

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der
Technischen Universität München

Charakterisierung der biologischen Funktion von Interleukin-18

Peter Hochholzer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der
Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. St. Glaser

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher
2. Univ.-Prof. Dr. K. Heeg, Philipps-Universität Marburg
3. Univ.-Prof. Dr. A. Gierl

Die Dissertation wurde am 17.04.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 26.07.2001 angenommen.

*In Dankbarkeit
meinen Eltern*

Inhaltsverzeichnis

A.	Einleitung	1
B.	Material und Methoden	6
1.	Medien und Reagenzien	6
1.1.	Zellkulturmedien.....	6
1.2.	Medium zur Anzucht von Bakterien.....	7
1.3.	Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	7
1.4.	Trypsin/EDTA Lösung.....	7
1.5.	Ficoll-Lösung.....	7
1.6.	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)-Lösung	8
1.7.	Eosin-Färbelösung	8
1.8.	Paraformaldehyd-Fixierlösung	8
1.9.	Wachstumsfaktoren	8
1.9.1.	T-Zell und NK-Zell Wachstumsfaktoren	8
1.9.2.	Wachstums- und Reifungsfaktoren für dendritische Zellen.....	8
2.	Zellen	9
3.	Bakterien	9
4.	Versuchstiere	9
5.	Molekularbiologische Arbeiten und Methoden	10
5.1.	Auflistung verwendeter molekularbiologischer Arbeitsmethoden.....	10
5.2.	Plasmide, Genbanken und synthetische Oligonukleotide	12
5.2.1.	Plasmide	12
5.2.2.	Genbanken.....	12
5.2.3.	Synthetische Oligonukleotide.....	12
6.	Zellkultur	13
6.1.	Kultur von ES/EF Zellen.....	13
6.2.	Elektroporation	14
6.3.	Selektion rekombinanter ES-Zellklone.....	14
7.	Tierversuche	14
7.1.	Superovulation.....	14
7.2.	Generierung von Mäusen aus ES-Zelllinien.....	15
7.3.	Organentnahmen	15
7.4.	Gewinnung embryonaler Fibroblasten.....	15
7.5.	Injektionsprotokolle	16
7.5.1.	Letale Schockinduktion.....	16
7.5.2.	Immunisierung von Mäusen.....	16

INHALTSVERZEICHNIS

8.	Immunologische und zellbiologische Methoden	16
8.1.	Stimulierung von Zellen	16
8.1.1.	T-Zell-Stimulation	17
8.1.2.	Stimulation von dendritischen Zellen	17
8.2.	Herstellung von Liposomen zur Immunisierung	17
8.3.	⁵¹ Cr-Zytotoxizitätsversuch	18
8.4.	Proliferationsmessung durch ³ H-Thymidininkorporation	18
8.5.	Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen	19
8.6.	Anfertigung und Färbung von Gewebeschnitten	19
8.7.	Bestimmung von Zytokinen	20
C.	Ergebnisse	22
1.	Generierung eines Interleukin-18 defizienten Mausstammes	22
1.1.	Analyse der genomischen Struktur des murinen IL-18 Gens	22
1.1.1.	Konstruktion einer Sonde	22
1.1.2.	Fischen des IL-18 Gens aus einer Genbibliothek	23
1.1.3.	Physikalische Kartierung und partielle Sequenzierung des IL-18 Gens	24
1.2.	Konstruktion eines „Targeting-Vektors“	28
1.3.	Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen	30
1.4.	Entwicklung eines IL-18 defizienten Mausstammes aus mutierten ES-Zellen	32
2.	Analyse des Interleukin-18 defizienten Mausstammes	35
2.1.	Allgemeine Phänotypanalyse der IL-18KO-Mäuse	35
2.1.1.	Fertilität und Entwicklung	35
2.1.2.	Anatomie und Histologie	36
2.1.3.	Lymphozytenverteilung in lymphoiden Organen	36
2.1.4.	Funktionsanalyse der T-Zellen aus IL-18KO-Mäusen	37
2.1.5.	Funktionsanalyse der natürlichen Killerzellen aus IL-18KO-Mäusen	37
2.2.	Lipopolysaccharid-Schockmodelle in IL-18 defizienten Mäusen	40
2.2.1.	„Low dose“ LPS-Schockmodell	40
2.2.2.	„High dose“ LPS-Schockmodell	41
2.2.3.	LPS induziertes Zytokinprofil in Abhängigkeit von IL-18	42
2.2.4.	Superantigen induzierte Reaktionen in Abhängigkeit von IL-18	45
2.2.4.1.	Sensibilisierung für die letalen Effekte von LPS durch Superantigen	45
2.2.4.2.	Allgemeine Reaktivität von IL-18KO-Mäusen gegenüber SEB	47
2.3.	Die Rolle von Interleukin-18 bei der Induktion von primären zytotoxischen T-Lymphozyten Antworten	49
2.3.1.	Untersuchung der Fähigkeit von dendritischen Zellen, IL-18 zu sekretieren	49
2.3.2.	Untersuchung der Funktion von IL-18 bei der Induktion einer primären ZTL Antwort mit ODN1668 als Adjuvans	52
2.3.3.	Untersuchung von IL-18 als Adjuvans bei der Induktion einer primären ZTL Antwort	55
2.3.4.	Untersuchung der Funktion von IL-12 und Interferon- γ bei der Induktion einer primären ZTL Antwort mit ODN1668 als Adjuvans	57
2.3.4.1.	Die Funktion von IFN- γ	57
2.3.4.2.	Die Funktion von IL-12	58

INHALTSVERZEICHNIS

2.3.5. Generierung einer primären ZTL Antwort in IL-18 defizienten Mäusen mit Zellen allogenen Ursprungs.....	60
2.3.6. Induktion einer primären ZTL Antwort mit dem Adjuvans QuilA in Abhängigkeit von IL-18.....	62
2.3.7. Reaktivität von IL-18 defizienten Mäusen gegenüber ODN1668.....	63
2.3.7.1.Induktion von IL-12 und IFN- γ Produktion durch ODN1668 in Abhängigkeit von IL-18.....	63
2.3.7.2.Induktion eines Th1 polarisierten Immungedächtnisses mit ODN1668 in Abhängigkeit von IL-18.....	67
D. Diskussion.....	70
E. Zusammenfassung.....	84
F. Literaturverzeichnis	86

Abkürzungen

APZ	Antigen präsentierende Zelle
bp	Basenpaare
CD	Cluster of Differentiation
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	embryonale Fibroblasten
ES	embryonale Stammzellen
FACS	Fluoreszenz-Aktivierter-Zellsorter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
IFN	Interferon
IL	Interleukin
kd	Kilodalton
LD	letale Dosis
LIF	Leukämie Inhibitionsfaktor
MHC	Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PEC	Zellen aus der Bauchhöhle
RNS	Ribonukleinsäure
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TH	T-Helferzellen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
ZTL	Zytotoxische T-Lymphozyten

A. Einleitung

Das Immunsystem von Vertebraten ist ein äußerst komplexes, aus humoralen und zellulären Komponenten bestehendes Netzwerk. Es dient dem einzelnen Individuum zum Schutz gegen Schäden, die durch Invasion von Krankheitserregern (z.B. Viren, Bakterien, Protozoen) verursacht werden könnten. Durch die Fähigkeit „Fremd“ von „Selbst“ zu unterscheiden, ist es dem Immunsystem möglich, Invasoren unter geringer Schädigung körpereigener Strukturen zu bekämpfen. Eine weitere Eigenschaft ist der Besitz eines sogenannten „immunologischen Gedächtnisses“, welches das Immunsystem in die Lage versetzt, auf wiederkehrende Attacken gleicher Art schneller und effektiver zu reagieren.

Das Immunsystem von Säugern kann grob in zwei Kompartimente gegliedert werden: das natürliche bzw. unspezifische und das erworbene bzw. spezifische Kompartiment, wobei das erste evolutionär älter ist als das zweite. Die natürliche Immunität wird als schnell reagierende erste Verteidigungslinie, die spezifische Immunität als langsamer reagierende, zweite Verteidigungslinie angesehen. Die Verflechtung beider Teilbereiche ist jedoch, gerade in Säugern, sehr ausgeprägt und vielfältig.

Als Effektorzellen der natürlichen Immunität werden natürliche Killerzellen (NK), Makrophagen, Makrophagen-ähnliche sowie dendritische Zellen angesehen, während B- und T-Zellen als Effektoren der spezifischen Immunität gelten. Die genannten Zelltypen pflegen eine intensive Kommunikation miteinander, welche sie durch Zell-Zell-Kontakt oder lösliche Faktoren bewerkstelligen. Während beim Zell-Zell-Kontakt Oberflächenmoleküle die zentrale Rolle spielen, sind es bei der mittelbaren Kommunikation hauptsächlich Chemokine und Zytokine. Im Gegensatz zum Zell-Zell-Kontakt kann die Kommunikation mittels löslicher Faktoren über größere Distanzen geschehen, als sie auch Amplifikationsmöglichkeiten bietet. Dies begründet sich in der Tatsache, daß eine Zelle, welche lösliche Botenstoffe sekretiert, damit wesentlich mehr Zellen anspricht als wenn die Kommunikation über direkten Kontakt geschehen müßte. Bei einer Überaktivierung entwickelt sich jedoch die Gefahr einer ungewollten, systemischen Aktivierung. Dies kann wiederum bis zum Tod des Individuums führen.

A. EINLEITUNG

Für die Regulation der Makrophagenwirkung scheint das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) eine zentrale Rolle zu spielen. Dieses Zytokin wird primär von T-Zellen (Trinchieri, 1995) produziert. Aufgrund der Produktion von IFN- γ kann ein spezieller Typ von T-Lymphozyten charakterisiert werden, die als TH1 Zellen bezeichnet werden. TH1 Zellen sind bedeutsam bei der Abwehr intrazellulärer Erreger und spielen bei der Transplantatabstoßung eine bedeutende Rolle. IFN- γ dient unter anderem der Verstärkung der Effektorfunktionen von Makrophagen. Mittels IFN- γ sind somit Zellen der spezifischen Immunität in der Lage, den Betriebszustand von Zellen der natürlichen Immunität zu modulieren.

Die Rolle von IFN- γ konnte vor allem durch die Analyse von IFN- γ -Rezeptor (IFN- γ -R) defizienten Mäusen näher charakterisiert werden. Durch das Fehlen eines funktionalen IFN- γ -R auf den Zellen dieser Mäuse sind alle durch IFN- γ induzierten Modulationen von Effektorfunktionen eliminiert. Ein Beispiel der Effektorfunktion von Makrophagen ist die Reaktion auf den bakterielle Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin). Nach LPS Gabe reagieren Makrophagen mit Aktivierung und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. dem Tumor-Nekrose Faktor (TNF). Die unkontrollierte Ausschüttung dieser Zytokine kann ein letales Zytokinsyndrom (letaler Schock) auslösen. Mäuse die keinen IFN- γ Rezeptor besitzen, zeigen eine signifikant erniedrigte LPS-Sensitivität, welche sich sowohl durch geringere Letalität, als auch durch deutlich geringere TNF-Serumspiegel nach LPS-Gabe manifestiert. Weiterhin wurde in diesen Mäusen ein wesentlich geringeres Maß an Lebergewebezerstörung nach LPS-Behandlung nachgewiesen (Car et al., 1994; Kamijo et al., 1993). Lebergewebezerstörung kann auch durch Administration des Mitogens ConcanavalinA (ConA) in Mäuse ausgelöst werden. Auch hierbei konnte IFN- γ als Schlüsselzytokin identifiziert werden (Küsters et al., 1996). Aus den Ergebnissen dieser Arbeiten kann gefolgert werden, daß IFN- γ eine zentrale Rolle bei der Induktion von Letalität, als auch bei der Lebergewebezerstörung nach LPS-Gabe spielt.

Die Induktion der Produktion von IFN- γ selbst ist wiederum sehr genau durch die Anwesenheit anderer Zytokine kontrolliert. Bis vor kurzem wurde diese Fähigkeit hauptsächlich dem Zytokin Interleukin-12 (IL-12) zugeschrieben (Trinchieri, 1995). Um so interessanter war deshalb die Arbeit von Okamura et al., in der die Identifizierung und Klonierung eines neuen Zytokins beschrieben wurde. Dieses besaß die ausgeprägte Eigenschaft, Produktion von IFN- γ in hohem Maße zu induzieren. Gezeigt werden konnte dies an *Propionibacterium acnes* und LPS behandelten Mäusen, als auch an differenzierten TH1-Zellen. Daher wurde dieses

A. EINLEITUNG

Zytokin zuerst als IFN- γ induzierender Faktor (Interferon-gamma inducing factor, IGIF) bezeichnet. Erst später wurde diesem Zytokin die Bezeichnung Interleukin-18 (IL-18) zuteil. Besonders gut gelang die Induktion der IFN- γ -Produktion im Synergismus mit IL-12 (Okamura et al., 1995b). Sogar aus B-Zellen (Yoshimoto et al., 1997) und Makrophagen (Munder et al., 1998) konnte IFN- γ Sekretion nachgewiesen werden, nachdem sie mit IL-12 und IL-18 stimuliert wurden. Diese Beobachtungen tragen wesentlich zum Verständnis der teilweise noch nicht detailliert geklärten Kommunikation zwischen natürlichem und erworbenem Immunsystem bei.

Weiterhin konnte für IL-18 die Fähigkeit gezeigt werden, daß es einen wichtigen Kofaktor bei der Steigerung der Zytotoxizität und Proliferation von natürlichen Killerzellen (NK) darstellt. Sowohl die Perforin als auch die Fas vermittelte Zytotoxizität wird durch IL-18 gesteigert (Hyodo et al., 1999; Takeda et al., 1998; Tsutsui et al., 1996).

Die Produktion von IL-18 selbst erfolgt vornehmlich aus dendritischen Zellen (DZ) (Stoll et al., 1998), aktivierten Makrophagen (Okamura et al., 1995b) und Kupffer Zellen (Matsui et al., 1997), wobei die genauen Signale der Induktion dieser Produktion noch nicht geklärt sind. Durch die IL-18 vermittelte IFN- γ Induktion fördern diese Zellen zusätzlich die Entwicklung von TH1-Zellen (Robinson et al., 1997).

Obwohl IL-18 funktionale Ähnlichkeiten mit IL-12 aufweist, besteht eine evolutionäre Verwandtschaft mit der Interleukin-1 (IL-1) Familie. So wurde von Bazan et al. eine strukturelle Ähnlichkeit mit den Mitgliedern der IL-1 Familie gezeigt (Bazan et al., 1996). Zur Reifung und Sekretion von IL-18 ist, wie bei IL-1 β eine Spaltung der Proform notwendig, die strikt von Interleukin-1-beta-converting-enzyme (ICE) abhängt (Ghayur et al., 1997; Gu et al., 1997). Somit ist verständlich, daß in ICE-defizienten Mäusen weder reifes IL-1 β noch IL-18 freigesetzt werden kann.

IL-18 scheint eine zentrale Rolle bei der Regulation der Reaktivität gegenüber Endotoxin (LPS) zu zukommen. Zum einen sind ICE-defiziente Mäuse signifikant weniger sensitiv gegenüber Endotoxin (Kuida et al., 1995; Li et al., 1995), zum anderen wurde in IL-1 β -defizienten Mäusen eine normale Responsivität gegenüber LPS festgestellt. Weiterhin wurde in IL-1-RezeptorI defizienten Mäusen, in welchen weder IL-1 α noch IL-1 β wirksam sind, eine normale Reaktivität gegenüber LPS beobachtet (Fantuzzi et al., 1996; Glaccum et al., 1997; Zheng et al., 1995). ICE-defiziente Mäuse zeigen einen signifikant erniedrigten IFN- γ Serumspiegel nach LPS Stimulation. Zu bemerken ist, daß hierbei normale IL-12 Serumspiegel nach LPS Stimulaion gemessen wurden (Fantuzzi et al., 1998; Ghayur et al., 1997).

A. EINLEITUNG

Zusammengenommen legen diese Befunde nahe, daß fehlendes reifes IL-18 für die erniedrigte LPS-Reaktivität in ICE-defizienten Mäusen verantwortlich ist. Auch für die beobachteten erniedrigten IFN- γ Serumspiegel nach LPS Gabe könnte das fehlende reife IL-18 verantwortlich sein. Diese Hypothese erfährt zusätzliche Unterstützung durch die normalen IL-12 Serumspiegel nach LPS-Stimulation in diesen Mäusen. Somit drängt sich die Implikation auf, daß IL-18 eine zentrale Rolle, im speziellen hinsichtlich der Produktion von IFN- γ , bei der Immunantwort nach LPS-Stimulation zukommt.

Interessanterweise wurde, ähnlich wie für IFN- γ , auch für IL-18 eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Lebergewebezerstörung nach LPS-Gabe in mit *Propionibacterium acnes* sensibilisierten Mäusen gezeigt (Okamura et al., 1995b). Hierbei ist zu bemerken, daß IL-18 während der durch *P. acnes* vermittelten Sensibilisierungsphase, nicht aber während der LPS vermittelten Schockinduktionsphase, wichtig ist (Sakao et al., 1999).

IL-18 wirkt auf B-Zellen (Yoshimoto et al., 1997), NK-Zellen (Hyodo et al., 1999; Takeda et al., 1998; Tsutsui et al., 1996) und T-Zellen (Okamura et al., 1995b). Die Voraussetzung für die Wirkung von IL-18 ist die Expression des IL-18 Rezeptors (IL-18R), der früher als Interleukin-1 Receptor related protein (IL-1RrP) bezeichnet wurde. Untersuchungen der Expression des IL-18R auf oben genannten Zellen zeigte eine zum Teil konstitutive, als auch induzierbare Expression (Kunikata et al., 1998; Tomura et al., 1998). Hierbei fiel auf, daß CD8⁺-T-Zellen eine starke Expressionserhöhung des IL-18R nach gleichzeitiger Stimulation des T-Tell-Rezeptors (TZR) mit anti-CD3 Antikörpern und des kostimulatorisch wirkenden Rezeptors CD28 mit entsprechenden Antikörpern, mit anschließender Interleukin-12 (IL-12) Zugabe, zeigten (Tomura et al., 1998). Diese Befunde legen eine Beteiligung von Interleukin-18 an der Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen, auch als zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) bezeichnet, nahe.

Um die Rolle von IL-18 bei der Induktion eines letalen Schocks näher zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit IL-18 defiziente Mäuse mittels gezielter Genzerstörung generiert. Es sollte nicht nur die Rolle von IL-18 bei der Auslösung, sondern auch der Mechanismus der Sensibilisierung für die Induktion eines letalen Schocks untersucht werden. Weiterhin sollten die IL-18 defizienten Mäuse dazu benutzt werden, um die Rolle von IL-18 bei der Generierung und Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen zu charakterisieren. Hierbei sollte im speziellen die Frage geklärt werden, ob IL-18 von Zellen des natürlichen Immun-

A. EINLEITUNG

systems, wie dendritischen Zellen, benützt werden kann, um die Effektorzellen des erworbenen Immunsystems, die zytotoxischen T-Zellen, zu aktivieren. Somit war die Frage zu klären, ob IL-18 ein wichtiges kommunikatives Brückenelement zwischen natürlichem und erworbenem Immunsystem ist.

B. Material und Methoden

1. Medien und Reagenzien

1.1. Zellkulturmedien

Als Zellkulturmedium zur Anzucht aller verwendeten Zellen, mit Ausnahme embryonaler Stammzellen, wurde Click's RPMI 1640 (BiochromKG, Berlin, Deutschland) verwendet. Das Medium wurde als Instantmix bezogen und selbst angesetzt. Hierbei fanden folgende Zusätze, welche sämtlich von BiochromKG (Berlin, Deutschland) bezogen wurden, Verwendung:

Hydroxyethylpiperazinethanolsulfonsäure (HEPES) – Puffer	2,4 g/l
Bicarbonat	1,2 g/l
Antibiotika: Penicillin G	1000 U/ml
Tylosintartrat	1 µg/ml
Streptomycinsulfat	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
2-Mercaptoethanol	5 µM
Fötale Kälberserum (FKS)	10 %(v/v)
pH 7,2	

Die Lagerung erfolgte steril bei 4°C.

Zur Anzucht embryonaler Stammzellen wurde DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland) verwendet. Dieses wurde als steriles Fertigmedium bezogen. Folgende Zusätze fanden Verwendung:

L-Glutamin	2 mM
2-Mercaptoethanol	5 µM
Fötale Kälberserum (FKS)	5 % bis 15 %(v/v)
Leukämie Inhibitions Faktor (leukemia inhibitory factor, LIF)	1 %

Hier stammte das FKS von GibcoBRL (Eggenstein, Deutschland) und wurde vor Gebrauch für 30 min auf 56° C erhitzt, um Komplementaktivität zu eliminieren. LIF wurde als Kulturüberstand des LIF produzierenden Klons CHO-LIF-D zugesetzt. Der Überstand wurde freundlicherweise von Klaus Pfeffer zur Verfügung gestellt.

B. MATERIAL UND METHODEN

Je nach Verwendung wurden dem Medium unterschiedliche Konzentrationen von dem Neomycinderivat Geneticinsulfat[®] (G418, GibcoBRL, Eggenstein, Deutschland) und Cymeven[®] (Gancyclovir, Syntex) zugesetzt.

Das Einfriermedium bestand aus RPM1640- bzw. DMEM-Medium mit 25% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, Deisenhofen, Taufkirchen). Das Einfrieren der Zellen erfolgte durch schrittweise Abkühlung. Hierbei wurden die Zellen in Einfriermedium 30 min bei -20°C und dann ÜN bei -80°C inkubiert, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

1.2. Medium zur Anzucht von Bakterien

Die Anzucht von *Escherichia coli* erfolgte mit Luria Bertani Medium (fest oder als Agar) (Sambrook et al., 1989). Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Medium gegebenenfalls Ampicillin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Die sogenannte „Blau-Weiß-Selektion“ von Transformanden wurde durch Zugabe von 0,004% (v/v) X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktopyranosid) in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ermöglicht.

1.3. Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)

PBS wurde als Instantmix von BiochromKG (Berlin, Deutschland) bezogen und selbst angesetzt. Die Lagerung erfolgte steril bei 4°C .

1.4. Trypsin/EDTA Lösung

Diese Lösung diente zur Ablösung von adhärent wachsenden Zellen, welche 5 min bei 37°C damit inkubiert wurden. Die fertige Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% Ethylendiamintetraacetat) wurde von GibcoBRL (Eggenstein, Deutschland) bezogen.

1.5. Ficoll-Lösung

Zur Abtrennung von Erythrozyten von Milzzellen wurden die Zellsuspensionen mit je 1-2 ml Ficoll ($\delta = 1,09$) (Seromed, Berlin, Deutschland) unterschichtet und für 20 min bei $1000 \times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Da die Erythrozyten aufgrund ihrer Dichte in die Ficollphase wanderten, konnten die gewünschten Milzzellen aus der Interphase geerntet werden.

1.6. Ammoniumchlorid (NH₄Cl)-Lösung

8,3 g NH₄Cl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden in 1000 ml H₂O_{bidest} gelöst und durch Zugabe von 111 ml Tris (170 mM) gepuffert. Die Lösung wurde auf pH 7,2 eingestellt und steril filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C. Verwendung fand diese Lösung zur Lyse von kontaminierenden Erythrozyten.

1.7. Eosin-Färbelösung

2 g Eosin (Merck, Darmstadt, Deutschland), 250 mg Natriumazid (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 50 ml FKS wurden langsam in 450 ml 0,9 % Natriumchlorid-Lösung eingerührt, durch einen Papierfilter filtriert, portioniert und unsteril bei 4°C gelagert. Diese Lösung diente zur Vitalfärbung von Zellsuspensionen im Verhältnis 10:1 oder 1:1.

1.8. Paraformaldehyd-Fixierlösung

1 g Paraformaldehyd (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden in 100 ml PBS bei 56°C unter Rühren über Nacht gelöst. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,45 µm Filter (Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland) filtriert und bei 4°C gelagert. Diese Lösung diente zur Fixierung von mit spezifischen Antikörpern markierten Zellen, welche mittels Durchflußzytometrie analysiert werden sollten.

1.9. Wachstumsfaktoren

1.9.1. T-Zell und NK-Zell Wachstumsfaktoren

Rekombinantes, humanes Interleukin-2 (rhuIL-2) (Eurocetus, Amsterdam, Niederlande) wurde als Wachstumsfaktor für Lymphozytenkulturen in einer Mediumkonzentration von 10 U/ml eingesetzt. Zur Generierung von „Lymphokine activated killer“ (LAK) Zellen wurden den Lymphozytenkulturen rhuIL-2 in einer Mediumkonzentration von 500 U/ml zugesetzt.

1.9.2. Wachstums- und Reifungsfaktoren für dendritische Zellen

Zur Generierung von dendritischen Zellen aus Knochenmark wurde rekombinanter, muriner Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierungsfaktor (rmuGM-CSF) (PeproTech, London, England) in einer Mediumkonzentration von 200 U/ml eingesetzt.

2. Zellen

Folgende Zelllinien wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Zelllinie	Beschreibung
ES E14.1	Embryonale Stammzelllinie aus dem Mausstamm 129/SvJ, freundlicherweise überlassen von Klaus Pfeffer
EF	Embryonale Fibroblasten aus CD1-Mäusen, selbst hergestellt
EL-4	Murines T-Zellymphom, Haplotyp: H-2 ^b ; ATCC: TIB-39
P815	Haplotyp: H-2 ^d ; ATCC: TIB-64
EG-7	EL-4 transfeziert mit Ovalbumin cDNS; freundlicherweise überlassen von M. Bevan
YAC-1	Zielzelle für NK-Zellen; ATCC: TIB-160

Tab. 1: Verwendete Zelllinien mit Eigenschaften und Herkunft. ATCC steht für American Tissue Type Culture Collection (ATCC; Rockville, USA), dahinter ist die Bestellnummer angegeben.

3. Bakterien

Als Wirtsbakterium für alle Klonierungen wurde *Escherichia coli* XL1Blue oder *E. coli* SURE (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Als Wirtsbakterium für die genomische λ DashII Genbank diente *E. coli* LE392 (Stratagene, Heidelberg, Deutschland).

4. Versuchstiere

Die Zucht und Haltung aller in dieser Arbeit verwendeten Mäuse erfolgte unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen. In Versuchen eingesetzte Tieren waren zwischen 8 und 12 Wochen alt, falls nicht anders vermerkt. Direkt in Versuche eingesetzte Balb/C und C57BL/6 Mäuse wurden von Bomholtgard Breeding and Research Zentrum LTD (Bomholtvej, Dänemark) bezogen. Interferon-gamma defiziente und Interleukin-12 defiziente Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bezogen. CD1 Mäuse, die als Oozyten- und Morula-Spender, und als Ammenmütter benutzt wurden, als auch C57BL/6 Mäuse, welche als Blastozystenspender dienten, wurden freundlicherweise von Klaus Pfeffer zur Verfügung gestellt.

5. Molekularbiologische Arbeiten und Methoden

5.1. Auflistung verwendeter molekularbiologischer Arbeitsmethoden

Die angewandten molekularbiologischen Arbeitsmethoden sind allgemeiner Laborstandard und werden deshalb nur tabellarisch mit Hinweisen auf die entsprechende Technik aufgelistet.

Methode	Technik / Bemerkung	Referenz
DNS allgemein		
Aufkonzentrierung	EtOH-Präzipitation	Sambrook et al., 1989
Genbank Screen	in λ DASH II	Sambrook et al., 1989
Hybridisierung	Radioaktiv, Detektion im Autoradiogramm oder Phosphoimager Screen	Sambrook et al., 1989 und DuPont NEN (Bad Homburg, Deutschland)
Konzentrationsbestimmung	photometrisch	Sambrook et al., 1989
Polymerase Kettenreaktion (PCR)	Taq-Polymerase	Sambrook et al., 1989
Präparation, genomisch	proteolytischer Verdau	siehe unten
Präparation, aus Phagen	QIAquick Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Präparation, Plasmid	Qiagen Plasmid Kits	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Reinigung aus Agarosegel	Gel extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Reinigung, genomisch	Phenol-Chloroform-Extraktion	Sambrook et al., 1989
Reinigung, PCR Produkte	PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Reinigung, markierte Sonden	Gelfiltration mit NucTrap-Säulen	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
Separation	Agarosegelelektrophorese, analytisch oder präparativ	Sambrook et al., 1989
Sequenzierung	Cycle Sequencing Verfahren nach der Sanger Kettenabbruchmethode mit dem Prism TM Ready Reaction DyeDeoxy TM Terminator Cycle Sequencing Kit; Detektion am Applied Biosystems 373 Sequencer	Perkin Elmer Applied Biosystems (Foster City, USA)
Transfer, genomisch u. Plasmid (Southern)	Kapillarblot auf Nitrozellulose	Sambrook et al., 1989
Transfer, Phagen (Southern)	Plaque Lift auf Nitrozellulose	Sambrook et al., 1989

B. MATERIAL UND METHODEN

DNS Modifikation		
Ligation	T4 DNS Ligase	Sambrook et al., 1989
Markierung	³² P- α dCTP Rediprime Kit und ³² P- α dCTP	Amersham (Braunschweig, Deutschland)
Spaltung	Restriktionsendonukleasen	Sambrook et al., 1989
DNS Transformation / Transfektion		
Bakterien und ES-Zellen	Elektroporation mit Gene Pulser (BioRad, München, Deutschland)	Sambrook et al., 1989
RNS		
cDNS Synthese	Random u. Oligo-dT Primed reverse Transkription mit Superscript II Plus (Gibco, Eggenstein, Deutschland)	Sambrook et al., 1989
Konzentrationsbestimmung	Photometrisch	Sambrook et al., 1989
mRNS Analyse	RNase-Protection-Assay-(RPA)-Kit	Pharmingen (Hamburg, Deutschland)
Präparation, gesamt	TriReagent TM (saure Phenolextraktion)	Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

Tab. 2: Molekularbiologische Arbeitsmethoden mit Bemerkungen, Referenzen und Bezugsquellen. Beim Einsatz von Kits wurde exakt nach den Herstellervorschriften gearbeitet. Alle Enzyme zur DNS-Manipulation wurden von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen.

Isolierung chromosomaler DNS

Proben von Schwanz, anderen Geweben oder Zellpellets wurden ÜN in Verdaulösung bei 56°C inkubiert. Danach wurde mit 1 Volumen Phenol/Chloroform geschüttelt, 5 min abzentrifugiert und die obere, wässrige Phase mit 2,5 Volumen eiskaltem EtOH_{abs} präzipitiert. Die ausgefällte DNS wurde nach Waschen in 70% EtOH luftgetrocknet und in 100 µl H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Puffer und Lösungen:

Verdaulösung:	TNE	500 µl
	SDS 10%	50 µl
	Proteinase K (10 mg/ml)	7,5 µl
TNE	Tris-HCl, pH=8,0	10 mM
	NaCl	100 mM
	EDTA, pH=8,0	1 mM

5.2. Plasmide, Genbanken und synthetische Oligonukleotide

5.2.1. Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten Plasmide zur Klonierung verschiedener Konstrukte zur Erzeugung der Knockout-Mäuse eingesetzt. Die durch die vielzähligen Klonierungsschritte entstandenen Konstrukte sind nicht im einzelnen aufgeführt.

Vektor	Bemerkung	Referenz
pBluescript KS (-)	allgemein benutzter Klonierungsvektor	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
pMC1-Neo-poly(A)	enthält die für Neomycinresistenz kodierende Genkassette	Stratagene (Heidelberg, Deutschland)
pGEM7TK	enthält das Gen kodierend für die Thymidinkinase aus <i>Herpes simplex</i> Virus	Klaus Pfeffer, München
pGEM-T	T-Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega (Mannheim, Deutschland)

Tab. 3: Zur Klonierung verschiedener DNS-Fragmente benutzte Plasmide mit Bemerkungen, Referenzen und Bezugsquellen.

5.2.2. Genbanken

In der vorliegenden Arbeit wurde die Genbank 129/SvJ/ λ DASHII zum Fischen des murinen IL-18 Gens verwendet. Diese Genbank beinhaltet genomische DNS aus 129/SvJ Mäusen in dem Vektor λ DASHII, konstruiert durch SauIIIa Partialverdau und Ligation der Fragmente in die BamHI Schnittstelle des Vektors. Die Genbank wurde freundlicherweise von Klaus Pfeffer, München, zur Verfügung gestellt.

5.2.3. Synthetische Oligonukleotide

Sämtliche Primer wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Standardprimer M13 wurden zur Sequenzierung von Inserts in pBluescript KS(-) verwendet. Die restlichen in Tabelle 4 gezeigten Primer wurden zur Sequenzierung des murinen, genomischen IL-18-Lokus und/oder (in Kombination) zur Amplifikation verschiedener Abschnitte aus dem IL-18-Lokus mittels PCR, benutzt.

B. MATERIAL UND METHODEN

Die für die PCR's gewählte Standardmethode war wie folgt:

Hot Start	95°C	5 min	einmal
Denaturierung	95°C	1 min	Zyklus
Annealing	58°C - 63°C	1 min	Zyklus
Extension	72°C	1 min 30 sec	Zyklus

Nach 35 Zyklen folgte einmalig eine Inkubation bei 72°C für 10 min.

Name	Sequenz
IGIF-V1	5'-ATGGCTGCCATGTCAGAAGAC-3'
IGIF-V2	5'-CAACTTTGGCCGACTTCACTG-3'
IGIF-R1	5'-CTGGTCTGGGGTTCCTACTGGC-3'
IGIF-R3	5'-CTAACTTTGATGTAAGTTAGTG-3'
IGIF-IE-V2,5	5'-GTGACCCTCTCTGTGAAGG-3'
IGIF-IE-V3,5	5'-GCCAAAAGGAAGATGATGC-3'
IGIF-IE-R2	5'-GGTATAAAGTAAAGCGTGTTG-3'
IGIF-IE-R2,25	5'-CACAGGCTGTCTTTTGTCAACG-3'
IGIF-IE-R2,5	5'-CACAGAGAGGGTCACAGCC-3'
IGIF-KOF	5'-AGACATATCCGCTGTCAGCTG-3'
NEO1500	5'-TCGCCTTCTATCGCCTTCTTG-3'
SA-F	5'-GTTTTAGTGTGGTGGCATGCAC-3'
SA-R	5'-GAGAGGATCCCACAGGCTGTCTTTTGTCAACG-3'
M13-F	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13-R	5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'

Tab. 4: Primer, die zur Sequenzierung, oder zur Amplifikation verschiedener Abschnitte des murinen IL-18 Gens mittels PCR eingesetzt wurden.

6. Zellkultur

6.1. Kultur von ES/EF Zellen

Embryonale Stammzellen (ES) wurden stets zusammen mit Mitomycin C behandelten, embryonalen Fibroblasten (EF) kultiviert. Diese Feederzellen produzierten Wachstumsfaktoren und verhinderten so, zusammen mit dem der Kultur zugesetzten LIF, das Ausdifferenzieren der ES Zellen. Die Zellen wurden regelmäßig trypsinisiert und in frische Kulturschalen umgesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte täglich. Als Maß für die Qualität der ES Zellen galt die Koloniemorphologie. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen langsam in Einfriermedium abgekühlt (30 min bei -20°C, dann ÜN bei -80°C) und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

6.2. Elektroporation

ES Zellen wurden wie in B.6.1. beschrieben expandiert. 5×10^7 Zellen (drei 15 cm-Zellkulturplatten) wurden für die Elektroporation in 7 ml ES-Medium aufgenommen und mit 200 µg Rekombinationsvektor in 1 ml PBS gemischt. Die Transfektion erfolgte in einem Volumen von je 0,8 ml in Elektroporationsküvetten (Gap 4 mm, BioRad) bei 200 Ω, 250 µF und 0,34 Volt. Die Kondensatorentladungszeit betrug um die 0,4 sec. Nach Abkühlen auf Eis wurde jeder Transfektionsansatz in 0,4 ml Portionen geteilt und auf je zwei vorbereitete EF Kulturen in 10 cm Schalen plattiert.

6.3. Selektion rekombinanter ES-Zellklone

Nach der Transfektion wurden die ES-Zellen zwei Tage ohne Selektionsdruck kultiviert, ab dem zweiten Tag mit 200 µg/ml Geneticin (G418) und ab dem vierten Tag zusätzlich mit 2 mg/ml Gancyclovir selektioniert. Alle zwei Tage wurden die Zellen mit frischem Selektionsmedium versorgt, um Zelltrümmer und tote Zellen zu entfernen. Sobald sich überlebende Zellkolonien etabliert hatten (ca. an Tag 14 bis 18), wurden diese mit PBS gewaschen, mit PBS überschichtet und unter einem Binokular mit Hilfe einer Mikropipette von der Platte entfernt. Die Klone wurden zunächst in 96-well Mikrotiterplatten mit Trypsin/EDTA vereinzelt und anschließend wieder mit EF-Zellen (ca. 5×10^4 /Well) kokultiviert. Nach zwei Tagen wurden die ES-Klone auf drei 96-well Mikrotiterplatten geteilt, wovon zwei für die PCR Analyse des Genotyps der Klone nach vier weiteren Tagen mit PBS gewaschen und das Pellet bei -20°C eingefroren wurde. Die Klone der verbleibenden Platte wurden währenddessen auf eine 48-well Mikrotiterplatte transferiert und nach weiteren drei Tagen Kultur bis zum Vorliegen des Ergebnisses der PCR-Untersuchung eingefroren.

7. Tierversuche

7.1. Superovulation

Zur Auslösung einer Superovulation wurden weibliche Mäuse mit 10 U PMSG und 44-48 h später mit 10 U hCG jeweils intraperitoneal injiziert und mit männlichen Tieren verpaart. Der Zeitplan war so organisiert, daß die Ovulation, die etwa 12 Stunden nach hCG-Gabe erfolgte, auf die Mitte der Dunkelphase fiel. Innerhalb von weiteren zwölf Stunden wurde durch Untersuchung auf einen Vaginalpfropf (Plug) überprüft, ob eine Begattung stattgefunden hatte. Der Tag, an dem der Vaginalpfropf entdeckt wurde, galt als Tag 0,5 der Embryonal-

entwicklung (E0,5). Die Entnahme der Embryonen geschah am Tag 3 (E3,5). Die entnommenen Embryonen waren im Blastozystenstadium und konnten zur Blastozysteninjektion verwendet werden.

7.2. Generierung von Mäusen aus ES Zelllinien

Die Erzeugung chimärer Mäuse aus homolog rekombinierten ES Zellen erfolgte durch Blastozysteninjektion und anschließendem Transfer der veränderten Embryonen in pseudoschwangere Ammenmütter.

Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen im Blastozystenstadium (E3,5) aus dem Uterus superovulierter C57BL/6 Weibchen gewonnen. Die Blastozysten wurden in M2 Medium aufgenommen. Mit Hilfe von Mikromanipulatoren wurden ca. 15 bis 20 ES Zellen in das Blastocoel injiziert. Der Uterustransfer in pseudoschwangere Ammenmütter erfolgte anschließend. Für die genaue Beschreibung der Techniken und Medien siehe (Pfeffer et al., 1993).

Als Ammenmütter wurden CD1 Weibchen verwendet. Sie wurden superovuliert und mit vasktomierten Männchen verpaart. Der Transfer der Blastozysten erfolgte analog zu deren Entwicklungsstadium in Ammenmütter am Tag 3,5 *post coitem*.

7.3. Organentnahmen

Die Versuchstiere wurden durch Genickbruch oder durch Begasung mit CO₂ getötet, äußerlich mit 70% EtOH desinfiziert und die jeweiligen Organe, Bauchhöhlenzellen (PEC), Knochen oder Embryonen steril entnommen.

7.4. Gewinnung embryonaler Fibroblasten

Embryonale Fibroblasten (EF) wurden aus superovulierten CD1 Mäusen an Tag 14 *post coitem* gewonnen. Den Spendertieren wurde der Uterus steril entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Die Embryos wurden aus dem Uterus präpariert und in PBS gewaschen. Der Kopfbereich und die fötale Leber wurden entfernt, der Rest mit einem Skalpell so fein wie möglich zerteilt und in EF Medium kultiviert. Etwa alle zwei Tage wurden die Fibroblasten mit neuem Medium versorgt und wenn nötig auf größere Zellkulturgefäße transferiert.

7.5. Injektionsprotokolle

7.5.1. Letale Schockinduktion

Zur Untersuchung verschiedener Schockmodelle wurden Mäuse intraperitoneal mit 20 mg D-Galaktosamin (D-GalN, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zusammen mit 2 µg LPS (aus *E. coli* 0127:B8, Sigma Deisenhofen, Deutschland), mit verschiedenen Mengen LPS alleine oder mit 10 µg *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB, Toxin Technologies, Sarasota, USA) und anschließend LPS (70 µg oder 100 µg) injiziert. Zur Analyse der Zytokinproduktion wurden 500 µg oder 1000 µg LPS injiziert. Alle Agenzien waren steril in PBS gelöst. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 200 µl.

7.5.2. Immunisierung von Mäusen

Den Mäusen wurde in beide hintere Füße subkutan je 50 µl Immunisierungslösung injiziert. Diese enthielt entweder Liposomen, deren Herstellung später beschrieben wird, oder das Oligonukleotid (ODN) 1668 (Sequenz: 5'-TCCATGACGTTCCCTGATGCT-3'; synthetisiert von MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland) als Adjuvans zusammen mit Ovalbumin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Vier Tage nach der Injektion wurden die poplietalen und inguinalen Lymphknoten isoliert, durch ein Sieb gedrückt und die Zellsuspension mit 10 U/ml rhuIL-2 in 5% Clicks RPMI1640 Medium für weitere 4 Tage inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde die zytotoxische Aktivität der Zellen im ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest, der später beschrieben wird, überprüft.

8. Immunologische und zellbiologische Methoden

8.1. Stimulation von Zellen

Zur Stimulation von Zellen über Oberflächenrezeptoren wurden Antikörper eingesetzt. Um eine möglichst effiziente Kreuzvernetzung zu erzielen, wurden zusätzlich zu den an die Zellen bindenden Antikörpern noch solche eingesetzt, welche die Fc-Regionen der ersten Antikörper binden und somit vernetzen.

8.1.1. T-Zell-Stimulation

Um T-Zellen zu stimulieren, wurden 96-well U-Boden-Platten mit einem Ziege-anti-Hamster IgG polyklonalen Antikörper beschichtet. Hierzu wurde in jedes Well 150 µl PBS mit 10 µg/ml des Ziege-anti-Hamster IgG polyklonalen Antikörpers (Dianova, Hamburg, Deutschland) pipettiert und ÜN bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurde in jedes Well 150 µl in PBS gelöster Hamster-anti-Maus-CD3 monoklonaler Antikörper (1µg/ml, Pharmingen, Hamburg, Deutschland), in manchen Ansätzen zusätzlich Hamster-anti-Maus-CD28 monoklonaler Antikörper (1µg/ml, Pharmingen, Hamburg, Deutschland), pipettiert und für 3 Std bei RT inkubiert. Nach einmaligem Waschen wurden die so behandelten Platten zur T-Zellstimulation eingesetzt. Diese sollten über CD3, in manchen Ansätzen und CD28, direkt an die an der Welloberfläche gebundenen Antikörper binden und somit stimuliert werden.

8.1.2. Stimulation von dendritischen Zellen

Zur Stimulation von dendritischen Zellen über CD40 wurde zu 7×10^6 Zellen in 3 ml Medium in einem Well einer Sechswellplatte zuerst Hamster-anti-Maus-CD40 monoklonaler Antikörper der Klasse IgM (Dianova, Hamburg, Deutschland) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml gegeben. Danach wurde ein Ziege-anti-Hamster-IgM polyklonaler Antikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) in der Endkonzentration 0,5 µg/ml zugegeben. Durch die Zugabe des zweiten AK sollte der erste, bereits an CD40 gebundene AK, kreuzvernetzt werden und es somit zu einer Zellaktivierung über CD40 führen.

Andere Arten der Stimulation von dendritischen Zellen waren die Zugabe von ODN1668 in einer Endkonzentration von 3 µM oder die Zugabe von Camptothecin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Endkonzentration von 30 µg/ml.

8.2. Herstellung von Liposomen zur Immunisierung

Ein Gemisch aus 18 mg Phosphatidylcholin, 2 mg Phosphatidylglyzerol, 5 mg Cholesterol (molares Verhältnis von 2:0,2:1) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 5 ml Chloroform wurde in einem 100 ml Rundkolben unter Vakuum eingedampft, bis sich ein dünner Lipidfilm an der Kolbenwand gebildet hatte. An einem Lyophilisator wurden letzte Spuren des Chloroforms entfernt. 3 mg Ovalbumin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde zusammen mit 0,4 mg QuilA (Isotec Production AB; Lulea, Schweden) in 1 ml PBS gelöst. Diese Lösung wurde langsam zu dem Lipidfilm hinzugefügt und der Kolben vorsichtig geschüttelt, bis die Lipide resuspendiert waren. Die resultierende milchige Suspension wurde für 30 min

bei Raumtemperatur equilibriert, in Eppendorf-Tubes bei 3000 U/min für 5 min zentrifugiert und durch einen 0,22 µm Anotop 10 Plus Filter (Whatman, Maidstone, England) filtriert.

8.3. ⁵¹Cr-Zytotoxizitätsversuch

Die lytische Aktivität der Effektorzellen wurde in einem 4 h ⁵¹Cr-Zytotoxizitätsversuch untersucht. Die Zielzellen wurden für 1 h bei 37°C mit 75 µl Na₂⁵¹CrO₂ (14MBq) (Amersham, Braunschweig, Deutschland) inkubiert und danach zweimal gewaschen. Die Zellen nehmen das Chromat über einen unbekanntem Mechanismus auf. Für die Peptidbeladung von EL-4 Zellen mit dem Peptid P1 (Neosystem Laboratoire, Strasbourg, Frankreich) erfolgte eine Inkubation der ⁵¹Cr markierten Zellen mit 10µM Peptid. Das Peptid P1 (Sequenz: N-SIINFEKL-C) stellt ein H-2K^b restringiertes Epitop aus Ovalbumin dar. Nach drei Waschschritten wurden 100 µl der Zielzellen (10⁴/ml) zu 100 µl Effektorzellen pipettiert. Für die Effektorzellen wurden stets verschiedene Verdünnungen und Mehrfachwerte angesetzt. Kontrollen enthielten keine Effektorzellen (Spontanlyse) oder 100 µl 1% SDS (Maximallyse). Die Effektor- und Zielzellen wurden abzentrifugiert (50 x g, 1min), um eine sofortige Interaktion zwischen beiden Zellarten zu ermöglichen. Nach 4 h Inkubation bei 37°C wurden 100 µl Überstand abgenommen und die γ-Strahlung in einem γ-Zähler (Coulter, Frankfurt, Deutschland) gemessen. Die Prozent spezifische Lyse errechnete sich nach folgender Gleichung: [(experimentielle Lyse – Spontanlyse) / (Maximallyse – Spontanlyse)] x 100.

8.4. Proliferationsmessung durch ³H-Thymidininkorporation

Zur Bestimmung der Proliferation nach Stimulation der Zellen wurden sie in 96-Well U-Bodenplatten in Sechsfachbestimmungen kultiviert. Zusammen mit den Stimulantien erfolgte die Inkubation für 48 Std. Danach wurden die Zellen mit 1 µCi (6,7 Ci/mM) ³H-Thymidin (Amersham, Braunschweig, Deutschland) für 6 Std. gepulst. Nach einem Gefrierschritt wurden die lysierten Zellen mit einem 96-Well Zellharvester (Inotech, Schweiz) durch einen Glasfieberfilter gesaugt. Die ³H-Thymidininkorporation in der auf dem Filter zurückgehaltenen DNS wurde in einem Matrix-96 Counter (Packard Instruments, Meriden, CT, USA) vermessen. Die Ergebnisse wurden in „Counts per Minute“ (cpm) vom Counter geliefert und als solche, ohne weitere Verrechnung, verwendet. Von den Sechsfachbestimmungen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen ermittelt und in den jeweiligen Grafiken dargestellt.

8.5. Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen

10^6 Zellen wurden mit den entsprechenden Antikörpern für 45 min auf Eis inkubiert und dreimal mit PBS-2%FKS gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 1 % Paraformaldehyd fixiert. Es wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Antikörper eingesetzt, die ausnahmslos bei Pharmingen (Hamburg, Deutschland) bezogen wurden. Die Antikörper waren gegen spezifische Oberflächenmoleküle gerichtet und entweder mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelt. Durch diese Koppelung war es möglich, Zellen mit gebundenen Antikörpern entsprechend nach ihren Oberflächenmolekülen an einem Fluoreszenz-Aktivierten-Zell-Sorter (FACS, Epics Profile II, Fa. Coulter, Krefeld, Deutschland) zu analysieren. In diesem Gerät werden Zellen in einer Flüssigkeit angesaugt, über eine vibrierende Durchflußzelle in Einzelzellen pro Flüssigkeitstropfen aufgetrennt und mit Laserlicht (Argon-Laser) bestrahlt. Je nach Ablenkung des Laserlichts kann die Größe (forward light scatter) oder die Granularität (90° light scatter) der Zellen bestimmt werden. Gleichzeitig regt das Laserlicht die an Antikörper gekoppelten Fluoreszenz-Farbstoffe zur Lichtemission an und erlaubt somit den Nachweis von Oberflächenmolekülen, an die Antikörper spezifisch gebunden haben. Mittels dieser Methode wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Zellpopulationen analysiert, wobei die analysierten Oberflächenmoleküle jeweils im Ergebnisteil beschrieben sind.

8.6. Anfertigung und Färbung von Gewebeschnitten

Nach Entnahme des Organs wurde dieses in spezielle Einbettplastikschälchen gelegt, mit O.C.T. Einbettmedium (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) luftblasenfrei überschichtet und dann in 2-Methylbutan (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), das in flüssigem Stickstoff vorgekühlt war, schockgefroren. Dabei sollte möglichst schnell gearbeitet werden, um autolytische Vorgänge zu vermeiden. Das eingebettete Organ kann bei -80°C gelagert werden.

In einem Kryostat (Leica, Nussloch, Deutschland) wurde der Präparatblock in $8\ \mu\text{m}$ dicke Scheiben geschnitten, die dann auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgebracht wurden.

Die in dieser Arbeit ausschließlich verwendete Hämatoxylin/Eosin Färbung wird häufig für routinemäßige Untersuchungen von Geweben und Organen verwendet. Durch den basischen

B. MATERIAL UND METHODEN

Farbstoff Hämatoxilin werden die Zellkerne blau, durch den sauren Farbstoff Eosin das Zytoplasma in einem roten Farbton angefärbt.

Lösungen und Puffer:

Hämalaun:	Hämatoxilin	1 g
	Natriumjodat	0,2 g
	Aluminiumkaliumsulfat	50 g
	Zitronensäure	1 g
	H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 1 l
Eosin:	Eosin	10 g
	H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 1 l
Eosinfärbelösung:	Eosin	10 %
	H ₂ O _{bidest}	90 %
	Eisessig	0,02 %

Durchführung:

Fixierung in aufsteigender Alkoholreihe:

- Präparate in 70 % EtOH und EtOH_{abs.} jeweils 4x eintauchen
- Inkubation für 5 min in EtOH_{abs.} bei RT

Färbung:

- Färben in Hämatoxilin 30 min
- Waschen in PBS 3x 5 min
- Färben in Eosinfärbelösung 10 min
- Waschen in PBS 1 x 1 min

Die getrockneten Schnitte wurden mit Glycerin-Gelatine luftblasenfrei überschichtet. Darauf wurde vorsichtig ein Deckglas plaziert.

8.7. Bestimmung von Zytokinen

Zur Bestimmung von Zytokinen aus Mausseren wurden die Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach den Injektionen getötet und das Blut der Mäuse wurde gewonnen. Nach dem es geronnen war, wurde es in Eppendorf Reaktionsgefäßen für 20 min bei 14.000 Upm abzentrifugiert und das abgetrennte Serum wurde geerntet. Zur Bestimmung von Zytokinen aus Zellkulturüberständen wurden das Serum in verschiedenen Verdünnungen in PBS eingesetzt.

B. MATERIAL UND METHODEN

Die Bestimmungen wurden mittels „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA) durchgeführt. Die hierzu notwendigen Kits wurden von Pharmingen (Hamburg, Deutschland) bezogen. Zur Bestimmung von IL-18 wurde der notwendige Kit von R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland) bezogen. Die Durchführung erfolgte jeweils exakt nach Herstellervorschriften.

C. Ergebnisse

1. Generierung eines Interleukin-18 defizienten Mausstammes

Die Erzeugung eines Interleukin-18 (IL-18) defizienten Mausstammes sollte durch die Zerstörung des für IL-18 kodierenden Gens auf embryonaler Stammzebene erreicht werden. Diese Genzerstörung wiederum sollte durch homologe Rekombination mit einem sogenannten „Targeting-Vektor“ erzielt werden. Um solch einen „Targeting-Vektor“ konstruieren zu können, war es notwendig, Kenntnis über die genomische Struktur des murinen IL-18 Gens zu erlangen.

1.1. Analyse der genomischen Struktur des murinen IL-18 Gens

1.1.1. Konstruktion einer Sonde

Um eine physikalische Kartierung des murinen IL-18 Gens durchführen zu können, mußte dieses Gen mittels einer Sonde aus einer entsprechenden Genbank gefischt werden. Als Grundlage zur Herstellung dieser Sonde diente die mRNA-Sequenz von IL-18 (GenBank Acc.-Nr.: D49949).

```

1  GGCACAGCTG GACCTGGTGG GGGTTCTCTG TGGTTCCATG CTTTCTGGAC
51  TCCTGCCTGC TGGCTGGAGC TGCTGACAGG CCTGACATCT TCTGCAACCT
101 CCAGCATCAG GACAAAGAAA GCCGCCTCAA ACCTTCCAAA TCACTTCCTC
151 TTGGCCCAGG AACAATGGGCT GCCATGTCAG AAGACTCTTG CGTCAACTTC
201 AAGGAAATGA TGTTTATTGA CAACACGCTT TACTTTATAC CTGAAGAAAA
251 TGGAGACCTG GAATCAGACA ACTTTGGCCG ACTTCACTGT ACAACCGCAG
301 TAATACGGAA TATAAATGAC CAAGTTCTCT TCGTTGACAA AAGACAGCCT
351 GTGTTGAGG ATATGACTGA TATTGATCAA AGTGCCAGTG AACCCAGAC
401 CAGACTGATA ATATACATGT ACAAAGACAG TGAAGTAAGA GGACTGGCTG
451 TGACCCTCTC TGTGAAGGAT AGTAAAATGT CTACCCTCTC CTGTAAGAAC
501 AAGATCATTT CCTTTGAGGA AATGGATCCA CCTGAAAATA TTGATGATAT
551 ACAAAGTGAT CTCATATTCT TTCAGAAACG TGTTCAGGA CACAACAAGA
601 TGGAGTTTGA ATCTTCACTG TATGAAGGAC ACTTTCTTGC TTGCCAAAAG
651 GAAGATGATG CTTTCAAAC TATTCTGAAA AAAAAGGATG AAAATGGGGA
701 TAAATCTGTA ATGTTCACTC TCACTAACTT ACATCAAAGT TAGGTGGGGA
751 GGGTTTGTGT TCCAGAAAGA TGATTAGCAC ACATGCGCCT TGTGATGACC
801 TCGCCTGTAT TTCCATAACA GAATACCCGA GGCTGCATGA TTTATAGAGT
851 AAACACGTTT ATTTGT

```

Abb. 1: Darstellung der cDNA-Sequenz von murinem IL-18. Das Startkodon (ATG) und das Stopkodon (TAG) ist fett, die Bindungsstellen für die Primer IGIF-V1 und IGIF-R1 sind unterstrichen dargestellt.

Die Primer IGIF-V1 (Abb. 1, Pos. 165 – 185) und IGIF-R1 (Abb. 1, Pos. 384 – 403) wurden anhand der IL-18-mRNA Sequenz entworfen und anschließend benutzt, um eine Polymerase

Kettenreaktion (PCR) durchzuführen. Als Template wurde Leber-cDNS aus unbehandelten C57BL/6 Mäusen verwendet, welche durch reverse Transkription einer total-RNS Präparation erhalten werden konnte. Die PCR wurde mit 1,5 mM MgCl₂ und einer Annealingtemperatur von 60°C durchgeführt. Die genauen PCR Bedingungen sind in B.5.2.3 zu finden. Das resultierende Amplikon hatte die erwartete Größe von 239 Bp, was mittels Agarosegelelektrophorese mit einem Aliquot der PCR-Reaktion überprüft wurde. Zu bemerken ist, daß aufgrund der Wahl der Primer das Amplikon die Region vom A des ATG-Startkodons bis 239 Bp in 3'-Richtung überspannte und somit nur kodierende Elemente enthielt. Nach einer Phenol/Chloroform-Reinigung des Amplikons wurde es in den pGEM-T-Vektor kloniert. Das in *Escherichia coli* SURE amplifizierte Plasmid wurde mittels Quiagen-Midi-Kit isoliert und gereinigt. Danach erfolgte eine Kontrollsequenzierung unter Verwendung des Primers M13R für die Sequenzierreaktion. Für diesen Primer existiert eine Bindungsstelle proximal zur Insertionsstelle, wobei das 3'-Ende des Primers in Richtung Insertion weist.

Das Ergebnis der Kontrollsequenzierung bestätigte die Richtigkeit des klonierten Fragments, ermittelt durch Vergleich mit der IL-18-cDNS Sequenz. Nun wurden aus der gleichen Präparation, die zum Sequenzieren benutzt wurde, 5 µg Plasmid mit den Restriktionsendonucleasen (REN) NotI und NcoI verdaut. Das Produkt dieser Doppelverdauung sollten das excisierte Fragment, was dem vorher beschriebenen PCR-Produkt entspricht, und der linearisierte Vektor sein. Mittels einer präparativem Agarosegelelektrophorese wurden beide Fragmente verifiziert, als auch das excisierte Insert vom Vektor getrennt und isoliert. Dazu wurde die das Insert repräsentierende Bande ausgeschnitten und das DNS-Fragment aus dem Gel aufgereinigt.

1.1.2. Fischen des murinen IL-18 Gens aus einer Genbank

Die wie oben beschrieben hergestellte und verifizierte Sonde fand Verwendung beim Durchsuchen einer Phagen-Genbank. Diese basierte auf dem Vektorsystem Lambda (λ) DASHIII, welches Fragmente des Genoms des Mausstammes 129/SvJ in sich trug. Nachdem die Sonde radioaktiv markiert wurde, erfolgte die Hybridisierung mit der Genbank. Nach dreimaligem Durchlaufen dieser Prozedur konnten drei, mit der Sonde hybridisierende Phagenklone unabhängig voneinander isoliert werden. Nach der Expansion dieser Klone wurde die Phagen-DNS gereinigt und einem Verdau mit NotI unterzogen. Diese REN sollte die inserierten genomischen Fragmente aus dem Vektorsystem schneiden und als sogenannter

C. ERGEBNISSE

„rare-cutter“ mit nur sehr geringer Wahrscheinlichkeit innerhalb der Inserts schneiden. Die sich anschließende Agarosegelelektrophorese zeigte bei jedem Klon drei Fragmente, wobei zwei davon den kurzen (9 KB) und langen Arm (20 KB) des Phagenvektors repräsentierten. Die dritte Bande repräsentierte das inserierte genomische, nicht durch NotI verdaute Fragment. Hierbei zeigte sich, daß die drei Klone unterschiedlich große Fragmente beherbergten.

Klon	2	8	25
Insertgröße	12,5 KB	18 KB	15 KB

Tab. 5 Darstellung der Insertgrößen der isolierten Phagenklone

Durch zwei weitere Verdauungen mit BamHI bzw. EcoRI der Phagen-DNS konnte anhand des sich bei der Agarosegelelektrophorese ergebenden Musters gefolgert werden, daß die drei Klone unterschiedlich waren und unabhängig voneinander gefischt wurden.

1.1.3. Physikalische Kartierung und partielle Sequenzierung des IL-18 Gens

Da direkt aus Phagen stammende DNS aufgrund nicht eliminierbarer Kontaminationen problematisch in der Handhabung war, erfolgte eine Umklonierung der drei Fragmente in den Vektor pBlueskript KS (-) (pBlue). Hierzu wurde die NotI Schnittstelle in pBlue verwendet, in welche die mit NotI aus dem Phagenvektor excisierten Fragmente ligiert wurden. Die Produkte waren pBlue λ 2, pBlue λ 8 und pBlue λ 25. Da Klon Nr. 8 das größte Insert lieferte, wurde die grobe Analyse mit pBlue λ 8 begonnen. Mit der REN NheI konnte das Insert in zwei, 7,3 KB und 10,7 KB große Fragmente geteilt werden. Diese wurden über die NotI und XbaI (Überhangkompatibilität zu NheI), in pBlue subkloniert. Die Produkte waren pBlueNN7,3 und pBlueNN10,7. Da beide Fragmente mit der in C.1.1.1. beschriebenen Sonde hybridisierten, wurde pBlueNN10,7 nochmals verkleinert. Nach einem Verdau mit PstI hybridisierte nur ein 3,5 KB großes, randständiges (über die vorherige NheI Schnittstelle mit dem Vektor verbundenes) Fragment mit der Sonde. Durch eine Religation konnte somit ein, nur das 3,5 KB Fragment tragendes Plasmid (pBluePN3,5) erzeugt werden. Zusammen repräsentierten diese beiden Fragmente (in pBlueNN7,3 und pBluePN3,5) einen durchgehenden, 10,8 KB großen Bereich jener murinen chromosomalen Region, auf der das IL-18 Gen vermutet wurde. Die ehemalige NheI Schnittstelle stellte die Verbindung der Fragmente dar. pBluePN3,5 und pBlueNN7,3 wurden zur genaueren Kartierung weiter verwendet. Das Ergebnis dieser Kartierung findet sich in Abb. 3 (oben).

C. ERGEBNISSE

Um die Exon-Intron-Struktur zu ermitteln, mußten Sequenzierungen durchgeführt werden. Anhand der in Abb. 1 dargestellten mRNA-Sequenz von IL-18 wurden die Primer IGIF-V1 (siehe C.1.1.1.), IGIF-IE-R2, IGIF-V2, IGIF-IE-R2,25, IGIF-IE-V2,5, IGIF-IE-R2,5, IGIF-IE-V3,5 und IGIF-R3 generiert. Die Sequenz der einzelnen Primer findet sich in B.5.2.3. Durch Sequenzierung der Plasmide pBluePN3,5 und pBlueNN7,3 mit den aufgeführten Primern konnte die Exon-Intron-Struktur des IL-18 Gens weitgehend aufgeklärt werden. Lediglich das nur 12 Bp große Exon 4 mußte durch „Primer-Walking“ lokalisiert werden. Anhand der durch Kartierung und Sequenzierung ermittelten Restriktionsschnittstellen wurden weitere Subklonierungen der beiden Plasmide pBluePN3,5 und pBlueNN7,3 in pBlue durchgeführt. Die resultierenden Plasmide wurden mit den im Vektor bindenden Primer M13F und M13R, als auch mittels „Primer-Walking“ sequenziert. Dadurch konnte, bis auf zwei Lücken die durchgehende Sequenz eines 7,5 KB überspannenden Bereiches des murinen IL-18 Gens ermittelt werden. In diesem Bereich waren alle kodierenden Exons (Exon 3 bis Exon 7) lokalisiert. Die gefundene Sequenz ist in Abb. 2 gezeigt. Alle Sequenzierungen wurden nur einmal und in einer Richtung durchgeführt. Die nicht sequenzierten Lücken sind entsprechend gekennzeichnet. Punktuelle Lücken, welche nicht identifiziert werden konnten, sind als „N“ gekennzeichnet. In Abb. 3 ist die Lage der sequenzierten Bereiche graphisch in der Genkarte dargestellt.

```
1 GGATCCAACG CCATCTCTGG ACTCCATCAG AAGTGCATGT GATGCACAGA
51 CATACATGTT AGCAAAGTAC CAAATACATA AAACAAAATA AAATTCCTT
101 TACNNAAG AAGAAGANAA GAATTTTCGTT CNTTTTATGT GTTCAAAGAA
151 CAGTCTTTGC CTCTTCNTAN GTGACTCTTT GCTTTCAC TAAGGAACAATG
201 GCTGCCATGT CAGAAGATTC TTGCGTCAAC TTCAAGGAAA TGATGTTTAT
251 TGACAAACAG CTTTACTTTA TACGTAAGTN TAAATCAGTA GGACAAATGC
301 AGGGNTCAGA TACAGGTATT CAACAAGAAA AGAAATCATA CAGTGAACCT
351 AGGCCCTGT TTGTCATCAA ATTCTACNGC AATGTCNACT CCCNTCTCTA
401 AAAATAACCA TAAGATTCGN GAGGTCCCAG TGCCCTGTCC CACNTCAGGG
451 ATGGCACTCT GGCAGTAGCT CACCAAGATG GTGCCCTGGGG CCCATCATGA
501 AGATCCCATG AAAATGTGCC ATTGAGAAAA CCCTGCTTCC CAAAAGAAAT
551 GCTCGTCATG ATATTCTAGA CCTTGAGTTC TGTGAATACC ATTCATGTGA
601 ATATATTTGA CCAGAGAGAG AGGAAGGAAG GAAAGGAGGG AGGGAGGGAG
651 GGAGGGAGGG AGGGA----- ---ca. 360 Bp-----
1001 -----
1051 GAGGAAGGGA GGGAGGGAGG GAGGGAGGGA GATTCTTCTC ATTAAGCTTC
1101 CATGGGGGAT TTGACTTCAC TGAAAGTTCG GCTTTCCTCA GAAGCTTCCT
1151 GAAAAAGTCC TTAGATGTTT TTCCATTTAA ACAATAAATT TAAAAGAAGA
1201 GTTTGCTGCT TTATAAAAAA TACTTTTGCT ATGTATTGAG ATTTTAAAT
1251 CCTGGAATTA AATCTTTTAA TTATTTTTTA TTGTATGTAT ATGAGTGTTT
1301 CTCTGTATG TATGTCTGTG CACCACATGC ATGTGGTACC CATGGAGGTC
1351 AGAAGAGGAC ACTGGATCCA TAGAAGTGA TATGAGCTAA CATGTGGGTG
1401 CTGGGAATCA AAGTACTAGT CCTCTGGAAN AGTAGACGGT GCTCTTAACT
1451 ACTGAGCCAT CTCTCCAGCC CTGGATTTTG GTTTTATACC TAACATAGCT
1501 AAGCACACAT GAACCCTAAT AGGCTTGGTT TTATGGGCTT GAATGCTTAT
1551 CAAATCTGAT ATTCCTACTG GAGGCCAAAA GAGCCCATCC ACAAACACAG
1601 AAGTTAAGGA GTGAGGAGTG GGGACCAGGC ACCACACCTT CAATCTCAGC
```

C. ERGEBNISSE

1651	ACTTCAGGGA	GGCAGANGCA	GGTGGACTCT	CTAAGTCTGG	GGCCAGTCTA
1701	GTCTACAGAG	TGAGTTCAG	GTCAGCCANA	NCTATATAGT	ATCTCCCTGT
1751	CTACAGANAA	ANTTGGGGGA	GGGGAGTGG	AGGAAGAATA	NANTTGCCAA
1801	AGGGTGGGAG	ANANGGGACA	TTTGANCTGA	ACTGTATAAT	TAAACATATC
1851	GTGTTTCTCT	TTTCCTCCCN	TTAGCTGAAG	AAAATGGTAA	AGTATAAATT
1901	TATTTTTCTT	TCTTTGCAAA	TTANAANGCA	CTTGAGACAT	ATCCGCTGTC
1951	AGCTGGGAAA	AACTGTCCAT	AGGGTTGTTT	CCTANGTAGA	TAATCATTAC
2001	AGTTATATTA	AATTCATGTG	GTGAGAGCAT	AATAAAAACTA	TAATTCCTCT
2051	ATAAAAAAAT	AAAAAATACC	ACTATAAATC	CATAATAAAA	GNATAATTCC
2101	TNTCCCTTAG	ACGCTCGGAC	ACTTTTCCAN	TATTTNTCNN	TANTAAGGGA
2151	AAAGAANTGT	TTTAGTGTGG	TGGCATGCAC	CTTTTAGCCC	ACTTAGGAGG
2201	CAGAGGCAGG	CAGATCTCTG	AGTTTGAAGC	CGGCTTGGTC	TACAGAGCAA
2251	TGTCCAGGAC	AGCCAAGATT	ACACAGAGAA	ACCCTGTCTC	AAAAAAGAAA
2301	AGACAGGGGG	TGGGGTTCAG	GGGAGGGAAG	GAGAAGAAGA	CAGAGATGTA
2351	GAGGGAGAGG	GAGATGGGGG	GAGAGGGAGA	GAGAGAATTC	CCTGAAGGGG
2401	AAAGTAGGGA	TGGTGGTGTA	AAGATTCGGA	GAGCAGCAAG	ACTTGAAGCT
2451	TCAGCTGCGC	TCAACTGAAA	AACCAAGTAC	TGCCCCCGGT	GAGCCAGGGT
2501	GGGATAGTTC	TCACATCTGC	ATAAGCAGGT	TAAGAATTCA	CAGTATTAAC
2551	AAGATGCCAC	AATGCAGTAA	CAAGGTGTGG	CTAGCAGGGA	AGGGCAGGCA
2601	GGACCTGAGC	TAGGGAAGAA	TTCCCAGGGC	CAGGAGACGA	ATGGGAGGGC
2651	TTTGTAAGGT	CTGAGAACGT	GGACAGCGTG	AGTCAAAATG	TAAGGAAACA
2701	AAAGGGCAGG	AGGCTGGTCA	GACAGTAAGA	CAGTGAACC	TCTGGCCGGA
2751	GAGTAGCTCC	AAGCACAAAC	AGGAAACAGA	GTGTCTTAGA	AGCGGATGAA
2801	TGCAGCAGTC	AGCTTGATCA	TTGCTGCACC	TAGAGGTATG	TACTGACTCA
2851	AGAGAACAGT	AGTACTCGGT	CTATTTGTTA	TCTGGAAAAA	AAAAAACCTA
2901	ACTATTAATG	ATTCAATGTA	TATTATAGGA	GACCTGGAAT	CAGACAACCT
2951	TGGCCGACTT	CACTGTACAA	CCGCAGTAAT	ACGGAATATA	UAGACCAAG
3001	TTCTCTTCGT	TGACAAAAGA	CAGCCTGTGT	TCGAGGATAT	GACTGATATT
3051	GATCAAAGTG	GTACTTTTTCC	CCTATTTTATT	TAAAAACACA	GAAGATGAGA
3101	AGACCACCCA	TTATTCTCCC	TCCATTTTAC	TGCC'TACACT	CTCAAATATT
3151	GCATCTTTGA	CCCCATCCTT	AAATGGAAAG	TCACAGTAGT	AAATATAATT
3201	TCACTTTAGA	GCGTGCCCAT	ACTTTTAGTT	GGAGGGAGGA	GTTGGGTCCA
3251	ATAAAGACGC	TGGCAGAGGA	CAAGTCACTC	TGAGTCTACA	TGTGTNCCAC
3301	TAGTTCCTT	ATTTTAATTG	TATCCTCTGA	GGAAGAACCT	CACCAAGTTA
3351	GATGCTTCAT	CCCCACTGGT	TATAGCTAAA	CATACTGCTG	ACACCATCAA
3401	AACTCACTAT	TAAAAGCAAA	ACAGAAGCCT	TTCAAATGAA	ACCTGCCTTC
3451	CACCAGAACA	CAAGAAGCAC	CTCAGAGGAT	GGCATGATTA	ATGGGCGCCT
3501	CAAGTTATAA	GTTCAAAATC	ACACAGTTTA	GGACCTAGTT	GAATGAATAT
3551	TTTCCAAAAA	GAAAAACTA	TCCTAAGATT	CTTACCGCAG	CAAATAGGTT
3601	TTTAATATTC	CGTTGAACAT	TCAACAGTTA	AACATAGTCT	TTAGATTTCAG
3651	AATAATGCTC	TGTTTGAGAG	TTGGTTTTGT	TTTTGTTTTG	GGACAGGATC
3701	TCACTATGTA	TCCCTAGCAG	ACTTAGAACT	CTATCGGCCA	GACAGACATA
3751	AAATTCCTACC	TACCCCTGCC	TCCCAAGTTC	ATGGAAATAA	AGACATGCAG
3801	ATACCTTTAT	TTCCCACACC	CAGCAGGGTT	CCATGGAAT	TTAACACTACT
3851	CAAAAATTAT	CAGAGTGTCC	TTAATACATT	CAGAATATCT	TTTTTATGTA
3901	TATTGACGTT	TTGCCAGCAT	GTATGTCTGT	GTGAAATTAC	AGACAGTTGT
3951	GAGCGACATG	TGGGTGCTCA	AAACTGAACC	CAGTGTCTTT	AACCACTGAG
4001	CCATCTTCCC	AGACCCCACT	CAGAATATCT	TTAGCACACT	CATGTTGCCC
4051	ACTCATGTTT	TATAACACCN	TGTAAGTGTG	TTTTAAGGGG	TGTCTGGTCA
4101	ACGGGGCATT	ATGTCTGTCA	ACTGTCTGAC	CAAACTGAN	TGCAGAATAG
4151	TGATTGGCCT	ATTAAGGTGG	ATCTAGCCTT	TGGCTACGTT	TCTGCAGGTG
4201	CTGATTTAGG	AGAAAATAT	TATAACTAGT	GGCATCACTT	ATGAATATCT
4251	GTTTCAGCCA	GTGAACCCCA	GACCAGACTG	ATAATATACA	TGTACAAAGA
4301	CAGTGAAGTA	AGAGGACTGG	CTGTGACCCT	CTCTGTGAAG	GATAGTAAAA
4351	TGCTACCCT	CTCCTGTAAG	AACAAAATCA	TTTCCTTTGA	GGTAAGATTC
4401	AGTTCATTNG	GTTTTAGTCA	TATTAATGGA	CAAAATGATA	ATATCCCAGT
4451	GATTTTTTCAG	ACCAACCCTT	GATNTAGAGC	TGGAAGACCA	GAGACATCCA
4501	CTGAAATGTA	TGGTAGTAGG	GAATTATCAA	GCCCTTTGGT	CTAGTGTGAT
4551	GANACTTGCT	TGCTAATTT	TGTCTCTGAG	TCTATCAGAG	AGGAAATGAC
4601	CACTGTGTTT	TCTTTTCAGA	AAGGGTTTCT	TGTATTCTAG	ACTGACCTTA

C. ERGEBNISSE

```

4651 TACTCAGTGT ATAGCTGAGG GTGACCTTGA ACTTTTAACC CTTCCATCTC
4701 TACTCCCATG TGCTAGGATT ACGGGTGTCT GTCACGTGTAC CCTGTCTCAT
4751 GCTCTGGTCT TTCACTAATA CAAATNTTAG CCACTGTGGC CACAGACAGG
4801 GTTCGGATAA GACCCAGTTG CAGCTCCTGC TGTATCANTA GGGCTTTGTA
4851 GCTAAGAATT AGTTCTCAGC TAGACTTTGA GCTTACATTT GGTCCTAGAT
4901 CAGCTCCTGC AGCTTACAGT CTCTCCCTAA GTTGTGGCTT AGCAGGCACA
4951 GTTTCAGAAG CAGCTGCTGG TGAGAGTACT TAGCATGACC GTCAACCCCG
5001 AGGCCATACT TGTTCATAAA GGACAATGGC CAAAAACTAT GACTCTCAGT
5051 TCTATAACTA GTTCAGTTAA AACCCCTCCTC AGAGTCTTCT ATGCATCTTA
5101 GGGGGTTAGG GTGCCTTTTT AATTCTAGAG ATTTCTCTAT CAATCCATAG
5151 GATCATGATG ATCTTTGGTA CCATGGAGTC AAAATGCACT CCAAAATATT
5201 AGTTCTATGA TTAACATGGA AGAACTTCAG GCAGTGCCCA TATTTTNTAA
5251 TACACCCTGA AAAGGTAGAC AAGATGTAAG AATAGGAAAA GCCAGGCANT
5301 CCTAGCAGCT ACAGGCCAG TGTGAGGGAN TACAGCTTCC AGACACCTAA
5351 TCCTGATAGA CTCTGGTGTG TGAATAAAAG AGAGAGGAAT CAGCATGTGG
5401 TCTTTNTGGG CAGGACCCAC CAAAGAGATT ATATTTNTGGA CCAAAGGAG
5451 AGACAACTGT GCATTGTCAT GCTTGGCAGA AAGGCAGAAT CAGGGGCCAC
5501 AACTGAGCC AGTACAGGCA GGCTATTGAG AAACCCAAGA CTCGGTCATA
5551 GCACAGCTNC TGGGTTTAAAT CACGCTGCAG CTTACAGTCT CTCCCTAAGT
5601 TGTGGCTTAG CAGGCACAGT TTCAGAAGCA GCTGCTGGTG AGAGTACTTA
5651 GCATGACCGT CAACCCCGAG GCCATACTTG TTCATAAAGG ACAATGGCCA
5701 AAAACTATGA CTCTCAGTTC TATAACTAGT TCAGTTAAAA CCCTCCTCAG
5751 AGTCTTCTAT GCATCTTAGG GGGTTAGGGT GCCTTTTCAA TTCTAGAGAT
5801 TTCTCTATCA ATCCATAGGA TCATGATGAT CTTTGGTACC ATGGAGTCAA
5851 AATGCACTCC AAAATATTAG TTCTATGATT AACATGGAAG AACTTCAGGC
5901 AGTGCCATA TTTTNTAATA CACCTGAAA AGGTAGACAA GATGTAAGAA
5951 TAGGAAAAGC CAGGCANTCC TAGCAGCTAC AGGCCAGTG TGAGGGANTA
6001 CAGCTTCCAG ACACCTAATC CTGATAGACT CTGGTGTCTG AATAAAAGAG
6051 AGAGGAATCA GCATGTGGTC TTTNTGGGCA GGA-----
6451 ----- ca. 400 Bp ----- --AAAAAATT AAAACTGCTT
6501 TAGTTCTGTT TANCAATAGA TTTCTAAATA AACTGNGCAT ATTCAATTNG
6551 TTAATATCTT CTTTTAAAAA ATATTTCACT TCATGTGTGT GTGTGTGTGT
6601 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT ATGTATGTTT CTTCAGAGGT
6651 CAGAAGGAAG AATAGGATCC CCTGGTGTCT GAGTTCAGGC ATTTGCGAGC
6701 TGCCAAATTC CAGACTTCTG AGAGCAGGGC AGCAAGCACT CTTAACCCCG
6751 AGCCTTTCAT CGCTCCTGCC CCGTTTGTTT ATATCCCTTA AAAATTATGT
6801 GTTTTGTGTT TTCTCCACAG GAAATGGATC CTGAAAATAT TGATGATATA
6851 CAAAGTGATC TCATATTCTT TCAGAAACGT GTTCCAGGAC ACAACAAGAT
6901 GGAGTTTGAA TCTTCACTGT ATGAAGGACA C'TTCT'TGCT TGCCAAAAGG
6951 AAGATGATGC TTTCAAACCTC ATTCTGAAAA AAAAGGATGA AAATGGGGAT
7001 AAATCTGTAA TGTTCACTCT CACTAACTTA CATCAAAGTT AGGTGGGGAG
7051 GGTTTGTGTT CCAGAAAAGAT GATTAGCACA CATGCGCCTT GTGATGACCT
7101 CGCCTGTATT TCCATAACAG AATACCCGAG GCTGCATGAT TTATAGAGTA
7151 AACACGTTTA TTTGTGCGAT GTGTCCAGCC CAATTTCTAC TCCCTGGAGA
7201 ATTGTCTGG ATGCATCACA ACATAGAAGA TAAAAGGAAA GGAATCAGCC
7251 GCATGTGAAT TAGCACATGG ATGAGCCTTA CCCCATAGCA ACTGAGTCTT
7301 GAGAGAGGCA ATAACAGTCT CCGTCACTAA AGCCTGATAT AATTCTATGG
7351 AAAATTTTAA GATAGTGCTC ATAGGGTAGA GGGATGGCTC ACTGGTTAAG
7401 AGCACATGCT ACTCTTCAAG AGGATCAAGT TAGAAAATGA GTTCCACGAT
7451 GGGAGCCTGC GTGCACATGC CCCAGTGAGC CTGTGAAGTC AGCTCTATCC
7501 TCCCACTGTT GTGGGTCCA GGTTTCCAGG AAAACAACT AAGATTCATC
7551 AGGCATAGCA AGCGCTCTTA CCTAAGGAAG TGG

```

Abb. 2: Nukleotidteilsequenz des murinen IL-18 Gens. Die Exonnukleotidsequenzen sind unterstrichen dargestellt. Das Translations-Start- und Stopkodon sind jeweils fett gedruckt. Punktuellen Lücken sind durch N gekennzeichnet.

Durch die Kombination aus Kartierung und Sequenzierung konnte die in Abb. 3 (oben) gezeigte Genkarte erstellt werden. Die hier ermittelte genomische Struktur wurde durch die

später veröffentlichte Arbeit von Tone et al. (Tone et al., 1997) bestätigt. Diese Veröffentlichung war auch die Grundlage zu der in dieser Arbeit verwendeten Nummerierung der Exons.

1.2. Konstruktion eines „Targeting-Vektors“

Mittels Kenntnis der genomischen Struktur des murinen IL-18 Gens, zumindest von Exon 3 bis Exon 7, konnte ein sogenannter „Targeting“-Vektor entworfen werden. Dieser sollte genug homologe Bereiche enthalten, um eine homologe Rekombination mit dem Wildtypallel zu ermöglichen. Durch die Substitution eines Bereiches des IL-18 Gens mit einer für Neomycinresistenz kodierenden Genkassette, in inverser Orientierung zum Gen, sollte die Funktionalität des Gens zerstört werden. Weiterhin sollte die G418-Resistenz vermittelnde Wirkung dieser Genkassette später bei der Positivselektion der transformierten embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) genutzt werden. Hierbei war zu beachten, daß diese Kassette von zwei homologen Bereichen flankiert sein sollte, so daß sie nicht im Zuge der homologen Rekombination eliminiert wird. Von den zwei homologen Bereichen sollte einer, im folgenden als „langer Arm“ bezeichnet, eine Größe von mindestens 3 KB aufweisen, um die homologe Rekombination mit dem IL-18 Gen zu ermöglichen. Der andere Bereich, im folgenden als „kurzer Arm“ bezeichnet, sollte die Größe von 1 KB nicht überschreiten, um die später beschriebene „Screening-PCR“ zu ermöglichen. Ein weiteres Element des „Targeting“-Vektors sollte eine Genkassette sein, welche das für die Thymidinkinase kodierende Gen *tk* aus dem Virus *Herpes simplex* beherbergte. Das Genprodukt macht die Transformanden, welche es inserieren, sensibel für die letale Wirkung von Gancyclovir, das somit zur Negativselektion verwendet werden kann. Die unspezifische Integration des kompletten „Targeting“-Vektorkonstruktes sollte daher, bei Anwesenheit von Gancyclovir, letal für diese transformierten ES-Zellen sein. Bei der gewünschten homologen Rekombination mit dem IL-18 Gen sollte es zur Eliminierung der (nicht homologen) *tk*-Kassette kommen und somit die natürliche Resistenz der ES-Zellen gegen Gancyclovir erhalten bleiben. Zu beachten war hierbei, daß die *tk*-Kassette randständig zum „langen Arm“ positioniert werden sollte, so daß die Eliminierung im Zuge der homologen Rekombination stattfinden konnte. Da bekannterweise die Rekombinationswahrscheinlichkeit eines linearen DNA Stranges um ein vielfaches über der zirkulärer DNA Stränge liegt, mußte der „Targeting“-Vektor eine singuläre Schnittstelle beinhalten. Darum wurde die Klonierungsstrategie so entworfen, daß sich eine, im Endprodukt singuläre NotI Schnittstelle zwischen

C. ERGEBNISSE

„kurzen Arm“ und Vektor befand. Als Trägervektor diente pBlue. Der Aufbau des „Targeting-Vektors“ ist graphisch in Abb. 3 dargestellt. Hier findet sich auch der Bezug zum originären Wildtypallel. Zur Klonierung des „Targeting-Vektors“ wurde zuerst pBlue mit BamHI und EcoRV geöffnet. Aus pBlueNN7,3 wurde ein 3,2 KB großes Fragment unter Verwendung der BamHI Schnittstelle in Exon 7 und der EcoRV Schnittstelle 3,2 KB stromabwärts davon mit den entsprechenden REN's excisiert. Dieses als „langer Arm“ dienende Fragment wurde gereinigt und in den geöffneten pBlue ligiert. Das Produkt war pBlue-LA. Im zweiten Schritt sollte der „kurze Arm“ eingesetzt werden. Zur Generation des als „kurzen Arm“ dienenden DNA Fragments wurde eine PCR mit pBlueλ8 als Template durchgeführt. Die benutzten Primer waren SA-F und SA-R. Die Sequenz des Primers SA-R entspricht der von IGIF-IE-R2,25 und befindet sich mittig in Exon 5 (Abb. 2, Pos. 3008-3029). Allerdings war das 5'-Ende von SA-R im Vergleich zu IGIF-IE-R2,25 um 10 Basen verlängert, in denen sich eine Schnittstelle für BamHI befand. Die Bindungsstelle für SA-F befand sich 850 Bp stromaufwärts davon (Abb. 2, Pos. 2159-2180). Das Amplikon wurde so in den Vektor pGEM-T (welcher eine NotI aber keine eigene BamHI Schnittstelle besitzt) ligiert, daß die SA-F Seite des Amplikons proximal zur NotI Schnittstelle des Vektors lag. Das Produkt war pGEM-T-SA. Mit BamHI und NotI konnte der „kurze Arm“ aus pGEM-T-SA excisiert werden. Dieses Fragment besaß somit am 5'-Ende eine geöffnete NotI, und am 3'-Ende eine geöffnete BamHI Schnittstelle und wurde in den mit NotI und BamHI geöffneten Vektor pBlue-LA ligiert. Das Produkt war pBlue-LA-SA, in dem der „lange Arm“ und „kurze Arm“, durch eine BamHI Schnittstelle getrennt, aneinander lagen. Der nächste Schritt sollte die Einbringung der Neomycinresistenz kodierenden Genkassette sein. Die Quelle hierfür war das Plasmid pBlue-Neo, das von Klaus Pfeffer zur Verfügung gestellt wurde. In dem Plasmid pBlue-Neo war nach Informationen von Klaus Pfeffer die Genkassette des Plasmids pMC1-NEOpoly(A) so inseriert worden, daß sie von zwei BamHI Schnittstellen flankiert war. Durch den Verdau des Plasmids pBlue-Neo mit BamHI konnte somit die Neomycinresistenz kodierende Genkassette excisiert werden. Nach der Öffnung des Plasmids pBlue-LA-SA mit BamHI wurde die so vorbereitete Genkassette inseriert. Die Orientierung der Neomycinresistenz kodierenden Kassette war invers zu jener der beiden „Arme“. Das Produkt war pBlue-LA-SA-Neo. Als letzter Schritt wurde nun die *tk*-Kassette zwischen „langen Arm“ und Vektor in pBlue-LA-SA-Neo inseriert. Hierzu wurde die an dieser Stelle liegende und in diesem Plasmid singuläre KpnI Schnittstelle verwendet. Die *tk*-Kassette

C. ERGEBNISSE

wurde durch einen KpnI Verdau eines Plasmids von Evi Schaller und Klaus Pfeffer gewonnen. Die ursprüngliche Herkunft dieser Kassette war das Plasmid pGEM7-TK.

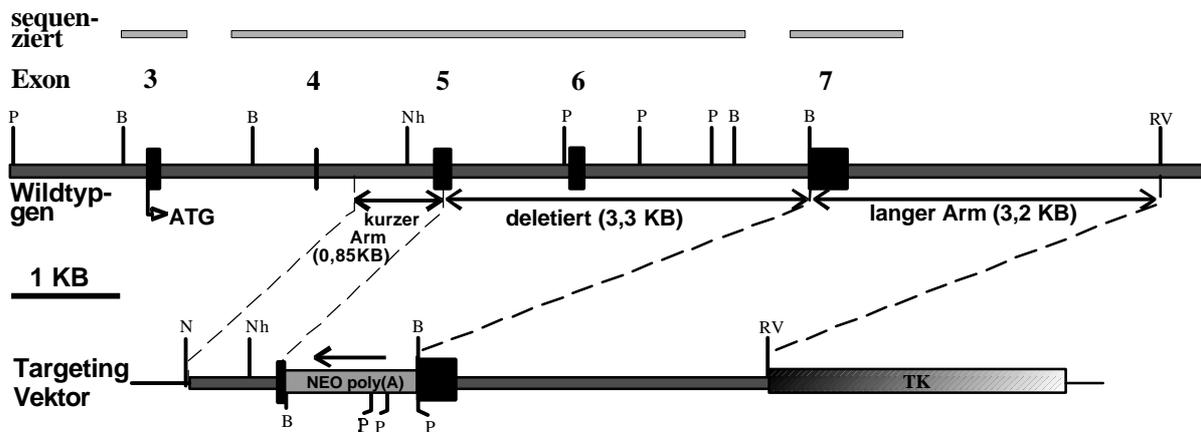


Abb. 3: Graphische Darstellung des murinen IL-18 Genlokus und des daraus entwickelten „Targeting-Vektors“. Der sequenzierte Bereich (die Sequenz ist in Abb. 2 gezeigt) ist entsprechend gekennzeichnet. Die dünnen Striche unten markieren Vektorsequenzen. Die Restriktionsschnittstellen sind wie folgt abgekürzt: B, BamHI; N, NotI; Nh, NheI; P, PstI; RV, EcoRV. Die Lage des Startkodons ist durch ATG gekennzeichnet. Die Neomycinresistenz kodierende Genkassette ist durch NEO poly(A) gekennzeichnet, wobei der Pfeil die Orientierung angibt. Die tk-Genkassette ist durch TK gekennzeichnet.

Nach Amplifikation des „Targeting-Vektors“ wurde eine große Plasmidpräparation mit einer Ausbeute von 1 mg durchgeführt. Aus dieser Präparation wurden Aliquots entnommen und zur Kontrollsequenzierung verwendet. Diese erbrachte die Korrektheit des Konstruktes. Anschließend wurden je 200 µg Plasmid mit NotI linearisiert und anschließend Ethanol präzipitiert, getrocknet und in PBS wieder aufgelöst.

1.3. Homologe Rekombination in embryonalen Stammzellen

Um das IL-18 Wildtypgen zu zerstören, mußte eine homologe Rekombination mit dem „Targeting-Vektor“ stattfinden. ES-Zellen männlichen Ursprunges des genetischen Hintergrundes 129/SvJ wurden daher mit dem linearisierten „Targeting-Vektor“ transformiert. Hierzu wurden 5×10^7 ES-Zellen mit 200 µg Vektor vermischt und bei folgenden Bedingungen elektroporiert: 340 V, 200 Ω, 250 µF. Die elektroporierten Zellen wurden ausplattiert und unter Doppelsektion mit G418 und Gancyclovir gesetzt. Nach 11 Tagen konnten 55 doppelt resistente Klone gepickt und in eine 96-Well Platte vereinzelt werden. Nachdem die Klone ausreichend proliferiert hatten, wurde ein Teil der Zellen in Wells einer 48-Well Platte überführt. Die restlichen Zellen in der 96-Well Platte wurden nochmals vermehrt und dann direkt in der sogenannten „Screening-PCR“ getestet. Die Zellen wurden in einem Hitzeschritt aufgeschlossen und anschließend 1 Std. mit Proteinase K behandelt. Somit

C. ERGEBNISSE

sollte genügend chromosomale DNS freigesetzt worden sein, um als Template in der folgenden „Screening-PCR“ zu fungieren. Die Primer wurden so gewählt, daß nur bei korrekt erfolgter homologer Rekombination, zumindest des „kurzen Armes“, ein Amplikon entstehen sollte. Der Vorwärtsprimer IGIF-KOF (Abb. 2, Pos. 1935-1955) sollte etwas in 5'-Richtung des „kurzen Armes“ und somit außerhalb des „Targeting-Vektor“ Konstruktes binden. Der Rückwärtsprimer NEO1500 sollte im homolog rekombinierten und somit mutierten Allel ca. 1,2 KB in 3'-Richtung von IGIF-KOF, in der Neomyciresistenz kodierenden Genkassette, binden. Die Lage der Primer ist in Abb. 4 dargestellt. Die PCR wurde in einer 96-Well Platte mit 2,0 mM MgCl₂ und einer Annealingtemperatur von 63°C durchgeführt. Das PCR Produkt wurden anschließend in einem Agarosegel elektrophoretisch analysiert. Die Ethidiumbromidfärbung des Gels war zu unsensitiv, um entstandene Amplikons zu visualisieren. Deshalb wurde ein Kapillarblot auf eine Nylonmembran angeschlossen. Diese Membran wurde dann mit einem radioaktiv markierten DNS Fragment, das den „kurzen Arm“ repräsentierte, hybridisiert und exponiert. Als das den „kurzen Arm“ repräsentierende DNS Fragment wurde das mit BamHI und NotI excisierte Fragment aus pGEM-T-SA verwendet. Aus den getesteten 55 Klonen ergaben fünf ein positives Signal in der beschriebenen Hybridisierung, nämlich Klon 23, 26, 35, 40 und 41. Diese fünf Klone wurden aus der 48-Well Platte weiter amplifiziert. Die restlichen Klone wurden verworfen. Zur Verifikation des Ergebnisses aus der „Screening-PCR“ sollte im Anschluß eine Analyse mittels „genomischem Southern Blotting“ durchgeführt werden. Hierzu sollte die chromosomale DNS mit einer REN verdaut werden, elektrophoretisch über ein Agarosegel aufgetrennt werden und anschließend mit einer entsprechenden, radioaktiv markierten Gensonde aus dem IL-18 Gen hybridisiert werden. Zwei Möglichkeiten zur Verifikation der Allelkonfiguration wurden ausgewählt. Zum einen ein Verdau mit PstI und anschließender Hybridisierung mit Sonde 1, zum anderen ein Verdau mit BamHI und anschließender Hybridisierung mit Sonde 2. Aufgrund der veränderten Lage der Schnittstellen der beiden REN, sollten verschieden große Fragmente des Wildtyp- bzw. mutierten Allels mit den Sonden hybridisieren. Graphisch dargestellt finden sich beide Strategien mit Lokalisation der Sonden und erwarteten Fragmentgrößen in Abb. 3. Als Sonde 1 diente ein ca. 560 Bp großes, das Exon 3 enthaltende, BamHI (Abb. 2, Pos. 1)-XbaI (Abb.2, Pos. 565)-Fragment. Als Sonde 2 diente ein ca. 500 Bp großes, das Exon 4 enthaltende, AccI (Abb.2, Pos. 1701)-BglII (Abb.2, Pos. 2212)-Fragment. Beide Fragmente wurden aus pBluePN3,5 excisiert und subkloniert, bevor sie als Sonden eingesetzt wurden.

C. ERGEBNISSE

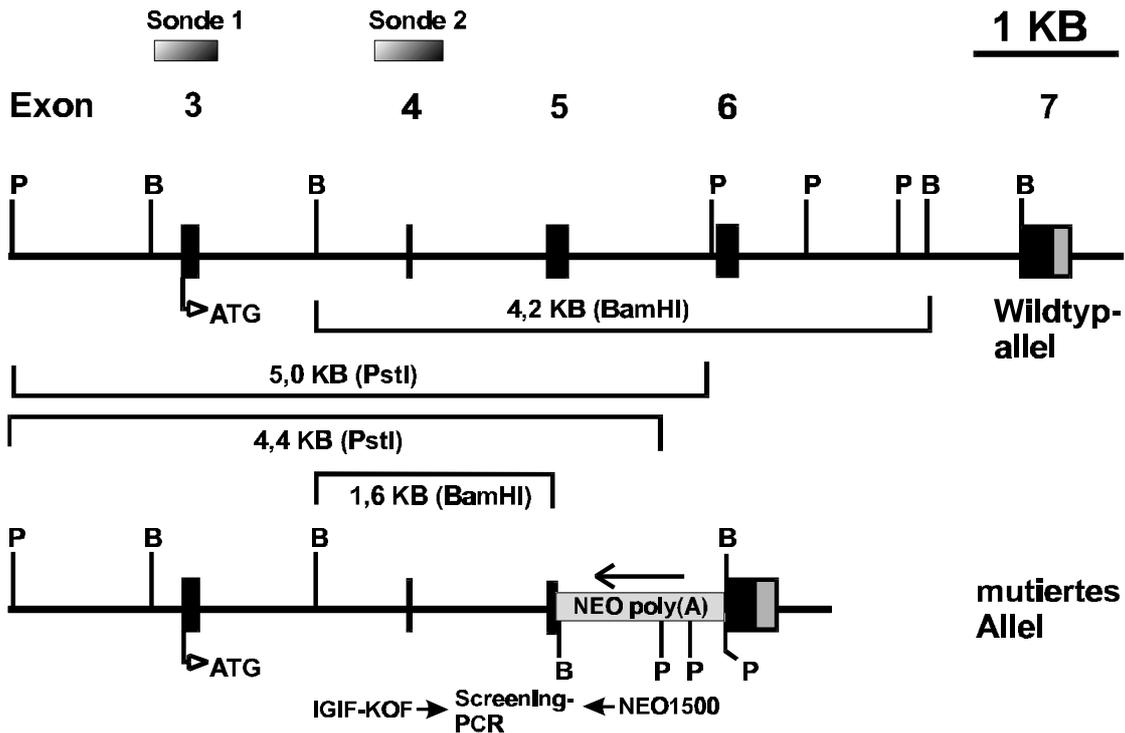


Abb. 4: Graphische Darstellung des Wildtyp IL-18-Genlokus und des mutierten Allels nach homologer Rekombination mit dem „Targeting-Vektor“. Die entstehenden DNS-Fragmente nach Verdau mit PstI oder BamHI sind entsprechend gekennzeichnet. Die Lage der Sonden, die mit diesen Fragmenten hybridisieren, ist entsprechend gekennzeichnet. Unten ist das in der „Screening-PCR“ amplifizierte Fragment mit Lage der Primer IGIF-KOF und NEO1500 dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind wie folgt abgekürzt: B, BamHI; P, PstI. Die Lage des Startkodons ist durch ATG gekennzeichnet. Die Neomycinresistenz kodierende Genkassette ist durch NEO poly(A) gekennzeichnet, wobei der Pfeil die Orientierung angibt.

Durch Anwendung beider Strategien konnten nur Klon Nr. 26 und 41 als erfolgreich homolog rekombiniert verifiziert werden. Beide zeigten einen heterozygoten Genotyp, da die homologe Rekombination, wie erwartet nur auf einem Allel stattfand.

1.4. Entwicklung eines IL-18 defizienten Mausstammes aus mutierten ES-Zellen

Um die, wie unter C.1.3. beschrieben generierten, mutierten ES-Zellen zu Mäusen zu entwickeln, wurde eine Injektion der ES-Zellen des Klons Nr. 26 in Blastozysten aus C57BL/6 Mäusen vorgenommen. Danach erfolgte der Transfer dieser injizierten Blastozysten in scheinchwangere Ammenmütter des Stammes CD1 (siehe auch B.7.2.). Das Resultat waren Mäuse, deren Chimärismus sich aus 129/SvJ (ES-Zellen, Fellfarbe Agouti) und C57BL/6 (Blastozysten, Fellfarbe Schwarz) zusammensetzte und somit über die Verteilung der Fellfarbenanteile abgeschätzt werden konnte. Alle chimären Mäuse wurden einer sogenannten Testverpaarung mit je einer C57BL/6 Maus unterzogen. Die erwünschte Keimbahntransmission der 129/SvJ-ES-Zellen war an der kompletten Agoutifärbung der

C. ERGEBNISSE

Nachwuchsmaus zu erkennen, da die Fellfarbe Agouti (129/SvJ) dominant gegenüber der Fellfarbe Schwarz (C57BL/6) ist. Es zeigte sich, daß ausschließlich Chimären männlichen Geschlechts mit einem Agoutifellfarbenanteil von 90% oder mehr in der Lage waren, 129/SvJ Zellen via Keimbahn zu transmittieren. Von insgesamt 23 Nachkommen, die durch ihre Agoutifärbung Keimbahntransmission der ES-Zellen anzeigten, trugen 11 das mutierte Allel, wie mittels genomischem Southern Blotting ermittelt wurde. Dies entspricht in etwa der erwarteten Rate von 50%. Um homozygote IL-18 defiziente Mäuse zu erhalten, wurden die 11, das mutierte Allel in heterozygoter Ausführung tragende Mäuse untereinander verpaart. Das war die Gründerkolonie für den IL-18 defizienten Mausstamm. Die Analyse der Nachkommen erfolgte durch Anwendung der oben beschriebenen „genomischen Southern Blot“ Analysen. Die hierzu benötigte chromosomale DNS wurde aus einem kleinen Schwanzstück gewonnen.

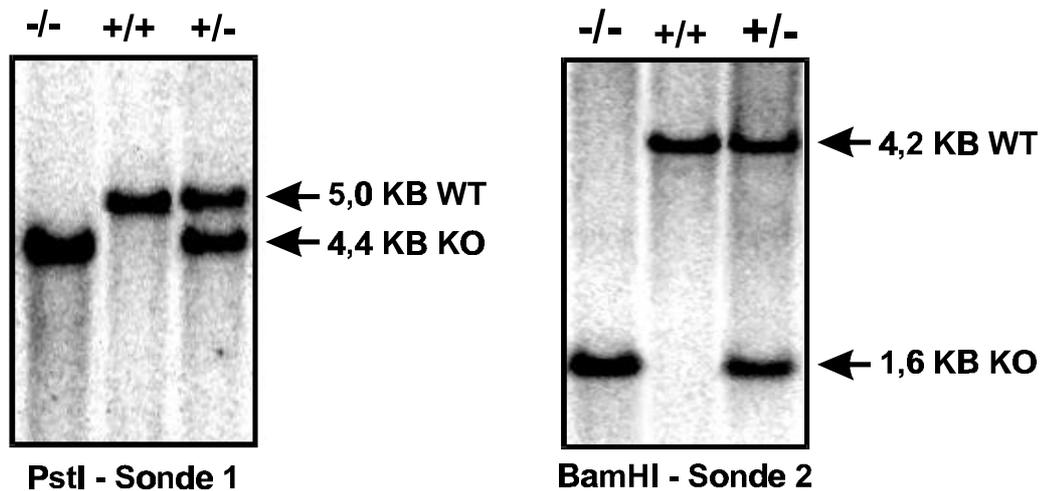


Abb. 5: „Genomische Southern Blot“ Analyse der Nachkommen der Verpaarung von Mäusen, welche die Mutation heterozygot im IL-18 Gen trugen. Alle drei möglichen Genotypen (+/+ : homozygot Wildtyp; +/- : heterozygot für das mutierte Allel; -/- : homozygot für das mutierte Allel) sind dargestellt. Die jeweilige Strategie ist durch das verwendete Restriktionsenzym und die korrespondierende Gensonde entsprechend gekennzeichnet.

C. ERGEBNISSE

In der folgenden Züchtung, die durch Verpaarung von heterozygoten Mäusen durchgeführt wurde, ergab sich folgende Statistik:

Genotyp	+ / +	+ / -	- / -
Anzahl	45	104	62
in Prozent	21,3 %	49,3 %	29,4 %
erwartet nach Mendel	25 %	50 %	25 %

Tab. 6: Brutstatistik der Verpaarung von Mäusen, die heterozygot das mutierte IL-18 Gen tragen. Abkürzungen: +/+, homozygot Wildtyp; +/-, heterozygot für das mutierte Allel; -/-, homozygot für das mutierte Allel (IL-18 defizient).

Aus dieser Statistik geht hervor, daß die Weitergabe des mutierten IL-18 Allels den Vererbungsgesetzen nach Mendel folgt. Daraus kann gefolgert werden, daß IL-18 Defizienz keine entscheidende Auswirkung auf die Entstehung und Entwicklung von Mausembryonen hat.

Die weitere Züchtung erfolgte durch Verpaarung von, für das mutierte IL-18 Allel homozygoten Mäusen (IL-18 defiziente Mäuse, IL-18KO-Mäuse). Parallel hierzu wurden Mäuse, die zwei Wildtypallele trugen, verpaart (IL-18 Wildtyp Mäuse, IL-18WT-Mäuse). Diese dienten in allen durchgeführten Experimenten als Kontrollmäuse (Wildtypkontrollen), da sie denselben Ursprung wie IL-18KO Mäuse, nämlich ES-Zellklon Nr. 26, hatten, und somit bis auf die IL-18 Mutation syngen zu IL-18KO Mäusen sein sollten. Diese Art der Kontrollen war wichtig, da der genetische Hintergrund dieser Mäuse, aufgrund der beschriebenen Entstehungshistorie, aus einer Mischung zu gleichen Teilen der genetischen Hintergründe 129/SvJ und C57BL/6 besteht.

2. Analyse des Interleukin-18 defizienten Mausstammes

Zur Verifikation der IL-18 Defizienz in den wie unter C.1. generierten Mäusen, wurde der IL-18-mRNS Gehalt von Lebern dieser Mäuse überprüft. Hierzu wurden von je zwei unbehandelten IL-18WT und IL-18KO Mäusen die Lebern entnommen. Mit dem Gewebe wurde eine total-RNS Präparation durchgeführt. Diese RNS wurde im sogenannten „RNase Protection Assay“ (RPA) (20 µg pro Maus) eingesetzt.

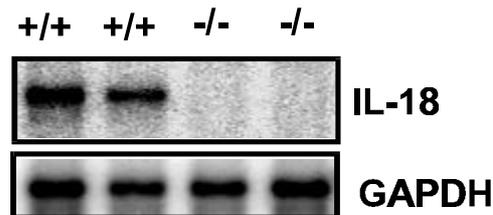


Abb. 6: RNase Protection Assay aus total RNA von Lebern unbehandelter Mäuse. Als Ladekontrolle ist mRNA der Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) gezeigt. IL-18 markiert das durch IL-18 mRNA verursachte Signal. IL-18WT Mäuse sind durch +/+, IL-18KO Mäuse durch -/- gekennzeichnet.

Wie aus Abbildung 6 hervor geht, ist keine mRNA für IL-18 in IL-18KO-Mäusen nachzuweisen. Somit ist sicher gestellt, daß die wie unter C.1. beschrieben eingeführte Mutation die Funktionalität des IL-18 Gens zerstörte.

2.1. Allgemeine Phänotypanalyse der IL-18KO Mäuse

2.1.1. Fertilität und Entwicklung

Unter speziellen Pathogen freien (SPF) Bedingungen war eine völlig normale Fertilität der IL-18KO Mäuse zu beobachten. Über einen Beobachtungszeitraum von 11 Monaten erbrachten Zuchtpaare bestehend aus IL-18WT Mäusen im Durchschnitt 7,9 Nachkommen pro Brutpaar und Monat, Zuchtpaare bestehend aus IL-18KO Mäusen 4,5 Nachkommen pro Brutpaar und Monat. Dieser Unterschied ist auf den relativ kurzen Beobachtungszeitraum und die relativ kleine Anzahl von Brutpaaren (maximal drei pro Gruppe) zurück zu führen und somit ohne Bedeutung.

Zur Überprüfung eventuell auftretender Entwicklungsschäden wurden je zwei männliche und zwei weibliche IL-18WT und IL-18KO Mäuse über einen Zeitraum von ca. 70 Wochen

beobachtet. Hierbei war keinerlei Unterschied in der Entwicklung oder dem Verhalten zwischen IL-18WT- und IL-18KO Mäusen feststellbar. Nach diesem Zeitraum wurden die Mäuse getötet.

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß IL-18 weder bei Ausprägung der Fertilität noch bei der generellen Entwicklung der Maus eine Rolle spielt.

2.1.2. Anatomie und Histologie

Jeweils eine weibliche und eine männliche IL-18WT und IL-18KO Maus wurden getötet und parallel anatomisch untersucht. Hierbei wurde im speziellen die Ausprägung aller lymphoiden Organe, wie Thymus, Milz, Lymphknoten und Peyer'sche Plaques begutachtet. Weiterhin wurde die Anatomie des ganzen Tieres, d.h. Skelettaufbau und Organbeschaffenheit, optisch begutachtet. Es konnte keinerlei Veränderung in der Anatomie von IL-18KO Mäusen im Vergleich zu Wildtypkontrollen festgestellt werden. Hieraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß IL-18 keine tragende Rolle bei der generellen Entwicklung der Maus spielt.

Eine histologische Begutachtung wurde von Thymus, Milz und mesenterialen Lymphknoten durchgeführt. Hierzu wurden diese Organe aus je einer weiblichen und einer männlichen IL-18WT und IL-18KO Maus entnommen. Nach der Anfertigung von Schnitten wurden diese mit Hämatoxylin-Eosin (HE) angefärbt. Der Thymus von IL-18KO Mäusen zeigte im Bezug auf Formation des Kortex und der Medulla eine normale Architektur, verglichen mit einem Thymus einer IL-18WT Maus. Die Milz von IL-18KO Mäusen zeigte im Bezug auf Formation der weißen und roten Pulpa, der Marginalzone und Keimzentren eine normale Architektur, verglichen mit der Milz einer IL-18WT-Maus. Die mesenterialen Lymphknoten von IL-18KO Mäusen zeigte im Bezug auf Formation der lymphatischen Follikel und der Keimzentren eine normale Architektur, verglichen mit mesenterialen Lymphknoten einer IL-18WT Maus.

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß IL-18 keine Rolle bei der Entwicklung von Thymus, Milz oder mesenterialen Lymphknoten spielt.

2.1.3. Lymphozytenverteilung in lymphoiden Organen

Von je einer weiblichen und einer männlichen IL-18WT und IL-18KO Maus, jeweils unbehandelt, wurden Thymus, Milz und mesenteriale Lymphknoten entnommen. Nach Überführung der Organe zur Einzelzellsuspension erfolgte eine Erythrozytenlyse. Die so gewon-

C. ERGEBNISSE

nenen Zellpräparation wurde mittels Durchflußzytometrie analysiert. Hierzu wurde mittels spezifischer, markierter Antikörper die Oberflächenantigene CD3 (T-Zellen), CD4 (T-Helfer-Zellen), CD8 (T-Killer-Zellen), B220 (B-Zellen), Mac1 (Monozyten/Makrophagen), F4/80 (aktivierte Makrophagen) und GR1 (Granulozyten) gefärbt. Desweiteren wurde zur Anfärbung von NK-Zellen der PanNK Antikörper Dx5 verwendet. Die vergleichende Analyse zwischen IL-18WT- und IL-18KO Mäuse ergab keinerlei Unterschiede in der Verteilung der erwähnten Lymphozyten in den aufgeführten lymphoiden Organen.

Obwohl der Anteil der T-Zellen in den IL-18KO Mäusen normal erschien, zeigte sich bei diesen Mäusen in der Expressionsintensität von CD3 eine ca. 30%ige Reduktion, verglichen mit IL-18WT Mäusen. Dieses Phänomen trat in allen untersuchten Organen in der gleichen Größenordnung auf.

	Thymus	Milz	mesenteriale Lymphknoten
+ / +	20,0	16,7	35,9
- / -	15,3	11,3	22,1

Tab. 7: Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten nach Färbung des Oberflächenantigens CD3 in verschiedenen Organen. IL-18WT Mäuse sind als +/+, IL-18KO Mäuse als -/- gekennzeichnet.

Die in Tabelle 7 gezeigten Werte wurden unter Verwendung je einer Maus generiert. Sie sind repräsentativ, da ein zweiter Ansatz mit anderen Mäusen nahezu identische Werte liefert.

2.1.4. Funktionsanalyse der T-Zellen aus IL-18KO-Mäusen

Durch die in C.2.1.3. gezeigte, verminderte CD3 Expressionsintensität auf T-Zellen aus IL-18KO Mäusen entstand die Fragestellung nach einer generellen Funktionsreduktion dieser T-Zellen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden mesenteriale Lymphknoten je einer unbehandelten IL-18WT und IL-18KO Maus geerntet und zur Einzelzellsuspension überführt. Ohne weitere Anreinigung wurden diese Zellen in Wells einer 96-Well U-Bodenplatte überführt. Deren Böden waren zuvor mit anti-Hamster-IgG Antikörpern beschichtet worden, so daß die nachfolgend zugegebenen Antikörper gerichtet immobilisiert werden sollten und somit die notwendige Kreuzvernetzungseffizienz gegeben war. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch Kreuzvernetzung der CD3-Rezeptoren mittels Hamster-anti-Maus-CD3 Antikörpern (1 µg/ml). Zusätzlich wurden die Zellen entweder durch Zugabe von 10 U/ml Interleukin-2 (IL-2) oder Hamster-anti-Maus-CD28 Antikörpern (1 µg/ml), die zur Kreuzvernetzung der CD28-Rezeptoren führen sollten, kostimuliert. Die Reaktion der Zellen

C. ERGEBNISSE

wurde durch Messung der Proliferation (mittels ^3H -Thymidininkorporation) oder der IL-2 Produktion in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl bestimmt.

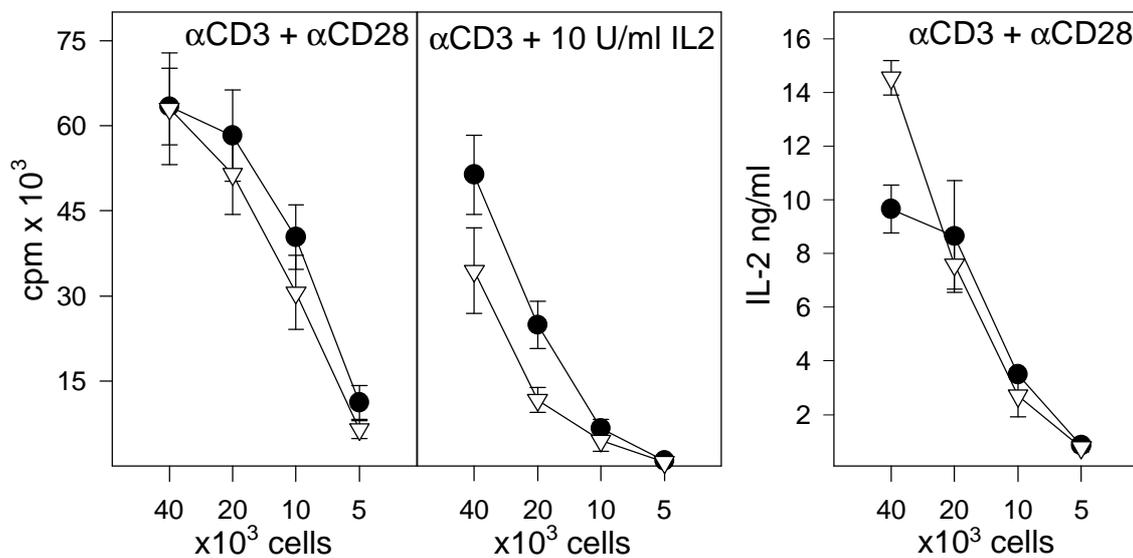


Abb. 7: Darstellung der Reaktion von Zellen aus mesenterialen Lymphknoten von IL-18WT (●) bzw. von IL-18KO (▽) Mäusen nach Stimulation mittels CD3-Kreuzvernetzung, kombiniert mit IL-2 Zugabe oder CD28-Kreuzvernetzung. Die verwendeten Stimulationen sind entsprechend vermerkt. Die linken zwei Graphen zeigen die Proliferation, ausgedrückt durch inkorporierte ^3H -Thymidinmenge in „counts per minute“ (cpm), der rechte Graph zeigt die IL-2 Produktion, jeweils in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl.

Im Sinne von Proliferation als auch IL-2 Produktion ist kein signifikanter Unterschied zwischen Zellen aus mesenterialen Lymphknoten von IL-18WT und IL-18KO Mäusen festzustellen. Trotz der in C.2.1.3. beschriebenen Erniedrigung der Expressionsintensität von CD3 auf T-Zellen scheinen, zumindest bei der hier gezeigten *in vitro* Analyse, diese T-Zellen keinerlei Defizienzen in der Reaktion nach Stimulation über CD3-Kreuzvernetzung aufzuweisen.

2.1.5. Funktionsanalyse der natürlichen Killerzellen aus IL-18KO Mäusen

Takeda et al. beschrieb in seiner Studie an von ihm generierten IL-18KO-Mäusen einen Defekt dieser Mäuse im Bezug auf die lytische Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Takeda et al., 1998). In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß frisch gewonnene Milzzellen aus unbehandelten IL-18KO Mäusen eine signifikant erniedrigte lytische Aktivität gegen YAC1 Zellen aufweisen, verglichen mit Milzzellen aus IL-18WT Mäusen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden entsprechende Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die Milz aus je einer IL-18WT und IL-18KO Maus entnommen und zur Einzelzellsuspension überführt. Die Elimination von Erythrozyten erfolgte entweder durch Lyse mit NH_4Cl oder

C. ERGEBNISSE

durch Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung von Ficoll der Dichte 1,09 g/ml. Beide Ansätze wurden gewählt, da die Möglichkeit besteht, daß NK-Zellen bei Kontakt mit NH_4Cl ihre Granula verlieren und somit an Funktionalität einbüßen. Die so gewonnenen Zellen wurden als Effektorzellen in einem ^{51}Cr -Freisetzungssassay gegen YAC1 Zellen eingesetzt. Hierbei zeigte sich, selbst bei einem Effektor/Zielzellverhältnis von 200/1, keinerlei lytische Aktivität, weder von Zellen aus IL-18WT noch von Zellen aus IL-18KO Mäusen, gegen YAC1 Zellen. Somit waren die Resultate von Takeda et al. nicht reproduzierbar.

Die restlichen, nicht im ^{51}Cr -Freisetzungssassay eingesetzten Zellen, wurden daraufhin in Kultur genommen. Die Zellen aus der Präparation, bei der NH_4Cl verwendet wurde, wurden auch weiterhin getrennt von den Zellen gehalten, bei deren Präparation die Dichtegradientenzentrifugation Einsatz fand. Es ist bekannt, daß hohe Dosen von IL-2 zur Generierung von sogenannten „Lymphokin aktivierte Killerzellen“ („lymphokine activated killer“, LAK) führen. Diese Zellen werden im allgemeinen als *in vitro* stimulierte NK-Zellen angesehen. Deshalb wurde den Kulturen 500 U/ml IL-2 zugesetzt und selbige für 48 h inkubiert. Die resultierenden Zellen wurden abermals in einem ^{51}Cr -Freisetzungssassay eingesetzt, bei dem markierte YAC1 Zellen als Zielzellen fungierten.

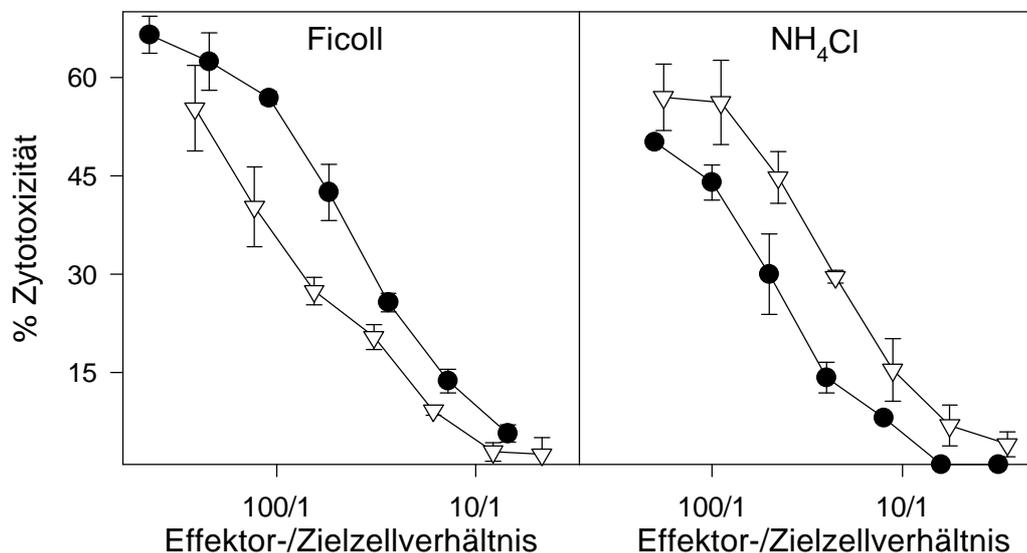


Abb. 8: Darstellung der Zytotoxizität von LAK-Zellen aus IL-18WT- (●) bzw. aus IL-18KO- (▽) Mäusen. Die Art der Zellpräparation, mit NH_4Cl oder Ficoll, ist in den Graphen vermerkt. Die Auftragung des Effektor-/Zielzellverhältnisses ist logarithmisch.

Im Gegensatz zu den Zellen, welche *ex vivo* verwendet wurden, zeigen diese *in vitro* generierten LAK-Zellen eine gute zytotoxische Aktivität gegen YAC1 Zellen. Die Zyto-

toxizität ist unabhängig von der Art der Präparation, d.h. ob die Elimination der Erythrozyten mittels NH_4Cl oder Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt wurde. Des weiteren bleibt festzuhalten, daß aus IL-18KO Mäusen LAK-Zellen generiert werden können, die keinerlei Einschränkungen in der Zytotoxizität gegen YAC-1 Zellen aufweisen.

2.2. Lipopolysaccharid-Schockmodelle in IL-18 defizienten Mäusen

Wie in der Einleitung beschrieben, wurde IL-18 in einem Modell des letalen Zytokinschocks entdeckt (Okamura et al., 1995a; Okamura et al., 1995b). Aus diesem Grund war es von Interesse, die Reaktion von IL-18KO-Mäusen in verschiedenen LPS-Schockmodellen zu untersuchen. Hierbei sollte die Rolle von IL-18 bei der Vermittlung von Sensitivität gegenüber den letalen Effekten von LPS näher untersucht werden.

2.2.1. „Low dose“ LPS-Schockmodell

Bei diesem LPS-Schockmodell wird D-Galaktosamin (D-GalN) gemeinsam mit LPS verabreicht. D-GalN ist bekannt dafür, einen transkriptionellen Arrest in Hepatozyten zu verursachen. Dadurch werden diese Zellen sehr empfindlich gegenüber Tumor Nekrose Faktor (TNF) vermittelte Apoptose. Hierbei reichen Serumspiegel von ca. 0,5 ng/ml TNF aus, um Letalität innerhalb von 8 – 12 h zu verursachen (Galanos et al., 1979; Leist et al., 1994; Wendel, 1991). Jeweils fünf IL-18WT und IL-18KO Mäuse wurden 20 mg D-GalN und 2 µg LPS pro Maus intraperitoneal (i.p.) injiziert. Anschließend wurden die Tiere bezüglich auftretender Letalität beobachtet.

C. ERGEBNISSE

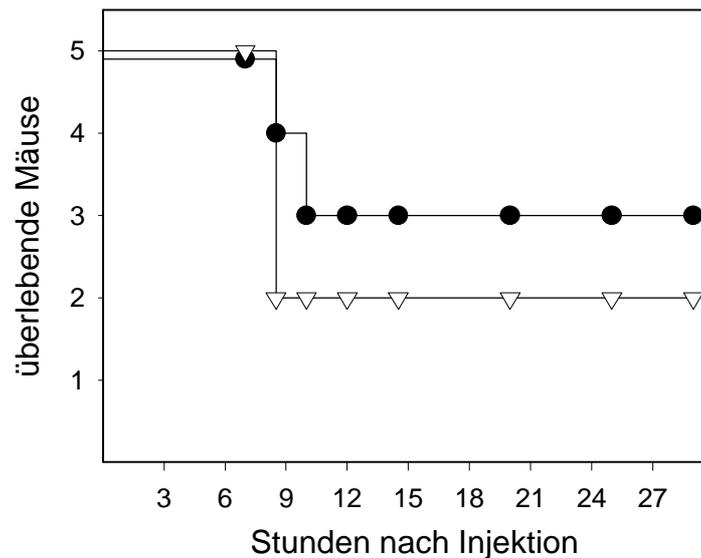


Abb. 9: „Low dose“ LPS-Schock. Darstellung der Letalität von IL-18WT (●) und IL-18KO (∇) Mäusen, verursacht durch die intraperitoneale Injektion von 20 mg D-GalN zusammen mit 2µg LPS.

Wie aus Abbildung 9 hervor geht, zeigen IL-18KO Mäuse im „low dose“ LPS-Schockmodell eine normale Sensitivität gegenüber den letalen Effekten von LPS, verglichen mit IL-18WT Mäusen. Da dieses Schockmodell jedoch ausschließlich von der Produktion von TNF abhängt, läßt sich aufgrund der hier gezeigten Resultate keine Aussage bezüglich der Rolle von IL-18 bei Vermittlung von Sensitivität gegenüber den letalen Effekten von LPS treffen.

2.2.2. „High dose“ LPS-Schockmodell

Dieses LPS-Schockmodell ist von seiner Funktionalität ungleich komplexer als das unter C.2.2.1. beschriebene „low dose“ LPS-Schockmodell. Durch die Applikation von sehr hohen LPS-Dosen (mehrere 100 µg) kommt es zur systemischen Inflammation. Diese ist gekennzeichnet durch relativ hohe Serumspiegel von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF, IL-12, IL-1, IL-6 und anderen. Durch bisher immer noch im Detail ungeklärte Mechanismen führt diese systemische Inflammation letztendlich zum Tod. Um die Rolle von IL-18 in diesem Modell zu untersuchen, wurden je sechs IL-18WT und IL-18KO Mäuse mit aufsteigenden LPS Mengen i.p. injiziert. Die niedrigste Dosis war 500 µg und wurde in Schritten von 100 µg bis auf 1000 µg gesteigert. Anschließend wurde die auftretende Letalität beobachtet.

C. ERGEBNISSE

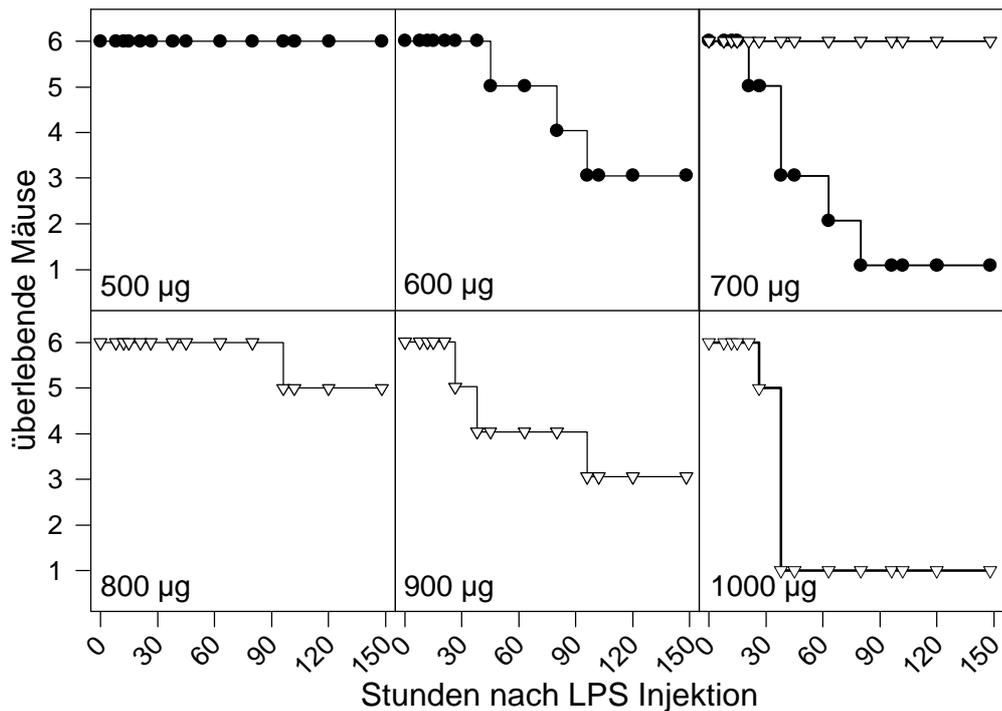


Abb. 10: „High dose“ LPS-Schock. Darstellung der Letalität von IL-18WT (●) und IL-18KO (▽) Mäusen, verursacht durch die i.p. Injektion von verschiedenen LPS Dosen wie angegeben. Für die Dosen größer 700 µg wurden keine IL-18WT Mäuse, für die Dosen kleiner 700 µg keine IL-18KO Mäuse mitgeführt, da das Ergebnis der Dosis 700 µg dies überflüssig erscheinen ließ.

Überraschenderweise zeigten die IL-18KO Mäuse eine deutlich erhöhte LPS-Resistenz, verglichen mit Wildtypkontrollen. Die geschätzte LD₅₀ für IL-18WT Mäuse betrug ca. 600 µg, für IL-18KO Mäuse hingegen ca. 900 µg. Nahezu 100%ige Letalität konnte in IL-18WT Mäusen mit 700 µg LPS, in IL-18KO-Mäusen jedoch erst mit 1000 µg erreicht werden (siehe Abb. 10). Somit weisen IL-18KO Mäuse eine um ca. 50% erhöhte Resistenz gegenüber den letalen Effekten von LPS auf.

2.2.3. LPS induziertes Zytokinprofil in Abhängigkeit von IL-18

Um die erhöhte LPS-Resistenz von IL-18KO Mäusen näher zu untersuchen, wurden durch LPS induzierte Zytokine analysiert. Hierzu wurden je zwei IL-18KO und IL-18WT Mäuse pro Zeitspanne mit der für beide Gruppen subletalen Dosis von 500 µg LPS behandelt. Verschiedene Zeitpunkte nach der i.p. Injektion wurden die Milzen geerntet und daraus die total RNS präpariert. Mit je 10 µg davon wurde ein RPA durchgeführt. Ein Vergleich der induzierten Zytokine auf mRNA Ebene zwischen IL-18WT und IL-18KO Mäusen eine halbe, eine, zwei, drei und fünf Stunden nach LPS Injektion ergab keinerlei Unterschiede für Interleukin-1α (IL-1α), Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA),

C. ERGEBNISSE

Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-12p35 (IL-12p35), Interleukin-12p40 (IL-12p40) und Tumor Nekrose Faktor (TNF). Die normale Induktion von TNF-mRNS eine Stunde nach LPS-Administration in IL-18KO Mäusen ist in Abbildung 11 gezeigt. Ein deutlicher Unterschied ergab sich jedoch bei der Analyse der Induktion von IFN- γ -mRNS. IL-18KO Mäuse zeigten keinerlei, bzw. unter der Detektionsgrenze liegende, Induktion von IFN- γ -mRNS. Da 1000 μ g LPS 100%ige Letalität auch in IL-18KO Mäusen verursachen, wurde mit dieser Dosis die Induktion von IFN- γ -mRNS überprüft. Aber auch mit dieser letalen LPS Dosis war keine Induktion von IFN- γ -mRNS detektierbar. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Hier ist die IFN- γ -mRNS Induktion 5 Stunden nach LPS Administration gezeigt.

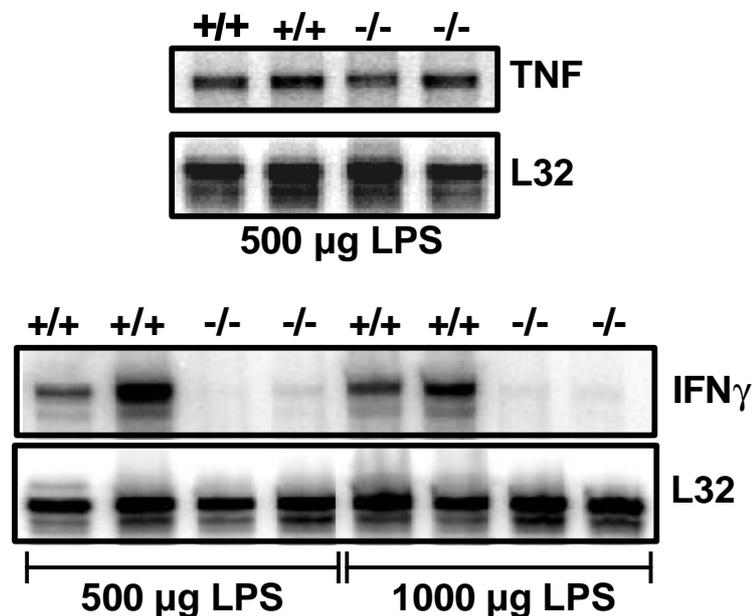


Abb. 11: Induktion von TNF und IFN γ -mRNS in IL-18WT (+/+) und IL-18KO (-/-) Mäusen. Je zwei Mäuse wurden mit den angegebenen Mengen LPS i.p. injiziert. Eine Stunde (TNF) oder fünf Stunden (IFN γ) nach Injektion wurden mittels RPA die entsprechenden Zytokin-mRNS Induktionen in der Milz analysiert. L32 („housekeeping Gen“) stellt den internen Standard dar und diente als Ladekontrolle.

Als nächstes wurden die korrespondierenden Zytokinserumwerte für TNF, IL-12 ((p40)₂+p70), IL-18 und IFN- γ ermittelt. Hierzu wurde identisch verfahren, wie oben beschrieben. Lediglich die Mauszahlen pro Zeitpunkt variierten. Für die Kinetiken von TNF und IL-18 wurden drei, für IL-12 ((p40)₂+p70) ein bis zwei und für IFN- γ eine Maus pro Zeitpunkt und Genotyp (IL-18WT bzw. IL-18KO) verwendet. Verschiedene Zeitpunkte nach der LPS-Injektion wurden

C. ERGEBNISSE

die Mäuse getötet und das Serum geerntet. Die Zytokinkonzentrationen in den Seren wurden mittels ELISA bestimmt.

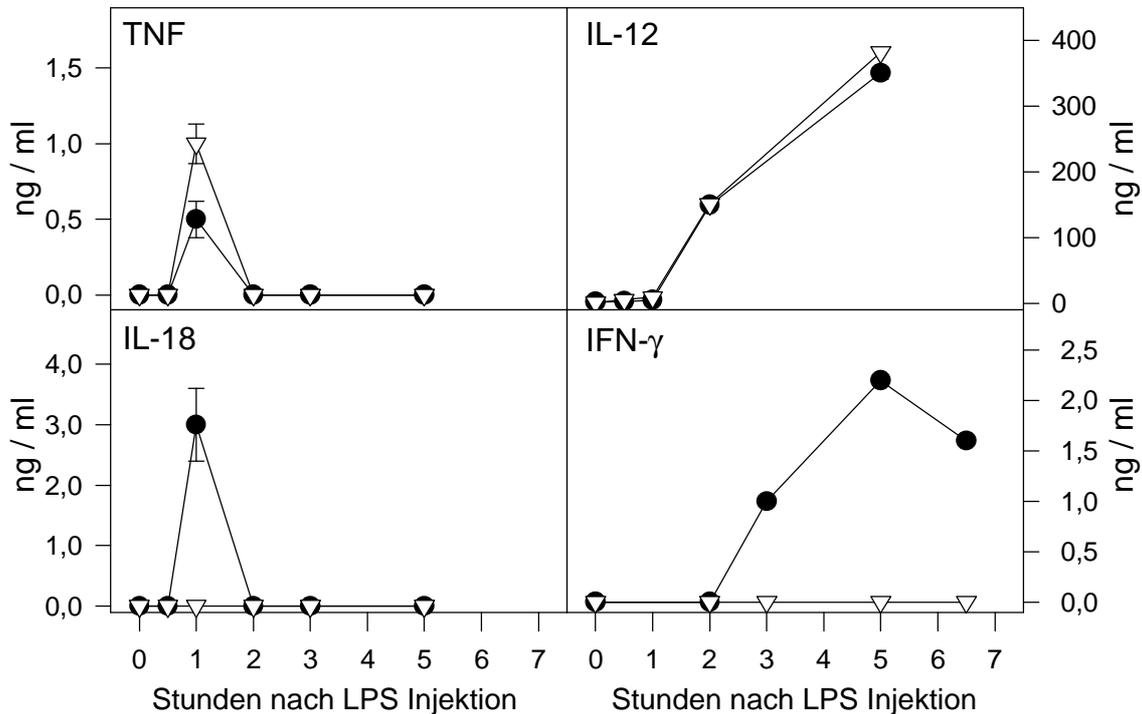


Abb. 12: Graphische Darstellung der Kinetik der durch LPS induzierten Zytokinserumwerte. Zeitpunkte und gemessene Zytokine sind entsprechend gekennzeichnet.

Wie aus Abbildung 12 hervor geht, korrespondieren die gemessenen Serumwerte gut mit den oben gezeigten Analysen auf mRNA Ebene. Die durch LPS induzierten Serumwerte für TNF sind nahezu identisch zwischen IL-18WT und IL-18KO Mäusen, wobei IL-18KO Mäuse sogar etwas höhere Serumwerte als IL-18WT Mäuse aufweisen. Wie erwartet, ist kein IL-18 im Serum von IL-18KO Mäusen nachweisbar. Wildtypmäuse hingegen zeigen eine rasche, nur kurz anhaltende Induktion von IL-18. Hierbei liegt der höchste Wert zeitlich deutlich vor dem ersten Anstieg von IFN- γ . Wie schon auf mRNA Ebene ermittelt, zeigen IL-18KO Mäuse auch auf Proteinebene keine meßbare Induktion von IFN- γ , im Gegensatz zu IL-18WT Mäusen. Dieser Befund ist sehr interessant, da die Induktion von IL-12 nach LPS vergleichbar zwischen IL-18WT und IL-18KO Mäusen geschieht. Anscheinend werden nach LPS beide Zytokine, IL-12 als auch IL-18, benötigt, um IFN- γ zu induzieren.

2.2.4. Superantigen induzierte Reaktionen in Abhängigkeit von IL-18

2.2.4.1. Sensibilisierung für die letalen Effekte von LPS durch Superantigen

In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß das Superantigen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) Mäuse für eine definierte Zeitspanne von 4 bis 32 Stunden für die letalen Effekte von LPS sensibilisiert. Nach der Sensibilisierung mit SEB sank die LD₁₀₀ für LPS um den Faktor 10 bis 20. Die SEB Administration führte zu einer Cyclosporin A (CsA) abhängigen Induktion von IFN- γ , vermutlich durch die SEB vermittelte Aktivierung von V β 8R⁺-T-Zellen. Durch die Blockierung von IFN- γ mittels neutralisierender Antikörper konnte die SEB induzierte Sensibilisierung komplett unterbunden werden (Hochholzer et al., 1997). Da IL-18KO Mäuse einen Defekt in der Produktion von IFN- γ nach LPS zeigen, und weiterhin IFN- γ das Schlüsselzytokin bei der SEB vermittelten Sensibilisierung darstellt, wurde die Fragestellung untersucht, ob IL-18KO Mäuse durch SEB für die letalen Effekte von LPS sensibilisiert werden. Hierzu wurden je drei Mäuse pro Genotyp (IL-18WT oder IL-18KO) und LPS Dosis (100 μ g und 70 μ g) mit je 10 μ g SEB i.p. injiziert. Nach 8 Stunden erfolgte die LPS Injektion i.p.

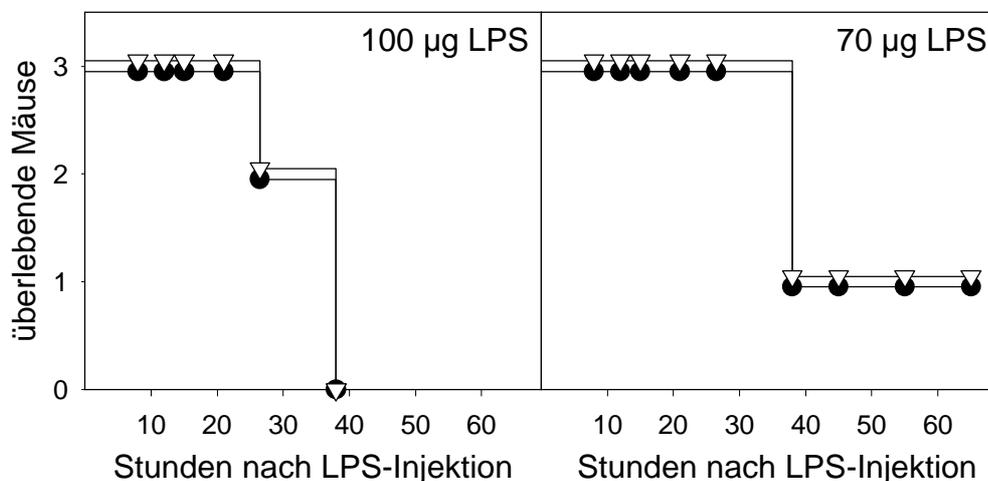


Abb. 13: Darstellung der Letalität von IL-18WT (●) und IL-18KO (▽) Mäusen, verursacht durch i.p. Injektion von den angegebenen Mengen LPS, 8 Stunden nach der i.p. Injektion von 10 μ g SEB.

Wie Abbildung 13 zeigt, ist die LPS Sensitivität in IL-18KO Mäusen nach vorheriger Sensibilisierung mit SEB identisch zu Wildtypkontrollen. SEB-Sensibilisierung stellt die normale LPS Reaktivität in IL-18KO Mäusen wieder her und eliminiert somit die erhöhte

C. ERGEBNISSE

LPS-Resistenz von IL-18KO-Mäusen. Deshalb kann die Aussage getroffen werden, daß die SEB-Sensibilisierung unabhängig von IL-18 funktioniert.

Sakao et al. haben gezeigt, daß IL-18KO Mäuse nach einer Sensibilisierung mit *Propionibacterium acnes* und einer anschließenden Behandlung mit LPS bis zu zehnfach erhöhte TNF Spiegel im Serum, verglichen mit Wildtypkontrollen, aufweisen. Dies hatte eine dramatisch erhöht der Letalität dieser Mäuse zur Folge (Sakao et al., 1999). Um zu überprüfen, ob IL-18 die TNF Expression nach LPS Injektion in gleicher Weise in SEB sensibilisierten Tieren beeinflusst, wurden mit dem gleichen experimentiellen Ansatz wie oben beschrieben gearbeitet. Acht Stunden nach der SEB-Sensibilisierung folgte eine i.p. Injektion von 100 µg LPS in je vier IL-18WT und IL 18KO Mäusen. Eine Stunde nach der LPS-Injektion wurden die Mäuse getötet und die TNF Serumspiegel mittels ELISA ermittelt.

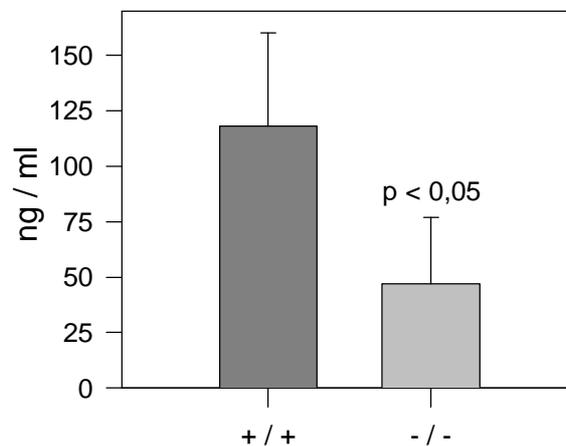


Abb. 14: Serumkonzentrationen von TNF in IL-18WT (+/+) und IL-18KO (-/-) Mäusen nach Sensibilisierung mit SEB und anschließender Behandlung mit LPS. Der Wert der Teststatistik (N=4), ermittelt durch Verwendung des T-Tests, ist über dem rechten Balken dargestellt.

Obwohl die TNF Serumspiegel bei beiden Genotypen nach SEB-Sensibilisierung mit anschließender LPS Gabe deutlich höher waren als bei nicht sensibilisierten Tieren (Vergleich der Abbildungen 12 und 14), zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen IL-18WT und IL-18KO Mäusen. Der Grad der Verstärkung der TNF Produktion nach LPS Gabe in SEB sensibilisierten IL-18KO Mäusen ist signifikant kleiner als in Wildtypkontrollen. Im Gegensatz zur Sensibilisierung mit *P. acnes* scheint die Potenzierung der TNF Produktion nach LPS Gabe in SEB sensibilisierten Tieren, zumindest teilweise, IL-18 vermittelt zu sein.

2.2.4.2. Allgemeine Reaktivität von IL-18KO-Mäusen gegenüber SEB

Die Ergebnisse von C.2.2.4.1. weisen, zumindest im Sinne von Sensibilisierung, auf eine Unabhängigkeit von IL-18 in der Reaktion auf Superantigen hin. Im folgenden wurde die Reaktion von IL-18KO Mäusen auf SEB genauer überprüft. Eine bekannte Eigenschaft von SEB ist die Induktion von IFN- γ Produktion, welches das Schlüsselzytokin bei der Superantigen vermittelten Sensibilisierung darstellt. Je eine IL-18WT und IL-18KO Maus pro Zeitpunkt wurden mit 10 μ g SEB i.p. injiziert. Fünf und acht Stunden danach wurden die Mäuse getötet und die IFN- γ Serumkonzentrationen bestimmt.

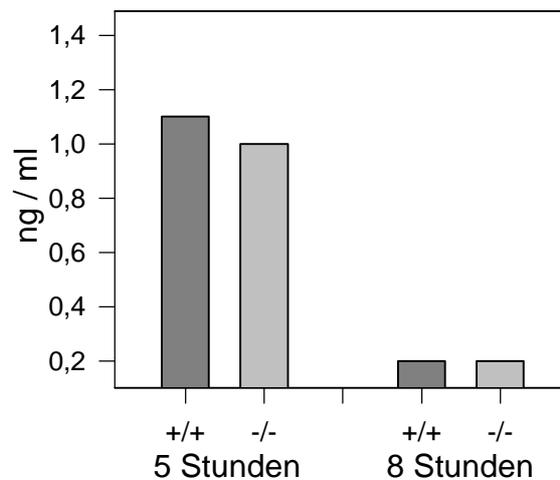


Abb. 15: Serumkonzentrationen von IFN- γ in IL-18WT (+/+) und IL-18KO (-/-) Mäusen, fünf und acht Stunden nach i.p. Injektion von 10 μ g SEB.

Wie Abbildung 15 zeigt, verursacht SEB die Induktion von IFN- γ Produktion in gleichem Maß in IL-18KO Mäusen wie in Wildtypkontrollen. Daraus kann gefolgert werden, daß die Induktion von IFN- γ Produktion durch SEB unabhängig von IL-18 geschieht. Dieser Befund kann auch die unter C.2.2.4.1. beschriebene IL-18 Unabhängigkeit der SEB Sensibilisierung erklären helfen.

Eine weitere Eigenschaft von SEB ist die Induktion der Expressionserhöhung verschiedener Oberflächenrezeptoren auf F4/80⁺ Bauchhöhlenmakrophagen („peritoneal exudate cells“, PEC). Hierzu zählen CD14 und die β - und „common“- γ -Kette des Interleukin-2 Rezeptors (IL-2R β (CD122), IL-2R γ (CD132)) (Hochholzer et al., 1997). Je zwei IL-18WT und IL-18KO Mäuse wurden mit 10 μ g SEB i.p. injiziert. Zwölf Stunden später wurden die Mäuse getötet und daraus die PEC geerntet, welche mittels Durchflußzytometrie analysiert wurden. Durch Verwendung spezifischer Antikörper wurden die Oberflächenrezeptoren F4/80, CD14,

C. ERGEBNISSE

IL-2R β und IL-2R γ markiert. Von den F4/80⁺ Zellen wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) für CD14, IL-2R β und IL-2R γ bestimmt. Als Negativkontrolle dienten PEC aus je zwei unbehandelten IL-18WT und IL-18KO Mäusen. Um unspezifische Markierungen auszuschließen, wurden die Zellen auch mit Isotypenkontrollantikörpern markiert.

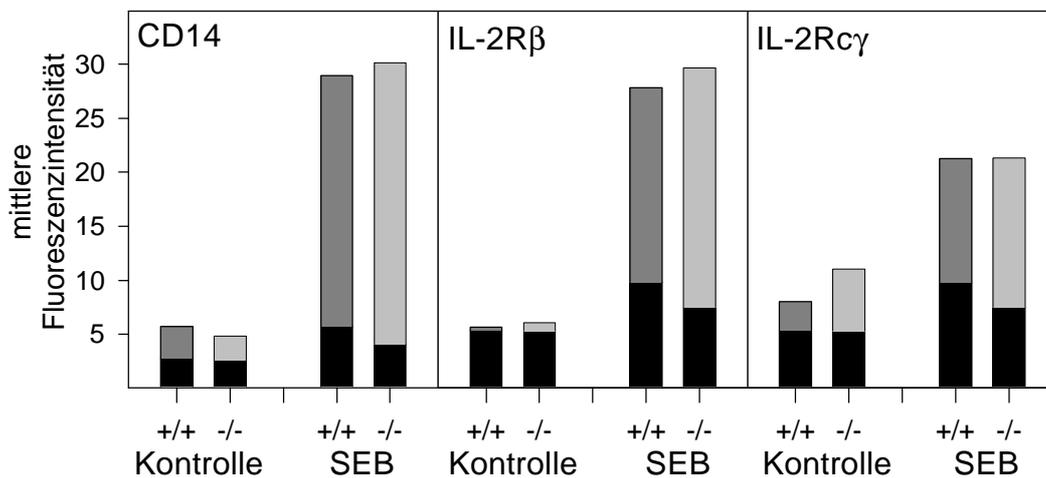


Abb. 16: Mittlere Fluoreszenzintensitäten nach Markierung der angegebenen Oberflächenrezeptoren von F4/80⁺ PEC, 12 Stunden nach i.p. Injektion von 10 μ g SEB in IL-18WT (+/+) und IL-18KO (-/-) Mäuse. Die sich durch die Isotypenkontrolle ergebenden Werte sind schwarz dargestellt. Unbehandelte Mäuse sind als Kontrolle gekennzeichnet.

Die in Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse stammen von je einer Maus und sind repräsentativ für je zwei Individuen, da ein parallel durchgeführter Versuch nahezu identische Ergebnisse lieferte. Alle getesteten Oberflächenrezeptoren werden deutlich hochreguliert. Diese Reaktion auf SEB ist völlig unabhängig von IL-18.

Zusammen implizieren diese Ergebnisse, daß die durch SEB verursachte IFN- γ Produktion von V β 8R⁺-T-Zellen als auch die nachfolgende Aktivierung von Makrophagen völlig unabhängig von IL-18 ist.

2.3. Die Rolle von IL-18 bei der Induktion von primären zytotoxischen T-Lymphozyten

Antworten

IL-18 wirkt auf B-Zellen (Yoshimoto et al., 1997), NK-Zellen (Hyodo et al., 1999; Takeda et al., 1998; Tsutsui et al., 1996) und T-Zellen (Okamura et al., 1995b) stimulatorisch im Sinne von Aktivierung. Die Voraussetzung für die Wirkung von IL-18 ist die Expression des IL-18 Rezeptors (IL-18R), früher als „Interleukin-1 Receptor related Protein“ (IL-1RrP) bezeichnet, auf diesen Zellen. Untersuchungen der Expression des IL-18R auf oben genannten Zellen zeigte eine zum Teil konstitutive, als auch induzierbare Expression (Kunikata et al., 1998; Tomura et al., 1998). Hierbei fiel auf, daß CD8⁺-T-Zellen eine starke Expressionserhöhung des IL-18R nach gleichzeitiger Stimulation des T-Tell-Rezeptors (TZR) mit anti-CD3 Antikörpern und des kostimulatorisch wirkenden Rezeptors CD28 mit entsprechenden Antikörpern, und anschließender Interleukin-12 (IL-12) Zugabe, zeigten (Tomura et al., 1998). Diese Befunde legen eine Beteiligung von IL-18 an der Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen, auch als zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) bezeichnet, nahe.

2.3.1. Untersuchung der Fähigkeit von dendritischen Zellen, IL-18 zu sekretieren

Dendritische Zellen (DZ) spielen durch die direkte Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen eine zentrale Rolle bei der Induktion einer primären ZTL Antwort. Um die Fähigkeit zur Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen zu erlangen, müssen DZ ihren Betriebszustand zu sogenannten „konditionierten“ DZ wechseln. Dies wiederum kann durch verschiedene Mechanismen induziert werden, wozu CD4⁺-T-Zell-Hilfe, CD40 Ligation und virale Infektion zählen (Ridge et al., 1998; Ada, 1999).

Das CpG Oligonukleotid ODN1668 hat immunstimulatorische Eigenschaften. Im besonderen ist es als Adjuvans bei der Induktion einer primären ZTL Antwort verwendbar. Weiterhin ist bekannt, daß ODN1668 DZ stimuliert und aktiviert (Sparwasser et al., 1998).

Um die Rolle von IL-18 bei der Induktion einer primären ZTL Antwort zu untersuchen, wurde zuerst die Fragestellung der Relevanz von DZ sekretiertem IL-18 untersucht. Da bekannt ist, daß DZ prinzipiell fähig sind, IL-18 zu sekretieren, (Stoll et al., 1998), war es von Interesse, ob auch ODN1668 eine Induktion von IL-18 Produktion in DZ bewirken kann. Hierzu wurden, wie unten beschrieben, Knochenmark-DZ generiert. Als Spender wurden Mäuse verwendet, welche einen gemischten genetischen Hintergrund aus C57BL/6 und 129/SvJ aufwiesen. Diese Spender wurden ausgewählt, da die IL-18KO Mäuse, in denen später die *in vivo* ZTL Induktionsversuche durchgeführt werden sollten, den selben

C. ERGEBNISSE

genetischen Hintergrund haben. Von drei weiblichen Mäusen wurde das Knochenmark aus Femur und Tibia ausgespült und zusammen suspendiert. Die Ausbeute betrug 6×10^7 Zellen, welche auf 10 Petrischalen mit 10 cm Durchmesser in je 10 ml Clicks RPMI Medium mit 10% FKS und 200 U/ml rGM-CSF verteilt wurden. Am dritten und sechsten Tag nach Kulturbeginn erfolgte Mediumergänzung bzw. Mediumwechsel. Am siebten Tag erfolgte die Ernte der nicht-adherenten Zellen durch Absaugen und anschließender Zentrifugation. Die Ausbeute betrug 1×10^8 Zellen. Zur Charakterisierung der so *in vitro* generierten Knochenmark DZ erfolgte eine FACS Färbung gegen die Oberflächenantigene CD11c und MHCII, wobei CD11c Expression als Linienmerkmal für DZ und Dichte der MHCII Expression als Merkmal zur Abschätzung des Reifegrades (hohe MHCII-Dichte entspricht einem hohen Reifegrad) der DZ dienten. Von den geernteten Zellen exprimierten 93,8 % das Oberflächenantigen CD11c. Diese CD11c⁺-Zellen zeigten ausnahmslos MHCII Expression, woraus geschlossen werden konnte, daß es sich bei diesen *in vitro* generierten Zellen um DZ ohne Kontamination mit Granulozyten, welche negativ in der Färbung für MHCII wären, handelt. Außerdem beinhaltete diese Population verschiedene Reifegrade der DZ, da die Expressionsdichte der MHCII Moleküle von intermediär bis hoch reichte.

Die so generierten und überprüften DZ wurden nun *in vitro* stimuliert. Hierzu wurden je 7×10^6 Zellen in 3 ml Medium pro Well einer Sechswellplatte gegeben, wobei für jede Bedingung bzw. jeden Zeitpunkt ein Well verwendet wurde.

Als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 30 µg/ml des DNS-TopoisomeraseI Inhibitors Camptothecin, welcher bekanntermaßen die Aktivierung des „Interleukin-1 beta converting enzyme“ (ICE), auch als Caspase-1 bezeichnet, induziert (Seimiya et al., 1997), was wiederum eine essentielle Voraussetzung für die Sekretion von IL-18 darstellt (Ghayur et al., 1997; Gu et al., 1997). Dieser Ansatz wurde über 4h inkubiert. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne jegliche Zusätze, d.h. die Zellen wurden nur mit Medium über 24h inkubiert.

Die Stimulation mit dem ODN1668 erfolgte durch Zugabe dieses Oligonukleotids in das Medium zur Endkonzentration von 3 µM. Vergleichend hierzu wurden die Zellen über CD40-Ligation durch entsprechende Antikörperzugabe stimuliert. Zuerst wurde ein Hamster-anti-Maus CD40 monoklonaler Antikörper der Klasse IgM in der Endkonzentration 1 µg/ml zugegeben, gefolgt von einem, über den ersten Antikörper kreuzvernetzenden, Ziege-anti-Hamster polyklonalen Antikörper, in der Endkonzentration von 0,5 µg/ml. Bei beiden Arten der Stimulation wurde eine Kinetik durchgeführt. Je nach einer halben, einer, zwei, vier, acht

C. ERGEBNISSE

und 24 Stunden wurde der Überstand des entsprechenden Wells geerntet und mit Hilfe eines „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“ (ELISA) die Konzentration von IL-18 bestimmt.

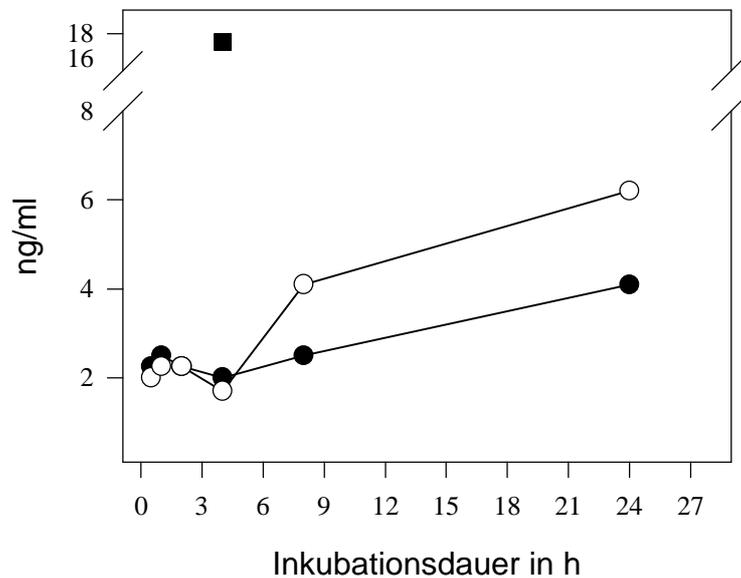


Abb. 17: IL-18 Sekretion von DZ. Nach Stimulation mit Camptothecin (■), ODN1668 (O) oder durch CD40-Ligation (●) sezerniertes IL-18 aus DZ.

Aus der graphischen Darstellung geht hervor, daß ODN1668 eine deutliche Induktion der Sezernierung von IL-18 von DZ verursacht. Diese Induktion ist wesentlich stärker als die durch CD40-Ligation beobachtete, welche sich kaum vom Referenzwert unterscheidet. Über die Aktivierung von ICE induziert Camptothecin wie erwartet eine relativ starke Sezernierung von IL-18 aus DZ. Diese Positivkontrolle zeigt die Funktions- und die generelle IL-18 Sezernierungsfähigkeit der *in vitro* generierten Knochenmark-DZ.

Diese Ergebnisse zeigen die Eigenschaft von ODN1668, IL-18 Produktion von DZ zu induzieren. Diese Eigenschaft könnte auch *in vivo* von Bedeutung sein und einige der bis dato beschriebenen immunmodulatorischen Wirkungen von ODN1668 erklären helfen.

2.3.2. Untersuchung der Funktion von IL-18 bei der Induktion einer primären ZTL

Antwort mit ODN1668 als Adjuvans

Um nun die Relevanz der unter C.2.3.1. beschriebenen Erkenntnisse für die Adjuvanswirkungen *in vivo* von ODN1668 im Sinne der Induktion einer primären ZTL Antwort näher zu untersuchen, wurden, wie unter C.1. beschrieben generierte, IL-18KO Mäuse vergleichend mit Wildtypkontrollen analysiert.

Jeweils drei Mäuse pro Gruppe wurden für das Experiment verwendet, dessen exakte Durchführung unter B.7.5.2. beschrieben ist. Es wurden drei Gruppen definiert: IL-18WT Mäuse, IL-18KO Mäuse und IL-18KO Mäuse, die mit rekombinantem murinem IL-18 (rmuIL-18) rekonstituiert wurden. Jede Maus erhielt 10 nmol ODN1668 als Adjuvans zusammen mit 100 µg Ovalbumin als Modellantigen, wobei die Individuen der rekonstituierten Gruppe gleichzeitig 1 µg rmuIL-18 in der selben Injektion erhielten. Die Injektionen wurden subcutan in die hinteren Füße vorgenommen. Nach vier Tagen wurden die Mäuse getötet und die poplietalen und die inguinalen Lymphknoten von beiden Seiten geerntet. Die vier Lymphknoten von jeder Maus wurden zusammen zur Einzelzellsuspension überführt. Die Zellen wurden gezählt und somit für jede Maus eine Gesamtzellzahl ermittelt. Nach einer 4 Tage dauernden *in vitro* Expansionsphase wurden die Zellen abermals gezählt.

	+ / +	- / -	- / - +rmuIL-18
Gesamtzellzahl <i>ex vivo</i>	15,8±4,8 x10 ⁶	14,5±6,1 x10 ⁶	14,5±0,9 x10 ⁶
Gesamtzellzahl nach <i>in vitro</i> Expansion	6,5±1,8 x10 ⁶	4,8±1,9 x10 ⁶	6,7±2,0 x10 ⁶

Tab. 8: Gesamtzellzahlen nach der *in vivo* ZTL Induktionsphase mit ODN1668 als Adjuvans und Ovalbumin als Modellantigen, und nach der *in vitro* Expansionsphase. IL-18KO Mäuse sind als -/-, die IL-18WT Mäuse als +/+ gekennzeichnet. Die Werte stellen das arithmetische Mittel ± Standardabweichung mit N=3 dar.

Wie aus der Tabelle 8 hervorgeht, zeigt sich die Lymphknotenzellzahl unabhängig von IL-18. IL-18KO Mäuse weisen eine vergleichbare Lymphknotenschwellung nach ODN1668 Gabe wie IL-18WT Mäuse auf. Bei allen drei Gruppen bewegt sich die Zunahme der Lymphknotenzellzahl, verursacht durch ODN1668, im Bereich von Faktor 50. Diese Berechnung basiert auf der Tatsache, daß eine unbehandelte Maus mit demselben genetischen Hintergrund im Mittel eine Gesamtzellzahl um die 0,3 x 10⁶ Zellen aufweist (eigene Erfahrungswerte).

C. ERGEBNISSE

Anschließend wurde die spezifische Zytotoxizität dieser Zellen im ^{51}Cr -Freisetzungssassay, dessen genaue Durchführung unter B.8.3. beschrieben ist, ermittelt. Die Zellen wurden direkt, ohne weitere Anreicherung oder Aufreinigung, verwendet. Als Zielzellen dienten mit ^{51}Cr markierte EL-4 Zellen, welche direkt oder mit dem sich aus der Ovalbuminsequenz ableitenden Peptid P1 beladen, eingesetzt wurden. Die nicht behandelten EL-4 Zellen dienten als Negativkontrolle, während die mit P1 beladenen Zellen durch *in vivo* induzierte und *in vitro* expandierte ZTL spezifisch lysiert werden sollten. Das Effektor/Zielzell-Verhältnis wurde von 100/1 über 7 Schritte bis 1,5625/1 titriert (1:2 Verdünnungsschritte), wobei jede Titrationsstufe als Dreifachbestimmung durchgeführt wurde. Nach 4h Inkubation wurde freigesetztes ^{51}Cr mit einem „Gammacounter“ im Überstand vermessen. Die gemessenen „Counts per Minute“ (cpm) wurden wie unter B.8.3. beschrieben in Prozent spezifischer Lyse umgerechnet. Die in Abbildung 18 gezeigten Ergebnisse leiten sich aus je einer Maus von jeder Gruppe ab und stehen repräsentativ für die ganze Gruppe, da alle Individuen einer Gruppe nahezu identische Ergebnisse lieferten

C. ERGEBNISSE

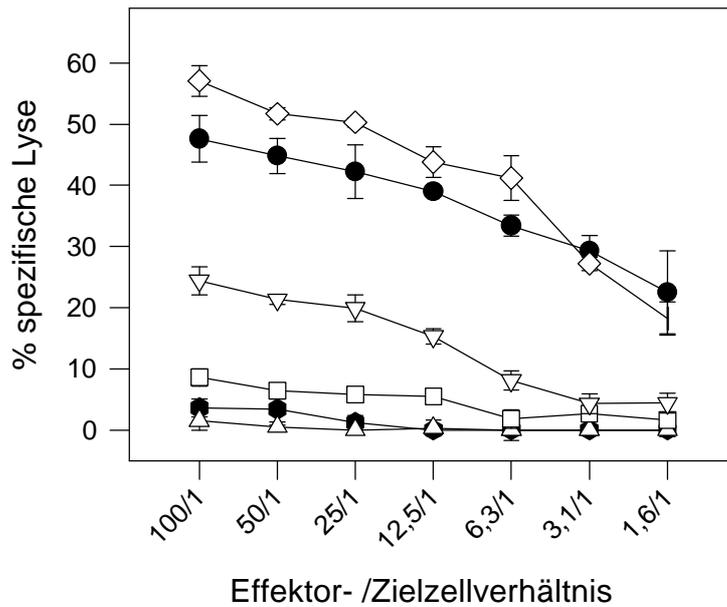


Abb. 18: Induktion einer primären ZTL Antwort in Abwesenheit von IL-18. Gezeigt ist hier jeweils ein Individuum, repräsentativ für die ganze Gruppe. IL-18WT Mäuse, IL-18KO Mäuse und IL-18KO Mäuse rekonstituiert mit rmuIL-18 wurden mit ODN1668 und Ovalbumin immunisiert und die resultierende ZTL Antwort mittels ^{51}Cr -Freisetzungssassay überprüft. Aufgetragen sind prozentuale spezifische Lyse der Zielzellen gegen das Verhältnis von Effektor- und Zielzellzahl mit der Symbolzuordnung wie folgt: Effektorzellen aus IL-18WT Mäuse gegen EL-4 Zellen ohne (◆) oder mit Ovalbumin-Peptid P1 beladen (●), aus IL-18KO Mäusen gegen EL-4 Zellen ohne (Δ) oder mit Ovalbumin-Peptid P1 beladen (∇) und aus IL-18KO Mäusen, die mit rmuIL-18 rekonstituiert wurden, gegen EL-4 Zellen ohne (\square) oder mit Ovalbumin-Peptid P1 beladen (\diamond). Die gezeigten Standardabweichungen leiten sich aus den Werten der Dreifachbestimmung ab.

Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, ist die Induktion einer primären ZTL Antwort mit ODN1668 als Adjuvans und dem Modellantigen Ovalbumin in IL-18KO Mäusen deutlich weniger effizient als in IL-18WT Mäusen. Da eine Gabe von rmuIL-18 gleichzeitig mit ODN1668 und Ovalbumin den beobachteten Defekt der IL-18KO Mäuse komplett behebt, kann davon ausgegangen werden, daß dieser Defekt ausschließlich auf die Abwesenheit von IL-18 während der frühen Phase der Induktion einer primären ZTL Antwort zurück zu führen ist.

Interessanterweise gelingt die Rekonstitution nicht, wenn man rmuIL-18 in einer Konzentration von 20 ng/ml nur der *in vitro* Expansion zusetzt. Hier ergibt sich kein Unterschied in der zytotoxischen Effizienz zu nicht rekonstituierten IL-18 defizienten Mäusen (Ergebnisse sind nicht explizit dargestellt). Dieser Befund impliziert eine essentielle Rolle

von IL-18 bei der frühen *in vivo* Induktionsphase einer primären ZTL Antwort mit ODN1668 als Adjuvans.

2.3.3. Untersuchung von IL-18 als Adjuvans bei der Induktion einer primären ZTL Antwort

Da, wie in C.2.3.2. gezeigt, IL-18 eine wichtige Rolle bei der Induktion einer primären ZTL Antwort spielt, war nun von Interesse, ob IL-18 selbst als Adjuvans eingesetzt werden kann. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde ein Immunisierungsprotokoll verwendet, welches auf Einschluß des Modellantigens Ovalbumin in Liposomen basiert. Das so eingeschlossene Antigen an sich ist nicht immunogen und führt nicht zur Induktion einer primären ZTL Antwort. Durch Zusatz des Saponins QuilA als Adjuvans erreicht man hingegen sehr gute Immunogenität und Induktion einer primären ZTL Antwort (Lipford et al., 1994). In diesem Modell wurde nun die Möglichkeit untersucht, ob IL-18 an Stelle von QuilA als Adjuvans dienen kann.

Hierzu wurden drei C57BL/6 Mäuse immunisiert. Alle Tiere erhielten Liposomen mit Ovalbumin, deren Herstellung in B.8.2. beschrieben ist, wobei ein Individuum zusätzlich QuilA, das zweite zusätzlich rmuIL-18 (0,5 µg) und das dritte keinerlei Zusätze erhielt. Die Agenzien wurden in die hinteren Füße in einem Volumen von 50 µl pro Fuß subcutan injiziert. Nach 4 Tagen wurden die poplitealen und inguinalen Lymphknoten präpariert. Die daraus gewonnenen Zellen wurden zur Expansion weitere vier Tage *in vitro* kultiviert. Die resultierenden Zellen wurden wie in C.2.3.2. beschrieben auf lytische Aktivität getestet. Als Zielzellen dienten hier jedoch EL-4 Zellen als Negativkontrolle, und EG-7 Zellen, eine mit cDNS für Ovalbumin kodierend transfezierte EL-4 Zelllinie, als Ovalbumin präsentierende Zielzelle.

C. ERGEBNISSE

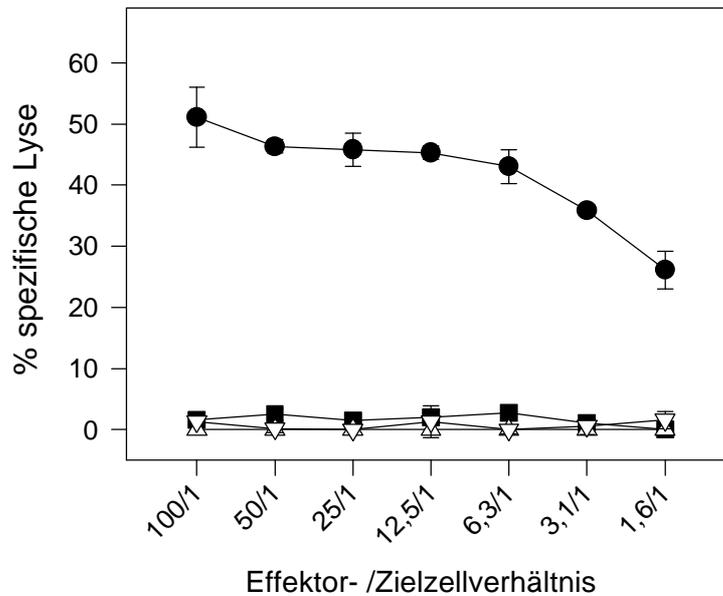


Abb. 19: Induktion einer primären ZTL Antwort mit rmuIL-18 als Adjuvans. C57BL/6 Mäuse wurden mit Ovalbumin-Liposomen immunisiert und die resultierende ZTL Antwort mittels ^{51}Cr -Freisetzungssassay überprüft. Aufgetragen sind prozentuale spezifische Lyse der Zielzellen gegen das Verhältnis von Effektor- und Zielzellzahl mit der Symbolzuordnung wie folgt: Effektorzellen aus Mäusen, die mit QuilA behandelt wurden, gegen EL-4 Zellen (■) oder gegen EG-7 Zellen (●) bzw. aus Mäusen, die mit rmuIL-18 behandelt wurden, gegen EL-4 Zellen (Δ) oder gegen EG-7 Zellen (∇). Die gezeigten Standardabweichungen leiten sich aus den Werten der Dreifachbestimmung ab.

Wie aus der Abbildung 19 hervor geht, ist mit QuilA als Adjuvans eine sehr gute ZTL Induktion gegen Ovalbumin zu erreichen, während rmuIL-18 keinerlei Adjuvanswirkung zeigt. Das Ergebnis ist identisch zu dem als Negativkontrolle dienendem Ansatz, bei dem nur Liposomen mit Ovalbumin verabreicht wurde. Diese Negativkontrolle erbrachte erwartungsgemäß keinerlei lytisch aktive Effektorzellen und ist auch nicht in der Abbildung 19 erfaßt.

Obwohl, wie in C.2.3.2. gezeigt, IL-18 zumindest bei Verwendung des ODN1668 als Adjuvans, eine wichtige Rolle bei der Induktion einer primären ZTL Antwort spielt, ist es als alleiniges, exogen zugeführtes Zytokin, unwirksam.

2.3.4. Untersuchung der Funktion von IL-12 und IFN- γ bei der Induktion einer primären ZTL Antwort mit ODN1668 als Adjuvans

2.3.4.1. Die Funktion von IFN- γ

IL-18 hat bekanntermaßen die Fähigkeit, Produktion von IFN- γ zu induzieren. Somit ist nicht auszuschließen, daß der in C.2.3.2. beschriebene Effekt nicht auf eine direkte Wirkung von IL-18 zurückzuführen ist, sondern vielmehr indirekt über eine fehlende Induktion von IFN- γ erklärt werden kann. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurde das Experiment, welches detailliert in C.2.3.2. beschrieben ist, mit IFN- γ defizienten Mäusen durchgeführt. Da diese Mäuse den genetischen Hintergrund C57BL/6 besaßen, dienten als Wildtypkontrollen C57BL/6 Mäuse. Die Kontrollgruppe und die Experimentalgruppe bestanden aus jeweils drei Tieren. Die in Abbildung 20 gezeigten Ergebnisse leiten sich aus je einer Maus von jeder Gruppe ab und stehen repräsentativ für die ganze Gruppe, da alle Individuen einer Gruppe nahezu identische Ergebnisse lieferten.

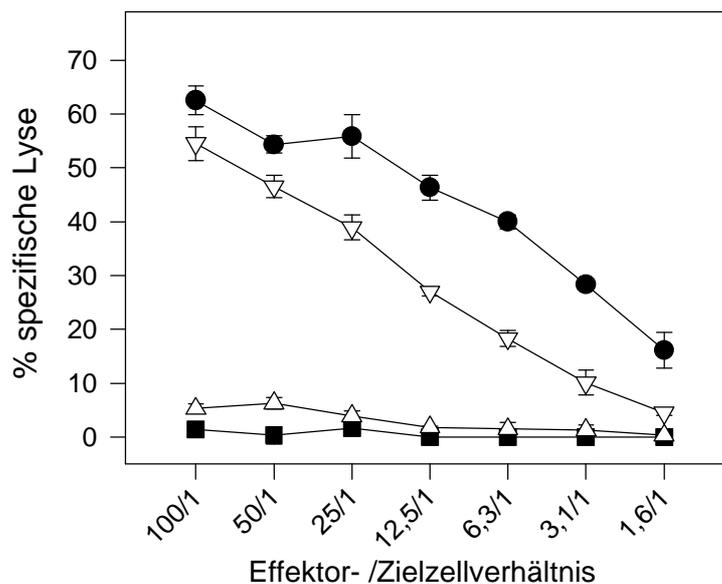


Abb. 20: Induktion einer primären ZTL Antwort in Abhängigkeit von IFN- γ . IFN- γ defiziente Mäuse und C57BL/6 Mäuse wurden mit Ovalbumin und ODN1668 als Adjuvans immunisiert und die resultierende ZTL Antwort mittels ^{51}Cr -Freisetzungssassay überprüft. Aufgetragen sind prozentuale spezifische Lyse der Zielzellen gegen das Verhältnis von Effektor- und Zielzellzahl mit der Symbolzuordnung wie folgt: Effektorzellen aus C57BL/6 Mäusen gegen EL-4 Zellen (■) oder gegen mit dem Peptid P1 beladene EL-4 Zellen (●) bzw. aus IFN- γ defizienten Mäusen, gegen EL-4 Zellen (Δ) oder gegen mit dem Peptid P1 beladene EL-4 Zellen (▽). Die gezeigten Standardabweichungen leiten sich aus den Werten der Dreifachbestimmung ab.

Wie man der Abbildung 20 entnehmen kann, führt das Fehlen von IFN- γ nicht zu einer signifikant erniedrigten Induktion einer primären ZTL Antwort. Die Effektorzellen aus IFN- γ defizienten Mäusen zeigen nahezu identische lytische Aktivität gegen EL-4 Zellen, welche mit dem sich aus der Ovalbuminsequenz ableitenden Peptid P1 beladen waren, wie Effektorzellen aus Wildtypmäusen. Allerdings ist bei näherer Betrachtung von Abbildung 20 eine tendenziell etwas reduzierte Effizienz der Effektorzellen aus IFN- γ defizienten Mäusen festzustellen. Die Frage, ob dies von physiologischer Bedeutung ist, muß offen bleiben.

Aus diesen Ergebnissen kann jedoch gefolgert werden, daß der beobachtete Effekt in IL-18 defizienten Mäusen nicht auf eine fehlende IFN- γ Induktion zurückzuführen ist, sondern es sich vielmehr um einen durch IL-18 direkt vermittelten handelt.

2.3.4.2. Die Funktion von IL-12

Neben IL-18 ist auch IL-12 in der Lage, die Produktion von IFN- γ zu induzieren. Da fehlendes IL-18 wesentlichen Einfluß auf die Induktion einer primären ZTL Antwort unter Verwendung von ODN1668 als Adjuvans hat (siehe C.2.3.2.), während der Effekt von fehlendem IFN- γ marginal bis nichtig ist, war es nunmehr von Interesse, den Effekt von fehlendem IL-12 in diesem ZTL Induktionsmodell zu testen. Hierfür wurde das in C.2.3.4.1. beschriebene Experiment unter Verwendung von IL-12 defizienten Mäusen durchgeführt. Die genaue Durchführung war identisch zu der in C.2.3.4.1. und C.2.3.2. beschriebenen. Drei IL-12 defiziente Mäuse mit dem genetischen Hintergrund C57BL/6 als auch drei C57BL/6 Wildtypmäuse wurden mit Ovalbumin und ODN1668 als Adjuvans immunisiert und anschließend die Induktion einer primären ZTL Antwort überprüft. Die in Abbildung 21 gezeigten Ergebnisse leiten sich aus je einer Maus von jeder Gruppe ab und stehen repräsentativ für die ganze Gruppe, da alle Individuen einer Gruppe nahezu identische Ergebnisse lieferten

C. ERGEBNISSE

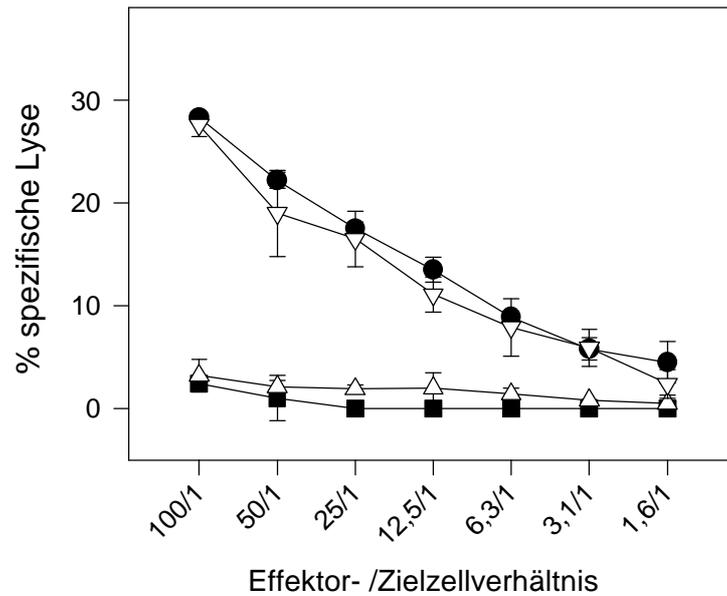


Abb. 21: Induktion einer primären ZTL Antwort in Abhängigkeit von IL-12. IL-12 defiziente Mäuse und C57BL/6 Mäuse wurden mit Ovalbumin und ODN1668 als Adjuvans immunisiert und die resultierende ZTL Antwort mittels ⁵¹Cr-Freisetzungssassay überprüft. Aufgetragen sind prozentuale spezifische Lyse der Zielzellen gegen das Verhältnis von Effektor- und Zielzellzahl mit der Symbolzuordnung wie folgt: Effektorzellen aus C57BL/6 Mäusen gegen EL-4 Zellen (■) oder gegen mit dem Peptid P1 beladene EL-4 Zellen (●) bzw. aus IL-12 defizienten Mäusen gegen EL-4 Zellen (□) oder gegen mit dem Peptid P1 beladene EL-4 Zellen (▽). Die gezeigten Standardabweichungen leiten sich aus den Werten der Dreifachbestimmung ab.

Wie aus dieser Abbildung zu ersehen ist, hat die Abwesenheit von IL-12 keinerlei negativen Effekt auf die Induktion einer primären ZTL Antwort unter Verwendung von ODN1668 als Adjuvans. Obwohl IL-12 als funktionelles Homolog zu IL-18 betrachtet wird, ist im Sinne von Induktion lytisch aktiver Effektorzellen ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Zytokinen festzustellen. IL-18 scheint bei der Induktion einer primären ZTL Antwort mit dem Adjuvans ODN1668 eine wesentliche, IL-12 jedoch eine unwesentliche Rolle zu spielen.

2.3.5. Generierung einer primären ZTL Antwort in IL-18KO Mäusen mit Zellen allogenen Ursprungs

Wie in C.2.3.2. gezeigt wurde, haben IL-18KO Mäuse einen Defekt in der Generation einer primären ZTL Antwort gegen das Modellantigen Ovalbumin unter Verwendung des Adjuvans ODN1668. Da dieser Defekt durch *rmuIL-18* völlig reparabel war, ist ein generelles Entwicklungsproblem dieser Mäuse diesbezüglich auszuschließen. Nicht ausschließbar hingegen ist die Eingrenzung dieses Defekts auf das verwendete Adjuvans, nämlich ODN1668. Aus diesem Grund wurde ein Protokoll zur Induktion einer primären ZTL Antwort durchgeführt, welches ohne künstliche Adjuvantien auskommt. Hierzu wurden Zellen allogenen Ursprungs zur Immunisierung verwendet und auch zur Bestimmung der resultierenden lytischen Aktivität der *in vivo* generierten Effektorzellen eingesetzt.

Der genetische Hintergrund der IL-18 defizienten Mäuse sowie deren Wildtypkontrollen besteht zu 50 % aus C57BL/6 und zu 50 % aus 129/SvJ. Der Haplotyp für MHCI von C57BL/6 ist H2K^b, während der Haplotyp für MHCI von 129/SvJ unbekannt ist. Da der Haplotyp für MHCI des genetischen Hintergrundes Balb/C als H2K^d definiert ist, sollte mit Zellen des Ursprunges Balb/C eine Immunisierung der IL-18 defizienten Mäusen und deren Wildtypkontrollen möglich sein. Einer unbehandelten Balb/C Maus wurde die Milz entnommen und daraus eine Einzelzellsuspension hergestellt. Erythrozytenfreiheit dieser Suspension wurde durch NH₄Cl Behandlung und anschließender Zentrifugation erzielt. Es folgte eine Bestrahlung der so präparierten Zellen mit Gammastrahlen einer Dosis von 1.500 rad. Jede der oben erwähnten Empfängermaus erhielt 4 x 10⁶ dieser Zellen, wobei je 2 x 10⁶ Zellen in einem Volumen von 50 µl in jeden hinteren Fuß subcutan injiziert wurden. Nach vier Tagen wurden die poplietalen und inguinalen Lymphknoten dieser Mäuse geerntet und zur Einzelzellsuspension überführt. Es schlossen sich weitere vier Tage *in vitro* Expansion an, bevor die Zellen unter Verwendung des ⁵¹Cr-Freisetzungstest auf lytische Aktivität getestet wurden. Als Zielzellen dienten mit ⁵¹Cr markierte P815 Zellen, deren Ursprung dem genetischen Hintergrund Balb/C entspricht, und EL-4 Zellen, deren Ursprung dem genetischen Hintergrund C57BL/6 entspricht. Die in Abbildung 22 gezeigten Ergebnisse leiten sich aus je einer Maus von jeder Gruppe ab und stehen repräsentativ für die ganze Gruppe, da alle Individuen einer Gruppe nahezu identische Ergebnisse lieferten.

C. ERGEBNISSE

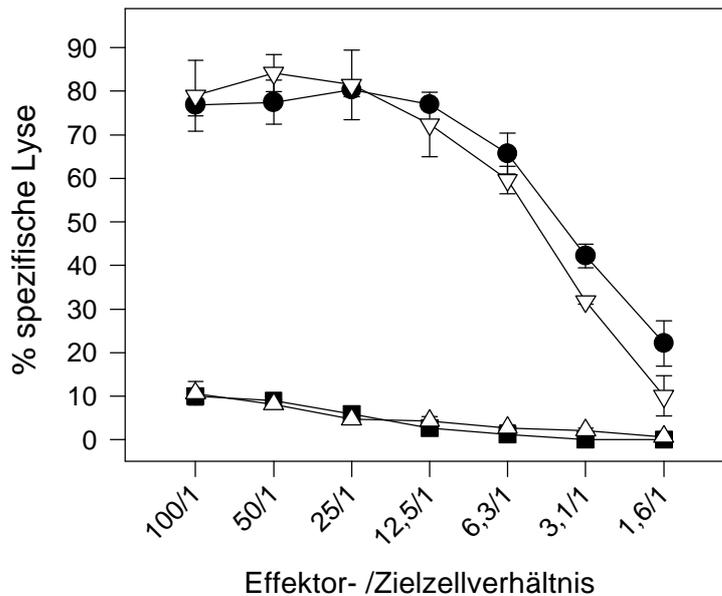


Abb. 22: Induktion einer primären ZTL Antwort durch Immunisierung mit Zellen allogegenen Ursprungs. IL-18KO Mäuse und IL-18WT Mäuse wurden mit Milzzellen einer Balb/C Maus immunisiert und die resultierende ZTL Antwort mittels ^{51}Cr -Freisetzungssassay überprüft. Aufgetragen sind prozentuale spezifische Lyse der Zielzellen gegen das Verhältnis von Effektor- und Zielzellzahl mit der Symbolzuordnung wie folgt: Effektorzellen aus Wildtypkontrollen gegen EL-4 Zellen (■) oder gegen P815 Zellen (●) bzw. aus IL-18 defizienten Mäusen gegen EL-4 Zellen (△) oder gegen P815 Zellen (▽). Die gezeigten Standardabweichungen leiten sich aus den Werten der Dreifachbestimmung ab.

Wie aus dieser Abbildung hervor geht, erzeugte die Immunisierung mit Zellen allogegenen Ursprungs eine sehr effiziente ZTL Antwort, und dies völlig unabhängig von der IL-18 Expressionsfähigkeit der immunisierten Mäuse. Aus diesem Ergebnis läßt sich ableiten, daß endogenes IL-18 der Rezipienten nicht zur Generierung einer primären ZTL Antwort nötig ist, wenn mit Zellen allogegenen Ursprungs immunisiert wird. Eine generelle Unabhängigkeit von IL-18 in diesem System kann man jedoch nicht postulieren, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß die bestrahlten und somit teilungsunfähigen aber zur Proteinexpression fähigen, injizierten Zellen IL-18 sekretieren und somit bioaktives IL-18 in IL-18KO Mäuse einbringen.

2.3.6. Induktion einer primären ZTL Antwort mit dem Adjuvans QuilA in Abhängigkeit von IL-18

Um zu untersuchen, ob der Defekt von IL-18 defizienten Mäusen im Bezug auf Generation einer primären ZTL Antwort ein generelles Phänomen ist, oder vielmehr vom Induktionsprotokoll und somit dem verwendeten Adjuvans abhängt, wurde ein weiteres Induktionsprotokoll an diesen Mäusen durchgeführt. Dieses Protokoll ist bereits in C.2.3.3. näher beschrieben. Das in Liposomen eingeschlossene Modellantigen Ovalbumin wurde zusammen mit dem Adjuvans QuilA subcutan in die Hinterfüße von drei IL-18KO Mäusen als auch drei IL-18WT Mäusen injiziert. Nach dem Ernten der inguinalen und poplitealen Lymphknoten nach vier Tagen wurden diese weiter behandelt wie in C.2.3.3. beschrieben. Zur Überprüfung der lytischen Aktivität der resultierenden Effektorzellen wurde ein ^{51}Cr Freisetzungstest durchgeführt, wobei EG-7 und EL-4 Zellen als Zielzellen eingesetzt wurden. Die in Abbildung 23 gezeigten Ergebnisse leiten sich aus je einer Maus von jeder Gruppe ab und stehen repräsentativ für die ganze Gruppe, da alle Individuen einer Gruppe nahezu identische Ergebnisse lieferten.

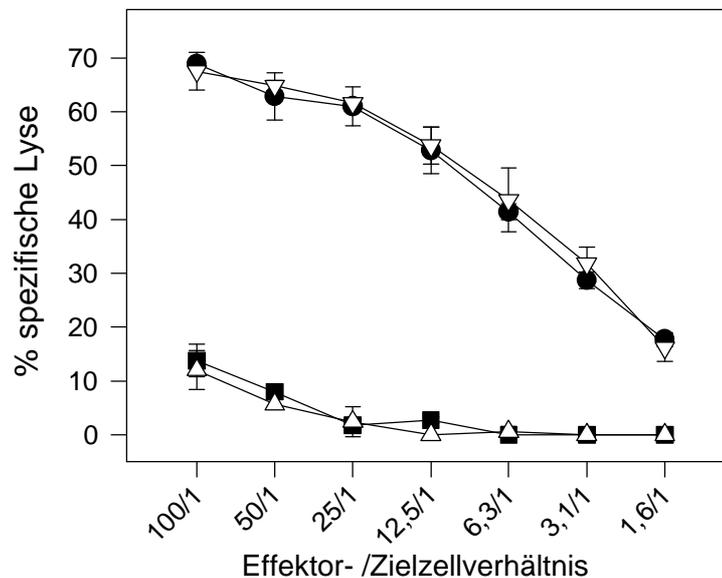


Abb. 23: Induktion einer primären ZTL Antwort mit QuilA als Adjuvans. IL-18KO und IL-18WT Mäuse wurden mit in Liposomen eingeschlossenes Ovalbumin und QuilA immunisiert und die resultierende ZTL Antwort mittels ^{51}Cr -Freisetzungstest überprüft. Aufgetragen sind prozentuale spezifische Lyse der Zielzellen gegen das Verhältnis von Effektor- und Zielzellzahl mit der Symbolzuordnung wie folgt: Effektorzellen aus IL-18WT Mäusen gegen EL-4 Zellen (■) oder gegen EG-7 Zellen (●) bzw. aus IL-18KO Mäusen gegen EL-4 Zellen (△) oder gegen EG-7 Zellen (▽). Die gezeigten Standardabweichungen leiten sich aus den Werten der Dreifachbestimmung ab.

Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, daß unter Verwendung von QuilA als Adjuvans die IL-18 Defizienz keinerlei negative Auswirkungen auf die Effizienz der induzierten Effektorzellen hat. Anders als bei Verwendung von ODN1668 als Adjuvans scheint in diesem Induktionsprotokoll eine absolute Unabhängigkeit von IL-18 zu herrschen.

2.3.7. Reaktivität von IL-18 defizienten Mäusen gegenüber ODN1668

Die Ergebnisse aus C.2.3.2., C.2.3.5. und C.2.3.6. führen zu der Schlußfolgerung, daß IL-18 zur Induktion einer primären ZTL Antwort nur essentiell ist, wenn als Adjuvans ODN1668 verwendet wird. Eine Unabhängigkeit von IL-18 herrscht bei Verwendung von QuilA als Adjuvans oder bei der Induktion mit Zellen allogenen Ursprungs ohne Adjuvans. Hieraus resultiert die Frage, ob die bekannten immunmodulatorischen Eigenschaften von ODN1668 in IL-18 defizienten Mäusen generell eingeschränkt sind. Die herausragende immunmodulatorische Eigenschaft von ODN1668 ist die Induktion einer TH1 polarisierten Immunantwort, welche durch Induktion der Produktion von IL-12 verursacht wird (Lipford et al., 1997). Weiterhin kommt es nach Injektion von ODN1668 zu einer Vergrößerung der Milz als auch der Lymphknoten, die im Abflußweg der Injektionsstelle liegen. Bei einer subcutanen Injektion in die Hinterfüße sind dies die poplietalen und inguinalen Lymphknoten. Die Zellen dieser Lymphknoten produzieren über einen Zeitraum von Tagen IL-12 und IFN- γ . Gerade die IFN- γ Produktion kann durch *in vitro* Stimulation über TZR-Vernetzung mittels anti-CD3 Antikörpern positiv beeinflusst und somit leichter meßbar werden. Die Quelle des produzierten IFN- γ sind vornehmlich CD8⁺-T-Zellen (persönliche Mitteilungen von G.B.Lipford). Anhand dieser Eigenschaften von ODN1668 sollte im folgenden die Reaktivität von IL-18KO Mäusen gegenüber ODN1668 überprüft werden.

2.3.7.1. Induktion von IL-12 und IFN- γ Produktion durch ODN1668 in Abhängigkeit von IL-18

Zur Überprüfung der immunmodulatorischen Fähigkeiten von ODN1668 in Abhängigkeit von IL-18 wurden je drei IL-18KO und IL-18WT Mäuse mit 5nmol ODN1668 in den rechten hinteren Fuß subcutan injiziert. Nach 7 Tagen wurden die poplietalen Lymphknoten entnommen, zur Einzelzellsuspension verarbeitet und die Zellzahl bestimmt. In Tabelle 9 findet sich der arithmetische Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung der einzelnen Zählergebnisse. Die Lymphknoten der linken, unbehandelten Seite wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Diese waren jedoch so klein, daß sie aus jeder Gruppe, vor

C. ERGEBNISSE

Herstellung der Einzelzellsuspension, zusammen gegeben wurden. Nach dem Auszählen wurde das Ergebnis durch drei dividiert und somit der Mittelwert bestimmt. Aus diesem Grund wurde keine Standardabweichung für diese Werte berechnet. Die ermittelten Zellzahlen waren wie folgt:

	+ / + rechts	- / - rechts	+ / + links	- / - links
Gesamtzellzahl	$10,4 \pm 2,1 \times 10^6$	$2,5 \pm 0,5 \times 10^6$	$0,1 \times 10^6$	$0,25 \times 10^6$

Tab. 9: Gesamtzellzahlen der poplietalen Lymphknoten nach *in vivo* Behandlung mit ODN1668. IL-18KO Mäuse sind als -/-, die IL-18WT Mäuse als +/- gekennzeichnet. Die Werte stellen das arithmetische Mittel \pm Standardabweichung mit N=3 dar.

Wie aus Tabelle 9 hervor geht, war eine eindrucksvolle Zunahme der Zellzahl in den poplietalen Lymphknoten durch die Einwirkung von ODN1668 beobachtbar, verglichen mit den Zellzahlen der Lymphknoten aus der unbehandelten Seite. Auffällig ist eine geringere Zunahme bei IL-18 defizienten Mäusen. Da die Teststatistik des T-Tests einen Wert von $p = 0,02$ liefert, kann der Unterschied im Vergleich zu Wildtykontrollen als statistisch signifikant gewertet werden. Die Ergebnisse aus C.2.3.2. scheinen diesem Befund zu widersprechen. Allerdings betrug die Einwirkzeit von ODN1668 in C.2.3.2. nur vier Tage und es wurden die poplietalen zusammen mit den inguinalen Lymphknoten gezählt. Diese unterschiedliche Behandlung könnte die Erklärung für die beobachtete Differenz der Zellzahlen sein.

Die Zellen wurden in Kultur genommen, wobei $0,25 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 96-Well U-Bodenplatte in 250 μ l Medium gegeben wurden. Die Inkubation erfolgte ohne und mit TZR-Stimulation durch Kreuzvernetzung über anti-CD3 Antikörper, die vorher an die Wellwandungen wie in B.8.1.1. beschrieben, adsorbiert waren. Zusätzlich wurden noch Inkubationen, mit 20 ng/ml rmuIL-18 durchgeführt, um einen eventuell auftretenden Defekt auf Rekonstitutionsmöglichkeit zu überprüfen. Die Zellen der linken Lymphknoten erfuhren ausschließlich eine Inkubation mit anti-CD3 Stimulation, da die Zellzahl nicht für weitere Ansätze ausreichte. Zur Bestimmung der produzierten Zytokinmengen wurden die Überstände nach 24 h für IL-12 bzw. nach 48 h für IFN- γ abgenommen und mittels ELISA analysiert.

Die Zellen der linken Lymphknoten produzierten nach Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern keine meßbaren Mengen der Zytokine IL-12 oder IFN- γ und sind deshalb in folgenden Graphiken nicht erfaßt.

In Abbildung 24 sind die gemessenen IL-12 Konzentrationen gezeigt. Zu bemerken ist, daß der hier verwendete ELISA die Summe der beiden Spezies IL-12p70 und IL-12(p40)₂ erfaßt.

C. ERGEBNISSE

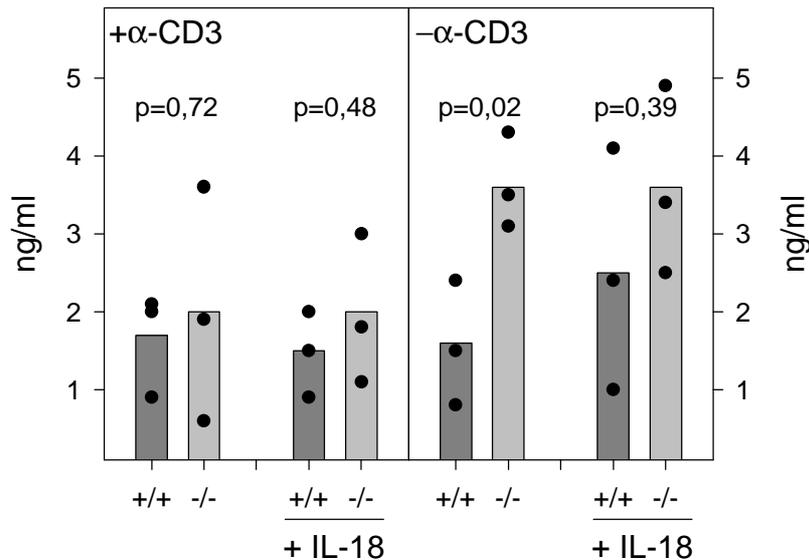


Abb. 24: IL-12 Produktion der Lymphknotenzellen. Gezeigt ist mit (+ α -CD3) und ohne (- α -CD3) TZR kreuzvernetzender anti-CD3 Antikörper Stimulation, sowie mit (+IL-18) und ohne Zugabe von rmuIL-18. Zellen aus IL-18KO Mäusen sind mit -/-, Zellen aus IL-18WT Mäusen mit +/+ gekennzeichnet. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte aus drei Mäusen dar, die geschlossenen Kreise die einzelnen Werte dazu. Zu jedem Balkenpaar ist der Wert der Teststatistik, ermittelt durch Verwendung des T-Tests, dargestellt.

Wie aus Abbildung 24 ersichtlich wird, ist die Konzentration von produziertem IL-12 nahezu identisch zwischen Zellen aus IL-18KO und IL-18WT Mäusen. Weiterhin spielt es, im Sinne von IL-12 Produktion, erwartungsgemäß keine Rolle, ob eine Stimulation der Zellen über TZR Kreuzvernetzung mittels anti-CD3 Antikörpern erfolgt oder rmuIL-18 anwesend ist. Lediglich bei der Inkubation ohne jeglichen externen Stimulus ergibt sich ein Unterschied, der sogar statistisch signifikant zu sein scheint. Bei der starken Streuung der Werte ist es jedoch fraglich, ob dieses Ergebnis von physiologischer Bedeutung ist.

Aus den gleichen Kulturüberständen wurde eine Bestimmung der IFN- γ Konzentrationen durchgeführt.

C. ERGEBNISSE

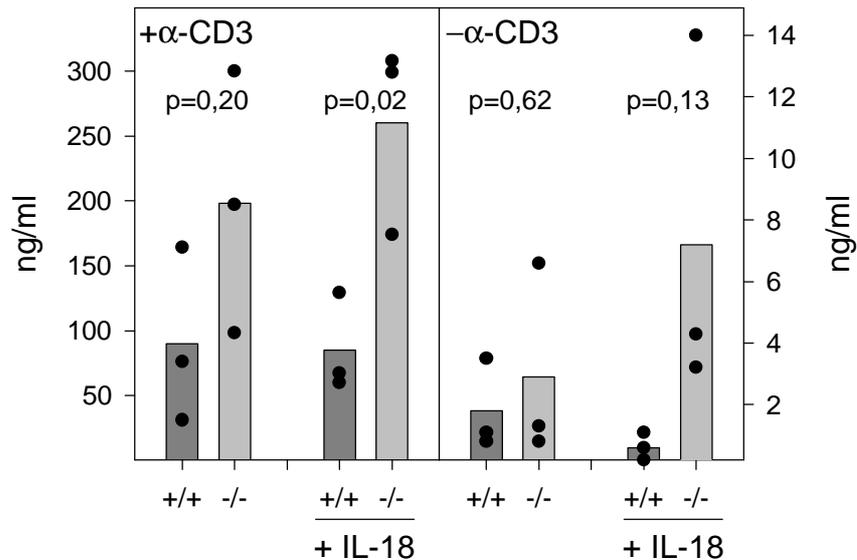


Abb. 25: IFN- γ Produktion der Lymphknotenzellen. Gezeigt ist mit (+ α -CD3) und ohne (- α -CD3) TZR kreuzvernetzender anti-CD3 Antikörper Stimulation, sowie mit (+IL-18) und ohne Zugabe von rmuIL-18. Zellen aus IL-18KO Mäusen sind mit -/-, Zellen aus IL-18WT Mäusen mit +/+ gekennzeichnet. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte aus drei Mäusen dar, die geschlossenen Kreise die einzelnen Werte dazu. Zu jedem Balkenpaar ist der Wert der Teststatistik, ermittelt durch Verwendung des T-Tests, dargestellt.

Aus dieser Abbildung leitet sich eine generell vergleichbare IFN- γ Produktion von Lymphknotenzellen aus IL-18 defizienten Mäusen und Wildtypkontrollen ab. Lediglich die Anwesenheit von rmuIL-18 führt zu einer stärkeren IFN- γ Produktion von Zellen aus IL-18KO Mäusen verglichen mit IL-18WT Mäusen, was sich bei der Anwesenheit von anti-CD3 Antikörpern sogar als statistisch signifikant erweist. Dieser Befund impliziert eine größere Sensitivität gegenüber IL-18 von Zellen aus IL-18KO Mäusen. Die Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern führt zur Produktion einer ca. 50fachen IFN- γ Menge, verglichen mit jener, die aus der Inkubation ohne TZR Stimulus resultiert. Diese Steigerung ist bei IL-18 defizienten Mäusen vergleichbar mit Wildtypkontrollen.

Aus diesen Ergebnissen leitet sich eine normale immunmodulatorische Wirkung von ODN1668, zumindest im Sinne der Induktion von IL-12 und IFN- γ Produktion, in IL-18KO Mäusen ab.

2.3.7.2. Induktion eines TH1 polarisierten Immungedächtnisses mit ODN1668 in Abhängigkeit von IL-18

Wie die Ergebnisse aus C.2.3.7.1. zeigen, ist die Induktion von IL-12 und IFN- γ durch ODN1668 unabhängig von IL-18, da IL-18KO Mäuse diesbezüglich normale Reaktivität zeigen. Wie frühere Experimente von G.B. Lipford zeigen, stammt durch ODN1668 induziertes IL-12 hauptsächlich aus DZ, während IFN- γ hauptsächlich von CD8⁺-T-zellen produziert wird (persönliche Mitteilung von G.B. Lipford).

Um IFN- γ Produktion von TH-Zellen, also CD4⁺-T-Zellen, zu induzieren und nachzuweisen, muß ein System benutzt werden, welches mit löslichen Holoantigen arbeitet. Ein solches Antigen wird von Antigen präsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen, prozessiert und über MHCII präsentiert. Dies führt dazu, daß nur CD4⁺-T-Zellen Antigen spezifisch aktiviert werden. Findet dieser Prozess in einem Milieu statt, welches eine TH1 Polarisierung bevorzugt, sollte es zur Generierung sogenannter „Memory“-Zellen des TH1 Typs kommen. Diese sollten dann mit einer Restimulation mit dem selben Antigen, in Anwesenheit von APZ, zur IFN- γ Produktion anregbar sein. Im folgenden wurde überprüft, ob dieses Prinzip von IL-18 abhängig ist, wenn zur Generierung des TH1 Polarisierung bevorzugenden Milieus, ODN1668 eingesetzt wird.

Jeweils zwei IL-18KO und IL-18WT Mäusen wurden 10 nmol ODN1668 pro Maus in die Hinterfüße subcutan injiziert. Diese Behandlung sollte zu einem Zytokinmilieu führen, welches eine TH1 polarisierte Immunantwort *in vivo* generiert. Nach 7 Tagen wurden den selben Mäusen 100 μ g Ovalbumin pro Maus wiederum in die Hinterfüße subcutan injiziert. Dies sollte zu einer spezifischen Immunantwort gegen Ovalbumin führen. Als Negativkontrolle wurden je zwei IL-18KO und IL-18WT Mäuse mitgeführt, die kein ODN1668 erhielten, sonst aber identisch behandelt wurden. Nach weiteren 7 Tagen wurden die poplietalen und inguinalen Lymphknoten geerntet und in Einzelzellsuspension überführt. Es wurde angenommen, daß nach diesem Zeitraum „Memory“-T-Zellen mit der Spezifität gegen Ovalbumin entstanden sind. Um nun die Polarisierung (TH1 oder TH2) dieser „Memory“-T-Zellen zu ermitteln, erfolgte eine Restimulation *in vitro* mit Ovalbumin, welches aufgrund der Anwesenheit von APZ prozessiert und via MHCII präsentiert werden sollte. Hierzu wurden 0,25 x 10⁶ Zellen pro Well einer 96-Well U-Bodenplatte in 250 μ l Medium gegeben. Alle Ansätze enthielten Ovalbumin mit einer Medienkonzentration von 300 μ g/ml, wobei ein Teil der Ansätze, mit Zellen aus IL-18KO Mäusen, zusätzlich 20 ng/ml rmuIL-18 enthielt. Nach 48h und 96h wurden die Überstände abgenommen und die

C. ERGEBNISSE

Konzentrationen von IFN- γ und IL-4 mittels ELISA bestimmt. Dadurch sollte eine Aussage bezüglich der Polarisierung der „Memory“-T-Zellen möglich sein. Hierbei entspräche IFN- γ Produktion einer TH1 und IL-4 Produktion einer TH2 Polarisierung. In keinem der Ansätze war IL-4 detektierbar. Die gemessenen IFN- γ Konzentrationen sind in folgender Abbildung gezeigt.

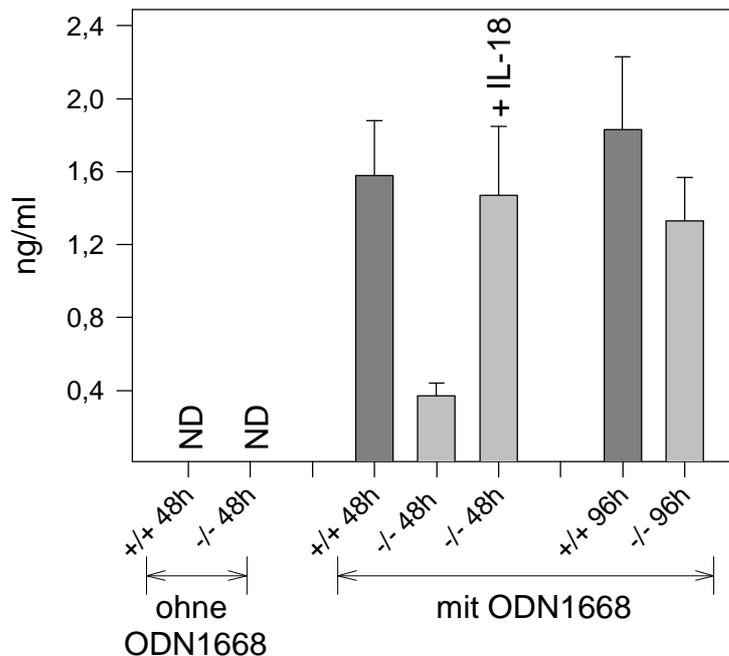


Abb. 26: IFN- γ Produktion der Lymphknotenzellen. Gezeigt ist die IFN- γ Konzentration in den Überständen nach 48h und 96h. Zellen aus IL-18KO Mäusen sind mit -/-, Zellen aus IL-18WT Mäusen mit +/+ gekennzeichnet. ND steht für nicht detektierbar. Die Ansätze, bei denen zusätzlich rmuIL-18 *in vitro* verwendet wurde, sind entsprechend gekennzeichnet. Die Balken stellen die arithmetischen Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dar (N=2).

Da keine detektierbaren Konzentrationen IL-4 produziert wurden, aber wie Abbildung 26 zeigt, eine deutliche IFN- γ Produktion nachzuweisen war, kann man eindeutig auf eine TH1 Polarisierung des Systems durch die geschilderte Behandlung schließen. Diese wurde durch ODN1668 ausgelöst, was durch das Fehlen der IFN- γ Produktion bei der Negativkontrolle, welche ohne Applikation von ODN1668 durchgeführt wurde, deutlich wird. Nach 48h ist eine deutlich verringerte IFN- γ Produktion von Zellen aus IL-18KO Mäusen, verglichen mit denen aus IL-18WT Mäusen, erkennbar. Dieser Defekt kann vollständig behoben werden, wenn nur während der *in vitro* Restimulation rmuIL-18 anwesend ist. Gleichsam zur Behebung dieses Defekts führt eine Verdoppelung der *in vitro* Inkubationszeit. Interessanterweise kommt es

C. ERGEBNISSE

hierbei nicht zur Steigerung der IFN- γ Konzentration im Vergleich zur Inkubation über 48h, was auf einen Sättigungseffekt schließen läßt.

Die Induzierung von „Memory“-T-Zellen des TH1 Typs mittels ODN1668 und löslichem Holoantigen scheint unabhängig von IL-18 zu sein. Obwohl Zellen aus IL-18KO Mäusen weniger IFN- γ als Zellen aus IL-18WT Mäusen innerhalb 48 h produzieren, läßt dieser Defekt nicht auf ein Problem bei der *in vivo* Induktion der TH1 polarisierten Immunantwort schließen, sondern vielmehr auf ein IFN- γ Produktionsproblem in der *in vitro* Restimulation.

D. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Interleukin-18 (IL-18) defizienter Mausstamm (IL-18KO) generiert und charakterisiert. Die Charakterisierung erfolgte im Hinblick auf Reaktionen gegenüber den bakteriellen Produkten Lipopolysaccharid (LPS) und *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB) in letalen Schockmodellen, als auch im Hinblick auf Funktionalität primärer zytotoxischer T-Lymphozyten (ZTL) Antworten. IL-18KO Mäuse waren fertil, entwickelten sich normal und zeigten auch im Alter von 70 Wochen keinerlei Schäden. Dies impliziert, daß IL-18 keinerlei Rolle beim generellen Entwicklungsprozeß der Maus spielt.

Überprüfung der Zerstörung des IL-18 Gens

Durch die in C beschriebene genetische Manipulation an embryonalen Stammzellen wurde ein Teil des Maus-IL-18 Gens durch eine für Neomycinresistenz kodierende Genkassette ersetzt. Das ersetzte Genfragment beinhaltet ein Exon komplett und Teile von zwei weiteren Exons. Die erwartete genetische Konfiguration in den IL-18KO Mäusen konnte durch die in C.1.4. Abb. 5 gezeigten genomischen Southern Blots verifiziert werden. Da das manipulierte IL-18 Gen noch mindestens vier nicht manipulierte Exons (Nummer eins bis vier) beinhaltet, wurde eine Überprüfung der IL-18KO Mäuse auf residuale IL-18 Expression eines etwaigen verkürzten Proteins durchgeführt. Durch den Einsatz eines kommerziell erhältlichen „RNase Protection Assays“ (RPA) konnte die Absenz von IL-18 mRNS in IL-18KO Mäusen gezeigt werden (siehe C.1.4., Abb. 5). Ein kommerziell erhältlicher „Enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA) fand Einsatz zum Nachweis der Absenz des Proteins IL-18 in IL-18KO Mäusen. Die Ergebnisse hierzu finden sich in C.2.2.3., Abb. 12, und zeigen, daß keine Expression von IL-18 in IL-18KO Mäusen detektierbar ist.

Diese Befunde verifizieren die vollständige Zerstörung der Funktionalität des IL-18 Gens in dem in dieser Arbeit generierten IL-18KO Mausstammes. Daher konnte dieser Mausstamm für Analysen der biologischen Funktion von IL-18 verwendet werden.

Verhalten von T-Zellen und natürlichen Killerzellen aus IL-18KO Mäusen

Die herausragende und als erstes entdeckte Eigenschaft von IL-18 ist die Induktion der Produktion von Interferon gamma (IFN- γ) (Okamura et al., 1995b). T-Zellen und natürliche Killer (NK) Zellen gelten als die hauptsächlichen Produzenten von IFN- γ , von welchem sie selbst wiederum in ihrer Aktivität stimuliert werden. Hierbei ist zu bemerken, daß die stimulatorische Wirkung von IFN- γ für T-Helfer-Zellen (TH) als auch für zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) beschrieben ist (Adolf, 1985; Billiau, 1996). Aufgrund dieser Zusammenhänge war es von Interesse, T-Zellen und NK-Zellen in ihrer generellen Funktionalität in IL-18KO Mäusen zu überprüfen.

T-Zellen aus IL-18KO-Mäusen zeigten lediglich eine erniedrigte Expression des T-Zellrezeptor-assoziierten Proteins CD3. Obwohl die *in vitro* Versuche in dieser Arbeit zeigten, daß diese T-Zellen normal auf eine Antikörper-vermittelte Kreuzvernetzung von CD3 und somit Stimulation via CD3 reagieren, kann eine Funktionseinschränkung der T-Zellrezeptorerkennung *in vivo* grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Die hier vorgelegten Befunde ähneln den Ergebnissen aus der Studie von Takeda et al., in denen ebenfalls ein IL-18 defizienter Mausstamm generiert und analysiert wurde (Takeda et al., 1998). Auch hier wurde von einer verminderten Expressionsintensität von CD3 auf T-Zellen aus IL-18KO Mäusen berichtet, und auch hier hatte dies bei *in vitro* Stimulationen keinerlei Konsequenzen für die Reaktivität dieser T-Zellen.

Ausführliche Studien betrieb Takeda et al. mit natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) aus IL-18KO Mäusen. Hierbei wurde eine deutlich verminderte zytotoxische Aktivität dieser Zellen gegenüber YAC-1 Zellen, im Vergleich zu Zellen aus Wildtypkontrollen, beschrieben. Alle Experimente wurden laut Angabe in dieser Veröffentlichung mit frisch gewonnen Milzzellen aus unbehandelten Mäusen durchgeführt (Takeda et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keinerlei zytotoxische Aktivität von Milzzellen aus unbehandelten Mäusen jeden Genotyps (IL-18WT oder IL-18KO) festgestellt werden. Diese Diskrepanz ist umso interessanter, als von Takeda et al. hergestellte Mäuse den selben genetischen Hintergrund (Sv129J X C57BL/6) ,wie die in der vorliegenden Arbeit generierten, besaßen. Die Ursache für diesen unterschiedlichen Befund konnte nicht geklärt werden und muß offen bleiben. Da IL-18 und Interleukin-12 (IL-12) Ähnlichkeiten in ihrer biologischen Funktion, im besonderen im Sinne von NK-Zellaktivierung aufweisen (Kobayashi et al., 1989; Stern et al., 1990; Hyodo et al., 1999; Tsutsui et al., 1996), ist die Arbeit von Magram et al. in diesem Zusammenhang von Bedeutung. Hier wurde ein Interleukin-12p40 defizienter (IL-12p40KO)

D. DISKUSSION

Mausstamm generiert und analysiert. Frisch gewonnene NK-Zellen dieser Mäuse wiesen eine reduzierte zytotoxische Aktivität gegen YAC-1 Zellen auf. Allerdings konnte dieser Defekt durch Inkubation dieser Zellen mit hohen Dosen Interleukin-2 (IL-2) zwischen Entnahme und Zytotoxizitätsassay völlig behoben werden (Magram et al., 1996). Auch Milzzellen aus IL-18KO Mäusen weisen nach Inkubation mit IL-2 zu Wildtypkontrollen identische, lytische Aktivität gegen YAC-1 Zellen auf (siehe C.2.5.1.). Da weder IL-18- noch IL-12-defiziente Mäuse einen schwerwiegenden Defekt ihrer NK-Zellpopulationen aufweisen, ist zu vermuten, daß sich IL-12 und IL-18 bei der Entwicklung und Aktivierung von NK-Zellen gegenseitig substituieren können. Diese Vermutung erfährt Unterstützung durch die diesbezüglichen Befunde an IL-12KO/IL-18KO-Mäusen, die defizient für beide Zytokine sind (Takeda et al., 1998).

Die Rolle von IL-18 aus dendritischen Zellen bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen

Dendritische Zellen (DZ) sind wichtige Effektoren der ersten Verteidigungslinie des Immunsystems. So reagieren sie beispielsweise durch Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, mit Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) und IL-12. Desweiteren ist nach einer solchen Stimulation die Hochregulation von Oberflächenmarkern wie MHCII, B7-1, B7-2 und CD40 zu beobachten, was einen aktivierten Zustand der DZ anzeigt (Verhasselt et al., 1997). Ähnliche Effekte kann man durch Stimulation von DZ mittels CD40-Ligation erzielen (Cella et al., 1996). Während die erste Art der Stimulation eine Invasion des Systems mit Gram-negativen Bakterien simuliert, ist die zweite Art der Stimulation mit einem Zell-Zell-Kontakt mit T-Zellen vergleichbar. Durch die Sekretion der oben erwähnten Zytokine üben DZ immunmodulatorische Funktion auf ihr zelluläres Umfeld aus.

Darüber hinaus übt auch das CpG-Motiv enthaltende Oligonukleotid 1668 (ODN1668) aktivierende Wirkung auf DZ aus. Neben der oben erwähnten Hochregulation von Oberflächenmarkern kommt es zur Sekretion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, wobei IL-12 eine herausragende Rolle bezüglich der Expressionsintensität einnimmt (G.B. Lipford, persönliche Mitteilungen). Wie in C.2.1. gezeigt, wird auch IL-18 von, mit ODN1668 stimulierten, DZ sekretiert. Da sich die Sequenz von ODN1668 von Sequenzcharakteristika bakterieller DNA ableitet (nicht methyliertes CpG-Motiv), kommt die Stimulation mit diesem Oligonukleotid der Simulation einer bakteriellen Invasion gleich.

D. DISKUSSION

Hieraus kann gefolgert werden, daß IL-18 Sekretion ein Bestandteil der immunmodulatorischen Funktion von DZ nach der Erkennung eines Gefahrensignals darstellt. Die Stimulation der DZ durch CD40-Ligation erzeugte IL-18 Sekretion in wesentlich erniedrigtem Umfang. Da die Stimulation via CD40 den Zell-Zell-Kontakt mit T-Zellen simuliert, impliziert dieser Befund, daß IL-18 Sekretion von DZ als eine direkte, frühe Reaktion auf Invasion angesehen werden kann.

ODN1668 besitzt Adjuvanseigenschaften im Sinne der Induktion einer primären zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) Antwort. Hierbei scheint die Wirkung von ODN1668 auf DZ eine wichtige Rolle zu spielen (G.B. Lipford, persönliche Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die durch ODN1668 ausgelöste Induktion einer primären ZTL Antwort in IL-18KO Mäusen mit deutlich erniedrigter Effizienz, verglichen mit Wildtypkontrollen, ausfällt. Durch die erfolgreiche Rekonstitution *in vivo* mit rekombinantem murinem IL-18 (rmuIL-18) kann der beobachtete Defekt ausschließlich auf IL-18 Defizienz zurück geführt werden. Dieser Befund demonstriert eine wesentliche Rolle von IL-18 bei der Induktion einer primären ZTL Antwort mit dem Adjuvans ODN1668.

Tomura et al. zeigten die konstitutive Expression des IL-18 Rezeptors (IL-18R) auf CD8⁺-T-Zellen. Die Expressionsdichte konnte durch Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern in Kombination mit IL-12 drastisch erhöht werden (Tomura et al., 1998). Dieser Befund legt nahe, daß ZTL IL-18-Reaktivität besitzen, und dies besonders in aktiviertem Zustand.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, daß DZ nur dann in der Lage sind, CD8⁺-T-Zellen zu aktivieren, wenn sie selbst in einen sogenannten konditionierten Zustand überführt wurden. Diese Konditionierung konnte durch CD4⁺-T-Zellhilfe, CD40-Ligation oder der Infektion mit Influenzaviren erreicht werden (Ridge et al., 1998). Da auch ODN1668 in der Lage ist, den Betriebszustand von DZ in Richtung Aktivierung zu verändern, liegt die Vermutung nahe, daß ODN1668 DZ zu CD8⁺-T-Zell aktivierenden Zellen konditioniert. Dies könnte die Erklärung für die beobachtete Adjuvanswirkung von ODN1668 sein. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß ODN1668 DZ zur Sekretion von IL-18 stimuliert und IL-18 wesentlich zur Induktion einer primären ZTL Antwort beiträgt. Zusammen mit den oben genannten Befunden ergibt sich die Vermutung, daß sich ein konditionierter DZ-Phänotyp auch durch die Fähigkeit, IL-18 zu sezernieren auszeichnet. Diese Vermutung wird gestärkt durch die Tatsache, daß CD40-Ligation als auch Infektion mit Influenzaviren die Konditionierung von DZ bewirkt (Ridge et al., 1998) und beide Arten der Stimulation

D. DISKUSSION

nachgewiesenermaßen DZ zur IL-18 Sekretion befähigen. Vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelialzellen beispielsweise reagieren durch CD40-Ligation mit der Aktivierung des Interleukin-1 Beta Converting Enzymes (ICE, Caspase-1) (Schonbeck et al., 1997) was eine wichtige Voraussetzung zur IL-18 Sekretion darstellt (Ghayur et al., 1997; Gu et al., 1997). Weiterhin wurde von Pirhonen et al. IL-18-Sekretion von Makrophagen, welche mittels GM-CSF zur Reifung gebracht wurden, nach Influenzainfektion gezeigt (Pirhonen et al., 1999). Obwohl beide Studien andere Zellen als DZ verwendeten, scheint generell CD40-Ligation als auch Infektion mit Influenzaviren IL-18 Sekretion oder zumindest ICE-Aktivierung auszulösen. Da beide Arten der Zellstimulation auch DZ aktivieren (Ridge et al., 1998), scheint die oben gemachte Vermutung um so wahrscheinlicher, daß sich ein konditionierter Phänotyp von DZ durch IL-18 Sekretion äußert. Wird nun das über MHCI präsentierte Antigen auf der DZ von einer CD8⁺-T-Zelle erkannt und führt somit zur Bindung dieser T-Zelle an die DZ über TZR-MHCI-Kontakt, könnte das von der DZ sekretierte IL-18 ein wesentliches Aktivierungssignal für die angebundene CD8⁺-T-Zelle sein, da wie oben erwähnt, CD8⁺-T-Zellen IL-18R exprimieren. Weitere Unterstützung erfährt diese These durch Arbeiten von Heuer et al., in denen Neuroblastomzellen durch Transfektion in IL-18 sekretierende Zellen verwandelt wurden. Die so transfizierten Zellen konnten T-Zellen aktivieren und wurden darauf hin *in vivo* eliminiert. Nicht-transfizierte Tumorzellen führten im Gegensatz dazu zu einer Etablierung des Tumors (Heuer et al., 1999). Eine indirekte Wirkung von IL-18 über die Induktion der Produktion von IFN- γ oder IL-12 ist extrem unwahrscheinlich, da die Induktion einer primären ZTL Antwort mit ODN1668 als Adjuvans sowohl in IFN- γ als auch in IL-12 defizienten Mäusen gelingt (gezeigt in C.2.3.4.).

Somit könnte der beobachtete Defekt von IL-18 defizienten Mäusen im Sinne der Induktion einer primären ZTL Antwort durch das Fehlen von IL-18 als aktivierender Signalweg von DZ zu CD8⁺-T-Zellen erklärt werden. Die Ergebnisse aus C.2.3. zeigen jedoch, daß IL-18 alleine nicht als Adjuvans dienen kann. Daraus kann geschlossen werden, daß obwohl IL-18 eine wichtige Rolle bei der Induktion einer primären ZTL Antwort mit ODN1668 als Adjuvans zukommt, es nur eines von mehreren Aktivierungsprinzipien für CD8⁺-T-Zellen zu sein scheint. Hierzu zählen weitere Signale, die aus Zell-Zell-Kontakt zwischen aktivierenden DZ und CD8⁺-T-Zellen und anderen lösliche Faktoren aus DZ resultieren. Diese Signale werden wahrscheinlich durch die alleinige Applikation von Antigen enthaltende Liposomen und IL-18 nicht induziert, was die Ergebnisse aus C.2.3.3. erklären könnte.

D. DISKUSSION

Wie in C.2.3.5. demonstriert, ist die Induktion einer primären ZTL Antwort in IL-18 defizienten Mäusen mit allogenen Zellen mit gleicher Effizienz wie in Wildtypkontrollen möglich. Dies kann dadurch erklärt werden, daß IL-18 Expression von den eingebrachten allogenen Zellen direkt erfolgt und damit die IL-18 Defizienz in den KO-Mäusen aufhebt.

Die essentielle Rolle von IL-18 scheint bei der Induktion einer primären ZTL Antwort nicht generell gegeben, sondern vielmehr auf das verwendete Adjuvans ODN1668 beschränkt zu sein. Die Immunisierung mit in Liposomen eingeschlossenem Antigen und dem Adjuvans QuilA (siehe C.2.6.) führt nämlich zu einer normalen ZTL Antwort in IL-18 defizienten Mäusen. Wie bei der Immunisierung mit allogenen Zellen scheint auch hier endogenes IL-18 entbehrlich zu sein. Die Adjuvanswirkung von QuilA ist noch nicht im Detail aufgeklärt. Jedoch scheint die aktive Komponente des Pflanzenextraktes QuilA das Molekül QS-21 zu sein. Dieses Saponin hat in gereinigter Form die gleichen Adjuvanseigenschaften wie QuilA. Essentiell für diese Adjuvansfunktion scheint eine Aldehydgruppe zu sein. Wird diese zerstört, verliert QS-21 seine Adjuvansfunktion komplett (Soltysik et al., 1995). Aldehydgruppen können mit primären Aminen zu Schiff'schen Basen, mit sekundären Aminen zu Halbaminale und letztlich zu Aminen kondensieren. Bei der Amination werden zwei, sekundäre Amine tragende Moleküle, über den Kohlenstoff der Aldehydgruppe kovalent miteinander verknüpft. Desweiteren können Aldehydgruppen mit Hydroxylgruppen zu Halbacetalen und weiter zu Acetalen kondensieren. Auch bei der Acetalbildung werden zwei, Hydroxylgruppen tragende, Moleküle kovalent verknüpft (Beyer and Walter, 1991). Sekundäre Amine genauso wie Hydroxylgruppen sind in Polypeptiden vorhanden. Somit ist es wahrscheinlich, daß das Triterpen QS-21 die Kreuzvernetzung von Proteinen wie z.B. Oberflächenrezeptoren verursacht, was zur Aktivierung der betroffenen Zellen führen kann. Tatsächlich konnte gezeigt werden, daß Agenzien, die Schiff'sche Basen induzieren, in vivo Kostimulationssignale auslösten und eine Immunreaktion signifikant verstärkten (Rhodes et al., 1995). Diese Art der Zellaktivierung durch unspezifische Kreuzvernetzungen von Rezeptoren, auf einer Zelle oder zwischen zwei Zellen, könnte somit die Erklärung für die Entbehrlichkeit von IL-18 bei dem QuilA-abhängigen ZTL Induktionsprotokoll sein. Es ist sogar vorstellbar, daß durch die kovalente Koppelung der α und β Kette des IL-18R ein IL-18-unabhängiges Signal ausgelöst wird und deshalb kein endogenes IL-18 für die Aktivierung der ZTL benötigt wird.

Die Rolle von IL-18 bei der Immunantwort nach Stimulation mit dem Oligonukleotid ODN1668

Da das ODN1668 als Adjuvans in IL-18KO Mäusen nicht wirkt, andererseits ODN 1668 in Normalmäusen zu einer ausgezeichneten Aktivierung von T- und B-Zellen führt (Lipford et al., 1997) war es von Interesse, die generelle Reaktionsfähigkeit von IL-18 defizienten Mäusen gegenüber dem ODN1668 zu überprüfen. In C.2.7. sind die Induktion der Produktion von IL-12 und IFN- γ nach *in vivo* Gabe von ODN1668 dargestellt. Erstaunlicherweise zeigten Zellen aus IL-18 defizienten Mäusen keinerlei Defekte bezüglich der induzierten Zytokinproduktion nach ODN1668 Gabe (siehe C.2.3.7.1.). Darüber hinaus bestätigte sich die von G.B. Lipford gemachte Beobachtung einer über Tage andauernden IL-12 und IFN- γ Produktion von Lymphknotenzellen nach Gabe von ODN1668 *in vivo* in C57BL/6 Mäusen (Lipford et al.,) auch in der IL-18 KO Maus. Da als Quelle von IL-12 DZ und von IFN- γ CD8⁺-T-Zellen wahrscheinlich sind (G.B. Lipford, persönliche Mitteilung), kann man davon ausgehen, daß beide Kompartimente in IL-18 defizienten Mäusen, direkt oder indirekt, von ODN1668 in normaler Größenordnung stimuliert werden. Auffällig ist, daß Zellen aus IL-18 defizienten Mäusen durch die Zugabe *in vitro* von rmuIL-18 bei unveränderter IL-12 Produktion eine wesentlich stärkere Steigerung der IFN- γ Produktion zeigen als Zellen aus Wildtypmäusen. Eine Erklärung hierfür könnte eine stärkere IL-18 Reaktivität von Zellen aus IL-18 defizienten Mäusen sein, da auch Takeda et al. entsprechende Beobachtungen, zumindest bei NK Zellen aus IL-18 defizienten Mäusen, beschrieb (Takeda et al., 1998).

Eine weitere Eigenschaft von ODN1668 ist die Stimulation des hämatopoetischen Systems, (Sparwasser et al., 1999) die sich zum Beispiel in der Induktion einer ausgeprägten Splenomegalie oder in lokalen Lymphknotenschwellungen äußert (Lipford et al., persönliche Mitteilung). Bei der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Injektionen mit ODN 1668 in die Hinterfüße sind die inguinalen und poplietalen Lymphknoten betroffen. Wie in Tabelle 9 unter C.2.3.7.1. gezeigt, ist die Zellzahl der poplietalen Lymphknoten der IL-18 defizienten Mäuse, nach ODN1668 Injektion statistisch signifikant kleiner als die entsprechender Wildtypkontrollen. Da IL-18 in der Lage ist, die Produktion des Chemokines IL-8 zu induzieren (Puren et al., 1998), wäre es denkbar, daß in IL-18 defizienten Mäusen die Chemokinproduktion, die die Lymphozytenmigration steuert, gestört ist und daß es damit zu einem unvollständigen Einstrom der Leukozyten in die lokalen Injektionsgebiete kommt.

Eine weitere charakteristische Eigenschaft von ODN1668 ist die präferentielle Induktion einer TH1 polarisierten Immunantwort (Lipford et al., 1997). Tatsächlich fand Takeda et al.

D. DISKUSSION

Hinweise für einen Defekt in der TH1 Polarisierung in IL-18KO Mäusen (Takeda et al., 1998). Mit den hier generierten IL-18 defizienten Mäusen wurde diese Beobachtung in einem von G.B. Lipford entwickelten Immunisierungsprotokoll (siehe C2.3.7.2.) überprüft. In diesem Ansatz ist durch das Zeitintervall von jeweils 7 Tagen zwischen der Injektion von ODN1668, der Gabe des Antigens Ovalbumin und der Lymphozytenisolation die Generierung von TH1 polarisierten „Memory“-T-Zellen in Normalmäusen gewährleistet. Die anschließende *in vitro* Restimulation mit löslichem Ovalbumin sollte überwiegend CD4⁺-„Memory“-T-Zellen stimulieren (GB. Lipford, persönliche Mitteilung). Nach der Restimulation von Lymphozyten aus IL-18KO Mäusen konnte keine IL-4, jedoch IFN- γ Produktion nachgewiesen werden, was für eine erfolgreichen TH1 Polarisierung der induzierten Immunantwort spricht. Nach einer Inkubation von 48 h zeigten die Zellen aus IL-18 defizienten Mäusen jedoch eine deutlich erniedrigte Fähigkeit IFN- γ zu produzieren. Durch Verdoppelung der Inkubationszeit oder durch Zugabe von rmuIL-18 *in vitro* konnte dieser Defekt wieder aufgehoben werden. Daraus kann geschlossen werden, daß die generelle TH1 Polarisierung durch ODN1668 in IL-18 defizienten Mäusen zwar erfolgt, die Höhe der induzierten IFN- γ Produktion jedoch reduziert ist. Dies könnte auf eine erniedrigte Zahl der TH1-„Memory“-Zellen aus IL-18 defizienten Mäusen zurückgeführt werden. Durch eine verlängerte Inkubationszeit könnte diese Unterzahl ausgeglichen werden (siehe Abb. 26). Auch die Gabe von rmuIL-18 könnte die in niedrigerer Frequenz vorliegenden, IFN- γ produzierende Zellen zu einer verstärkten Produktion des Zytokins anregen. IL-18 defiziente Mäuse scheinen also keinen generellen Defekt bei der Entwicklung einer TH1 polarisierten Immunantwort zu besitzen, lediglich die Intensität ihrer Antwort erscheint reduziert, da die verstärkende Wirkung von IL-18 für die IFN- γ Induktion fehlt.

Zusammen genommen zeigen die diskutierten Ergebnisse eine weitgehend normale Reaktivität von IL-18 defizienten Mäusen gegenüber ODN1668, zumindest in den in dieser Arbeit gewählten experimentiellen Ansätzen. Da diese Ansätze die Funktionalität von Antigen präsentierenden Zellen (APZ) als auch T-Zellen demonstrieren, kann davon ausgegangen werden, daß der in C.2.2. beschriebene Defekt von IL-18 defizienten Mäusen nicht auf eine generell unzureichende Reaktivität dieser Mäuse gegenüber ODN1668 zurück zu führen ist. Der Defekt bei der Induktion einer primären ZTL Antwort scheint also allein durch fehlendes IL-18 während der Induktionsphase der T-Zellen begründet.

Rolle von IL-18 im LPS-Schock

Die Pathogenese des septischen Schocks ist genauso komplex wie dramatisch im Verlauf. Zu Grunde hierfür liegt das septische Syndrom, welches durch bakterielle Infektionen ausgelöst wird. Eine dominante Rolle hierbei spielen konstitutive bakterielle Bestandteile und Exotoxine, die eine überschießende Reaktion des Immunsystems induzieren. Besonders genau untersucht ist hierbei der bakterielle Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid (LPS), das sich in der Zellwand von Gram-negativen Bakterien befindet. Durch Gabe von LPS kann ein letaler Schock in Experimentaltieren ausgelöst werden. (Glauser et al., 1991).

Die Reaktionen des Immunsystems auf LPS sind komplex und hängen sehr vom jeweiligen funktionellen Zustand des Immunsystems zum Zeitpunkt der Konfrontation mit LPS ab. Es konnten Zustände der Hyporeaktivität (LPS-Toleranz), als auch der Hyperreaktivität gegenüber LPS definiert werden (Freudenberg et al., 1998; Ziegler-Heitbrock, 1995). Die genauen Mechanismen, welche eine LPS-Toleranz induzieren, sind weitgehend unverstanden. Im Gegensatz hierzu ist der Mechanismus zur Induktion einer Hyperreaktivität gegenüber LPS zumindest in Grundzügen geklärt. Verschiedene Induktoren können eine Hyperreaktivität erzeugen: dazu gehören verschiedene Gram-positive wie Gram-negative Bakterien (Katschinski et al., 1992; Matsuura and Galanos, 1990), im speziellen hitzegetötetes *Propionibacterium acnes* (Katschinski et al., 1992), aber auch bakterielle Strukturelemente wie LPS selbst (Shwartzman-Reaktion) (Ozmen et al., 1994) oder bakterielle Produkte wie Superantigen (Hochholzer et al., 1997). All diese aufgezählten Induktoren einer Hyperreaktivität gegenüber LPS haben nachgewiesenermaßen die Eigenschaft, IFN- γ Produktion zu induzieren. Dieses Zytokin wiederum wurde als Schlüsselzytokin bei Erzeugung einer LPS-Hyperreaktivität identifiziert. In der klassischen Shwartzman-Reaktion beispielsweise, spielt IFN- γ eine Schlüsselrolle in der Sensibilisierungs- als auch in der Schockphase (Ozmen et al., 1994).

Erhöhte Resistenz gegenüber den letalen Effekten von LPS wurde bereits für verschiedene Gen-defiziente Mausstämmen beschrieben (Gutierrez-Ramos and Bluethmann, 1997). Im speziellen zeigten IFN- γ Rezeptor defiziente Mäuse (IFN- γ R-KO) erhöhte Resistenz gegenüber LPS, was sich durch die Erhöhung der letalen Dosis (LD₁₀₀) und weniger starke klinische Veränderungen wie Gewichtsverlust oder Leberschäden nach LPS Gabe äußerte (Car et al., 1994). Zusammen implizieren diese Befunde eine zentrale Rolle für IFN- γ bei der Reaktion auf LPS, besonders beim letalen Schock. Die Produktion von IFN- γ selbst ist direkt durch regulierende Zytokine wie IL-12 und IL-18 kontrolliert. Sowohl IL-12 als auch IL-18

D. DISKUSSION

können Produktion von IFN- γ induzieren, zusammen wirken sie synergistisch (Okamura et al., 1995b). So konnte sogar bei B-Zellen oder Makrophagen eine IFN- γ Produktion nachgewiesen werden, vorausgesetzt sie wurden mit IL-12 und IL-18 zusammen stimuliert. (Yoshimoto et al., 1997; Munder et al., 1998). Im Gegensatz dazu ist eine gemeinsame Stimulation mit IL-12 und IL-18 zur Induktion von IFN- γ Produktion in T- und NK-Zellen nicht notwendig (Trinchieri, 1995). Daher ist anzunehmen, daß die relative Bedeutung beider Zytokine während der Induktion einer Hyperreaktivität gegenüber LPS sehr wahrscheinlich sowohl von der Qualität des Induktors als auch der Zielpopulation des Stimulus abhängt.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von IL-18 für die Modulation der Reaktivität gegenüber LPS analysiert werden. Es konnte gezeigt werden, daß IL-18KO-Mäuse eine erhöhte Resistenz gegenüber den letalen Effekten von LPS aufweisen. Nach LPS Gabe konnte, im Gegensatz zu Wildtypmäusen, keine Freisetzung von IFN- γ festgestellt werden. Wurde jedoch ein T-Zell-abhängiger IFN- γ Induktor eingesetzt (das Superantigen SEB), konnte eine normale Reaktion gefunden werden, die sich in einer Expressionserhöhung von IL-2R β , IL-2R γ und CD14 auf Peritonealmakrophagen (F4/80⁺ PEC) aus IL-18KO-Mäusen manifestierte. Dies läßt auf eine normale Aktivierbarkeit der Makrophagen in IL-18KO Mäusen schließen. Damit wird belegt, daß die beobachtete, erniedrigte Reaktivität von IL-18KO Mäusen gegenüber LPS nicht auf eine generelle Suppression von Makrophagen zurückzuführen ist, sondern daß die fehlende Induktion der Produktion von IFN- γ für die erniedrigte Reaktivität gegenüber LPS verantwortlich ist. Diese Schlußfolgerung wird unterstützt durch die Befunde von Okamura et al., welche die Wichtigkeit von IL-18 während der LPS induzierten Schockphase nach der Sensibilisierung mit *P. acnes* demonstrieren (Okamura et al., 1995b).

Extrem hohe LPS-Dosen (1000 μ g) jedoch verursachten auch in IL-18KO Mäusen nahezu 100%ige Letalität, obwohl auch hier keinerlei IFN- γ Induktion nachweisbar war. Diese Beobachtung legt nahe, daß bei extrem hohen LPS-Dosen synergistische Effekte von proinflammatorischen Zytokinen ausreichen, Letalität auch ohne IFN- γ zu verursachen. Eine analoge Synergie wurde beispielsweise schon für TNF und IL-1 in einer Arbeit von Ozmen et al. beschrieben (Ozmen et al., 1994). Trotzdem bleibt festzuhalten, daß die durch niedrige LPS-Dosen verursachte Letalität strikt IFN- γ abhängig ist und damit in der IL-18 defizienten Maus deutlich reduziert ist.

D. DISKUSSION

T-Zellen, welche den V β 8-T-Zellrezeptor tragen, werden polyklonal durch die Kreuzvernetzung durch das Superantigen SEB aktiviert, das von MHCII Molekülen präsentiert wird. (Kappler et al., 1994; Miethke et al., 1992). In einer früheren Studie konnte vom Verfasser gezeigt werden, daß die Gabe von SEB Mäuse für eine definierte Zeitspanne für die letalen Effekte von LPS sensibilisiert (Superantigen vermittelte Shwartzman-ähnliche Reaktion). Diese Sensibilisierung hängt strikt von IFN- γ ab, das von T-Zellen produziert wird, da das Immunsuppressivum Cyclosporin A die Superantigen-vermittelte Sensibilisierung vollständig blockiert. Interessanterweise wurde die Sensibilisierung nicht blockiert, wenn IL-12 mit entsprechenden Antikörpern neutralisiert wurde. Dies läßt auf eine IL-12 unabhängige Induktion der Produktion von IFN- γ durch SEB schließen (Hochholzer et al., 1997). Intrazelluläre Zytokinfärbungen zeigten, daß die durch SEB aktivierten V β 8R⁺-T-Zellen die Quelle des induzierten IFN- γ waren. Die Induktion der Produktion von IFN- γ durch SEB als auch die daraus resultierende Sensibilisierung für LPS ist, wie in der vorliegenden Arbeit demonstriert, unabhängig von IL-18.

Die Messung der induzierten TNF Serumspiegel legte allerdings nahe, daß der Umfang der Superantigen-induzierten Sensibilisierung in IL-18 defizienten Mäusen niedriger ist als in entsprechenden Wildtypkontrollen. (siehe Abb. 14). Hier liegt die Vermutung nahe, daß in SEB-sensibilisierten IL-18KO Mäusen, aufgrund der unvollständigen, durch LPS induzierten IFN- γ Induktion, ein Verstärkermechanismus der TNF Produktion ausbleibt. Die erniedrigten TNF Spiegel haben allerdings keinerlei Auswirkung auf die Letalität, wie Abbildung 13 zeigt. Wie von Sakao et al. gezeigt, führt die Sensibilisierung mit *P. acnes* zu einer erhöhten Letalität und TNF Produktion nach anschließender LPS Administration in IL-18KO-Mäusen. Hierbei scheint IL-18 eine wichtige Rolle im Sinne von Dämpfung der Sensibilisierung zu spielen. Im Gegensatz hierzu ist die Sensibilisierung mit SEB unabhängig von IL-18. Vergleicht man die in dieser Arbeit dargestellten Befunde mit denen von Sakao et al. (Sakao et al., 1999), wird deutlich, daß die Bedeutung von IL-18 bei der Erzeugung einer Hyperreaktivität gegenüber LPS kritisch von der Qualität und der Zielstruktur des Induktors der Sensibilisierung abhängt.

Ein häufig benutztes Verfahren zur Induktion eines letalen Schocks stellt die Injektion von D-Galaktosamin vor oder mit der Gabe von LPS dar. Das Galaktosederivat D-Galaktosamin (D-GalN) verursacht das komplette Aufzehren des UTP-Pools in Hepatozyten, was zu deren transkriptionellem Arrest führt. Dadurch werden die Hepatozyten für eine, durch TNF

D. DISKUSSION

vermittelte Apoptose sensibilisiert. Gleichzeitig bleibt die schützende Akut-Phase-Antwort der Hepatozyten aus (Leist et al., 1994; Wendel, 1991). Bereits sehr geringe TNF Serumspiegel führen dann zu einer massiven Hepatozytenapoptose, was die resultierende hohe Letalität erklärt (Pfeffer et al., 1993). Die induzierte Letalität ist primär von TNF abhängig und nicht auf komplexe synergistische Wirkungen verschiedener Zytokine zurückzuführen. Das D-GalN-Modell stellt deshalb nur in Annäherung ein physiologisch relevantes Schockmodell dar.

IL-18KO Mäuse zeigten nach Gabe von D-GalN und LPS eine identische Letalität wie Wildtypkontrollen. Dies kann dadurch erklärt werden, daß die durch LPS induzierten TNF Serumspiegel in IL-18KO Mäusen normal, verglichen mit Wildtypkontrollen sind. Die erniedrigte, bzw. gar nicht vorhandene IFN- γ Produktion der IL-18 defizienten Mäuse spielt in diesem Schockmodell keine Rolle, ist jedoch essentiell für alle anderen Modelle, die in dieser Arbeit analysiert wurden (siehe C.2.2.2. und C.2.2.4.).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von IL-18 während der Immunantwort auf bakterielle Produkte wie Endotoxin (LPS) und dem Exotoxin SEB untersucht. Die Ergebnisse demonstrieren eine wichtige Funktion von IL-18 bei der Reaktion auf auf bakterielle Gefahrensignale wie z.B. LPS. Zusammen mit den Ergebnissen, die mit IL-12p40KO Mäusen im Bezug auf Induktion von IFN- γ durch LPS erhalten wurden (Magram et al., 1996), implizieren die hier vorgestellten Ergebnisse ein Zusammenwirken der Zytokine IL-12 und IL-18 bei der Induktion von IFN- γ durch LPS. Dies legt nahe, daß Makrophagen die Hauptproduzenten für IFN- γ nach einer Stimulation mit LPS darstellen, da Makrophagen zwar durch LPS aktiviert werden können, jedoch erst in der Gegenwart von IL-12 und IL-18 IFN- γ produzieren (Munder et al., 1998). Im Gegensatz dazu findet die Induktion der Produktion von IFN- γ durch eine direkte Aktivierung von T-Zellen mittels SEB völlig unabhängig von IL-12 und IL-18 statt.

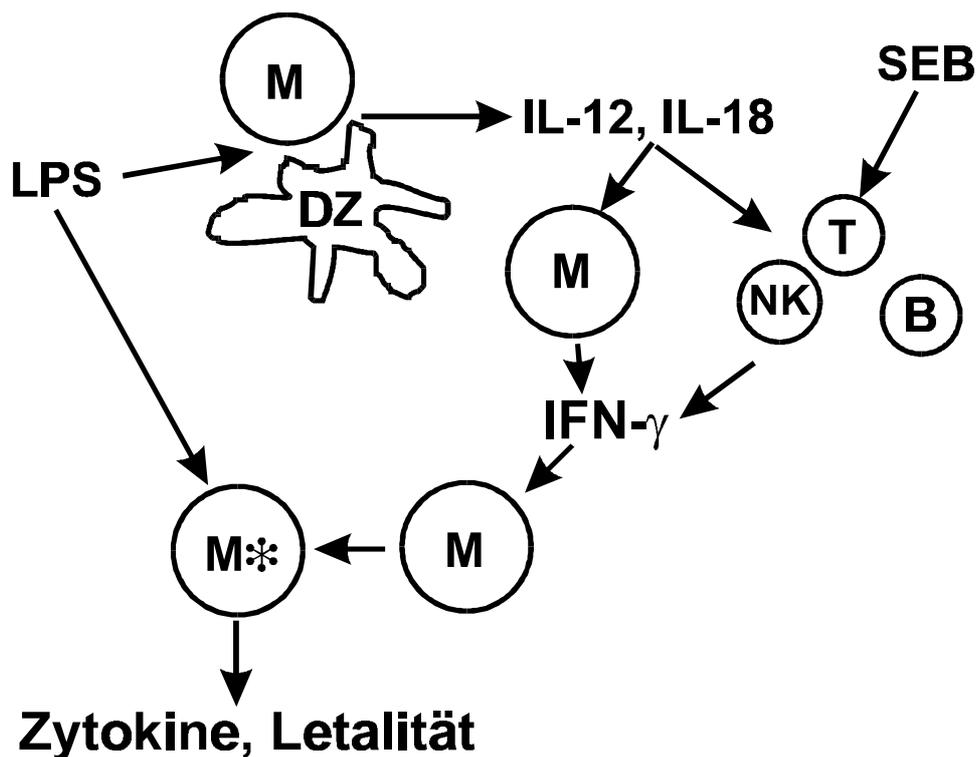


Abb. 27: Graphische Darstellung der Immunantwort nach Stimulation mit LPS oder SEB. LPS stimuliert Makrophagen (M) und dendritische Zellen (DZ) zur Sekretion von IL-12 und IL-18. Beide Zytokine wirken auf natürliche Killerzellen (NK), B-Zellen (B), Makrophagen (M) und T-Zellen (T) und verursachen die Sekretion von IFN- γ . SEB wirkt direkt auf T-Zellen und bedingt dadurch IFN- γ Sekretion, während LPS IFN- γ Sekretion über IL-12 und IL-18 aus Makrophagen bedingt. IFN- γ wiederum verwandelt ruhende Makrophagen (M) in aktivierte Makrophagen (M*). Diese reagieren nach Kontakt mit LPS mit überschüssiger Zytokinproduktion und verursachen dadurch Letalität.

Das in Abbildung 27 gezeigte Schema stellt schematisch den Ablauf der Reaktionen des Immunsystems nach Stimulation mit LPS oder SEB dar. Es erklärt die IL-18 und IL-12 Abhängigkeit der Immunantwort nach Stimulation mit LPS und die Unabhängigkeit von beiden Zytokinen nach Stimulation mit SEB, als auch die Rolle von IFN- γ bei der Sensibilisierung und der Immunantwort nach LPS Stimulation.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß IL-18 wichtige Funktionen sowohl in der natürlichen Immunität als auch in der spezifischen Immunität erfüllt. Somit stellt IL-18 ein Bindeglied zwischen beiden Schenkeln des Immunsystems dar. Daraus begründet sich auch die bekannte und in dieser Arbeit bestätigte Pleiotropie von IL-18. Die genaue Ausprägung dieses Pleiotropismus wird sich erst nach vollständiger Aufklärung der Rolle von IL-18 in sämtlichen Reaktionswegen des Immunsystems zeigen. Die Generierung der IL-18

D. DISKUSSION

defizienten Maus ist hierfür ein wichtiger Schritt, der für die weitere detaillierte Aufklärung und damit der Aufstellung eines übergreifendes Schemas essentiell ist.

E. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der biologischen Funktionen von Interleukin-18 (IL-18). Hierfür wurde ein IL-18 defizienter Mausstamm (IL-18KO) generiert und analysiert.

IL-18KO Mäuse entwickeln sich normal und zeigen auch bis zum Alter von 70 Wochen keinerlei auffallende Fehlentwicklungen. Die Mäuse sind fertil und anatomisch, als auch histologisch unauffällig. Durchflußzytometrische Analysen zeigten eine normale Verteilung von Lymphozyten in lymphoiden Organen. Lediglich eine leicht erniedrigte Expressionsintensität des T-Zellrezeptor assoziierten Moleküls CD3 konnte auf reifen T-Zellen festgestellt werden. In vitro Stimulationen der T-Zellen aus IL-18KO Mäusen durch CD3 Kreuzvernetzung mit entsprechenden Antikörpern zeigten jedoch eine normale Reaktivität dieser Zellen im Hinblick auf Proliferation und induzierter IL-2 Produktion.

IL-18KO Mäuse zeigten eine erniedrigte Empfindlichkeit gegenüber einem, durch hohe Dosen von Lipopolysaccharid (LPS) ausgelösten letalen Schock. Die Induktion von Interferon gamma (IFN- γ) nach LPS Gabe blieb in IL-18KO Mäusen völlig aus, wohingegen die Induktion von IL-12 und Tumor Nekrose Faktors (TNF) sich als normal erwies. Wurden die Mäuse jedoch durch Gabe von D-Galaktosamin für die letale Wirkung von TNF sensibilisiert, konnte in IL-18KO Mäusen durch LPS Gabe eine mit Wildtypkontrollen vergleichbare Letalität erzielt werden. Im Gegensatz zu LPS induzierte das bakterielle Superantigen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB), das auf eine Subpopulation der T-Zellen wirkt und dort IFN- γ Produktion induziert, in IL-18KO Mäusen normale IFN- γ Spiegel. Auch die durch SEB ausgelöste Expressionserhöhung der Oberflächenmarker CD14, CD122 (IL-2R β) und CD132 (IL-2R γ) auf peritonealen Makrophagen geschah in IL-18KO Mäusen in zu Wildtypkontrollen vergleichbarem Maß. Nach der Injektion von SEB wurden IL-18KO Mäuse für die letalen Effekte einer folgenden LPS Gabe sensibilisiert. Das Ausmaß dieser Sensibilisierung war in IL-18KO Mäusen im Hinblick auf Letalität vergleichbar zu Wildtypkontrollen. Allerdings waren die durch LPS erzeugten TNF Spiegel in SEB-sensibilisierten IL-18KO Mäusen signifikant niedriger als in identisch behandelten Wildtypkontrollen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Diese Ergebnisse lassen auf eine wichtige Rolle von IL-18 bei der Induktion von IFN- γ und damit der Regulation der natürlichen Immunität (einschließlich der Letalität nach LPS Gabe) schließen.

Bei der Analyse der Induktion von zytotoxischen T-Zell (ZTL) Antworten fiel auf, daß selbst unter Verwendung eines optimalen Adjuvans (Oligodesoxynukleotid (ODN) 1668), IL-18KO-Mäuse eine deutlich schwächere ZTL Antwort, verglichen mit Wildtypkontrollen, zeigten. Dieser Defekt war direkt auf die Abwesenheit von IL-18 zurück zu führen, da er einmal mit rekombinantem murinem IL-18 rekonstituierbar war und zum anderen weder IFN- γ noch IL-12 defiziente Mäuse bei identischer Immunisierung Defekte der ZTL Antwort zeigten. Erst durch Verwendung des Saponins QuilA als Adjuvans war eine annähernd normale ZTL Antwort in IL-18KO Mäusen zu beobachten. Die Immunisierung von IL-18KO Mäusen mit Zellen allogegenen Ursprunges, die IL-18 produzieren konnten, resultierte in einer normalen ZTL Antwort. Interessanterweise zeigten IL-18KO Mäuse keine Defekte der IL-12 und IFN- γ Induktion nach Gabe von ODN 1668. Ebenfalls war ein TH1 polarisiertes Immungedächtniss induzierbar. Da dendritische Zellen aus Normalmäusen IL-18 nach Stimulation mit ODN 1668 sezernierten, ist es, zusammen mit den oben beschriebenen Ergebnissen wahrscheinlich, daß IL-18 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch Antigen präsentierende dendritische Zellen spielt. Diese Rolle könnte auch bei der Antwort auf virale Infektionen, sowie in der Tumorummunologie und bei der Transplantatabstoßung wichtig sein.

F. Literaturverzeichnis

- Ada, G.** (1999). The coming of age of tumour immunotherapy. *Immunol.Cell Biol.* **77**, 180-185.
- Adolf, G.R.** (1985). Structure and effects of interferon-gamma. *Oncology* **42 Suppl 1:33-40**, 33-40.
- Bazan, J.F., Timans, J.C., and Kastelein, R.A.** (1996). A newly defined interleukin-1? [letter]. *Nature* **379**, 591-591.
- Beyer, H. and Walter, W.** (1991). Lehrbuch der organischen Chemie (S.Hirzel Verlag Stuttgart).
- Billiau, A.** (1996). Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv.Immunol.* **62**, 61-130.
- Car, B.D., Eng, V.M., Schnyder, B., Ozmen, L., Huang, S., Gallay, P., Heumann, D., Aguet, M., and Ryffel, B.** (1994). Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J.Exp.Med.* **179**, 1437-1444.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G.** (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J.Exp.Med.* **184**, 747-752.
- Fantuzzi, G., Puren, A.J., Harding, M.W., Livingston, D.J., and Dinarello, C.A.** (1998). Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase- 1)-deficient mice. *Blood* **91**, 2118-2125.
- Fantuzzi, G., Zheng, H., Faggioni, R., Benigni, F., Ghezzi, P., Sipe, J.D., Shaw, A.R., and Dinarello, C.A.** (1996). Effect of endotoxin in IL-1 beta-deficient mice. *J.Immunol.* **157**, 291-296.
- Freudenberg, M.A., Salomao, R., Sing, A., Mitov, I., and Galanos, C.** (1998). Reconciling the concepts of endotoxin sensitization and tolerance. *Prog.Clin.Biol.Res.* **397:261-8**, 261-268.
- Galanos, C., Freudenberg, M.A., and Reutter, W.** (1979). Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 5939-5943.
- Ghayur, T., Banerjee, S., Hugunin, M., Butler, D., Herzog, L., Carter, A., Quintal, L., Sekut, L., Talanian, R., Paskind, M., Wong, W., Kamen, R., Tracey, D., and Allen, H.** (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS- induced IFN-gamma production. *Nature* **386**, 619-623.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Glaccum, M.B., Stocking, K.L., Charrier, K., Smith, J.L., Willis, C.R., Maliszewski, C., Livingston, D.J., Peschon, J.J., and Morrissey, P.J.** (1997). Phenotypic and functional characterization of mice that lack the type I receptor for IL-1. *J.Immunol.* **159**, 3364-3371.
- Glauser, M.P., Zanetti, G., Baumgartner, J.D., and Cohen, J.** (1991). Septic shock: pathogenesis [see comments]. *Lancet* **338**, 732-736.
- Gu, Y., Kuida, K., Tsutsui, H., Ku, G., Hsiao, K., Fleming, M.A., Hayashi, N., Higashino, K., Okamura, H., Nakanishi, K., Kurimoto, M., Tanimoto, T., Flavell, R.A., Sato, V., Harding, M.W., Livingston, D.J., and Su, M.S.** (1997). Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* **275**, 206-209.
- Gutierrez-Ramos, J.C. and Bluethmann, H.** (1997). Molecules and mechanisms operating in septic shock: lessons from knockout mice. *Immunol.Today* **18**, 329-334.
- Heuer, J.G., Tucker-McClung, C., and Hock, R.A.** (1999). Neuroblastoma cells expressing mature IL-18, but not proIL-18, induce a strong and immediate antitumor immune response. *J.Immunother.* **22**, 324-335.
- Hochholzer, P., Blank, C., Bendigs, S., Wagner, H., and Heeg, K.** (1997). Superantigen-induced Shwartzman-like reaction: critical role for IFN γ . 4th Int. Congress on Trauma, Shock and Sepsis (Proceedings), 479-482.
- Hochholzer, P., Lipford, G.B., Wagner, W., Pfeffer, K., and Heeg, K.** (2000). Role of Interleukin-18 (IL-18) during Lethal Shock: Decreased Lipopolysaccharide Sensitivity but Normal Superantigen Reaction in IL-18-Deficient Mice. *Infect.Immun.* **68**, 3502-3508.
- Hyodo, Y., Matsui, K., Hayashi, N., Tsutsui, H., Kashiwamura Si, Yamauchi, H., Hiroishi, K., Takeda, K., Tagawa Yi, Iwakura, Y., Kayagaki, N., Kurimoto, M., Okamura, H., Hada, T., Yagita, H., Akira, S., Nakanishi2, K., and Higashino, K.** (1999). IL-18 Up-Regulates Perforin-Mediated NK Activity Without Increasing Perforin Messenger RNA Expression by Binding to Constitutively Expressed IL-18 Receptor. *J.Immunol.* **162**, 1662-1668.
- Kamijo, R., Le, J., Shapiro, D., Havell, E.A., Huang, S., Aguet, M., Bosland, M., and Vilcek, J.** (1993). Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.* **178**, 1435-1440.
- Kappler, J., White, J., Kozono, H., Clements, J., and Marrack, P.** (1994). Binding of a soluble alpha beta T-cell receptor to superantigen/major histocompatibility complex ligands. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **91**, 8462-8466.
- Katschinski, T., Galanos, C., Coumbos, A., and Freudenberg, M.A.** (1992). Gamma interferon mediates Propionibacterium acnes-induced hypersensitivity to lipopolysaccharide in mice. *Infect.Immun.* **60**, 1994-2001.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G.** (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J.Exp.Med.* **170**, 827-845.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Kuida, K., Lippke, J.A., Ku, G., Harding, M.W., Livingston, D.J., Su, M.S., and Flavell, R.A.** (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **267**, 2000-2003.
- Kunikata, T., Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Ushio, C., Yamauchi, H., Ikeda, M., Ikegami, H., and Kurimoto, M.** (1998). Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody. *Cell Immunol.* **189** , 135-143.
- Küsters, S., Gantner, F., Kunstle, G., and Tiegs, G.** (1996). Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. *Gastroenterology* **111**, 462-471.
- Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Germann, P.G., Tiegs, G., and Wendel, A.** (1994). Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest. *J.Immunol.* **153**, 1778-1788.
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., and et al** (1995). Mice deficient in IL-1 beta-converting enzyme are defective in production of mature IL-1 beta and resistant to endotoxic shock. *Cell* **80**, 401-411.
- Lipford, G.B., Bauer, M., Blank, C., Reiter, R., Wagner, H., and Heeg, K.** (1997). CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur.J.Immunol.* **27**, 2340-2344.
- Lipford, G.B., Bendigs, S., Heeg, K., and Wagner, H.** (2000) Poly-guanosine motifs costimulate antigen-reactive CD8 T cells while bacterial CpG-DNA affect T-cell activation via antigen-presenting cell-derived cytokines. *Immunology* **101**, 46-52.
- Lipford, G.B., Sparwasser, T., Bauer, M., Zimmermann, S., Koch, E.S., Heeg, K., and Wagner, H.** (1997). Immunostimulatory DNA: sequence-dependent production of potentially harmful or useful cytokines. *Eur.J.Immunol.* **27**, 3420-3426.
- Lipford, G.B., Wagner, H., and Heeg, K.** (1994). Vaccination with immunodominant peptides encapsulated in Quil A- containing liposomes induces peptide-specific primary CD8+ cytotoxic T cells. *Vaccine* **12**, 73-80.
- Magram, J., Connaughton, S.E., Warriar, R.R., Carvajal, D.M., Wu, C.Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D.A., and Gately, M.K.** (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* **4**, 471-481.
- Matsui, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Hyodo, Y., Hayashi, N., Hiroishi, K., Kawada, N., Okamura, H., Nakanishi, K., and Higashino, K.** (1997). Propionibacterium acnes treatment diminishes CD4+ NK1.1+ T cells but induces type I T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J.Immunol.* **159**, 97-106.
- Matsuura, M. and Galanos, C.** (1990). Induction of hypersensitivity to endotoxin and tumor necrosis factor by sublethal infection with Salmonella typhimurium. *Infect.Immun.* **58**, 935-937.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Miethke, T., Wahl, C., Heeg, K., Echtenacher, B., Krammer, P.H., and Wagner, H.** (1992). T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* **175**, 91-98.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., and Modolell, M.** (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J.Exp.Med.* **187**, 2103-2108.
- Okamura, H., Nagata, K., Komatsu, T., Tanimoto, T., Nukata, Y., Tanabe, F., Akita, K., Torigoe, K., Okura, T., Fukuda, S.** (1995a). A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect.Immun.* **63**, 3966-3972.
- Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., Hattori, K.** (1995b). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* **378**, 88-91.
- Ozmen, L., Pericin, M., Hakimi, J., Chizzonite, R.A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Gately, M., and Garotta, G.** (1994). Interleukin 12, interferon gamma, and tumor necrosis factor alpha are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *J.Exp.Med.* **180**, 907-915.
- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T.M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P.S., Kronke, M., and Mak, T.W.** (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **73**, 457-467.
- Pirhonen, J., Sareneva, T., Kurimoto, M., Julkunen, I., and Matikainen, S.** (1999). Virus infection activates IL-1 beta and IL-18 production in human macrophages by a caspase-1-dependent pathway. *J.Immunol.* **162**, 7322-7329.
- Puren, A.J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M.S., and Dinarello, C.A.** (1998). Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J.Clin.Invest.* **101**, 711-721.
- Rhodes, J., Chen, H., Hall, S.R., Beesley, J.E., Jenkins, D.C., Collins, P., and Zheng, B.** (1995). Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature* **377**, 71-75.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., and Matzinger, P.** (1998). A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-478.
- Robinson, D., Shibuya, K., Mui, A., Zonin, F., Murphy, E., Sana, T., Hartley, S.B., Menon, S., Kastelein, R., Bazan, F., and O'Garra, A.** (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* **7**, 571-581.
- Sakao, Y., Takeda, K., Tsutsui, H., Kaisho, T., Nomura, F., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S.** (1999). IL-18-deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock. *Int.Immunol.* **11**, 471-480.

F. LITERATURVERZEICHNIS

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor).

Schonbeck, U., Mach, F., Bonnefoy, J.Y., Loppnow, H., Flad, H.D., and Libby, P. (1997). Ligation of CD40 activates interleukin 1beta-converting enzyme (caspase- 1) activity in vascular smooth muscle and endothelial cells and promotes elaboration of active interleukin 1beta. *J.Biol.Chem.* **272**, 19569-19574.

Seimiya, H., Mashima, T., Toho, M., and Tsuruo, T. (1997). c-Jun NH2-terminal kinase-mediated activation of interleukin-1beta converting enzyme/CED-3-like protease during anticancer drug-induced apoptosis. *J.Biol.Chem.* **272**, 4631-4636.

Soltysik, S., Wu, J.Y., Recchia, J., Wheeler, D.A., Newman, M.J., Coughlin, R.T., and Kensil, C.R. (1995). Structure/function studies of QS-21 adjuvant: assessment of triterpene aldehyde and glucuronic acid roles in adjuvant function. *Vaccine* **13**, 1403-1410.

Sparwasser, T., Hultner, L., Koch, E.S., Luz, A., Lipford, G.B., and Wagner, H. (1999). Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J.Immunol.* **162**, 2368-2374.

Sparwasser, T., Koch, E.S., Vabulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W., and Wagner, H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* **28**, 2045-2054.

Stern, A.S., Podlaski, F.J., Hulmes, J.D., Pan, Y.C., Quinn, P.M., Wolitzky, A.G., Familletti, P.C., Stremlo, D.L., Truitt, T., and Chizzonite, R. (1990). Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **87**, 6808-6812.

Stoll, S., Jonuleit, H., Schmitt, E., Muller, G., Yamauchi, H., Kurimoto, M., Knop, J., and Enk, A.H. (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12- dependent Th1 development. *Eur.J.Immunol.* **28**, 3231-3239.

Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity.* **8**, 383-390.

Tomura, M., Maruo, S., Mu, J., Zhou, X.Y., Ahn, H.J., Hamaoka, T., Okamura, H., Nakanishi, K., Clark, S., Kurimoto, M., and Fujiwara, H. (1998). Differential capacities of CD4+, CD8+, and CD4-CD8- T cell subsets to express IL-18 receptor and produce IFN-gamma in response to IL-18. *J.Immunol.* **160**, 3759-3765.

Tone, M., Thompson, S.A., Tone, Y., Fairchild, P.J., and Waldmann, H. (1997). Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J.Immunol.* **159**, 6156-6163.

Trinchieri, G. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu.Rev.Immunol.* **13**, 251-276.

F. LITERATURVERZEICHNIS

- Tsutsui, H., Nakanishi, K., Matsui, K., Higashino, K., Okamura, H., Miyazawa, Y., and Kaneda, K.** (1996). IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J.Immunol.* **157**, 3967-3973.
- Verhasselt, V., Buelens, C., Willems, F., De Groote, D., Haeffner-Cavaillon, N., and Goldman, M.** (1997). Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J.Immunol.* **158**, 2919-2925.
- Wendel, A.** (1991). Reactive oxygen species, antiproteases, and cytokines in sepsis. *Klin.Wochenschr.* **69**, 969-974.
- Yoshimoto, T., Okamura, H., Tagawa, Y.I., Iwakura, Y., and Nakanishi, K.** (1997). Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **94**, 3948-3953.
- Zheng, H., Fletcher, D., Kozak, W., Jiang, M., Hofmann, K.J., Conn, C.A., Soszynski, D., Grabcic, C., Trumbauer, M.E., Shaw, A.** (1995). Resistance to fever induction and impaired acute-phase response in interleukin-1 beta-deficient mice. *Immunity.* **3**, 9-19.
- Ziegler-Heitbrock, H.W.** (1995). Molecular mechanism in tolerance to lipopolysaccharide. *J.Inflamm.* **45**, 13-26.

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. H. Wagner, Ph.D., vom Januar 1996 bis September 1999 durchgeführt.

An dieser Stelle gilt mein herzlicher Dank:

Herrn Prof. Dr. Dr. A. Bacher für die Übernahme der Doktorvaterschaft und seinen Anregungen zu dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Heeg für die ausgezeichnete Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Herrn Prof. Dr. H. Wagner, Ph. D. für die Arbeitsmöglichkeit an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer für die kompetente inhaltliche Hilfe und Bereitstellung der technischen Möglichkeiten zur Erzeugung des IL-18 defizienten Mausstammes.

Herrn G. B. Lipford, Ph.D. für die stete Bereitschaft zur fachlichen Diskussion.

Herrn Dr. S. Bauer und Herrn Dr. R. Lang für die vielen Anregungen zu dieser Arbeit.

Frau Sylvia Bendigs und Frau Susanne Hausmann für ihre Hilfsbereitschaft bei der täglichen Arbeit im Labor, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Frau Agnes Fütterer, Frau Ulrike Huffstadt, Frau Susanne Weiß, Frau Evi Schaller und Frau Karin Mink für ihre Hilfsbereitschaft bei der Erzeugung des IL-18 defizienten Mausstammes.

Allen Mitarbeitern des Instituts für das angenehme Arbeitsklima.