant weniger T-Zellen gemessen im Vergleich zu sIL-6R^{fl/fl} Mäusen. Zur Feststellung der Tragweite des gefundenen Effekts wurde eine weitere CD8⁺ T-Zellpopulation untersucht. Im Blut konnten T-Zellen gerichtet gegen das np396-Peptid gefunden werden, zeigten aber keine abweichende Entwicklung im Vergleich der genutzten Mauslinien (Abb. 23D). Ebenfalls konnte in den np396⁺ CD8⁺ T-Zellpopulationen in der Milz und der Leber kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 23E,F).

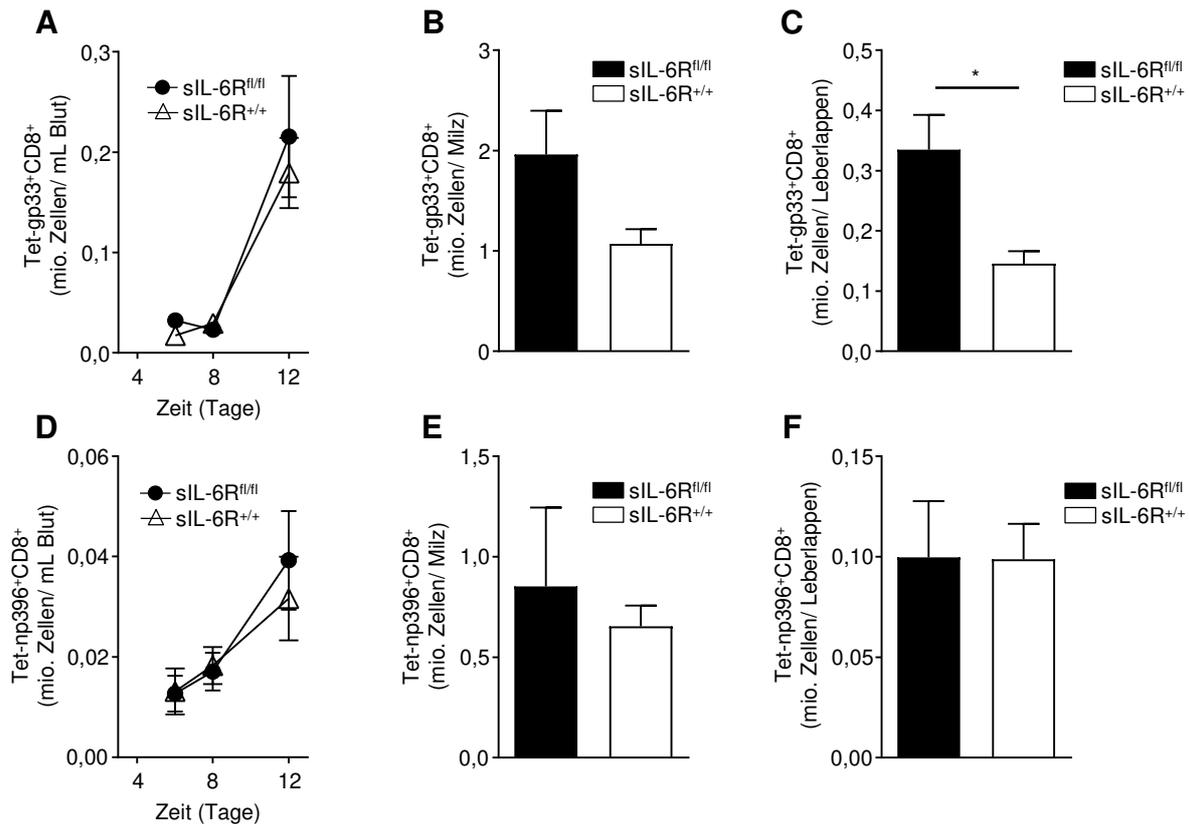


Abbildung 23: Effekt des Trans-Signals auf die T-Zellentwicklung. Die transgenen Mäuse sIL-6^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und die T-Zellentwicklung 12 Tage lang beobachtet. **(A)** An Tag 6, 8 und 12 nach Infektion wurde Blut entnommen und gp33-spezifischen T-Zellen gemessen. **(B)** An Tag 12 nach Infektion wurden die gp33-spezifischen T-Zellen aus der Milz gemessen. **(C)** An Tag 12 nach Infektion wurden die gp33-spezifischen T-Zellen aus der Leber gemessen. **(D)** An Tag 6, 8 und 12 nach Infektion wurde Blut entnommen und np396-spezifische T-Zellen gemessen. **(E)** An Tag 12 nach Infektion wurden die np396-spezifischen T-Zellen aus der Milz gemessen. **(F)** An Tag 12 nach Infektion wurden die np396-spezifischen T-Zellen aus der Leber gemessen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 6$ Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test oder des *Student's t*-Tests durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$).

Zur Überprüfung der T-Zellfunktion wurden die Zellen aus der Milz und der Leber *in vitro* stimuliert und die Effektorzytokinproduktion in den virusspezifischen T-Zellen an Tag 12 nach Infektion gemessen (siehe 2.4.7). Für die zwei T-Zellpopulation aus der Milz konnte IFN- γ induziert werden (Abb. 24A). Dabei wurden vergleichsweise wenig positive T-Zellen gefunden und zudem kein Unterschied in den untersuchten Gruppen. Ebenfalls konnte die Produktion von TNF- α in T-Zellen aus der Milz gemessen werden (Abb. 24B). Durch Stimulation mit gp33 konnte eine deutliche Induktion in beiden Gruppen bewirkt werden, die sich nicht signifikant voneinander unterschied. Bezüglich der Stimulation mit np396 wurde ebenfalls eine Produktion

von TNF- α ausgelöst, die sich nicht signifikant im Vergleich der beiden Mauslinien unterscheidet. Auffällig ist, dass für sIL-6R^{+/+} Mäuse nahezu keine Induktion im Vergleich zur Kontrolle durch np396 stattfand.

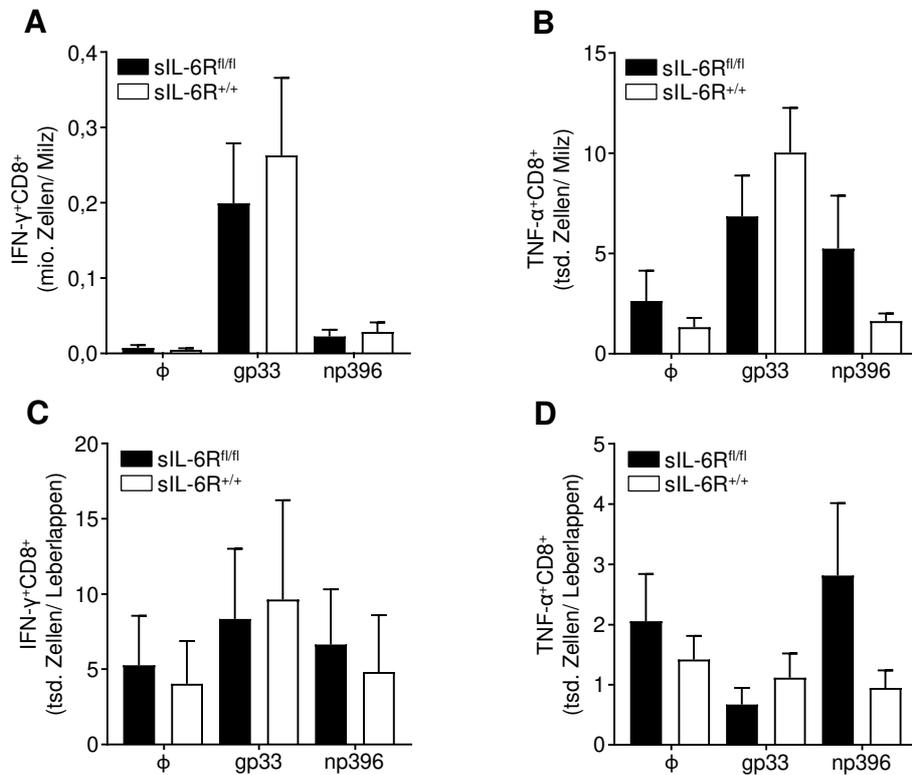


Abbildung 24: Intrazelluläre Zytokininfärbung in sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} zur Ermittlung der T-Zellfunktion. Die transgenen Mäuse sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und die T-Zellfunktion an Tag 12 gemessen. **(A)** IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz. **(B)** TNF- α Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz. **(C)** IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Leber. **(D)** TNF- α Produktion der CD8⁺ T-Zellen aus der Leber. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von n = 6 Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt.

Viruspezifische T-Zellen aus der Leber von sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäusen zeigten sowohl für gp33, als auch für np396 Stimulation keinen Unterschied zueinander in der Produktion von den beiden Effektorzytokinen IFN- γ und TNF- α (Abb. 24C,D). Darüber hinaus hatten die nicht stimulierten Kontrollen bereits eine messbare Zytokinproduktion.

Aufgrund keiner deutlichen Funde in der T-Zellentwicklung und Funktion, aber der zuvor beschriebenen effektiveren Elimination des Virus aus dem Blut an Tag 8 nach

Infektion (Abb. 19A) wurde die Expression von Oberflächenmarkern auf den virusspezifischen T-Zellen genauer untersucht.

Bei einer Infektion durch Viren oder intrazellulären Bakterien folgt eine schnelle Induktion von Interleukin-12 (IL-12) und Interferonen, gefolgt von T-helfer 1 (T_H1) und zytotoxischer T-Zellentwicklung.¹⁴² Dabei aktivieren DZ mittels Kreuzpräsentation CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten (ZTLs) zur Immunabwehr gegen Viren.¹⁴³ Funktional betrachtet sezernieren die ZTLs Zytokine wie TNF und IFN- γ die zusammen mit Granzyme B (GzmB) oder Perforin zur Abtötung virusinfizierter Zellen führen.^{144,145} Dabei wurde im speziellen der IL-6 Trans-Signalweg als Auslöser beschrieben der zur schnellen Expression von GzmB in zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen führt.⁹⁷ Zur Charakterisierung von T-Zellsubpopulationen, der Differenzierung oder Erschöpfungsstatus können verschiedenste Oberflächenmarker eingesetzt werden. So lassen sich Effektor CD8⁺ T-Zellen beispielsweise anhand der Expression von Interleukin-7 Rezeptor (IL-7R), B-Zell Lymphoma 2 (BZL-2) und *killer cell lectin-like receptor G1* (KLRG1) abgrenzen.^{146–150} Neben Gedächtnisvorläufer Effektorzellen, die während einer Infektion entstehen, konnte unter anderen eine weitere T-Zellpopulation beschrieben werden. Charakterisiert über die erhöhte Expression von KLRG1 und niedriger Expression von IL-7R sind *short-lived effector cells* (SLECs) terminal differenzierte T-Zellen, welche nach Elimination der Infektion durch Apoptose sterben.^{147,149}

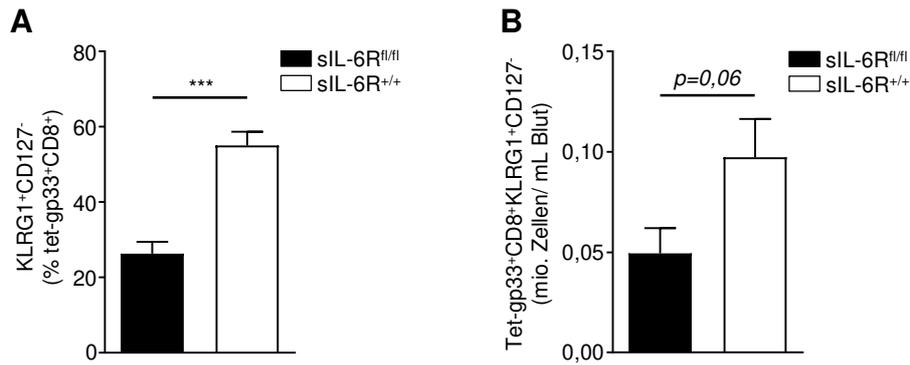


Abbildung 25: SLEC-Population im Blut von sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+}. An Tag 12 nach Infektion wurde im Blut eine T-Zellpopulation in den virusspezifischen gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen anhand der Oberflächenexpression abgegrenzt. **(A)** Frequenz der KLRG1⁺ CD127⁻ Zellpopulation in den gp33⁺ CD8⁺ virusspezifischen T-Zellpopulation im Blut. **(B)** Zellzahl der KLRG1⁺ CD127⁻ Zellpopulation in den gp33⁺ CD8⁺ virusspezifischen T-Zellpopulation im Blut. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von n = 6 Tieren pro Gruppe aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *Student's t*-Tests durchgeführt ($p \leq 0,001 = ***$).

An Tag 12 nach Infektion wurde im Blut von sIL-6R^{+/+} Mäusen eine signifikant erhöhte Frequenz der zuvor beschriebenen virusspezifischen SLECs gefunden (Abb. 25A). Ebenfalls ist die Zellzahl der SLECs tendenziell erhöht in sIL-6R^{+/+} Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren sIL-6R^{fl/fl} (Abb. 25B). Trotz der vergleichbaren IFN- γ Produktion nach *in vitro* Stimulation der T-Zellen aus der Milz und der Leber weist diese Abweichung auf einen möglichen Vorteil der sIL-6R^{+/+} Mäuse hin, virusinfizierte Zellen effektiver abzutöten.

In diesem Abschnitt wurde die T-Zellentwicklung und Funktion in den transgenen Mäusen sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} nach LCMV WE Infektion näher analysiert. Zusammenfassend konnte in der virusspezifischen gp33⁺ CD8⁺ T-Zellpopulation aus dem Blut kein Unterschied gefunden werden. Für die T-Zellen in der Milz und der Leber an Tag 12 nach Infektion wurde eine tendenziell verringerte Expansion in der Milz gefunden, die in der Leber signifikant ausgefallen ist. Auswertung der np396⁺ T-Zellpopulation ergab in der Blutkinetik, sowie in den Organen Milz und Leber an Tag 12 nach Infektion keinen Unterschied. Im Weiteren wurde für die Produktion der Effektorzytokine IFN- γ und TNF- α nach *in vitro* Stimulation der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz und Leber mit den Peptiden gp33 und np396 kein Unterschied gefunden. Interessanterweise ergab sich bei Analyse der Oberflächenexpression der virusspezifischen gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen ein Expressionsmuster, dass eine Effektor

T-Zellsubpopulation charakterisiert. Die SLEC-Population war in sIL-6R^{+/+} Mäuse im Blut an Tag 12 nach Infektion deutlich erhöht.

Bisher wurden Nachweise für eine erhöhte Leberfibrose nach Infektion mit LCMV WE in Mäusen aufgezeigt bei Blockade des klassischen IL-6 Signalweges und des Trans-Signalweges, nur des Trans-Signalweges, sowie nur des klassischen Signalweges in Kombination mit erhöhtem Trans-Signal. Abgegrenzt davon bleibt der Krankheitsverlauf bei vollständiger Deletion des IL-6R offen. Im nächsten Abschnitt werden daher kurz Schlüsselexperimente aus IL-6R^{-/-} Mäusen aufgezeigt.

3.5 Auswirkungen der IL-6R Deletion in Mäusen nach Infektion mit LCMV WE

Der IL-6 Rezeptor wird, anders als gp130, fast nur auf Hepatozyten und Zellen des Immunsystems exprimiert. Durch Blockade des IL-6R *in vivo* können bereits viele bekannte Funktionen von IL-6 unterdrückt werden. Dazu gehören auch die Modulation der inflammatorischen Antwort.^{151,152} Anders als IL-6 defiziente Mäuse zeigen Tiere ohne IL-6R keine verlangsamte Wundheilung.¹⁵³ Weiter konnte durch Deletion des IL-6R auf Hepatozyten die tragende Rolle des membranständigen Rezeptors bei der Initiation der Akute-Phase-Antwort geschlussfolgert werden.¹⁵³ Wird der IL-6R mit Antikörpern blockiert, so zeigte sich eine ähnlich schlechte Viruskontrolle, B-Zellantwort und T_{FH}-Zellantwort, wie bei der Blockade von IL-6.⁸⁵ Andererseits zeigte die Blockade des IL-6R metabolische Konsequenzen in Form eines veränderten Lipidprofils.¹⁵⁴ Eine biologische Funktion des löslichen IL-6R liegt in der Verlängerung der Plasmahalbwertszeit von IL-6.^{140,141} Aufgrund höherer Mortalität und langsamerer Leberregeneration von IL-6^{-/-} Mäuse nach partieller Hepatektomie liegt die Vermutung nahe, dass auch die Regeneration bei IL-6R^{-/-} Mäuse gestört ist.⁴⁰ Daraus folgernd ist die Untersuchung von IL-6R^{-/-} Mäusen mit dem Modell zur virusinduzierten Leberschädigung notwendig zur Ergänzung des Phänotyps. In Wildtyp-Mäusen ist der klassische und der Trans-Signalweg für IL-6 vermittelte Signalweiterleitung verfügbar (Abb. 26A). Durch Deletion des IL-6R sind diese beiden Signalwege in den IL-6R^{-/-} Mäusen blockiert.

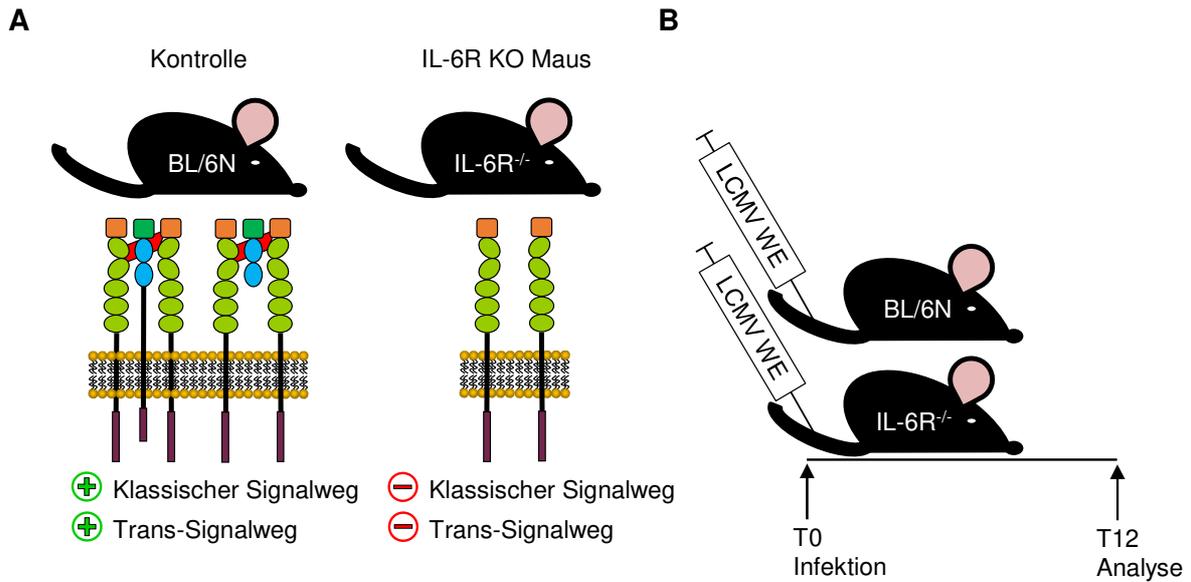


Abbildung 26: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Infektion von BL/6N und IL-6R^{-/-}. (A) In Wildtyp-Mäusen (BL/6N) kann über den klassischen und den Trans-Signalweg noch IL-6 vermittelte Signalweiterleitung erfolgen. Durch Deletion des IL-6R ist keine Signalweiterleitung mehr über den klassischen und den Trans-Signalweg möglich. (B) Die Mäuse wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und über 12 Tage beobachtet. An Tag 12 nach Infektion wurden die Mäuse geopfert.

Wildtyp-Mäuse und IL-6R^{-/-} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und an den Tagen 6, 8 und 12 nach Infektion retrobulbär Blut abgenommen (Abb. 26B, siehe 2.2.6). Aus dem Serum der Mäuse wurde mittels Trockenchemie-Analyser und Teststreifen die Leberschädigung bestimmt (siehe 2.4.1). Im beobachteten Zeitraum konnte ein Anstieg für ALT im Serum gemessen werden (Abb. 27A). Im Vergleich der beiden untersuchten Gruppen konnte kein Unterschied in der Amplitude der ALT-Serumkonzentration festgestellt werden. Ebenso wurde die Serumkonzentration von AST in beiden Gruppen festgestellt (Abb. 27B). Hierfür ergab sich an allen gemessenen Zeitpunkten kein Unterschied zwischen Wildtyp-Mäusen und IL-6R^{-/-}.

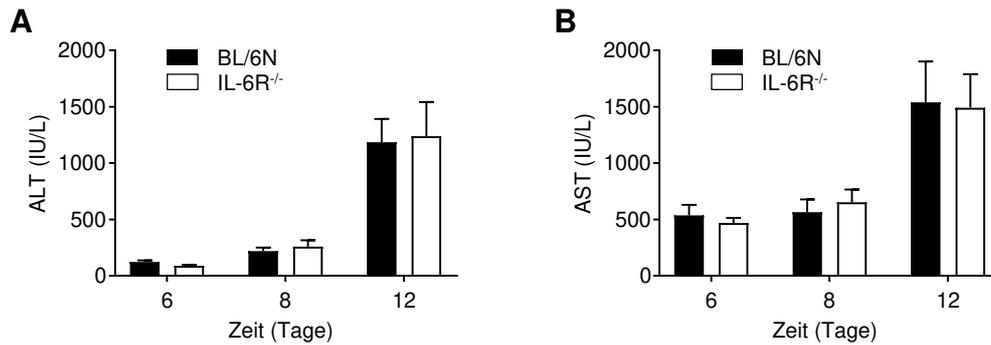


Abbildung 27: Leberschädigungsmarker ALT und AST in BL/6N und IL-6R^{-/-} Mäusen nach Infektion. Nach Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE wurde den Wildtyp-Mäusen und IL-6R^{-/-} zu den angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen. Die Serumkonzentration von ALT (**A**) oder AST (**B**) wurde mittels Trockenchemie-Analyser und Teststreifen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 3$ Tieren pro Gruppe aus einem Experiment. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Sidak's *multiple comparisons* Test durchgeführt.

Im Weiteren wurde die Viruslast im Serum und primär infizierten Organen bestimmt (siehe 2.4.5). An Tag 6 nach Infektion waren noch hohe Titer im Serum detektierbar worden (Abb. 28A). Für die Wildtyp-Mäuse wurde an Tag 8 nach Infektion eine tendenziell reduzierte Viruslast gemessen, die jedoch höher ausgefallen ist als für IL-6R^{-/-} Mäuse. Zum Ende des Beobachtungszeitraums an Tag 12 nach Infektion wurde der Virus vollständig aus dem Blut eliminiert. Bezüglich der Viruslast in Milz und Leber konnten geringe bis keine Viruspartikel an Tag 12 nach Infektion mehr festgestellt werden (Abb. 28B,C).

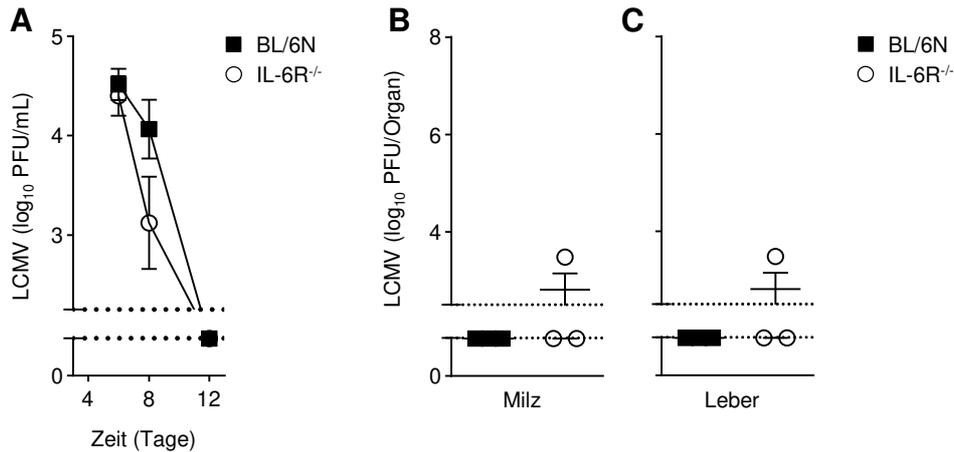


Abbildung 28: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von BL/6N und IL-6R^{-/-} Mäusen nach Infektion. Wildtyp-Mäuse und IL-6R^{-/-} wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und zu angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen bzw. an Tag 12 nach Infektion die Organe. **(A)** Serumkinetik der Viruslast bestimmt mittels Plaque-Assay. **(B)** Viruslast in der Milz an Tag 12 nach Infektion. **(C)** Viruslast in der Leber an Tag 12 nach Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM oder das Streudiagramm \pm SEM von $n = 3$ Tieren pro Gruppe aus einem Experiment. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test oder *Student's t*-Test durchgeführt.

Zusätzlich wurde die Viruslast in weiteren Geweben an Tag 12 nach Infektion festgestellt. Typisch für das Modell und bestätigend für einen erwarteten Krankheitsverlauf konnte noch Viruslast in der Niere, der Lunge, dem Spinalkanal und dem Gehirn gemessen werden (Abb. 29A-D). Dabei konnte kein Unterschied in der Viruslast im Vergleich der zwei Mausgruppen gefunden werden. Zuletzt wurde in beiden Gruppen der Fibrosemarker Collagen in der Leber untersucht. Dazu wurde an Tag 12 nach Infektion Gewebeproben der Leber genommen und die Collagenexpression mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt (siehe 2.4.3).

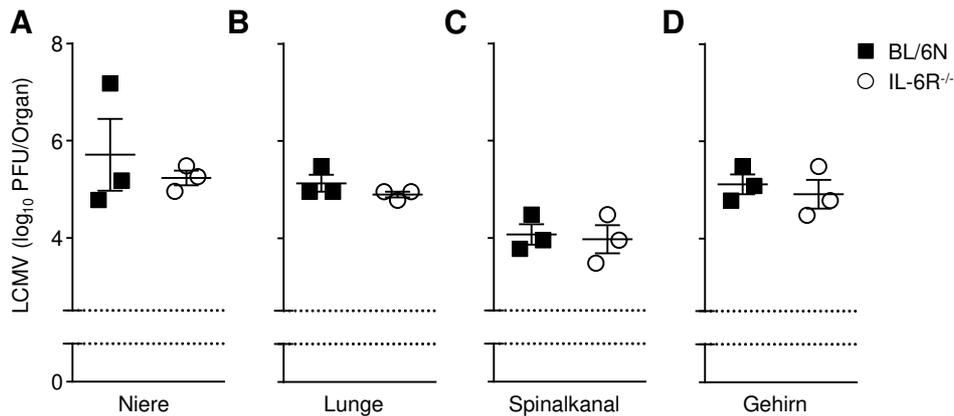


Abbildung 29: Viruslast im Gewebe nach Infektion von BL/6N und IL-6R^{-/-} Mäusen. BL/6N und IL-6R^{-/-} Mäuse wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert und an Tag 12 nach Infektion Gewebeproben entnommen. Die Viruslast wurde mittels Plaque-Assay in Niere (A), Lunge (B), Spinalkanal (C) und Gehirn (D) gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM als Streudiagramm von $n = 3$ Tieren pro Gruppe aus einem Experiment. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *Student's t*-Tests durchgeführt.

Für IL-6R^{-/-} Mäuse wurde tendenziell mehr Signal für Collagenexpression in der Leber gefunden im Vergleich zu BL/6N-Mäusen (Abb. 30A). Zudem konnte durch statistische Auswertung dieser Trend weiter bestätigt werden (Abb. 30B).

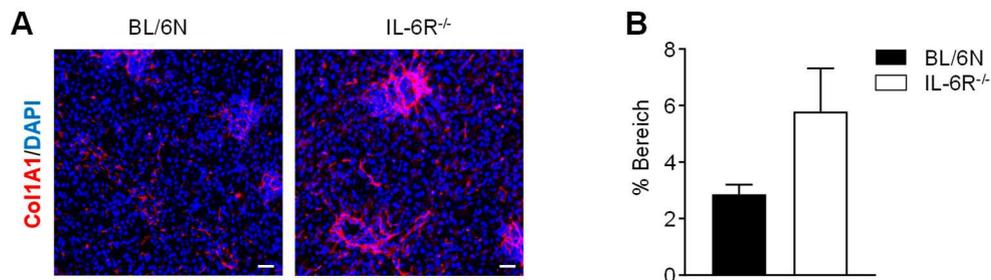


Abbildung 30: Collagenexpression in der Leber nach Virusinfektion in BL/6N und IL-6R^{-/-} Mäusen. An Tag 12 nach Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE wurde den BL/6N und IL-6R^{-/-} Mäusen die Lebern entnommen und die Collagenexpression mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. (A) Collagenexpression (rot), sowie Zellkerne (blau) dargestellt mittels Immunfluoreszenz. Abgebildet sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Vergrößerung: 20-fach, Maßstab: 100 μ m. (B) Statistische Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen von Collagen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 3$ Tieren pro Gruppe aus einem Experiment. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *Student's t*-Tests durchgeführt.

Zusammengenommen konnte durch die Infektion und die erhaltenen Funde in Bezug auf die Leberschädigung die Beteiligung des IL-6 Signalweges weiter konkretisiert

werden. In allen bisherigen Modellen wurde der IL-6 Signalweg auf unterschiedlichste Weise beeinträchtigt. Dabei zeigte sich keine Veränderung in den Serummarkern ALT und AST. Zudem blieb auch die Viruslast in allen Geweben konstant vergleichbar. Zum Ende der Experimente konnte jeweils eine fast vollständige Elimination im Serum, der Milz oder der Leber nachgewiesen werden. Einzig durch Abwesenheit des IL-6R auf der Oberfläche von Zellen konnte für sIL-6R^{+/+} signifikant schnellere und IL-6R^{-/-} eine tendenziell schnellere Elimination am Tag 8 nach Infektion im Serum festgestellt werden. In den peripher infizierten Organen Niere, Lunge, Spinalkanal und Gehirn persistierte das Virus bis zum Ende des Beobachtungszeitraums von 12 Tagen. Jedoch konnte bei jedem Modell durch die Beeinflussung des IL-6 Signalweges ein verstärktes Signal für die Collagenexpression gefunden werden. Die Effekte in der T-Zellentwicklung und Funktion waren uneinheitlich.

Aufgrund der Funde für die Viruselimination im Blut von sIL-6R^{+/+} und einer vermehrten Differenzierung hinzu ZTL kam die Fragestellung auf, ob erhöhtes Trans-Signal einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf nach viraler Infektion hat. Zur Beurteilung dieser Hypothese wurde das Designerzytokin HIL-6 verwendet, welches Zellen nur über den Trans-Signalweg aktiviert. Auf die Auswertung der Experimente wird im nächsten Abschnitt eingegangen.

3.6 Stimulation des Trans-Signalweges verstärkt Leberschädigung nach Infektion mit LCMV

Der Trans-Signalweg wird häufig mit negativen physiologischen Auswirkungen assoziiert.¹²⁹ Einige davon könnten jedoch bei einer akuten Infektion durch kurzfristige Applikation von Hyper-IL-6 im Gegenteil förderlich sein. Erst kürzlich konnte die essentielle Rolle des Trans-Signals während der Leberregeneration charakterisiert werden.²⁶ Zur gezielten Analyse der Auswirkungen durch Stimulation des Trans-Signalweges wurde das Fusionsprotein Hyper-IL-6 generiert.²⁹ Damit ist es möglich, alle Zellen zu aktivieren die gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Ziel war es daher, sowohl die Kontrolle der Infektion als auch die anschließende Leberregeneration positiv zu beeinflussen.

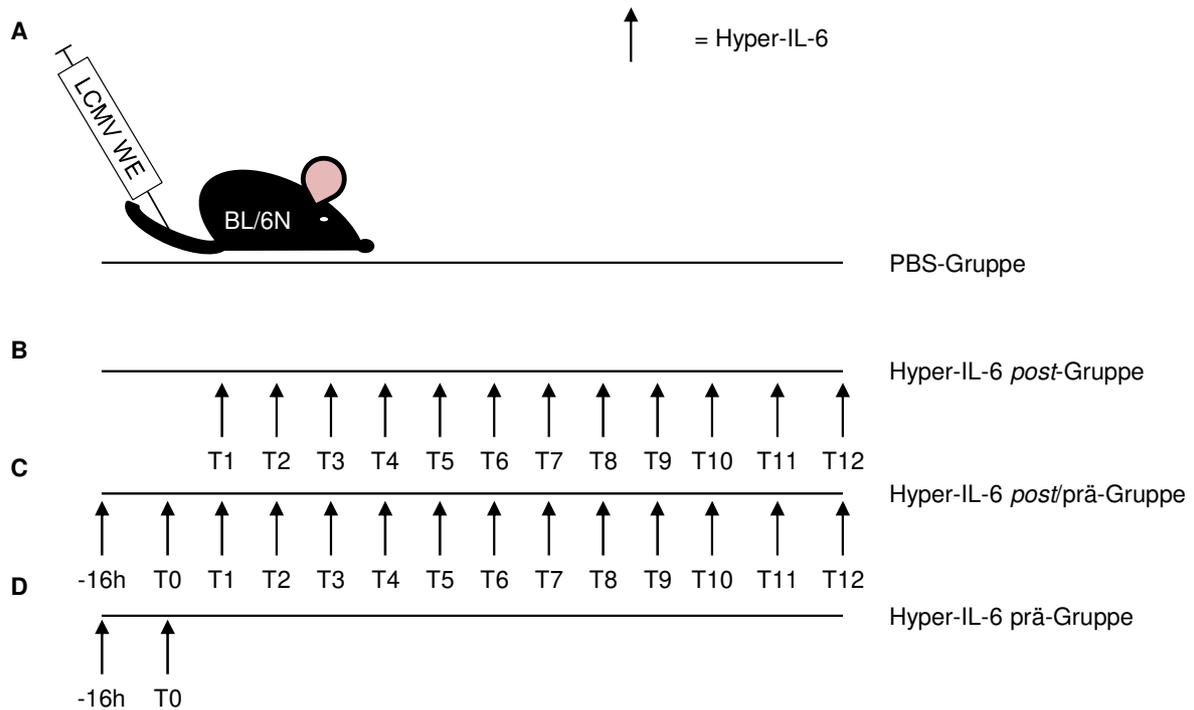


Abbildung 31: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Aktivierung des Trans-Signalweges mit Hyper-IL-6 in Kombination mit LCMV WE-Infektion. (A) BL/6N Mäusen wurde 16 Stunden vor Infektion PBS *i.p* verabreicht und anschließend täglich. (B) BL/6N Mäusen wurde 16 Stunden vor Infektion, sowie am Tag der Infektion, PBS *i.p* verabreicht und anschließend täglich mit 10 µg Hyper-IL-6 behandelt (schwarze Pfeile). (C) BL/6N Mäusen wurde 16 Stunden vor Infektion 10 µg Hyper-IL-6 *i.p* verabreicht und anschließend täglich (schwarze Pfeile). (D) BL/6N Mäusen wurde nur 16 Stunden vor Infektion, sowie am Tag der Infektion, Hyper-IL-6 *i.p* verabreicht (schwarze Pfeile). Alle Gruppen wurden mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. Am Tag 12 nach Infektion endete das Experiment.

Zur Evaluation eines verstärkten Trans-Signals in Mäusen wurde Hyper-IL-6 eingesetzt und mittels intraperitonealer Injektion appliziert (siehe 2.2.5). Zusätzlich sollte geklärt werden, ob der Zeitpunkt des Stimulus entscheidend über den Krankheitsverlauf ist. Es wurden vier Gruppen mit unterschiedlichem Start und Ende der Behandlung gewählt. Als Ausgangslinie wurden BL/6N Mäuse verwendet. Zur Kontrolle diente jeweils PBS, da das Fusionsprotein darin gelöst wurde. Für die Kontrolle wurde keine Behandlung mit Hyper-IL-6 durchgeführt, stattdessen wurde nur PBS in die Tiere injiziert. In die erste Gruppe wurde von Anfang bis Ende nur PBS gespritzt (Abb. 31A, PBS-Gruppe). Die Gruppe Hyper-IL-6 *post* erhielt nach Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE täglich eine Behandlung mit Hyper-IL-6 (Abb. 31B). Eine weitere Gruppe wurde vor Infektion und danach täglich mit Hyper-IL-6 behandelt (Abb. 31C, Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe). Die letzte Gruppe erhielt nur vor Infektion eine Behandlung mit Hyper-IL-6 (Abb. 31D, Hyper-IL-6 *prä*-Gruppe).

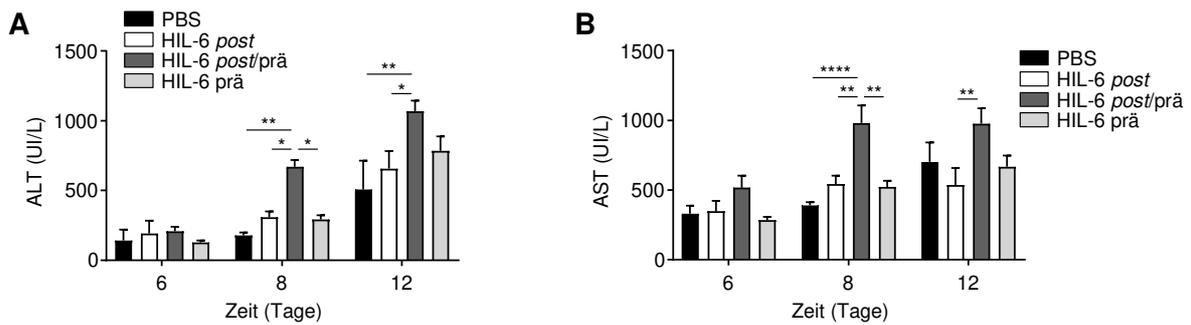


Abbildung 32: Leberschädigungsmarker ALT und AST in Hyper-IL-6 behandelten Mäusen nach Infektion. Nach Infektion mit 2×10^6 PFU LCMV WE wurde den behandelten Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten Blut entnommen. Die Serumkonzentration von ALT (**A**) oder AST (**B**) wurde mittels Trockenchemie-Analyser und Teststreifen bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 5 - 8$ Tieren pro Gruppe aus ein bis zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,0001 = ****$).

Das Serum aller Gruppen wurde auf die Leberschädigungsmarker ALT und AST untersucht (siehe 2.4.1). Nach Infektion wurde den Mäusen an Tag 6, 8 und 12 nach Infektion retrobulbär Blut entnommen und das Serum abgetrennt (siehe 2.2.6). Bereits an Tag 8 nach Infektion konnte in der Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu allen anderen Gruppen an ALT gemessen werden (Abb. 32A). Zuvor war an Tag 6 nach Infektion noch kein Unterschied messbar. Nach 12 Tagen wurde immer noch ein signifikanter Unterschied in der Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe im Vergleich zur PBS- und *post*-Gruppe gefunden. Weitere Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht detektiert werden. Ein ähnliches Muster konnte für die Serumkonzentration von AST bestimmt werden (Abb. 32B). So zeigt sich an Tag 6 eine geringfügige Tendenz für erhöhtes AST im Serum der Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe. An Tag 8 war der Wert in der gleichen Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu allen anderen Gruppen. Selbst an Tag 12 nach Infektion verblieb die Serumkonzentration von AST noch signifikant erhöht im Vergleich zur Hyper-IL-6 *post*-Gruppe.

Somit zeigte sich, dass ein durchgängig erhöhtes *Trans-Signaling* zu einer früheren und deutlicheren virusinduzierten Schädigung der Leber führte. Zudem verblieb die tendenziell erhöhte Serumkonzentration von ALT und AST in der Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe bis zum Ende des Experiments an Tag 12.

Im weiteren Verlauf wurde die Viruslast in den behandelten Tieren mittels Plaque-Assay gemessen (siehe 2.4.5). Im Serum aller Gruppen zeigte sich an Tag 6

nach Infektion eine deutliche Viruslast (Abb. 33A). Nach 8 Tagen wurde nur für die PBS-Gruppe signifikant weniger Viruslast im Vergleich zwischen den Gruppen im Serum gefunden. Nach 12 Tagen konnte im Serum Virus in allen Gruppen gefunden werden, jedoch deutlich weniger als an Tag 8 nach Infektion. In der Regel wird der Virus bis 12 Tage nach Infektion aus dem System eliminiert. In diesem Versuch verblieb selbst in der Kontrollgruppe noch Virus im Serum.

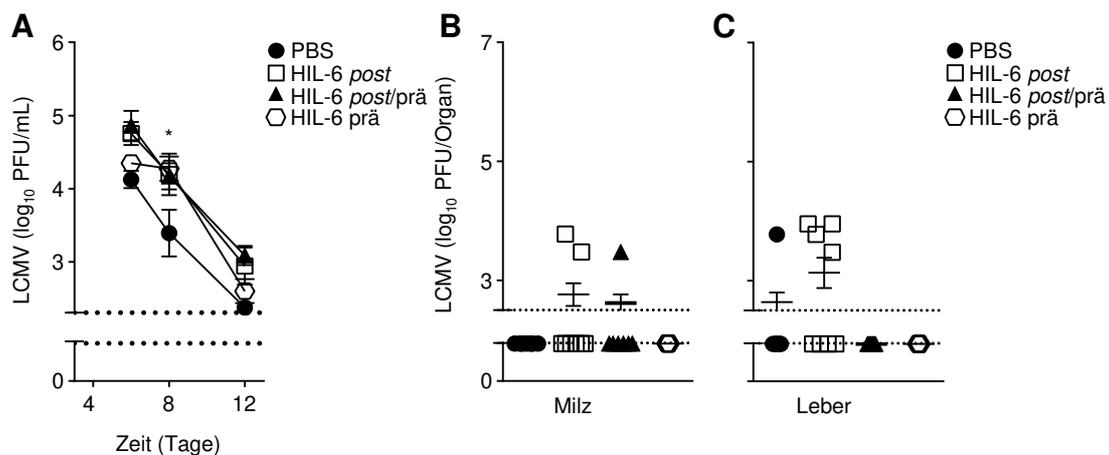


Abbildung 33: Viruslast im Serum und in primär infizierten Organen von Hyper-IL-6 behandelten Mäusen nach Infektion. BL/6N Mäuse wurden mit Hyper-IL-6 oder PBS behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde Blut entnommen bzw. an Tag 12 nach Infektion die Organe. **(A)** Serumkinetik der Viruslast bestimmt mittels Plaque-Assay. **(B)** Viruslast in der Milz an Tag 12 nach Infektion. **(C)** Viruslast in der Leber an Tag 12 nach Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM oder das Streudiagramm \pm SEM von $n = 5 - 8$ Tieren pro Gruppe aus einem bis zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Test mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test oder *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$).

Neben dem Serum wurden auch Milz und Leber auf die Viruslast mittels Plaque-Assay untersucht. Für die Milz zeigte sich keine Viruslast mehr in der PBS-Gruppe und der Hyper-IL-6 prä-Gruppe (Abb. 33B). In wenigen Individuen der Hyper-IL-6 *post*-Gruppe und der Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe wurden noch eine geringe Viruslast gemessen. In der Leber der Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe und der Hyper-IL-6 prä-Gruppe konnte keine Viruslast mehr gemessen werden (Abb. 33C). Hingegen wurde in der PBS-Gruppe und der Hyper-IL-6 *post*-Gruppe für wenige Individuen noch Viruslast gefunden.

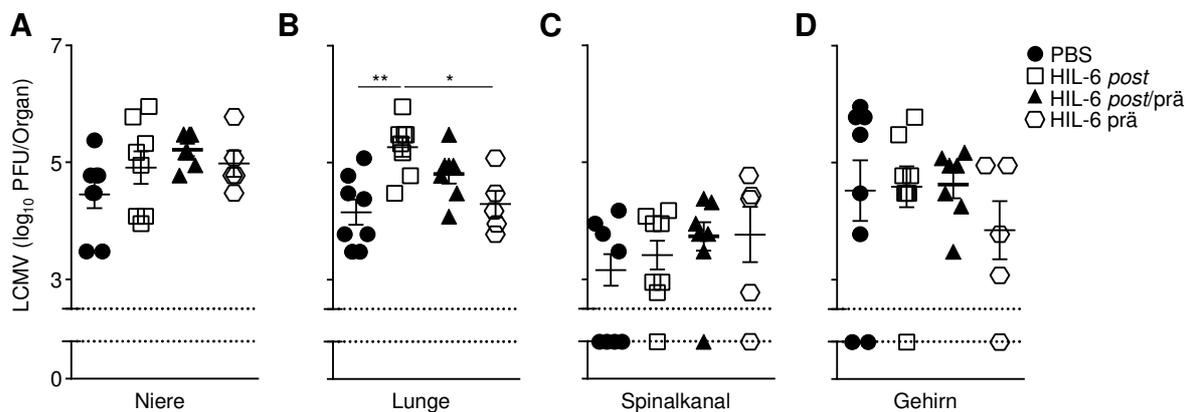


Abbildung 34: Viruslast im Gewebe von Hyper-IL-6 behandelten Mäusen nach Infektion. BL/6N Mäuse wurden mit Hyper-IL-6 oder PBS behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. An Tag 12 nach Infektion wurden die Organe entnommen und die Viruslast mittels Plaque-Assay bestimmt. **(A)** Viruslast in der Niere an Tag 12 nach Infektion. **(B)** Viruslast in der Lunge an Tag 12 nach Infektion. **(C)** Viruslast in der Leber an Tag 12 nach Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM oder das Streudiagramm \pm SEM von $n = 5 - 8$ Tieren pro Gruppe aus einem bis zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$).

Zusätzlich wurde die Viruslast in weiteren Geweben untersucht. In allen Gruppen konnten vergleichbare Mengen an Virus in der Niere gefunden werden (Abb. 34A). Ebenso zeigten sich für den Spinalkanal und das Gehirn vergleichbare Mengen an Virus in allen Gruppen (Abb. 34C,D). Für die Lunge wurde auch eine hohe Viruslast gefunden (Abb. 34B). Dabei konnte für die Hyper-IL-6 *post*-Gruppe eine signifikant höhere Viruslast im Vergleich zur PBS-Gruppe und der Hyper-IL-6 *prä*-Gruppe gefunden werden. Die Viruslast in der Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe war vergleichbar mit der Hyper-IL-6 *post*-Gruppe.

Aus der Viruslast im Serum und den Geweben ergibt sich ein erwartetes Muster für die Virusinfektion in Kombination mit der Behandlung mit Hyper-IL-6. Die signifikanten Unterschiede im Serum an Tag 8 nach Infektion und der Lunge geben jedoch einen weiteren Hinweis auf eine mögliche höhere Pathologie begünstigt durch hohes Trans-Signal in den Tieren.

Besonders für Hyper-IL-6 konnte ein positiver Effekt bei der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie beschrieben werden.³⁵ Dabei zeigte sich bereits kurz nach Behandlung mit Hyper-IL-6 eine Erhöhung der Lebermasse um 50%. Aus dem Grund

war es von Interesse die Leberschädigung am Ende des Experiments zu evaluieren. Als erstes wurde die Expression von Collagen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen (siehe 2.4.3). Dabei zeigte sich eine erhöhte Expression von Collagen in allen mit Hyper-IL-6 behandelten Gruppen verglichen mit der PBS-Gruppe (Abb. 35A). Statistische Auswertung des betroffenen Bereichs zeigte einen signifikanten Anstieg in der Expression in allen Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 35B). Dabei hatte die Hyper-IL-6 *post*-Gruppe und die Hyper-IL-6 *post/prä*-Gruppe eine vergleichbare Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe. Hervorstechend war die Erhöhung der Expression in der Hyper-IL-6 *prä*-Gruppe. Diese zeichnete sich im Besonderen ab, da der betroffene Bereich verglichen mit allen anderen Gruppen signifikant erhöht war.

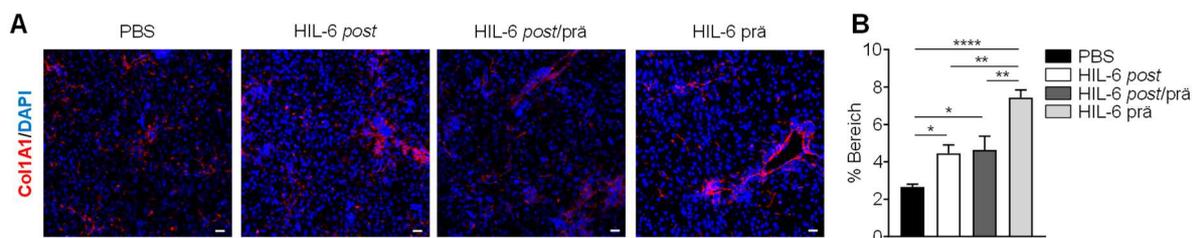


Abbildung 35: Collagenexpression in der Leber nach Virusinfektion in Hyper-IL-6 behandelten Mäusen. BL/6N Mäuse wurden mit HIL-6 oder PBS behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. An Tag 12 nach Infektion wurde die Leber entnommen. **(A)** Schnitte der Leber wurden gefärbt und die Collagenexpression (rot), sowie Zellkerne (blau) mittels Immunfluoreszenz abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Vergrößerung: 20-fach, Maßstab: 100 μ m. **(B)** Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen von Collagen. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 5 - 8$ Tieren pro Gruppe aus einem bis zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,0001 = ****$).

Zusätzlich wurde in allen Gruppen die Expression von α -SMA nachvollzogen (Abb. 36A). In den Aufnahmen zeigte sich kein eindeutiger Trend der auf einen Effekt durch HIL-6 hinweist. Durch Analyse des betroffenen Bereichs konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden (Abb. 36B).

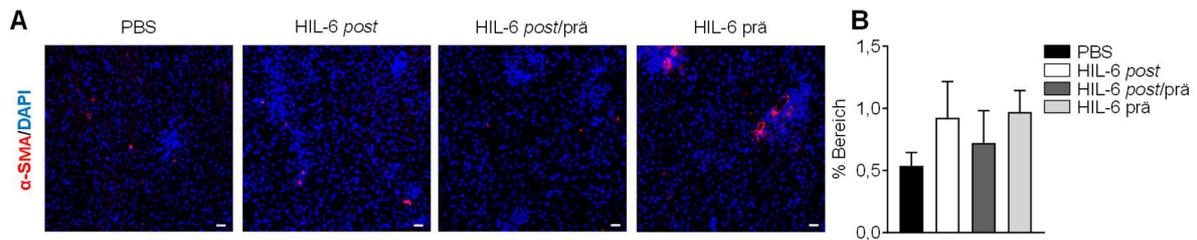


Abbildung 36: Expression von α -SMA in der Leber nach Virusinfektion in Hyper-IL-6 behandelten Mäusen. BL/6N Mäuse wurden mit Hyper-IL-6 oder PBS behandelt und mit 2×10^6 PFU LCMV WE infiziert. An Tag 12 nach Infektion wurde die Leber entnommen. **(A)** Schnitte der Leber wurden gefärbt und die α -SMA Expression (rot), sowie Zellkerne (blau) mittels Immunfluoreszenz abgebildet. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Vergrößerung: 20-fach, Maßstab: $100 \mu\text{m}$. **(B)** Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen von α -SMA. Angegeben ist der Mittelwert \pm SEM von $n = 5 - 8$ Tieren pro Gruppe aus einem bis zwei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung des *one-way* ANOVA-Tests mit anschließendem Tukey's *multiple comparisons* Test durchgeführt.

Zusammenfassend konnte für jedes Experiment ein Einfluss durch erhöhtes Trans-Signal gefunden werden. Vor- und Nachbehandlung mit Hyper-IL-6 in Kombination mit LCMV WE Infektion führte zu signifikant höheren Serumkonzentrationen von ALT und AST. Zudem wurde für alle behandelten Gruppen an Tag 8 nach Infektion mehr Viruslast im Serum gefunden. In Zusammenhang damit grenzte sich die Hyper-IL-6 *post*-Gruppe durch erhöhte Titer in der Lunge von der Kontrollgruppe und der Hyper-IL-6 *prä*-Gruppe ab. Bezüglich des Fibrosemarkers Collagen zeigte sich eine signifikant höhere Expression in allen behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zudem hatte die Behandlung mit Hyper-IL-6 nur vor der Infektion einen weitaus stärkeren Effekt auf die Expression von Collagen verglichen mit allen anderen Gruppen. Zuletzt wurde kein Unterschied in der Expression von α -SMA zwischen allen Gruppen gefunden. Im Allgemeinen lässt sich daher für die Behandlung mit Hyper-IL-6 eine negative Tendenz vermerken, sowohl für den anfangs entstandenen Schaden, als auch für die darauf folgende Regeneration.

4. Diskussion

Interleukin-6 ist ein Zytokin und gehört zu der Familie der Interleukin-6 artigen Zytokine.³ Neben pleiotropen Effekten von IL-6 bei der Homöostase im Körper steuert der IL-6 Signalweg sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Prozesse.⁴ Dabei sind für IL-6, nach derzeitigem Stand, drei Aktivierungswege bekannt. Bei dem klassischen IL-6 Signal bindet IL-6 aus dem Blut an den membrangebundenen IL-6R. In Folge dessen werden gp130-Rezeptoren rekrutiert und die Signalkaskade angestoßen. Der Trans-Signalweg wird aktiviert durch einen Komplex aus IL-6 und sIL-6R. Nach Bildung des Komplexes kann dieser an membranständiges gp130 binden, wodurch nach Homodimerisierung von gp130 die Signalkaskade initiiert wird.^{27,28} Ein kürzlich gefundener Signalweg vermittelt das IL-6 Signal direkt über Zell-Zell-Kontakt durch Präsentation eines IL-6/IL-6R-Komplex an ein gp130-Dimer auf der Empfängerzelle.³⁰

Interessanterweise exprimieren nur wenige Zellen den IL-6R auf ihrer Oberfläche, wohingegen gp130 nahezu ubiquitär vorkommt.³ Somit ermöglicht der Trans-Signalweg eine Erweiterung des Zellspektrums auf das IL-6 Einfluss nimmt. Neben Makrophagen und Neutrophilen wird der IL-6R auch von Hepatozyten exprimiert.³ Als Hauptzellpopulation der Leber wurde das IL-6 vermittelte Signal im Besonderen als essentieller Stimulus bei der Leberregeneration beschrieben.⁴⁰ Funktional betrachtet ist die Leber unter anderem beteiligt am Metabolismus, der Mehrheit an sezernierten Proteinen im Blut und der Unterstützung des Immunsystems bei bakteriellen und viralen Infekten.¹⁵⁵

Eine chronische Virusinfektion mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) ist ein globales Gesundheitsproblem und verbunden mit Leberschäden.¹⁵⁶ Zur Untersuchung im *in vivo* Modell kann eine hohe Dosis des lymphatischen Choriomeningitis Virus verwendet werden.¹¹⁵ Die Etablierung einer T-Zellimmunität bedarf die Aktivierung des angeborenen Immunsystems im Zusammenhang mit der Reifung von Antigenpräsentierenden Zellen. Diese professionellen APZs sind beteiligt an der Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen hinzu zytotoxischen T-Lymphozyten.¹⁴³ Zusammen mit weiteren kostimulatorischen Signalen in einem komplexen Netzwerk von Transkriptionsregulatoren führt dies zum Erwerb der T-Zelleffektorfunktion und einer anhaltenden Proliferation zur Elimination der Viruslast.^{142,157} In diesem Modell schädigen aktivierte virusspezifische T-Zellen die Leber in Folge der Elimination der

Viren aus dem System. Dadurch kann zum einen die entstehende Fibrose, sowie die Entwicklung der Immunantwort untersucht werden.

Ziel dieses Projektes war es daher, in murinen *in vivo* Modellen die Virusabwehr bei einer LCMV-Infektion im Hinblick auf die IL-6 Signalwege zu untersuchen. Im Weiteren kann durch Infektion mit dem nicht-zytolytischen Virusstamm LCMV WE die Leberregeneration nach Virus-induzierter Schädigung beobachtet werden. Dadurch sollte geklärt werden, welchen Beitrag der klassische oder der Trans-Signalweg zu der Leberregeneration leistet.

Zu diesem Zweck wurden drei Ansätze gewählt:

- (i) Den Einsatz von monoklonalen Antikörpern zur globalen IL-6 Blockade oder des spezifischen *Trans-signaling* Inhibitors sgp130Fc, um in Wildtyp-Tieren zwischen den beteiligten Aktivierungswegen zu unterscheiden,
- (ii) Die Blockade des klassischen IL-6 Signalweges mittels sIL-6R^{+/+}-*Trans-signaling* Mäusen oder des klassischen und des Trans-Signalweges mittels IL-6R^{-/-} *knock-out* Mäusen
- (iii) Den Einsatz des Fusionsproteins Hyper-IL-6 zur gezielten Aktivierung des Trans-Signalweges.

Durch die Analyse der T-Zellen, ihrer Funktion, der Viruslast und des Leberschadens war es möglich, die Auswirkungen der Signalwege im Kontext der Virus-induzierten Leberschädigung zu untersuchen.

4.1 Auswirkungen der Blockade des IL-6 vermittelten Signals im Modell zur virusinduzierten Leberschädigung

Unter physiologischen Bedingungen ist die Menge an IL-6 im Serum sehr gering. Im Gegensatz dazu können Konzentrationen im Nanogrammbereich pro Milliliter des sIL-6R im Serum gefunden werden. Besonders nach bakteriellen oder viralen Infektionen wird häufig ein Anstieg der IL-6 Serumkonzentration beobachtet. Ebenfalls konnte ein Anstieg des sIL-6R bei einer Reihe von Erkrankungen gefunden werden. Dadurch ergibt sich neben dem klassischen Signalweg über den membrangebunden IL-6R ein weiterer Signalweg. IL-6 und sIL-6R können einen Komplex bilden, der den Trans-Signalweg über gp130 auf der Zielzelle aktiviert.¹²⁹

Auch bei einer Infektion durch LCMV steigt der IL-6-Serumspiegel am dritten Tag als Reaktion auf den Erreger in einer ersten Immunreaktion des angeborenen Immunsystems.⁸⁵ Sowohl den Anstieg von IL-6, als auch einen Anstieg des sIL-6R konnten wir im Serum von infizierten Wildtyp-Mäusen nachvollziehen (Abb. 6). Daraus ergab sich die Fragestellung, welche Bedeutung der Anstieg von IL-6 und sIL-6R in unserem Modell hat und welche Auswirkungen eine Blockade der Signalwege bei einer akuten Virusinfektion hat. Zusätzlich ist die virus-induzierte Leberschädigung Teil des Modells.¹¹⁵ Dadurch ermöglicht die Verwendung des LCMV WE-Stamms die Analyse einer T-Zellantwort, sowie die Beurteilung der Leberregeneration.

Durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 können der klassische und der Trans-Signalweg blockiert werden.¹²⁹ Durch Verwendung des spezifischen Inhibitors sgp130Fc ist es möglich, spezifisch den Trans-Signalweg zu blockieren.¹⁶ Behandelte Mausgruppen mit entweder IL-6 mAb oder sgp130Fc zeigten einen Anstieg der Serummarker AST und ALT, jedoch gab es untereinander in den Gruppen keinen signifikanten Unterschied (Abb. 8). Immunfluoreszenzaufnahmen von Leberschnitten zeigten bei der anschließenden Regeneration signifikante Unterschiede in der Collagen- und α -SMA Expression (Abb. 11, 12). Sowohl die globale IL-6 Blockade, als auch die spezifische Blockade des Trans-Signalweges führte zur erhöhten Expression beider Fibrosemarker. Folglich ist die Blockade des Trans-Signalweges ausschlaggebend für den gefundenen Phänotyp. Der Trans-Signalweg wurde als essentiell für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie beschrieben.²⁶ Darauf aufbauend würde auch unser Fund damit übereinstimmen (Abb. 37).

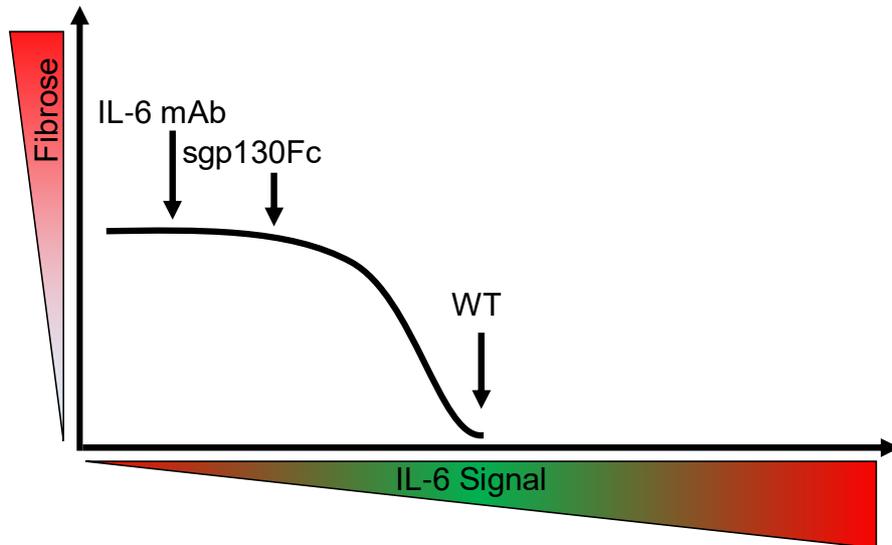


Abbildung 37: Schematische Darstellung der Leberfibrose nach virusinduzierter Schädigung in Abhängigkeit vom IL-6 Signal (I). In Wildtyp-Mäusen wird das IL-6 Signal natürlich reguliert. Durch Blockade des Trans-Signalweges mit sgp130Fc fällt der Trans-Signalweg weg, wodurch eine erhöhte Fibrose eintritt. Wird IL-6 komplett blockiert, fallen alle IL-6 vermittelten Signalwege weg, wodurch ebenfalls eine erhöhte Fibrose nach virusinduzierter Schädigung entsteht.

In dem verwendeten Modell sorgen zytotoxische T-Zellen für eine Leberschädigung.¹¹⁵ Durch Infektion mit einer sehr hohen Dosis Virus werden folglich Hepatozyten, durch Präsentation von Viruspeptiden auf MHC I Molekülen auf der Oberfläche, erkannt und abgetötet (Abb. 5). In diesem Zusammenhang ist die Viruslast im Serum und anderen Geweben von Interesse für den Infektionsverlauf. In den behandelten Gruppen wurde kein Unterschied untereinander bezüglich der Viruslast gefunden (Abb. 9, 10). Daraus lässt sich ableiten, dass durch die Blockade des klassischen oder des Trans-Signalweges keine effektivere Elimination der Viren stattfindet. Auch könnte argumentiert werden, dass die Vermehrung und die allgemeine Elimination der Viren aus dem Wirt nicht signifikant durch diese beiden IL-6 Signalwege beeinflusst wird. Gestützt wird diese Hypothese durch zwei weitere Arbeiten mit LCMV in einem akuten Infektionsmodell, in denen auch kein Effekt in IL-6 *knock-out* Mäusen gefunden wurde.^{85,87} In klinischen Studien mit monoklonalen Antikörper gegen IL-6R wurde in den behandelten Patienten eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen beschrieben.^{72,73} Dies verweist im Weiteren darauf, dass IL-6 vielmehr im Fall einer bakteriellen Infektion eine tragende Rolle zukommt, als bei einer akuten viralen Infektion.

Davon abgegrenzt wurde jedoch in einem chronischen Infektionsmodell eine wichtige Rolle für IL-6 beschrieben. Die Erhaltung des humoralen Immunsystems ist insbesondere abhängig von STAT3.⁸⁴ Im Weiteren wird IL-6 auch bei der Abwehr von bakteriellen Infektionen benötigt.⁴⁵ Jedoch zeigte sich in der gleichen Studie, dass die Blockade des Trans-Signalweges keinen Einfluss auf die Kontrolle von *Listeria monocytogenes* hatte.

Bei der Analyse der T-Zellentwicklung wurde einzig im Blut durch Inhibition des klassischen und des Trans-Signalweges durch IL-6 mAb eine verringerte Expansion der gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen gefunden (Abb. 13A). Dieser Unterschied konnte nicht bei der Entstehung des Leberschadens gefunden werden und wirkte sich auch nicht weiter auf die Elimination der Viren aus dem Blut aus. IL-6 ist wichtig für die T-Zellexpansion und das Überleben von T-Zellen und gilt neben der Antigenstimulation und dem IL-2 vermittelten Signal als weiterer notwendiger Stimulus.^{158,159} Interessant hierbei ist, dass ähnlich wie bei einer bakteriellen Infektion durch *Listeria monocytogenes* die Blockade des Trans-Signalweges keine Auswirkung auf die T-Zellen hatte. Die T-Zellen aus der Milz oder der Leber entwickelten sich unbeeinflusst durch die Blockade der Signalwege. Eine weitere untersuchte T-Zellpopulation zeigte keine Unterschiede. Für np396⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde keine Beeinträchtigung im Blut, der Milz oder der Leber beobachtet. Zur Abtötung virusinfizierter Zellen sezernieren die ZTLs Zytokine wie TNF- α und IFN- γ , die zusammen mit Perforin und GzmB wirken.^{160,161}

Es zeigte sich für CD8⁺ T-Zellen aus der Milz kein Unterschied bei der Produktion von IFN- γ oder TNF- α nach *in vitro* Stimulation mit dem Viruspeptid gp33 (Abb. 14). Die Zytokinproduktion konnte deutlich initiiert werden. Jedoch zeigte die Blockade der IL-6 Signalwege keine Beeinträchtigung. Für T-Zellen aus der Leber wurde ein signifikanter Unterschied bei der IFN- γ Produktion durch globale IL-6 Blockade im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Durch die Blockade des Trans-Signalweges mit sgp130Fc zeigte sich tendenziell ein etwas geringeres Signal für IFN- γ . Allerdings ist auch eine Produktion von IFN- γ in den nicht stimulierten Kontrollen nachweisbar. Möglicherweise sorgen nicht eliminierte Viruspartikel in der Leber für eine Stimulation der T-Zellen. In Kombination mit deutlich weniger T-Zellen in der Leber als in der Milz könnte damit die vergleichsweise deutliche Produktion von IFN- γ erklärt werden.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die Produktion von TNF- α . In den T-Zellen aus der Leber konnte kaum eine Induktion durch die Stimulation mit gp33-Peptid festgestellt

werden, verglichen mit den nicht stimulierten Kontrollen. Folglich wurde durch die Blockade der IL-6 Signalwege keine deutliche Beeinträchtigung der T-Zellfunktion festgestellt.

Für die Viruslast im Serum und den Geweben wurde kein Unterschied gefunden. Zusätzlich gab es zwischen den behandelten Gruppen kaum Abweichung in der Anzahl der virusspezifischen T-Zellen. Zusammen mit der vergleichbaren Funktionalität der T-Zellen und ähnlichen Leberschädigungsmarkern AST und ALT wurde für diesen Experimentalteil nur ein deutlicher Unterschied in der Leberregeneration gefunden. Diese geht jedoch einher mit bereits veröffentlichten Daten, welche den Beitrag von IL-6 unterstreichen.⁴⁰

Bei Behandlung mit Inhibitoren bleibt oftmals die Frage offen, ob eine vollständige Inhibition erreicht werden kann. Zudem könnte argumentiert werden, dass sgp130Fc neben dem Trans-Signal auch den klassischen Signalweg inhibiert. Durch die Komplexbildung von IL-6 mit dem sIL-6R und weiterer Komplexierung durch sgp130Fc könnte alles freie IL-6 gebunden und der klassische Signalweg inhibiert werden. In Zellkulturexperimenten konnte dieser Sachverhalt bei einem molaren Überschuss des sIL-6R gegenüber IL-6 auch gezeigt werden.¹⁶² Selbst unter physiologischen Bedingungen ist ein molarer Überschuss an sIL-6R gegenüber IL-6 vorhanden.¹³⁹ Bei moderaten Entzündungen steigt die Serumkonzentration von IL-6 signifikant an und kann im Fall einer LCMV-Infektion Werte bis zu 600 pg/mL erreichen.⁸⁵ Demnach ist derzeit noch nicht geklärt, ob die lokale Konzentration im Gewebe oder in direkter Nähe zu IL-6 produzierenden Zellen eine Kreuzreaktivität von sgp130Fc in Bezug auf die Inhibition des klassischen IL-6 Signals zum Tragen kommt.

Im Weiteren wurde bei der Wahl der sgp130Fc Injektion darauf geachtet, eine möglichst geringe aber noch wirksame Dosis von 50 µg/Maus (etwa 1,25 mg/kg) zu verwenden, wie bereits veröffentlicht.^{163,164} Die Arbeiten zeigten zum einen, dass nur eine mittlere Dosis von sgp130Fc (0,5 – 1 mg/kg) zum Überleben der Mäuse beitrug und höhere Konzentrationen möglicherweise das klassische Signal hemmen. Zum anderen wurde das gleiche Verhältnis (1:5) von sgp130Fc zu IL-6 mAb gewählt, welches einen signifikanten Effekt bei der Kontrolle von *Listeria monocytogenes* aufzeigte.⁴⁵

Es gibt eine transgene Maus, die endogen sgp130Fc exprimiert.¹⁵¹ Diese Maus könnte genutzt werden, um die Auswirkungen der Inhibition des Trans-Signalweges

zu untersuchen. Jedoch zeigte die Analyse des Serums bereits Konzentrationen bis zu 34 µg/mL.¹⁵¹ Dies entspricht etwa einer Konzentration um 60 µg/Maus, ausgeschlossen der Mengen an sgp130Fc in Geweben. Davon abgeleitet würde sich eine wesentlich höhere Konzentration an sgp130Fc für diese Mäuse ergeben, die wie zuvor diskutiert mit dem klassischen Signal interferieren könnte. Zusätzlich simuliert eine regelmäßige Applikation von sgp130Fc das Vorgehen bei Behandlung von Patienten.

Als weiteren Ansatz zur Charakterisierung des Trans-Signalweges in Bezug auf virusvermittelte Leberschädigung wurde ein neues Mausmodell verwendet. In dieser Maus ist einzig die Stimulation der Zellen über den Trans-Signalweg möglich.²⁶

4.2 Kompensatorische Kapazität des Trans-Signals in transgenen Mäusen

IL-6 hat eine wesentliche Rolle bei der Leberregeneration, ist am Metabolismus beteiligt und sorgt für Homöostase im Darm.^{4,40} Darüber hinaus ist IL-6 am Wechsel zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantworten beteiligt.^{88,89} Dabei wurde in den meisten Prozessen nicht direkt zwischen dem klassischen und dem Trans-Signalweg unterschieden. Besonders kommt zum Tragen, dass in der Regel kaum IL-6 unter physiologischen Bedingungen vorhanden ist, sIL-6R jedoch schon. Im Kontext des Immunsystems kann der IL-6R unter anderem auf der Oberfläche von Makrophagen, Granulozyten, T-Zellen oder Monozyten gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass die klassische IL-6 Signalweiterleitung auch bei der Immunantwort eine essentielle Rolle hat. Daraus ergab sich die Fragestellung, auf welche Weise die klassische IL-6 Signalweiterleitung bei einer viralen Hepatitis wirkt und ob der Trans-Signalweg eine mögliche kompensatorische Funktion übernehmen könnte.

In dieser Arbeit wurde eine neuartige Maus verwendet, die nur löslichen IL-6R exprimiert. Dadurch treten signifikant erhöhte Mengen an sIL-6R im Serum auf. Der klassische IL-6 Signalweg ist nicht verfügbar, wodurch einzig die Effekte des Trans-Signalweges untersucht werden können.

Nach der Infektion mit LCMV WE stieg die Serumkonzentration des IL-6R in beiden Mausgruppen 8 Tage an und fiel danach leicht ab (Abb. 17B). Im Vergleich der zwei Gruppen für die Leberschädigungsmarker ALT und AST konnte kein Unterschied festgestellt werden (Abb. 18). Zudem wurde in den *Trans-Signaling* Mäusen am Tag 8 nach der Infektion der Virus effektiver als in den sIL-6R^{fl/fl} Tieren eliminiert (Abb.

19A). In allen anderen untersuchten Geweben war die Viruslast vergleichbar (Abb. 19, 20).

Darüber hinaus konnte kein deutlicher Unterschied in der T-Zellentwicklung und der T-Zellfunktion in den untersuchten gp33⁺ und np396⁺ virusspezifischen T-Zellen gefunden werden. Ausgenommen einer verringerten klonalen Expansion der gp33⁺ T-Zellen in der Leber wurde kein Unterschied verzeichnet (Abb. 23C). Die Produktion der Effektorzytokine IFN- γ und TNF- α nach *in vitro* Stimulation der CD8⁺ T-Zellen aus der Milz und Leber mit den Peptiden gp33 und np396 zeigte keinen Unterschied (Abb. 24). Gezielte Analyse der Oberflächenexpression der virusspezifischen gp33⁺ CD8⁺ T-Zellen im Blut ergab ein Expressionsmuster, das eine Effektor T-Zellsubpopulation charakterisiert (Abb. 25). Die SLEC-Population, abgegrenzt durch erhöhte Expression von KLRG1 und niedriger Expression von IL-7R, war in sIL-6R^{+/+} Mäusen im Blut am Tag 12 nach der Infektion signifikant erhöht.^{147,149}

Zur Abtötung virusinfizierter Zellen sezernieren zytotoxische T-Zellen Zytokine wie TNF- α und IFN- γ zusammen mit Granzyme B und Perforin.^{144,145} Insbesondere das Trans-Signal wurde als Auslöser für eine schnelle Expression von Granzyme B in ZTLs beschrieben.⁹⁷ Aufgrund der signifikant erhöhten Serumkonzentration von sIL-6R in den *Trans-Signaling* Mäusen ist anzunehmen, dass sezerniertes IL-6 durch den sIL-6R stabilisiert wird und sich mehr IL-6/sIL-6R-Komplexe bilden.^{56,141} Diese Komplexe vermitteln das Trans-Signal und sorgen in ZTLs für eine schnellere Expression von Granzyme B in den sIL-6R^{+/+} Mäusen. Eine mögliche Beteiligung von diesem Sachverhalt könnte für die effektivere Elimination der Viren im Blut am achten Tag im Vergleich zu sIL-6R^{fl/fl} Tieren erklären.

Ein weiterer Unterschied wurde nach Analyse der Leberfibrose mittels Collagen- und α -SMA-Expression deutlich (Abb. 21, 22). In den sIL-6R^{+/+} Mäusen wurde eine signifikante Erhöhung beider Marker festgestellt. Dies könnte mit der SLEC-Population zusammenhängen oder zeigen, dass auf Ebene der Regeneration nach virusinduzierter Schädigung einzig das IL-6 Trans-Signal nicht ausreichend ist. Die Schädigung der Leber wird im verwendeten Modell durch die ZTLs hervorgerufen.¹¹⁵ Demnach sollten im Fall einer stärkeren Schädigung der Leber durch effektivere Elimination auch Unterschiede in den Serummarkern AST und ALT deutlich werden. Im Modell zur Leberschädigung nach Gallengangsligatur (Bileduct ligation, BDL) wurden durchschnittlich deutlich höhere Werte für AST und ALT

gefunden.¹⁶⁵ Somit sollte eine stärkere Schädigung der Leber mit erhöhten Werten für ALT und AST einhergehen. Da sIL-6R^{fl/fl} und sIL-6R^{+/+} Mäuse vergleichbare Werte für ALT und AST hatten, erschließt sich die erhöhte Expression der Fibrosemarker Collagen und α -SMA wahrscheinlich aus einer Beeinträchtigung während der Regeneration.

Als weiterer Anhaltspunkt wurden IL-6R^{-/-} Mäuse mit LCMV WE infiziert und die Leberschädigung, sowie die anschließende Regeneration untersucht. Anders als gp130 wird der IL-6R fast nur auf Hepatozyten und Zellen des Immunsystems exprimiert. Durch die Deletion des IL-6R ist sowohl der klassische, als auch der Trans-Signalweg blockiert. In IL-6 defizienten Mäusen wurde eine höhere Mortalität nach partieller Hepatektomie gefunden.⁴⁰ Demnach ist anzunehmen, dass im Fall der IL-6R^{-/-} Mäuse auch eine Beeinträchtigung der Regeneration vorliegt.

Selbst nach vollständiger Deletion des IL-6R konnte für die Leberschädigungsmarker AST und ALT kein Unterschied nach der Infektion gefunden werden (Abb. 27). Die Viruslast in allen Geweben war konstant vergleichbar und entsprach den Erwartungen wie bereits gezeigt (Abb. 28, 29).¹¹⁶ Eine tendenziell erhöhte Collagenexpression in der Leber an Tag 12 nach der Infektion verweist für die IL-6R^{-/-} Mäuse ebenfalls auf eine leichte Beeinträchtigung bei der Leberregeneration. Zusammen mit dem zuvor beschriebenen Ergebnis würde sich die Hypothese bestätigen, dass das IL-6 Trans-Signal allein nicht ausreichend ist, die Regeneration der Leber nach virusinduzierter Schädigung zu kompensieren (Abb. 38).

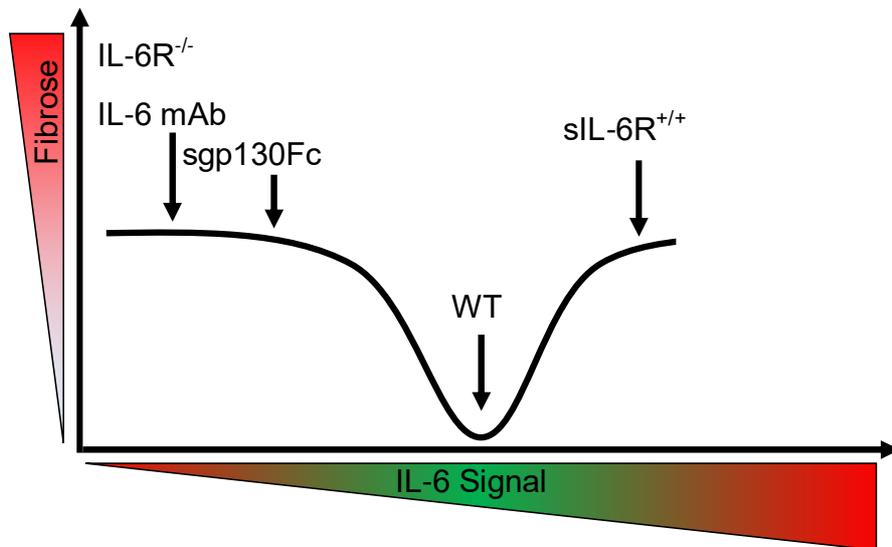


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Leberfibrose nach virusinduzierter Schädigung in Abhängigkeit vom IL-6 Signal (II). In Wildtyp-Mäusen wird das IL-6 Signal natürlich reguliert. Durch Blockade des Trans-Signalweges mit sgp130Fc fällt der Trans-Signalweg weg, wodurch eine erhöhte Fibrose eintritt. Wird IL-6 komplett blockiert, fallen alle IL-6 vermittelten Signalwege weg, wodurch ebenfalls eine erhöhte Fibrose nach virusinduzierter Schädigung entsteht. Im Fall der *Trans-Signaling* Mäuse (IL-6R^{+/+}) fällt der klassische Signalweg weg, wird aber weitestgehend durch verstärktes Trans-Signal kompensiert. Trotzdem konnte eine erhöhte Fibrose in der Leber gefunden werden. Bei Verwendung von IL-6R^{-/-} Mäusen im gleichen Modell konnte tendenziell ebenfalls eine höhere Fibrose festgestellt werden.

Bei der Verwendung transgener Mäuse bleibt häufig die Frage offen, ob die Rekombination vollständig stattgefunden hat und keine Restexpression des Wildtyp-Gens vorhanden ist. Zur Generierung der verwendeten Mäuse wurde das *Cre/loxP*-System genutzt.¹⁶⁶ Dabei wird das Zielgen mit der *loxP*-Sequenz flankiert und in Mäuse eingebracht. Nach Verpaarung der genetisch modifizierten Mäuse mit Tieren, welche die *Cre*-Rekombinase unter Kontrolle des Cytomegalovirus (CMV) minimal Promoters exprimieren, wird die flankierte Sequenz ausgeschnitten.^{167,168} Dies findet auch in den Keimzellen statt, wodurch die Nachkommen einheitlich die Deletion tragen. Die verwendete *Trans-Signaling* Maus wurde durch Modares, Polz et al. charakterisiert.²⁶ Die Autoren zeigen sowohl für die sIL-6R^{+/+} Mäuse, als auch für die IL-6R^{-/-} Mäuse deutliche Nachweise auf Genom-, Transkriptions- und Proteinebene, dass die jeweilige Deletion vollständig stattgefunden hat. In weiteren Experimenten wurde gezeigt, dass der sIL-6R vollständig aktiv ist und zusammen mit IL-6 ein pSTAT3-Signal auslösen kann.

Nach den Funden für die Viruselimination im Blut von sIL-6R^{+/+}, einer vermehrten Differenzierung hinzu SLECs und einer erhöhten Leberschädigung bei Manipulation

des IL-6 vermittelten Signals kam die Fragestellung auf, ob ein erhöhtes Trans-Signal einen positiven Einfluss auf die Leberregeneration hat. Im Modell zur Leberregeneration nach partieller Hepatektomie konnte bereits eine signifikante Verbesserung erzielt werden.³⁵ Inwiefern dieser Sachverhalt auch für die Regeneration der Leber nach virusinduzierter Schädigung zutrifft, wurde mit dem Fusionsprotein Hyper-IL-6 untersucht.

4.3 Übermäßige Aktivierung durch Hyper-IL-6 verhindert vollständige Leberregeneration nach virusinduzierter Schädigung

Der Trans-Signalweg wird aktiviert durch Bindung eines Komplexes aus IL-6 und sIL-6R an gp130 auf der Zelloberfläche und Rekrutierung eines weiteren gp130 Rezeptors.^{27,28} Zur gezielten Untersuchung des Trans-Signalweges wurde ein Fusionsprotein aus IL-6 und IL-6R verbunden über einen flexiblen Peptidlinker generiert (Hyper-IL-6).²⁹

Für den Trans-Signalweg wurden negative physiologische Auswirkungen gefunden, wie die Rekrutierung von mononukleären Zellen oder Inhibition der T-Zell Apoptose.¹²⁹ Im Gegensatz dazu ist das Trans-Signal während der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie essentiell und sorgt für eine schnelle Expression von Granzyme B in T-Zellen.^{26,97} Besonders hervorzuheben ist jedoch die Erhöhung der Leberproliferation bei Behandlung mit Hyper-IL-6 nach partieller Hepatektomie.³⁵ Ein weiterer Effekt der Hyper-IL-6 Injektion ist die Stimulation einer Akute-Phase-Reaktion.¹⁶⁹ Speziell in Bezug auf eine Infektion könnte eine zusätzliche Aktivierung des angeborenen Immunsystems ausschlaggebend sein.

Durch unterschiedliche Behandlungsmodelle sollte der Einfluss eines starken Trans-Signals hervorgerufen durch Hyper-IL-6 Injektion näher untersucht werden (Abb. 31). Durch Vor- und Nachbehandlung mit Hyper-IL-6 in Kombination mit einer LCMV WE Infektion wurden signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von ALT und AST gefunden (Abb. 32). Zudem wurde für alle behandelten Gruppen an Tag 8 nach der Infektion mehr Viruslast im Serum detektiert (Abb. 33A). Bezüglich der Viruslast im Gewebe der behandelten Tiere grenzte sich die Hyper-IL-6 *post*-Gruppe durch erhöhte Titer in der Lunge von der Kontrollgruppe und der Hyper-IL-6 *prä*-Gruppe ab (Abb. 34). In Anbetracht des Fibrosemarkers Collagen wurde eine signifikant höhere

Expression in allen Hyper-IL-6 behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden (Abb. 35). Besonders stark erhöht war die Expression von Collagen in der Gruppe, die nur vor der Infektion behandelt wurde. Dabei zeigte die Expression von α -SMA nach virusinduzierter Schädigung keinen Unterschied im Vergleich aller Gruppen (Abb. 36). Aus den Ergebnissen lässt sich daher eine negative Tendenz ableiten. Nicht nur, dass der entstandene Leberschaden stärker und die Viruslast an Tag 8 nach der Infektion höher ausfiel, sondern auch dass die darauffolgende Regeneration wesentlich beeinträchtigt war.

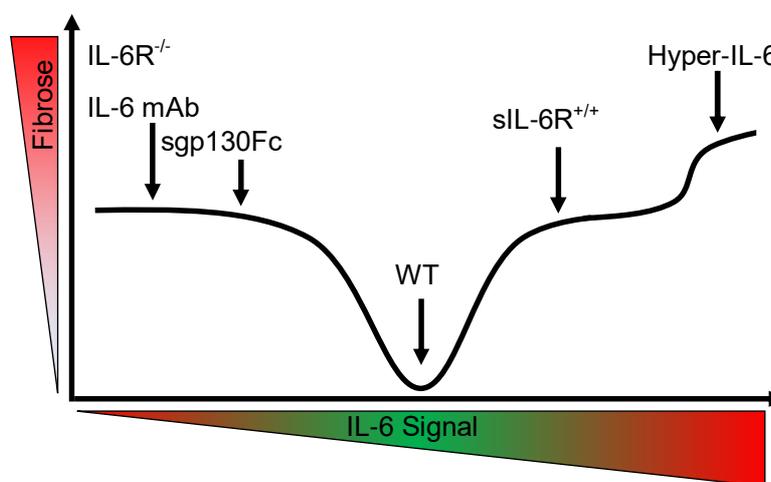


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Leberfibrose nach virusinduzierter Schädigung in Abhängigkeit vom IL-6 Signal (III). In Wildtyp-Mäusen wird das IL-6 Signal natürlich reguliert. Durch Blockade des Trans-Signalweges mit sgp130Fc fällt der Trans-Signalweg weg, wodurch eine erhöhte Fibrose eintritt. Wird IL-6 komplett blockiert, fallen alle IL-6 vermittelten Signalwege weg, wodurch ebenfalls eine erhöhte Fibrose nach virusinduzierter Schädigung entsteht. Im Fall der *Trans-Signaling* Mäuse (IL-6R^{+/+}) fällt der klassische Signalweg weg, wird aber weitestgehend durch verstärktes Trans-Signal kompensiert. Trotzdem konnte eine erhöhte Fibrose in der Leber gefunden werden. Bei Verwendung von IL-6R^{-/-} Mäusen im gleichen Modell konnte tendenziell ebenfalls eine höhere Fibrose festgestellt werden. Werden die Zellen spezifisch über den Trans-Signalweg aktiviert, konnte neben einer höheren Fibrose auch eine stärkere Leberschädigung festgestellt werden.

Dieses in Anbetracht der Literatur kontroverse Ergebnis wirft jedoch Fragen zur Beteiligung des Trans-Signals bei virusinduzierter Leberschädigung auf. Es konnte durch die Blockade des Trans-Signals mit sgp130Fc keine Veränderung in der Leberschädigung beobachtet werden, sondern einzig eine erhöhte Fibrose. Die Stimulation aller Zellen mit gp130 durch Hyper-IL-6 zeigte im Besonderen bei kontinuierlicher Stimulation (*post/prä*-Gruppe) einen signifikant erhöhten Leberschaden, sowie eine erhöhte Fibrose.

Der erhöhte Leberschaden könnte durch die zuvor angesprochenen ZTLs zu erklären sein. Erst an Tag 8 nach Infektion wurde für die beiden Leberschädigungsmarker ALT und AST ein signifikanter Anstieg gemessen. Für die Infektion mit LCMV WE tritt ein Anstieg dieser Marker typischerweise an Tag 7 nach Infektion auf und zeigt somit parallel die eine robuste virusspezifische T-Zellpopulation.¹¹⁵ Zusätzlich stimuliert Hyper-IL-6 die ZTLs zur schnellen Produktion von GzmB, welches in Kombination mit Perforin zur Abtötung der virusinfizierten Zellen führt.⁹⁷ Durch die kontinuierliche Stimulation mit Hyper-IL-6 in der *post/prä*-Gruppe könnte sich somit dieser Phänotyp erklären lassen.

Im Bezug auf die anschließende Leberfibrose könnte eine Beteiligung von Hepatischen Sternzellen (HSC) in Betracht kommen. Wesentlich an der Leberregeneration beteiligt und mit verantwortlich für den Aufbau von Matrixgewebe sind HSCs.^{170,171} Dabei konnte hauptsächlich Collagen Typ I und III gefunden werden.^{172,173} Zusätzlich wurde für HCV Proteine eine direkte Interaktion mit HSCs gefunden, die zur Aktivierung und Sezernierung von TGF- β und Procollagen $\alpha 1$ führte.¹⁷⁴

Hepatische Sternzellen exprimieren IL-6R und gp130 und können somit über den klassischen und den Trans-Signalweg aktiviert werden.²⁶ Diese Zellen sind die primäre Quelle von *hepatocyte growth factor* (HGF), dessen Beteiligung bei der Leberregeneration von großer Bedeutung ist.¹³⁹ Interessanterweise induzierte Hyper-IL-6 die Genexpression von HGF und die Konzentration im Zelllysat, nicht aber die sezernierte Menge nach *in vitro* Stimulation.²⁶ Möglicherweise fehlt auch in dem verwendeten Modell der richtige Stimulus zur Sezernierung von HGF, wodurch der entstandene Leberschaden nicht zu großen Teilen wiederhergestellt werden konnte.

Eine andere Funktion der HSCs tritt nach der Leberschädigung in Kraft. Durch Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) kann die zuvor gebildete extrazelluläre Matrix degradiert werden.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Aktivierte HSC sezernieren die MMPs, die unter anderem auch das Collagen in der Basalmembran abbauen, wodurch eine Störung der subendothelialen Lebermatrix eintritt.¹⁷⁸ Durch eine andauernde Produktion von Collagen entsteht eine Matrix die wiederum die Funktion der Leber beeinträchtigt und zu weiterer HSC Aktivierung führt.¹⁷⁹ Zwar wurde gezeigt, dass über den Trans-Signalweg die Proliferation der Hepatozyten stimuliert wird und die

Leber schneller an Masse gewinnt, jedoch könnte dies aufgrund des Milieus, geschaffen durch aktivierte HSCs, seine Wirkung verfehlen.

5. Ausblick

Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums von IL-6 ist das Zytokin an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Die Zelltypbeschränkung, gegeben durch den IL-6R, kann durch den Trans-Signalweg umgangen werden, wodurch die Zellaktivierung allein über gp130 erfolgt. Die nahezu ubiquitäre Expression von gp130 ermöglicht die Zellaktivierung durch einen Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R. Zudem wird IL-6 bei der Immunantwort sehr konkret reguliert und in vielen Studien konnte eine Fehlregulation mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen assoziiert werden. Durch Vorarbeiten mit LCMV konnte insbesondere die Differenzierung der T_{FH}-Zellen, sowie die B-Zellentwicklung in Abhängigkeit von IL-6 beschrieben werden.⁸³⁻⁸⁵

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit verbleibt jedoch die Frage offen, welche Funktion der IL-6 Anstieg an Tag 3 nach Infektion hinsichtlich der akuten LCMV-WE Infektion hat. Die Viruslast, sowie die T-Zellentwicklung und Funktion zeigten nur wenige Unterschiede bei Blockade von IL-6 mit Antikörpern.

Mit Verwendung der *Trans-signaling* Maus war es möglich, den Trans-Signalweg separat vom klassischen Signalweg zu untersuchen. Dabei zeigte sich weitgehend ein kompensatorischer Effekt durch das *Trans-signaling*, jedoch verblieb bei der ausgelösten Fibrose ein erhöhter Schaden. Durch diese Defizite wäre eine Untersuchung speziell der Leberfibrose, beispielsweise durch eine Gallengangligatur, interessant, um die Tragweite des klassischen und des Trans-Signalweges in einem weiteren Modell näher zu beschreiben. Für die *Trans-signaling* Maus kann angenommen werden, dass im Vergleich zum Wildtyp eine stärkere Zellaktivierung über den Trans-Signalweg erfolgt. Somit zeigte sich für die spezifische Blockade des Trans-Signalweges mit sgp130Fc, sowie erhöhte Zellaktivierung über den Trans-Signalweg in den *Trans-signaling* Mäuse eine ähnlich erhöhte Fibrose. Dies führt zu der Frage nach der genauen IL-6 Signalstärke in Wildtyp-Mäusen, die zu einer geringeren Pathologie führt.

Durch Verwendung von LCMV in einem Modell zur chronischen Virusinfektion wurde insbesondere für IL-6 gezeigt, dass eine bilaterale Regulation vorliegt und ein späterer IL-6 Anstieg wichtig für die B-Zellentwicklung ist.⁸⁵ Daraus ergab sich die Fragestellung, ob auch das Trans-Signal im gleichen Maße reguliert wird. Durch spezifische Aktivierung des Trans-Signalweges mit Hyper-IL-6 während

unterschiedlicher Zeitpunkte bei einer Virusinfektion sollte geklärt werden, ob der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst werden kann. Anhand der Ergebnisse wurde überwiegend eine verstärkte Leberschädigung und Leberfibrose in den behandelten Tieren gefunden. Somit blieb die Frage offen, ob eventuell eine geringere Dosis oder eine lokale anstelle einer systemischen Zellaktivierung über den Trans-Signalweg den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen kann. Durch Reduktion der Dosis oder Verringerung der Injektionen könnte ein weiteres Experiment Aufschluss geben. Gewebespezifische Aktivierung von gp130 könnte im Gegenzug die Fragestellung teilweise beantworten, ob eine lokale Aktivierung des Trans-Signalweges einer systemischen vorzuziehen ist.

6. Zusammenfassung

Chronische Virusinfektion, ausgelöst durch Viren wie dem Hepatitis C Virus (HCV) sind ein globales Gesundheitsproblem und assoziiert mit einer Leberschädigung. Zur gezielten Charakterisierung des Infektionsverlaufs und der Entstehung eines Leberschadens eignet sich der Modellorganismus *Mus musculus* zusammen mit dem Lymphozytären-Choriomeningitis-Virus (LCMV). Essentiell für die Regeneration der Leber ist das pleiotrope Zytokin Interleukin-6 (IL-6), dass im Weiteren auch an Prozessen wie der Akute-Phase-Reaktion, Differenzierung von T-Zellen und der Vermittlung von anti- und proinflammatorischen Antwort beteiligt ist.

IL-6 vermittelt die Zellaktivierung hauptsächlich über den klassischen oder den Trans-Signalweg. Nur Zellen mit membranständigen IL-6 Rezeptoren (IL-6R) können, zusammen mit gp130, über den klassischen Signalweg aktiviert werden. Zusätzlich können alle Zellen mit gp130 durch einen Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6R über den Trans-Signalweg aktiviert werden. Therapeutische Ansätze zur Blockade der IL-6-vermittelten Zellaktivierung bei rheumatoider Arthritis zeigten neben der gewünschten Verbesserung der Pathologie ebenfalls Nebenwirkungen wie ein erhöhtes Infektionsrisiko. Hierfür wird derzeit der spezifische *Trans-signaling*-Inhibitor sgp130Fc getestet zur Erhaltung der homöostatischen Funktionen von IL-6 und Unterdrückung der hauptsächlich negativen Auswirkungen des Trans-Signals.

Durch Verwendung von Inhibitoren, transgenen Mäusen und dem Fusionsprotein Hyper-IL-6 konnte gezeigt werden, dass ohne *Trans-signaling*, sowie mit übermäßigem *Trans-signaling* eine erhöhte virusinduzierte Leberfibrose entsteht. Sowohl die Viruselimination, als auch die T-Zellfunktion waren durch Manipulation des IL-6-vermittelten Signals weitestgehend unbeeinflusst. Im Weiteren zeigte sich indirekt bei der *Trans-signaling* Maus eine virusinduzierte Regulation der IL-6R Expression. Zuletzt konnte durch leicht erhöhtes *Trans-signaling* eine effektivere Elimination der Viren aus dem Serum beobachtet werden.

Zusammengenommen zeigt diese Studie, dass neben der Regulation des klassischen IL-6 Signals auch eine weitere Ebene der Regulation bezüglich des Trans-Signals vorliegt. Nur durch Feinabstimmung beider Signalwege kann die Regeneration der Leber umfassend erfolgen.

7. Summary

Chronic viral infections caused by viruses such as the hepatitis C virus (HCV) are a global health problem and are associated with liver damage. The model organism *Mus musculus* infected with the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) is a suitable target for the characterization of the course of infection and the development of liver damage. The pleiotropic cytokine interleukin-6 (IL-6) is essential for the regeneration of the liver and also involved in processes such as the acute phase reaction, differentiation of T cells and the mediation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses.

IL-6 mediates cell activation mainly via the classic or the trans-signaling pathway. Only cells with membrane-bound IL-6 receptors (IL-6R), together with gp130, can be activated via the classic signaling pathway. In addition, all cells with gp130 can be activated by a complex of IL-6 and the soluble IL-6R via the trans-signaling pathway. Therapeutic approaches to block IL-6-mediated cell activation in rheumatoid arthritis showed beneficial effects as well as an increased risk of infection in addition to the desired improvement in pathology. The specific trans-signaling inhibitor sgp130Fc is currently being tested to maintain the homeostatic functions of IL-6 and to suppress the mainly negative effects of trans-signaling.

By using inhibitors, transgenic mice and the fusion protein Hyper-IL-6, we could show that without trans-signaling and with excessive trans-signaling an increased virus-induced liver fibrosis occurs. Both virus elimination and T cell function were largely unaffected by manipulation of the IL-6 mediated signal. Furthermore, virus-induced regulation of IL-6R expression was shown indirectly in the trans-signaling mouse. Finally, a more effective elimination of the viruses from the serum could be observed through slightly increased trans-signaling.

Taken together, this study shows that in addition to the regulation of the classic IL-6 signaling, there is also another level of regulation regarding the trans-signal. The liver can only be fully regenerated by fine-tuning both signaling pathways.

8. Literaturverzeichnis

1. O'Shea JJ, Gadina M, Siegel RM. Cytokines and Cytokine Receptors. *Clin Immunol*. January 2019;127-155.e1. doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00009-0
2. Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, Müller-Newen G, Grötzinger J, Rose-John S, Scheller J. Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2012;23(3):85-97. doi:10.1016/j.cytogfr.2012.04.001
3. Rose-John S. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(2):a028415. doi:10.1101/cshperspect.a028415
4. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813(5):878-888. doi:10.1016/J.BBAMCR.2011.01.034
5. Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today*. 1990;11:350-354. doi:10.1016/0167-5699(90)90139-Z
6. Bazan JF. A novel family of growth factor receptors: A common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor β -chain. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;164(2):788-795. doi:10.1016/0006-291X(89)91528-3
7. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*. 1995;86(4):1243-1254. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7632928>.
8. Dillon SR, Sprecher C, Hammond A, Billsborough J, Rosenfeld-Franklin M, Presnell SR, Haugen HS, Maurer M, Harder B, Johnston J, Bort S, Mudri S, Kuijper JL, Bukowski T, Shea P, Dong DL, Dasovich M, Grant FJ, Lockwood L, Levin SD, LeCiel C, Waggie K, Day H, Topouzis S, Kramer J, Kuestner R, Chen Z, Foster D, Parrish-Novak J, Gross JA. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol*. 2004;5(7):752-760. doi:10.1038/ni1084
9. Schiel X, Rose-John S, Dufhues G, Schooltink H, Gross V, Heinrich PC. Microheterogeneity of human interleukin 6 synthesized by transfected NIH/3T3 cells: Comparison with human monocytes, fibroblasts and endothelial cells. *Eur J Immunol*. 1990;20(4):883-887. doi:10.1002/eji.1830200425
10. Parekh RB, Dwek RA, Rademacher TW, Opdenakker G, Van Damme J. Glycosylation of interleukin-6 purified from normal human blood mononuclear cells. *Eur J Biochem*. 1992;203(1-2):135-141. doi:10.1111/j.1432-1033.1992.tb19838.x
11. Simpson RJ, Hammacher A, Smith DK, Matthews JM, Ward LD. Interleukin-6: Structure-function relationships. *Protein Sci*. 1997;6(5):929-955. doi:10.1002/pro.5560060501
12. Weissenbach J, Chernajovsky Y, Zeevi M, Shulman L, Soreq H, Nir U, Wallach D, Perricaudet M, Tiollais P, Revel M. Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(12):7152-7156. doi:10.1073/pnas.77.12.7152

13. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*. 1986;324(6092):73-76. doi:10.1038/324073a0
14. Sehgal PB, Helfgott DC, Santhanam U, Tatter SB, Clarick RH, Ghrayeb J, May LT. Regulation of the acute phase and immune responses in viral disease. Enhanced expression of the beta 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6 gene in virus-infected human fibroblasts. *J Exp Med*. 1988;167(6):1951-1956. doi:10.1084/jem.167.6.1951
15. Baran P, Nitz R, Grötzinger J, Scheller J, Garbers C. Minimal Interleukin 6 (IL-6) Receptor Stalk Composition for IL-6 Receptor Shedding and IL-6 Classic Signaling. *J Biol Chem*. 2013;288(21):14756-14768. doi:10.1074/jbc.M113.466169
16. Jostock T, Müllberg J, Özbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem*. 2001;268(1):160-167. doi:10.1046/j.1432-1327.2001.01867.x
17. Gerhartz C, Heesel B, Sasse J, Hemmann U, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Horn F, Heinrich PC, Graeve L. Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J Biol Chem*. 1996;271(22):12991-12998. doi:10.1074/jbc.271.22.12991
18. Schmitz J, Dahmen H, Grimm C, Gendo C, Müller-Newen G, Heinrich PC, Schaper F. The Cytoplasmic Tyrosine Motifs in Full-Length Glycoprotein 130 Have Different Roles in IL-6 Signal Transduction. *J Immunol*. 2000;164(2):848-854. doi:10.4049/JIMMUNOL.164.2.848
19. Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JE, Yancopoulos GD. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science (80-)*. 1995;267(5202):1349-1353. doi:10.1126/science.7871433
20. Hilton DJ. Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci*. 1999;55(12):1568-1577. doi:10.1007/s000180050396
21. Fuhrer DK, Feng GS, Yang YC. Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin-11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(42):24826-24830. doi:10.1074/jbc.270.42.24826
22. Müllberg J, Schooltink H, Stoyan T, Günther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol*. 1993;23(2):473-480. doi:10.1002/eji.1830230226
23. Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol*. 1992;148(7):2175-2180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1545125>.
24. Mitsuyama K, Toyonaga A, Sasaki E, Ishida O, Ikeda H, Tsuruta O, Harada K,

- Tateishi H, Nishiyama T, Tanikawa K. Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut*. 1995;36(1):45-49. doi:10.1136/gut.36.1.45
25. Montero-Julian FA. The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2001;47(4):583-597. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11502067>.
 26. Modares NF, Polz R, Haghighi F, Lamertz L, Behnke K, Zhuang Y, Kordes C, Häussinger D, Sorg UR, Pfeffer K, Floss DM, Moll JM, Piekorz RP, Ahmadian MR, Lang PA, Scheller J. IL -6 trans-signaling controls liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology*. May 2019;hep.30774. doi:10.1002/hep.30774
 27. Muller-newen G, Kohne C, Keul R, Hemmann U, Muller-esterl W, Wijdenes J, Brakenhoff JPJ, Hart MHL, Heinrich PC. Purification and Characterization of the Soluble Interleukin-6 Receptor from Human Plasma and Identification of An Isoform Generated through Alternative Splicing. *Eur J Biochem*. 1996;236(3):837-842. doi:10.1111/j.1432-1033.1996.00837.x
 28. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*. 2003;374(Pt 1):1-20. doi:10.1042/BJ20030407
 29. Fischer M, Goldschmitt J, Peschel C, Brakenhoff JPG, Kallen K-J, Wollmer A, Grötzinger J, Rose-John S. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol*. 1997;15(2):142-145. doi:10.1038/nbt0297-142
 30. Heink S, Yogev N, Garbers C, Herwerth M, Aly L, Gasperi C, Husterer V, Croxford AL, Möller-Hackbarth K, Bartsch HS, Sotlar K, Krebs S, Regen T, Blum H, Hemmer B, Misgeld T, Wunderlich TF, Hidalgo J, Oukka M, Rose-John S, Schmidt-Supprian M, Waisman A, Korn T. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T H 17 cells. *Nat Immunol*. 2017;18(1):74-85. doi:10.1038/ni.3632
 31. Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu G-Y, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell*. 2009;15(2):103-113. doi:10.1016/J.CCR.2009.01.001
 32. Kuhn KA, Manieri NA, Liu T-C, Stappenbeck TS. IL-6 Stimulates Intestinal Epithelial Proliferation and Repair after Injury. Karhausen J, ed. *PLoS One*. 2014;9(12):e114195. doi:10.1371/journal.pone.0114195
 33. Hecht N, Pappo O, Shouval D, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. Hyper-IL-6 Gene Therapy Reverses Fulminant Hepatic Failure. *Mol Ther*. 2001;3(5):683-687. doi:10.1006/MTHE.2001.0313
 34. Galun E, Zeira E, Pappo O, Peters M, Rose-John S. Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury. *FASEB J*. 2000;14(13):1979-1987. doi:10.1096/fj.99-0913com
 35. Peters M, Blinn G, Jostock T, Schirmacher P, Meyer zum Büschenfelde KH,

- Galle PR, Rose-John S. Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1663-1671. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11113088>.
36. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1237-1247. doi:10.7150/ijbs.4989
 37. Akira S, Taga T, Kishimoto T. Interleukin-6 in Biology and Medicine. *Adv Immunol*. 1993;54:1-78. doi:10.1016/S0065-2776(08)60532-5
 38. Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*. 1989;169(1):333-338. doi:10.1084/jem.169.1.333
 39. Mauer J, Denson JL, Brüning JC. Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol*. 2015;36(2):92-101. doi:10.1016/J.IT.2014.12.008
 40. Cressman DE, Greenbaum LE, DeAngelis RA, Ciliberto G, Furth EE, Poli V, Taub R. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice. *Science*. 1996;274(5291):1379-1383. doi:10.1126/science.274.5291.1379
 41. Matthews VB, Allen TL, Risis S, Chan MHS, Henstridge DC, Watson N, Zaffino LA, Babb JR, Boon J, Meikle PJ, Jowett JB, Watt MJ, Jansson J-O, Bruce CR, Febbraio MA. Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance. *Diabetologia*. 2010;53(11):2431-2441. doi:10.1007/s00125-010-1865-y
 42. Dienz O, Rud JG, Eaton SM, Lanthier PA, Burg E, Drew A, Bunn J, Suratt BT, Haynes L, Rincon M. Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung. *Mucosal Immunol*. 2012;5(3):258-266. doi:10.1038/mi.2012.2
 43. Paul Simons J, Loeffler JM, Al-Shawi R, Ellmerich S, Hutchinson WL, Tennent GA, Petrie A, Raynes JG, de Souza JB, Lawrence RA, Read KD, Pepys MB. C-reactive protein is essential for innate resistance to pneumococcal infection. *Immunology*. 2014;142(3):414-420. doi:10.1111/imm.12266
 44. Neveu WA, Allard JB, Dienz O, Wargo MJ, Ciliberto G, Whittaker LA, Rincon M. IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens. *J Immunol*. 2009;183(3):1732-1738. doi:10.4049/jimmunol.0802923
 45. Hoge J, Yan I, Jänner N, Schumacher V, Chalaris A, Steinmetz OM, Engel DR, Scheller J, Rose-John S, Mittrücker H-W. IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. *J Immunol*. 2013;190(2):703-711. doi:10.4049/jimmunol.1201044
 46. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012;8(9):1254-1266. doi:10.7150/ijbs.4679
 47. Fontes JA, Rose NR, Čiháková D. The varying faces of IL-6: From cardiac protection to cardiac failure. *Cytokine*. 2015;74(1):62-68. doi:10.1016/J.CYTO.2014.12.024

48. Heikkilä K, Ebrahim S, Lawlor DA. Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer. *Eur J Cancer*. 2008;44(7):937-945. doi:10.1016/J.EJCA.2008.02.047
49. Ma Y, Ren Y, Dai Z-J, Wu C-J, Ji Y-H, Xu J. IL-6, IL-8 and TNF- α levels correlate with disease stage in breast cancer patients. *Adv Clin Exp Med*. 2017;26(3):421-426. doi:10.17219/acem/62120
50. Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. TGF- β Suppresses Tumor Progression in Colon Cancer by Inhibition of IL-6 trans-Signaling. *Immunity*. 2004;21(4):491-501. doi:10.1016/J.IMMUNI.2004.07.020
51. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. 2000;6(5):583-588. doi:10.1038/75068
52. Robak T, Gladalska A, Stepień H, Robak E. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 1998;7(5):347-353. doi:10.1080/09629359890875
53. Garbers C, Monhasery N, Aparicio-Siegmund S, Lokau J, Baran P, Nowell MA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842(9):1485-1494. doi:10.1016/j.bbadis.2014.05.018
54. Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, Howson JMM, Rainbow DB, Smyth DJ, Kaptoge S, Clarke P, Boreham C, Coulson RM, Pekalski ML, Chen W-M, Onengut-Gumuscu S, Rich SS, Butterworth AS, Malarstig A, Danesh J, Todd JA. Functional IL6R 358Ala Allele Impairs Classical IL-6 Receptor Signaling and Influences Risk of Diverse Inflammatory Diseases. Gibson G, ed. *PLoS Genet*. 2013;9(4):e1003444. doi:10.1371/journal.pgen.1003444
55. Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies. *Lancet*. 2012;379(9822):1205-1213. doi:10.1016/S0140-6736(11)61931-4
56. Garbers C, Scheller J. Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. *Biol Chem*. 2013;394(9):1145-1161. doi:10.1515/hsz-2013-0166
57. Srirangan S, Choy EH. The role of Interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2010;2(5):247-256. doi:10.1177/1759720X10378372
58. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, Twisk JWR, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, Habibuw MR, Dijkmans BAC. Simultaneous development of acute phase response and autoantibodies in preclinical rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2006;65(4):535-537. doi:10.1136/ard.2005.040659

59. De Benedetti F, Rucci N, Del Fattore A, Peruzzi B, Paro R, Longo M, Vivarelli M, Muratori F, Berni S, Ballanti P, Ferrari S, Teti A. Impaired skeletal development in interleukin-6–transgenic mice: A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis Rheum.* 2006;54(11):3551-3563. doi:10.1002/art.22175
60. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest.* 2004;113(9):1271-1276. doi:10.1172/JCI20945
61. Hosokawa T, Kusugami K, Ina K, Ando T, Shinoda M, Imada A, Ohsuga M, Sakai T, Matsuura T, Ito K, Kaneshiro K. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14(10):987-996. doi:10.1046/j.1440-1746.1999.01989.x
62. Okuda Y, Sakoda S, Bernard CC, Fujimura H, Saeki Y, Kishimoto T, Yanagihara T. IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Int Immunol.* 1998;10(5):703-708. doi:10.1093/intimm/10.5.703
63. Rose-John S, Winthrop K, Calabrese L. The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications. *Nat Rev Rheumatol.* 2017;13(7):399-409. doi:10.1038/nrrheum.2017.83
64. Sarosiek S, Shah R, Munshi NC. Review of siltuximab in the treatment of multicentric Castleman's disease. *Ther Adv Hematol.* 2016;7(6):360-366. doi:10.1177/2040620716653745
65. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16(5):448-457. doi:10.1038/ni.3153
66. Takeuchi T, Tanaka Y, Yamanaka H, Amano K, Nagamine R, Park W, Shiozawa K, Tsukano M, Wei JC-C, Shao J, Togo O, Mashimo H. Efficacy and safety of olokizumab in Asian patients with moderate-to-severe rheumatoid arthritis, previously exposed to anti-TNF therapy: Results from a randomized phase II trial. *Mod Rheumatol.* 2016;26(1):15-23. doi:10.3109/14397595.2015.1074648
67. Shah JJ, Feng L, Thomas SK, Berkova Z, Weber DM, Wang M, Qazilbash MH, Champlin RE, Mendoza TR, Cleeland C, Orlowski RZ. Siltuximab (CNTO 328) with lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in newly-diagnosed, previously untreated multiple myeloma: an open-label phase I trial. *Blood Cancer J.* 2016;6(2):e396-e396. doi:10.1038/bcj.2016.4
68. Schett G. Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis. *Rheumatol (United Kingdom).* 2018;57(suppl_2):ii43-ii50. doi:10.1093/rheumatology/kex513
69. Calabrese LH, Rose-John S. IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol.* 2014;10(12):720-727. doi:10.1038/nrrheum.2014.127
70. Raimondo MG, Biggioggero M, Crotti C, Becciolini A, Favalli EG. Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis. *Drug Des*

Devel Ther. 2017;11:1593-1603. doi:10.2147/DDDT.S100302

71. Huizinga TWJ, Fleischmann RM, Jasson M, Radin AR, van Adelsberg J, Fiore S, Huang X, Yancopoulos GD, Stahl N, Genovese MC. Sarilumab, a fully human monoclonal antibody against IL-6R α in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: efficacy and safety results from the randomised SARIL-RA-MOBILITY Part A trial. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(9):1626-1634. doi:10.1136/annrheumdis-2013-204405
72. Navarro G, Taroumian S, Barroso N, Duan L, Furst D. Tocilizumab in rheumatoid arthritis: A meta-analysis of efficacy and selected clinical conundrums. *Semin Arthritis Rheum.* 2014;43(4):458-469. doi:10.1016/J.SEMARTHRT.2013.08.001
73. Morel J, Constantin A, Baron G, Dernis E, Flipo RM, Rist S, Combe B, Gottenberg JE, Schaeffer T, Soubrier M, Vittecoq O, Dougados M, Saraux A, Mariette X, Ravaud P, Sibilia J. Risk factors of serious infections in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in the French Registry REGATE. *Rheumatology.* 2017;56(10):1746-1754. doi:10.1093/rheumatology/kex238
74. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos G, Taga T, Kishimoto T. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood.* 1993;82(4):1120-1126. doi:10.1182/blood.V82.4.1120.bloodjournal8241120
75. Ullah MA, Revez JA, Loh Z, Simpson J, Zhang V, Bain L, Varelias A, Rose-John S, Blumenthal A, Smyth MJ, Hill GR, Sukkar MB, Ferreira MAR, Phipps S. Allergen-induced IL-6 trans-signaling activates $\gamma\delta$ T cells to promote type 2 and type 17 airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2015;136(4):1065-1073. doi:10.1016/J.JACI.2015.02.032
76. Campbell IL, Erta M, Lim SL, Frausto R, May U, Rose-John S, Scheller J, Hidalgo J. Trans-Signaling Is a Dominant Mechanism for the Pathogenic Actions of Interleukin-6 in the Brain. *J Neurosci.* 2014;34(7):2503-2513. doi:10.1523/JNEUROSCI.2830-13.2014
77. Murphy K, Weaver C, Weaver C. *Janeway's Immunobiology.* 9th edition. | New York, NY : Garland Science/Taylor & Francis: Garland Science; 2016. doi:10.1201/9781315533247
78. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol.* 2002;39(9):531-536. doi:10.1016/S0161-5890(02)00210-9
79. Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW., Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ. SOCS1 Is a Critical Inhibitor of Interferon γ Signaling and Prevents the Potentially Fatal Neonatal Actions of this Cytokine. *Cell.* 1999;98(5):597-608. doi:10.1016/S0092-8674(00)80047-1
80. Hirota K, Martin B, Veldhoen M. Development, regulation and functional capacities of Th17 cells. *Semin Immunopathol.* 2010;32(1):3-16. doi:10.1007/s00281-009-0187-y

81. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235-238. doi:10.1038/nature04753
82. Lally F, Smith E, Filer A, Stone MA, Shaw JS, Nash GB, Buckley CD, Ed R, Ringer G. A novel mechanism of neutrophil recruitment in a coculture model of the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum*. 2005;52(11):3460-3469. doi:10.1002/art.21394
83. Cui W, Liu Y, Weinstein JS, Craft J, Kaech SM. An Interleukin-21- Interleukin-10-STAT3 Pathway Is Critical for Functional Maturation of Memory CD8+ T Cells. *Immunity*. 2011;35(5):792-805. doi:10.1016/J.IMMUNI.2011.09.017
84. McIlwain DR, Grusdat M, Pozdeev VI, Xu HC, Shinde P, Reardon C, Hao Z, Beyer M, Bergthaler A, Häussinger D, Nolan GP, Lang KS, Lang PA. T-cell STAT3 is required for the maintenance of humoral immunity to LCMV. *Eur J Immunol*. 2015;45(2):418-427. doi:10.1002/eji.201445060
85. Harker JA, Lewis GM, Mack L, Zuniga EI. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science*. 2011;334(6057):825-829. doi:10.1126/science.1208421
86. Harker J a, Wong K a, Dolgoter A, Zuniga EI. Cell-Intrinsic gp130 Signaling on CD4+ T Cells Shapes Long-Lasting Antiviral Immunity. *J Immunol*. 2015:1402402. doi:10.4049/jimmunol.1402402
87. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994;368(6469):339-342. doi:10.1038/368339a0
88. Jones SA, Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2002;1592(3):251-263. doi:10.1016/S0167-4889(02)00319-1
89. Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnarier C. IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol*. 2003;24(1):25-29. doi:10.1016/S1471-4906(02)00013-3
90. McLoughlin RM, Witowski J, Robson RL, Wilkinson TS, Hurst SM, Williams AS, Williams JD, Rose-John S, Jones SA, Topley N. Interplay between IFN- γ and IL-6 signaling governs neutrophil trafficking and apoptosis during acute inflammation. *J Clin Invest*. 2003;112(4):598-607. doi:10.1172/JCI200317129
91. Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*. 1997;6(3):315-325. doi:10.1016/s1074-7613(00)80334-9
92. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen

- during acute inflammation. *Immunity*. 2001;14(6):705-714. doi:10.1016/s1074-7613(01)00151-0
93. Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest*. 1997;100(11):2752-2756. doi:10.1172/JCI119821
 94. Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G, Dohi K, Ishikawa H, Ohmoto Y. The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol*. 2001;167(6):3435-3442. doi:10.4049/jimmunol.167.6.3435
 95. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*. 2000;6(5):583-588. doi:10.1038/75068
 96. Chen Q, Wang WC, Bruce R, Li H, Schleider DM, Mulbury MJ, Bain MD, Wallace PK, Baumann H, Evans SS. Central role of IL-6 receptor signal-transducing chain gp130 in activation of L-selectin adhesion by fever-range thermal stress. *Immunity*. 2004;20(1):59-70. doi:10.1016/s1074-7613(03)00358-3
 97. Böttcher JP, Schanz O, Garbers C, Zaremba A, Hegenbarth S, Kurts C, Beyer M, Schultze JL, Kastenmüller W, Rose-John S, Knolle PA. IL-6 trans-Signaling-Dependent Rapid Development of Cytotoxic CD8+ T Cell Function. *Cell Rep*. 2014;8(5):1318-1327. doi:10.1016/J.CELREP.2014.07.008
 98. Armstrong C, Lillie RD. Experimental Lymphocytic Choriomeningitis of Monkeys and Mice Produced by a Virus Encountered in Studies of the 1933 St. Louis Encephalitis Epidemic. *Public Heal Reports*. 1934;49(35):1019. doi:10.2307/4581290
 99. Rivers TM, Scott TFM. Meningitis in man caused by a filterable virus. *Science (80-)*. 1935;81(2105):439-440. doi:10.1126/science.81.2105.439-a
 100. Traub E. The Epidemiology of Lymphocytic Choriomeningitis in White Mice. *J Exp Med*. 1936;64(2):183-200. doi:10.1084/jem.64.2.183
 101. Bonthius DJ, Perlman S. Congenital Viral Infections of the Brain: Lessons Learned from Lymphocytic Choriomeningitis Virus in the Neonatal Rat. *PLoS Pathog*. 2007;3(11):e149. doi:10.1371/journal.ppat.0030149
 102. Fields BN, Knipe DM (David M, Howley PM. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. <https://www.worldcat.org/title/fields-virology/oclc/71812790>.
 103. Cao W, Henry MD, Borrow P, Yamada H, Elder JH, Ravkov E V, Nichol ST, Compans RW, Campbell KP, Oldstone MB. Identification of alpha-dystroglycan as a receptor for lymphocytic choriomeningitis virus and Lassa fever virus.

- Science*. 1998;282(5396):2079-2081. doi:10.1126/science.282.5396.2079
104. Borrow P, Oldstone MBA. Mechanism of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Entry into Cells. *Virology*. 1994;198(1):1-9. doi:10.1006/VIRO.1994.1001
 105. Cornu TI, de la Torre JC. RING Finger Z Protein of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Inhibits Transcription and RNA Replication of an LCMV S-Segment Minigenome. *J Virol*. 2001;75(19):9415-9426. doi:10.1128/jvi.75.19.9415-9426.2001
 106. Fuller-Pace FV, Southern PJ. Temporal analysis of transcription and replication during acute infection with lymphocytic choriomeningitis virus. *Virology*. 1988;162(1):260-263. doi:10.1016/0042-6822(88)90419-9
 107. Lee KJ, Novella IS, Teng MN, Oldstone MB, de La Torre JC, Oldstone MB, Curran J, Kolakofsky D. NP and L proteins of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) are sufficient for efficient transcription and replication of LCMV genomic RNA analogs. *J Virol*. 2000;74(8):3470-3477. doi:10.1128/jvi.74.8.3470-3477.2000
 108. Perez M, Craven RC, De la Torre JC. The small RING finger protein Z drives arenavirus budding: Implications for antiviral strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12978-12983. doi:10.1073/pnas.2133782100
 109. Strecker T, Eichler R, Meulen J ter, Weissenhorn W, Dieter Klenk H, Garten W, Lenz O. Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol*. 2003;77(19):10700-10705. doi:10.1128/jvi.77.19.10700-10705.2003
 110. Zinkernagel RM, Doherty PC. Major Transplantation Antigens, Viruses, and Specificity of Surveillance T Cells. In: *Contemporary Topics in Immunobiology*. Boston, MA: Springer US; 1977:179-220. doi:10.1007/978-1-4684-3054-7_5
 111. Khanolkar A, Fuller MJ, Zajac AJ. T Cell Responses to Viral Infections: Lessons from Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Immunol Res*. 2002;26(1-3):309-322. doi:10.1385/IR:26:1-3:309
 112. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 1993;362(6422):758-761. doi:10.1038/362758a0
 113. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, Tissot AC, Plückthun A, Elliott T, Hengartner H, Zinkernagel R. Induction and Exhaustion of Lymphocytic Choriomeningitis Virus-specific Cytotoxic T Lymphocytes Visualized Using Soluble Tetrameric Major Histocompatibility Complex Class I–Peptide Complexes. *J Exp Med*. 1998;187(9):1383-1393. doi:10.1084/JEM.187.9.1383
 114. Oldstone MBA. Biology and Pathogenesis of Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection. In: Springer, Berlin, Heidelberg; 2002:83-117. doi:10.1007/978-3-642-56055-2_6
 115. Zinkernagel RM, Haenseler E, Leist T, Cerny A, Hengartner H, Althage A. T cell-mediated hepatitis in mice infected with lymphocytic choriomeningitis virus. Liver cell destruction by H-2 class I-restricted virus-specific cytotoxic T cells as a physiological correlate of the 51Cr-release assay? *J Exp Med*. 1986;164(4):1075-1092.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2188412&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

116. Xu HC, Huang J, Pandyra AA, Lang E, Zhuang Y, Thöns C, Timm J, Häussinger D, Colonna M, Cantor H, Lang KS, Lang PA. Lymphocytes Negatively Regulate NK Cell Activity via Qa-1b following Viral Infection. *Cell Rep*. 2017;21(9):2528-2540. doi:10.1016/J.CELREP.2017.11.001
117. Frei K, Leist TP, Meager A, Gallo P, Leppert D, Zinkernagel RM, Fontana A. Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon gamma in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. Evaluation in a murine model infection and in patients. *J Exp Med*. 1988;168(1):449-453. doi:10.1084/jem.168.1.449
118. Frei K, Malipiero U V., Leist TP, Zinkernagel RM, Schwab ME, Fontana A. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases. *Eur J Immunol*. 1989;19(4):689-694. doi:10.1002/eji.1830190418
119. Benveniste EN, Sparacio SM, Gavin Norris J, Grennett HE, Fuller GM. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1990;30(2-3):201-212. doi:10.1016/0165-5728(90)90104-U
120. Moskophidis D, Frei K, Löhler J, Fontana A, Zinkernagel RM. Production of random classes of immunoglobulins in brain tissue during persistent viral infection paralleled by secretion of interleukin-6 (IL-6) but not IL-4, IL-5, and gamma interferon. *J Virol*. 1991;65(3):1364-1369. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1899893>.
121. Kopf M, Ramsay A, Brombacher F, Baumann H, Freer G, Galanos C, Gutierrez-Ramos J -C, Köhler G. Pleiotropic Defects of IL-6—deficient Mice Including Early Hematopoiesis, T and B Cell Function, and Acute Phase Responses. *Ann N Y Acad Sci*. 1995;762(1):308-318. doi:10.1111/j.1749-6632.1995.tb32335.x
122. Houssiau F, Snick J Van. IL6 and the T-cell response. *Res Immunol*. 1992;143(7):740-743. doi:10.1016/0923-2494(92)80014-C
123. Kamperschroer C, Quinn DG, Dinarello CA. The role of proinflammatory cytokines in wasting disease during lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Immunol*. 2002;169(1):340-349. doi:10.4049/jimmunol.169.1.340
124. Lukashevich IS, Tikhonov I, Rodas JD, Zapata JC, Yang Y, Djavani M, Salvato MS. Arenavirus-Mediated Liver Pathology: Acute Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection of Rhesus Macaques Is Characterized by High-Level Interleukin-6 Expression and Hepatocyte Proliferation. *J Virol*. 2003;77(3):1727-1737. doi:10.1128/jvi.77.3.1727-1737.2003
125. Lukashevich IS, Rodas JD, Tikhonov II, Zapata JC, Yang Y, Djavani M, Salvato MS. LCMV-mediated hepatitis in rhesus macaques: WE but not ARM strain activates hepatocytes and induces liver regeneration. *Arch Virol*. 2004;149(12):2319-2336. doi:10.1007/s00705-004-0385-9
126. Hunziker L, Recher M, Macpherson AJ, Ciurea A, Freigang S, Hengartner H, Zinkernagel RM. Hypergammaglobulinemia and autoantibody induction

- mechanisms in viral infections. *Nat Immunol*. 2003;4(4):343-349.
doi:10.1038/ni911
127. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, Yusuf I, Crotty S. IL-21 and IL-6 Are Critical for Different Aspects of B Cell Immunity and Redundantly Induce Optimal Follicular Helper CD4 T Cell (T_{fh}) Differentiation. Poh LNF, ed. *PLoS One*. 2011;6(3):e17739. doi:10.1371/journal.pone.0017739
 128. Welsh RM, Seedhom MO. Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV): Propagation, Quantitation, and Storage. In: *Current Protocols in Microbiology*. Vol 8. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008:15A.1.1-15A.1.11. doi:10.1002/9780471729259.mc15a01s8
 129. Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3375-3383. doi:10.1172/JCI57158
 130. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. *Physiol Rev*. 2010;90(3):1165-1194. doi:10.1152/physrev.00061.2009
 131. Nishio T, Hu R, Koyama Y, Liang S, Rosenthal SB, Yamamoto G, Karin D, Baglieri J, Ma H-Y, Xu J, Liu X, Dhar D, Iwaisako K, Taura K, Brenner DA, Kisseleva T. Activated hepatic stellate cells and portal fibroblasts contribute to cholestatic liver fibrosis in MDR2 knockout mice. *J Hepatol*. 2019;71(3):573-585. doi:10.1016/J.JHEP.2019.04.012
 132. Sawitza I, Kordes C, Reister S, Häussinger D. The niche of stellate cells within rat liver. *Hepatology*. 2009;50(5):1617-1624. doi:10.1002/hep.23184
 133. Xu HC, Grusdat M, Pandrya AA, Polz R, Huang J, Sharma P, Deenen R, Köhrer K, Rahbar R, Diefenbach A, Gibbert K, Löhning M, Höcker L, Waibler Z, Häussinger D, Mak TW, Ohashi PS, Lang KS, Lang PA. Type I interferon protects antiviral CD8(+) T cells from NK cell cytotoxicity. *Immunity*. 2014;40(6):949-960. doi:10.1016/j.immuni.2014.05.004
 134. Fuller MJ, Zajac AJ. Ablation of CD8 and CD4 T cell responses by high viral loads. *J Immunol*. 2003;170(1):477-486. doi:10.4049/jimmunol.170.1.477
 135. van der Most RG, Murali-Krishna K, Lanier JG, Wherry EJ, Puglielli MT, Blattman JN, Sette A, Ahmed R. Changing immunodominance patterns in antiviral CD8 T-cell responses after loss of epitope presentation or chronic antigenic stimulation. *Virology*. 2003;315(1):93-102. doi:10.1016/J.VIROL.2003.07.001
 136. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*. 2003;77(8):4911-4927. doi:10.1128/jvi.77.8.4911-4927.2003
 137. Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol*. 2004;78(11):5535-5545. doi:10.1128/JVI.78.11.5535-5545.2004
 138. Wherry EJ, Ha S-J, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R. Molecular Signature of CD8+ T Cell Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Immunity*. 2007;27(4):670-684. doi:10.1016/J.IMMUNI.2007.09.006

139. Nechemia-Arbely Y, Shriki A, Denz U, Drucker C, Scheller J, Raub J, Pappo O, Rose-John S, Galun E, Axelrod JH. Early hepatocyte DNA synthetic response posthepatectomy is modulated by IL-6 trans-signaling and PI3K/AKT activation. *J Hepatol.* 2011;54(5):922-929. doi:10.1016/j.jhep.2010.08.017
140. Garbers C, Spudy B, Aparicio-Siegmund S, Waetzig GH, Sommer J, Hölscher C, Rose-John S, Grötzinger J, Lorenzen I, Scheller J. An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer. *J Biol Chem.* 2013;288(6):4346-4354. doi:10.1074/jbc.M112.432955
141. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Müllberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J Exp Med.* 1996;183(4):1399-1406. doi:10.1084/jem.183.4.1399
142. Curtsinger JM, Mescher MF. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol.* 2010;22(3):333-340. doi:10.1016/J.COI.2010.02.013
143. Kurts C, Robinson BWS, Knolle PA. Cross-priming in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):403-414. doi:10.1038/nri2780
144. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):735-747. doi:10.1038/nri911
145. Zhang N, Bevan MJ. CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity.* 2011;35(2):161-168. doi:10.1016/J.IMMUNI.2011.07.010
146. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1191-1198. doi:10.1038/ni1009
147. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, Gapin L, Kaech SM. Inflammation Directs Memory Precursor and Short-Lived Effector CD8+ T Cell Fates via the Graded Expression of T-bet Transcription Factor. *Immunity.* 2007;27(2):281-295. doi:10.1016/J.IMMUNI.2007.07.010
148. Joshi NS, Kaech SM. Effector CD8 T cell development: a balancing act between memory cell potential and terminal differentiation. *J Immunol.* 2008;180(3):1309-1315. doi:10.4049/jimmunol.180.3.1309
149. Sarkar S, Kalia V, Haining WN, Konieczny BT, Subramaniam S, Ahmed R. Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med.* 2008;205(3):625-640. doi:10.1084/jem.20071641
150. Schluns KS, Kieper WC, Jameson SC, Lefrançois L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol.* 2000;1(5):426-432. doi:10.1038/80868
151. Rabe B, Chalaris A, May U, Waetzig GH, Seegert D, Williams AS, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation. *Blood.* 2008;111(3):1021-1028. doi:10.1182/blood-2007-07-102137

152. Chalaris A, Rabe B, Paliga K, Lange H, Laskay T, Fielding CA, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. *Blood*. 2007;110(6):1748-1755. doi:10.1182/blood-2007-01-067918
153. McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, Zhou M, Giridhar PV, Mercer C a, Kozma SC, Drew AF. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor. *J Immunol*. 2010;184(12):7219-7228. doi:10.4049/jimmunol.0901929
154. Smolen JS, Beaulieu A, Rubbert-Roth A, Ramos-Remus C, Rovensky J, Alecock E, Woodworth T, Alten R. Effect of interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis (OPTION study): a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet*. 2008;371(9617):987-997. doi:10.1016/S0140-6736(08)60453-5
155. Trefts E, Gannon M, Wasserman DH. The liver. *Curr Biol*. 2017;27(21):R1147-R1151. doi:10.1016/j.cub.2017.09.019
156. Rehermann B, Nascimbeni M. Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(3):215-229. doi:10.1038/nri1573
157. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(11):749-761. doi:10.1038/nri3307
158. Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 1999;162(6):3256-3262. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10092777>.
159. Rochman I, Paul WE, Ben-Sasson SZ. IL-6 increases primed cell expansion and survival. *J Immunol*. 2005;174(8):4761-4767. doi:10.4049/jimmunol.174.8.4761
160. Lopez JA, Susanto O, Jenkins MR, Lukoyanova N, Sutton VR, Law RHP, Johnston A, Bird CH, Bird PI, Whisstock JC, Trapani JA, Saibil HR, Voskoboinik I. Perforin forms transient pores on the target cell plasma membrane to facilitate rapid access of granzymes during killer cell attack. *Blood*. 2013;121(14):2659-2668. doi:10.1182/blood-2012-07-446146
161. de Saint Basile G, Ménasché G, Fischer A. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(8):568-579. doi:10.1038/nri2803
162. Garbers C, Thaiss W, Jones GW, Waetzig GH, Lorenzen I, Guilhot F, Lissilaa R, Ferlin WG, Grötzinger J, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*. 2011;286(50):42959-42970. doi:10.1074/jbc.M111.295758
163. Barkhausen T, Tschernig T, Rosenstiel P, van Griensven M, Vonberg R-P, Dorsch M, Mueller-Heine A, Chalaris A, Scheller J, Rose-John S, Seegert D, Krettek C, Waetzig GH. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med*. 2011;39(6):1407-1413. doi:10.1097/CCM.0b013e318211ff56

164. Nowell MA, Williams AS, Carty SA, Scheller J, Hayes AJ, Jones GW, Richards PJ, Slinn S, Ernst M, Jenkins BJ, Topley N, Rose-John S, Jones SA. Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol*. 2009;182(1):613-622. doi:10.4049/jimmunol.182.1.613
165. Sundaram B, Behnke K, Belancic A, Al-Salihi MA, Thabet Y, Polz R, Pellegrino R, Zhuang Y, Shinde P V., Xu HC, Vasilevska J, Longerich T, Herebian D, Mayatepek E, Bock HH, May P, Kordes C, Aghaepour N, Mak TW, Keitel V, Häussinger D, Scheller J, Pandyra AA, Lang KS, Lang PA. IRhom2 inhibits bile duct obstruction-induced liver fibrosis. *Sci Signal*. 2019;12(605):eaax1194. doi:10.1126/scisignal.aax1194
166. Hoess RH, Abremski K. The Cre-lox Recombination System. In: Springer, Berlin, Heidelberg; 1990:99-109. doi:10.1007/978-3-642-84150-7_6
167. Abremski K, Wierzbicki A, Frommer B, Hoess RH. Bacteriophage P1 Cre-loxP site-specific recombination. Site-specific DNA topoisomerase activity of the Cre recombination protein. *J Biol Chem*. 1986;261(1):391-396.
168. Hoess R, Abremski K, Sternberg N. The nature of the interaction of the P1 recombinase Cre with the recombining site loxP. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1984;49:761-768. doi:10.1101/sqb.1984.049.01.086
169. Peters M, Blinn G, Solem F, Fischer M, Zum Büschenfelde KHM, Rose-John S. In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6. *J Immunol*. 1998;161(7):3575-3581. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759879>.
170. Kent G, Gay S, Inouye T, Bahu R, Minick OT, Popper H. Vitamin A containing lipocytes and formation of type III collagen in liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(10):3719-3722. doi:10.1073/pnas.73.10.3719
171. Friedman SL, Roll FJ, Boyles J, Bissell DM. Hepatic lipocytes: The principal collagen-producing cells of normal rat liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;82(24):8681-8685. doi:10.1073/pnas.82.24.8681
172. Schuppan D. Structure of the extracellular matrix in normal and fibrotic liver: Collagens and glycoproteins. *Semin Liver Dis*. 1990;10(1):1-10. doi:10.1055/s-2008-1040452
173. Rojkind M, Martinez Palomo A. Increase in type I and type III collagens in human alcoholic liver cirrhosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976;73(2):539-543. doi:10.1073/pnas.73.2.539
174. Bataller R, Paik YH, Lindquist JN, Lemasters JJ, Brenner DA. Hepatitis C Virus Core and Nonstructural Proteins Induce Fibrogenic Effects in Hepatic Stellate Cells. *Gastroenterology*. 2004;126(2):529-540. doi:10.1053/j.gastro.2003.11.018
175. Benyon RC, Arthur MJP. Extracellular Matrix Degradation and the Role of Hepatic Stellate Cells. *Semin Liver Dis*. 2001;21(03):373-384. doi:10.1055/s-2001-17552
176. Arthur MJP, Stanley A, Iredale JP, Rafferty JA, Hembry RM, Friedman SL. Secretion of 72 kDa type IV collagenase/gelatinase by cultured human

- lipocytes: Analysis of gene expression, protein synthesis and proteinase activity. *Biochem J.* 1992;287(3):701-707. doi:10.1042/bj2870701
177. Takahara T, Furui K, Funaki J, Nakayama Y, Itoh H, Miyabayashi C, Sato H, Seiki M, Ooshima A, Watanabe A. Increased expression of matrix metalloproteinase-II in experimental liver fibrosis in rats. *Hepatology.* 1995;21(3):787-795. doi:10.1002/hep.1840210328
178. Arthur MJ, Friedman SL, Roll FJ, Bissell DM. Lipocytes from normal rat liver release a neutral metalloproteinase that degrades basement membrane (type IV) collagen. *J Clin Invest.* 1989;84(4):1076-1085. doi:10.1172/JCI114270
179. Jarnagin WR, Rockey DC, Koteliansky VE, Wang SS, Bissell DM. Expression of variant fibronectins in wound healing: cellular source and biological activity of the EIIIA segment in rat hepatic fibrogenesis. *J Cell Biol.* 1994;127(6):2037-2048. doi:10.1083/jcb.127.6.2037

9. Publikationen

- Fazel Modares* N, **Polz* R**, Haghighi F, Lamertz L, Behnke K, Zhuang Y, Kordes C, Häussinger D, Sorg UR, Pfeffer K, Floss DM, Moll JM, Piekorz RP, Ahmadian MR, Lang PA, Scheller J. IL-6 Trans-signaling Controls Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. *Hepatology*. 2019 Dec;70(6):2075-2091. doi: 10.1002/hep.30774.
- Lamertz L, Rummel F, **Polz R**, Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Moll JM, Floss DM, Scheller J. Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses. *Sci Signal*. 2018 Oct 2;11(550). pii: eaar7388. doi: 10.1126/scisignal.aar7388.
- Behnke K, Zhuang Y, Xu HC, Sundaram B, Reich M, Shinde PV, Huang J, Modares NF, Tumanov AV, **Polz R**, Scheller J, Ware CF, Pfeffer K, Keitel V, Häussinger D, Pandyra AA, Lang KS, Lang PA. B Cell-Mediated Maintenance of Cluster of Differentiation 169-Positive Cells Is Critical for Liver Regeneration. *Hepatology*. 2018 Dec;68(6):2348-2361. doi: 10.1002/hep.30088.
- Sundaram B, Behnke K, Belancic A, Al-Salihi MA, Thabet Y, **Polz R**, Pellegrino R, Zhuang Y, Shinde PV, Xu HC, Vasilevska J, Longerich T, Herebian D, Mayatepek E, Bock HH, May P, Kordes C, Aghaeepour N, Mak TW, Keitel V, Häussinger D, Scheller J, Pandyra AA, Lang KS, Lang PA. iRhom2 inhibits bile duct obstruction-induced liver fibrosis. *Sci Signal*. 2019 Oct 29;12(605). pii: eaax1194. doi: 10.1126/scisignal.aax1194.

10. Danksagung

Zu Anfang möchte ich mich im Besondern bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Durchführung dieser Arbeit in seinem Institut bedanken. Als mein Erstgutachter und Betreuer hat er mich durch diese Arbeit geführt und mir durch konstruktive Diskussion geholfen, die Fragestellungen fokussiert anzugehen. Ich bedanke mich ebenfalls für seine schnelle Korrektur dieser Arbeit. Ein weiteres großes Lob möchte ich für die Organisation der Sommer- und Weihnachtsfeier aussprechen.

Im Weiteren bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Philipp Lang für alle Diskussionen und die Übernahme des Zweitgutachtens. Bereits während der Anfertigung meiner Masterarbeit in seinem Institut konnte ich durch seine Betreuung meine erste wissenschaftliche Veröffentlichung anfertigen.

Ein großes Dankeschön richte ich an Herrn PhD Heifeng Chris Xu für seine Beratung bei allen Experimenten und tatkräftiger Unterstützung bei der Bewältigung von Problemen. Durch seine Betreuung und kritische Evaluation der Experimente ermöglichte er mir die Sachverhalte angemessen zu reflektieren.

Meiner Kollegin Nastaran Fazel Modares möchte ich hier auch meinen Dank aussprechen für die Zusammenarbeit bei den Experimenten und den anregenden Diskussionen.

Dem gesamten Institut für Biochemie und Molekularbiologie II möchte ich ebenfalls meinen herzlichsten Dank aussprechen. Die gesamte freundschaftliche und freudige Atmosphäre hat jeden Arbeitstag verschönert. Meiner Labornachbarin Dr. Erika Engelowski möchte ich an dieser Stelle auch danken. Wir teilten stets die Spätschicht im Labor und machten alle Lichter aus. Für die Beratung bei Experimenten und Einweisung in die Proteinreinigung möchte ich mich sehr bei Herrn PhD Jens Moll bedanken. Weiter möchte ich mich bei Dr. Doreen Floß, Fereshteh Kamrani, Christian Horstmeier, Marco Schönberg, Matthias Krusche, Dr. Alexander Lang, Sofie Moßner, Anna Masiarz, Denise Heise und Puyan Rafii bedanken. Für die Organisation und Aufrechterhaltung des Labors, sowie der Unterstützung bei Experimenten möchte ich mich auch bei Sebastian Fey bedanken. Einen ganz besonderen Dank möchte ich gerne dem Herz und der guten Seele des Instituts aussprechen. Vielen Dank Petra Oprée Jeremic für deine Unterstützung in allen

Bereichen, der Schaffung einer familiären Umgebung und deiner unermüdlichen Fürsorge.

Bei Herrn Prof. Reza Ahmadian und Herrn Dr. Roland Piekorz möchte ich mich auch sehr bedanken für den fachlichen Austausch, die gute Kritik und netten Gespräche.

An meine Freunde Jens und Patrick möchte ich ein riesiges Dankeschön aussprechen. Ihr begleitet mich schon mein halbes Leben lang. Auf euch ist immer Verlass und ihr habt stets ein offenes Ohr für mich. Auch bei meinen Kommilitonen Arne Linhorst, Tobias Beuel und Sebastian Joecks möchte ich mich für eine schöne Zeit in Bielefeld während des Studiums bedanken.

Zuletzt möchte ich meine Dankbarkeit gegenüber meiner Familie ausdrücken. Meine Begeisterung für die Wissenschaft wurde durch Dr. Karl Ditgens geweckt. Ihm verdanke ich vieles, was mich heute ausmacht. Bei meinen Großeltern möchte ich mich sehr bedanken und im Besonderen bei meiner Oma Garath. Du gibst mir noch heute die Zuversicht, alles zu schaffen. Meinem Vater möchte ich auch meinen Dank aussprechen für deine unablässige Motivation und stete Unterstützung. Ich bedanke mich auch sehr bei meinem zweiten Vater Jürgen für deine guten Ratschläge und bei meiner Schwiegermutter für ihre ansteckende Gelassenheit.

Abschließend gehört mein größter Dank meiner Frau Miriam. Vielen Dank für dich, deine Taten und deinen Zuspruch. Du bist der Mensch, der mir am meisten den Rücken stärkt und jedes Problem mit mir bewältigt. Mit unserem Bund beschreite ich jeden steinigen Pfad. Vielen Dank auch meinen Töchtern Helena und Josefine, die jeden Moment für mich mit Freude füllen und mich auch in Zukunft motivieren, die schwersten Hürden zu überwinden.

11. Eidesstattliche Erklärung zur Dissertation

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verfasst worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 21.12.2019

Robin Thomas Siegfried Polz