

Chirurgische Klinik und Poliklinik
Klinische Forschergruppe "Sepsis"
Klinikum rechts der Isar
Technische Universität München

**Charakterisierung der biologischen Effekte von
IL-22 und IL-22-BP und deren immunologische Rolle während
inflammatorischer Reaktionen**

Georg Ferdinand Weber

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
3. Priv.-Doz. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 10.07.2006 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 24.01.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Stand der Forschung	2
2.1	Modelle zur immunpathogenese der Sepsis	2
2.1.1	Hyperinflammations-Modell.....	2
2.1.2	SIRS-CARS-Modell.....	3
2.1.3	MARS-Modell.....	3
2.1.4	Prädispositions-Modell.....	4
2.2	Bedeutung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) in der Sepsis	5
2.3	MALP-2, LPS, SEB und CASP als entzündungsinduzierende Faktoren	6
2.3.1	Macrophage Activating Lipopeptide (MALP-2).....	6
2.3.2	Lipopolysaccharid (LPS).....	6
2.3.3	Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB).....	6
2.3.4	Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP).....	7
2.4	Mechanismen der Akut-Phase-Reaktion	7
2.5	Interleukin-22 und Interleukin-22-Bindeprotein, Rezeptoraufbau und Signaltransduktion	9
2.6	Interleukin-Fusionsproteine	12
2.7	Fragestellung	14
3.	Material und Methoden	15
3.1	Bezugsquellnachweis	15
3.1.1	Chemikalien, Filter, Filme, Reagenzien, Enzyme.....	15
3.1.2	Reagenziensammlungen ("Kits").....	18
3.1.3	Gerätschaften.....	18
3.1.4	Versuchstiere.....	19
3.2	Medien und Puffer	20
3.2.1	Medien für <i>E.coli</i> -Bakterien.....	20
3.2.2	Medien und Puffer für die Zellkultur.....	20
3.2.3	Stammlösungen und Puffer.....	22
3.3	Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	24
3.4	Molekularbiologische Methoden	27
3.4.1	Vektoren und Plasmide.....	27
3.4.2	RNS-Präparation.....	27
3.4.3	cDNS-Synthese.....	28
3.4.4	DNS-Amplifikation mittels PCR.....	28
3.4.5	DNS-Amplifikation mittels RT-PCR.....	29

Inhaltsverzeichnis

3.4.6	Klonierung von PCR-Produkten in verschiedene Vektoren	30
3.4.7	Plasmidpräparation: analytisch (Mini-Prep) und präparativ (Maxi-Prep)	30
3.4.8	Verdau, Dephosphorylierung, Auftrennung, Isolierung und Ligation von DNS-Fragmenten	31
3.4.9	DNS-Sequenzierung	32
3.4.10	Transformation, Herstellung und Lagerung kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien und bakterieller Wirtsstämmen	32
3.5	Herstellung von Fusionsproteinen	33
3.5.1	Transiente Transfektion humaner 293T-Nierenepithelzellen	33
3.5.2	Analyse der Expression der Fusionsproteine	33
3.5.3	Aufreinigung im analytischen Maßstab	33
3.5.4	Präparative Aufreinigung und Aufkonzentration der Fusionsproteine	34
3.6	Proteinanalytische Methoden	35
3.6.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
3.6.2	Färbung von Proteinen im Gel mit Coomassie	36
3.6.3	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen	36
3.6.4	Western Blot Analyse	36
3.7	Zellbiologische Methoden	38
3.7.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	38
3.7.2	LPS-Kontaminationstest	38
3.7.3	Detektion der Stat-3-Phosphorylierung nach Stimulation verschiedener Zelllinien	38
3.7.4	Blockierung der Stat-3-Phosphorylierung	39
3.7.5	Gewinnung von RNS aus stimulierten Zelllinien	39
3.7.6	Durchflußzytometrie, "Fluorescens Activated Cell Sorter" (FACS)	39
3.7.7	"Enzym-linked Immunosorbent Assay" (ELISA)	40
3.7.8	Proliferations-Assay	40
3.7.9	Apoptose-Assays	40
3.7.9.1	Annexin V-Färbung	41
3.7.9.2	Messung der Caspase 3- und p38-Aktivierung	41
3.8	Tierexperimentelle Methoden	42
3.8.1	Versuche unter Verwendung immunogener Mediatoren	42
3.8.2	Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)	42
3.9	Ex vivo-Analysen	44
3.9.1	Peritonealmakrophagen	44
3.9.2	Isolierung und Herstellung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark	44
3.9.3	Serumgewinnung	45

3.9.4	Herstellung von Organextrakten zur Zytokinbestimmung.....	45
3.9.5	Phago-Test.....	45
3.9.6	Analyse von reaktiven Sauerstoffradikalen ("oxidative burst").....	45
3.9.7	Bestimmung der Bakterienzahlen in peripheren Organen.....	46
3.9.8	Isolierung von B- und T-Zellen aus der Milz mit magnetischen "beads".....	46
3.9.9	Zellsortierung im Hochleistungsdurchflußzytometer MoFlo.....	46
3.10	Statistische Auswertung.....	47
4.	Ergebnisse.....	48
4.1	Effekte entzündungsfördernder Substanzen oder eines polymikrobiellen Stimulus auf die Regulation von IL-22 <i>in vivo</i>.....	48
4.1.1	Untersuchung verschiedener Entzündungsparameter im Serum.....	48
4.1.2	Analyse der Expression von IL-10, IL-10R2, IL-22 und IL-22R1 mittels RT-PCR.....	50
4.1.3	Expression von IL-22 in verschiedenen Zellen.....	53
4.2	Biologische Effekte von IL-22 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>.....	54
4.2.1	IL-22-Rezeptor-Screening mittels RT-PCR.....	54
4.2.2	Nachweis der intrazellulären Aktivierung verschiedener Zelllinien.....	55
4.2.3	Untersuchung Zellproliferation.....	56
4.2.4	Apoptose-Induktion.....	57
4.2.4.1	Aktivierung von Annexin V.....	57
4.2.4.2	Aktivierung von Caspase 3 und p38.....	58
4.2.5	Verminderung der AKT- und Erk1/2-Aktivität nach IL-22-Stimulus.....	59
4.2.6	Expression von IL-22 in Darmtumoren.....	61
4.3	Herstellung von IL-22- und IL-22-BP-Fusionsproteinen.....	62
4.3.1	Klonierung der Vektor-DNA von IL-22 Fc und IL-22-BP Fc.....	62
4.3.2	Transfektionsanalyse.....	64
4.3.3	Aufreinigung und Konzentration der Fusionsproteine aus Zellüberständen.....	65
4.3.4	LPS-Kontaminationstest.....	67
4.4	Analyse der biologischen Aktivität der Fusionsproteine <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>.....	68
4.4.1	Analyse der biologischen Aktivität <i>in vitro</i>	68
4.4.1.1	Untersuchung der Hepatoma 1-6-Zelllinie auf die IL-22R1 Rezeptorkette mittels PCR.....	68
4.4.1.2	Untersuchung von IL-22 Fc und IL-22-BP Fc im STAT-3-Assay.....	69

4.4.1.3	Umklonierung von IL-22 Fc in IL-22 ohne Fc (IL-22 myc).....	71
4.4.2	Analyse der biologischen Aktivität <i>in vivo</i>	72
4.4.2.1	IL-22-BP Fc als immunmodulierender Mediator.....	72
4.4.2.2	IL-22-BP Fc bedingt eine erhöhte Zell- akkumulation in der Bauchhöhle.....	74
4.4.2.3	Verminderte systemische bakterielle Belastung nach Vorbehandlung mit IL-22-BP Fc.....	75
4.4.2.4	Vorbehandlung mit IL-22-BP Fc resultiert in einer erhöhten Phagozytoseaktivität der Leukozyten.....	75
4.4.2.5	Geringerer Nierenorganschaden bei IL-22-BP Fc behandelten Mäusen.....	76
4.4.2.6	IL-22-BP Fc erhöht die Permeabilität des Lungengewebes.....	77
4.4.2.7	IL-22-BP Fc vermindert die Überlebensrate in einem Sepsis-Modell (CASP).....	78
5.	Diskussion	79
5.1	Induktion von IL-22 durch Stimulation mit MALP/LPS/SEB.....	80
5.2	Biologische Effekte von IL-22 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	83
5.3	Herstellung funktionell aktiver Fusionsproteine.....	86
5.4	Effekte von IL-22-BP Fc in einem Sepsis-Modell (CASP).....	88
5.5	Ausblick.....	90
6.	Zusammenfassung	92
7.	Literaturverzeichnis	94
8.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	104
9.	Abkürzungsverzeichnis	106
	Publikationsliste	109
	Danksagung	110
	Lebenslauf	111

1. Einleitung

Die postoperative Sepsis ist eine gefürchtete Komplikation nach visceral-chirurgischen Eingriffen. Oftmals versterben Patienten nicht an ihrem Grundleiden, sondern an den Komplikationen nach einer erfolgreichen Operation.

In den letzten Jahrzehnten konnte die Mortalitätsrate vor allem der schweren postoperativen Sepsis nur unwesentlich gesenkt werden. Die derzeitige Therapie der visceral ausgehenden Sepsis besteht aus der chirurgischen Fokussanierung, der Antibiotikagabe zur Eliminierung der Bakteriämie und geeigneter intensiv-medizinischer Maßnahmen. Trotz der heute fortgeschrittenen, intensiv-medizinischen Therapiemöglichkeiten zur Stabilisierung vitaler Kreislauf-, Gerinnungs- und metabolischer Parameter sind die Überlebenschancen für Patienten, die an einer postoperativen Sepsis erkranken, nach wie vor zu gering. Die Mortalität liegt derzeit bei ca. 40% (Emmanuilidis *et al.*, 2002). Grund hierfür ist vor allem die noch unzureichend verstandene Pathogenese und Immunregulation während des septischen Geschehens, die eine effektive therapeutische Intervention verhindert.

Ausgehend von der postoperativen Peritonitis kommt es durch Infiltration regionärer Lymphbahnen und Lymphknoten zu einer massiven, systemischen Bakterienverschleppung. Infolge der Ausschwemmung von Bakterien oder infizierter Thromben kommt es nachfolgend zu einer dem septischen Schock zugrunde liegenden Sepsis, die mit Fieber assoziiert ist und durch metabolische, hämostatische und hormonale Entgleisungen zur Akkumulation von Entzündungszellen, Kapillargefäßschädigung und Vasodilatation führt (Heidecke *et al.*, 2000). Dabei ist der septische Schock die gefährlichste Ausprägung der Sepsis. Letztendlich führt die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC), die Schocklunge (ARDS) und das Multiorganversagen zum Tod.

Ein Ansatz der Sepsisforschung ist es, den komplexen immunologischen Abläufen im Vorfeld und während des Sepsisgeschehens auf den Grund zu gehen, um die Hierarchie der interagierenden Immunmodulatoren identifizieren zu können und darauf aufbauend in Sepsismodellen neue Therapieansätze zu entwickeln.

2. Stand der Forschung

Wie das Immunsystem in der Sepsis im Einzelnen reguliert wird, ist noch weitgehend unbekannt. Frühe Studien haben nahe gelegt, dass eine überschießende Immunantwort des Körpers für die klinische Symptomatik verantwortlich ist. Dies wurde anhand einer Überproduktion von Immunmediatoren im Rahmen einer exzessiven inflammatorischen Reaktion auf Endo- und Exotoxine nachgewiesen (van der Poll *et al.*, 1999). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Immunsuppression eine wichtige Rolle in der Entstehung der Sepsis spielt. Dies konnte durch eine stark verminderte Fähigkeit von Immunzellen zur Produktion von Immunmediatoren wie IL-1, IL-6, IL-12 und TNF- α sowie eine verminderte Expression von MHC Klasse-II Molekülen (Munoz *et al.*, 1991; Randow *et al.*, 1995; Heidecke *et al.*, 2000; Weighardt *et al.*, 2000) durch Monozyten septischer Patienten nachgewiesen werden. Es scheint, dass sowohl eine massive Aktivierung pro-inflammatorischer Kaskaden als auch eine Immunsuppression die Pathogenese der Sepsis beeinflussen kann (Annane *et al.*, 2005).

Welche dieser beiden Reaktionen des Immunsystems im Verlauf der Sepsis vorliegen ist für präventive bzw. therapeutische Maßnahmen von größter Bedeutung.

2.1 Modelle zur Immunpathogenese der Sepsis

Derzeit gibt es verschiedene Modelle zur Beschreibung immunologischer Vorgänge bei der Sepsis. Erkenntnisse hieraus wurden in den letzten Jahren auch Grundlage verschiedener Therapieansätze zur Behandlung der postoperativen abdominalen Sepsis. Im einzelnen sind dies das Hyperinflammations-Modell, das SIRS-CARS-Modell, das MARS-Modell und das Prädispositions-Modell.

2.1.1 Hyperinflammations-Modell

Diesem Modell liegt zu Grunde, dass die in der Sepsis durch gram-negative sowie gram-positive Bakterien freigesetzten Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharid, LPS) zu einer unkontrollierten, überschießenden Immunantwort des Organismus führen. Dies hat den septischen Schock zur Folge, der durch die massive Freisetzung zahlreicher Mediatoren wie TNF- α , IL-1 oder IFN- γ ausgelöst wird. Zudem wirken neben weiteren Zytokinen und Proteasen auch reaktive Sauerstoffspezies wie O_2^- , $O_2^{\cdot-}$ und Stickoxide. Die dadurch induzierte, zunächst lokal begrenzte, physiologisch regulierte und nützliche Abwehrreaktion führt bei einer überschießenden Reaktion der Immunantwort schließlich zu einem durch

intravaskuläre Gerinnung und Blutdruckabfall charakterisierten Multiorganversagen, das vor allem Lunge, Leber und Nieren betrifft und dosisabhängig zum Tode führt.

2.1.2 SIRS-CARS-Modell

Das SIRS-CARS-Modell geht davon aus, dass das oben dargestellte Hyperinflammations-Modell möglicherweise eine vereinfachte Sichtweise der Pathogenese der Sepsis darstellt (Docke *et al.*, 1997). In diesem Modell sind dabei mehrere Reaktionen involviert. Demnach sind im Verlauf der Sepsis zwei Phasen zu unterscheiden (**Abb. 1**). Die erste Phase wird durch die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren bestimmt, deren unkontrollierte Freisetzung zur Hyperinflammation beitragen können (SIRS). In Reaktion hierauf werden außerdem anti-inflammatorische Mediatoren in einer zweiten Phase produziert (CARS). Dies kann jedoch ebenfalls unkontrolliert verlaufen und in einer generalisierten Hypoinflammation münden. In diesem Zustand kann es zu einer Immunsuppression kommen, die durch eine Deaktivierung z.B. von Monozyten charakterisiert ist (Kox *et al.*, 2000). Die Immunsuppression verläuft durch ein Fehlen protektiver Immunreaktionen letal.

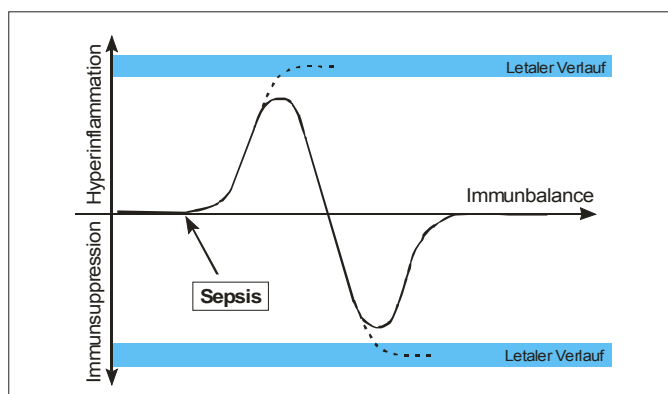


Abb. 1:

*SIRS-CARS-Modell. Die Abbildung zeigt die phasenhaften Reaktionen des Immunsystems nach einem Sepsisreiz, die in Extremphasen letal enden können (modifiziert nach Kox *et al.*, 2000).*

2.1.3 MARS-Modell

Das MARS-Modell beschreibt abwechselnde Phasen von pro- und anti-inflammatorischen Reaktionen im Sinne eines gemischten antagonistischen Reaktionssyndroms (mixed antagonistic response syndrome). Dieses Nebeneinander von systemischer Inflammation und Anti-Inflammation wurde erstmals von Bone *et al.* (1996) beschrieben. Dabei wirken immunmodulatorische Mediatoren zur gleichen Zeit in alternierender Weise. Das hat zur Folge, dass sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Reaktionen parallel ablaufen (Buras *et al.*, 2005).

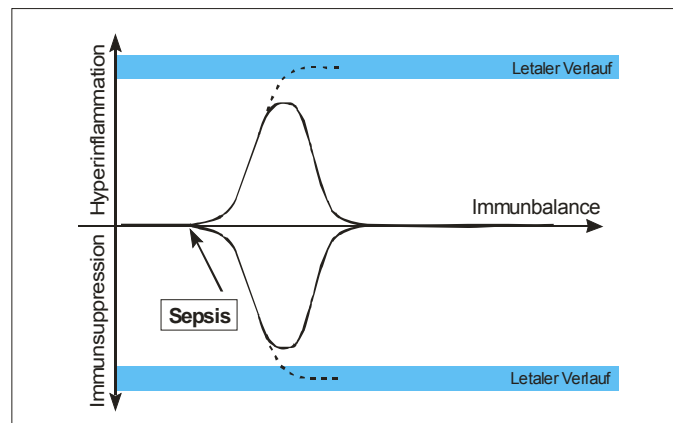


Abb. 2:

MARS-Modell. Die Abbildung zeigt die zeitgleichen Reaktionen des Immunsystems nach einem Sepsisreiz, die in Extremphasen letal enden können (modifiziert nach Bone *et al.*, 1996).

2.1.4 Prädispositions-Modell

Obige Verlaufsformen können sich entwickeln, wenn die Erregerabwehr durch prädisponierte Immunsuppression geschwächt ist. Nach dem Hyperinflammationsmodell ist die Hemmung der Monozytenfunktion als kompensatorisches Ereignis Folge der überschießenden proinflammatorischen Immunantwort während der Sepsis. Ein weiterer Erklärungsansatz ist ein Mangel monozytärer Zytokinproduktion in der frühen Phase der Sepsis (Weighardt *et al.*, 2000; Novotny *et al.*, 2006). Grundlage dieser Hypothese ist eine unmittelbare Suppression der Monozytenfunktion bereits vor oder als Antwort auf eine Infektion. Untersuchungen an Patienten mit postoperativer Sepsis haben gezeigt, dass die Monozytenfunktion in Form einer verminderten IL-12 Sekretion schon vor der Operation gehemmt war (Hensler *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse korrelieren mit der verminderten Sekretion von IL-12 im frühen Verlauf der Sepsis. Anhand dieser Ergebnisse wurde ein Modell erstellt, welches eine Immunsuppression als primäre Folge oder als Ursache der Pathogenese der Sepsis ansieht (**Abb. 3**).

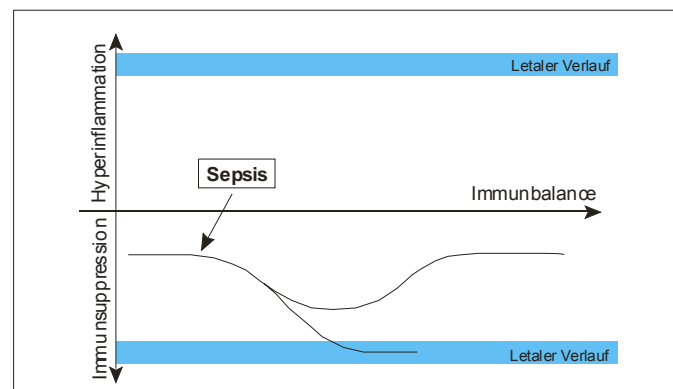


Abb. 3:

Prädispositions-Modell. Dieses Modell beschreibt eine Immunsuppression während der Sepsis.

2.2 Bedeutung der Toll-like Rezeptoren (TLRs) in der Sepsis

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass die Rezeptorklasse der TLRs als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle in der Infektabwehr während der Sepsis spielt. Grund hierfür ist die Eigenschaft der TLRs, die Erkennung mikrobieller Strukturen (LPS, Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren) in zelluläre Signale zu übersetzen. In Folge dessen werden akute Abwehrleistungen eingeleitet und die nachfolgende Aktivierung der humoralen und zellulären Immunität gesteuert. Toll-like Rezeptoren bestehen aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne, die auf Grund ihrer Homologie zum IL-1-Rezeptor auch als TIR-(Toll/IL-1-Rezeptor-) Domäne bezeichnet wird (Akira *et al.*, 2001; Janeway *et al.*, 2002; Kopp *et al.*, 1999). Die Familie der TLRs besteht aus 11 Mitgliedern, für die bis auf TLR10 mikrobielle Strukturen als Rezeptorliganden identifiziert werden konnten (**Tab. 1**). Neben mikrobiellen Strukturen können Immunzellen auch durch körpereigene Strukturen wie Hitzeschockproteine und Fragmente der Hyaluronsäure, die nach Zell- oder Gewebeerstörung freigesetzt werden, über TLR4 und TLR2 stimuliert werden. Somit können exogene und endogene Noxen detektiert und das Immunsystem aktiviert werden.

Toll-like Rezeptor [TLR]	Spezifität
TLR2/TLR1+6	Lipopeptide, Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, Lipoarabinomannan, Zymosan, einige LPS Formen
TLR3	dsRNS
TLR4	LPS gramnegativer Bakterien, virales F-Protein (RSV), Hyaluronsäurefragmente
TLR5	Bakterielles Flagellin
TLR6+2	MALP-2
TLR7,8	ssRNA
TLR9	Bakterielle DNS (CpG Motive)

Tab. 1: Klassifikation der Toll-like Rezeptoren.

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch TLRs in der Sepsis führt nach Kontakt mit mikrobiellen Komponenten zu einer Induktion von Zytokinen, die die Immunantwort einleiten und eine protektive Immunfunktion haben. Durch eine Dysregulation dieser Abläufe kann es allerdings zu Organschäden kommen, die entscheidend für den Verlauf der Sepsis sind (Weighardt *et al.*, 2004).

2.3 MALP-2, LPS, SEB und CASP als entzündungsinduzierende Faktoren

Viele verschiedene Reaktionskaskaden werden im Laufe einer polymikrobiellen Sepsis aktiviert. Um nur bestimmte Signalkaskaden zu aktivieren, kann man sich spezifisch wirksamer Substanzen bedienen, damit gezielt einzelne Reaktionen untersucht werden können.

2.3.1 Makrophage Activating Lipopeptide (MALP-2)

MALP-2 ist ein 2kDa großes Molekül und Teil der Zellwand von Mycoplasmen. MALP-2 kann synthetisch hergestellt werden und existiert dann in zwei stereoisomeren Formen, eine R- und eine S-Form, allerdings dient nur die S-Form als Immunstimulanz. MALP-2 besitzt zwei Fettsäurereste, die für die spezifische Aktivierung von TLR2 und TLR6 verantwortlich sind. Dies hat zur Folge, dass bei einer *in vivo*-Applikation von MALP-2 nur der durch TLR2 (nach Dimerisierung mit dem Korezeptor TLR6) vermittelte Signalweg aktiviert wird (Muhlradt *et al.*, 1998). Dadurch ist es möglich, die Auswirkungen einer spezifischen TLR2/TLR6-Aktivierung zu studieren. Im folgenden wird MALP-2 durch MALP beschrieben.

2.3.2 Lipopolysaccharid (LPS)

Für viele pathophysiologische Effekte im Rahmen einer gram-negativen Sepsis ist Endotoxin (LPS) verantwortlich (Rietschel *et al.*, 1996). LPS ist ein Membranbestandteil vor allem gram-negativer Bakterien, wobei die endotoxisch wirkende Komponente von LPS im hydrophoben Teil, dem sogenannten Lipid A, lokalisiert ist (Galanos *et al.*, 1984).

Durch eine LPS-Applikation kann TLR4 gezielt aktiviert werden (Poltorak *et al.*, 1998). LPS wird zunächst durch das LPS-Bindeprotein (LBP) komplexiert. Dies bedingt eine Wirkungsverstärkung von LPS, so dass geringste Mengen an LPS bioaktiv wirksam werden (Schumann *et al.*, 1990; Hailman *et al.*, 1994). Der LPS-LBP-Komplex bindet anschließend an den CD14-Korezeptor von TLR4 und setzt damit die Signalkaskade in Gang.

2.3.3 Staphylokokken-Enterotoxin (SEB)

Superantigene gehören zu einer Gruppe bakterieller und viraler Proteine, die die Fähigkeit besitzen, mit dem T-Zell-Rezeptor (TZR) und MHC Klasse II Molekülen außerhalb der Peptidbindungsstelle zu interagieren. Es werden dadurch Proteinkomplexe gebildet, die aus TZR, MHC Klasse II Molekül und Superantigen bestehen. Dies initiiert eine polyklonale T-Zell-Antwort (Acha-Orbea, 1993; Heeg *et al.*, 1996; Herman *et al.*, 1991).

Konventionelle Antigene werden von T-Lymphozyten erst nach Endozytose und proteolytischer Prozessierung als MHC-gebundene Peptide präsentiert. Im Gegensatz hierzu interagieren Superantigene als intakte Proteine mit den MHC Klasse II Molekülen. Ihre Bindungsstelle liegt außerhalb der normalen Peptidbindungstasche und es kommt nach Bindung zu keiner Konformationsänderung der MHC Proteine oder des Superantigens (Torres *et al.*, 1993; Mottershead *et al.*, 1995).

Mit Hilfe von *ex vivo*-Analysen ist es deshalb möglich, die Effekte einer massiven T-Zell-Aktivierung durch SEB zu untersuchen. Diese hat eine verstärkte Zytokin- (IL-1, IL-6, TNF- α)-Produktion zur Folge (Gaus *et al.*, 1994; Miethke *et al.*, 1992), die bedingt durch die Hyperinflammationsreaktion zu Schock und Organschäden führt.

2.3.4 Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

In diesem Modell wird, wie später unter 3.8.2 näher beschrieben, eine künstliche Verbindung zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle geschaffen und so eine polymikrobielle Infektion induziert. Im folgenden können die im Darmlumen befindlichen Bakterien und Mikroorganismen ungehindert in die Peritonealhöhle permieren. Dadurch kommt es zu einer Peritonitis, die der Ausgangspunkt einer abdominellen Sepsis ist. Da hierbei ein großes Spektrum an Bakterien und Mikroorganismen systemisch wird, werden eine Vielzahl von verschiedenen Immunzellen auf diese Weise aktiviert. So kann die Immunantwort des Organismus in ihrem physiologischen Ablauf untersucht werden.

2.4 Mechanismen der Akut-Phase-Antwort

Akut-Phase-Proteine (APP) umfassen das in akuten Entzündungsphasen (=Akut-Phase-Reaktion) diagnostisch nutzbare Spektrum von Plasmaproteinen, die von verschiedenen Körperzellen gebildet und freigesetzt werden (**Tab. 2**). Die Akut-Phase-Reaktion kann in zwei Phasen eingeteilt werden. Eine lokale Reaktion, die zum einen eine Aktivierung von Endothel- und Immunzellen (Blutmonozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Mastzellen) zur Folge hat und nach Anreicherung dieser Zellen im Gewebe typische lokale Entzündungszeichen wie Schwellung, Schmerz und Rötung verursacht. Die später einsetzende systemische Reaktion bedingt, dass Fibroblasten und Endothelzellen chemotaktische Botenstoffe für Neutrophile und Monozyten sezernieren. Es kommt zur Diapedese weiterer Entzündungszellen zum Ort des Entzündungsgeschehens, was ein perikapilläres Ödem durch Erweiterung der postkapillären Venolen und vermehrte Durchlässigkeit der Gefäßwände zur Folge hat.

Stand der Forschung

Klassische APP	Weitere APP	Anti-APP
<ul style="list-style-type: none"> • CRP • SAA • SAP • LBP 	<ul style="list-style-type: none"> • Komplement: C3, C4 • Proteasen: α1-Proteaseinhibitor α1-Antichymotrypsin α1-Makroglobulin • Gerinnung: Fibrinogen Haptoglobin von Willebrand-Faktor • Transport: Coeruloplasmin Ferritin 	<ul style="list-style-type: none"> • Albumin • Transthyretin • Transferrin

Tab. 2:

Klassifikation der Akut-Phase-Proteine.

Im Allgemeinen wird die Akut-Phase-Reaktion durch eine Entzündung ausgelöst, deren häufigste Ursache Infektionen durch Mikroorganismen darstellen. Es kommt dadurch zu einem 100- bis 1000-fachen Anstieg diverser APP (z.B. CRP, SAA).

Das folgende Schema soll die Pathophysiologie der Abläufe während einer Entzündung und deren Folgen kurz erläutern (**Abb. 4**).

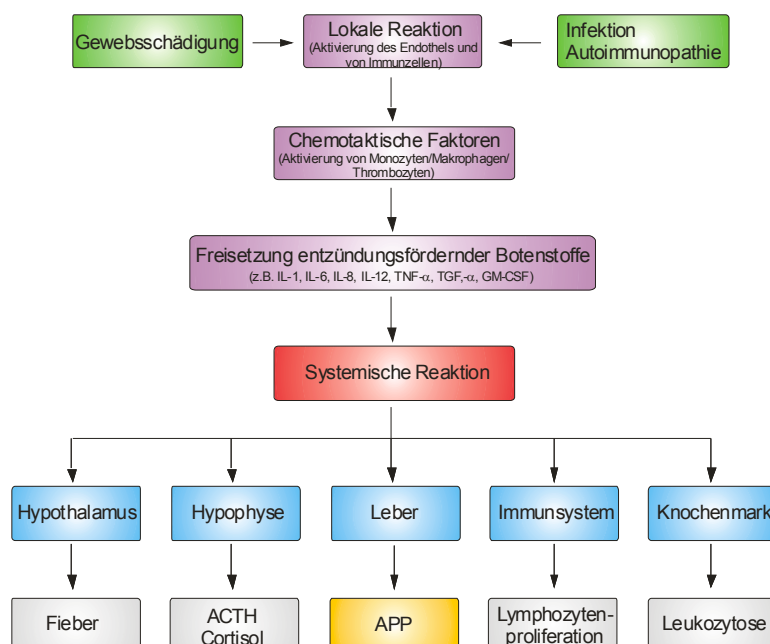


Abb. 4:

Pathophysiologie der allgemeinen Entzündungsreaktion.

Über Aktivierung diverser Immunzellen werden daraufhin Zytokine (v.a. IL-1 β , IL-6 und TNF- α (Ramadori *et al.*, 1988)) synthetisiert, die eine Hochregulation der APP zur Folge haben (**Abb. 5**). Es werden Komplementfaktoren gebildet, die Bakterien (im Falle einer Sepsis), aber nicht körpereigene Zellen binden. Hierdurch wird das Komplementsystem aktiviert, das die Bakterien lysiert oder für Makrophagen opsoniert (Gabay und Kushner, 1999).

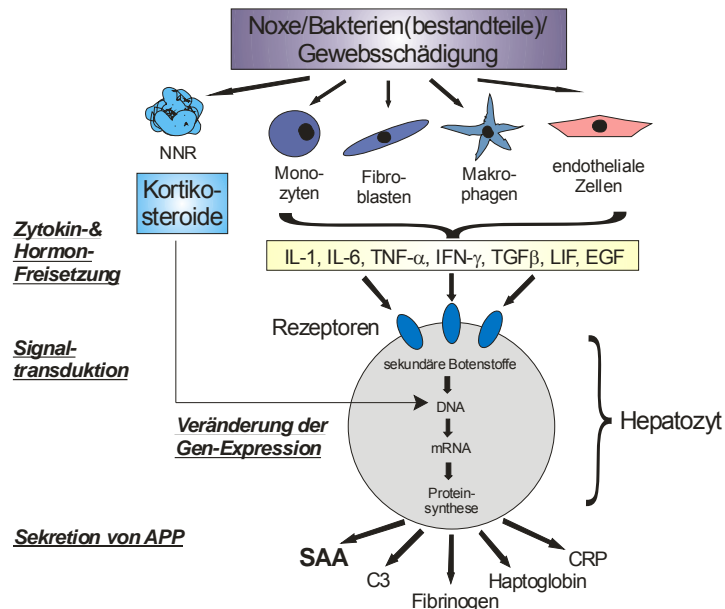


Abb. 5:
Induktion der Akut-Phase-Proteine.

2.5 Interleukin-22 und Interleukin-22-Bindeprotein, Rezeptoraufbau und Signaltransduktion

Interleukine werden vor allem von immunkompetenten Zellen im Rahmen einer Entzündungsreaktion gebildet. Diese Botenstoffe aus der Familie der Zytokine sind ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese in der postoperativen Peritonitis und Sepsis (Kox *et al.*, 2000) .

Interleukin-22 (IL-22)

IL-22, früher als "IL-10 related T-cell-derived inducible factor" (IL-TIF) bezeichnet, kann durch IL-9 und LPS in T- und Mast-Zellen und durch Lektine in frisch isolierten Milzzellen induziert werden. IL-22 wird konstitutiv im Thymus und im Gehirn gebildet. Humanes und murines IL-22 haben eine zu 79% identische Aminosäuresequenz. Es wird zu der Gruppe der IL-10 Homologen gezählt (Dumoutier *et al.*, Feb 2000), (**Tab. 3**).

Es ist bekannt, dass IL-22 die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der humanen HepG2-Zelllinie stimuliert. Ebenso weiß man, dass IL-22 als pro-inflammatorisches Zytokin *in vivo*

Akut-Phase-Proteine induziert. Die Produktion von IL-22 kann durch Injektion bakterieller Lipopolysaccharide induziert werden (Dumoutier *et al.*, Aug 2000).

IL-10 Homologe	Klasse II Zytokin-Rezeptorfamilie (CRF2)
<ul style="list-style-type: none"> • IL-19 • IL-20 • IL-22 (IL-TIF) • IL-24 (MDA-7) • IL-26 (AK155) 	<ul style="list-style-type: none"> • Typ I und II IFN-Rezeptoren(IFNAR1/2, IFNGR1/2) • IL-10R1 } IL-10 Rezeptor • IL-10R2c (=CRF2-4) } IL-22 Rezeptor • IL-22R1 (=CRF2-9) • IL-20R1 (=CRF2-8) • IL-20R2 (=CRF2-11) • Tissue factor • IL-22R1* (IL-22BP)

Tab. 3:

Klassifikation der IL-10-Homologen und der Klasse II Zytokin-Rezeptorfamilie (CFR2).

Interleukin-22 Bindeprotein (IL-22-BP)

IL-22-BP ist ein lösliches Protein, das Homologien zu der Rezeptorkomponente IL-22R1 des IL-22 Transmembranrezeptors aufweist (Kotenko *et al.*, Jun 2001). Es bindet und inaktiviert IL-22 und wirkt als dessen funktioneller Antagonist. IL-22-BP kann somit die biologische Funktion von IL-22 regulieren. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass IL-22-BP nach LPS-Stimulation in Mausmonozyten hochreguliert wird, was Bedeutung für die Immunmodulation während der Sepsis hat (Wei *et al.*, 2003).

Rezeptoraufbau und Signaltransduktion von IL-10 und IL-22

IL-22 ist ein hauptsächlich pro-inflammatorisch wirksames Zytokin. Dabei wirkt IL-22 über den IL-22-Zellrezeptor, der der Klasse II Zytokin-Rezeptorfamilie (CRF-2) angehört (**Tab. 3**). Der IL-22-Rezeptor ist ein Heterodimer (**Abb. 6**), wobei eine Untereinheit mit der des IL-10-Rezeptors identisch ist. Sie wird als IL-10R2_c bezeichnet und ist mit der CRF2-4 Rezeptorkette identisch. Die für IL-22 spezifische Rezeptorkette CRF2-9 konnte als IL-22R1-Untereinheit identifiziert werden.

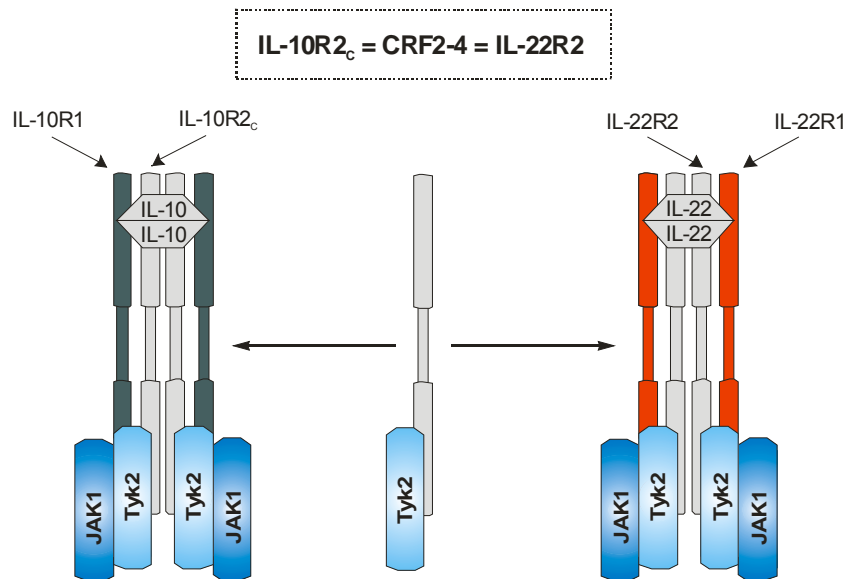


Abb. 6:

IL-10- und IL-22- Rezeptorkomplex.

Der IL-22 Rezeptorkomplex besteht aus 2 Rezeptorketten, der IL-22R1 und der IL-10R2 Kette. Die IL-10R2 Kette ist eine gemeinsame Kette des IL-22 und des IL-10 Rezeptorkomplexes. IL-10R2 wird auch als CRF2-4 bezeichnet.

Beide Ketten können unabhängig voneinander IL-22 binden, aber zur Signaltransduktion kommt es nur durch Bindung von IL-22 an den funktionalen Rezeptorkomplex, der aus beiden Rezeptorketten besteht (Kotenko *et al.*, Jan 2001).

Es wurde beschrieben, dass IL-22 in Hepatomazellen der Ratte nach Rezeptorbindung die JAK/STAT, ERK, JNK und p38 MAP-Kinasen Signalwege aktiviert (Lejeune *et al.*, 2002), wobei der JAK/STAT-Signalweg ähnlich den des IL-10-Signalwegs pro- und anti-inflammatorisch, der MAP-Kinase-Signalweg hingegen ausschließlich pro-inflammatorisch wirkt. Die Aktivierung dieser Signalkaskaden ist demnach dafür verantwortlich, dass vor allem Akute-Phase-Proteine und pro-inflammatorische Zytokine nach IL-22-Rezeptorbindung synthetisiert werden (**Abb. 7**).

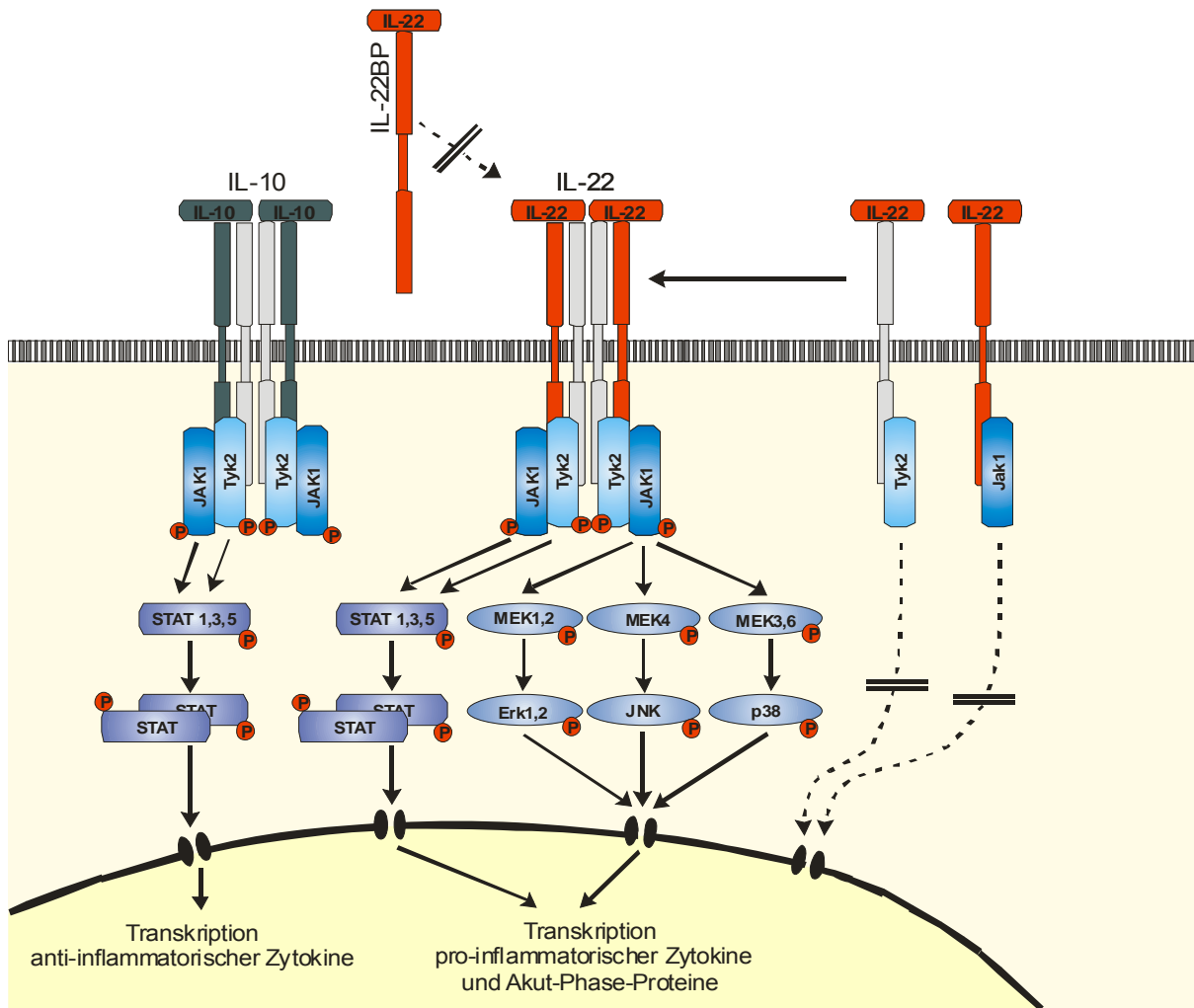


Abb. 7:
IL-10- und IL-22-Signalwege.

2.6 Interleukin-Fusionsproteine

Um Immunantworten und Zytokinwirkungen *in vivo* studieren zu können, kann man Zytokine *in vivo* überexprimieren. Native Interleukine besitzen nur eine sehr kurze Serumhalbwertszeit. Gerard *et al.*, 1993 konnten zeigen, dass Interleukin-10 *in vivo* einen biologischen Effekt von ca. 30 Minuten aufweist, was experimentell eine repetitive Gabe dieses Interleukins notwendig macht, um modellhaft protrahierte Immunantworten wie z.B. Sepsisreaktionen zu studieren. Aufgrund der Tatsache, dass IL-22 und IL-10 der gleichen Zytokinfamilie angehören, können für IL-22 ähnliche Halbwertszeiten *in vivo* angenommen werden. Fusionsproteine mit Fc-Domänen können die Halbwertszeit *in vivo* verlängern, um ein über mehrere Stunden gleichmäßigen Serumspiegel des applizierten Interleukins zu erreichen. Hierbei wird beispielsweise das Interleukinmolekül an den Fc γ 2a-Teil eines Antikörpermoleküls gekoppelt. Um die biologische Aktivität dieser Fc-Domäne zu inaktivieren wurde in Position 235 der Rezeptorbindungsstelle die Aminosäure Leuzin durch Glutamin

ersetzt. Analog dazu wurden die Aminosäuren Glutamin in Position 318 und Lysin in Position 320 und 322 durch Alanin ausgetauscht, um die Bindung an C1q des Komplementsystems zu verhindern. Dadurch wurde erreicht, dass der so mutierte Fc-Teil weder eine antikörperabhängige zellvermittelte, noch eine komplement-abhängige zytotoxische Aktivität besitzt (Zheng *et al.*, 1995).

Die so generierten Interleukin-Fusionsproteine sind antikörper-ähnliche Moleküle, in denen die Interleukine durch die Kopplung an die Fc-Domäne als Dimer vorliegen (**Abb. 8**) und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* als Homodimere an ihre Rezeptoren binden. Die nach diesem Prinzip hergestellten Interleukin-Fusionsproteine weisen alle biologischen Aktivitäten der unveränderten Interleukine auf und haben zudem eine erheblich verlängerte Zirkulationshalbwertszeit *in vivo* (Zheng *et al.*, 1995).

Nach diesem Verfahren können auch andere Interleukin-ähnliche Fusionsproteine hergestellt werden, um deren Halbwertszeit *in vivo* ebenfalls zu verlängern.

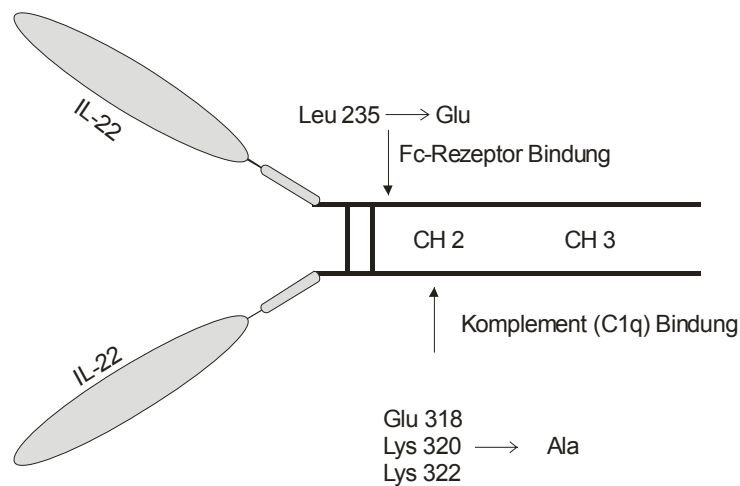


Abb. 8:

Nicht-lytisierendes Fc-Fusionsprotein mit IL-22.

2.7 Fragestellung

Wie dargestellt, ist die Pathogenese der postoperativen Peritonitis und der möglichen konsekutiven Sepsis bis heute in weiten Teilen nicht geklärt. Ursache hierfür sind unter anderem Probleme bei der Einordnung der sehr komplexen Zytokininteraktionen während der Immunantwort. IL-22 könnte hierbei eine wichtige immunmodulatorische Funktion ausüben. IL-22 ist bekannt als proinflammatorisches Zytokin der IL-10 Familie. Es induziert die Akute-Phase-Reaktion in der Leber und hat somit Anteil am Verlauf systemischer Entzündungsreaktionen. Ebenso ist bekannt, dass IL-22 von aktivierten T-Zellen produziert wird.

In dieser Arbeit sollte zunächst die Rolle von endogen produziertem IL-22 nach Applikation Sepsis-induzierender Substanzen ebenso wie nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis untersucht werden. Eine weitere Fragestellung war, welche biologischen Effekte IL-22 besitzt und welche Wirkungen IL-22 auf Immunzellen und nicht-Immunzellen ausübt. Durch die Generierung von IL-22- und IL-22-BP-Fusionsproteinen sollte darüber hinaus die über IL-22 ausgelöste Akut-Phase-Reaktion in ihren Abläufen näher charakterisiert werden. Schließlich sollte der funktionelle IL-22-Antagonist IL-22-BP in seiner biologischen Wirkungsweise während septischer Entzündungsprozesse näher beschrieben werden.

Ziel dieser Arbeit war somit der Nachweis und die Untersuchung der biologischen Effekte der beiden immunmodulatorisch wirksamen Proteine IL-22 und IL-22-BP und die Beschreibung ihrer Funktionen während entzündlicher Abläufe.

3. Material und Methoden

In den Abschnitten 3.1 – 3.9 sind die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen, Gerätschaften und Versuchstiere aufgeführt. Zudem werden die Methoden zur Durchführung der Experimente beschrieben.

3.1 Bezugsquellennachweis

Chemikalien zur Durchführung der Experimente werden im folgenden mit deren Bezugsquellen aufgeführt.

3.1.1 Chemikalien, Filter, Filme, Reagenzien, Enzyme

Chemikalien	Bezugsquellen
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid 30/0,8	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose Seakem GTG	Biozym Diagnostika, Hameln
Amipicillin	Roche, Mannheim
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	Bio-Rad, München
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue	Sigma, Deisenhofen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Deisenhofen
Desoxynukleotide (dNTPs) (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Roche, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum	Seromed, Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Seromed, Biochrom, Berlin
Gene-X-Press	PAA Laboratories, Cölbe
GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen- koloniestimulierender Faktor)	PeproTech, Rocky Hill, USA

Material und Methoden

Geneticin	Sigma, Deisenhofen
Glyzerin	Sigma, Deisenhofen
HBSS	Sigma, Taufkirchen
IL-1 β	Bioconcept, Umkirch
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid)	Sigma, Deisenhofen
Kanamycin	Roche, Mannheim
LPS Serotyp 0127:B8	Sigma, Deisenhofen
MALP (Macrophage Activating Lipopeptide)	GBF, Braunschweig
Milchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Mineralöl	Sigma, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Oligo(dt) 12-18 Primer	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma, Deisenhofen
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin
Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000)	Merck, Darmstadt
PLA (Pepstatin, Leupeptin, Antepain)	Sigma, Deisenhofen
PMA (Phorbol-12myristate-13 acetat)	Sigma, Deisenhofen
Protein A	Sigma, Deisenhofen
Random Primers	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Sigma, Deisenhofen
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)	Roth, Karlsruhe
SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B)	Toxin Technology, Sarasota, USA
Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Staurosporin	Sigma, Deisenhofen
TEMED	Invitrogen, Karlsruhe
(N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamid)	
Thioglykollat	Difco, Detroit, USA
(Brewer Thioglycollate Medium)	
Thymidin [Methyl- 3 H], spezifische Aktivität 5.0 Ci/mmol, $T_{1/2}$ =13.3 y	Ammersham, Braunschweig
TNF- α	Bioconcept, Umkirch
Tri-Reagenz	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin

Andere, hier nicht einzeln aufgeführte Laborchemikalien wurden bei den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) erworben.

Enzyme

alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim
Klenow-Polymerase	Roche, Mannheim
Peroxidase (POD)	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Karlsruhe
	Roche, Mannheim
RNase A	Invitrogen, Karlsruhe
RNasin	Promega, Madison, USA
Superscript II plus reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNS Ligase	Roche, Mannheim
Taq-DNS-Polymerase TM	Invitrogen, Karlsruhe
PFU-Turbopolymerase	Roche, Mannheim

Filter, Filme

Filterpapier 3MM	Whatman, New Jersey, USA
Glass Fiber Filters	Packard, Niederlande
Poly-Prep Chromatographie-Säulen	Bio-Rad, München
Röntgenfilme X-OMAT LS	Kodak, Stuttgart
	Hyperfilm, Amersham, Braunschweig
Sterilfilter 0,4 µm, Celluloseacetat	Satorius, Göttingen
"Centricon Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheit"	Milipore, Eschborn
für wässrige Lösungen (10kD Porengröße)	
Transwell-Platten	Corning, New York, USA

Reagenzien

DNS-100bp-Standard	Invitrogen, Karlsruhe
DNS-1000bp-Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Microtainer SST	BD PharMingen, Heidelberg
Nitrocellulose, Protran	Schleicher und Schüll, Dassel
Parafilm M	Amer. National Can TM , Chicago, USA
pH-Indikatorstäbchen, pH-Fix	Macherey-Nagel, Düren
Proteinstandard	Novex, San Diego, USA
("SeeBlue Prestained Standard")	
Zellkulturgefäße, Plastik	Nunclon, Dänemark
	Falcon, UK
	TPP, Peske, Aindling-Pichl

3.1.2 Reagenziensammlungen („Kits“)

Advantage RT-for-PCR Kit	Clontech, Palo Alto, USA
ECL Kit	Amersham, Braunschweig
Enzyme-linked-Immuno-Assay (ELISA): mIL-1 α , mIL-6, mIL-10, mIL-12, mKC, mMCP-1/JE, mTNF- α mSAA	R&D Systems, Wiesbaden Biognosis, London, UK
Phago-Test	Orpegen Pharma, Heidelberg
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Qiaprep Plasmid Purification Kit (Midi und Maxi)	Qiagen, Hilden
RNase Protection Assay Template Set (RPA)	BD PharMingen, Heidelberg
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche, Mannheim

3.1.3 Geräte

β -Counter	Direct β -Counter Matrix TM96, Packard, USA
Elektrophoresekammer für Proteine Eukaryontische Zellkultur	Biometra, Göttingen Brutschrank B5060 Ek/CO ₂ , Kendro Laboratory Products, München Sterilbank, HeraSafe, Kendro Laboratory Products, München
ELISA-Lesegerät	Biolumin TM 960 Fluorescence/Absorbance, Amersham Pharmacia Biotec, Freiburg
ELISA-Waschgerät	SLT, Tecan SLT Labinstruments, Crailsheim
Durchflusszytometrie ("FACS")	BD PharMingen, Heidelberg
Geltrockner	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifuge	Beckmann J2-21, Palo Alto, USA Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau Megafuge 2.0 R, Heraeus, Hanau
Mikroskope	Zeiss Mikroskop ID 03, Zeiss, Jena
Nukleinsäuredetektion	GelDoc 1000, Bio-Rad, München
Photometer	Spectronic, Genesys 5 Spectronic Instruments

pH-Meter	761 Kalimatic, Knick
Proteintransfer	Transblot SD, Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Rotationsrad	Renner, Darmstadt
Schüttler	Innova 4230, Refrigerated Inkubator New Brunswick Scientific, Edison, USA
Spannungsquellen	Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Thermocycler	Perkin Elmer, Überlingen Gene Amp, PCR Systems 9600/9700
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415 R Picofuge, Heraeus, Hanau
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301, Eppendorf, Hanau
Videophotographie	Gel Doc 1000, Bio-Rad, München
Waagen	Satorius, Göttingen
Wasserbäder	Köttermann, Labor-Technik
Zell-Harvester	Micro 96 Harvester, Skatron Instr., UK
Zell-Homogenisator	Ultra Turrax, Janke & Kunkel, Staufen

3.1.4 Versuchstiere

Mäuse des Inzuchtstammes C57/B6	Harlan-Winkelmann, Borcheln
Mäuse des Inzuchtstammes Swiss Nude	The Jackson Laboratory, Maine, USA

3.2 Medien und Puffer

Alle in dieser Arbeit verwendeten und hier aufgeführten Medien und Puffer wurden mit ddH₂O oder *aqua dest.* angesetzt und vor Gebrauch entweder steril filtriert oder autoklaviert.

3.2.1 Medien für *Escherichia coli* Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium

1% Bacto-Trypton
0,5% Hefeextrakt
1% NaCl
pH 7,2 (für die Herstellung fester
Nährböden wurde das
Medium mit 1,5% Agar
versetzt)

SOC-Medium

2% Bacto-Trypton
0,5% Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose
pH 7

Alle Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert, Glukose wurde dem autoklavierten SOC-Medium nach Abkühlen steril zugegeben.

Bei Bedarf wurde das Medium nach dem Autoklavieren mit 100µg/ml Ampicillin versetzt (Stammlösung in H₂O : 100mg/ml).

3.2.2 Medien und Puffer für die Zellkultur

Alle Zellkulturmedien ebenso wie Zusätze wurden von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) und der Firma Biochrom (Berlin) bezogen. Fötale Kälberserum (FKS) (Biochrom, Berlin bzw. ICN Biomedicals GmbH, Eschwege) wurden zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch für 30min auf 56°C erhitzt.

Material und Methoden

Dulbeco`s Modifiziertes Eagle Medium

(DMEM) mit 4,5mg/ml Glukose

10% FKS
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
L-Glutamin

Dulbeco`s Modifiziertes Eagle Medium

(DMEM) mit 4,5mg/ml Glukose, 3,7mg/ml

NaHCO₃, ohne Pyruvat

10% FKS
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
400 mg Geneticin
L-Glutamin

Roswell Park Memorial Institute

(RPMI) 1640 Medium

10% FKS
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
500 mg Geneticin
25 mM HEPES
L-Glutamin

Roswell Park Memorial Institute

(RPMI) 1640 Medium

10% FKS
100 U/ml Penicillin
100 mg/ml Streptomycin
L-Glutamin

Transfektionsmedium

(DMEM mit 4,5mg/ml Glukose)

10% FKS (IgG depletiert durch
2x Fällung mit 1%
Protein A-Sepharose
und
Sterilfiltration)

100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
L-Glutamin
0,5% Gene-X-Press

Waymouth Medium MB 752/1

10% FKS
100 U/ml Penicillin
100 U/ml Streptomycin
L-Glutamin

Einfriermedium

FKS 90%
DMSO 10%

Trypanblaulösung

0,2% in PBS

3.2.3 Stammlösungen und Puffer

Alle hier aufgeführten Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

10% Ammoniumpersulfat (APS)

1 g Ammoniumpersulfat in
10 ml ddH₂O

2x BES-Puffer: für die Transfektion eukaryontischer Zellen

50 mM BES
280 mM NaCl
1,5 mM NaCl
pH 6,96, steril filtrieren

Citrat-Puffer

0,1 M
pH 3

DEPC-H₂O

0,1% DEPC in ddH₂O, 12-24h
rühren und danach auto-klavieren,
zum inaktivieren des nicht
gebundenen DEPC

10x Erythrozyten-Lyse-Puffer

9 Vol.T. 0,83% NH₄Cl
1 Vol.T. Tris (2C, 594 g/L;
pH auf 7,65 mit HCl einstellen)
pH 7,2

HCl-Tris-Puffer

1 M
pH 10

5x KCM-Puffer

500 mM KCl
150 mM CaCl₂
250 mM MgCl₂

3x Laemmli-Puffer: Auftragepuffer für Proteine

187,5 mM Tris/HCl pH 7,5
6% SDS
30% Glycerin
0,01% Bromphenolblau
3% 2-Mercaptoethanol

10x PCR-Puffer

200 mM Tris/HCl pH 8,4
50 mM MgCl₂
500 mM KCl
0,1% Gelatine

2x SDS-Probenpuffer

5% Bromphenolblau
30% Saccharose
2% SDS
80 mM Tris-HCL, pH 6,8

10x SD-Transblot Puffer

480 mM Tris/HCl pH 7,5
390 mM Glycin
(vor Gebrauch wird der 1x Puffer
mit 20% Methanol versetzt)

10x TAE-Puffer: Laufpuffer für

Agarosegele

400 mM Tris/HCL pH 8,0
10 mM EDTA
20 µl Ethidiumbromidlösung
(10 mg/ml in H₂O), pH 8,0

TBS-Puffer: Waschpuffer für

Western Blot

150 mM NaCl
10 mM Tris/HCl, pH 7,5

TENS-Puffer

0,1 M NaOH
5% SDS
85% TE

TBST-Puffer : Waschpuffer für

Western Blot

500 mM NaCl
20 mM Tris/HCl pH 7,5
0,05% Tween 20
0,2% Triton X-100

10x Tris-Glycin-SDS-Puffer:

Laufpuffer für SDS-Polyacrylamidgele

248 mM Tris/HCl pH 7,5
1,9 M Glycin
1% SDS

10x TE-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 8
10 mM EDTA pH 8

TSB-Puffer (sterilfiltrieren):

LB-Medium
5% DMSO
10% PEG 4000
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄

3.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>endA1, hsdR17, recA1, (r_k⁻ m_k⁺), supE44, thi1gyrA (Nal^r), relA12</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> TOPO 10F'	F' (<i>lac</i> ^g Tn10 (Tet ^R)) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr</i> - <i>hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 deoR araD139 Δ(<i>ara</i>- <i>leu</i>)7697 <i>galK rpsL</i> (Str^R) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen, Karlsruhe

Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
293T	humane embryonale Fibroblasten, Niere	ATCC, Rockville, USA
38c13	murine B-Zelle	Nature 241:396-398 (1973)
ANA-1	murine Makrophagen	J.Natl.Canc.Inst. 81(19):1492-6 (1989)
BW 5147	murine T-Lymphom-Zelle	ATCC, Rockville, USA
CMT 64/61	murine Carcinomzelle, Lunge	Eur.J.Immunol. 23:1630 (1993)
CMT 93	murine Carcinomzelle, Rectum	Eur.J.Immunol. 23:1630 (1993)
D-36	murine Mastzellen	J.Imm.Methods.;168(1):49-54 (1994)
bEND	murine Endothelzelle, Gehirn	R.Hallmann, MPI Erlangen
eEND	murine Endothelzelle, embryonal	W.Risau, Bad Nauheim
splEND	murine Endothelzelle, Milz	W.Risau, Bad Nauheim
EL-4	murine T-Lymphom-Zelle	Brit.J.Cancer 4:372 (1950)
EMT 6	murine Carcinomzelle, Mamma	Radiology;117(1):215-7 (1975)
HEPA 1-6	murine Parenchymzelle, Leber	DSMZ, Braunschweig
LLC-PK1	porcine Epithelzelle, Niere	In Vitro Cell Dev. Biol. 12:670-677 (1976)
MC-9	murine Mastzelle	Prostaglandins;32(4):615-27 (1986)
RAW 112	murine B-Zelle	Biochem.Biophys.Res.Comm. 61:1268 (1974)
RAW 264.7	murine Makrophagen	J.Immunol.;121(1):300-3 (1978)
TD ₂	murine Carcinomzelle, Pancreas	M.Essler, München

Antikörper

Antikörper [Ak]	Spezies/Isotyp	Referenz
Anti-Maus Annexin V-FITC	Ratte	Cell Signaling
Anti-Maus IgG-POD	Ziege	Cell Signaling
Anti-Maus IgG 2b-FITC	Ratte	Cell Signaling
AKT	Kanninchen	Cell Signaling
Phospho-AKT	Kanninchen	Cell Signaling
Anti-Maus Caspase 3	Ratte	Cell Signaling
Anti-Maus aktivierte Caspase 3	Ratte	Cell Signaling
Anti-Maus β -Actin HRP linked	Ratte	Cell Signaling
Erk1/2	Kanninchen	Cell Signaling
Phospho-Erk1/2	Kanninchen	Cell Signaling
p27 KIP	Kanninchen	Cell Signaling
p38	Kanninchen	Cell Signaling
Phospho-p38	Kanninchen	Cell Signaling
Stat3	Kanninchen	Cell Signaling
Phospho-Stat3 (Tyr705)	Kanninchen	Cell Signaling
Anti-Kanninchen IgG HRP-linked	Ratte	Cell Signaling
Anti-Ratte IgG HRP-linked	Kanninchen	Cell Signaling
Anti-Biotin HRP-linked	Kanninchen	Cell Signaling

Plasmide

Name	Eigenschaften	Referenz
pEF-SEM	Expressionsplasmid mit EF-1 α -Prom. CMV-Promotor von pcDNA3 durch EF-1 α Promotor aus pEF-BOS ersetzt	H. Häcker, 1997
pCR2.1-TOPO	durch überhäng. 3' Desoxythymidin (T) direkte Ligation mit PCR-Produkten möglich (TOPO TA Cloning Kit)	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1-Fc	Insert: IgG2aFc-Teil (nicht Komplement aktivierend, nicht Phagozytose vermittelnd)	Zheng <i>et al.</i> , 1997
pEGFP-N-1	grün fluoreszierendes Protein aus der lumineszierenden Qualle <i>Aequorea</i> <i>victoria</i> ; Transfektionskontrolle	Clontech, Heidelberg

Oligonukleotide (Primer)

Alle hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried bezogen. Für die weitere Klonierung der amplifizierten DNS-Fragmente wurden die Primer am 5'-Ende mit Restriktionsenzym-Schnittstellen versehen.

Primer		Sequenz
Murines IL-22	F (5'-3')	GAG AGC GGC CGC ACA CTT GTG
	R (5'-3')	GAC GCA AGC ATT TCT CAG AGA
Murines IL-22 myc	R (5'-3')	GAG AGA TCT AGA TCA ATT CAG ATC CTC TTC TGA GAT GAG TTT TTG TTC GAC GCA AGC ATT TCT CAG AGA
Murines IL-22-BP	F (5'-3')	TAC TGG CAA CAG CAG TGT C
	R (5'-3')	TGG AAT TTC CAC ACA TCT
Murines IL-22 (Sybr)	F (5'-3')	GTA CAT CGT CAA CCG CAC CTT T
	R (5'-3')	AGC CGG ACA TCT GTG TTG TTA T
Murines IL-22R1 (Sybr)	F (5'-3')	CTA CGT GTG CCG AGT GAA GA
	R (5'-3')	AAG CGT AGG GGT TGA AAG GT
Murines IL-10 (Sybr)	F (5'-3')	ATA ACT GCA CCC ACT TCC CAG TC
	R (5'-3')	CCC AAG TAA CCC TTA AAG TCC TGC
Murines IL-10R2 (Sybr)	F (5'-3')	ACA TTC GGA GTG GGT CAA TGT C
	R (5'-3')	TCT GCA TCT CAG GAG GTC CAA T
β -Actin (Sybr)	F (5'-3')	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC
	R (5'-3')	AGC CAA GTC CAG ACG CAG G

Abkürzung: bp, Basenpaare

3.4 Molekularbiologische Methoden

Die verwendeten Verfahren dienen zur Herstellung und Analyse bzw. Messung der biologischen Aktivität von immunologischen Signalmolekülen (IL-22 Fc, IL-22 Fc BP), deren Rolle bei Sepsisreaktionen untersucht werden sollte.

3.4.1 Vektoren und Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Vektoren und Plasmide eingesetzt bzw. hergestellt. Es folgt eine Aufzählung aller benutzten Vektoren und Plasmide:

Vektorname	Vektoreigenschaften	Klonierungsenzyme Vektor/Insert
pEF SpFc	Signalpeptid mit Fc-Teil in pEF-SEM	Not I, BamH I
pEF IL-10 Fc	rmIL-10 mit Fc-Teil in pEF-SEM	BamH I, Xba I
pEF IL-22 Fc	rmIL-22 mit Fc-Teil in pEF-SEM	Not I, BamH I
pEF IL-22 ohne Fc	rmIL-22 ohne Fc-Teil in pEF-SEM	Not I, Xba I
pEF IL-22 Fc BP	rmIL-22 BP mit Fc-Teil in pEF-SEM	Not I, BamH I
pEF IL-22 BP ohne Fc	rmIL-22 BP ohne Fc-Teil in pEF-SEM	Not I, Xba I
pEF Leervektor (Kontrolle)	pEF Negativ-Kontroll-Vektor ohne kodierende DNS-Sequenz	keine
eGFP (Fluoreszenzvektor)	eGFP Positiv-Kontroll-Vektor	keine

3.4.2 RNS-Präparation

Aus peripheren Organen (Leber, Lunge, Milz) wurde mittels "RNeasy MidiKit"-Methode (Quiagen, Hilden) RNS gewonnen. Das Gewebe wurde zunächst auf ca. 100mg abgewogen und in einem 15ml Röhrchen mit 1,5ml RNS/ater RNS-Stabilisationspuffer versetzt. Anschließend wurden die Gewebeproben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, um die RNS in den Organen zu stabilisieren. Das Gewebe wurde daraufhin nach einem Pufferwechsel auf 3ml RLT (=RNeasy-Lyse-Puffer mit 1% 2-Mercaptoethanol) mit einem Zellhomogenisator für 30sec homogenisiert und für 10min zentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 4.000 U/min und Raumtemperatur).

Die in dem Überstand gelöste RNS wurde anschließend in ein frisches 15ml Gefäß überführt, mit 3ml 70% Ethanol versetzt und kräftig geschüttelt. Von dieser Probe wurden 3ml auf eine RNeasy-Midi-Säule gegeben und für 5min abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde für die restliche Probe wiederholt. Es folgten drei Waschschritte mit 1 mal 4ml RW1-Puffer (zentrifugiert für 5min) und 2 mal mit 2,5ml RPE-Puffer (zentrifugiert für 2min). Der Durchlauf wurde nach jedem Schritt verworfen. Die in der Säule fixierte RNS wurde mit 200µl RNase

freiem Wasser in ein neues 15ml Gefäß eluiert, indem man das Wasser auf die Säule gab, diese für 1min stehen ließ und anschließend für 5min abzentrifugierte. Dieser Elutionsschritt wurde ein weiteres mal wiederholt, um evtl. in der Säule zurückgebliebene RNS zu eluieren. Zuletzt wurde die Konzentration der RNS-Proben mittels Photometer bestimmt. Die Probenlagerung erfolgte bei -80°C . Die RNS-Präparation aus Zelllinien (bis 3×10^7 Zellen) erfolgte ebenfalls nach dieser Methode, jedoch ohne RNA later -Schritt.

3.4.3 cDNS-Synthese

Mit Hilfe von reverser Transkriptase ist es möglich, RNS in komplementäre DNS (cDNS) umzuschreiben. Das Verfahren der cDNS-Synthese beruht auf den Erkenntnissen der Replikation von Retroviren (Houts *et al.*, 1979; Kotewicz *et al.*, 1985; Gerard *et al.*, 1986). Synthetische Oligonukleotide, die an den RNS-Strang binden, dienen dabei als Primer für die Synthese des cDNS-Stranges. Für die cDNS-Synthese wurden 30 μl RNS Eluat mit jeweils 2,5 μl 10 μM Oligo-dT- und „random hexamer“- Primer für 10min auf 70°C erhitzt und auf Eis rasch wieder abgekühlt, um Sekundärstrukturen in der RNS aufzulösen. Anschließend wurden dem Ansatz 10 μl 5x Transkriptionspuffer („first strand buffer“), 5 μl 0,1M DTT, 2,5 μl dNTP-Mix (200 μM) und 2,5 μl Superskript II Plus (200 E/ μl) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 60min bei 42°C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 15min inaktiviert. Alternativ wurde auch die cDNS-Synthese Methode der Firma Clontech („Advantage-RT-for-PCR Kit“) verwendet. Für die Amplifizierung einer spezifischen DNS-Sequenz wurden 5 μl des Reaktionsansatzes in die PCR-Reaktion eingesetzt.

3.4.4 DNS-Amplifikation mittels PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit, bestimmte DNS-Sequenzen selektiv zu vervielfältigen. Durch Hitze einwirkung werden zunächst die Doppelstränge der DNS voneinander getrennt. An die Randbereiche des zu amplifizierenden DNS-Fragments binden in der „Annealingreaktion“ synthetische Oligonukleotide (Primer). Die gebundenen Oligonukleotide dienen hitzestabilen DNS-Polymerasen als Startpunkte für die Synthese eines komplementären DNS-Stranges („Extensions“). Durch zyklische Wiederholung dieser drei Schritte (Denaturierung, „Annealing“ und „Extension“) wird die spezifische DNS-Sequenz exponentiell angereichert (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988).

Zu der Ausgangs-DNS (5 μl) wurden je 50pmol 5` und 3` Primer, 5 μl 10x PCR Puffer, 1 μl dNTPs (je 10mM), 1,5 μl 25mM MgCl_2 und 0,2 μl (1 Einheit) Taq-DNS-Polymerase zugegeben. Der Ansatz wurde anschließend mit H_2O auf 50 μl aufgefüllt.

Für die Polymerasekettenreaktion wurden folgende Programmschritte gewählt:

Vorgang	Zeit	Temp [°C]	Bezeichnung
Anfang	5min	95	Denaturierung
35 Zyklen	1min	95	Denaturierung
	1min	60	Annealing (Temperatur abhängig von den Primern)
	1min	72	Extension
Ende	10 min	72	Extension

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze bei 4°C gelagert.

Die PCR-Produkte konnten durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden.

3.4.5 Real-Time PCR mittels TaqMan

Mit Hilfe der TaqMan RT-PCR erhält man über die Menge der gebildeten cDNS eine direkt quantitative Aussage über die im Ausgangsmaterial vorhandene Menge an mRNA. Zur Durchführung der RT-PCR wurde das SYBR® Green System verwendet. Dabei handelt es sich um einen DNS interkalierenden Farbstoff. Durch dessen Bindung in die "minor groove" der doppelsträngigen DNS wird die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein vielfaches verstärkt und man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zur Zahl der vorhandenen Doppelstränge ist. Nach einer bestimmten Zyklenzahl wird Fluoreszenz messbar (Ct). Dieses Signal ist direkt proportional zur Menge an gebildeter DNS und steigt wie auch die DNS-Menge exponentiell bis zum Erreichen eines Maximums an. Korreliert man nun den logarithmischen Anstieg mit dem entsprechenden Zyklus und setzt dies in Verhältnis zu einem "Housekeeping"-Gen wie β -Aktin, ist es möglich die Menge an mRNA zu quantifizieren.

Ein PCR-Ansatz besteht aus	15 μ l	SYBR® Green Master Mix
	5 μ l	DNS (0,1 μ g/ μ l)
	je 1 μ l	Primer (20 pmol)
	8 μ l	H ₂ O
PCR-Bedingungen für die verwendeten Primerpaare	52°C	2min
	95°C	10min
	95°C	0,15min
	58 - 66°C	1min

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCRs wurden auf dem ABI Prism™ 7700 Sequence Detector durchgeführt und mit Hilfe des Programms Sequence Detector v.1.6.3 ausgewertet.

3.4.6 Klonierung von PCR-Produkten in verschiedene Vektoren

Nach der PCR-Amplifikation von Vektoren mit ihren spezifischen Inserts, der Reinigung mittels "QIAquick-Kit" (Qiagen) und anschließendem Verdau des PCR-Produktes (Ausschneiden des Inserts aus dem Vektor mittels Enzymverdau) ist es möglich, nach der Auftrennung des Reaktionsgemisches im Agarose-Gel (siehe 3.4.9) die benötigten Komponenten aus diesem zu isolieren (siehe 3.4.10), über "QIAquick-Kit" (Qiagen) aufzureinigen und in neue Vektoren durch Ligation (siehe 3.4.11) einzusetzen.

3.4.7 Plasmidpräparation: analytisch (Mini-Prep) und präparativ (Maxi-Prep)

Für analytische Zwecke wurden geringe Mengen von DNS durch alkalische Lyse präpariert. Es wurden 1,5ml der stationären "Über Nacht"-Kultur von transformierten Bakterien abzentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte bei 13.000 U/min für 5min bei 4°C), der Überstand abgenommen und das Bakterienpellet in 300µl TENS (siehe 3.2.3) resuspendiert. Durch Zugabe von 150µl 3,0M Natriumacetat (pH 5,2), kräftiges Mischen und Inkubation für 5min auf Eis wurde die bakterielle DNS ausgefällt. Der Ansatz wurde erneut abzentrifugiert, die Plasmid-DNS im Überstand mit 750µl 96% Ethanol für 5min gefällt und anschließend durch Zentrifugieren sedimentiert. Das DNS-Pellet wurde einmal mit 70% Ethanol gewaschen, um Reste von Natriumacetat zu entfernen, anschließend getrocknet, in 100µl TE/RNase aufgenommen und bei 37°C für 15min inkubiert. Für die abschließende Restriktionsanalyse wurden 5µl der DNS-Lösung eingesetzt.

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNS in präparativem Maßstab wurden Puffer und Silicagelsäulen (Qiagen) verwendet. 250ml antibiotikahaltiges Kulturmedium (mit 100µl Ampicillin/100ml LB-Medium) wurden mit einem Aliquot einer Bakterien-"Über Nacht"-Kultur oder einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft und über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die ü.N. gewachsenen ampicillinresistenten Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4.000U/min für 15min bei 4°C sedimentiert und alkalisch lysiert. Es folgten Aufreinigungsschritte der Plasmid-DNS durch Anionenaustauschchromatographie (Qiagen). Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNS wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm und 280nm bestimmt.

3.4.8 Verdau, Dephosphorylierung, Auftrennung, Isolierung und Ligation von DNS-Fragmenten

Verdau der DNS mittels Restriktionsendonukleasen

Die für Restriktionsendonukleasen erkennbaren DNS-Stücke können sequenz-spezifisch gespalten werden. Restriktionen erfolgen dabei in den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern für eine Stunde bei optimalen Temperaturen. Pro Reaktionsansatz wurden ca. 1-5µg DNS eingesetzt und in einem Volumen von 15µl mit 10-15 Einheiten Restriktionsenzym verdaut.

Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase

5-10µg Plasmid-DNS wurden in einem Volumen von 50µl CIP-Puffer mit 1 Einheit alkalischer Phosphatase versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die 5'-Enden zu dephosphorylieren und die Re-Ligation von Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern. Anschließend wurde das Enzym bei 70°C für 10min hitzeinaktiviert und so die Reaktion abgestoppt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend mit einem Elutionskit (Qiagen) aufgereinigt.

Auftrennung der DNS-Fragmente im Agarose-Gel

Auftrennung doppelsträngiger DNS-Moleküle durch Gelelektrophorese kann zur analytischen sowie zur präparativen Trennung von Restriktionsfragmenten oder PCR-Produkten angewandt werden. Dafür wurden 1%ige Agarose-Gele verwendet, die Fragmente von 200bp bis 10kbp ausreichend trennen. Die DNS-Proben wurden mit einem 6fach Auftragepuffer gemischt und je nach Größe der Gelkammer bei 30-100 Volt 1-2h aufgetrennt. Der 1x-TAE Laufpuffer, der auch zum Aufkochen der Agarose verwendet wurde, enthielt 0,1µg/ml Ethidiumbromid. Die aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids fluoreszierenden DNS-Banden konnten so in einem Transluminator sichtbar gemacht und die Resultate durch Videophotographie protokolliert werden.

Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die DNS-Banden wurden mit einer energiearmen UV-Handlampe sichtbar gemacht und zügig ausgeschnitten, um Strangbrüche der DNS zu verhindern. Im Anschluss wurden die DNS-Fragmente mit Hilfe eines Aufreinigungs-Kits (Qiagen) isoliert, wobei die Auflösung der Agarose in einer Natriumjodidlösung unter Wärmeeinfluß (50°C) erfolgte. Durch Adsorption

an einer Silikamatrix wurden die DNS-Moleküle aus dem Ansatz isoliert und nach einem Waschschrift mit 30µl ddH₂O von der Silikamatrix eluiert.

Ligation von DNS-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-DNS-Ligase ist es möglich, zwei kompatible DNS-Fragmente zu ligieren. Dabei katalysiert das Enzym die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxylgruppen unter ATP-Verbrauch. Geschnittene, isolierte und aufgereinigte Vektor-DNS wurde dabei mit einem 8-10fachen molaren Überschuss des zu klonierenden DNS-Fragments gemischt. Anschließend wurden die Bestandteile in einem Volumen von 15µl in Gegenwart von 1 Einheit T4-DNS-Ligase und Ligasepuffer über Nacht bei 16°C ligiert.

3.4.9 DNS-Sequenzierung

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC Biotech, Konstanz durchgeführt.

3.4.10 Transformation, Herstellung und Lagerung kompetenter E.coli Bakterien und bakterieller Wirtsstäme

Zur Transformation wurde ein auf 4°C vorgekühltes 100µl-Gemisch aus ca. 1µg Plasmid-DNS und 20µl 5x KCM-Puffer (siehe 3.2.3) mit 100µl der vorsichtig aufgetauten kompetenten Bakterien gemischt. Nach 20min Inkubation auf Eis und 1min Hitzeschock bei 42°C wurden die transformierten Bakterien in 800µl LB-Medium aufgenommen und zur phänotypischen Expression der Antibiotikaresistenz für 1h bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte ü.N. bei 37°C auf antibiotikahaltigen Agarplatten (ü.N.-Kultur).

Die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien erfolgte nach Chung und Miller, 1988. Dabei wurden 250ml LB-Medium mit Bakterien einer ü.N.-kultur 1:100 angeimpft, bei 37°C inkubiert und nach Erreichen der frühen logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀: 0,5-0,6) nach ca.16h durch Zentrifugation bei 4.000 U/min für 10min bei 4°C geerntet. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 25ml gekühltem TSB-Puffer (siehe 3.2.3) und 10min Inkubation auf Eis wurden 500µl Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur langfristigen Lagerung von Bakterienstämmen oder Klonen wurden 15ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (4.000 U/min für 5min), das Pelett in einem 1:1 Glycerin/ LB-Medium-Gemisch resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.5 Herstellung von Fusionsproteinen

3.5.1 Transiente Transfektion humaner 293T-Nierenepithelzellen

In einer 15cm Zellkulturschale wurden 3×10^6 293T-Zellen in einem Volumen von 25ml DMEM (10% FKS) ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die zu transfizierende DNS (48µg) wurde in einem 15ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) mit 120µl 2,5M CaCl₂-Lösung und sterilem H₂O in einem Gesamtvolumen von 1200µl gemischt. Unter ständigem Durchmischen mit Hilfe eines „Vortex“-Schüttlers wurden zu der CaCl₂-DNS Suspension 1200µl 2xBBS-Puffer pipettiert. Damit sich Komplexe aus Calcium-Phosphat und DNS ausbilden können, wurde der Ansatz 10min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung unter vorsichtigem Schwenken der Schalen tropfenweise zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen ca. 16h lang bei 37°C in einer 3%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Das Medium wurde gegen Transfektionsmedium ersetzt und die Zellen für weitere 72h bei 7% CO₂ inkubiert. Die Transfektionsrate wurde durch die grüne Fluoreszenz von mit GFP (Green Fluorescence Protein aus der fluoreszierenden Qualle *Aequorea victoria*) transfizierten Kontrollzellen am 2.Tag nach Transfektion mittels Durchflußzytometer (FACS) (siehe 3.8.7) bestimmt.

3.5.2 Analyse der Expression der Fusionsproteine

Um die Transfektionsrate bestimmen zu können wurden die mit GFP transfizierten 293T-Zellen im FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorter") analysiert. So konnte auf die Transfektionsrate der mit der für die Fusionsproteine kodierenden cDNA transfizierten 293T-Zellen geschlossen werden. Ein weiteres Verfahren sah die Analyse der Fusionsproteine im Western Blot vor. Dies konnte Aufschluß über die Effizienz des Transfektions-, Biosynthese- und Fällungsverfahrens geben. Die Proben wurden nach Protein A-Sepharose Aufreinigung mittels Western Blot (siehe 3.6.4) und nach der Aufkonzentration mittels Coomassie-Gel (siehe 3.6.2) analysiert.

3.5.3 Aufreinigung im analytischen Maßstab

Die Fusionsproteine werden mit Hilfe von Protein A-Sepharose aus dem Zellüberstand isoliert und konzentriert. Das an die Sepharose gekoppelte Protein A bindet hierbei die Fc-Antikörper-Fragmente der Fusionsproteine. Den Zellkulturüberständen wurde im Verhältnis 1:100 (V/V) Protein A-Sepharose zugefügt. Anschließend wurden die Proben 16h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, um die Bindung der Fusionsproteine an die Protein A-Sepharose zu ermöglichen. Die so an die Protein A-Sepharose gebundenen Fusionsproteine wurden nun

abzentrifugiert (4.000 U/min für 10min bei 4°C) und für Western Blot-Analysen (siehe 3.5.3) oder präparative (siehe 3.5.4) Zwecke verwendet.

3.5.4 Präparative Aufreinigung und Aufkonzentration der Fusionsproteine

Die durch die Protein A-Sepharose aus 40ml Transfektionsüberstand gefällten Fusionsproteine wurden nach deren Abzentrifugation (4.000 U/min für 10min bei 4°C) mit 10ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert (4.000 U/min für 10min bei 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift mit 10ml PBS wurde das Protein A-Sepharose Pellet, an das die Fusionsproteine gebunden waren, in 2ml PBS aufgenommen und auf eine Poly-Prep Chromatographie-Säule (Bio-Rad, München) gegeben. Um das Fusionsprotein von der Protein A-Sepharose trennen zu können, wurde die Poly-Prep Säule mit 500µl Citrat-Puffer pH3 (siehe 3.2.3) beschickt und der Durchlauf, in dem sich das Fusionprotein befand, mit 105µl HCl-Tris-Puffer pH 10 (siehe 3.2.3) neutralisiert. Die so gewonnene Fusionsproteinlösung hatte einen pH-Wert von 7-8. Dieser Vorgang wurde zwei mal wiederholt, um sämtliches Fusionsprotein von der Protein A-Sepharose zu eluieren. Anschließend wurden der Proteinlösung 20µl eines Proteaseinhibitor(PLA)-Gemisches (siehe 3.1.1) hinzugefügt. Zur Erfolgskontrolle der Aufreinigung wurde den einzelnen Eluaten 20µl entnommen und im Western Blot analysiert.

1,5ml des gereinigten und im Western Blot analysierten Fusionsproteins wurde in das Probenreservoir einer Centricon Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheit (siehe 3.1.2) gegeben und mit sterilem PBS auf 2ml aufgefüllt. Anschließend wurde die Probe bei 4.000g für 1h bei 4°C zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, das eingeeengte Probenvolumen von ca. 0,3ml mit sterilem PBS auf 2ml aufgefüllt (Pufferwechsel) und erneut bei 4.000g für 1h bei 4°C zur Konzentration zentrifugiert. Das auf diese Weise aufkonzentrierte Fusionsprotein wurde anschließend bei -20°C gelagert. Der Aufkonzentrationserfolg konnte mittels Western Blot bzw. Coomassie-Gel bestimmt werden.

Mit Hilfe einer BSA-Titration wurde die Konzentration der jeweiligen Fusionsproteine im Coomassie-Gel bestimmt.

3.6 Proteinanalytische Methoden

3.6.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur aufgefaltet. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so daß ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird. Durch das im Laemmli-Puffer enthaltene 2-Mercaptoethanol werden intra- und intermolekulare Disulfidbrücken reduziert.

Um eine optimale Auftrennung der Proteine im Gel zu erhalten, kann die Porengröße eines Geles variiert werden. Die Porengröße wird bei der Polymerisation durch die Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid festgelegt. Die angegebenen Gelkonzentrationen beziehen sich auf die Konzentration von Acrylamid im Gel. Im Laemmli-System werden die Proteinproben zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwandern.

Sammelgel (5ml)

Reagentien	3%
Acrylamidsg. (30% / 0,8%)	0,5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,2 ml
10 % SDS	50 µl
H ₂ O	3,2 ml
10 % APS	50 µl
TEMED	2,5 µl

Trenngel (20 ml)

Reagentien	7%	10%	12%
Acrylamidsg. (30%/0,8%)	5 ml	6,7 ml	8 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml
10 % SDS	230 µl	230 µl	230 µl
H ₂ O	9,7 ml	8,0 ml	6,7 ml
10 % APS	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	11,4 µl	11,4 µl	11,4 µl

Die Proteinproben werden in dem Auftragspuffer für 5min bei 95°C denaturiert und in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese findet bei 60- 90mV statt.

Als Molekulargewichtsstandard wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

Protein	Molekulargewicht (kD)
Myosin	250
BSA	98
Glutamatdehydrogenase	64
Alkoholdehydrogenase	50
Carboanhydrase	36
Myoglobin	30
Lysozym	16
Aprotinin	6
Insulin, β -Kette	4

See Blue Pre-Stained Standard, Invitrogen, Karlsruhe

3.6.2 Färbung von Proteinen im Gel mit Coomassie

Zur Anfärbung der Proteine im Gel wurde eine Lösung mit Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Sigma) verwendet. Dieser Farbstoff bildet Komplexe mit Proteinen. Die Polyacrylamidgele wurden ca. 10min in der Coomassie Färbelösung (0,25g Coomassie, 90ml Methanol, 10ml Essigsäure) geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung (90ml Methanol, 20ml Essigsäure, 90ml H₂O) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Mit dieser Methode können Proteinmengen von 1 μ g gerade noch detektiert werden.

3.6.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Elektrophorese aus den SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Gershoni und Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot Puffer durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf einer „Semidry“-Blotapparatur, wobei für 1h ein Strom von 1mA/cm² Nitrozellulosemembran floß.

3.6.4 Western Blot Analyse

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulose zu verhindern, wurde diese mit Proteinen abgesättigt. Die Nitrozellulose wurde dafür 5min in TBS gewaschen und dann in 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBS-T ü.N. bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde sie drei mal 10min mit TBS-T, um das Milchpulver zu entfernen. Zur Detektion wurden monoklonale, Peroxidase-gekoppelte Fc-spezifische Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden gemäß Herstellerangaben 1:5.000 in 1,5% fettfreiem Trockenmilchpulver

in TBS-T verdünnt. Der Blot wurde dann für 1h bei RT mit der Antikörperlösung inkubiert, danach vier mal für 10min mit TBS-T gewaschen.

Die Detektion erfolgte durch Chemilumineszenz. Hierfür wurde ein ECL-Kit (Amersham, Braunschweig) verwendet. Durch das Enzym Peroxidase kommt es zur Umsetzung des Substrates Wasserstoffperoxid, wobei Sauerstoff frei wird. Hierdurch wird die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Durch die Oxidation wird Luminol auf ein höheres Energieniveau transferiert. Beim Rückfall in den Grundzustand wird diese Energie als Chemielumineszenz frei. Durch den Zusatz von „Enhancern“ wird die Menge des emittierten Lichtes erhöht und zugleich die Emission verlängert (Thorpe *et al.*, 1985). Zur Detektion wurde der Blot in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 unter Schwenken für 1min inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und dann auf einem Röntgenfilm unterschiedlich lange (30sec bis 15min) in Abhängigkeit von der Stärke der Chemilumineszenz exponiert. Anschließend wurde der Röntgenfilm entwickelt.

(Für die Western Blot-Analyse der p27KIP, AKT, Erk1/2, p38- und Stat-3-Phosphorylierungsexperimente ebenso wie für die Analyse der Caspase-3-Aktivierung wurde gemäß den Herstellerangaben (Cell Signaling) verfahren).

3.7 Zellbiologische Methoden

Um die biologische Aktivität der hergestellten Fusionsproteine (IL-22 Fc, IL-22-BP Fc) *in vitro* zu untersuchen wurden diverse zellbiologische Experimente durchgeführt. Nachfolgende werden diese kurz beschrieben.

3.7.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 7% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Kultur gehalten. Zur Vermeidung von Kontaminationen erfolgten alle Arbeiten mit den Zellen an Sterilbänken. Suspensionszellen wurden je nach Wachstum 3 bis 4 mal pro Woche in frischem Medium verdünnt. Adhärente Zellen wurden spätestens bei Erreichen der Konfluenz von den Zellkulturschalen abgelöst und auf frische Zellkulturschalen verteilt. Für eine Lagerung von Zellen über längere Zeit wurden abzentrifugierte Zellen in FKS mit 20% DMSO aufgenommen, in Kryoröhrchen überführt, 24h bei -80°C eingefroren und anschließend in einem Aufbewahrungstank mit flüssigem Stickstoff gelagert. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer.

3.7.2 LPS-Kontaminationstest

Zum Ausschluß einer LPS-Kontamination der Fusionsproteinlösungen wurden die auf LPS sehr sensitiv reagierenden Peritonealmakrophagen verwendet.

Hierfür wurden die Zellen in eine 96 well-Platte in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/well ausgesät und anschließend mit hitzeinaktivierten (bei 95°C für 10min gekocht) Fusionsproteinen (5µg/well), LPS (50ng/well als positiv-Kontrolle) und PBS für 24h inkubiert. Die 96 well-Platte wurde zu Versuchsende bei 1.500 U/min für 5min abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und TNF-α mittels ELISA quantitativ bestimmt.

3.7.3 Detektion der Stat-3-Phosphorylierung (Stat-3-P) nach Stimulation verschiedener Zelllinien

Für diese Versuchsreihe wurden Hepatoma 1-6-Leberzellen verwendet. Nach Stimulation reagieren diese Zellen mit einer Erhöhung des Stat-3-P-Spiegels, der im Western Blot mit spezifischen Antikörpern detektiert werden kann (siehe 3.6.4).

Für den Versuch wurden 5×10^6 Zellen/well in einer 6 well-Platte ausgesät und ü.N. bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurde der FKS-Anteil des Zellmediums von 10% auf 0,5% gesenkt, um den nativen Stat-3-P-Spiegel in den Zellen zu vermindern, der durch FKS-Bestandteile hervorgerufen wird. Hierfür wurde die Platte bei 1.500 U/min für 5min

abzentrifugiert und ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach Inkubation der Zellen für weitere 2h wurden diese mit den Fusionsproteinen für 10 bzw. 20min stimuliert, einmal mit 2ml PBS gewaschen, in 200µl Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und auf Eis gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 30sec mittels Ultraschall aufgeschlossen, die Proteine für 10min bei 95°C denaturiert und die Proben bei 13.000 U/min für 5min abzentrifugiert. Zur Detektion der Stat-3-Aktivierung wurden 20µl der Proben auf ein SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und wie unter 3.6.3/3.6.4 verfahren.

3.7.4 Blockierung der Stat-3-Phosphorylierung

Um den löslichen IL-22 Antagonisten (IL-22-BP Fc) biologisch testen zu können, wurde ebenfalls die Stat-3-Phosphorylierung in der Hepatoma 1-6-Zelllinie gemessen. Die hierzu durchgeführte Zellpräparation war zu der unter 3.8.4 beschriebenen identisch.

Vor Versuchsbeginn wurde rekombinantes IL-22 mit IL-22-BP Fc 30min auf Eis vorinkubiert. Anschließend wurde das Proteingemisch auf die Zellen gegeben und diese für 20min stimuliert. Das weitere Vorgehen ist unter 3.8.4 erläutert.

3.7.5 Gewinnung von RNS aus stimulierten Zelllinien

Zur Gewinnung von mRNS aus Hepatomazellen wurden 2×10^7 Zellen ü.N. bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert und zu Versuchsbeginn mit je 50ng/ml LPS versetzt. Nach 3h wurde aus den Zellen RNS isoliert (siehe 3.4.2).

3.7.6 Durchflußzytometrie, "Fluorescens Activated Cell Sorter" (FACS)

Bei der Durchflußzytometrie werden die Fluoreszenzeigenschaften von Zellen bzw. die Fluoreszenzstärke von mit fluoreszierenden Antikörpern beladenen Zellen untersucht, die in einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet werden. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granulartität der Zelle gewonnen. Auf diese Weise kann die Bindung von durch Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern an Zellen gemessen werden. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Cell Quest Software.

Für die Oberflächenfärbung von Zellen wurden pro FACS-Färbung 1×10^5 Zellen verwendet, die zunächst in 100µl CD16/32 (Fc-Block; 1:200) aufgenommen wurden. Dann wurden die Zellen einmal gewaschen und in 100µl PBS mit dem Erstantikörper (1µg) für 30min auf Eis

inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe eines Sekundärantikörpers in der gewünschten Konzentration. Die Zellen wurden für weitere 20min auf Eis im Dunkeln inkubiert, bevor zunächst zwei mal mit PBS, dann einmal mit PBS/1% BSA gewaschen wurde und die Zellen in 300ml PBS aufgenommen wurden. Die gefärbten Zellen wurden im FACS-Scan analysiert.

3.7.7 "Enzym-linked Immunosorbent Assay" (ELISA)

Alle ELISA wurden mit Kits von R&D Systems nach dem Prinzip des quantitativen enzymgekoppelten „Sandwich“-Immunoassays durchgeführt: 96-Loch-Platten werden mit polyklonalen Antikörpern, die für das nachzuweisende Zytokin spezifisch sind, beschichtet. Standards, Kontrollen und Proben werden in die Einheiten der Platte pipettiert und das nachzuweisende Zytokin wird, falls vorhanden, an die immobilisierten Antikörper gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen durch Waschen entfernt wurden, wird ein enzymgekoppelter Antikörper gegen das jeweilige Zytokin zugegeben. Alle ungebundenen enzymgekoppelten Antikörper werden wieder durch einen Waschschrift entfernt und anschließend eine Substratlösung hinzugefügt. Die Enzymreaktion führt zu einem blau gefärbten Produkt, das ins Gelbe umschlägt, wenn die Reaktion durch Ansäuern abgestoppt wird. Die Intensität der im Photometer gemessenen Farbe ist proportional zur Menge des jeweiligen Zytokins in den Proben. Allein der mSAA-ELISA zum Nachweis von Akut-Phase-Proteinen wurde von der Firma Biognosis bezogen.

3.7.8 Proliferations-Assay

Ruhende Zellen können durch eine Reihe von polyklonalen Aktivatoren zur Proliferation angeregt werden. Die proliferative Antwort ist Anhand des [³H]-Thymidineinbaus messbar. Zur Untersuchung der Proliferation wurden verschiedene Zelllinien in der Konzentration von 2×10^4 Zellen/well mit verschiedenen Stimulatoren für 60h inkubiert. Für die letzten 16h wurde in jedes well 1 μ Ci [³H]-Thymidin zugegeben. Der Einbau des [³H]-Thymidins wurde anschließend mittels β -Counter vermessen.

3.7.9 Apoptose-Assay

Um mögliche Effekte von IL-22 auf den programmierten Zelltod zu untersuchen wurden verschiedene Zellkonzentrationen in einer 12 well-Platte ausgesät und für unterschiedlich lange Zeit mit verschiedenen Konzentrationen von rek. IL-22 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen verschiedenen Analyseverfahren zugeteilt.

3.7.9.1 Annexin V-Färbung

Die Verwendung von FITC-gekoppeltem Annexin V beruht auf der hochspezifischen Bindung des Annexin V an das Phospholipid Phosphatidylserin. Dieses Phospholipid befindet sich in gesunden Zellen ausschließlich auf der Innenseite der Plasmamembran. In einem frühen Stadium der Apoptose kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins an die Außenseite der Membran, wo es mittels Annexin V-FITC detektiert werden kann. Um ein Signal durch membranständige Zellen zu vermeiden, wurde eine Doppelfärbung mit Propidiumjodid (PI) durchgeführt. PI ist eine Substanz, die durch Interkalation in die DNS fluoresziert, aber in Zellen mit einer intakten Plasmamembran nicht eindringen kann. Apoptotische Zellen sind daher Zellen, die Annexin V-positiv, aber PI-negativ sind, während es sich bei PI-positiven Zellen um nekrotische oder sekundär nekrotische Zellen handelt. Um die Auswirkung von IL-22 auf die Apoptoseinduktion im FACS zu analysieren, wurde bei Versuchsende das Kulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500µl 1x Trypsin/EDTA von der Plattenoberfläche abgespült. Um das Trypsin schnell zu inaktivieren und die Zelloberflächenstrukturen zu schützen, wurden 500µl FCS zugegeben. Nach jedem dieser Schritte wurden die Überstände in einem 50ml Falcon gesammelt. Anschließend wurden die Zellen für 8min bei 800 U/min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen auf eine Endkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml in PBS mit 1% FCS resuspendiert, damit während der FACS-Messung die Flußraten in einem gleichmäßigen Bereich lagen und so die Ergebnisse besser miteinander vergleichbar waren. Die Zellen konnten dann mit Annexin V-FITC in einer Verdünnung von 1:400 für 20min bei 37°C gefärbt werden. Zur FACS-Analyse wurden die Zellen in ein FACS-Röhrchen überführt und mit Propidiumjodid in einer Konzentration von 50µg/ml gegen gefärbt. Die Zellen konnten nun im FACS analysiert werden.

3.7.9.2 Messung der Caspase-3- und p38-Aktivierung

Die Caspase-3 gehört zu den Cystein-Aspartat-Proteasen, die während der Apoptose aktiviert werden. In gesunden Zellen liegt das Enzym als inaktives Protein vor und wird durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivierung gehört zu den klassischen Apoptoseparametern. Sie kann unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers und anschließender Analyse im Western Blot biochemisch nachgewiesen werden (siehe auch 3.6.4). Ebenso gilt für p38, dass eine Aktivierung dieser mitogen-activated protein(MAP)-Kinasen apoptotische Prozesse induzieren kann. Für die Versuchsansätze und die Handhabung mit den jeweiligen Antikörpern wurde nach den Herstellerangaben vorgegangen.

3.8 Tierexperimentelle Methoden

Im folgenden Abschnitt sind Methoden für die Durchführung von Tierexperimenten mit Mäusen beschrieben.

3.8.1 Versuche unter Verwendung immunogener Mediatoren

Die Injektionen der verwendeten Substanzen erfolgten in einem Volumen von 200µl PBS. Alle verwendeten Versuchsmäuse (Mausstamm C57BL/6 oder Swiss Nude) waren zwischen 6-8 Wochen alt und wogen 20-25g. Je nach Experiment wurden die verschiedenen Reagenzien entweder i.p. oder i.v. appliziert.

IL-22 Fc-Modell

Um die Auswirkung der Akut-Phase-Reaktion auf verschiedene Stimuli untersuchen zu können, sah dieses Experiment die Injektion von 40µg IL-22 Fc vor. Hierfür wurde das Protein i.v. appliziert und der Versuch nach 4h bzw. 16h beendet. Als Kontrolle diente i.p. injiziertes PBS und LPS (200µg/Maus).

MALP/LPS/SEB-Modell

In dieser Versuchsanordnung wurden 10µg MALP, 200µg LPS und 50µg SEB in einem Volumen von 200µl PBS i.p. injiziert. Als Kontrolle wurde 200µl PBS i.p. injiziert. Nach 2h bzw. 16h wurde der Versuch beendet.

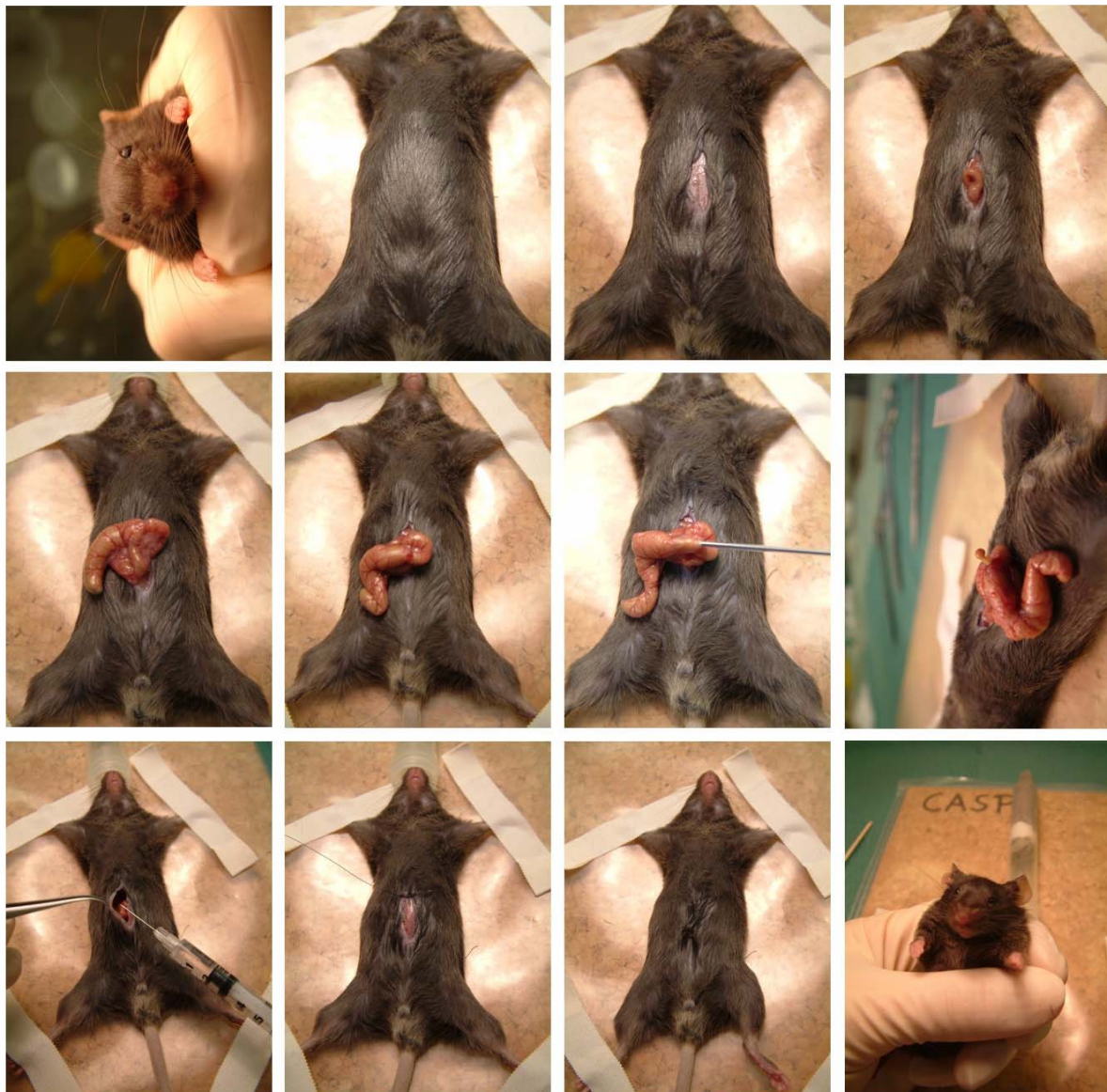
Bei beiden Versuchen wurden nach Versuchsende die Mäuse ausgeblutet, mit Hilfe von Microtainer Zentrifugationsröhrchen (13.000 U/min für 10min bei 4°C) Serum gewonnen, die Organe (Leber, Milz, Lunge) entnommen und bei -80°C bis zur weiteren Analyse aufbewahrt.

3.8.2 Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Das Operationsverfahren der Colon ascendens stent peritonitis (CASP) in der Maus wurde von Dr. N. Zantl entwickelt (Zantl *et al.*, 1998). Vor Beginn der Operation wurde in das Plastikröhrchen eines 16-Gauche Venenkatheters (Venflon®, Helsingborg, Schweden) ca. 3mm von dessen Öffnung entfernt eine Kerbe geritzt. Unter Narkose wurde das Abdomen im Bereich der Linea alba geöffnet, das Colon ascendens eventeriert, ein 7/0 Ethilon-Faden (Ethicon, Norderstedt) ca. 10mm von der Ileocoecalklappe entfernt, durch den antimesenterialen Teil des Colon ascendens gezogen und verknotet. Der vorbereitete Venenkatheter wurde direkt daneben durch die Colonwand in das Intestinallumen eingeführt und mit dem Faden an der Einkerbung fixiert. An der gegenüberliegenden Darmwand wurde der Katheter durch einen zweiten Knoten, wiederum antimesenterial gelegen, fixiert. Danach wurde die innere Katheternadel entfernt und das Plastikröhrchen kurz oberhalb der

Einkerbung abgeschnitten. Zum Nachweis der korrekten intraluminalen Lage des Katheters wurde Stuhl durch dessen Öffnung gedrückt, bis ein Tropfen davon an der Katheteröffnung zu sehen war. Anschließend wurde der Darm in die Peritonealhöhle reponiert und zur Rehydrierung der Maus 0,5ml 0,9% NaCl-Lösung in die Peritonealhöhle injiziert. Danach wurde die Bauchhöhle in fortlaufender Naht mit einem 5/0 Ethilon-Faden geschlossen. Die Hautnaht erfolgte mit einem 3/0 Ethilon-Faden mittels Einzelknopfnahnt (siehe "Bildliche Darstellung der CASP-Operationsmethode").

Bildliche Darstellung der CASP-Operationsmethode



3.9 Ex vivo-Analysen

3.9.1 Peritonealmakrophagen

Peritonealmakrophagen wurden *lege artis* nach einem genehmigten Protokoll unter Beachtung einschlägiger Tierschutzbedingungen (AZ 211-2531-41/02, Regierung von Oberbayern) aus Mäusen gewonnen. Hierzu wurde Mäusen 800µl Thioglykollat i.p. injiziert, was eine Migration von Makrophagen in die Bauchhöhle bewirkt. Nach 4-5 Tagen erfolgte die Peritoneallavage mit 8ml PBS. Die so gewonnene Zellsuspension wurde anschließend abzentrifugiert (alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1.500 U/min für 5min bei 4°C), die enthaltenen Erythrozyten lysiert, die Peritonealmakrophagen mit PBS gewaschen und dann in RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen konnten nun für weitere Versuche verwendet werden.

3.9.2 Isolierung und Herstellung dendritischer (DC-) Zellen aus dem Knochenmark

Um DC-Zellen zu generieren wurden zunächst die Knochenmarkszellen isoliert. Hierfür wurden die Extremitäten von C57bl6-Mäusen von umliegendem Muskel- und Fettgewebe befreit, kurz in 70%igem Ethanol gereinigt und in eine Mediumschale gegeben. Anschließend wurden die Epiphysen von Femur und Tibia abgetrennt und die medialen Röhrenknochenstücke mit je 5ml RPMI-Medium (mit einer 10ml-Spritze, 27G-Kanüle) durchspült. Nach Zentrifugation (alle Schritte bei 1.500 U/min für 5min, RT) der Zellsuspension wurde diese in 10ml RPMI-Medium resuspendiert. Zum Auszählen der vitalen Zellen wurde ein Teil der Zellsuspension mit Trypanblau (siehe 3.2.3) gemischt. Nach Gewinnung des Knochenmarkszellgemisches konnten nun die DC-Zellen isoliert werden.

Dazu wurden 5×10^6 Knochenmarkszellen pro beschichteter Bakterienschale in 10ml RPMI-Medium aufgenommen. Dem Medium wurden 10µl rekombinantes GM-CSF (Granulozyten Makrophagen-koloniestimulierender Faktor) zugegeben. Dies hatte zur Folge, dass entsprechende Progenitorzellen zu DC-Zellen differenzierten. 3 Tage nach der Präparation wurden 10ml RPMI-Medium mit 10µl GM-CSF der Schale zugegeben. Am Tag 6 wurden 10ml der Zellsuspension in ein 50ml Röhrchen überführt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10ml RPMI-Medium mit 10µl GM-CSF resuspendiert und der alten Schale mit den teilweise schon differenzierten DC-Zellen wieder zugefügt. Nach weiteren zwei Tagen wurde erneut der oben beschriebene Mediumwechsel vorgenommen.

So konnten nach der 10 Tage dauernden Zelldifferenzierung aus 5×10^6 Zellen der Knochenmarkszellsuspension 20×10^6 DC-Zellen gewonnen werden. Die Zellen konnten nun für anschließende Versuche verwendet werden.

3.9.3 Serumgewinnung

Narkotisierten Mäusen wurde über die Augenvene peripheres Blut entnommen. Das Vollblut wurde in Serumröhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Serumröhrchen bei 13.000 U/min für 5min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach konnte die Serumschicht abgenommen werden.

3.9.4 Herstellung von Organextrakten zur Zytokinbestimmung

Leber, Lunge und Milz wurden den Versuchsmäusen entnommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Organe in PBS unter Zugabe von 50µl eines Proteaseinhibitor(PLA)-Gemisches homogenisiert und zentrifugiert (10.000 U/min für 20min bei 4 °C). Der Überstand wurde auf seinen Gehalt an Zytokinen mittels ELISA untersucht. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen wurden gegen die Gesamtproteinmenge (Gesamt-Protein-Assay von Pierce) in den Proben normalisiert.

3.9.5 Phago-Test

Der Phagozytoseassay der Firma ORPEGEN Pharma (Heidelberg) wurde laut Hersteller-nachweis durchgeführt. Heparinisieretes Vollblut (durch Zugabe von 100µl Heparin (170U/ml) wurde die Koagulation des Bluts verhindert) wurde mit 20µl opsonisierten, FITC-markierten *E.coli* Bakterien für 10min bei 37°C inkubiert. Als Kontrollansatz wurden die Proben 10min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von Quenchinglösung (100µl) wurden Signale der an der Oberfläche gebundenen und nicht phagozytierten Bakterien eliminiert. Nach einem Waschschrift wurde das Vollblut zweimalig mit Lyse-/Fixierungslösung für 20 bis 40min bei RT inkubiert. Eine Inkubation mit 200µl DNA-Färbelösung für 10min auf Eis wurde nach einmaligen Waschschrift durchgeführt. Die Zellen wurden innerhalb von 60min mittels Durchflußzytometrie (FACSCalibur, BD PharMingen) analysiert, dabei wurden die phagozytierten FITC-markierten Bakterien in den Zellen analysiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Cell Quest Software.

3.9.6 Analyse von reaktiven Sauerstoffradikalen ("oxidative burst")

Die Produktion von reaktiven Sauerstoff-Metaboliten ist neben der Phagozytose ein Effektormechanismus zur Abwehr von Bakterien. Diese Produktion kann in Einzelzellen durch die Verwendung des Farbstoffs Dihydrorhodamin 123 mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden. Dihydrorhodamin ist frei permeabel und emittiert Fluoreszenzsignale nach der Oxidation durch H_2O_2 oder O_2^- zu Rhodamin. Hierzu wurde heparinisieretes Vollblut (siehe 3.9.5) lysiert. Die Leukozyten wurden in HBSS gewaschen und 15min bei 37°C im

Dunkeln mit 60µM Dihydrorhodamin 123 in HBSS + 5mM Glucose inkubiert. Nach Inkubation für 20 min bei 37°C im Dunkeln und Zugabe von 2,5 µM Natriumazid und wurden die Zellen auf Eis transferiert und innerhalb weniger Stunden mittels Durchflußzytometrie (FACSCalibur, BD PharMingen) analysiert. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Cell Quest Software.

3.9.7 Bestimmung der Bakterienzahlen in peripheren Organen

12h nach CASP-Operation wurden Leber, Lunge, Milz und Niere entnommen und eine Peritoneallavage durchgeführt. Die Organe wurden in 5ml PBS aufgenommen und mit einem Zellhomogenisator zerkleinert. Die Zellsuspension ebenso wie die Peritoneallavage wurden seriell in PBS verdünnt. Zur Bestimmung gram-negativer und gram-positiver Bakterien pro peripherem Organ oder der Peritoneallavage wurden Nährböden (Blutagar) der Firma Becton Dickinson, Heidelberg verwendet. Pro Verdünnungsstufe wurde 10µl auf Agarplatten ausplattiert und diese bei 37°C ü.N. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienkolonien gezählt und die Bakterienzahlen pro Organ bzw. Peritonealhöhle ermittelt.

3.9.8 Isolierung von B- und T-Zellen aus der Milz mit magnetischen "beads"

Die Milz einer C57/B6 oder einer Swiss Nude Maus wurde im Ganzen entnommen und mit einem sterilen Metallsieb zu einer Einzelzellsuspension homogenisiert. Die Erythrozyten wurden durch 2min Inkubation mit einer Tris/HCl (17mM, pH 7,2) gepufferten NH₄Cl-Lösung (Merck, Darmstadt) lysiert. Nach zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen gezählt.

Um B-Zellen aufzureinigen wurden die Milzzellen mit B220 gekoppelten magnetischen "beads" (Miltenyi, Bergisch Gladbach) für 30min auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Die Zellen, die an die magnetischen "beads" gebunden hatten, wurden mittels Magneten abgetrennt. Bei der Aufreinigung der T-Zellen wurde genauso verfahren. Hierbei wurden mit Thy 1.2 gekoppelte magnetische "beads" eingesetzt (jeweils nach Herstellerangaben).

Die Qualität der Aufreinigung wurde durch FACS-Analysen überprüft. Dazu wurden die aufgereinigten Zellfraktionen mit einem Antikörper gegen CD3 (PE-markiert) und einem Antikörper gegen IgM (FITC-markiert) gefärbt und analysiert. Die aufgereinigten B- und T-Zell-Populationen hatten eine Reinheit von 80%.

Die aufgereinigten Zellen wurden direkt in RNS-Lyse-Puffer aufgenommen und die RNS mit dem "RNeasy Mini Kit" (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

3.9.9 Zellsortierung im Hochleistungsdurchflußzytometer MoFlo

Mit Hilfe des MoFlo (präparative Hochgeschwindigkeitszytometrie, DakoCytomatation, Glostrup, Dänemark) können Zellen auf Grund der Expression bestimmter

Oberflächenmoleküle separiert werden. Hierfür wurden Zellen wie unter 3.7.6 beschrieben gefärbt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml in PBS/Propidiumiodid (Endkonzentration 1mg/ml) aufgenommen. Direkt vor dem Sortieren wurde mit Hilfe eines Zellsiebes (60 μ m) eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die gesorteten Zellen wurden in Medium aufgenommen und expandiert oder für weitere Experimente stimuliert.

3.10 Statistische Auswertung

Die Werte aus Mehrfachbestimmungen ($n \geq 3$) sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Statistische Signifikanz wurde mit Hilfe des student-t-Tests ermittelt. Signifikante Ergebnisse ($p < 0.05$) sind in den Grafiken mit Sternen markiert.

4. Ergebnisse

Die Akut-Phase-Reaktion ist ein wichtiger Bestandteil der physiologischen Abwehrreaktion bei Entzündungsprozessen. Als zentrale Mediatoren dieser Reaktion wurden TNF- α , IL-1 und IL-6 bereits mehrfach beschrieben. Neueste Erkenntnisse zeigen, dass auch das Zytokin Interleukin-22 in der Lage ist, die Akut-Phase-Reaktion zu induzieren. Um die biologischen Effekte von IL-22 in diesem Zusammenhang näher zu beleuchten, wurden zunächst verschiedene Substanzen und zudem auch ein polymikrobieller Stimulus auf die Aktivierung der Akut-Phase-Reaktion und deren möglichen Induktion von IL-22 hin untersucht.

4.1 Effekte entzündungsfördernder Substanzen oder eines polymikrobiellen Stimulus auf die Akut-Phase-Reaktion *in vivo*

In diesem Experiment wurde den Mäusen wie unter 3.8.1 beschrieben 200 μ g LPS, 10 μ g MALP, 50 μ g SEB oder 200 μ l PBS i.p. injiziert. Der Versuchsansatz beinhaltete 60 Mäuse in 10 Gruppen á 6 Mäuse. Es wurden 2h und 16h nach Beginn des Versuchs *ex vivo* Analysen durchgeführt.

4.1.1 Untersuchung verschiedener Entzündungsparameter im Serum

Es bestand die Annahme, dass abhängig von einem spezifischen Entzündungsreiz entweder durch die Substanzen MALP, LPS und SEB oder durch einen polymikrobiellen Stimulus verschiedene Entzündungsparameter unterschiedlich beeinflusst werden. Grund für diese Annahme war die Kenntnis, dass zum einen alle drei Stimuli unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren und zum anderen, dass das CASP-Modell als Induktor einer polymikrobiellen Sepsis eine Vielzahl von Signalkaskaden gleichzeitig aktiviert. MALP aktiviert spezifisch TLR2-Rezeptoren, LPS spezifisch TLR4-Rezeptoren und SEB als Superantigen vorwiegend T-Zellen (Muhlradt *et al.*, 1998; Poltorak *et al.*, 1998; Gaus *et al.*, 1995; Miethke *et al.*, 1992). Im Vergleich dazu werden nach der CASP-Operation durch die im Darm befindlichen Bakterien und Mikroorganismen mehrere Signalwege aktiviert.

Die Serumproben der Mäuse wurden auf Veränderungen des Akut-Phase-Protein (SAA)-, Chemokin (KC)- und Zytokin (IL-10, IL-6, IL-1 α , TNF- α)-Spiegels untersucht. Mit Hilfe von ELISA-Messungen konnten so abhängig von der applizierten Substanz die Serumspiegelveränderungen wichtiger Entzündungsfaktoren detektiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach Applikation der drei Substanzen der Serumspiegel des Akut-Phase-Proteins SAA nach 2h bei LPS und MALP sich gegenüber der Negativkontrolle verzwanzigfach (von 60 pg/ml auf 1,4 ng/ml), bei SEB jedoch kaum Veränderungen zeigte.

Ergebnisse

Nach 16h war der SAA-Spiegel bei allen drei Gruppen stark erhöht, wobei nach LPS-Applikation der Wert auf 110µg/ml, nach MALP-Applikation auf 80µg/ml und nach SEB-Applikation auf 30µg/ml anstieg (**Tab. 4** und **Abb. 9**). Sowohl 2h als auch 16h nach der CASP-Operation zeigte sich ein deutlicher Anstieg von SAA. Eine massive Konzentrationserhöhung der Akut-Phase-Proteine im Serum wird normalerweise durch die Zytokine TNF-α, IL-1α und IL-6 hervorgerufen (Ramadori *et al.*, 1988). Im Gegensatz zu LPS konnte nach MALP-Applikation nur eine Erhöhung des IL-6-Spiegels auf 11,5ng/ml, nach SEB-Applikation sogar nur auf 3ng/ml nach 2h nachgewiesen werden. Die Serumwerte von TNF-α und IL-1α zeigten keine Veränderungen zur Kontrollgruppe (**Tab. 4**). Da durch die CASP-Operation ein polymikrobieller Entzündungsreiz generiert wird, zeigte sich in dieser Gruppe, dass alle untersuchten Entzündungsparameter stark und signifikant zu der Kontrollgruppe anstiegen.

Stimulus Mediator- Konzentration	PBS	LPS	MALP	SEB	CASP	
SAA [µg/ml]	2h	0,6 ± 0,06 x 10 ⁻⁴	14 ± 6 x 10 ⁻⁴	15 ± 1 x 10 ⁻⁴	2,0 ± 0,7 x 10 ⁻⁴	17 ± 3 x 10 ⁻⁴
	16h	0,8 ± 0,3 x 10 ⁻⁴	107 ± 4	76 ± 30	28 ± 17	10 ± 1
TNF-α [pg/ml]	2h	0 ± 0	1965 ± 484	13 ± 30	0 ± 0	175 ± 29
	16h	0 ± 0	25 ± 61	0 ± 0	0 ± 0	514 ± 134
IL-1α [pg/ml]	2h	191 ± 149	866 ± 630	172 ± 238	137 ± 104	588 ± 93
	16h	162 ± 149	511 ± 222	105 ± 104	186 ± 322	695 ± 170
IL-6 [ng/ml]	2h	0 ± 0	17,2 ± 0,9	11,3 ± 1,5	2,4 ± 0,8	20,6 ± 3,4
	16h	0 ± 0	15,8 ± 3,4	0 ± 0	0 ± 0	15,8 ± 1,7
IL-10 [pg/ml]	2h	0 ± 0	1589 ± 590	0 ± 0	0 ± 0	8808 ± 1174
	16h	0 ± 0	1709 ± 2096	0 ± 0	0 ± 0	16910 ± 6017
KC [pg/ml]	2h	0 ± 0	3862 ± 847	1273 ± 1124	4,5 ± 2,0	15701 ± 885
	16h	0 ± 0	1236 ± 1288	0 ± 0	0 ± 0	9926 ± 1816

Tab. 4:

Tabellarische Darstellung der Veränderungen der Serumkonzentrationen verschiedener Entzündungsparameter nach Stimulation mit LPS, MALP, SEB oder nach CASP. Die Werte wurden mittels ELISA gemessen. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt (n=6).

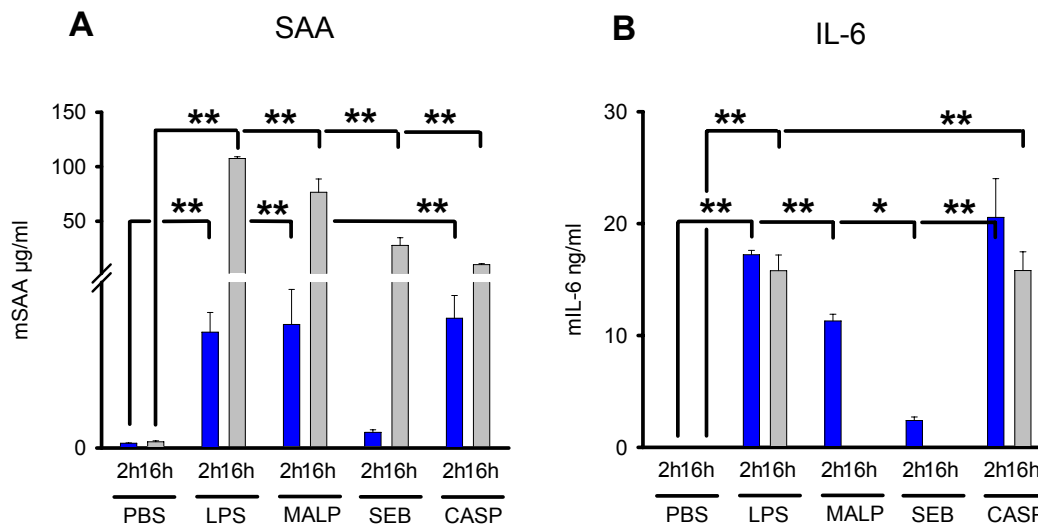


Abb. 9:

*Kinetik der SAA- und IL-6-Serumwerte. Die beiden Abbildungen zeigen die Kinetik der (A) SAA- und (B) IL-6-Serumwerte 2h und 16h nach Stimulation mit LPS, MALP und SEB oder nach CASP. Die Werte wurden mittels ELISA gemessen (n=6; * p < 0.05; ** p < 0.01).*

Um die Akut-Phase-Reaktion zu untersuchen geben IL-6 als Induktor und SAA als Akut-Phase-Protein Aufschluss. Wie oben bereits beschrieben und in **Abb. 9** gezeigt, wurde SAA sowohl 2h als auch 16h nach Entzündungsinduktion signifikant hochreguliert. Zudem zeigte sich, dass IL-6 nach 2h signifikant erhöht war. Ausgehend von diesen Daten stellte sich die Frage, inwieweit der geringe IL-6-Anstieg 2h nach SEB-Applikation für den massiven SAA-Anstieg 16h nach SEB-Applikation verantwortlich war oder ob noch andere Akut-Phase-Protein induzierende Mediatoren wie z.B. IL-22 gebildet werden.

SEB ist ein spezifischer Aktivator von T-Zellen (Miethke *et al.*, 1992). Dies veranlasste uns zu der Annahme, dass nach SEB-Applikation neben IL-6 auch das von aktivierten T-Zellen gebildete Zytokin IL-22 (Dumoutier *et al.*, Feb 2000) ansteigen müsste. Es ist bekannt, dass IL-22 als Induktor der Akut-Phase-Reaktion fungiert (Dumoutier *et al.*, Aug 2000) und für die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in Leberzellen verantwortlich ist. Um diese Annahme näher zu beleuchten, wurde Milz- und Leber-cDNS mittels RT-PCR auf IL-22, IL-22R1, IL-10 und IL-10R2 hin untersucht (anzumerken ist hierbei, dass für IL-22-Proteinmessungen gegenwärtig keine ELISA's zur Verfügung stehen).

4.1.2 Analyse der Expression von IL-10, IL-10R2, IL-22 und IL-22R1 mittels RT-PCR

Die Expressionsveränderung von IL-10, IL-10R2, IL-22 und IL-22R1 sollte mittels der Real-Time PCR-Analyse von Milz- und Leber-cDNS untersucht werden. Hierbei stand im Mittelpunkt, ob IL-22 neben LPS auch durch MALP und SEB induziert werden kann.

Die Analyse der Milz-cDNS (**Abb. 10, A-D**) zeigt, dass IL-22 2h nach MALP-, SEB- und LPS-Applikation stark ansteigt. Allerdings ist nur noch 16h nach LPS-Applikation eine Erhöhung der IL-22-Expression zu sehen (**Abb. 10**). Ebenso zeigt sich, dass die IL-22R1-

Rezeptorkette, die spezifisch für IL-22 ist, 2h und 16h nach Applikation aller drei Stimuli signifikant vermindert exprimiert wird. Die Expression von IL-10 zeigt, dass 2h nach MALP- und LPS-Applikation bzw. 16h nach LPS-Applikation die IL-10-Expressionsrate ansteigt, SEB jedoch keinen Effekt auf dessen Expression hat. Ebenso wie die IL-22R1-Rezeptorkette ist die Expression der IL-10R2-Rezeptorkette sowohl 2h als auch 16h nach Applikation aller Stimuli vermindert. Die 2h PBS-Werte sind denen bei 0h gleichzusetzen (Daten nicht gezeigt).

In der Leber-cDNS (**Abb. 10, E-H**) zeigt sich eine verminderte Expression von IL-22 2h nach MALP-, SEB- und LPS-Injektion. 16h nach Applikation der drei Stimuli zeigt sich diese Verminderung allerdings nur noch nach SEB- und LPS-Injektion. Sowohl 2h als auch 16h nach Applikation von MALP, SEB und LPS wird die IL-22R1-Rezeptorkette signifikant vermindert exprimiert. Im Gegensatz hierzu wird IL-10R2 nicht reguliert. IL-10 wird 2h und 16h nach LPS-Injektion wie auch 16h nach MALP-Injektion hochreguliert.

Ebenfalls wurde anhand einer Kinetik nach CASP-Induktion (**Abb. 10, I-L**) die Expression von IL-10, IL-10R2, IL-22 und IL-22R1 untersucht. Es zeigt sich eine Zunahme der Expression von IL-22 in der Milz 6h nach CASP. Ebenso steigerte sich die Expression von IL-10 in Milz und Leber 6h nach CASP. IL-10R2 wird dabei herunter reguliert, IL-22R1 zeigt andererseits eine Expressionszunahme in Milz (6h und 12h) und Leber (6h).

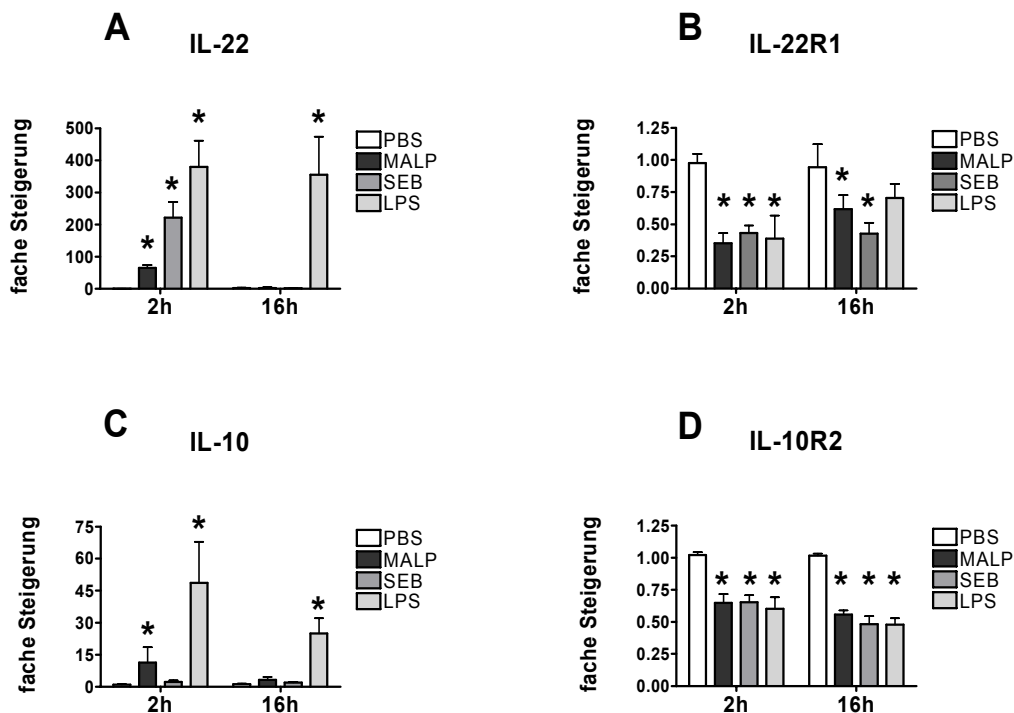


Abb. 10:

Regulation von IL-22, IL-22R1, IL-10 und IL-10R2 in Milz und Leber.

(A-D) Dargestellt ist die Expression von IL-10, IL-22, IL-22R1 und IL-10R2 nach Stimulation mit MALP, SEB und LPS in der Milz (n=4; * p < 0.05).

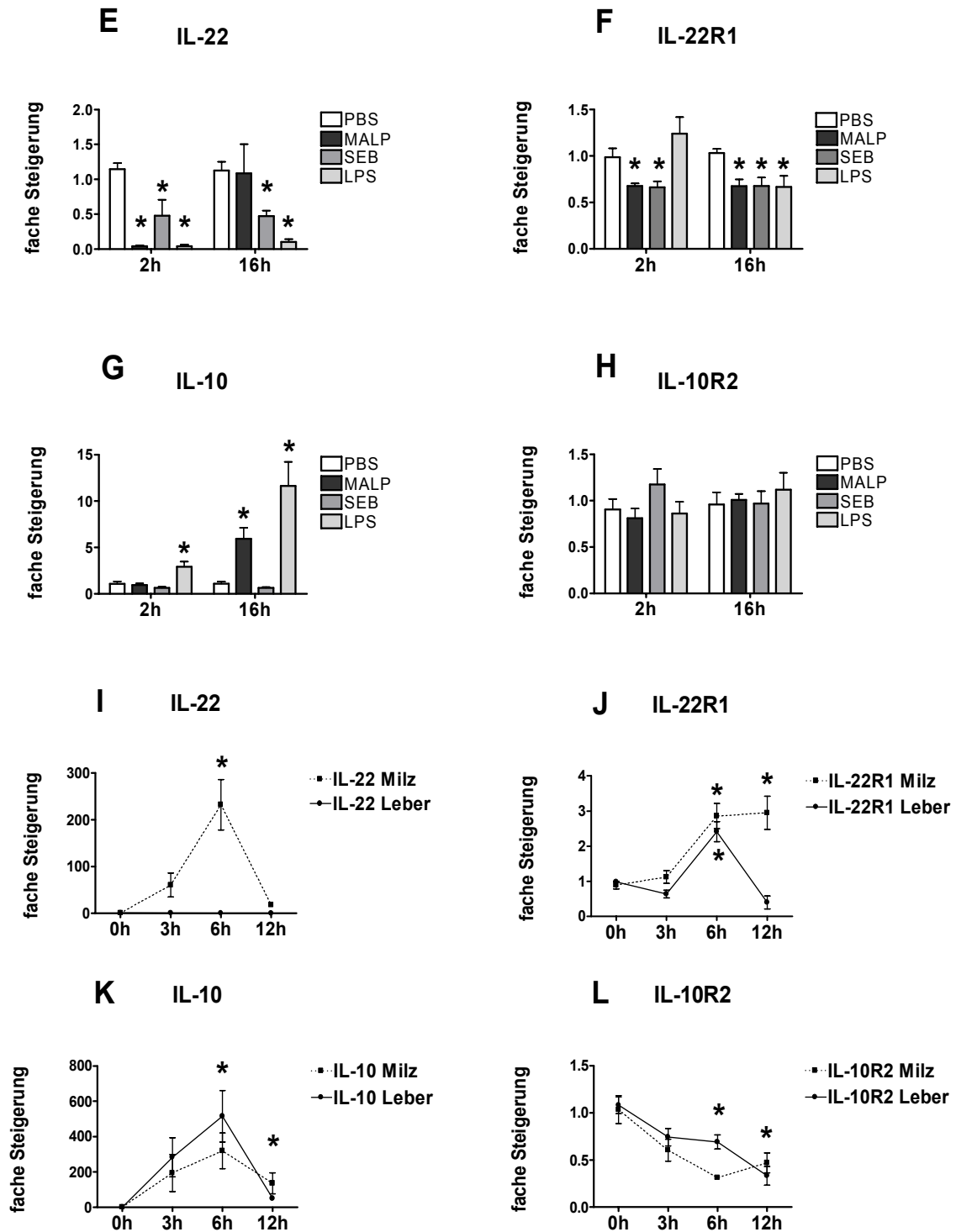


Abb. 10:

Regulation von IL-22, IL-22R1, IL-10 und IL-10R2 in Milz und Leber.

(E-H) In der Leber wird IL-22 vermindert und IL-10 vermehrt exprimiert. Die IL-22R1-Rezeptorkette wird negativ reguliert. Keinen Einfluss haben die Stimuli auf die Expression von IL-10R2 (n=4; * p < 0.05).

(I-L) Dargestellt ist eine Kinetik von CASP-operierten Mäusen. Die präsentierten Ergebnisse verdeutlichen, dass IL-22 in der Milz in ähnlicher Weise reguliert wird wie IL-10 (n=3; * p < 0.05).

Zur Berechnung derfachen Steigerung wurden die PBS-Werte, auf die sich die Expressionsveränderungen beziehen, gemittelt, weshalb es bei den PBS-Werten zu geringen Standardabweichungen kommt.

Zusammengefasst zeigen alle Experimente einen Anstieg der IL-22-Expression 2h und 16h nach LPS-Injektion und 2h nach SEB- und MALP-Injektion sowie 6h nach CASP (**Abb. 10**). Dies lässt vermuten, dass neben den bisher bekannten Akut-Phase-Protein induzierenden Zytokinen IL-1 α , IL-6 und TNF- α auch IL-22 nach Applikation bestimmter Entzündungsstimuli in der Induktion der Akut-Phase-Antwort involviert ist.

4.1.3 Expression von IL-22 in verschiedenen Zellen

Um zu untersuchen, ob neben aktivierten T-Zellen noch andere Zellpopulationen IL-22 produzieren, wurden Milzzellen 0h und 6h nach CASP-Operation wie unter 3.9.8 und 3.9.9 beschrieben in einzelne Zellpopulationen isoliert. Hierbei wurden neben T- und B-Zellpopulationen auch non-B/T-Zellen isoliert. Dies waren v.a. Makrophagen, Endothel- und Stromazellen. Aus allen Zellpopulationen wurde die RNS isoliert und cDNS hergestellt. Die Proben wurden mittels RT-PCR analysiert (**Abb. 11**).

Es zeigt sich, dass neben den T-Zellen auch B-Zellen einen starken Expressionsanstieg von IL-22 zeigen. Im Gegensatz dazu konnte in den non-B/T-Zellen keine IL-22-Expression nachgewiesen werden. Vergleicht man die IL-22-Expressionsraten der T- und B-Zellen, so zeigt sich, dass aktivierte T-Zellen 6,5 mal mehr IL-22 exprimieren als aktivierte B-Zellen (**Abb. 11**). Dies lässt vermuten, dass neben den bisherigen Erkenntnissen nicht nur aktivierte T-Zellen, sondern auch aktivierte B-Zellen für die Produktion von IL-22 wichtig sind.

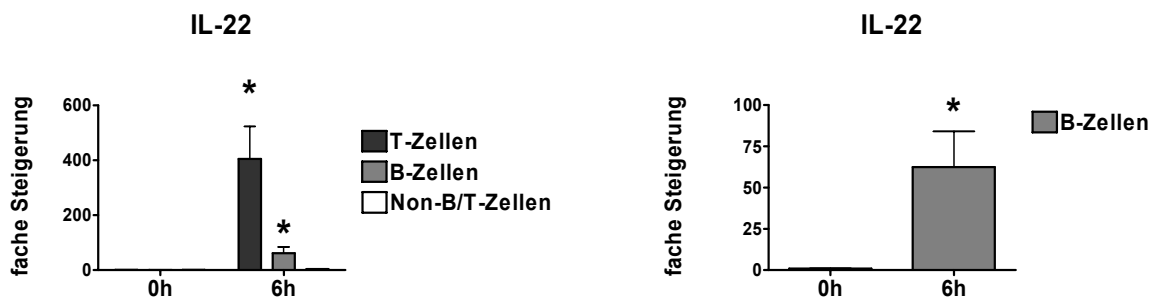


Abb. 11:

RT-PCR-Analyse der Expressionsraten von IL-22. Es zeigt sich, dass neben aktivierten T-Zellen auch aktivierte B-Zellen IL-22 verstärkt exprimieren ($n=3$; $* p < 0.05$).

Um die Regulation von IL-22 in einer Entzündungsreaktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher beurteilen zu können, wurden die biologischen Effekte von IL-22 im folgenden untersucht.

4.2 Biologische Effekte von IL-22 *in vitro* und *in vivo*

Da IL-22 während Entzündungsprozessen induziert wird, wurde die Rolle von IL-22 *in vitro* und *in vivo* analysiert. Zum einen lag die Vermutung nahe, dass IL-22 als IL-10 homologes ähnlich wie IL-10 eine Wirkung auf Immunzellen besitzt. Zum anderen wurde beschrieben, dass nicht-Immunzellen als Effektorzellen fungieren können (Wolk *et al.*, 2004). Um diese Annahmen zu überprüfen, wurden viele verschiedene Zellen hin auf die IL-22 spezifische IL-22R1 Rezeptorkette untersucht, da es nur wenige Erkenntnisse darüber gab, welche Zellen diesen Rezeptor exprimieren.

4.2.1 IL-22-Rezeptor-Screening mittels RT-PCR

Um Zielzellen zu finden wurden Immun- und nicht-Immunzellen mittels RT-PCR auf das Vorhandensein der IL-22R1-Rezeptorkette hin untersucht. Der Hintergrund hierfür war, verschiedene Zelllinien zu identifizieren, die den IL-22-Rezeptor besitzen und somit auf einen IL-22-Stimulus reagieren können. Es konnten verschiedene Zelllinien identifiziert werden, die diese IL-22-Rezeptoruntereinheit besaßen. Die mittels RT-PCR untersuchten Zelllinien sind in der nachstehenden Abbildung (**Abb. 12**) dargestellt. Die IL-22-Rezeptor-positiven und IL-22-Rezeptor-negativen Zelllinien sind in der folgenden Tabelle (**Tab. 5**) zusammengefasst. Im Laufe dieser Arbeit wurden viele weitere Immunzellen (Ana1, Raw112, Raw264.7, BW5147, MC9, D36, EL4, DC) auf die Expression des IL-22-Rezeptors hin untersucht. Hintergrund hierfür war die Annahme, dass IL-22 als IL-10 homologes Zytokin ebenso wie IL-10 biologische Wirkung auf Immunzellen besitzt. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der IL-22-Rezeptor nicht exprimiert war (Ergebnisse nicht dargestellt).

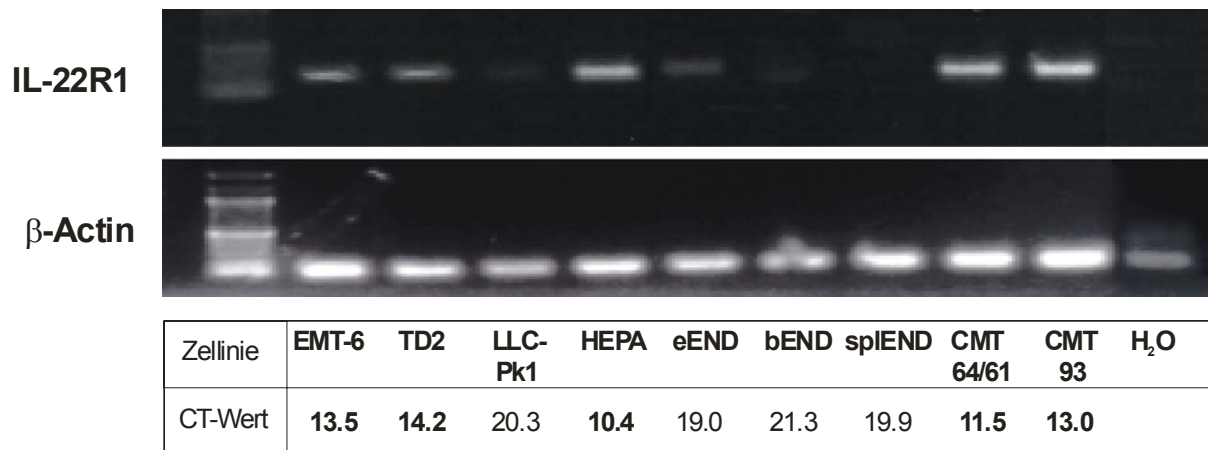


Abb. 12:

Analyse der IL-22R1-Expression verschiedener Zelllinien mittels RT-PCR. Mittels TaqMan-SybrGreen Primern konnten nach dem Verfahren der RT-PCR Zelllinien auf die Expression des IL-22-Rezeptors untersucht werden. In dieser Abbildung sind sie Ergebnisse aller untersuchter Zelllinien dargestellt.

Zelllinie	IL-22-R1 Rezeptor positiv/negativ
Endothelien	
eEND (embryonale Endothelzelle, Maus)	(+)
bEND (Gehirn- Endothelzelle, Maus)	-
spIEND (Milz- Endothelzelle, Maus)	-
Epithelien	
CMT 93 (Rektum-Carcinom-Zelle, Maus)	+
CMT 64/61 (Lungen-Carcinom-Zelle, Maus)	+
LLC-PK1 (Nierenzelle, Schwein)	n.d.
Parenchym (Leber)	
Hepa 1-6 (Leberzelle, Maus)	+
weitere Tumorzellen	
EMT 6 (Mamma-Carcinom-Zelle, Maus)	+
TD ₂ (Pankreas-Carcinom-Zelle, Maus)	+

Tab. 5:

Tabelle aller untersuchten IL-22-Rezeptor-positiven und -negativen Zelllinien (n.d., nicht detektiert wegen Speziesunterschied).

Mit den Rezeptor-positiven Zelllinien wurden im Verlauf der Arbeit weitere Experimente durchgeführt, um die biologische Rolle von IL-22 zu erfassen. Die EMT-6-Tumorzelllinie wurde bzgl. der Reaktion auf IL-22-Stimulation untersucht, da in der Literatur beschrieben wurde, dass das Tumorstadium über eine Aktivierung der IL-22R1-Rezeptorkette gehemmt werden kann (Ramesh *et al.*, 2003).

4.2.2 Nachweis der intrazellulären Aktivierung verschiedener Zelllinien

Um eine direkte Aktivierung der IL-22-Rezeptor-positiven Zelllinien nachzuweisen, wurde die STAT-3-Aktivierung mittels Western Blot detektiert, da STAT-3 ein wichtiger intrazellulärer Mediator in dem durch IL-22 ausgelösten Signaling ist (Lejeune *et al.*, 2002). Hierbei konnte gezeigt werden, dass nicht alle in der RT-PCR für den IL-22-Rezeptor positiv detektierten Zelllinien auch mit STAT-3-Phosphorylierung reagierten. Bei der porcinen Zelllinie LLC-Pk1 korrelieren die Ergebnisse der RT-PCR und der STAT-3-Aktivierung jedoch nicht. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die IL-22R1-Rezeptorkette der Zelllinie LLC-PK1 (porcine) wegen des Speziesunterschieds nicht durch den murinen IL-22R Primer detektiert werden konnte, das verwendete rek. IL-22 sowie der STAT-3-Antikörper allerdings cross-reaktiv sind. Die Ergebnisse der mittels Western Blot detektierten STAT-3-Zellaktivierung sind in nachstehender Abbildung dargestellt (**Abb. 13**). Zur Kontrolle der RT-PCR-Ergebnisse wurden ebenfalls die Rezeptor-negativen Zellen auf eine intrazelluläre STAT-3-Aktivierung untersucht. Hierbei konnten die Ergebnisse der RT-PCR ausnahmslos bestätigt werden.

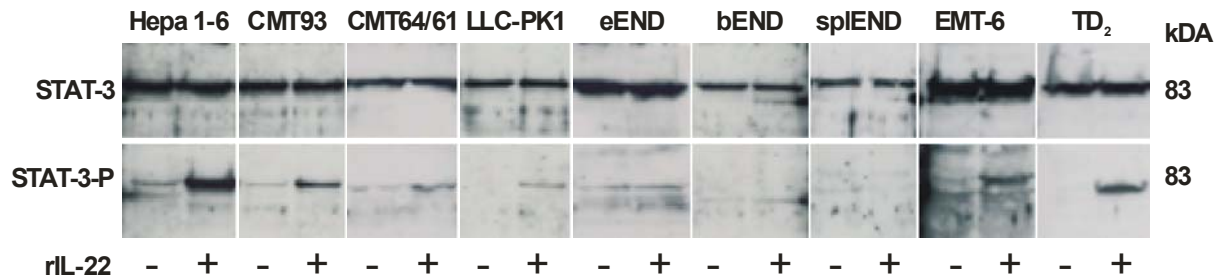


Abb. 13:

STAT-3-Western Blot-Analyse von IL-22 stimulierten Zelllinien. Die abgebildeten Western Blots zeigen verschiedene Zelllinien, die nach Stimulation mit 50ng/ml rek. IL-22 (+) über 10min mit einer Erhöhung der STAT-3-Phosphorylierung reagieren. Als Kontrolle diente PBS (-). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die IL-22-Rezeptor-negativen Zelllinien keine verstärkte STAT-3-Phosphorylierung zeigen. Dargestellt ist eine exemplarische Zusammenstellung aus jeweils 3 Versuchen.

4.2.3 Untersuchung der Zellproliferation

Anhand der bisherigen Ergebnisse wurden die Rezeptor-positiven Zellen auf eine durch rek. IL-22 vermittelte Proliferationsveränderung hin untersucht. Dies war ein geeignetes Experiment, die biologischen Eigenschaften von IL-22 näher zu untersuchen, da IL-22 mögliche proliferations-beeinflussende Effekte besaß (Ikeuchi *et al.*, 2005).

Proliferationsanalyse mittels [³H]-Thymidineinbau

Bei den Zelllinien EMT-6, LLC-PK1, CMT64/61, CMT 93, HEPA 1-6 und TD₂ wurde der Einfluss von IL-22 auf die Proliferation mittels [³H]-Thymidineinbau untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass durch 50ng/ml rek. IL-22 die Proliferation von EMT-6-Zellen auf 48,1% ± 10,0% (p < 0.007) gehemmt werden konnte. Ein ähnlicher, allerdings quantitativ weniger stark ausgeprägter Effekt konnte bei LLC-PK1 detektiert werden. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein proliferationssteigernder Effekt auf die CMT 64/61 Zelle. Für die anderen untersuchten Zelllinien (HEPA 1-6, CMT 93 und TD₂) konnte kein Unterschied nach IL-22-Stimulus festgestellt werden (**Abb. 14**).

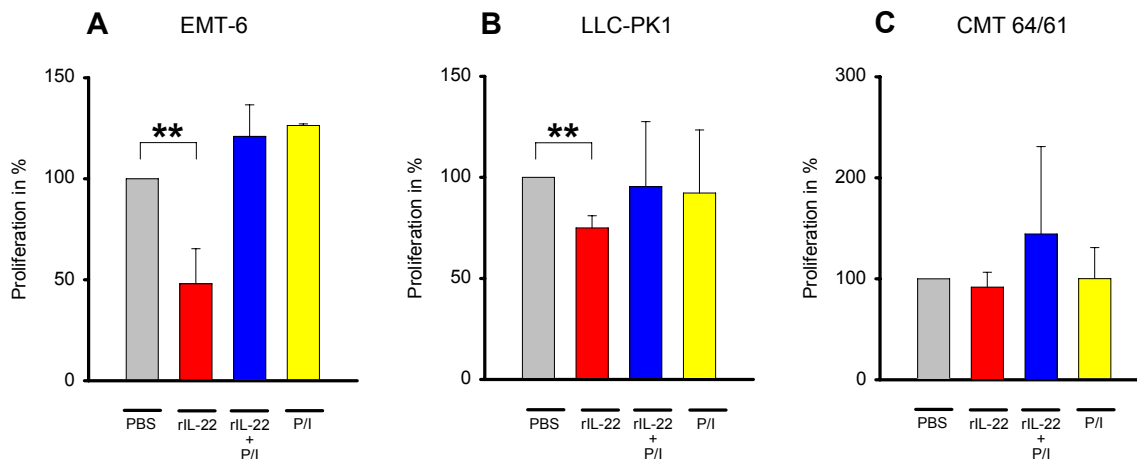


Abb. 14:

*Proliferations-Analyse. Die Abbildungen (A), (B) und (C) zeigen die Proliferationsveränderungen der Zelllinien EMT-6, LLC-PK1 und CMT 64/61. Die Zelllinien wurden 72h mit 100ng/ml rek. IL-22 oder 100ng/ml rek. IL-22 zusammen mit Ionomycin (1µg/ml) und PMA (10ng/ml) (P/I) stimuliert. Als Negativ-Kontrolle diente PBS, Positiv-Kontrolle war Ionomycin (1µg/ml) mit PMA (10ng/ml) (P/I). (A) zeigt eine Abnahme der Proliferation 72h nach Stimulation mit rek. IL-22 auf 48,1% ± 10,0% ($p < 0.007$). (B) zeigt eine Abnahme der Proliferation 72h nach Stimulation mit rek. IL-22 auf 75,0% ± 3,5% ($p < 0.002$). In (C) zeigt sich eine Steigerung der Proliferation 72h nach Stimulation mit rek. IL-22 zusammen mit P/I auf 144,2% ± 61,3% ($p < 0.405$). ($n=3$; $**p < 0.01$).*

Da die IL-22 bedingte Proliferationshemmung bei den EMT-6-Zellen am stärksten war, wurde diese Zelllinie auf weitere IL-22 bedingte biologische Veränderungen untersucht. Da ein möglicher Mechanismus der Proliferationsabnahme eine Erhöhung der Apoptoserate ist, sollte in weiteren Versuchen geklärt werden, ob die Ergebnisse der Proliferationsversuche im Zusammenhang mit einer möglichen Apoptoseinduktion durch IL-22 stehen.

4.2.4 Apoptose-Induktion

Wie oben bereits erläutert, kann eine Abnahme der Proliferation durch vermehrte Apoptose verursacht werden. Da bisher keine genauen Kenntnisse über die biologischen Wirkungen von IL-22 bekannt sind, wurde im folgenden untersucht, ob die Ergebnisse der Proliferationsversuche im Zusammenhang mit einer IL-22 bedingten Apoptoseinduktion stehen. Hierbei wurden verschiedene Ansätze verfolgt, die im folgenden dargestellt sind.

4.2.4.1 Aktivierung von Annexin V

Annexin V ist ein membranständiges Phospholipid, das sich in gesunden Zellen ausschließlich auf der Innenseite der Plasmamembran befindet. In einem frühen Stadium der Apoptose kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins an die Außenseite der Membran, an der es mittels FITC-markierter Antikörper detektiert werden kann. Es konnte

gezeigt werden, dass rek. IL-22 in Abhängigkeit der IL-22-Konzentration und der stimulierten Zellkonzentration keine Apoptose induziert. Die im FACScan analysierten Zellen zeigen, dass rek. IL-22 nach 24h zwar einen messbaren Anstieg der apoptotischen (Annexin V-positive, Propidiumiodid(PI)-negative) und nekrotischen (PI-positive) Zellen induziert (**Abb. 15**), dieser jedoch nicht signifikant war. Der leichte, aber bei jedem Versuch zu detektierende Effekt von rek. IL-22 auf eine mögliche Apoptoseinduktion wurde in einem ergänzenden Versuch analysiert.

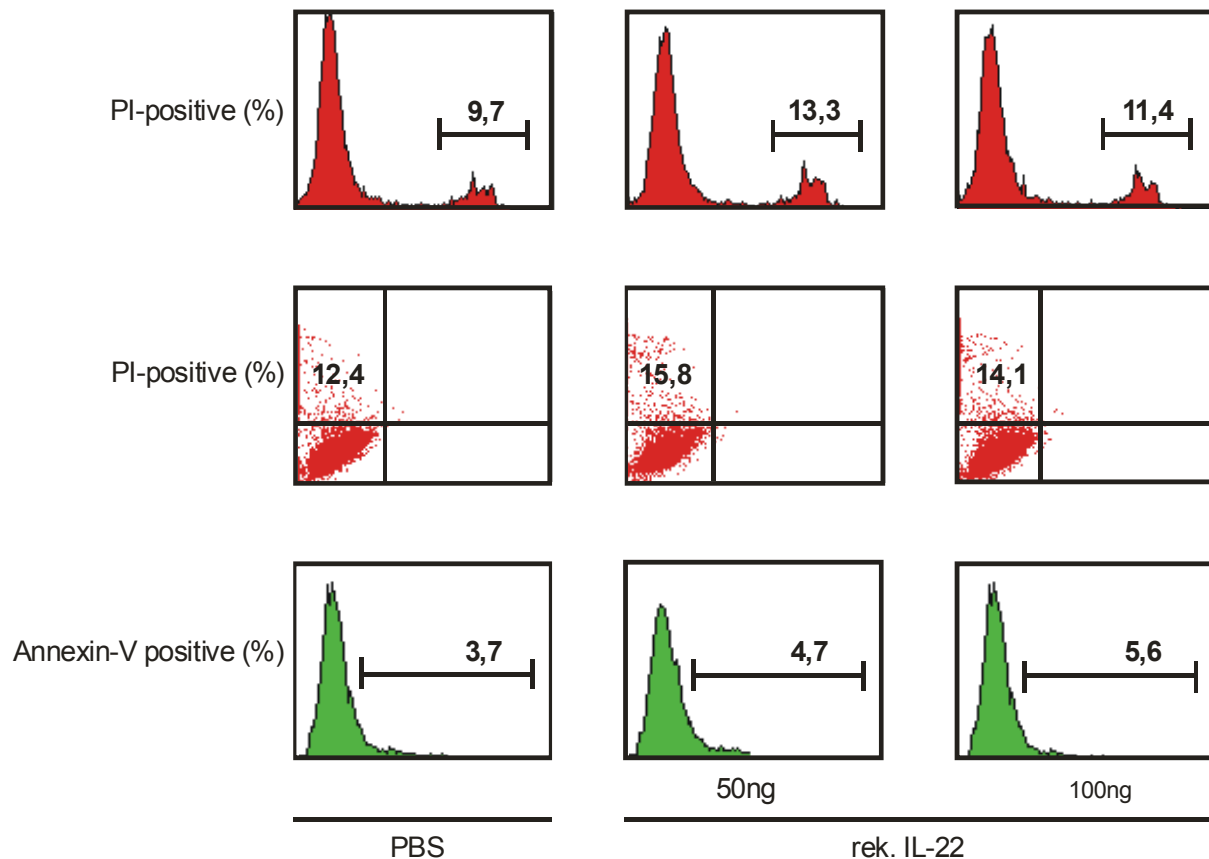


Abb. 15:

FACS-Analyse von Annexin V- und PI-positiven Zellen nach IL-22-Stimulus. Es zeigt sich, dass 24h nach Stimulation mit rek. IL-22 abhängig von der rek. IL-22-Konzentration der Anteil an apoptotischen (Annexin V-positive, PI-negative) Zellen leicht ansteigt. Ebenso steigt der Anteil an nekrotischen (PI-positive) Zellen an. Dargestellt ist eine repräsentative FACS-Analyse aus 3 Versuchen.

4.2.4.2 Aktivierung von Caspase 3 und p38

Um die in der Annexin V-FACS-Färbung erzielten Ergebnisse zu überprüfen, wurden in diesem Versuch die EMT-6-Zellen auf eine IL-22 vermittelte Aktivierung des Apoptose-Markers Caspase 3 und des Signalmoleküls p38 mittels Western Blot-Analyse untersucht. Die Zellen wurden für 6h und 24h mit 50ng/ml rek. IL-22 inkubiert und anschließend auf die Aktivierung des Apoptose-Markers Caspase 3 und aktivierte Caspase 3 hin analysiert.

Hierbei konnte gezeigt werden, dass rek. IL-22 nicht in der Lage ist Caspase 3 zu aktivieren. Ebenfalls zeigt sich keine Zunahme der aktivierten MAP-Kinase p38 nach 24h Stimulation mit 50ng/ml rek. IL-22. Es fällt auf, dass p38 in unstimulierten Zellen eine sehr hohe Aktivität besitzt. Staurosporin (1mM/ml) diente bei dieser Versuchsreihe als positiver Apoptose-Induktor. Es zeigt sich, dass dieser Stimulus deutlich Caspase 3 zu aktivieren vermag. PBS diente als Negativ-Kontrolle (**Abb. 16**).

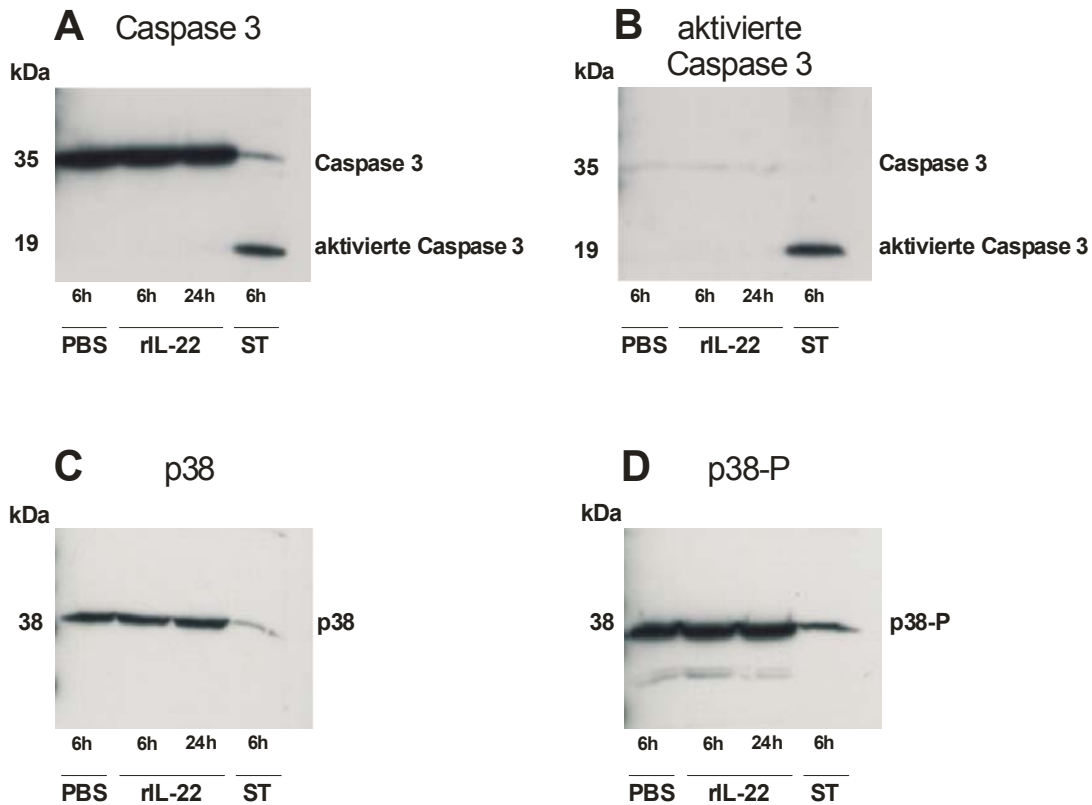


Abb. 16:

Western Blot-Analyse von Caspase 3 und p38 nach IL-22-Stimulus. Es zeigt sich, dass 50ng/ml rek. IL-22 nicht in der Lage sind, 6h bzw. 24h nach Stimulation Caspase 3 zu induzieren. Staurosporin (ST) (1mM/ml) diente als Positiv-Kontrolle. Dabei zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Caspase 3-Aktivität. PBS diente als Negativ-Kontrolle. In (A) ist die inaktive Form der Caspase 3 nachgewiesen, in (B) die aktivierte Caspase 3. Die abgebildeten Western Blots (C) und (D) zeigen den Nachweis von p38 und phosphoryliertem p38. Dargestellt sind repräsentative Western Blots aus 3 unabhängigen Experimenten.

4.2.5 Verminderung der AKT- und Erk1/2-Aktivität nach IL-22-Stimulus

In diesen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob IL-22 neben der Aktivierung von STAT-3 noch andere intrazelluläre Signalmoleküle beeinflussen kann. Im Hinblick auf die Ergebnisse des Proliferations-Assay mit Abnahme der Proliferationsrate der EMT-6-Zellen nach IL-22-

Stimulus auf 48.1% (siehe 4.2.4) standen Signalmoleküle im Mittelpunkt der Untersuchungen, die diese Effekte erklären könnten. Neben Zellzyklus-Markern wie p27 KIP (Sotillo *et al.*, 2005) wurden auch die pro-proliferativ wirksamen Signalmoleküle AKT und Erk1/2 untersucht (Wu *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2005; Romerio und Zella, 2002). Zu Beginn des Versuchs wurden 1×10^6 Zellen/ml ausgesät und für 6h in einem Medium mit 0,5% FCS ausgehungert, um die basale Aktivität von phosphoryliertem AKT und Erk1/2 zu vermindern. Anschließend wurden die Zellen mit 50ng/ml rek. IL-22 für verschiedene Zeitpunkte stimuliert. Hierbei zeigt sich, dass p27 KIP nicht von rek. IL-22 beeinflusst wird (Daten nicht gezeigt), die Phosphorylierung von AKT und Erk1/2 jedoch nach Stimulation mit rek. IL-22 vermindert ist (**Abb. 17**). Nach initialer Aktivitätssteigerung 20min nach Stimulation mit rek. IL-22 vermindert sich die Aktivität von phosphoryliertem AKT 40min nach Stimulation auf das 0.17 fache (= Faktor 5.8) des Ausgangswertes (**Abb. 17, A**). Zudem zeigt sich, dass 40min nach Stimulation mit rek. IL-22 die Aktivität von phosphoryliertem Erk1/2 auf das 0.54 fache (= Faktor 1.8) des Ausgangswertes vermindert ist (**Abb. 17, B**). Analysiert man Erk1 und Erk2 unabhängig voneinander, so zeigt sich, dass Erk1-P auf das 0.68 fache (= Faktor 1.5) und Erk2-P auf das 0.33 fache (= Faktor 3.0) der Ausgangswerte vermindert ist (Daten nicht gezeigt).

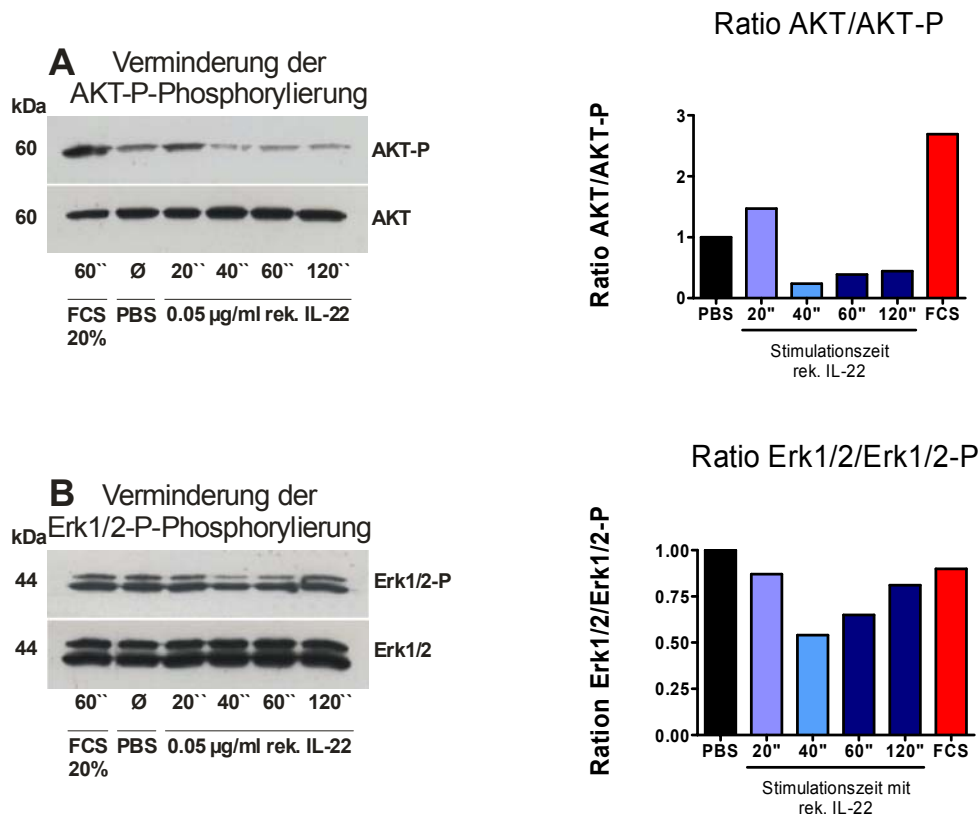


Abb. 17:

Western Blot von AKT/AKT-P und Erk1/2/Erk1/2-P nach IL-22-Stimulus.

(A) Untersuchung der AKT-P-Aktivität nach Stimulation mit rek. IL-22. (B) Untersuchung der Erk1/2-P-Aktivität nach Stimulation mit rek. IL-22. Abgebildet sind repräsentative Western Blots aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Analyse der Bandenintensität erfolgte mit dem Softwareprogramm Scion Image (Microsoft).

4.2.6 Expression von IL-22 in Darmtumoren

Im Rahmen der Arbeit ergab sich die Möglichkeit, durch Kooperation mit der klinischen Forschergruppe "Molekulare Tumorbologie" (Leiter Klaus-Peter Janssen) die Rolle von IL-22 in der Tumorgenese zu untersuchen. Die dabei untersuchte cDNS wurde aus colo-rectalen Darmtumoren Onkogen(K-ras, APC, RasAPC)-exprimierender Mäuse gewonnen. In diesem Modell kommt es somit durch Überexpression dieser Onkogene zur Entstehung von soliden Darmtumoren.

Die oben bereits dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass durch die anti-proliferative Wirkung von IL-22 Tumorwachstum beeinflusst werden kann. Da native Darmepithelzellen IL-22 produzieren, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, welche Rolle IL-22 bei Darmtumoren spielt. Hierfür wurden verschiedene Darmtumoren mittels RT-PCR-Analyse auf ihre IL-22-Expression untersucht. Die Ergebnisse lassen erkennen, dass IL-22 in den Darmtumoren signifikant vermindert exprimiert wird. So zeigt sich, dass die Zellen der Tumore um den Faktor 3.5 (R 8095 A), 2.1 (R 113 A), 4.9 (R 274 A) und 14.1 (APC 9160 C) weniger IL-22 exprimieren als Normalgewebe. Im Durchschnitt wird somit in soliden Darmtumoren um den Faktor 6.2 weniger IL-22 produziert als in Normalgewebe (R 331 KO) (**Abb. 18**).

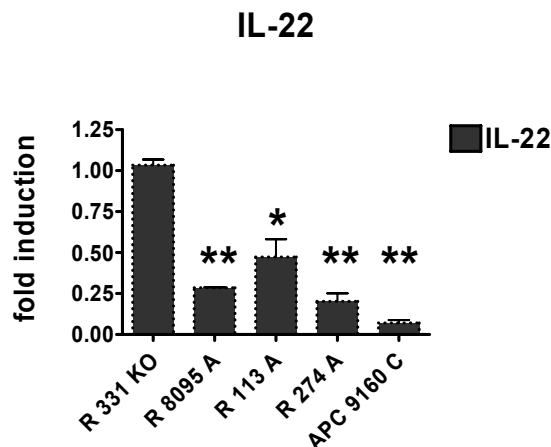


Abb. 18:

IL-22-Expression in Darmtumoren.

*Die Analyse zeigt, dass IL-22 vermindert in den Darmtumoren exprimiert wird. Die cDNS der Darmtumore wurde mir freundlicherweise von der klinischen Forschergruppe "Molekulare Tumorbologie" (Leiter Klaus-Peter Janßen) zur Verfügung gestellt (n=3; *p < 0.05; **p < 0.01).*

4.3 Herstellung von IL-22- und IL-22-BP-Fusionsproteinen

Die bisher gesammelten Ergebnisse lassen vermuten, dass IL-22 als IL-10 homologes und Mitglied der Zytokin-Klasse-II-Rezeptorfamilie eine Sonderstellung einnimmt. Dies kann damit erklärt werden, dass entgegen der bisherigen Vermutung IL-22 nur nicht-Immunzellen zu aktivieren vermag (Wolk *et al.*, 2004) und bisher keine Wirkung auf Immunzellen beobachtet werden konnte. Um dieses Zytokin in seiner biologischen Funktion sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weiter untersuchen zu können, wurden im Verlauf dieser Arbeit die Fusionsproteine IL-22 Fc und dessen biologisch wirksamer Antagonist IL-22-BP Fc synthetisiert, bestehend aus den jeweiligen Proteinen IL-22 und IL-22-BP (lösliche Bindungsdomäne des IL-22-Rezeptors (Kotenko *et al.*, Jun 2001)) und einem biologisch inaktiven IgG2a-Fc-Fragment eines Antikörpers, der die Halbwertszeit *in vivo* für das Protein erheblich steigert (Zheng *et al.*, 1995). Deshalb sind alle weiteren Interleukinbezeichnungen mit der Abkürzung Fc versehen, um deutlich zu machen, dass es sich um ein Fc-Fusionprotein handelt. Als Negativ-Kontrolle diente das synthetisierte IgG2a-Fc-Fragment. Im folgenden werden die Ergebnisse zur Herstellung, Aufreinigung und Aufkonzentration von den Fusionsproteinen (FP) IL-22 Fc und IL-22-BP Fc beschrieben.

4.3.1 Klonierung der Vektor-DNA von IL-22 Fc und IL-22-BP Fc

Ausgehend von dem Vektor pEF-IL-10 Fc, der von Kristina Görg zur Verfügung gestellt wurde, wurden die Vektoren pEF-IL-22 Fc und pEF-IL-22-BP Fc im Verlauf dieser Arbeit hergestellt. Dabei bediente man sich den in dem pEF-IL-10 Fc-Vektor eingefügten Schnittstellen Not I und BamH I, die im folgenden dargestellt sind (**Abb. 19**).

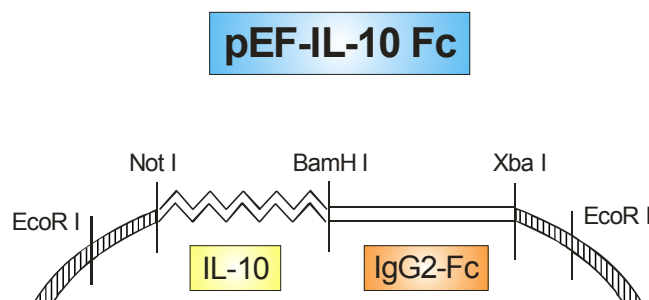


Abb. 19:

Schnittstellen des pEF-IL-10 Fc- Vektors.

Dieser fungiert als Ausgangsvektor für die Klonierung der Vektoren für IL-22 Fc und IL-22-BP Fc.

Zu Beginn der Klonierung wurde aus cDNS isolierter T-Zellen der Milz IL-22 und aus cDNS von Leberlysaten IL-22-BP mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte von IL-22 und IL-22-BP zunächst in den pCR2.1-TOPO Vektor ligiert. Über die durch die

Primer IL-22 Fc fwd., rev. und IL-22-BP Fc fwd., rev. eingeführten Schnittstellen Not I und BamH I wurde IL-22 bzw. IL-22-BP in den pEF-IL-10 Fc-Vektor subkloniert, aus dem zuvor über die selben Schnittstellen IL-10 entfernt worden war. Es resultierten die Vektoren pEF-IL-22 Fc und pEF-IL-22-BP Fc (**Abb. 20**).

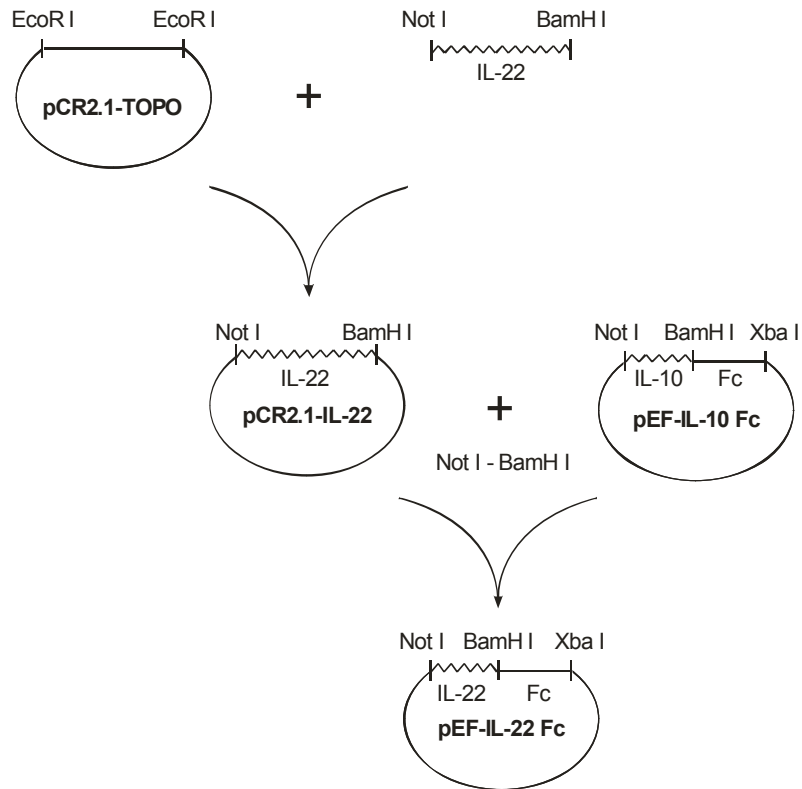


Abb. 20:

Klonierungsschritte des Vektors pEF-IL-22 Fc.

Analog zu der abgebildeten Klonierung von pEF-IL-22 Fc wurde der Vektor pEF-IL-22-BP Fc kloniert. Der Kontroll-Vektor pEF-SpFc, der nur das IgG2a-Fc-Fragment enthält, und der Vektor pEF-IL-10 Fc wurde von Kristina Görg zur Verfügung gestellt.

4.3.2 Transfektionsanalyse

Ziel der Transfektionsanalyse ist es, die Transfektionseffizienz durch Co-Transfektion der Zellen mit Hilfe eines grün fluoreszierenden Kontrollvektors zu analysieren. Um die synthetisierten Proteine IL-22 Fc und IL-22-BP Fc aus den Zellüberständen aufzureinigen zu können, wurden 293T-Zellen mittels der Calcium-Phosphat-Methode transient transfiziert (siehe 3.5.1). Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf alle in dieser Arbeit hergestellten Fusionsproteine (SpFc, Fc, IL-22 Fc und IL-22-BP Fc). 72h nach der transienten Transfektion der 293T-Zellen wurden die Überstände gesammelt. Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden 293T-Zellen mit einem pEGFP-N-1 (grün fluoreszierendes Protein) Kontrollvektor transfiziert. Die Zellen wurden 48h nach Transfektion in einem Durchflußzytometer (FACS) analysiert (siehe 3.5.2). Anhand des Anteils der grün fluoreszierenden Zellen der Kontrolltransfektion konnte so auf die Transfektionsrate der Fusionsprotein-Vektoren geschlossen werden. Es wurden durchschnittlich Transfektionsraten von über 90% erreicht (**Abb. 21**). Zur schnellen Abschätzung des Transfektionserfolges konnten die mit dem pEGFP-N-1-Vektor transfizierten Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden.

FACS-Analyse

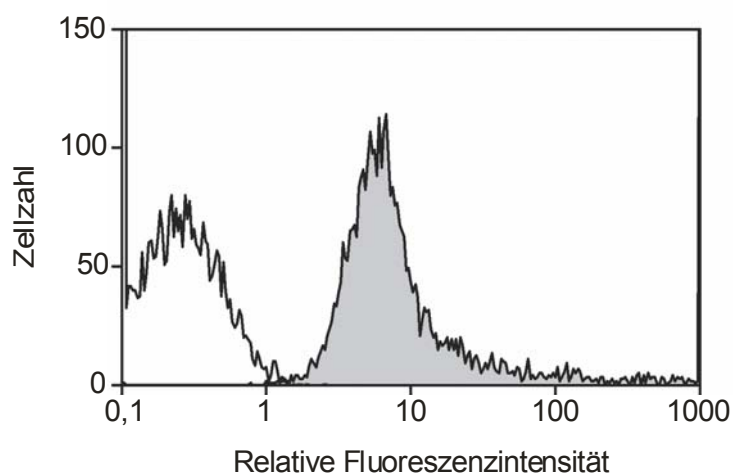


Abb. 21:

FACScan-Analyse transient transfizierter 293T-Zellen.

Die Abbildung zeigt mit dem Kontroll-Vektor pEF-SEM transfizierte Zellen (weiß) und mit dem GFP-Vektor transfizierte Zellen (grau). Die Transfektionsrate beträgt über 95%.

4.3.3 Aufreinigung und Konzentration der Fusionsproteine aus Zellüberständen

Die Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte mit Hilfe von Protein A-Sepharose (siehe 3.5.3). Hierbei erfolgten die Analyse-Schritte mittels Western Blot und Coomassie-Gel. Vor der Aufkonzentration der Proteine konnten diese allerdings nur mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen werden (SpFc (30 kDa), IL-22 Fc (50 kDa) und IL-22-BP Fc (75 kDa)) (**Abb. 22**). Nachdem gesichert war, dass sich das gewünschte Fusionsprotein auch in den Zellüberständen befand, wurden die an die Protein A-Sepharose gekoppelten Fusionsproteine eluiert (siehe 3.5.4) und anschließend erneut mittels Western Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass sich die Proteine erfolgreich aufreinen ließen (**Abb. 23**). Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die Proteine *in vitro* als auch *in vivo* auf deren biologische Aktivität getestet werden. Für die *in vivo*-Versuche war es notwendig, die Proteinkonzentration der Proteinlösungen zu erhöhen. Hintergrund ist, dass zum einen nur eine bestimmte Menge an Volumen i.v. appliziert werden kann und zum anderen hohe Konzentrationen eines externen Stimulus benötigt werden. Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden wie unter 3.5.4 beschrieben aufkonzentriert. Die Ergebnisse des Aufkonzentrationsprozesses zeigen eine deutliche Steigerung der Konzentration vor und nach dem Konzentrationverfahren (**Abb. 23**). Mittels Western Blot- und Coomassie-Gel-Analyse zeigte sich, dass sich die angewendeten Verfahren zur präparativen Herstellung der Fusionsproteine gut eignen. Die Proteinkonzentrationen wurden anschließend anhand der BSA-Beladungskontrolle mit Hilfe der ScionSoftware quantifiziert (Daten nicht gezeigt). Die aufgereinigten und aufkonzentrierten Fusionsproteine konnten nun auf ihre biologische Aktivität *in vitro* und *in vivo* getestet werden.

Ergebnisse

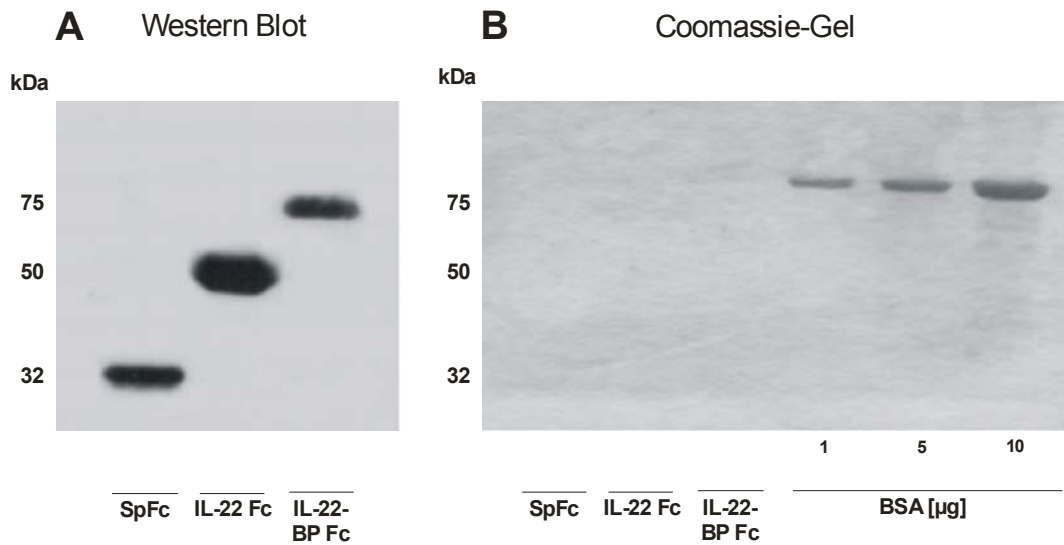


Abb. 22:

Western Blot- und Coomassie-Gel-Analyse der Fusionsproteine. Die Abbildung zeigt die Analyse der Fusionsproteine vor der Aufreinigung und Aufkonzentration. (A) zeigt eine Western Blot-Analyse der gefällten Fusionsproteine aus den Zellüberständen, (B) zeigt die Analyse als Coomassie-Gel mit einer BSA-Titration als Konzentrationsreferenz. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der aus den Zellüberständen gefällten Proteine.

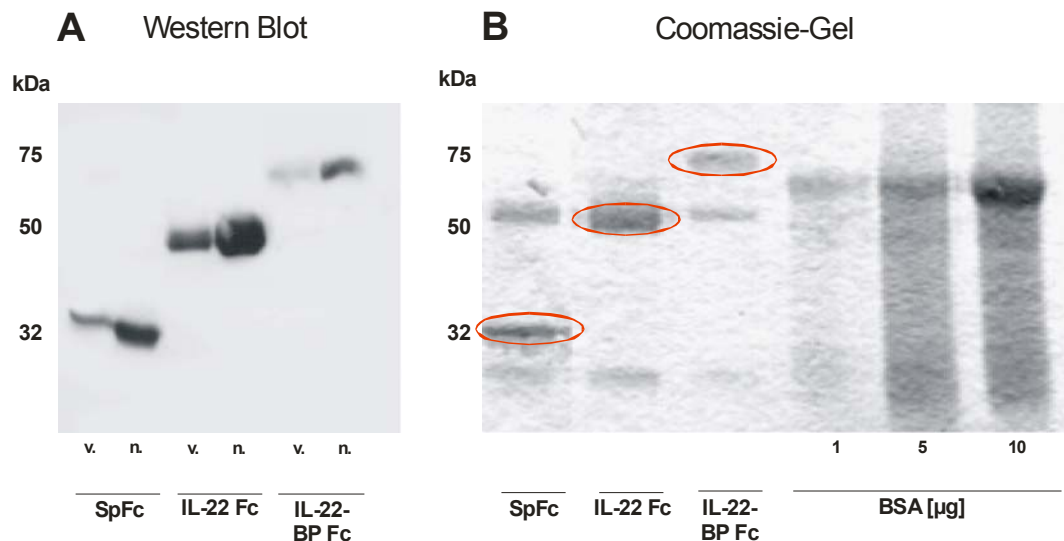


Abb. 23:

Western Blot- und Coomassie-Gel-Analyse der aufgereinigten und aufkonzentrierten Fusionsproteine.

Die Abbildung (A) zeigt die Fusionsproteine vor (v.) und nach (n.) dem Aufkonzentrationsprozeß in einem Western Blot. (B) zeigt die Proteinfraction nach Aufkonzentration im Coomassie-Gel. Die aufgetragenen Proteine und Proteinstandards sowie die BSA-Titration entspricht der von **Abb. 21**. Man erkennt, dass erst nach der Aufreinigung und Aufkonzentration eine Konzentrationsbestimmung der Proteine mittels Coomassie-Gel möglich ist. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl der aufgereinigten und aufkonzentrierten Proteine.

4.3.4 LPS-Kontaminationstest

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass während der Herstellung der Fusionsproteine eine LPS-Kontamination auftrat, wurden die Fusionsprotein-Lösungen auf ihren LPS-Gehalt untersucht. Dafür wurde ein Limulus-Assay in Auftrag gegeben, den die Firma ACILA (Mörfelden-Waldorf) durchführte. Die Untersuchungen der durch Hitze inaktivierten Protein-Lösungen ergaben keinen wesentlichen Unterschied an LPS-Gehalt zwischen der internen Negativ-Kontrolle SpFc (40µg (=40µl) enthielt 0,173 IE/ml) und IL-22 Fc (40µg (=40µl) enthielt 0,254 IE/ml). Der LPS-Gehalt von 40µl PBS lag unter 0,01 IE/ml.

Zudem wurde eine mögliche biologische Auswirkung dieses Unterschiedes in einem LPS-Kontaminationsexperiment an Peritonealmakrophagen verifiziert (siehe 3.8.2). Diese wurden mit hitzeinaktivierten Protein-Lösungen von SpFc und IL-22 Fc (je 5µg/ml) jeweils mit und ohne Polymyxin B (2µg/ml) 24h inkubiert. Dabei diente PBS als negativ-Kontrolle und LPS (50ng/ml) als positiv-Kontrolle. Polymyxin B bindet und neutralisiert vorhandenes LPS. Die Zellen reagieren hochsensitiv auf geringste Mengen an LPS mit einem Anstieg der TNF-α-Produktion. Sollten die Proben LPS-kontaminiert sein, musste es demnach einen Unterschied zwischen den Protein-Lösungen mit und ohne Polymyxin B bzw. zwischen den Proteinlösungen und PBS geben, da IL-22 kein TNF-α induziert. Nach Beendigung des Versuchs wurde TNF-α mittels ELISA gemessen (**Abb. 24**). Es zeigte sich jedoch kein Unterschied zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen. Da sich keine Kontamination der Fusionsproteine mit LPS nachweisen ließ, konnten nun weitere *in vitro*-Versuche durchgeführt werden.

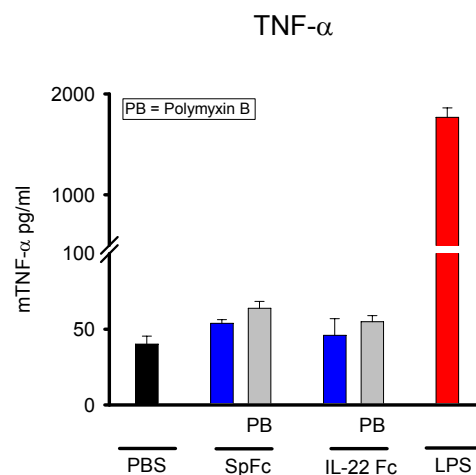


Abb. 24:

TNF-α-Suppressionstest.

TNF-α-ELISA nach Stimulation der Peritonealmakrophagen mit inaktivierten Fusionsprotein-Lösungen (5µg/ml) mit und ohne Polymyxin B (2µg/ml). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen (n=6).

4.4 Analyse der biologischen Aktivität der Fusionsproteine *in vitro* und *in vivo*

Hintergrund dieser Experimente war es, die biologische Aktivität der einzelnen Fusionsproteine zu charakterisieren. Es handelte sich hierbei um *in vitro*- als auch um *in vivo*-Versuche. Alle Untersuchungen wurden mit den aufgereinigten und aufkonzentrierten Fusionsproteinen durchgeführt.

4.4.1 Analyse der biologischen Aktivität *in vitro*

Im Mittelpunkt der Untersuchung stand IL-22 Fc. SpFc diente bei allen Versuchen neben PBS als Negativ-Kontrolle. Zudem wurde auch IL-22-BP Fc als funktioneller Antagonist in die Untersuchungen miteinbezogen.

4.4.1.1 Untersuchung der Hepatoma 1-6-Zelllinie auf die IL-22R1 Rezeptorkette mittels PCR

Wie unter 2.5 beschrieben lassen bisherige Erkenntnisse vermuten, dass Hepatozyten durch IL-22 aktiviert werden können. Zur funktionellen Prüfung der Fusionsproteine wurde deshalb die immortalisierte Leber-Zelllinie Hepa 1-6 verwendet. Diese wurde mittels PCR zunächst auf das Vorhandensein der IL-22R1 Rezeptorkette untersucht (**Abb. 25**). Das hier abgebildete Agarose-Gel zeigt die GAPDH-Kontrolle und die IL-22R1-PCR der Hepa 1-6-Zelllinie.

Im Vergleich dazu kann auch das Ergebnis der RT-PCR zu dieser Zelllinie angebracht werden (siehe 4.2.1).

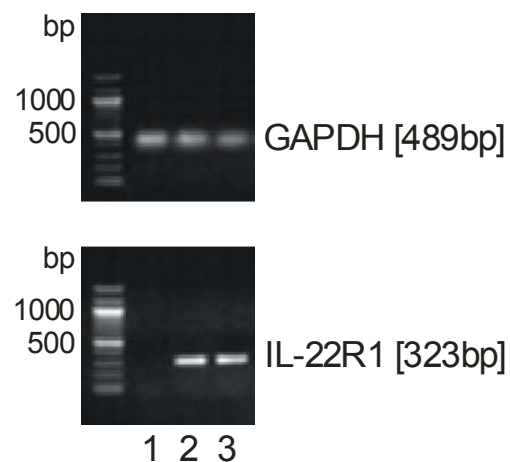


Abb. 25:

IL-22R1-PCR bei Hepatoma 1-6-Zellen.

1 zeigt die H₂O Leerkontrolle, in 2 und 3 wird die PCR mit IL-22R1-Primern gezeigt. Die hier dargestellte Analyse belegt, dass die Hepa 1-6-Zelllinie die IL-22R1 Rezeptorkette besitzt.

4.4.1.2 Untersuchung von IL-22 Fc und IL-22-BP Fc im STAT-3-Assay

Wie oben bereits beschrieben ist STAT-3 ein wichtiges Signaladaptermolekül in der Signalkaskade von IL-22 (Lejeune *et al.*, 2002). Demzufolge diente als Aktivitätsnachweis der Fusionsproteine eine Phosphorylierung dieses intrazellulären Signalmediators. Im folgenden wurde die Zelllinie Hepa 1-6 für die Untersuchungen der biologischen Aktivität der Fusionsproteine verwendet (**Abb. 25**). Die Zellen wurden wie unter 3.8.4 beschrieben stimuliert und das Zelllysate der stimulierten Zellen mittels Western Blot auf ihre STAT-3-Phosphorylierung hin untersucht.

Es zeigte sich nach Stimulation der Zellen mit IL-22 Fc keinerlei STAT-3-Phosphorylierung. Um auszuschließen, dass die Hepa-1-6-Zellen nicht auf einen IL-22-Stimulus reagieren, wurde als Kontrolle rek. IL-22 verwendet. Hierbei konnte nach Stimulation mit rek. IL-22 ein deutlicher Anstieg an phosphoryliertem STAT-3 in den Hepa 1-6-Zellen detektiert werden (**Abb. 26, A**). Dies bestätigte, dass Hepa-1-6-Zellen auf einen adäquaten Stimulus wie rek. IL-22 reagieren. Diese Ergebnisse lassen somit vermuten, dass IL-22 Fc nicht funktionell ist. Da IL-22 als IL-10 Homolog der gleichen Zytokinklasse angehört und nach Bindung an den spezifischen Rezeptor ebenfalls STAT-3 aktiviert, wurde ebenfalls die Wirkung von IL-10 Fc und rek. IL-10 auf die Hepa 1-6-Zellen getestet. Hierbei zeigt sich allerdings, dass durch beide Stimuli keine STAT-3-Aktivierung ausgelöst werden kann (**Abb. 26, A**). Dies lässt vermuten, dass die Hepa 1-6-Zelle keinen IL-10-Rezeptor besitzt. Ebenso verdeutlichen die Ergebnisse, dass SpFc nicht in der Lage ist, STAT-3 zu aktivieren.

Die Ergebnisse zu IL-22-BP Fc belegen, dass der funktionelle Antagonist zu IL-22 eine hohe biologische Aktivität und eine starke Bindungsfähigkeit für rek. IL-22 besitzt. Dies konnte durch Inhibition einer durch rek. IL-22 vermittelten STAT-3-Aktivierung durch IL-22-BP Fc gezeigt werden (**Abb. 26, C**). Als Kontrolle diente der biologisch inaktive Fc-Teil, um eine mögliche Inhibition von rek. IL-22 durch den Fc-Teil nachzuweisen. Es konnte dargestellt werden, dass der Fc-Teil keine blockierenden Eigenschaften aufweist (**Abb. 26, B**).

Im Versuch konnte durch eine 40fach höhere Konzentration des IL-22-BP Fc rek. IL-22 komplett antagonisiert werden (**Abb. 26, C**). Mit einem 4fachen Überschuss an IL-22-BP Fc konnte die Aktivität von rek. IL-22 um 50% vermindert werden (**Abb. 26, E**).

Um auszuschließen, dass IL-22-BP Fc in der Lage ist IL-10 zu binden, wurden DC-Zellen mit rek. IL-22 und rek. IL-10 zusammen mit IL-22-BP Fc stimuliert. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass IL-22-BP Fc nicht in der Lage ist, rek. IL-10 zu binden und dessen biologische Funktion zu inaktivieren (**Abb. 26, D**). Zudem konnten die DC-Zellen nicht durch rek. IL-22 aktiviert werden.

Zusammenfassend zeigt sich, dass IL-22-BP Fc biologische Aktivität besitzt und man mit Hilfe dieses Fusionsproteins die biologische Wirkung sowohl von IL-22 als auch von IL-22-BP Fc *in vivo* näher untersuchen kann.

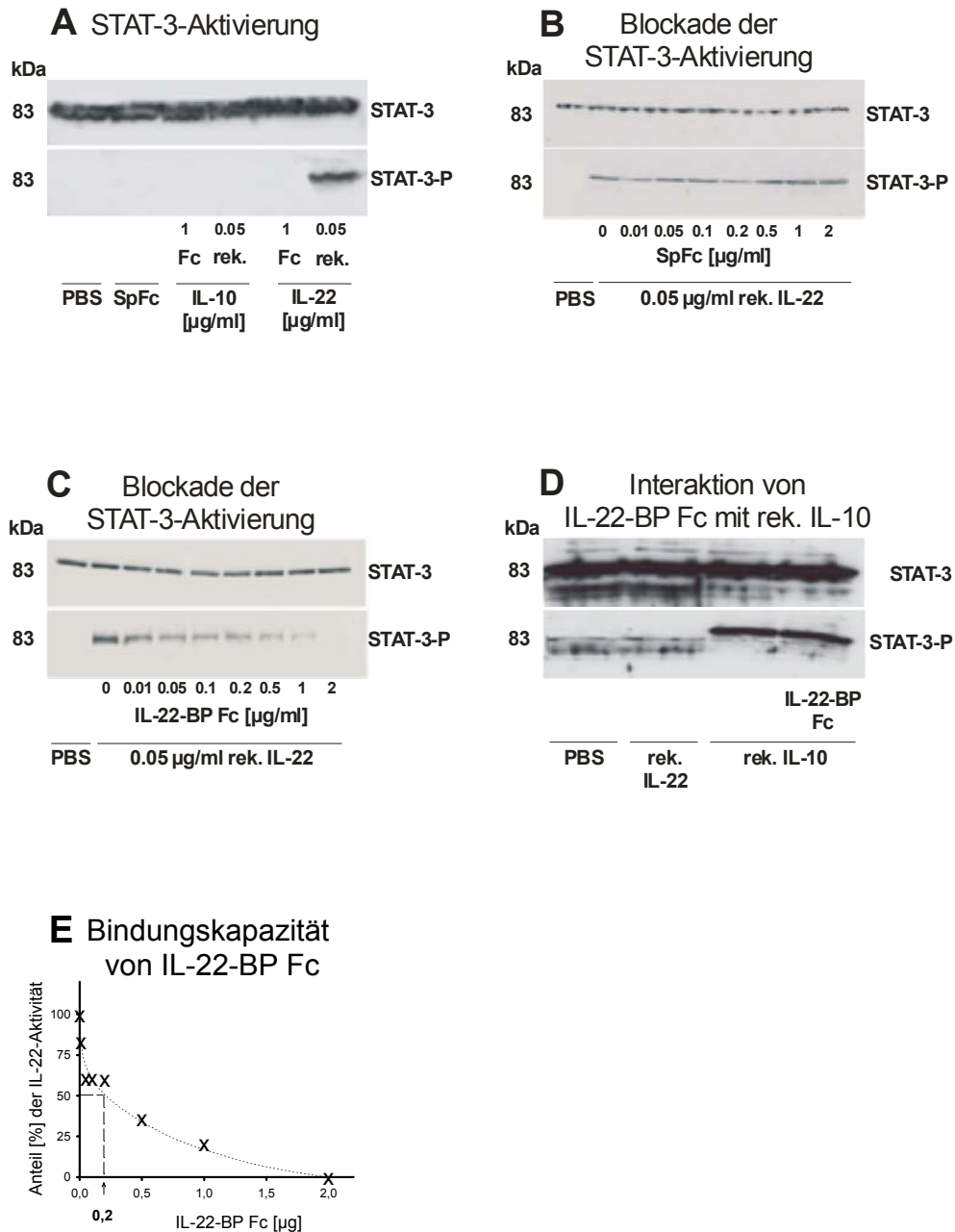


Abb. 26:

Aktivitätsnachweis von IL-22 Fc und IL-22-BP Fc.

(A) Es zeigt sich, dass Hepa 1-6-Zellen nicht durch IL-22 Fc, jedoch durch rek. IL-22 stimuliert werden können. Die Stimulation mit IL-10 Fc und rek. IL-10 zeigt, dass Hepa 1-6-Zellen nicht durch das IL-22-homologe Zytokin IL-10 aktiviert werden kann. (B) zeigt den Kontrollversuch zu (C) mit SpFc. Der Fc-Teil besitzt demnach keine blockierenden Eigenschaften. (C) zeigt die Inhibition einer durch 50ng/ml rek. IL-22 ausgelösten STAT-3-Phosphorylierung mittels IL-22-BP Fc. 2µg/ml IL-22-BP Fc sind in der Lage die IL-22-Wirkung vollständig zu antagonisieren. Zudem zeigt sich, dass IL-22-BP Fc die Aktivität von IL-10 nicht beeinflusst (D). Hierzu wurden dendritische Zellen mittels rek. IL-22, rek. IL-10 und rek. IL-10 zusammen mit IL-22-BP Fc stimuliert. (E) zeigt die Bindungskapazität des IL-22-BP Fc-Proteins. Bei 0.2µg IL-22-BP Fc konnte die Aktivität von rek. IL-22 um 50% vermindert werden. Dargestellt sind exemplarische Western Blots aus 3 Versuchen.

4.4.1.3 Umklonierung von IL-22 Fc in IL-22 ohne Fc (IL-22 myc)

Um die bisherigen Ergebnisse bzgl. der *in vitro*- und *in vivo*-Versuche mit IL-22 Fc und rek. IL-22 näher zu beleuchten, wurde ein neues IL-22-Konstrukt ohne Fc-Teil hergestellt. Hintergrund dieser Überlegung war, dass das Fc-bedingte Dimer eine unphysiologische Konformation einnimmt oder IL-22 als Dimer keine biologische Aktivität besitzt.

Bei der Klonierung wurde nach der unter 4.3.1 beschriebenen Methodik vorgegangen. Hierbei wurde IL-22 mit einem myc-tag versehen, um das IL-22-Protein über anti-myc-Säulen detektieren und aufreinigen zu können. Zu Beginn der Klonierung wurde aus cDNS isolierter T-Zellen der Milz IL-22 mittels PCR amplifiziert. Das myc-Epitop wurde dabei über den IL-22 myc Reverse-Primer eingebracht und an das 3'-Ende angehängt. Anschließend wurde IL-22 myc in den pEF-SEM-Vektor ligiert. Nach transienter Transfektion von IL-22 myc wurde mit den Transfektionsüberständen erneut die STAT-3-Aktivierung in Hepa 1-6-Zellen untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene Klone (Klon 5 und 6) des neu konstruierten IL-22 myc Proteins verwendet. Die Ergebnisse zeigen eindrucksvoll, dass das IL-22 myc in der Lage ist, STAT-3 zu phosphorylieren (**Abb. 27**). Dies lässt den Schluss zu, dass die Dimerisierung des IL-22 Fc-Proteins der Grund für die biologische Inaktivität war.

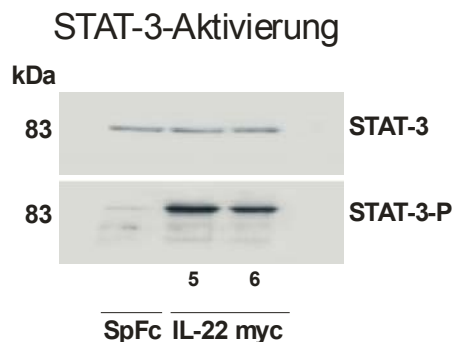


Abb. 27:

Western Blot zur Aktivitätsbestimmung von IL-22 myc.

Western Blot der STAT-3-Phosphorylierung bei Hepa 1-6-Zellen nach Stimulation mit IL-22 haltigen Transfektionsüberständen. Nach Transfektion der 293T-Zellen mit IL-22 myc wurden die Hepa 1-6-Zellen mit den nativen Überständen von Klon 5 und Klon 6 10min inkubiert. Dargestellt ist ein exemplarischer Western Blot aus 3 Versuchen.

4.4.2 Analyse der biologischen Aktivität *in vivo*

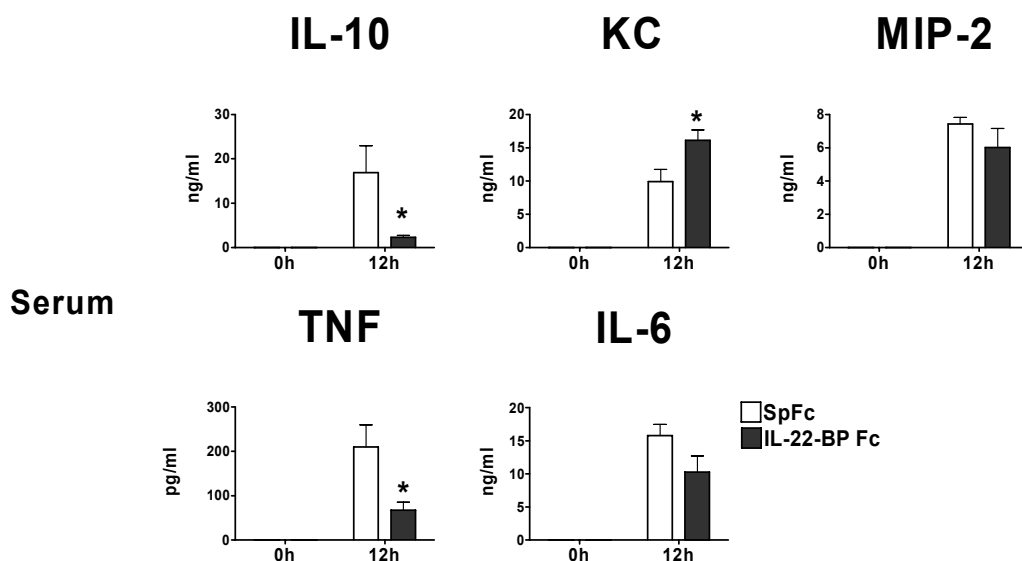
Parallel zu den *in vitro*-Versuchen wurde IL-22-BP Fc in weiteren Versuchen auch *in vivo* getestet. Es folgen nun die Ergebnisse zu den verschiedenen *in vivo*-Experimenten.

Charakterisierung der biologischen Aktivität von IL-22-BP Fc im CASP-Modell (Colon Ascendens Stent Peritonitis)

Da zu Beginn der Arbeit gezeigt werden konnte, wie IL-22 und IL-22R1 während der Sepsis reguliert werden, sollte nun durch Inhibition der endogenen IL-22-Wirkung durch IL-22-BP Fc dessen Beitrag während der Sepsis untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde den Mäusen 4h vor CASP-Beginn 10µg IL-22-BP Fc i.p. injiziert. Als Kontrolle dienten 10µg SpFc. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, um die systemische Verteilung des Fusionsproteins zu gewährleisten. 12h nach CASP-Operation wurde das Serum gewonnen und zusammen mit den Organen Leber, Lunge, Milz und Niere *ex vivo* analysiert. Zudem wurde eine weitere Experimentalgruppe von jeweils 7 Mäusen über einen Zeitraum von 96h beobachtet und Überlebenskurven erstellt.

4.4.2.1 IL-22-BP Fc als immunmodulierender Mediator

Im Vergleich zu SpFc kam es nach Applikation von IL-22-BP Fc zu einer signifikanten Verminderung der wichtigen immunmodulatorischen Zytokine IL-10 und TNF- α und zu einem Anstieg von KC. Zudem zeigten sich in der Peritoneallavage deutlich verminderte IL-10-Spiegel (**Abb. 28**).



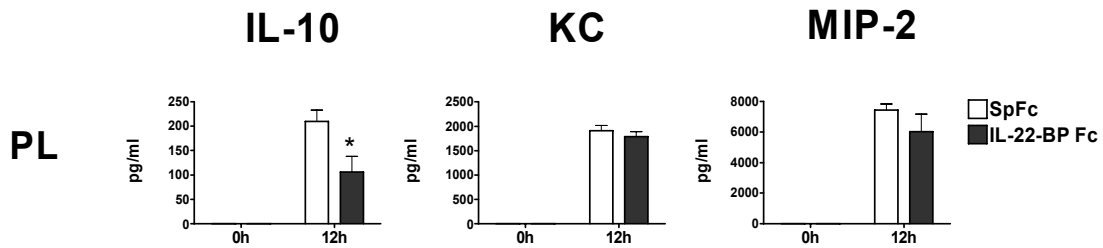


Abb. 28:

Zyto- und Chemokinspiegel in Serum und Peritoneallavage.

Die Ergebnisse zeigen die Serum- und Peritoneallavagewerte 0h und 12h nach einer CASP-Operation. Die Ergebnisse zeigen signifikant verminderte Serumspiegel von IL-10 und TNF- α und erhöhte Serumspiegel von KC bei den IL-22-BP Fc vorbehandelten Mäusen. IL-10 ist signifikant vermindert in der PL (n=12; * p < 0.05).

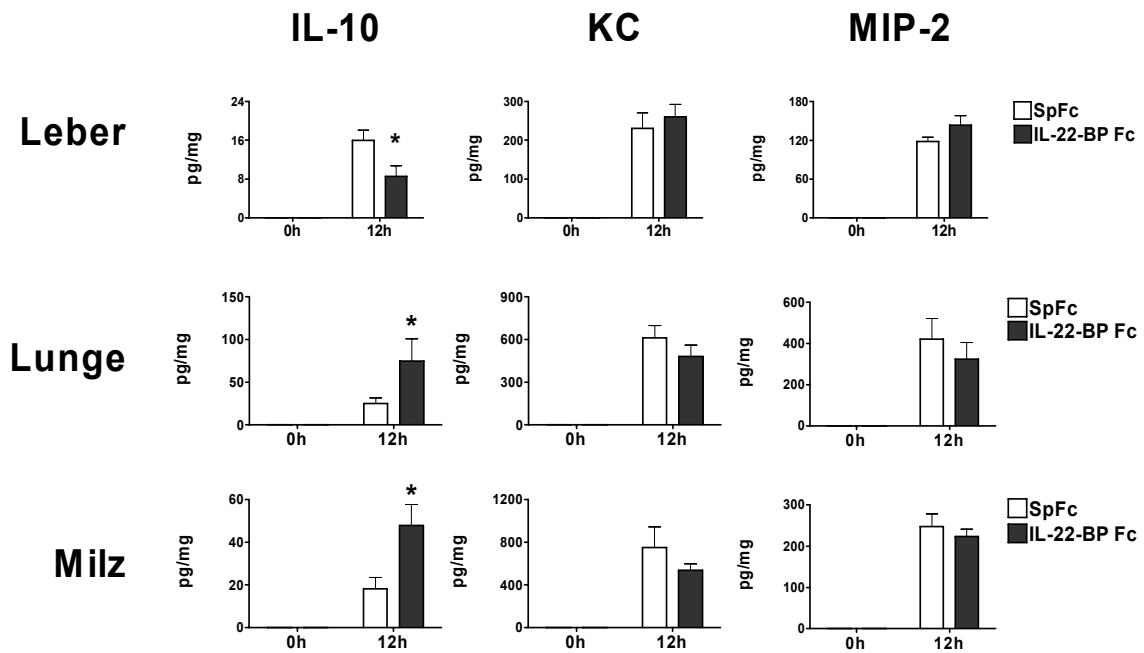


Abb. 29:

Zyto- und Chemokinspiegel in Leber, Lunge und Milz.

Zytokinanalyse der Peritoneallavage (PL) und der Organe Leber, Lunge und Milz. Es zeigen sich sowohl in der PL als auch in der Leber verminderte IL-10-Spiegel. Die darüber hinaus untersuchten Faktoren KC und MIP-2 weisen keine signifikanten Veränderungen auf (n=12; * p < 0.05).

Im weiteren wurden die Organe Leber, Lunge und Milz untersucht. Es zeigte sich nach Analyse der Organzytokine, dass IL-10 in der Leber vermindert produziert wird. Allerdings waren in Lunge und Milz erhöhte IL-10-Spiegel zu messen (**Abb. 29**).

4.4.2.2 IL-22-BP Fc bedingt eine erhöhte Zellakkumulation in der Bauchhöhle

Die bakterielle Belastung in der Bauchhöhle nach CASP-Operation ist eine wichtige Determinante für den weiteren Verlauf der Peritonitis und zudem ein wichtiger prädiktiver Faktor für die Entstehung sowie den Ausgang einer Sepsis. Die inflammatorische Reaktion und die Akkumulation von Abwehrzellen in der Bauchhöhle dient der Abtötung der Bakterien und ist ein entscheidender Faktor in der physiologischen Abwehrreaktion des Organismus. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob IL-22-BP Fc in der Lage ist, diese Abwehrreaktion zu beeinflussen. Die gezeigten Ergebnisse verdeutlichen, dass die mit IL-22-BP Fc vorbehandelten Mäuse eine erhöhte Akkumulation von Immunzellen in der Bauchhöhle aufweisen. Granulozyten ($\text{Gr1}^+/\text{Mac1}^+$) und Monozyten/Makrophagen ($\text{Gr1}^+/\text{Mac1}^+$) zeigen hierbei eine signifikant erhöhte Zellzahl. Allerdings konnte dabei keine erhöhte Burst-Aktivität nachgewiesen werden (**Abb. 30**). Dabei wird die Produktion von Sauerstoffradikalen als Maß für die Zellaktivierung gemessen.

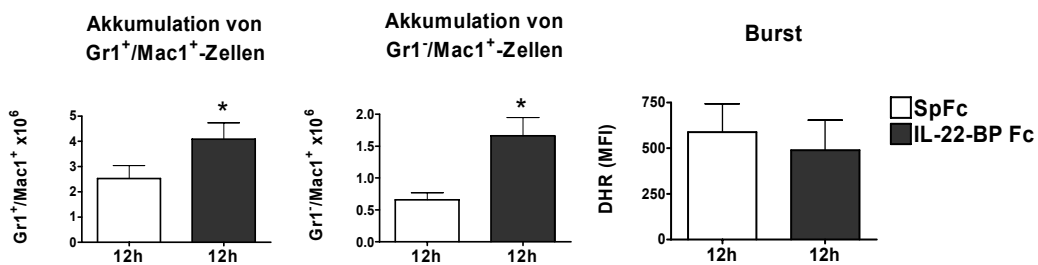


Abb. 30:

Akkumulation von Immunzellen in der Bauchhöhle.

Erhöhte Akkumulation von Immunzellen in der Bauchhöhle 12h nach CASP nach Vorbehandlung mit IL-22-BP Fc.

*Es zeigt sich eine erhöhte Zellzahl von Granulozyten und Monozyten/Makrophagen in der Bauchhöhle. Dies lässt auf eine verstärkte Abwehrreaktion des Organismus schliessen (n=9; * p < 0.05).*

4.4.2.3 Verminderte systemische bakterielle Belastung nach Vorbehandlung mit IL-22-BP Fc

Da es nach Applikation von IL-22-BP Fc zu einer erhöhten Zahl von Immunzellen in der Bauchhöhle kommt, wurde im Folgenden die bakterielle Belastung am Entzündungsort und in den Organen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl in der Peritoneallavage als auch in den Organen Niere und Leber die bakterielle Belastung signifikant vermindert war (**Abb. 31**). In Milz und Lunge konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

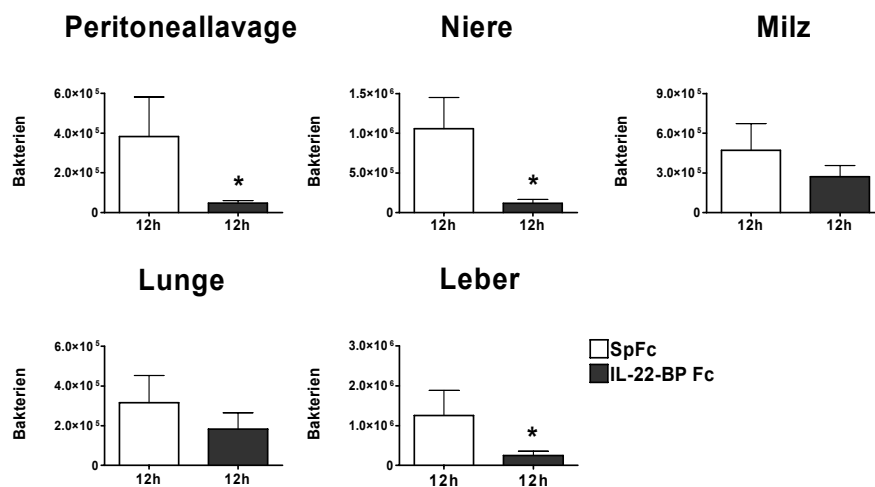


Abb. 31:

Bakterielle Belastung der Bauchhöhle und verschiedener Organe.

*Es zeigt sich, dass die Vorbehandlung mit IL-22-Bp Fc zu einer verminderten bakteriellen Belastung des gesamten Organismus führt. Signifikant verminderte Bakterienzahlen konnten dabei in Peritoneallavage, Niere und Leber festgestellt werden (n=9; * p < 0.05).*

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass ausgehend von den verminderten IL-10-Spiegeln der Bauchhöhle und die dadurch erhöhte Anzahl von Immunzellen in der Bauchhöhle die systemische Bakterienlast vermindert werden kann. Es bleibt zu klären, ob neben den bisher dargestellten noch andere Faktoren dazu beitragen, die bakterielle Belastung der Organe zu vermindern.

4.4.2.4 Vorbehandlung mit IL-22-BP Fc resultiert in einer erhöhten Phagozytoseaktivität der Leukozyten

Die Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Monozyten ist einer der wichtigsten Abwehrmechanismen des Körpers gegen bakterielle Infektionen. Der Phagozytoseprozeß kann in mehrere Hauptphasen eingeteilt werden: Chemotaxis,

Anlagerung von Partikeln an die Zelloberfläche der Phagozyten, Phagozytose und intrazelluläre Vernichtung durch sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige Mechanismen. Aufgrund der bisher gezeigten Daten kann vermutet werden, dass additiv zu der verminderten Bakterienzahl in der Bauchhöhle und der damit verbundenen geringeren systemischen bakteriellen Belastung des Organismus auch eine erhöhte Phagozytoseaktivität der Leukozyten eine wichtige Rolle spielen könnte. Es zeigte sich, dass nach Vorbehandlung der Mäuse mit IL-22-BP Fc 12h nach CASP-Operation die Phagozytoseaktivität der Leukozyten im Blut deutlich erhöht ist im Vergleich zu SpFc (**Abb. 32**). Dieser Effekt konnte allerdings nicht bei dem 0h CASP-Zeitpunkt festgestellt werden.

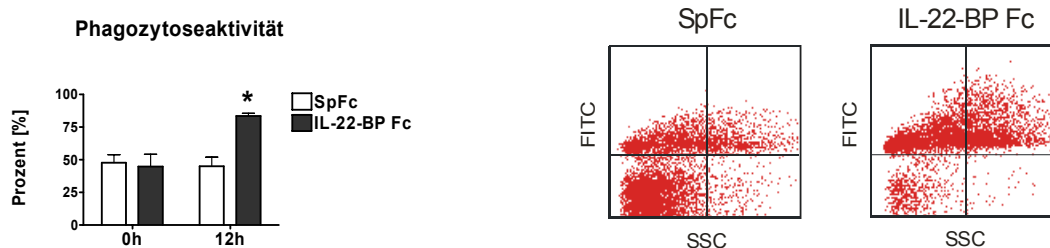


Abb. 32:

FACS-Analyse der Phagozytoserate der Leukozyten.

*Es zeigt sich eine signifikant erhöhte Phagozytoseaktivität der Leukozyten nach Vorbehandlung mit IL-22-BP Fc 12h nach CASP (n=9; * p < 0.05).*

4.4.2.5 Geringerer Nierenorganschaden bei IL-22-BP Fc behandelten Mäusen

Der Organschaden in einer polymikrobiellen Sepsis wird durch verschiedene Faktoren verursacht. Ursächlich hierfür können bakterielle Toxine, überschießende pro-inflammatorische Reaktionen verbunden mit einer vermehrten Induktion der Akut-Phase-Reaktion oder einer disseminierten intravasalen Gerinnung sein. Der dabei entstehende Verlust der Organfunktion hat oftmals schwere Komplikationen im Gesamtorganismus zur Folge. Im Hinblick auf diese Erkenntnisse wurde die Nierenfunktion während der Sepsis untersucht. Diese wurde mittels Messung der Kreatinin- und Harnstoffspiegel im Serum erfasst. Es zeigten sich signifikant verringerte Kreatininspiegel im Serum der mit IL-22-BP Fc vorbehandelten Mäuse (**Abb. 33**). Kein Unterschied konnte bei der Bestimmung von Harnstoff (BUN) detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es bei der Niere zu einem geringeren Organschaden nach CASP-Operation nach Applikation von IL-22-BP Fc kommt. Diese Daten korrelieren auch mit der bakteriellen Belastung der Niere (siehe 4.4.2.3).

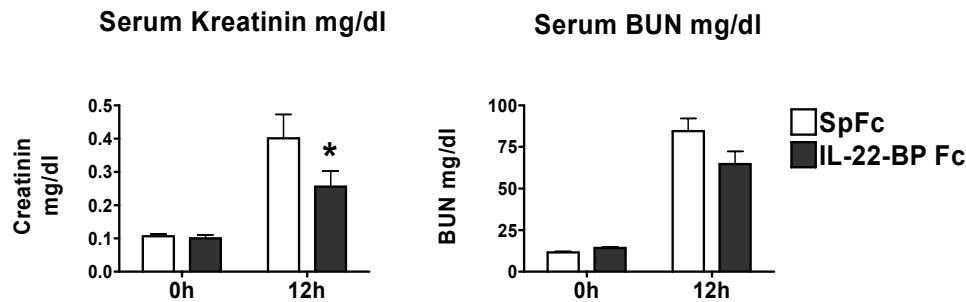


Abb. 33:

Serumspiegel von Kreatinin und Harnstoff (BUN).

Es zeigen sich signifikant verminderte Kreatininspiegel 12h nach CASP bei den mit IL-22-BP Fc vorbehandelten Mäusen (n=9; * p < 0.05).

4.4.2.6 IL-22-BP Fc erhöht die Permeabilität des Lungengewebes

Um Auswirkungen von IL-22-BP Fc auf die Lungenfunktion zu untersuchen, wurde den operierten Mäusen 1h vor Versuchsende 8µg HSA in 100µl PBS i.p. gespritzt. Dabei kommt es durch einen möglichen Lungenschaden mit konsekutiver Permeabilitätserhöhung der Endothelien zu einer erhöhten Diffusion von HSA in die Lungenalveolen. Demnach sollte bei entstandenem Lungenschaden HSA in höherer Konzentration in der Bronchiallavage zu messen sein. HSA wurde hierbei mittels ELISA nachgewiesen. Es zeigte sich, dass nicht nur 12h nach CASP-Operation, sondern auch unabhängig von der CASP-Operation IL-22-BP Fc den Gehalt an HSA in der Bronchiallavage steigert (**Abb. 34**).

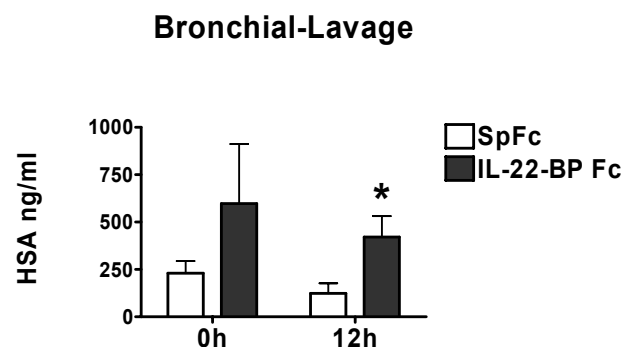


Abb. 34:

HSA-Konzentration in der Bronchiallavage.

0h und 12h nach CASP-Operation wurde die Bronchiallavage auf den Gehalt an HSA mittels ELISA untersucht. Es zeigt sich, dass sowohl 0h als auch 12h nach CASP-Operation IL-22-BP Fc eine permeabilitätssteigernde Wirkung auf das Lungengewebe besitzt (n=6; * p < 0.05).

4.4.2.7 IL-22-BP Fc vermindert die Überlebensrate in einem Sepsis-Modell (CASP)

Die bisher gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass IL-22-BP Fc einerseits eine wichtige protektive Rolle während der Sepsis einnehmen könnte. Dies wird durch die verminderte bakterielle Belastung und den verminderten Organschaden verdeutlicht. Andererseits zeigte sich, dass es nach Applikation von IL-22-BP Fc zu einer massiven Permeabilitätssteigerung des Lungengewebes kommt, was möglicherweise durch einen vermehrten Lungenschaden erklärt werden kann. Um diese Erkenntnisse nun weiter zu untersuchen und deren Bedeutung in einem Sepsis-Modell (CASP) zu analysieren, wurden jeweils 7 Mäusen pro Gruppe entweder 10µg IL-22-BP Fc oder 10µg SpFc 4h vor CASP-Beginn i.p. appliziert. Im Verlauf wurden alle weiteren 12h nach CASP-Operation den Mäusen erneut 10µg des jeweiligen Proteins i.p. appliziert. Der Versuchszeitraum betrug 96h.

Die Analyse der Überlebensdaten zeigt, dass entgegen den bisherigen Vermutungen IL-22-BP Fc die Überlebensrate der CASP-operierten Mäuse nicht steigert, sondern senkt. Alle mit IL-22-BP Fc behandelten Mäuse verstarben innerhalb der ersten 38h nach CASP-Operation. Hingegen überlebten 4 Mäuse der Kontrollgruppe den Versuchszeitraum (**Abb. 35**).

Überlebenskurve

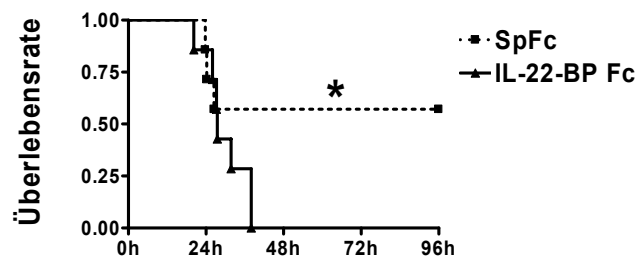


Abb. 35:

Überlebenskurve.

Es zeigt sich, dass die mit IL-22-BP Fc behandelten Mäuse signifikant schlechtere Überlebensraten aufweisen als die Kontrollgruppe. 7 von 7 Mäusen der Behandlungsgruppe verstarben innerhalb der ersten 38h nach der CASP-Operation. Hingegen überlebten 4 Mäuse der Kontrollgruppe den Versuch ($n=7$; $* p < 0.05$).

5. Diskussion

Zahlreiche Untersuchungen an Sepsispatienten haben gezeigt, dass Zytokine eine wichtige Rolle in der Regulation der pathophysiologischen Mechanismen während der Sepsis spielen (Takala *et al.*, 2002). Nicht nur ein erhöhter bzw. verminderter Zytokinspiegel kann für den septischen Verlauf von Bedeutung sein, sondern auch die unterschiedliche biologische Wirkung eines Zytokins, d.h. ob es anti-inflammatorisch oder pro-inflammatorisch wirkt (Takala *et al.*, 2002), ebenso wie der Zeitpunkt, an dem die Zytokinspiegelerhöhung erfolgt (Weighardt *et al.*, 2000). Neben den Effekten veränderter Zytokinspiegel ist auch die Akut-Phase-Reaktion von zentraler Bedeutung während septischer Entzündungsprozesse (Zweigner *et al.*, 2001; Albillos *et al.*, 2004). Hierbei kann es, wie unter 2.1 beschrieben, zu unterschiedlichen Sepsisverläufen kommen, deren Ausmaß verschiedene Zytokine und Chemokine zentral beeinflussen.

Interleukin-22 ist ein in der Akut-Phase-Reaktion beteiligtes Zytokin. Seine biologische Aktivität wird nachweislich von dem physiologischen Antagonisten IL-22-BP beeinflusst (Kotenko *et al.*, Jun 2001). Erst kürzlich konnte eine Beteiligung von IL-22 bei immunologischen Prozessen nachgewiesen werden (Wolk *et al.*, 2004; Ikeuchi *et al.*, 2005). Trotzdem ist aber nur wenig über die Funktionsweise von IL-22 und dessen Antagonisten IL-22-BP während septischer Entzündungsprozesse sowie deren weiteren biologischen Wirkungen bekannt.

Bei dieser Datenlage sollten in dieser Arbeit die biologischen Effekte des Zytokins IL-22 und dessen funktionellen Antagonisten IL-22-BP charakterisiert werden, um die möglichen Zusammenhänge der IL-22- und IL-22-BP-Wirkung in der Sepsis besser zu verstehen.

5.1 Induktion von IL-22 durch Stimulation mit MALP/LPS/SEB

Der Ausgangspunkt der folgenden Experimente war die Tatsache, dass IL-22 von aktivierten T-Zellen synthetisiert wird (Dumoutier *et al.*, Feb 2000). Zum einen kommt es durch Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch TLR-Liganden zu einer indirekten Aktivierung der T-Zellen vermittelt durch Makrophagen und dendritischen Zellen. Als Stimuli dienten hierbei LPS und MALP. Zum anderen können T-Zellen direkt durch SEB aktiviert werden.

Das Zytokinspektrum, welches aktivierte T-Zellen freisetzen, ist vielfältig. Da die Auswirkung einer IL-22-Induktion im Kern der Untersuchungen standen, war es sinnvoll, alle für eine massive Akut-Phase-Antwort in Betracht kommenden Zytokine zu untersuchen. Da dies vorwiegend für IL-1- α , IL-6 und TNF- α der Fall war, wurden auch diese Zytokine analysiert.

Interessant war die Beobachtung, dass nach Stimulation mit SEB neben der Aktivierung von IL-22 nur noch eine Induktion von IL-6 nachzuweisen war (siehe 4.1.1). Es fiel auf, dass nur ein geringer Anstieg des IL-6-Spiegels erfolgte und IL-1- α und TNF- α keine Veränderungen zeigten. Trotz dieses Befundes war der Akut-Phase-Protein-Spiegel nach 16h stark erhöht, was nicht nur durch den geringen IL-6-Anstieg 2h nach Stimulation zu erklären war. Letztendlich lag die Vermutung nahe, dass IL-22 ein Induktor der Akut-Phase-Reaktion in diesem Modell sein könnte.

LPS und MALP sind TLR-Liganden, die beide ähnliche Zellpopulationen stimulieren. LPS dient hierbei als TLR4-, MALP als TLR2-Ligand (Kaufmann *et al.*, 1999; Lien *et al.*, 2000; Supajatura *et al.*, 2002). Neben Makrophagen werden Monozyten, B-Zellen und dendritische Zellen aktiviert. Allerdings werden durch diese Stimuli keine normalen T-Zellen aktiviert. Dabei repräsentiert LPS eine Infektion mit gram-negativen Keimen, MALP mit gram-positiven. Wie in den Ergebnissen gezeigt werden konnte, werden durch LPS und MALP eine Vielzahl von Zytokinen induziert. Daneben konnte aber auch eine Induktion von IL-22 nachgewiesen werden, was als Indiz für eine Aktivierung von T-Zellen interpretiert werden kann. Da LPS und MALP Makrophagen aktivieren, könnte dies dazu führen, dass T-Zellen indirekt über die von Makrophagen sezernierten Zyto- und Chemokine aktiviert werden, was die Expressionszunahme von IL-22 in der Milz erklären könnte. Diese interessanten Ergebnisse wurden im Folgenden weiter untersucht.

Es stellte sich die Frage, ob in einem *in vivo*-Modell ähnliche Erkenntnisse gesammelt werden können. Hierbei wurde mittels CASP-Modell eine physiologische polymikrobielle Infektion nachgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass nach CASP-Operation ähnliche Zytokinspiegelveränderungen auftraten wie nach Stimulation mit LPS oder MALP (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Zudem wurde auch IL-22 massiv induziert, was auf eine Beteiligung der T-Zellen in der Immunantwort während einer polymikrobiellen Sepsis schließen lässt. Diese Beobachtung wurde bisher noch nicht beschrieben.

IL-22 ist als IL-10 Homolog bekannt. Um mögliche Funktionsüberlappungen von IL-22 und IL-10 detektieren zu können, wurde ebenso IL-10 im Vergleich zu IL-22 untersucht. Während der Entzündungsreaktion wurde IL-22 in ähnlicher Weise wie IL-10 hochreguliert (siehe 4.1.2).

Ebenfalls wurde die Expression des IL-22-Rezeptors, bestehend aus den Rezeptorketten IL-22R1 und IL-10R2, untersucht. Da Leberzellen nachweislich IL-22-Rezeptoren besitzen (Dumoutier *et al.*, 2001), war eine Untersuchung der Leber zielführend, um mögliche Regulationsmechanismen der Akut-Phase-Reaktion abhängig von IL-22 aufzuzeigen. Dabei wurde angenommen, dass die Leberhomogenisate, aus denen die cDNS gewonnen wurde, v.a. Leberzellen beinhalten und die ebenfalls sich in der Leber befindlichen und in der Immunantwort beteiligten Kupffer-Stern-Zellen einen sehr geringen Teil des Leberhomogenisats ausmachen. Es konnte gezeigt werden, dass 16h nach Applikation von SEB, MALP oder LPS sowie 6h nach CASP-Operation die IL-22R1-Rezeptorkette in der Leber stärker exprimiert ist (siehe 4.1.2). Da durch die eingesetzten Stimuli IL-22 in der Milz verstärkt exprimiert wird, kann vermutet werden, dass durch den Expressionsanstieg vermehrt biologisch aktives IL-22 freigesetzt wird, dadurch die Zellen der Leber aktiviert werden und die IL-22R1-Rezeptorkette über ein positives Feedback hochreguliert wird, um die Akut-Phase-Reaktion weiter zu verstärken (siehe 4.1.2). Im Gegensatz hierzu wird allerdings die IL-10R2-Rezeptorkette vermindert exprimiert. Der Grund könnte darin liegen, dass IL-10R2 nicht nur als Rezeptorkette für IL-22, sondern auch für IL-10 dient und deshalb regulatorisch vermindert exprimiert wird.

Auffallend war, dass es bei den durchgeführten Untersuchungen Unterschiede in der Expression der IL-22R1-Rezeptorkette in der Milz bzgl. der Stimulation mit SEB, MALP oder LPS bzw. nach CASP-Operation gab. Es zeigte sich, dass nach CASP-Operation die Expression von IL-22R1 anstieg, nach SEB, MALP oder LPS hingegen abfiel. Mögliche Gründe könnten in der evtl. stärkeren, längeren oder auch komplexeren Infektion nach CASP-Operation sein. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf aber nicht weiter eingegangen.

Ausgehend von diesen Erkenntnissen ist zu diskutieren, über welchen Mechanismus IL-22 die Akut-Phase-Reaktion induziert. Im Mittelpunkt der Frage stand die Überlegung, ob IL-22 direkt Leberzellen aktiviert. Wir konnten zeigen, dass Hepatozyten der Hepa 1-6-Zelllinie einen funktionalen IL-22-Rezeptor besitzen und dieser nach Stimulation mit IL-22 auch aktiviert wird (siehe 4.4.1).

Im Gegensatz dazu wäre auch denkbar, dass IL-22 indirekt die Akut-Phase-Reaktion über eine Aktivierung von Kupffer-Stern-Zellen induziert. Diese haben im Verlauf der Sepsis eine entscheidende Bedeutung. Nach Aktivierung von Kupffer-Stern-Zellen werden zahlreiche immunologische Mediatoren freigesetzt, die für die Regulation der physiologischen Abwehr von zentraler Bedeutung sind (Emmanuilidis *et al.*, 2001). Zudem werden Zytokine (IL-1- α , IL-6, TNF- α) freigesetzt, die entscheidend für die Induktion der Akut-Phase-Reaktion sind. Bisher ist es aber noch nicht gelungen, die IL-22R1-Rezeptorkette auf den Kupffer-Stern-Zellen nachzuweisen. Ebenso wäre denkbar, dass andere an der Akut-Phase-Antwort beteiligte Zytokine durch IL-22 induziert werden, sodass ein Zusammenspiel von direkter und indirekter Induktion der Akut-Phase-Antwort nach IL-22-Induktion zu vermuten ist. Dies könnte durch den leicht erhöhten IL-6-Spiegel erklärt werden. Welche Rolle IL-22 in der Induktion der Akut-Phase-Reaktion genau einnimmt, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Neueste Erkenntnisse lassen jedoch vermuten, dass IL-22 keinen Effekt auf Immunzellen besitzt (Lecart *et al.*, 2002; Wolk *et al.*, 2002; Wolk *et al.*, 2004). Demnach ist

die direkte Aktivierung der Leberzellen durch IL-22 im Hinblick auf die Induktion der Akut-Phase-Reaktion zu favorisieren.

Im Hinblick auf die Weiterführung der Arbeit sollte dies im Laufe der nächsten Experimente untersucht werden. Hierbei könnten Antikörper zum Einsatz kommen, die die potenten Akut-Phase-Protein-induzierenden Zytokine wie IL-1- α , IL-6 und TNF- α blockieren und eine mögliche Beteiligung dieser Zytokine an der IL-22 induzierten Akut-Phase-Antwort aufzeigen. Ebenso könnte durch die Depletion der Kupfer-Stern-Zellen durch Clodronat-Liposomen eine Beteiligung der von diesen Zellen sezernierten Zytokinen verhindert werden (Emmanuilidis *et al.*, 2001). Sollte IL-22 direkt die Leberzellen aktivieren, so wären die oben genannten Überlegungen dienlich, da sie die Beteiligung von weiteren wichtigen Zytokinen bei einer IL-22 induzierten Akut-Phase-Reaktion ausschließen und somit nachgewiesen werden könnte, dass IL-22 in diesem System maßgeblich für die Akut-Phase-Antwort verantwortlich ist und die Leberzellen auf direktem Weg aktiviert (**Abb. 36**). Zudem könnten Leberzellen und Kupfer-Stern-Zellen *ex vivo* isoliert und auf das Vorhandensein der IL-22R1-Rezeptorkette mittels RT-PCR analysiert werden.

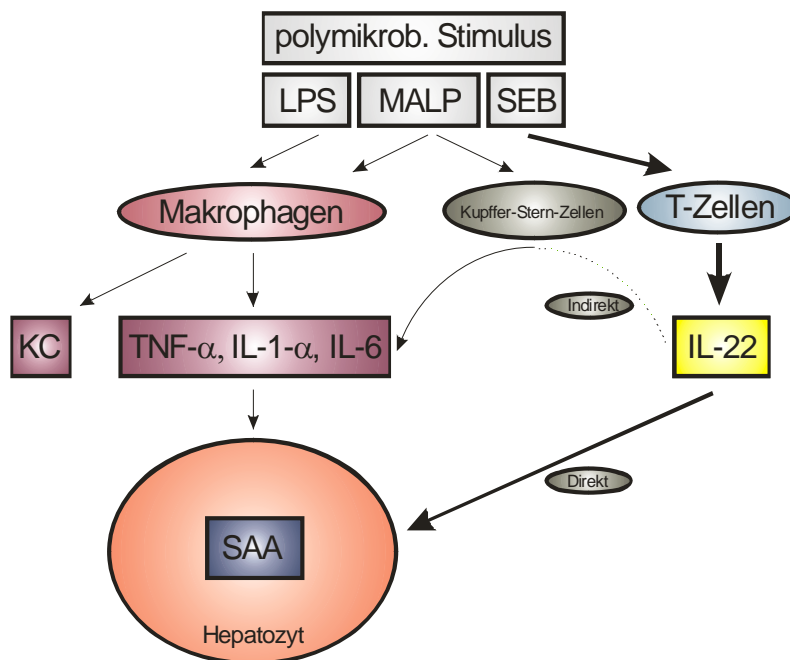


Abb. 36:

Modell zur möglichen Regulation der durch IL-22 induzierten Akut-Phase-Reaktion.

Im Hinblick auf die Untersuchungen nach CASP-Operation zu den T- und B-Zellen wird deutlich, dass es ebenfalls zu einer Expressionszunahme von IL-22 in aktivierten T-Zellen 6h nach CASP kommt (siehe 4.1.3). Bisher existieren keine veröffentlichten Daten darüber, dass T-Zellen während eines polymikrobiellen Stimulus aktiviert werden. Nicht veröffentlichten Daten der Forschergruppe "Postoperative Sepsis" zufolge konnte nur eine Aktivierung von regulatorischen T-Zellen gezeigt werden, die allerdings nicht für den IL-22-Anstieg

verantwortlich waren. Es bleibt die Frage offen, welche Rolle die frühe Aktivierung von T-Zellen während der Sepsis spielt.

Um zu untersuchen, ob noch andere Zellen neben aktivierten T-Zellen in der Lage sind, im Falle einer Sepsis IL-22 zu produzieren, wurden aktivierte B- und non-B/T-Zellen auf ihre IL-22-Expression hin analysiert (siehe 4.1.3). Die Ergebnisse zeigen, dass entgegen der bisherigen Vermutung (Wolk *et al.*, 2002) nicht nur aktivierte T-Zellen, sondern auch aktivierte B-Zellen in der Lage sind, IL-22 zu produzieren. Zudem zeigt sich, dass non-B/T-Zellen IL-22 nicht exprimieren. Dies lässt vermuten, dass neben aktivierten T-Zellen auch aktivierte B-Zellen eine wichtige Rolle in dem physiologischen Regulationsmechanismus von IL-22 einnehmen.

5.2 Biologische Effekte von IL-22 *in vitro* und *in vivo*

Lange wurde vermutet, dass IL-22 ähnlich wie IL-10 vorwiegend Immunzellen aktiviert. Beide Zytokine aktivieren wie IL-19, IL-20, IL-24 und IL-26 Mitglieder der Klasse II Zytokin-Rezeptorfamilie an. Da für IL-10 und IL-22 eine 23% Homologie der Aminosäuresequenz beschrieben ist, kann angenommen werden, dass auch ähnliche Zellpopulationen von beiden Zytokinen aktiviert werden. Diese Vermutung kann aufgrund bisher veröffentlichter Daten durchaus angestellt werden, da zum einen der IL-10- und IL-22-Rezeptor eine gemeinsame Rezeptorkette besitzen (Kotenko *et al.*, Jan 2001), zum anderen IL-22 vorwiegend von aktivierten T-Zellen produziert wird (Dumoutier *et al.*, Feb 2000). Interessanterweise konnte für alle in dieser Arbeit untersuchten Immunzellen kein IL-22-Rezeptor nachgewiesen und somit auch keine Zellantwort nach IL-22-Stimulus detektiert werden. Es zeigte sich, dass IL-22 Immunzellen nicht zu aktivieren vermag, was der bisherigen Auffassung von IL-22 als funktionellem IL-10 Homologem widerspricht. Es stellt sich die Frage, welche biologischen Effekte IL-22 auf Nicht-Immunzellen besitzt, die in der Pathophysiologie der Entzündungsreaktion eine Rolle spielen. In die weiteren Untersuchungen wurden deshalb nicht-Immunzellen einbezogen, um sie auf ihre IL-22-Responsivität hin zu untersuchen und auf diesem Weg weitere Erkenntnisse bzgl. der biologischen Funktionen von IL-22 zu identifizieren.

Die mittels RT-PCR als positiv für den IL-22-Rezeptor getesteten Zelllinien zeigten in ihrer biologischen Antwort nach IL-22-Stimulation teils deutliche Unterschiede (siehe 4.2.2). So konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Zelltypen (Epithel-, Endothel- oder Carcinomzelle) verschieden auf den IL-22-Stimulus reagieren und somit für IL-22 eine spezifische Wirkung abhängig von dem Zelltyp vermutet werden kann.

Dabei wird deutlich, dass dieses Zytokin eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen aktiviert. Dies geschieht nach Bindung von IL-22 an seinen spezifischen Rezeptor, der zudem die Zytokine IL-20 und IL-24 bindet (Xie *et al.*, 2000; Kotenko *et al.*, Jan 2001). Die bisherigen Erkenntnisse zu IL-22 und seinen homologen Zytokinen, ebenso wie das Wissen um den Aufbau der jeweiligen Rezeptoren zeigt, dass IL-22 mögliche biologische Effekte auf

Zellproliferation, Apoptoseprozesse, Neoangiogenese und Epithelpermeabilität haben könnte (**Abb. 37**).

p38 MAPKs ist in vielen verschiedenen Signalkaskaden involviert. Zum einen ist p38 MAPKs bei Permeabilitätsveränderungen von Endothelien, Zellproliferation, Zell-Überleben, Zell-Differenzierung und apoptotischen Prozessen beteiligt, andererseits als Tumorsuppressor bekannt (Wang *et al.*, 2004; Kondoh *et al.*, 2002; Nwariaku *et al.*, 2002; Rouxx *et al.*, 2004). Dies veranlasste uns zu der Erstellung von Arbeitshypothesen, die IL-22 mit der Aktivierung von p38 MAPKs in Zusammenhang brachte (Lejeune *et al.*, 2002).

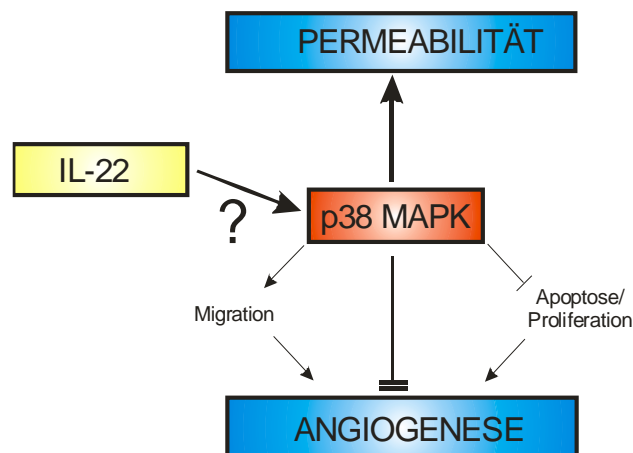


Abb. 37:

Mögliche p38-abhängige biologische Effekte von IL-22. Das hier abgebildete Schema zum intrazellulären Signaling von IL-22 zeigt, dass eine Aktivierung des intrazellulären Signalweges durch IL-22 viele verschiedene biologische Effekte nach sich ziehen könnte (modifiziert nach Issbrücker *et al.*, 2003).

Proliferations-Assay

Um die biologischen Effekte von IL-22 weiter zu untersuchen, wurden Proliferations-Assays durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-22 die Proliferation je nach Zelltyp unterschiedlich beeinflussen konnte. Interessant war, dass IL-22 die Proliferation der EMT-6-Zellen um 52% und der LLC-PK1-Zellen um 25% hemmen konnte (siehe 4.2.4). Ursache hierfür könnte die verminderte Aktivierung intrazellulärer Signalfaktoren sein, die für die Proliferation dieser Zellen wichtig sind. p38 als ein Signalfaktor des intrazellulären Signalweges von IL-22 könnte dabei zudem eine regulierende Rolle einnehmen, da p38 neben den bisher beschriebenen Effekten eine Funktion als Tumor-Suppressor zugeschrieben wird (Bulavin und Fornace, 2004). Dies wurde bei der EMT-6-Zelle weiter überprüft.

Apoptose-Assay

Aufgrund des IL-22-Rezeptoraufbaus und der Tatsache, dass IL-24 ein bekannter Induktor apoptotischer Prozesse ist, die über die Aktivierung der p38 MAPK vermittelt werden (Sarkar *et al.*, 2002), kann eine ähnliche Regulation bei IL-22 vermutet werden. Zudem ist bekannt, dass IL-24 wachstumsinhibierende Effekte auf Tumoren sowie anti-angiogenetische Eigenschaften besitzt, die über die IL-22R1-Rezeptorkette vermittelt werden (Ramesh *et al.*, 2003). Hierfür bediente man sich des Nachweises der Bindung von Annexin V, welches in einer späten Phase apoptotischer Prozesse als ein bekannter Apoptose-Marker fungiert. Die Aktivierung von Caspase 3, ein zentraler Faktor in apoptotischen Prozessen, wurde in diesem Zusammenhang auch untersucht. Die Ergebnisse zeigen allerdings, dass durch IL-22 keine Apoptose in den EMT-6-Zellen induziert wird. Der in der Durchflußzytometrie nur geringe Anteil von Annexin V positiven Zellen konnte durch die Western Blot-Analyse von aktivierter Caspase 3 nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass es nach Stimulation mit IL-22 zu keiner oder nur minimaler Induktion von Apoptose kommt (siehe 4.2.5).

Inhibierung pro-proliferativer Signalmoleküle

Da durch die oben diskutierten Ergebnisse gezeigt werden konnte, dass die Proliferationshemmung der EMT-6-Zellen scheinbar nicht über die Aktivierung von Apoptose zu erklären ist, sollten in weiteren Untersuchungen Signalmoleküle untersucht werden, die für proliferative Prozesse wichtig sind. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit IL-22 die pro-proliferativ wirksamen Signalmoleküle AKT und Erk1/2 vermindert phosphoryliert werden (siehe 4.2.5). Zum einen korrelieren diese Ergebnisse mit den Daten aus dem Proliferations-Assay, in dem eine Abnahme der Proliferation der EMT-6-Zellen nach IL-22-Stimulation um 52% beobachtet werden konnte, zum anderen zeigt sich dabei ein möglicher Regulationsmechanismus der anti-proliferativen Wirkung von IL-22. Werden für die Proliferation von Zellen notwendige Signalmoleküle in ihrer Aktivität vermindert, so kann dies zur Folge haben, dass die Proliferation abnimmt, sofern nicht andere Signalmoleküle regulatorisch aktiviert werden, die dem entgegenwirken. Ob allerdings die Aktivitätsabnahme der beiden Signalmoleküle AKT-P und Erk1/2-P alleine für die Proliferationsabnahme verantwortlich ist, bleibt zu klären.

Interessant waren die Ergebnisse der IL-22-Expressions-Analyse in Darmtumoren (siehe 4.2.6). Diese lassen vermuten, dass IL-22 eine mögliche Rolle in der Genese oder wie oben bereits angesprochen in der Proliferation und Progression solider Darmtumoren spielt. Da IL-22 auf Tumorzellen anti-proliferative Wirkung besitzt, kann geschlossen werden, dass zum einen die Reduktion von IL-22 das Tumorstadium in geringerer Weise hemmt oder zum anderen erst die Verminderung von IL-22 die Tumorstadiumprogression induziert. Neueste Ergebnisse zeigen zudem, dass IL-22 das Tumorstadium der EMT-6-Zellen *in vivo* signifikant hemmt (eigene Daten, nicht gezeigt).

5.3 Herstellung von funktionell aktiven Fusionsproteinen

Um das IL-22-System *in vitro* und *in vivo* besser studieren zu können, wurden im Laufe dieser Arbeit die Fusionsproteine IL-22-Fc und IL-22-BP Fc hergestellt. Wie oben bereits erwähnt war dabei ein wichtiger Grund, hierdurch eine lange Halbwertszeit dieser Proteine *in vivo* zu erzielen.

Wie unter 4.4.1 gezeigt wird, ist das IL-22-BP Fc-Fusionsprotein *in vitro* biologisch aktiv und konnte somit in weiteren *in vivo*-Experimenten eingesetzt werden. Es zeigte sich jedoch, dass das IL-22 Fc-Fusionsprotein *in vitro* keine biologische Aktivität besaß.

Obwohl das IL-22 Fc-Fusionsprotein in ausreichender Menge hergestellt, ohne größeren Proteinverlust aufgereinigt und konzentriert werden konnte (siehe 4.3.3), musste der Grund für die biologische Inaktivität *in vitro* in der veränderten Proteinstruktur von IL-22 Fc liegen. Es konnte gezeigt werden, dass der Fc-Teil des IL-22 Fc-Proteins durch die Dimerisierung eine Rezeptoraktivierung *in vitro* verhindert und das identische IL-22-Molekül ohne Fc-Teil eine solche auslöst (siehe 4.4.2.1). Demnach war gesichert, dass der IL-22-Teil des Fusionsproteins biologische Aktivität aufweist und dass die Kopplung des IL-22-Moleküls an den Fc-Teil das Fusionsprotein biologisch inaktiviert. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass das IL-22 Fc-Protein in dimerer Form nicht in der Lage ist, den IL-22-Rezeptor zu aktivieren. Wie kürzlich von Pestka *et al.* (2004) und auch Zdanov (2004) gezeigt wurde, gehört IL-22 zwar der IL-10-Zytokin-Familie an, liegt aber im Gegensatz zu IL-10 nativ als Monomer vor und ist nach dem bisherigen Wissensstand und ebenso nach den in dieser Arbeit gezeigten Daten als dimeres Fc-Protein nicht biologisch aktiv. Zur Veranschaulichung sind in **Abb. 38** mögliche Aufspaltungswege eines dimeren Proteins dargestellt.

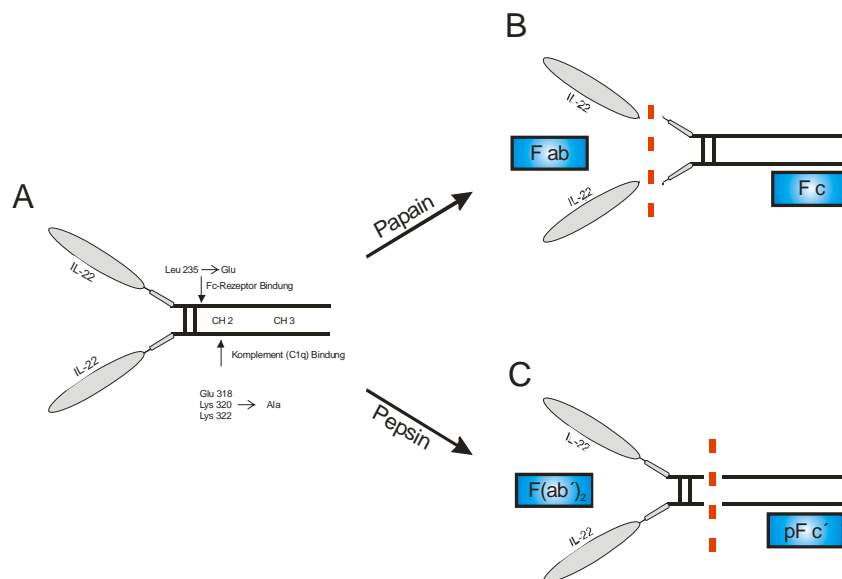


Abb. 38:

Mögliche Aufspaltungswege des IL-22 Fc-Fusionsproteins durch Proteasen.

Das oben dargestellte Schema zeigt, dass nach Spaltung des IL-22 Fc-Fusionsproteins durch Proteasen potentiell aktive IL-22-Monomere entstehen können (**Abb. 38**) und diese so biologisch aktiviert werden können.

Biologische Aktivität von IL-22 myc und dessen biologische Funktion

Im Rahmen der Versuche zu IL-22 Fc fiel auf, dass dieses Fusionsprotein keine biologische Aktivität *in vitro* besitzt. Da ein möglicher Grund hierfür die Dimerisierung des IL-22 Fc-Fusionsproteins war, wurde das IL-22-Protein ohne Fc-Teil kloniert und untersucht (siehe Punkt 4.4.1.3).

Es konnten bezüglich der Art der biologischen Aktivität des IL-22-Zytokins wertvolle Ergebnisse gesammelt werden. Aus den dargestellten Daten kann geschlossen werden, dass IL-22 nur als Monomer biologische Aktivität besitzt und den IL-22-Signalweg zu aktivieren vermag (**Abb. 39**). Da das IL-22 Fc-Protein als Dimer vorliegt, kann geschlossen werden, dass diese Strukturform den IL-22-Rezeptor nicht aktivieren kann. Da nach den bisherigen Erkenntnissen zu der Biologie von IL-22 und dessen Rezeptorkomponente eine Bindung an den Rezeptor als Dimer möglich erschien, bleibt zu klären, warum dieser Unterschied besteht und inwieweit die bestehenden Erkenntnisse mit diesen Ergebnissen in Einklang zu bringen sind. Obwohl IL-22 zu der Familie der IL-10 homologen zu zählen ist und deren Signalwege alle über ähnliche Ligand-Rezeptor-Mechanismen aktiviert werden, kann nach den gezeigten Ergebnissen IL-22 eine Sonderstellung zugewiesen werden. Dies wird durch neueste Erkenntnisse zu der Biologie von IL-22 bestätigt (Pestka *et al.*, 2004).

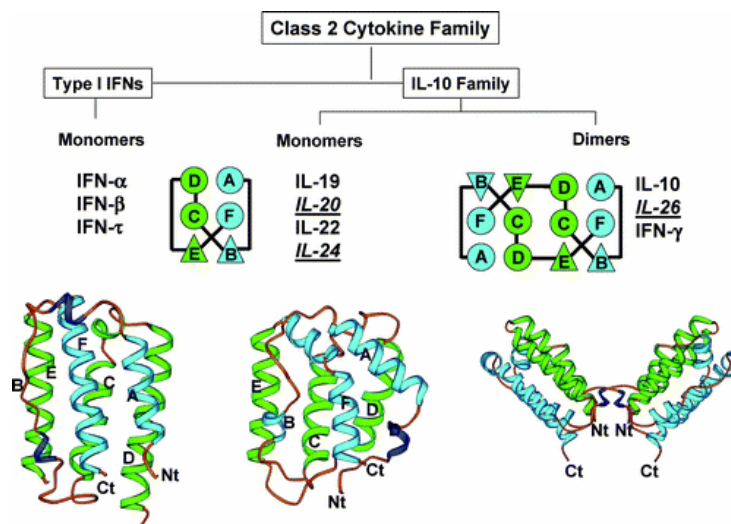


Abb. 39:

Darstellung der Klasse II Zytokin-Familie und deren Einteilung in Monomere und Dimere.

IL-22 liegt nur als Monomer vor und kann dementsprechend nur in dieser Strukturform den IL-22-Rezeptor aktivieren (Pestka *et al.*, 2004).

5.4 Effekte von IL-22-BP Fc in einem Sepsis-Modell (CASP)

IL-22-BP ist als physiologischer Antagonist von IL-22 bekannt (Dumoutier *et al.*, 2001). Es übernimmt als gelöste IL-22R1-Rezeptorkette die Bindung von IL-22 und reguliert somit dessen biologische Aktivität. Da IL-22 und IL-22R1 während der Sepsis induziert werden (siehe 4.1.2), war es interessant zu untersuchen, welche immunologische Rolle IL-22 während der Sepsis einnimmt. In den *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass IL-22-BP Fc ein potenter Inhibitor der IL-22-Wirkung (siehe 4.4.1) ist. Demnach wurde es zur Untersuchung der biologischen Effekte von IL-22 *in vivo* eingesetzt. In einem physiologisch relevanten Modell der Sepsis (CASP-Modell) sollte das applizierte IL-22-BP Fc das während einer Sepsis endogen produzierte IL-22 komplett antagonisieren und somit dessen Wirkung vollständig inhibieren. Die hierbei gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-22 eine wichtige Rolle in der physiologischen Abwehr einer polymikrobiellen Sepsis zu spielen scheint.

Die Applikation von IL-22-BP Fc führte zu einem signifikant verminderten IL-10-Spiegel im Serum, der Bauchhöhle und der Leber. Andererseits zeigten sich signifikant erhöhte IL-10-Spiegel in der Milz und der Lunge. Dies lässt vermuten, dass IL-22 verschiedene Funktionen in diesen Organen einnimmt. Die Ergebnisse in dieser Arbeit bestätigen die Tatsache, dass niedrige IL-10-Spiegel vor allem in der Bauchhöhle dazu führen, dass vermehrt Abwehrzellen in diese einwandern (siehe 4.4.2.2) (Ajuebor *et al.*, 1999; Feterowski *et al.*, 2004). Dies kann dazu führen, dass die in der Bauchhöhle befindlichen Bakterien verstärkt abgetötet und somit in geringerer Zahl ausgeschwemmt werden (Weighardt *et al.*, 2000). Diese Tatsache wird durch die unter 4.4.2.3 gezeigten Ergebnisse unterstützt, nach denen die bakterielle Belastung sowohl der Bauchhöhle als auch der Leber und der Niere signifikant vermindert ist. Zudem könnten die verminderten IL-10-Spiegel in diesen Organen selbst dazu führen, dass sich Abwehrzellen dort anreichern und es somit auch zu einer vermehrten Abtötung von Bakterien in der Leber und der Niere kommt (Feterowski *et al.*, 2004). Dies wird auch durch den verminderten Nierenschaden untermauert (4.4.2.5). In der Lunge könnte dieser regulatorische Mechanismus in entgegen gesetzter Richtung wirken. Die erhöhten IL-10-Spiegel (4.4.2.1) in der Lunge lassen darauf schließen, dass es zu einer verminderten Akkumulation von Abwehrzellen und konsekutiv zu einem vermehrten Lungenschaden durch die bakterielle Belastung kommt. Diese Annahme wird auch durch die erhöhten HSA-Spiegel in der Bronchiallavage als Maß für die Permeabilitätserhöhung gestützt. Alles in allem lassen die Daten vermuten, dass ein vermindertes IL-10-Spiegel in der Bauchhöhle, der Leber und der Niere (für die Niere Daten nicht gezeigt) mit einer Akkumulation von Abwehrzellen sowie mit einer verminderten bakteriellen Belastung und demzufolge einem verminderten Schaden dieser Organe einhergeht (Ajuebor *et al.*, 1999; Feterowski *et al.*, 2004).

Untersuchungen des Phagozytosevermögens der Leukozyten aus Vollblut haben gezeigt, dass nach Vorbehandlung der Mäuse mit IL-22-BP Fc 12h nach CASP die Leukozyten vermehrt Bakterien aufnehmen können. Dies könnte ebenfalls zu einer verminderten systemischen bakteriellen Belastung führen (Weighardt *et al.*, 2000). Werden weniger

Bakterien systemisch ausgeschwemmt und sind die Leukozyten demnach weniger gesättigt, können mehr Bakterien phagozytiert werden. Die Tatsache, dass der Organschaden der Niere vermindert ist, kann ebenfalls mit der geringeren bakteriellen Belastung erklärt werden (Feterowski *et al.*, 2004).

Um nun die funktionelle Rolle von IL-22 in einem Sepsis-Modell zu untersuchen, wurde ein Überlebensexperiment durchgeführt. Überraschend war, dass die Versuchstiere nach Behandlung mit IL-22-BP Fc früher verstarben als die Kontrolltiere. Nach den bis dahin vorliegenden Ergebnissen hätte eher darauf geschlossen werden können, dass die Applikation von IL-22-BP Fc zu einer verbesserten Überlebenschance während der Sepsis führt. Hierbei kann das verminderte Überleben der Tiere in Zusammenhang mit der erhöhten Permeabilität des Lungengewebes gebracht werden (Neumann *et al.*, 1999). Wird durch die Applikation von IL-22-BP Fc die Entstehung eines Lungenödems gefördert, könnte dies die günstigen Effekte auf andere Organsysteme aufheben und in der Bilanz die höhere Mortalität bewirken. Diese Überlegung kann durch die schon zum Zeitpunkt 0h erhöhte Permeabilität des Lungengewebes bei den mit IL-22-BP Fc behandelten Tieren gestützt werden. Eine weitere Erklärung für die erhöhte Mortalität ist die Tatsache, dass IL-22-BP Fc als selektiv wirksamer Immunmodulator die physiologische Abwehrreaktion so drastisch schwächen könnte, dass eine Situation ähnlich dem Prädispositions-Modell entsteht (siehe 2.1.4). Dies kann ebenfalls den letalen Verlauf einer Sepsis fördern (Weighardt *et al.*, 2000). Hier wären weitere Untersuchungen mit Zeit- und Dosis-Kinetiken von IL-22-BP Fc denkbar, um diese Überlegungen zu überprüfen.

Mechanistisch sind verschiedene Regulationswege vorstellbar. Sollten Kupffer-Stern-Zellen durch IL-22 aktiviert werden, würden daraufhin verschiedene Zyto- und Chemokine produziert, zu denen auch IL-10 gehört. Emmanuilidis *et al.* (2001) konnten zeigen, dass Kupffer-Stern-Zellen für die Produktion von IL-10 während der Sepsis eine tragende Rolle spielen. In den hier gezeigten Daten nach Applikation von IL-22-BP Fc war IL-10 12h nach CASP vermindert in der Leber zu messen. Ursache hierfür könnte sein, dass IL-22-BP Fc das endogen produzierte IL-22 inaktiviert, welches für die Aktivierung der Kupffer-Stern-Zellen verantwortlich ist. IL-10 würde somit in geringerer Menge produziert werden. Geprüft werden müsste für solche Überlegungen jedoch, ob Kupffer-Stern-Zellen einen IL-22-Rezeptor besitzen.

Fasst man die in dieser Arbeit gesammelten Daten zu IL-22 und IL-22-BP Fc zusammen kann vermutet werden, dass IL-22 und IL-22-BP eine wichtige Rolle in der Regulation der Abwehrmechanismen während der Sepsis einnehmen. Demnach kann festgestellt werden, dass es eine organspezifische Regulation der IL-22-Funktion gibt. Weitere Analysen sind nötig, um deren Bedeutung vollständig zu klären. Zum einen zeigt sich, dass eine Blockade der IL-22-Funktion in der Frühphase der Sepsis protektive Wirkung hat. Dies kann mit der verminderten bakteriellen Belastung und dem verminderten Organschaden erklärt werden. Zum anderen stellte sich heraus, dass in der Spätphase der Sepsis eine Blockade der IL-22-Wirkung die Überlebenschance offensichtlich vermindert. In kausalem Zusammenhang könnte hierzu der entstehende Lungenschaden und das damit verbundene Lungenödem gesehen werden. Die unterschiedlichen Wirkungsweisen von IL-22 in der Bauchhöhle und

der Lunge bedürfen weiterer Klärung. Eine Überlegung wäre, dass IL-22 an der physiologischen Regulation der Gewebeporosität beteiligt ist. Insgesamt ergeben diese Daten, dass es nach Blockade von IL-22 mit der damit verbundenen Porositätserhöhung zu einem verbesserten Einwandern von Abwehrzellen in die Bauchhöhle kommt und dies somit eine protektive Funktion hat. Andererseits könnten die gleichen Effekte nach Blockade von IL-22 die Entstehung eines Lungenödems fördern, was im Falle der Sepsis eher schädlich wäre (Neumann *et al.*, 1999).

Im Hinblick auf die verminderte bakterielle Belastung des Organismus bei Behandlung mit IL-22-BP Fc und der Tatsache verminderter Schädigung von Leber und Niere, könnten die positiven Effekte von IL-22-BP Fc im Vordergrund stehen. Zeit- und Dosis-Kinetiken mit IL-22-BP Fc wären zielführend, um einen insgesamt günstigen Effekt insbesondere unter Beachtung eines zu vermeidenden Lungenödems zu finden.

5.5 Ausblick

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zu den biologischen Effekten von IL-22 und dessen funktionellen Antagonisten könnten eine Reihe von Fragen beantworten. Es wurden aber ebenso neue Fragen aufgeworfen. Die eingangs als Arbeitshypothese aufgestellte Vermutung, dass IL-22 den zentralen Signalmediator p38 aktiviert und demzufolge intrazelluläre Signalkaskaden und spezifische Zellantworten induziert werden, muss im Hinblick auf die erhobenen Ergebnisse weiter überprüft werden. So konnte zwar gezeigt werden, dass IL-22 einen potenten Inhibitor der Zellproliferation der EMT-6-Zellen abhängig von AKT und Erk1/2 darstellt. Ob IL-22 jedoch relevante Effekte auf Apoptose, Porosität von epithelialen und endothelialen Zellverbänden und auf neo-angiogenetische Prozesse hat, bleibt abzuklären. In Anlehnung an alle in dieser Arbeit gesammelten Ergebnisse und den bisherigen veröffentlichten Daten zu IL-22 lässt sich ein Modell erstellen, welches für weiterführende Versuchsansätze als Arbeitshypothese fungieren könnte (**Abb. 40**)

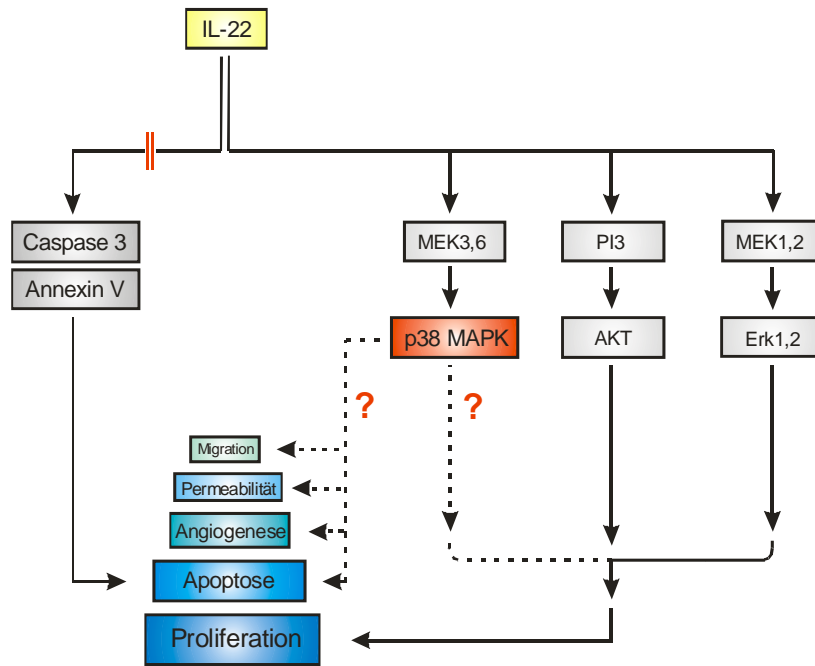


Abb. 40:

IL-22-Signalweg.

Der IL-22-Signalweg mit damit verbundenen biologischen Effekten bzgl. Apoptose, Proliferation, Angiogenese, Permeabilität, Zellmigration.

Durch die Blockade der p38-vermittelten Signalkaskaden durch den Einsatz von p38-Inhibitoren könnte der Einfluß von p38 auf proliferative bzw. apoptotische Prozesse weiter untersucht werden. Ebenso ist der Effekt von IL-22 auf die Tumorgenese und das Tumorwachstum *in vivo* ein weiterer interessanter Ansatzpunkt.

Im Hinblick auf das IL-22-System bei der Sepsis bleibt weiterhin ungeklärt, welche genaue Rolle T- und B-Zellen neben der Produktion von IL-22 spielen. Ebenso bleibt noch offen, welche weiteren zellulären Kompartimente neben denen in dieser Arbeit gefundenen durch IL-22 angesteuert werden. Welche Rolle IL-22 in der Veränderung der Permeabilität von Endothel- bzw. Epithelzellverbänden einnimmt, ist dabei von besonderem Interesse. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse bzgl. der Veränderung der Lungenpermeabilität lassen vermuten, dass IL-22 dort eine wichtige regulatorische Rolle einnimmt.

IL-22 und IL-22-BP stellen jedenfalls biologische Mediatoren dar, die neben ihrer Funktion bei Entzündungsprozessen auch eine Rolle bei proliferativen und Tumorerkrankungen spielen könnten.

6. Zusammenfassung

Die pathophysiologischen Prozesse während der Sepsis sind noch immer in weiten Teilen unklar. Bekannt ist, welche Folgen eine septische Komplikation nach sich ziehen kann. Welche immunologischen Mediatoren diese aber induzieren und zentral beeinflussen, ist bis heute in weiten Teilen ungeklärt. In dieser Arbeit sollte IL-22 als Mitglied der Klasse II Zytokin-Familie und Homologes von IL-10 auf seine biologischen Effekte hin untersucht und dessen funktioneller Antagonist IL-22-BP in seiner Wirkungsweise näher beleuchtet werden.

IL-22 ist als selektiv immunmodulatorisch wirksames Zytokin und Induktor der Akut-Phase-Reaktion bekannt und während Entzündungsprozessen an dessen Regulation beteiligt. Den bisherigen Erkenntnissen zufolge sollte IL-22 ähnlich wie IL-10 Effekte auf Immunzellen besitzen und somit als ein Immunmodulator während Entzündungsprozessen fungieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass IL-22 in seiner biologischen Funktion mit IL-10 nicht zu vergleichen ist. Es zeigte sich, dass IL-22 eine Wirkung auf Nicht-Immunzellen besitzt und diese in verschiedener Weise beeinflusst. Immunzellen wurden durch IL-22 nicht aktiviert. In Entzündungsprozessen wird IL-22 ebenso wie dessen Rezeptor deutlich reguliert, was auf eine Beteiligung in physiologischen Abwehrreaktionen des Organismus schließen lässt. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass entgegen den bisherigen Erkenntnissen IL-22 während der Sepsis nicht nur von aktivierten T-Zellen, sondern auch von aktivierten B-Zellen produziert wird.

Es konnten proliferationshemmende Effekte für IL-22 nachgewiesen werden. Diese können auf eine verminderte Aktivität der proliferationsfördernden Signalmediatoren AKT und Erk1/2 zurückgeführt werden. Zudem lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass apoptotische Prozesse durch IL-22 nicht induziert werden.

Die Ergebnisse zeigten weiterhin, dass das Fusionsprotein IL-22 Fc keine biologische Wirkung *in vitro* besitzt. Die Ergebnisse lassen jedoch vermuten, dass dies an der Dimerisierung von IL-22 Fc lag. Bei dem Monomer IL-22 myc konnte eine biologische Wirkung nachgewiesen werden. Demnach kann IL-22 eine Sonderstellung in der Klasse II Zytokin-Familie zugewiesen werden, da erst neueste Erkenntnisse belegen, dass der IL-22-Rezeptor IL-22 nur als Monomer bindet und so die intrazelluläre Signalkaskade aktiviert.

Die Rolle von IL-22-BP als wirksamer Immunmodulator konnte durch das Fusionsprotein IL-22-BP Fc genauer erklärt werden. Nach Applikation von IL-22-BP Fc vor einer Sepsisinduktion ist die systemische bakterielle Belastung im Verlauf der Sepsis signifikant vermindert, was auf eine erhöhte Phagozytoserate der Leukozyten und eine vermehrte Granulo- und Mono-

zytenakkumulation in der Bauchhöhle zurückzuführen ist. Daneben fanden sich Hinweise für eine Rolle von IL-22 bzw. IL-22-BP bei der Regulation der Lungenpermeabilität.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit könnte die Modulation der geschilderten funktionellen Effekte über den Eingriff in die Synthese und in die Bindung von IL-22 führen.

7. Literaturverzeichnis

Acha-Orbea H

Res Immunol. 1993 Mar-Apr;144(3):198-201; discussion 214-22

Roles of superantigens in microbial infections?

Ajuebor MN, Das AM, Virag L, Flower RJ, Szabo C, Perretti M

J Immunol. 1999 Feb 1;162(3):1685-91

Role of resident peritoneal macrophages and mast cells in chemokine production and neutrophil migration in acute inflammation: evidence for an inhibitory loop involving endogenous IL-10

Akira S, Takeda K, Kaisho T

Nat Immunol. 2001 Aug;2(8):675-80

Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity

Albillos A, de-la-Hera A, Alvarez-Mon M

Lancet. 2004 May 15;363(9421):1608-10

Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM

Lancet. 2005 Jan 1;365(9453):63-78

Septic shock

Bone RC

Crit Care Med. 1996 Jul;24(7):1125-8.

Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS

Bulavin DV, Fornace AJ Jr

Adv Cancer Res. 2004;92:95-118

p38 MAP Kinase's Emerging Role as a Tumor Suppressor

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M

Nat Rev Drug Discov. 2005 Oct;4(10):854-65

Animal models of sepsis: setting the stage

Chung CT, Miller RH

Nucleic Acids Res. 1988 Apr 25;16(8):3580

A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells

Docke WD, Radow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W

Nat Med. 1997 Jun;3(6):678-81

Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment

Dumoutier L, Louahed J, Renaud JC

J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):1814-9

Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9

Dumoutier L, Van Roost E, Colau D, Renaud JC

Proc Natl Acad Sci U S A, 2000 Aug 29;97(18):10144-9

Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor

Dumoutier L, Lejeune D, Colau D, Renaud JC

J Immunol. 2001 Jun 15;166(12):7090-5

Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22

Emmanuilidis K, Weighardt H, Maier S, Gerauer K, Fleischmann T, Zheng XX, Hancock WW, Holzmann B, Heidecke CD

J Immunol. 2001 Oct 1;167(7):3919-27

Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis

Emmanuilidis K, Weighardt H, Matevossian E, Heidecke CD, Ulm K, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B

Shock. 2002 Oct;18(4):301-5

Differential regulation of systemic IL-18 and IL-12 release during postoperative sepsis: high serum IL-18 as an early predictive indicator of lethal outcome

Feterowski C, Mack M, Weighardt H, Bartsch B, Kaiser-Moore S, Holzmann B

Eur J Immunol. 2004 Dec;34(12):3664-73

CC chemokine receptor 2 regulates leukocyte recruitment and IL-10 production during acute polymicrobial sepsis

Gabay C, Kushner I

N Engl J Med. 1999 Feb 11;340(6):448-54

Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation

Galanos C, Freudenberg MA, Jay F, Nerkar D, Veleva K, Brade H, Strittmatter W

Rev Infect Dis. 1984 Jul-Aug;6(4):546-52

Immunogenic properties of lipid A

Gaus H, Miethke T, Wagner H, Heeg K

Immunology. 1994 Nov;83(3):333-40

Superantigen-induced anergy of V beta 8+ CD4+ T cells induces functional but non-proliferative T cells in vivo

Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T

J Exp Med. 1993 Feb 1;177(2):547-50

Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia

Gerard GF, D'Alessio JM, Kotewicz ML, Noon MC

DNA. 1986 Aug;5(4):271-9

Influence on stability in Escherichia coli of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase

Gershoni JM, Palade GE

Anal Biochem. 1983 May;131(1):1-15

Protein blotting: principles and applications

Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, Busse LA, Zukowski MM, Wright SD

J Exp Med. 1994 Jan 1;179(1):269-77

Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14

Heeg K, Miethke T, Wagner H

Curr Top Microbiol Immunol. 1996;216:83-100

Superantigen-mediated lethal shock: the functional state of ligand-reactive T cells

Heidecke CD, Weighardt H, Hensler T, Bartels H, Holzmann B

Chirurg. 2000 Feb;71(2):159-65

Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival

- Hensler T**, Heidecke CD, Hecker H, Heeg K, Bartels H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B
J Immunol. 1998 Sep 1;161(5):2655-9
Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production
- Herman A**, Kappler JW, Marrack P, Pullen AM
Annu Rev Immunol. 1991;9:745-72
Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses
- Houts GE**, Miyagi M, Ellis C, Beard D, Beard JW
J Virol. 1979 Feb;29(2):517-22
Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus
- Ikeuchi H**, Kuroiwa T, Hiramatsu N, Kaneko Y, Hiromura K, Ueki K, Nojima Y
Arthritis Rheum. 2005 Apr;52(4):1037-46
Expression of Interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine
- Issbrucker K**, Marti HH, Hippenstiel S, Springmann G, Voswinckel R, Gaumann A, Breier G, Drexler HC, Suttrop N, Clauss M
FASEB J. 2003 Feb;17(2):262-4. Epub 2002 Dec 18
p38 MAP kinase--a molecular switch between VEGF-induced angiogenesis and vascular hyperpermeability
- Janeway CA Jr**, Medzhitov R
Annu Rev Immunol. 2002;20:197-216. Epub 2001 Oct 04
Innate immune recognition
- Kaufmann A**, Muhlradt PF, Gemsa D, Sprenger H
Infect Immun. 1999 Dec;67(12):6303-8
Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by Mycoplasma fermentans-derived lipoprotein MALP-2
- Kondoh M**, Tasaki E, Araragi S, Takiguchi M, Higashimoto M, Watanabe Y, Sato M
Eur J Biochem. 2002 Dec;269(24):6204-11
Requirement of caspase and p38MAPK activation in zinc-induced apoptosis in human leukemia HL-60 cells
- Kopp EB**, Medzhitov R
Curr Opin Immunol. 1999 Feb;11(1):13-8
The Toll-receptor family and control of innate immunity
-

Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S

J Immunol. 2001 Jun 15;166(12):7096-103

Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity

Kotenko SV, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Esterova E, Dickensheets H, Donnelly RP, Pestka S

J Biol Chem. 2001 Jan 26;276(4):2725-32. Epub 2000 Oct 16

Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes

Kotewicz ML, D'Alessio JM, Driftnier KM, Blodgett KP, Gerard GF

Gene. 1985;35(3):249-58

Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli

Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD

Intensive Care Med. 2000;26 Suppl 1:S124-8

Immunomodulatory therapies in sepsis

Laemmli UK

Nature. 1970 Aug 15;227(5259):680-5

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Lecart S, Morel F, Noraz N, Pene J, Garcia M, Boniface K, Lecron JC, Yssel H

Int Immunol. 2002 Nov;14(11):1351-6

IL-22, in contrast to IL-10, does not induce Ig production, due to absence of a functional IL-22 receptor on activated human B cells

Lejeune D, Dumoutier L, Constantinescu S, Kruijer W, Schuringa JJ, Renauld JC

J Biol Chem. 2002 Sep 13;277(37):33676-82. Epub 2002 Jun 26

Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10

Lien E, Means TK, Heine H, Yoshimura A, Kusumoto S, Fukase K, Fenton MJ, Oikawa M, Qureshi N, Monks B, Finberg RW, Ingalls RR, Golenbock DT

J Clin Invest. 2000 Feb;105(4):497-504

Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide

- Miethke T**, Wahl C, Heeg K, Echtenacher B, Krammer PH, Wagner H
J Exp Med. 1992 Jan 1;175(1):91-8
T cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin B: critical role of tumor necrosis factor
- Mottershead DG**, Hsu PN, Urban RG, Strominger JL, Huber BT
Immunity. 1995 Feb;2(2):149-54
Direct binding of the Mtv7 superantigen (Mls-1) to soluble MHC class II molecules
- Muhradt PF**, Kiess M, Meyer H, Sussmuth R, Jung G
Infect Immun. 1998 Oct;66(10):4804-10
Structure and specific activity of macrophage-stimulating lipopeptides from Mycoplasma hyorhinis
- Mullis KB**, Faloona FA
Methods Enzymol. 1987;155:335-50
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction
- Munoz C**, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM
J Clin Invest. 1991 Nov;88(5):1747-54
Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis
- Neumann B**, Zantl N, Veiheilmann A, Emmanuilidis K, Pfeffer K, Heidecke CD, Holzmann B
Int Immunol. 1999 Feb;11(2):217-27
Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis
- Novotny AR**, Emmanuel K, Ulm K, Bartels H, Siewert JR, Weighardt H, Holzmann B
Br J Surg. 2006 May 31
Blood interleukin 12 as preoperative predictor of fatal postoperative sepsis after neoadjuvant radiochemotherapy.
- Nwariaku FE**, Chang J, Zhu X, Liu Z, Duffy SL, Halaihel NH, Terada L, Turnage RH
Shock. 2002 Jul;18(1):82-5
The role of p38 map kinase in tumor necrosis factor-induced redistribution of vascular endothelial cadherin and increased endothelial permeability
- Pestka S**, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB
Annu Rev Immunol. 2004;22:929-79
Interleukin-10 and related cytokines and receptors
-

Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B
Science. 1998 Dec 11;282(5396):2085-8

Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene

Ramadori G, Van Damme J, Rieder H, Meyer zum Buschenfelde KH

Eur J Immunol. 1988 Aug;18(8):1259-64

Interleukin 6, the third mediator of acute-phase reaction, modulates hepatic protein synthesis in human and mouse. Comparison with interleukin 1 beta and tumor necrosis factor-alpha

Ramesh R, Mhashilkar AM, Tanaka F, Saito Y, Branch CD, Sieger K, Mumm JB, Stewart AL, Boquoi A, Dumoutier L, Grimm EA, Renauld JC, Kotenko S, Chada S, Boquio A
Cancer Res. 2003 Aug 15;63(16):5105-13

Melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin (IL)-24 is a novel ligand that regulates angiogenesis via the IL-22 receptor

Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD

J Exp Med. 1995 May 1;181(5):1887-92

Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller-Loennies S, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K, Ulmer AJ, Mattern T, Heine H, Schletter J, Loppnow H, Schonbeck U, Flad HD, Hauschildt S, Schade UF, Di Padova F, Kusumoto S, Schumann RR

Curr Top Microbiol Immunol. 1996;216:39-81

Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification

Romerio F, Zella D

FASEB J. 2002 Oct;16(12):1680-2. Epub 2002 Aug 21

MEK and ERK inhibitors enhance the anti-proliferative effect of interferon-alpha2b

Roux PP, Blenis J

Microbiol Mol Biol Rev. 2004 Jun;68(2):320-44

ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA

Science. 1988 Jan 29;239(4839):487-91

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

- Supajatura V**, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ra C, Ogawa H
J Clin Invest. 2002 May;109(10):1351-9
Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity
- Sarkar D**, Su ZZ, Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Valerie K, Dent P, Fisher PB
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jul 23;99(15):10054-9. Epub 2002 Jul 11
mda-7 (IL-24) Mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK
- Schumann RR**, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ
Science. 1990 Sep 21;249(4975):1429-31
Structure and function of lipopolysaccharide binding protein
- Song G**, Ouyang G, Bao S
J Cell Mol Med. 2005 Jan-Mar;9(1):59-71
The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival
- Sotillo R**, Renner O, Dubus P, Ruiz-Cabello J, Martin-Caballero J, Barbacid M, Carnero A, Malumbres M
Cancer Res. 2005 May 1;65(9):3846-52
Cooperation between Cdk4 and p27kip1 in tumor development: a preclinical model to evaluate cell cycle inhibitors with therapeutic activity
- Takala A**, Nupponen I, Kylanpaa-Back ML, Repo H
Ann Med. 2002;34(7-8):614-23
Markers of inflammation in sepsis
- Thorpe GH**, Kricka LJ, Gillespie E, Moseley S, Amess R, Baggett N, Whitehead TP
Anal Biochem. 1985 Feb 15;145(1):96-100
Enhancement of the horseradish peroxidase-catalyzed chemiluminescent oxidation of cyclic diacyl hydrazides by 6-hydroxybenzothiazoles
- Torres BA**, Griggs ND, Johnson HM
Nature. 1993 Jul 8;364(6433):152-4
Bacterial and retroviral superantigens share a common binding region on class II MHC antigens
- van der Poll T**, van Deventer SJ
Infect Dis Clin North Am. 1999 Jun;13(2):413-26
Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis
-

- Wang WH**, Gregori G, Hullinger RL, Andrisani OM
Mol Cell Biol. 2004 Dec;**24(23):10352-10365**
Sustained Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and c-Jun N-Terminal Kinase Pathways by Hepatitis B Virus X Protein Mediates Apoptosis via Induction of Fas/FasL and Tumor Necrosis Factor (TNF) Receptor 1/TNF- α Expression
- Wei CC**, Ho TW, Liang WG, Chen GY, Chang MS
Genes Immun. 2003 Apr;**4(3):204-11**
Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein
- Weighardt H**, Heidecke CD, Emmanuilidis K, Maier S, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B
Surgery. 2000 Mar;**127(3):309-15**
Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production
- Weighardt H**, Feterowski C, Veit M, Rump M, Wagner H, Holzmann B
J Immunol. 2000 Oct 15;**165(8):4537-43**
Increased resistance against acute polymicrobial sepsis in mice challenged with immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides is related to an enhanced innate effector cell response
- Weighardt H**, Jusek G, Mages J, Lang R, Hoebe K, Beutler B, Holzmann B
Eur J Immunol. 2004 Feb;**34(2):558-64**
Identification of a TLR4- and TRIF-dependent activation program of dendritic cells
- Wolk K, Kunz S**, Asadullah K, Sabat R
J Immunol. 2002 Jun 1;**168(11):5397-402**
Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members?
- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R**
Immunity. 2004 Aug;**21(2):241-54**
IL-22 increases the innate immunity of tissues
- Wu JJ**, Zhang XD, Gillespie S, Hersey P
FEBS Lett. 2005 Mar 28;**579(9):1940-4**
Selection for TRAIL resistance results in melanoma cells with high proliferative potential

- Xie MH**, Aggarwal S, Ho WH, Foster J, Zhang Z, Stinson J, Wood WI, Goddard AD, Gurney AL
J Biol Chem. 2000 Oct 6;275(40):31335-9
Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R
- Zanti N**, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K
Infect Immun. 1998 May;66(5):2300-9
Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis
- Zdanov A**
Curr Pharm Des. 2004;10(31):3873-84
Structural features of the interleukin-10 family of cytokines
- Zheng XX**, Steele AW, Nickerson PW, Steurer W, Steiger J, Strom TB
J Immunol. 1995 May 15;154(10):5590-600
Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide induced septic shock and allogeneic islet transplantation
- Zweigner J**, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR
Blood. 2001 Dec 15;98(13):3800-8
High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes

8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

	Seite
Abbildungen	
Abb. 1	SIRS-CARS-Modell..... 3
Abb. 2	MARS-Modell..... 4
Abb. 3	Prädispositions-Modell..... 4
Abb. 4	Pathophysiologie der allgemeinen Entzündungsreaktion..... 8
Abb. 5	Induktion der Akute-Phase-Proteine..... 9
Abb. 6	IL-10- und IL-22-Rezeptorkomplex..... 11
Abb. 7	IL-10- und IL-22-Signalweg..... 12
Abb. 8	Nicht-lysierendes Fc-Fusionsprotein..... 13
Abb. 9	Kinetik der SAA- und IL-6-Serumwerte nach Stimulation..... 50
Abb. 10	Regulation von IL-22, IL-22R1, IL-10 und IL-10R2 in Milz und Leber..... 51
Abb. 11	RT-PCR-Analyse der Expressionsraten von IL-22..... 53
Abb. 12	Analyse der IL-22R1-Expression verschiedener Zelllinien mittels RT-PCR..... 54
Abb. 13	STAT-3-Western Blot-Analyse von IL-22 stimulierten Zelllinien..... 56
Abb. 14	Proliferations-Analyse..... 57
Abb. 15	FACScan-Analyse von Annexin V- und PI-positiven Zellen nach IL-22-Stimulus..... 58
Abb. 16	Western Blot-Analyse von Caspase 3 und p38 nach IL-22-Stimulus..... 59
Abb. 17	Western Blot von AKT/AKT-P und Erk1/2/Erk1/2-P nach IL-22-Stimulus..... 60
Abb. 18	IL-22-Expression in Darmtumoren..... 61
Abb. 19	Schnittstellen des pEF-IL-10 Fc-Vektors..... 62
Abb. 20	Klonierungsschritte des Vektors pEF-IL-22 Fc..... 63
Abb. 21	FACScan-Analyse transient transfizierter 293T-Zellen..... 64
Abb. 22	Western Blot- und Coomassie-Gel-Analyse der Fusionsproteine..... 66
Abb. 23	Western Blot- und Coomassie-Gel-Analyse der aufgereinigten und aufkonzentrierten Fusionsproteine..... 66
Abb. 24	TNF- α -Suppressionstest..... 67
Abb. 25	IL-22R1-PCR bei Hepatoma 1-6-Zellen..... 68
Abb. 26	Aktivitätsnachweis von IL-22 Fc und IL-22-BP Fc..... 70
Abb. 27	Western Blot zur Aktivitätsbestimmung von IL-22 myc..... 71

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 28	Zyto- und Chemokinspiegel in Serum und Peritoneallavage.....	72
Abb. 29	Zyto- und Chemokinspiegel in Leber, Lunge und Milz.....	73
Abb. 30	Akkumulation von Immunzellen in der Bauchhöhle.....	74
Abb. 31	Bakterielle Belastung der Bauchhöhle und verschiedener Organe.....	75
Abb. 32	FACScan-Analyse der Phagozytoserate der Leukozyten.....	76
Abb. 33	Serumspiegel von Kreatinin und Harnstoff (BUN).....	77
Abb. 34	HSA-Konzentration in der Bronchiallavage.....	77
Abb. 35	Überlebenskurve.....	78
Abb. 36	Modell zur möglichen Regulation der durch IL-22 induzierten Akut-Phase-Reaktion.....	82
Abb. 37	Mögliche p38-abhängige biologische Effekte von IL-22.....	84
Abb. 38	Mögliche Aufspaltungswege des IL-22 Fc-Fusionsproteins durch Serumproteasen.....	86
Abb. 39	Darstellung der Klasse II Zytokin-Familie und deren Einteilung in Monomere und Dimere.....	87
Abb. 40	IL-22-Signalweg.....	91

Tabellen

Tab. 1	Klassifikation der Toll-like Rezeptoren.....	5
Tab. 2	Klassifikation der Akut-Phase-Proteine.....	8
Tab. 3	Klassifikation der IL-10-Homologen und der Klasse II Zytokin-Rezeptor-Familie (CRF2).....	10
Tab. 4	Tabellarische Darstellung der Veränderungen der Serumkonzentrationen verschiedener Entzündungsparameter nach Stimulation mit LPS, MALP, SEB oder nach CASP.....	49
Tab. 5	Tabelle aller untersuchten IL-22-Rezeptor-positiven und -negativen Zelllinien.....	55

9. Abkürzungsverzeichnis

βFGF	beta-fibroblast growth factor
β-Me	beta-Mercaptoethanol
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APP	Akute-Phase-Protein
APR	Akute-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	Adult-Respiratory-Distress-Syndrome
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfat-Säure
BP	Bindeprotein
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
CASP	Colon ascendens stent peritonitis
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm
CRF	Zytokin-Rezeptor-Familie
CRP	C-reaktives Protein
Da	Dalton
dATP	desoxyadenosin Triphosphat
dCTP	desoxycytosin Triphosphat
dGTP	desoxyguanidin Triphosphat
dTTP	desoxythymidin Triphosphat
DC	Dendritische Zellen
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Mischung aller vier Desoxynukleosid-Triphosphate
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Endothelial growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Durchflußzytometrie ("fluorescens activated cell sorter")
FKS	Fötales Kälberalbumin
g	Erdbeschleunigung

Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-TIF	Interleukin-10-T-cell-derived inducible factor
k	Kilo
KC	Cytokine-induced neutrophil chemoattractant
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LBP	LPS-Bindeprotein
LIF	Leukemia inhibiting factor
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro (10^{-6})
m	Milli (10^{-3})
M	Molar
MALP	Makrophage activating Lipopeptide
MARS	mixed antagonistic response syndrome
MDA-7	Melanoma differentiation-associated antigen-7
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
mRNS	Messenger(Boten-) Ribonukleinsäure
Mut.	Mutation
n	Nano (10^{-9})
NNR	Nebennierenrinde
OD	optische Dichte
PB	Polymyxin B
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlg ("Phosphate buffered saline")
PCR	Polymerasekettenreaktion ("polymerase chain reaction")
PEG	Polyethylenglycol
PI	Propidiumiodid
P/J	PMA/Ionomycin
POD	Peroxidase
rek.	Rekombinant
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium

Abkürzungsverzeichnis

RT	Reverse Transkriptase
sec.	Sekunde
SAA	Serum Amyloid A
SAP	Serum Amyloid P
s.c.	subcutan
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SEB	Staphylokokken-Enterotoxin B
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
ST	Staurosporin
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin
TGF	Tumor growth factor
TIR	Toll-Interleukin-1-Rezeptordomäne
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
TSB	Transformation and Storage Buffer
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor

Publikationsliste

Poster Präsentationen

Georg F. Weber, Felicitas Altmayr, Bernhard Holzmann und Heike Weighardt
IL-22-Binding Protein (BP) Fc as a novell tool to study the biological effects of the cyto-
kine IL-22 during inflammation and sepsis.
6th World-Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis – Pathophysiology,
Immune Consequences and Therapy, 02. - 06.März 2004, München, Germany

Georg F. Weber, Sylvia Schlautkötter, Simone Kaiser-Moore, Felicitas Altmayr,
Bernhard Holzmann und Heike Weighardt
IL-22 Modulates the Innate Immune Response During Polymicrobial Abdominal Sepsis
36th Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of Immunology
Kiel, Germany, September 21-24, 2005

Georg F. Weber, Florian C. Gärtner, Klaus-Peter Janssen, Bernhard Holzmann,
Wolfgang Erl, Heike Weighardt und Markus Essler
IL-22 – A New Inhibitory Cytokine in Tumor Proliferation
36th Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of Immunology
Kiel, Germany, September 21-24, 2005

Zitierbare Abstracts

Georg F. Weber, Felicitas Altmayr, Bernhard Holzmann und Heike Weighardt
IL-22-Binding Protein (BP) Fc as a novell tool to study the biological effects of the cyto-
kine IL-22 during inflammation and sepsis.
Shock, Supplement to Shock, Vol. 21, 2004; pp.50

Georg F. Weber, Sylvia Schlautkötter, Simone Kaiser-Moore, Felicitas Altmayr,
Bernhard Holzmann und Heike Weighardt
IL-22 Modulates the Innate Immune Response During Polymicrobial Abdominal Sepsis
Programmheft des 36th Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of
Immunology, Kiel, Germany, September 21-24, 2005

Georg F. Weber, Florian C. Gärtner, Klaus-Peter Janssen, Bernhard Holzmann,
Wolfgang Erl, Heike Weighardt und Markus Essler
IL-22 – A New Inhibitory Cytokine in Tumor Proliferation
Programmheft des 36th Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies of
Immunology, Kiel, Germany, September 21-24, 2005

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Holzmann für die Möglichkeit von 2001 bis 2005 diese Dissertation in seiner Abteilung anfertigen zu dürfen. Vor allem für den Freiraum zur Entwicklung und Verwirklichung eigener Ideen und Hypothesen. Es fanden im Rahmen von Journal-Clubs und "Progress Reports" stets fruchtbare Diskussionen statt.

Besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Heike Weighardt, die meine Arbeiten stets mit konstruktiver Kritik und hilfreichen Ideen begleitete. Ebenso bedanke ich mich für die Korrektur der Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Felicitas für die technische Assistenz und so manchen Trick und Kniff bedanken, die mir so einige Arbeit ersparten. Zudem für die bereitwillige Unterstützung bei so manchen Experimenten.

Es war mir immer eine besondere Freude mit Simone über die alltäglichen Probleme der "Jugend" zu diskutieren.

Gabi verdanke ich die hervorragende Einarbeitung während meiner ersten Labor-Monate und Sylvia danke ich für die Hilfe bei so manchen Versuchen. Tanja R. danke ich für die Hilfe bei der Etablierung der IL-22-Rezeptor-RT-PCR.

Marit, Monika S., Petra und Tanja S. danke ich für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor-Reich und die Einführung in die Welt der Proliferationsmessungen.

Bei Dr. Klaus-Peter Janßen möchte ich mich für sein Interesse bei aufkommenden Problemen bedanken, die er mit mir immer bereitwillig diskutierte.

Alex, Anne, Anja, Bernadett, Carmen, Caro, Dani, Franziska, Kay, Kristina, Martina, Melanie, Monika R. und Sandra danke ich für die gute und aufgeschlossene Zusammenarbeit.

Die Atmosphäre in der Forschergruppe war immer sehr freundlich, aufgeschlossen und locker. Für diese sehr lehrreiche Zeit möchte ich mich herzlich bei allen ehemaligen und aktiven Mitarbeitern bedanken.

Schließlich danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten, und meinem Bruder Martin für die Unterstützung in schwierigen Phasen während dieser Zeit.

Curriculum vitae - Georg Weber

Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort 21.03.1979, München
Eltern Prof. Dr. med. Peter C. Weber und
Regine Weber (geb. Coring)
3 Brüder (1966; 1969; 1977)

Schule

1985 - 1998 Grundschule, Planegg; Upham Primary School (Boston,
USA); Feodor-Lynen-Gymnasium, Planegg; Erasmus-
Grasser-Gymnasium, München
1998 Abitur

Studium

1998 - 2000 Studium der Humanmedizin an der LMU München
2000 Physikum
2000 - 2005 Studium der Humanmedizin an der TU München
2004 - 2005 Praktisches Jahr

- Anästhesiologie
Klinikum rechts der Isar, TU München
- II. Medizinische Klinik
Klinikum rechts der Isar, TU München
- Chirurgie
Universitätsspital Zürich, Schweiz

2005 3. Staatsexamen

Promotion

2001 - 2005 DFG-Forschungsgruppe "Postoperative Sepsis" der TU
München (Leiter Prof. Dr. med. B. Holzmann):
"Charakterisierung der biologischen Effekte von IL-22
und IL-22-BP und deren immunologische Rolle während
inflammatorischer Entzündungsreaktionen"

Ärztliche Tätigkeit

ab 2005 Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts
der Isar, TU München