

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der „Suppressor of Cytokine Signaling“ (SOCS)-Proteine bei muriner  
Infektion mit *Toxoplasma gondii*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Julius Hoehne  
aus Henstedt-Ulzburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld  
2. Prof. Dr. med. R. R. Schumann  
3. Priv.-Doz. Dr. C. Lüder

Datum der Promotion: 18.11.2011

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1. Morbus Crohn	6
1.2. Die orale Infektion mit 100 Zysten <i>Toxoplasma gondii</i> als Mausmodell für den M. Crohn	7
1.3. Die lokale Immunantwort bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen	7
1.3.1. Die Polarisierung von CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	7
1.3.2. Zytokinproduktion bei Th1- und sogenannten Th17-Immunantworten	8
1.3.2.1. Interferon (IFN)- $\gamma$	8
1.3.2.2. Interleukin (IL)-6	9
1.3.2.3. IL-23p19	9
1.3.3. Die Immunpathogenese des M. Crohn	10
1.4. Die „Suppressor of Cytokine Signaling“ (SOCS)-Proteine	12
1.4.1. Allgemeine Funktionen	12
1.4.1.1. SOCS-1	12
1.4.1.2. SOCS-3	14
1.5. Fragestellung	16
<b>2. Materialien und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1. Materialien	17
2.1.1. Mäuse	17
2.1.2. <i>Toxoplasma gondii</i>	17
2.1.3. Geräte	17
2.1.4. Plastikware	18
2.1.5. Chemikalien	19
2.1.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)- und andere Kits	20
2.1.7. Primer und Proben	20
2.1.7.1. IL-23p19 und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)	20
2.1.7.2. SOCS-1, SOCS-3 und $\beta$ -Actin	20
2.1.8. Durchflusszytometrie-Antikörper	22
2.1.9. Immunhistologie	22
2.1.10. Puffer und Lösungen	22
2.2. Methoden	26
2.2.1. Orale Infektion der Mäuse mit <i>T. gondii</i>	26
2.2.2. Organentnahme	26

2.2.3.	Histologische Methoden . . . . .	27
2.2.3.1.	Färbung mit Hämatoxylin und Eosin . . . . .	27
2.2.3.2.	Immunoperoxidasefärbung am Paraffinschnitt . . . . .	28
2.2.3.3.	Auswertung der histologischen Schnitte und Dokumentation . . . . .	29
2.2.4.	ELISA & Proteinbestimmung . . . . .	30
2.2.4.1.	Zytokin-ELISA . . . . .	30
2.2.4.2.	Proteinbestimmung . . . . .	31
2.2.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von SOCS-1, SOCS-3 und IL-23p19 . . . . .	31
2.2.5.1.	RNA-Extraktion . . . . .	31
2.2.5.2.	Reverse Transkription (RT) . . . . .	32
2.2.5.3.	Real-Time-quantitative (RTQ)-PCR . . . . .	33
2.2.6.	Durchflusszytometrie . . . . .	34
2.2.6.1.	Isolierung von Zellen aus Milz und MLN . . . . .	34
2.2.6.2.	Durchflusszytometrie . . . . .	35
2.2.7.	Statistische Analyse . . . . .	35
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1.	Morbidität, Histologie und Parasitenlast nach oraler Infektion mit <i>T. gondii</i> . . . . .	36
3.1.1.	Morbidität . . . . .	36
3.1.2.	Histologische Veränderungen im Ileum . . . . .	37
3.1.3.	Parasitenlast . . . . .	38
3.2.	Zytokinkonzentrationen in Ileum und Milz . . . . .	39
3.2.1.	IFN- $\gamma$ -, IL-6- und IL-23p19-Konzentrationen im Ileum . . . . .	39
3.2.2.	IFN- $\gamma$ - und IL-6-Konzentrationen in der Milz . . . . .	40
3.2.3.	Vergleich zwischen IFN- $\gamma$ - und IL-6-Konzentrationen in Ileum und Milz . . . . .	42
3.3.	SOCS-Expressionen in Ileum und Milz . . . . .	43
3.3.1.	SOCS-1- und SOCS-3-Expressionen im Ileum . . . . .	43
3.3.2.	SOCS-1- und SOCS-3-Expressionen in der Milz . . . . .	44
3.3.3.	Vergleich zwischen SOCS-1- und SOCS-3-Expressionen in Ileum und Milz . . . . .	46
3.4.	Korrelation der SOCS-Expressionen mit Zytokinkonzentrationen . . . . .	47
3.4.1.	Korrelation der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-23p19 mit SOCS-Proteinen im Ileum . . . . .	47
3.4.1.1.	IFN- $\gamma$ und SOCS-1 im Ileum . . . . .	47
3.4.1.2.	IL-6 und SOCS-3 im Ileum . . . . .	47
3.4.1.3.	IL-23p19 und SOCS-3 im Ileum . . . . .	48
3.4.2.	Korrelation der Zytokine IFN- $\gamma$ und IL-6 mit SOCS-Proteinen in der Milz . . . . .	49

## *Inhaltsverzeichnis*

---

3.4.2.1.	IFN- $\gamma$ und SOCS-1 in der Milz . . . . .	49
3.4.2.2.	IL-6 und SOCS-3 in der Milz . . . . .	50
3.5.	Bestimmung der Leukozytenpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz	51
3.5.1.	CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten . . . . .	51
3.5.2.	Makrophagen und dendritische Zellen in den mesenterialen Lymphknoten	51
3.5.3.	CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen in der Milz . . . . .	52
3.5.4.	Makrophagen und dendritische Zellen in der Milz . . . . .	53
3.5.5.	Vergleich der Leukozytenpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz . . . . .	53
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>55</b>
4.1.	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit . . . . .	55
4.2.	Assoziation von Morbidität, Histologie, Parasitenlast und Leukozytenpopulationen infizierter Mäuse untereinander . . . . .	55
4.3.	Assoziation der SOCS-Expressionen mit Entzündungsparametern . . . . .	56
4.4.	Assoziation der IFN- $\gamma$ -Produktion mit Entzündungsparametern und Korrelation mit der Expression der SOCS-Proteine . . . . .	57
4.5.	Assoziation der IL-6- und IL-23p19-Produktion mit Entzündungsparametern und Korrelation mit der Expression der SOCS-Proteine . . . . .	60
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>A.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>B.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>C.</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>85</b>
<b>D.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>86</b>
<b>E.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>89</b>
<b>F.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>90</b>
<b>G.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>91</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Morbus Crohn

Der Morbus Crohn bildet zusammen mit der Colitis ulcerosa die Entität der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), die eine weltweite Inzidenz von etwa 4-10/100.000 Personen pro Jahr bei einer Prävalenz von 40-100/100.000 Personen haben [1]. Die Pathologie des M. Crohn ist durch massive Nekrosen zumeist im terminalen Ileum gekennzeichnet, jedoch kann der gesamte Gastrointestinal (GI)-Trakt befallen sein. Schwerwiegende Komplikationen stellen Fistel- und Abszessbildung, intestinale Obstruktion, Malnutrition sowie extraintestinale Manifestationen dar [2].

Die medikamentöse Therapie des M. Crohn erfolgt derzeit mit der anti-inflammatorisch wirksamen 5-Aminosalicylsäure (=Mesalazin), weiterhin mit topischen oder systemischen Kortikosteroiden und in schwereren Fällen auch mit den Immunsuppressiva 6-Mercaptopurin, Azathioprin, Methotrexat und Ciclosporin [3]. Da es sich beim M. Crohn um eine Immunpathologie vom sog. T-Helfer (Th)1 (und/oder sog. Th17)-Typ (s. 1.3) handelt [4], die mit erhöhten proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  einhergeht, werden zur Therapie der Erkrankung auch monoklonale Antikörper gegen TNF- $\alpha$  wie Infliximab, Adalimumab oder Certolizumab eingesetzt [3]. Antikörper gegen ein weiteres wichtiges Th1-Zytokin, Interleukin (IL)-12, zeigten in einer klinischen Studie in den ersten sieben Wochen eine klinische Verbesserung der Symptomatik, die jedoch nach 18 Wochen nicht mehr statistisch signifikant war [3].

Trotz dieser medikamentösen Therapiemöglichkeiten müssen etwa 70-80% der Patienten mit M. Crohn im Laufe der Erkrankung operiert werden [2]. Klassische Indikationen für die chirurgische Therapie sind ein Nichtansprechen auf die medikamentöse Therapie sowie Fistel- oder Abszessbildung, intestinale Obstruktion und Malnutrition [2]. Doch auch die chirurgische Therapie ist mit hohen Rezidivraten behaftet; so liegt die Zeit zwischen dem ersten operativen Eingriff und einem notwendigen zweiten Eingriff im Mittel bei nur etwa 10 Jahren [2]. Aufgrund dieser Tatsachen und der teils schwerwiegenden Nebenwirkungen gängiger Therapeutika dauert die Suche nach neuen Behandlungsstrategien an.

Neben den klassischen Zytokinen der Th1-Immunantwort, TNF- $\alpha$  und Interferon (IFN)- $\gamma$ , konnte gezeigt werden, dass auch die Zytokine IL-6 sowie IL-23p19, ein kürzlich entdecktes Zytokin der sog. Th17-Immunantwort (s. 1.3.1), sowohl bei der Entstehung der experimentellen Kolitis in Mausmodellen als auch beim M. Crohn eine wesentliche Rolle spielen.

## 1.2. Die orale Infektion mit 100 Zysten *Toxoplasma gondii* als Mausmodell für den M. Crohn

Das obligat intrazelluläre Protozoon *Toxoplasma gondii* wird zumeist durch den Verzehr von ungenügend gekochtem oder ungekochtem Fleisch, das Gewebezysten enthält, aufgenommen. Eine Infektion kann jedoch auch über Nahrungsmittel oder Wasser stattfinden, die durch Katzen mit Oozysten kontaminiert wurden. Daher findet die erste Auseinandersetzung des Wirtes mit dem Parasiten im Darm des Wirtes statt [5].

Nach einer 100-Zysten-Infektion mit dem ME49-Stamm von *T. gondii* erkrankten CBA/ca-Mäuse (H-2k-Haplotyp) erst in der chronischen Phase der Infektion an einer Enzephalitis [6], wohingegen Balb/c-Mäuse (H-2d-Haplotyp) weder in der akuten, noch in der chronischen Phase erkrankten [7–10]. C57BL/6-Mäuse (H-2b-Haplotyp) entwickeln dagegen bereits in der Akutphase (etwa 7 Tage nach Infektion) eine Dünndarmpathologie, die durch massive Nekrosen im Ileum gekennzeichnet ist [7]. Diese Pathologie ist durch eine überschießende Th1 (und/oder sog. Th17)-Immunantwort (s. 1.3) verursacht, bei der antigen-präsentierende Zellen (APC) in der Lamina propria des Dünndarms durch Sekretion von IL-18 und IL-12 naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktivieren und zur Differenzierung zu Th1-Zellen anregen. Diese sezernieren daraufhin IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , welche eine starke Induktion der induzierbaren Stickstoffoxydsynthetase (iNOS) in mononukleären Zellen der Lamina propria bewirken. Das vermehrt gebildete Stickstoffoxid (NO) führt daraufhin zur Bildung von Nekrosen im Ileum [9]. Diese Immunkaskade hat große Ähnlichkeit mit der Immunkaskade in Mausmodellen für entzündliche Darmerkrankungen und bei Patienten mit M. Crohn [11](s. 1.3.3), weshalb sich die orale Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *T. gondii* als Modell zur Analyse von Immunmechanismen beim M. Crohn eignet.

## 1.3. Die lokale Immunantwort bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

### 1.3.1. Die Polarisierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Lange Zeit wurde angenommen, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen als Th1- und Th2-Zellen vorkommen [12–14]. Die Th1-Antwort ist durch Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  charakterisiert [12], wird mit zellulärer Immunität in Verbindung gebracht und ist die adäquate Immunantwort auf Erreger, die sich in Makrophagen oder anderen Wirtszellen vermehren (sog. intrazelluläre Erreger). In experimentellen Infektionen mit intrazellulären Pathogenen wie Mykobakterien, *Leishmania major*, *T. gondii* und *Listeria monocytogenes*, die alle eine Th1-Antwort hervorrufen, verhindert

eine Interferenz mit der Produktion oder der Wirkung von IFN- $\gamma$  und anderen Th1-Molekülen eine Eliminierung des Pathogens [15–20].

Im Gegensatz dazu ist die Th2-Immunität durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert [12, 21, 22]. Eine Th2-Antwort ist mit der Produktion von Antikörpern (IgG1 und IgE) und der Induktion einer Eosinophilie assoziiert [22, 23]. Die Th2-Immunantwort führt zur Abwehr von Nematodeninfektionen und spielt bei der Entstehung von Allergien eine wichtige Rolle.

Kürzlich wurden jedoch zwei weitere CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Populationen entdeckt. Neben regulatorischen T-Zellen, die die Entwicklung von inflammatorischen Immunantworten unterbinden können [24–26], wurden kürzlich sog. Th17-Zellen beschrieben [27, 28]. Diese sind durch die Produktion von IL-17A, IL-17F, TNF- $\alpha$ , IL-22 und IL-6 charakterisiert [29, 30]. Die sog. Th17-Lymphozyten werden als Entzündungsmediatoren im Rahmen verschiedener Autoimmunerkrankungen wie experimenteller Autoimmunenzephalitis (EAE), Kollagen-induzierter Arthritis [29, 31–33] und mukosaler Entzündungen wie M. Crohn diskutiert [34] (s. 1.3.3).

Die Differenzierung der jeweiligen T-Zellen wird durch die Zytokine bestimmt, die während der T-Zell-Aktivierung als Erstantwort auf ein Pathogen vorhanden sind [14]. IL-12 und IL-18 führen zu stabilen epigenetischen Veränderungen, durch die zuvor undeterminierte primäre T-Helfer-Zellen den Th1-Phänotyp annehmen [35, 36], wohingegen die Präsenz von IL-4 in einem Th2-Phänotyp resultiert [37]. IL-21, „Transforming Growth Factor“ (TGF)- $\beta$  und IL-6 spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung des sog. Th17-Phänotyps [38–41], der daraufhin vermutlich durch IL-23p19 aufrecht erhalten wird [27–29].

### 1.3.2. Zytokinproduktion bei Th1- und sogenannten Th17-Immunantworten

#### 1.3.2.1. Interferon (IFN)- $\gamma$

Das biologisch aktive IFN- $\gamma$  wird v.a. von aktivierten Natürlichen Killer (NK)- und CD4<sup>+</sup>-Th1-Zellen sowie von aktivierten zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen produziert [12, 42–44]. Jedoch sind auch APC's und NK-T-Zellen wichtige IFN- $\gamma$ -Produzenten [45–47]. Während vor allem NK-Zellen in der Frühphase nach Infektionen IFN- $\gamma$  produzieren, sind T-Lymphozyten in der adaptiven Immunantwort die wichtigste Quelle für IFN- $\gamma$  [12, 48].

Die IFN- $\gamma$ -Produktion wird durch von APC's sezernierte Zytokine, allen voran die Th1-Zytokine IL-12 und IL-18, sowie durch IFN- $\gamma$  selbst gesteigert [49–52]. Das Th2-Zytokin IL-4 blockiert die Produktion, das „Suppressor of Cytokine Signaling“ (SOCS)-Protein SOCS-1 (s. 1.4) hingegen blockiert die Wirkung von IFN- $\gamma$  [50, 53–57]. Die Produktion von IFN- $\gamma$  scheint zudem genetisch reguliert zu sein, da T-Lymphozyten aus C57BL/6-Mäusen signifikant mehr IFN- $\gamma$  als

T-Lymphozyten aus Balb/c-Mäusen sezernieren [58, 59]. Die erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion ist mit einer größeren Resistenz gegenüber intrazellulären Erregern verbunden.

IFN- $\gamma$  induziert die Chemotaxis von Leukozyten und steuert Reifung und Differenzierung von Makrophagen und Monozyten [60–63]. Außerdem verstärkt es die Aktivität von NK-, B- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen [45, 63–65]. IFN- $\gamma$  bewirkt zudem die Induktion des „Cytokine-inducible-SH2-Domain-containing-Protein“ (CIS) sowie von SOCS-1, SOCS-2 und SOCS-3 [66, 67].

Neben diesen (protektiven) Abwehrmechanismen trägt IFN- $\gamma$  jedoch auch zu Immunpathologien bei. Beim Menschen ist IFN- $\gamma$  unter anderem an Erkrankungen wie systemischem Lupus erythematodes [68, 69], Multipler Sklerose [70], insulinabhängigem Diabetes mellitus und M. Crohn (s. 1.3.3) beteiligt [71–73].

### 1.3.2.2. Interleukin (IL)-6

Das 26 kDa schwere IL-6-Protein wird durch lymphoide und nicht-lymphoide Zellen wie T- und B-Zellen, Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten und verschiedene Tumorzellen gebildet [74]. IL-6 beeinflusst zusammen mit TGF- $\beta$  die Reifung und Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup>-Zellen zu sog. Th17-Zellen [39–41] (s. 1.3.1). Weiterhin beeinflusst IL-6 Reifung und Differenzierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und ist an der Regulierung der Erythropoese sowie der Makrophagen-, Osteoklasten- und Megakaryozytendifferenzierung beteiligt [75]. IL-6 ist im Rahmen der Entzündungsreaktion der Hauptinduktor des C-reaktiven Proteins, des Fibrinogens und des Serumamyloid-A-Proteins [76]. Weiterhin induziert IL-6 die Expression von CIS, SOCS-1, SOCS-2 und SOCS-3 [66, 67].

IL-6 ist jedoch auch an der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Multiples Myelom, Mesangioproliferative Glomerulonephritis und Psoriasis [75] sowie an mukosalen Entzündungen wie M. Crohn beteiligt [77–80] (s. 1.3.3).

### 1.3.2.3. IL-23p19

Das im Jahr 2000 entdeckte 19,8 kDa schwere IL-23p19 (=IL-23) ist ein dem IL-12 eng verwandtes Zytokin, welches als Heterodimer aus einer p19-Kette und der p40-Untereinheit des IL-12 vorliegt [81]. Die Expression von IL-23p19-mRNA konnte in murinen aktivierten dendritischen Zellen (DC) nachgewiesen werden [81], weiterhin wird IL-23p19 von aktivierten Makrophagen produziert [82, 83]. Es wird v.a. im Intestinum, weniger dagegen in der Milz exprimiert [83, 84]. Im Gegensatz zu IL-12 hat IL-23p19 eine nur schwache antiparasitäre Wirkung gegen *T. gondii* [85].

IL-23p19 ist jedoch wichtig für die Aufrechterhaltung der sog. Th17-Antwort, wobei es diese weniger selbst zu induzieren scheint [31, 84, 86] (s. 1.3.1).

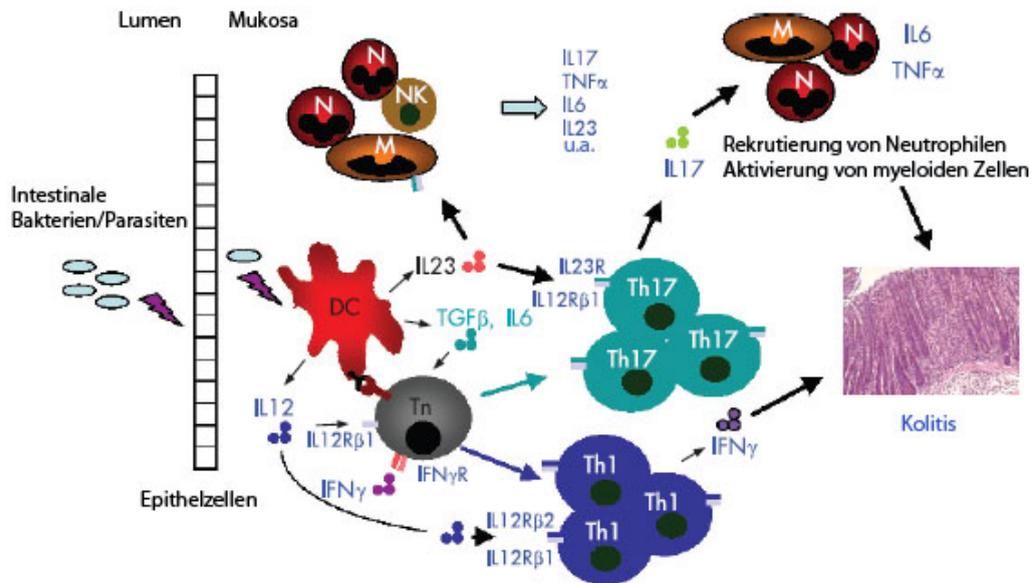
IL-23p19 wurde als essentieller Mediator der EAE, der Kollagen-induzierten Arthritis sowie der experimentellen Kolitis charakterisiert [31–33, 83, 84, 86, 87], der eine Kaskade durch Makrophagen sezernierter proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-17 unterhält. Kürzlich konnte zudem eine Beteiligung von IL-23p19 beim M. Crohn des Menschen nachgewiesen werden [88–90] (s. 1.3.3).

### 1.3.3. Die Immunpathogenese des M. Crohn

Bei der Immunpathogenese des M. Crohn scheint es sich um eine T-Zell-vermittelte fehlgesteuerte Immunantwort als Reaktion auf die darmeigene Bakterienflora zu handeln, die vom genetischen Hintergrund der betroffenen Individuen abhängig ist [91]. Die Erkennung von spezifischen Oberflächenmolekülen darmeigener Bakterien erfolgt durch die sog. „Nucleotide Oligomerization Domain“ (NOD)-Rezeptoren *NOD1* und *NOD2*. Mutationen dieser Proteine konnten mit erhöhter Suszeptibilität für M. Crohn in Verbindung gebracht werden [92–95].

Die Induktion der fehlgesteuerten Immunantwort erfolgt daraufhin durch APC's, die durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und IL-23p19 eine Aktivierung und Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup>-T-Zellen herbeiführen und Neutrophile sowie NK-Zellen zur weiteren Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 anregen (s. Abb. 1). IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bewirken über die Induktion von iNOS in Zellen der Lamina propria eine erhöhte Produktion von NO, welches zu Nekrosen führt [11]. Weiterhin bewirkt TNF- $\alpha$  die Induktion sog. Matrix-Metalloproteinasen (MMP), einer Gruppe Zink- und Calcium-aktivierter neutraler Endoproteinase, die bei erhöhter Expression starke proteolytische Aktivität aufweisen und so zu weiterer Nekrosenbildung führen [96, 97]. Die genaue Rolle von IL-23p19 bei der Entstehung chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen ist noch unklar, jedoch induziert IL-23p19 die Produktion von IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IFN- $\gamma$  durch Zellen des unspezifischen Immunsystems [32, 98] und stabilisiert sog. Th17-Zellen, die durch Sekretion von IL-17 myeloide und epitheliale Zellen zur Produktion von IL-6, TNF- $\alpha$  und anderen Faktoren anregen [32, 99, 100](s. Abb. 1).

Vor der Entdeckung der sog. Th17-Zellen wurde davon ausgegangen, dass es sich beim M. Crohn um eine Th1-Zell-vermittelte Erkrankung handelt, die durch IL-12 ausgelöst bzw. aufrecht erhalten wird. Studien am Menschen [101] und in Mausmodellen der Kolitis [102, 103] zeigten, dass exzessive Th1-Aktivität ein wesentlicher Faktor dieser Erkrankung ist. Erhöhte Werte von sowohl IL-18 als auch IL-12, die die Differenzierung von Th1-T-Zellen bewirken [35, 36], konnten



**Abb. 1.:** Modell zur Entstehung der Kolitis durch Th1- und sog. Th17-Zellen. DC = dendritische Zellen, M = Makrophagen, N = Neutrophile, NK = Natürliche Killerzellen, Tn = naive T-Zellen. Modifiziert nach McGovern, D. & Powrie, F.: The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. *Gut*, **2007**, *56*, 1333-1336

in der Mukosa von Patienten mit M. Crohn nachgewiesen werden [104, 105]. Auch konnte gezeigt werden, dass intestinale Epithelzellen von Patienten mit M. Crohn CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zur gesteigerten Sekretion von IFN- $\gamma$  anregen [101]. Die wichtige Rolle der IL-12/IFN- $\gamma$ -Achse bei der experimentellen Kolitis konnte auch in Mausmodellen nachgewiesen werden. In einem T-Zell-vermittelten Kolitis-Mausmodell reduzierte die Behandlung der Tiere mit anti-IL-12-Antikörpern die Ausprägung der Erkrankung [103].

Durch die Entdeckung von IL-23p19, das die p40-Kette mit IL-12 teilt [81] (s. 1.3.2.3), mussten jedoch diverse Experimente, in denen ein anti-p40-Antikörper zur Neutralisierung von IL-12 eingesetzt worden war, neu evaluiert werden. Viele der ursprünglich IL-12 zugeschriebenen Funktionen scheinen nach neuesten Erkenntnissen auf IL-23p19 zurückzugehen.

Die wichtige Rolle der sog. IL-23/Th17-Achse bei der Immunpathogenese der murinen experimentellen Kolitis sowie des M. Crohn beim Menschen konnte durch diverse Studien belegt werden. So wurden bei Patienten mit M. Crohn kürzlich Veränderungen im Gen für den IL-23-Rezeptor gefunden [89] sowie Makrophagen isoliert, die nach Stimulation durch *Escherichia coli* und *Enterococcus faecalis* vermehrt IL-23p19 produzierten [90]. Auch konnte eine erhöhte Produktion von IL-23p19-mRNA bei Patienten mit aktivem M. Crohn festgestellt werden [88]. In einem Mausmodell mit durch *Helicobacter hepaticus* induzierter T-Zell-abhängiger Kolitis induzierte IL-23p19 v.a. die Ausschüttung von IL-17 und IFN- $\gamma$  [86]. Weiterhin konnte in einem

IL-10-Knockout-Mausmodell der experimentellen Kolitis gezeigt werden, dass *Il12p35*<sup>-/-</sup> x *Il10*<sup>-/-</sup> Mäuse trotz niedriger IFN- $\gamma$ -Konzentrationen eine Erkrankung entwickeln, wohingegen *Il23p19*<sup>-/-</sup> x *Il10*<sup>-/-</sup> Mäuse trotz erhöhter Th1-Zytokine nicht erkranken. Dies zeigt, dass außer der IL-12/IFN- $\gamma$ -Achse auch IL-23p19 essentiell für die Pathogenese der experimentellen Kolitis ist [87].

Auch die Beteiligung von IL-6 an der Pathogenese chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen konnte in Studien gezeigt werden. Yamamoto *et al.* zeigten, dass der Transfer von CD45RB<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus naiven Balb/c-Mäusen in „scid“-Mäuse (Mäuse, die weder T- noch B-Zellen produzieren) eine Kolitis auslöst, die durch Gabe eines Antikörpers gegen den IL-6-Rezeptor unterdrückt werden kann [80]. Die Serumkonzentrationen von IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor sind zudem bei Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa stark erhöht und korrelieren mit der klinischen Ausprägung der Erkrankung [77–79].

### 1.4. Die „Suppressor of Cytokine Signaling“ (SOCS)-Proteine

#### 1.4.1. Allgemeine Funktionen

Die 1995 entdeckten SOCS-Proteine sind die einzigen induzierbaren Inhibitoren der Zytokinaktivität [66].

Als erstes SOCS-Protein wurde 1995 CIS beschrieben. Es handelt sich bei CIS um ein durch IL-2, IL-3 und Erythropoietin (Epo) induzierbares Protein [106]. SOCS-1 wurde 1997 als zweites Protein der Familie entdeckt [66, 67, 107], später wurden zwei verwandte Proteine, SOCS-2 und SOCS-3, entdeckt [67]. Hilton *et al.* isolierten 20 weitere Proteine in Mäusen und Menschen, die ein 40 Aminosäurereste langes sequenzhomologes C-terminales Motiv enthalten, das als „SOCS box“ bezeichnet wird, u.a. SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6 und SOCS-7 [67, 108]. Während die Funktionen von SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6 und SOCS-7 bisher wenig verstanden werden, wurden für SOCS-1 und SOCS-3 vielfältige Funktionen wie Kanzerogenese, immunologische Funktionen sowie Regulation der fetalen Erythropoese und des endokrinen Systems beschrieben [109].

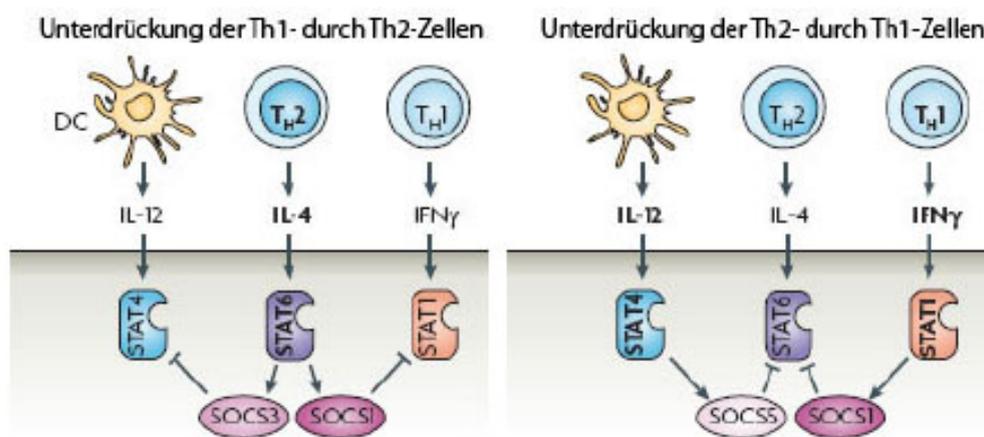
##### 1.4.1.1. SOCS-1

Das 212 Aminosäuren große SOCS-1-Protein ist in unstimulierten Zellen in niedriger Expression ubiquitär vorhanden, mit starker Expression in Thymus, Lunge, Milz und Testis [66, 67]. SOCS-

## 1. Einleitung

1 wird u.a. durch  $\text{IFN-}\gamma$ , durch Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-13 [110, 111] sowie durch IL-6 induziert [66, 67].

SOCS-1 verstärkt die Reifung von DC's [112]. Weiterhin inhibiert SOCS-1 sowohl die  $\text{IFN-}\gamma$ - als auch die IL-4-Signaltransduktion und scheint so einen Einfluss auf die Balance der Th1- oder Th2-Antwort zu haben. Sind die extrazellulären  $\text{IFN-}\gamma$ - oder IL-12-Konzentrationen hoch, wird das IL-4-Signal durch SOCS-1 blockiert. Sind dagegen die extrazellulären IL-4-Konzentrationen hoch, so wird das  $\text{IFN-}\gamma$ - bzw. IL-12-Signal durch SOCS-1 blockiert [113] (Abb. 2).



**Abb. 2.:** Modell zu den Wirkungen von SOCS auf die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen. Modifiziert nach Yoshimura, A.; Naka, T. & Kubo, M.: SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7, 454-465

Weiterhin hemmt SOCS-1 den „Januskinase/Signal Transducer and Activator of Transcription“ (JAK/STAT)-Signalübertragungsweg durch direkte Bindung an JAK2 [107, 114, 115]. So werden intrazelluläre Signalwege vieler Zytokine, unter anderem auch von IL-6 und  $\text{IFN-}\gamma$ , blockiert [116–119].

Diese Wirkungen von SOCS-1 konnten in Mausmodellen nachgewiesen werden. *Socs1*-Knockout-Mäuse zeigten reduziertes Wachstum und starben innerhalb von drei Wochen an einem Syndrom, das durch schwere Lymphozytopenie, Aktivierung peripherer T-Zellen, Leberverfettung und Leberzellnekrosen sowie Makrophageninfiltrationen aller großen Organe gekennzeichnet war [120, 121]. Diese Defekte scheinen v.a. auf unkontrollierte  $\text{IFN-}\gamma$ -Sekretion durch T-Zellen zurückzugehen [57]. *Socs1*<sup>-/-</sup> Mäuse, denen auch das *rag2*-Gen fehlte und die daher keine funktionsfähigen Lymphozyten hatten, produzierten kein  $\text{IFN-}\gamma$  und überlebten [122]. Diese Befunde weisen darauf hin, dass SOCS-1 die  $\text{IFN-}\gamma$ -Produktion *in vivo* hemmt. *Socs1*<sup>-/-</sup> x *Ifng*<sup>-/-</sup> Mäuse oder *Socs1*<sup>-/-</sup> Mäuse, die mit anti- $\text{IFN-}\gamma$ -Antikörpern behandelt wurden,

überlebten zunächst und schienen gesund [57, 121], starben jedoch nach sechs Monaten mit Infektionen und polyzystischen Nieren [123], was darauf hinweist, dass SOCS-1 neben IFN- $\gamma$  auch andere proinflammatorische Zytokine zu regulieren scheint.

*Socs1*<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen zudem eine Hypersensitivität auf IFN- $\gamma$  auf, da ihre Knochenmarksmakrophagen 100-fach geringere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Vergleich zu Wildtyp-Makrophagen benötigten, um eine *Leishmania major*-Infektion zu eliminieren [57]. Morita *et al.* konnten zeigen, dass die Apoptose von Zellen der *Socs1*<sup>-/-</sup> Mäuse mit exzessiver IFN- $\gamma$ -induzierter TNF- $\alpha$ -Wirkung in Verbindung steht [124]. Tatsächlich waren die TNF- $\alpha$ -Serumkonzentrationen in naiven *Socs1*<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht, und murine Fibroblasten von *Socs1*<sup>-/-</sup> Mäusen waren sensitiver gegenüber TNF- $\alpha$ -vermitteltem Zelltod als Wildtyp-Kontrollen [124]. *Socs1*<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten weiterhin eine moderate Neutrophilie mit reduzierten Thrombozyten- und Hämatokritwerten [125] sowie eine schwere Pankreatitis, die durch Entzündung, Ödem mit T-Zell- und Makrophageninfiltrationen und Atrophie der azinären Zellen gekennzeichnet war [126].

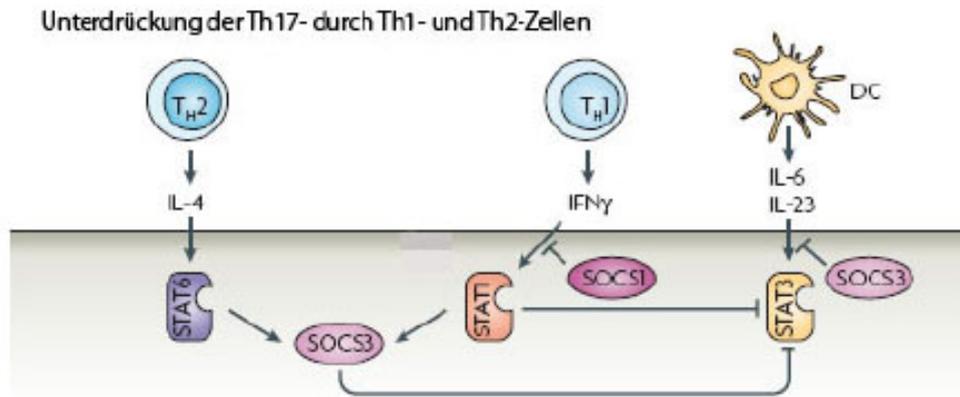
Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass SOCS-1 insbesondere die IFN- $\gamma$ -Signalwirkung reguliert und vor den pathologischen Folgen unkontrollierter IFN- $\gamma$ -Wirkungen schützt.

### 1.4.1.2. SOCS-3

SOCS-3 besteht aus 225 Aminosäuren und wird niedrig in Lunge, Milz und Thymus und hoch in der fetalen Leber exprimiert [67, 127]. Für SOCS-3 konnte eine Induktion durch Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-13 nachgewiesen werden, deren Signalübertragungsweg über STAT6 verläuft [111]. Weiterhin wird SOCS-3 durch IL-10 [128] sowie durch IL-1, IL-3, IL-6, Granulozyten-Koloniestimulierenden Faktor (G-CSF), Epo, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und weitere Faktoren induziert [67, 129].

SOCS-3 ist ein potenter Inhibitor der IL-12-Signalwirkung [130, 131]. Die Blockierung des IL-12-Signals durch SOCS-3 hemmt die Th1- und fördert die Th2-Differenzierung [132] (s. Abb. 2). SOCS-3 wirkt zudem auf die Differenzierung sog. Th17-Zellen, indem es als negativer Regulator der sog. Th17-Differenzierung die IL-23- und IL-6-vermittelte Aktivierung von STAT3 in sog. Th17-Zellen supprimiert [133] (s. Abb. 3). Durch Injektion von SOCS-3-transduzierten DC's in Wildtyp-Mäuse konnte die Entstehung der durch sog. Th17-Zellen vermittelten EAE unterdrückt werden, was auf einer verminderten IL-23p19-Produktion und der vorherrschenden Induktion von Th2-Zellen beruhte [134].

Die wohl wichtigste Funktion von SOCS-3 ist die Rolle als Regulator des proinflammatorischen IL-6 [129, 135, 136] über den JAK/STAT-Signalübertragungsweg, wobei SOCS-3 nicht direkt an die JAK, sondern an den zytoplasmatischen Teil des IL-6-Rezeptors bindet [137]. Verstärkte SOCS-3-Expression kann zudem die IFN- $\gamma$ -Antwort hemmen [138, 139].



**Abb. 3.:** Modell zu den Wirkungen von SOCS auf die Differenzierung von naiven T-Zellen zu sog. Th17-Zellen. Modifiziert nach Yoshimura, A.; Naka, T. & Kubo, M.: SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol*, **2007**, 7, 454-465

Die wichtige Rolle von SOCS-3 in der negativen Rückkopplung von Signalkaskaden konnte in Mausmodellen gezeigt werden. Zwar starben *Socs3*<sup>-/-</sup> Mäuse aufgrund placentarer Defekte bereits während der Schwangerschaft [127, 140], die genetische Reduzierung des „Leukemia Inhibitory Factor“ (LIF) in diesen Mäusen konnte die placentaren Defekte und die embryonale Letalität jedoch mindern. Dennoch zeigten auch *Socs3*<sup>-/-</sup> x *Lif*<sup>-/-</sup> Mäuse eine erhöhte neonatale Mortalität im Vergleich zu Kontrolltieren, und adulte Tiere entwickelten entzündliche Infiltrate in Geweben, die zum Tod der Mäuse führten [141]. An Mäusen mit spezifisch in der Leber ausgeschaltetem SOCS-3-Gen konnte die wichtige Rolle von SOCS-3 für die Regulierung von IL-6 gezeigt werden. In diesen Mäusen konnte eine verlängerte Aktivierung von STAT3 nach Injektion von IL-6 beobachtet werden, was darauf hinweist, dass SOCS-3 die Wirkung von IL-6 über STAT3 reguliert [135].

Sowohl SOCS-1 als auch SOCS-3 werden durch IFN- $\gamma$  und IL-6 induziert und hemmen die Antwort auf beide Zytokine [66, 67, 129, 138, 139]. Dennoch haben beide Proteine *in vivo* spezifische, nicht austauschbare Funktionen. Die Funktion von SOCS-1 scheint eher in der Hemmung des IFN- $\gamma$ -, die von SOCS-3 hingegen in der Hemmung des IL-6-Signalweges zu liegen, was durch Studien belegt werden konnte. So wurde eine erhöhte Sensitivität von *Socs3*<sup>-/-</sup> Makrophagen gegenüber dem antiproliferativen Effekt von IL-6 gezeigt [129, 136]. Die IFN- $\gamma$ -Wirkung blieb dagegen in *Socs3*<sup>-/-</sup> Lebern unbeeinflusst, und die Kinetik und Größe der IFN- $\gamma$ -induzierten STAT1-Aktivierung konnte nicht von Wildtyp-Lebern unterschieden werden [142]. In *Socs1*<sup>-/-</sup> Geweben konnten zudem verstärkte Reaktionen auf IFN- $\gamma$ , nicht aber auf IL-6 beobachtet werden [135].

Bei Mäusen mit entzündlichen Darmerkrankungen sowie bei Patienten mit Colitis ulcerosa und

M. Crohn wurde eine erhöhte Expression von SOCS-3 im Colon gefunden [143, 144]. Auch konnte eine intrazelluläre Applikation von SOCS-3 die Produktion proinflammatorischer Zytokine, die Leberzellapoptose sowie hämorrhagische Nekrosen in Mäusen, die mit *Staphylococcus*-Enterotoxin B, Lipopolysaccharid (LPS) oder Concanavalin A behandelt wurden, deutlich reduzieren [145]. In einem Mausmodell der Colitis ulcerosa wurde die Aktivierung von STAT3 nach 3-5 Tagen sichtbar und fiel danach ab, die Expression von SOCS-3 begann erst an Tag 5 und blieb danach erhöht [146]. Shouda *et al.* konnten zeigen, dass die periartikuläre Injektion rekombinanter Adenoviren, die SOCS-3-cDNA trugen, in die Gelenke von Mäusen mit Kollagen-induzierter Arthritis die Induktion und Progredienz der Erkrankung verhindert [147].

Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass der IL-6/STAT3-Signalübertragungsweg zur Progredienz chronisch-entzündlicher Erkrankungen beiträgt und dass SOCS-3 ein negativer Regulator entzündlicher Erkrankungen ist, speziell solcher, die mit hoher IL-6-Produktion verbunden sind [143, 147].

### 1.5. Fragestellung

Da die orale Infektion mit 100 Zysten des ME49-Stammes von *T. gondii* zu einer Immunpathologie des Dünndarms führt, deren Pathomechanismus dem chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen gleicht [7, 11], sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, welche Rolle die SOCS-Proteine bei der Entstehung der Immunpathologie spielen. Es wurden dazu der Gewichtsverlauf unter der Infektion, histologische Veränderungen im Ileum, die Anzahl der Parasiten, die Konzentrationen der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-23p19, die Expression von SOCS-1 und SOCS-3 auf mRNA-Ebene sowie die beteiligten Leukozytenpopulationen suszeptibler C57BL/6- sowie resistenter Balb/c- und CBA/ca-Mäuse untersucht. Dabei sollten folgende Fragen im Detail beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der SOCS-Expression und der Konzentration der proinflammatorischen Zytokine zwischen naiven und infizierten C57BL/6-, Balb/c- und CBA/ca-Mäusen?
2. Gibt es in naiven und infizierten Mäusen Unterschiede zwischen lokalen und systemischen Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine und der SOCS-Expressionen?
3. Korrelieren die Expression der SOCS-Proteine und die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine mit der Morbidität, der Schwere der histologischen Veränderungen und der Parasitenzahl im Ileum sowie mit den Frequenzen bestimmter Leukozytenpopulationen?

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Mäuse

Es wurden 2-4 Monate alte, weibliche Mäuse verwendet (n=125). Die Mäuse wurden in den Tierställen der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM), Charité in Käfigen zu bis zu 10 Tieren gehalten. Die Tiere hatten sterilisiertes Trockenfutter sowie eine Wasserflasche ad libitum zur Verfügung. Die Genehmigung der Tierversuchsvorhaben erfolgte durch das Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit (Genehmigungsnummer: 258/04).

C57BL/6-Mäuse	Zucht der Abt. Med. Mikrobiologie der Charité CBF
CBA/ca-Mäuse	Zucht der Abt. Med. Mikrobiologie der Charité CBF
Balb/c-Mäuse	Zucht der Abt. Med. Mikrobiologie der Charité CBF

#### 2.1.2. *Toxoplasma gondii*

Es wurde der Stamm ME49 (Prof. J. Remington, Stanford University, USA) (Typ-II-Stamm) verwendet.

#### 2.1.3. Geräte

Tab. 1.: Geräte

Gerät/Name	Bezeichnung, Hersteller, Stadt, Land
Brutschrank	B 5060EK-CO2, Heraeus-Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Digitalkamera für Mikroskop	Inteq GmbH, Berlin, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur™ Flow Cytometer, Becton Dickinson SA, Franklin Lakes, USA
ELISA-Reader	Spectra II, Tecan Trading AG, Mannedorf/Zürich, Schweiz
Gefrierschrank -20°C	Premium, Liebherr-International AG, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -86°C	VIP Series, Sanyo Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan
Knopfkanüle	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kühlplatte	CP60, Microm-International-GmbH, Walldorf, Deutschland
LightCycler®	F.Hoffmann-LaRoche AG, Basel, Schweiz
Mikroskop	Axiostar 1031-031, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mörser	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

## 2. Materialien und Methoden

---

Neubauer Zählkammer	Assistent, Karl Hecht AG, Sondheim, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
Photometer	BioPhotometer 6131, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Research, Eppendorf AG
Pipettierhilfe	Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Präparierbesteck	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Rotationsmikrotom HM355	Microm-International-GmbH
Rotor Stator	Micra D-1, ART-moderne Labortechnik e.K., Müllheim-Hügelheim, Deutschland
Sterile Arbeitsbank	LaminAir <sup>®</sup> HCB 2448 G5, Heraeus-Holding GmbH
Thermocycler	Gene Amp <sup>®</sup> PCR System 2700, Applied Biosystems, Foster City, USA ABI PRISM <sup>®</sup> 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417C, Eppendorf AG Centrifuge 5415C, Eppendorf AG
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Waage	Elektronische Analysewaage 1702 MP8, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge	Varifuge RF, Heraeus-Holding GmbH

### 2.1.4. Plastikware

**Tab. 2.:** Plastikware

Name	Bezeichnung, Hersteller, Stadt, Land
24-well-Platte	Nunclon <sup>™</sup> Surface, Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Cryotubes	Kartell, Noviglio, Italien
FACS-Tubes	BD Falcon <sup>™</sup> , Becton Dickinson SA
Filtereinheit	FP 30/0, 45 CA-S, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Gewebe-Einbettkassetten	Uni-Safe <sup>®</sup> , Medis-Weber Co., Buseck, Deutschland
Mikrotiterplatte, beschichtet	BD Falcon <sup>™</sup> , Microtest <sup>™</sup> , Becton Dickinson SA
Mikrotiterplatte, unbeschichtet	Nunc-Immuno Module, Nunc A/S
Kanülen 30G	BD Microlance <sup>™</sup> 3, Becton Dickinson SA
Küvette für Photometer	UVette <sup>®</sup> 220-1600 nm, Eppendorf AG
Light Cycler Kapillaren	F.Hoffmann-LaRoche AG
Parafilm <sup>®</sup> M	Pechiney Plastic Packaging Inc., Chicago, USA
Petrischalen	Nunclon <sup>™</sup> Surface, Nunc A/S
Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Costar <sup>®</sup> Stripette <sup>®</sup> , Corning Incorporated, Corning, USA
Pipettensitzen versch. Größen	Eppendorf AG
Pipettensitzen versch. Größen	MultiGuard Barrier Tips, Sorenson <sup>™</sup> BioScience, Inc., Salt Lake City, USA

## 2. Materialien und Methoden

Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2 ml	Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG PCR Softtubes 0,5 ml, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Röhrchen 15/50 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Spritzen 1/5/10 ml	Omnifix <sup>®</sup> , B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland BD Plastipak <sup>™</sup> 1 ml, Becton Dickinson SA
Zellsiebe 70 µm	BD Falcon <sup>™</sup> Cell Strainer, Becton Dickinson SA

### 2.1.5. Chemikalien

Tab. 3.: Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung, Hersteller, Stadt, Land
Albumin, bovine	A-7030, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Aqua dest.	Abt. Med. Mikrobiologie, Berlin, Deutschland
β-Mercaptoethanol	1.15433.0100, MerckKGaA, Darmstadt, Deutschland
CuSO <sub>4</sub>	2791, MerckKGaA
DAB (3,3'-Diaminobenzidin) Tablet Sets	D-4293, Sigma-Aldrich Co.
DMEM 1x	Gibco <sup>®</sup> , 31885-023, Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA
+ 1g/L D-Glucose	
+ L-Glutamine	
+ Pyruvate	
Eisessig	1.00063.1000, MerckKGaA
Entellan <sup>®</sup> Neu	1.07961.0100, MerckKGaA
Eosin	1345, MerckKGaA
Ethanol	1.00986.1000, MerckKGaA
FACS-Flow	BD FACSTFlow <sup>™</sup> Sheath Fluid, Becton Dickinson SA
FBS	S 0115, Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Formaldehydlösung min. 37%	1.04003.1000, MerckKGaA
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30% Lsg. in Wasser)	1.08597.1000, MerckKGaA
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Abbott Laboratories, Abbott Park, USA
Iso-Propanol	I0398, Sigma-Aldrich Co.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	1.05099.1000, MerckKGaA
Mayers Hämalaun-Lösung	1.09249.0500, MerckKGaA
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	1.06346.1000, MerckKGaA
NaHCO <sub>3</sub>	K10720529, MerckKGaA
NH <sub>3</sub>	422975, Sigma-Aldrich Co.
PAP, rabbit, polyclonal	ZO113, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	L 182-10, Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	A2213, Biochrom AG
Phloxin B	Fluka, 28550, Sigma-Aldrich Co.
RNAlater <sup>®</sup>	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Roti <sup>®</sup> -Nanoquant	K 880.1, Carl Roth GmbH + Co. KG
RPMI 1640 Medium 1x	Gibco <sup>®</sup> , 72400-021, Invitrogen Corporation

## 2. Materialien und Methoden

---

+ GlutaMAX™I	
+ 25 mM HEPES	
Salzsäure rauchend 37%	1.00317.1000, MerckKGaA
Schwefelsäure 30%, rein	X876.1, Carl Roth GmbH + Co. KG
Stickstoff, flüssig	Abt. Med. Mikrobiologie
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-dihydrochlorid)	T 3405, Sigma-Aldrich Co.
Toluidinblau	1273, MerckKGaA
Tween 20	P1379, Sigma-Aldrich Co.
Xylol reinst	8118, Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, USA
Zitronensäure	C8532, Sigma-Aldrich Co.

### 2.1.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)- und andere Kits

Tab. 4.: ELISA- und andere Kits

Kit	Bezeichnung, Hersteller, Stadt, Land
BD OptEIA™ Mouse IFN- $\gamma$ ELISA Set	BD Biosciences 555138, Becton Dickinson SA
BD OptEIA™ Mouse IL-6 ELISA Set	BD Biosciences 555240, Becton Dickinson SA
RNeasy® Plus Mini Kit	74134, Qiagen N.V.
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	205311, Qiagen N.V.
SuperScript™III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase	12574026 Invitrogen Corporation
ABolute™ QPCR Mix	AB-1132, ABgene Ltd., Epsom, Großbritannien

### 2.1.7. Primer und Proben

#### 2.1.7.1. IL-23p19 und Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)

Alle Primer wurden für die Benutzung im LightCycler® durch die Tib Molbiol GmbH, Berlin, Deutschland hergestellt. Alle cDNA-Sequenzen wurden von der GenBank-Datenbank bezogen.

#### 2.1.7.2. SOCS-1, SOCS-3 und $\beta$ -Actin

Die Primer wurden durch die MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland, hergestellt, die TaqMan-Sonden durch Eurogentec S.A., Seraing, Belgien. Alle cDNA-Sequenzen wurden von der NCBI-Datenbank bezogen.

## 2. Materialien und Methoden

**Tab. 5.:** Primer und Proben für IL-23p19 und HPRT

Primer		Sequenz(5' → 3')	Amplicon-Länge (bp)
IL-23p19	Sense	CCAgCgggACATATgAATCTAC	127
	Antisense	TgCAAgCAgAACTggCTgTT	
	FL-Probe	CCCgTATCCAgTgTgAAgATggTT-FL	
	LC Red640-Probe	LC-TgACCCACAAggACTCAAaggACAA-PH	
HPRT	Sense	gTTggATACAggCCAgACTTTgT	223
	Antisense	CACAggACTAgAACACCTgC	
	FL-Probe	AAAgCCTAAgATgAgCgCAAgTTgA-FL	
	LC Red705-Probe	LC-TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTg-PH	

**Tab. 6.:** Primer und Proben für SOCS-1, SOCS-3 und Actin

Primer		Sequenz(5' → 3')	Amplicon-Länge (bp)
SOCS-1	Forward	CACCTTCTTggTgCgCg	189
	Reverse	CgCCACgTAgTgCTCCAg	
	TaqMan Primer (5'FAM-3'TAMRA markiert)	TCgCCAACggAACTgCTTCTTCg	
SOCS-3	Forward	AgTAgAATCCgCTCTCCTgCAg	136
	Reverse	ACCCACAgCAAgTTTCCCg	
	TaqMan Primer (5'FAM-3'TAMRA markiert)	TTgCgCACggCgTTCACCAC	
$\beta$ -Actin	Forward	CCCTgTgCTgCTCACCgA	186
	Reverse	ACAgtgTgggTgACCCCGTC	
	TaqMan Primer (5'FAM-3'TAMRA markiert)	CCCCTgAACCCCTAAggCCAACCg	

### 2.1.8. Durchflusszytometrie-Antikörper

Tab. 7.: Durchflusszytometrie-Antikörper

Bezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Hamster-anti-mouse CD3e PerCP	BD Biosciences Pharmingen™, Becton Dickinson SA
Rat-anti-mouse CD4 FITC	BD Biosciences Pharmingen™, Becton Dickinson SA
Rat-anti-mouse CD8a APC	BD Biosciences Pharmingen™, Becton Dickinson SA
Rat-anti-mouse CD11b FITC	BD Biosciences Pharmingen™, Becton Dickinson SA
Hamster-anti-mouse CD11c PE	BD Biosciences Pharmingen™, Becton Dickinson SA

### 2.1.9. Immunhistologie

Tab. 8.: Immunhistologie

Bezeichnung	Hersteller, Stadt, Land
Schweineserum (normal)	X0901, Dako Denmark A/S
Schwein anti-Kaninchenimmunglobuline (Sekundärantikörper)	Z0196, Dako Denmark A/S
Kaninchenserum (Primärantikörper)	AG Liesenfeld, Charité

Ein Chinchilla Bastard Kaninchen wurde mit 20 Zysten *T. gondii* in 0,4 ml i.p. infiziert und zweieinhalb Monate später mit  $3 \times 10^5$  Parasiten (*T. gondii*, Stamm BK, Prof. Janitschke, RKI, Berlin) reinfiziert. Das Blut wurde aus einer Ohrvene entnommen und das Serum abzentrifugiert. Das Hyperimmunserum wurde je nach Proteingehalt (bestimmt durch Bradford-Assay) in Verdünnungen von 1:70 bis 1:250 verwendet.

### 2.1.10. Puffer und Lösungen

#### ELISA:

##### Coating Puffer:

0,1 M NaHCO<sub>3</sub> in PBS

M = 84,01 g/mol  $\Rightarrow$  0,8401 g in 100 ml PBS gelöst

##### Gebrauchspuffer:

PBS-Pulver in 10 l Aqua Tridest gelöst

##### Blockingpuffer:

10% FBS in PBS, evtl. mit 0,02% NaN<sub>3</sub> konserviert

## 2. Materialien und Methoden

---

### Waschpuffer:

0,05 Tween/PBS (1 ml Tween 20 in 2 l PBS gelöst)

### Substratpuffer:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M

Zitronensäure 0,1M

in Aqua dest.

⇒ für 500 ml: 128,5 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
121,5 ml Zitronensäure  
250 ml Aqua dest.

### Streptavidin-Peroxidase:

1:250 verdünnt in 10% FBS

### TMB-Substrat-Lösung:

Eine TMB-Tablette wurde in 10 ml Substratpuffer gelöst,  
kurz vor dem Auftragen wurden 2 µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugegeben

### Stopplösung:

2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Aqua dest. gelöst

### *Histologie:*

#### Formaldehyd-Lösung 5%ig:

Formaldehyd-Stammlösung (37%ig) 1:20 mit Aqua dest. verdünnt

#### Eosin:

1 g Eosin

3 Tropfen Eisessig

ad 100 ml Aqua dest.

#### HCl-Akohol:

720 ml Ethanol

20 ml HCl 37%

#### PBS-Stammlösung (25-fach):

150,4 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O

26 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

800 ml Aqua dest.

#### PBS-Gebrauchslösung:

40 ml PBS-25-fache-Stammlösung

960 ml Aqua dest.

#### Schweineserum:

1800 µl PBS-Gebrauchslösung

200 µl Schweineserum

## 2. Materialien und Methoden

---

### Primärantikörper:

1999  $\mu$ l PBS-Gebrauchslösung  
1  $\mu$ l Primärantikörper

### Sekundärantikörper:

1980  $\mu$ l PBS-Gebrauchslösung  
20  $\mu$ l Sekundärantikörper

### PAP-Komplex:

1980  $\mu$ l PBS-Gebrauchslösung  
20  $\mu$ l PAP, rabbit, polyclonal

### DAB-Lösung:

1 DAB-Tablette in 5 ml PBS gelöst, abgedunkelt gelagert

### DAB-Arbeitslösung:

5 ml DAB-Lösung  
5  $\mu$ l 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung:

20 ml 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
180 ml Aqua dest.

### 0,5% CuSO<sub>4</sub>-Lösung:

100 ml Aqua dest.  
0,5 g CuSO<sub>4</sub>

### 1% Ammoniak-Lösung:

100 ml Aqua dest.  
1 ml Ammoniak

### *PCR:*

#### RLT-Puffer Plus:

2 ml RLT-Puffer Plus  
20  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol

#### DNA-Eliminierung/Master Mix/PCR-Reaktionen:

**Tab. 9.:** DNA-Eliminierung

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
gDNA-Wipeout-Puffer, 7x	2 $\mu$ l	1x
RNA	500 pg	
RNase-freies Wasser	11,5 $\mu$ l	
Gesamtvolumen	14 $\mu$ l	

## 2. Materialien und Methoden

**Tab. 10.:** RT-Master Mix

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
RT-Master Mix:		
Quantiscript Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l	1x
Quantiscript RT-Puffer, 5x	4 $\mu$ l	
RT-Primer Mix	1 $\mu$ l	
RNA-Vorlage:		
DNA-Eliminierungsreaktion	14 $\mu$ l (im nächsten Schritt hinzugefügt)	
Gesamtvolumen	20 $\mu$ l	

**Tab. 11.:** PCR-Reaktion für IL-23p19

Komponente	Menge/Reaktion
RNA-Probe	1 $\mu$ l
MgSO <sub>4</sub>	3,5 mM
BSA	5%
Primer	0,5 $\mu$ M
Proben	0,15 $\mu$ M
SuperScript <sup>TM</sup> III RT/Platinum <sup>®</sup> Taq-Mix	4%
Reaction Mix	2x
Gesamtvolumen	10 $\mu$ l

**Tab. 12.:** PCR-Reaktion für SOCS-1 und SOCS-3

Komponente	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
ABsolute <sup>TM</sup> QPCR-Mix (2x)	12,5 $\mu$ l	1x
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	400 nM
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	400 nM
Probe	variabel	100-250 nM
Wasser	variabel	
Vorlage (cDNA)	1-5 $\mu$ l	< 250 ng/Reaktion
Gesamtvolumen	25 $\mu$ l	

### FACS:

#### FACS-Fix:

3,7% Formaldehydlösung:

Formaldehyd-Stammlösung (37%ig) 1:10 mit Aqua dest. verdünnt

#### FACS-Wash:

5% FBS in PBS

#### Lysepuffer für Erythrozyten:

RPMI 1:2 mit Aqua dest. verdünnt

#### Trypanblau 0,5%:

Trypanblau 0,5% in 0,9% NaCl

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Orale Infektion der Mäuse mit *T. gondii*

Die orale Infektion der Mäuse erfolgte mit 100 Zysten *T. gondii* (ME49-Stamm), die aus Gehirnen infizierter NMRI-Mäuse gewonnen wurden. Die NMRI-Mäuse waren 2-3 Monate vorher mit 10 Zysten i.p. infiziert worden. Ein Gehirn wurde in 1 ml PBS in einem Mörser zerrieben, in ein 15-ml-Röhrchen überführt und nach Homogenisierung durch eine 30-G-Kanüle auf Eis gelagert. Die Anzahl der Zysten wurde in 20  $\mu$ l Gehirnsuspension unter dem Mikroskop bestimmt. Die Suspension wurde auf die erforderliche Zystenkonzentration eingestellt und den Mäusen in einem Volumen von jeweils 0,3 ml mit Hilfe einer gebogenen Knopfkanüle oral verabreicht.

Die Tiere wurden an Tag 3 post infectionem und danach an den Tagen 5, 6 und 7 gewogen.

### 2.2.2. Organentnahme

Die Mäuse wurden am 7. Tag post infectionem durch Isofluran-Inhalation in tiefe Narkose versetzt. Anschließend wurde die Blutentnahme mittels Herzpunktion zur Gewinnung von Serum durchgeführt. Das entnommene Blut wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Die Hälfte der Milz, die mesenterialen Lymphknoten (MLN) sowie ein Leberlappen wurden sodann in jeweils eine mit 400  $\mu$ l/well DMEM-Medium + 1% P/S gefüllte 24-well-Platte gelegt und auf Eis gelagert. Danach wurde der gesamte Dünndarm entnommen, vom distalen Darmabschnitt 3 x 1 cm abgetrennt und wie folgt weiterverarbeitet: ein 1-cm-Abschnitt wurde in ein präperforiertes Cryotube gefüllt und sofort zur späteren RNA-Extraktion in flüssigem Stickstoff

schockgefroren. Der nächste cm-Abschnitt wurde zur späteren RNA-Extraktion (Reserve) in ein mit RNAlater<sup>®</sup> gefülltes Reaktionsgefäß überführt. Der proximale Abschnitt wurde wie die übrigen entnommenen Organe zur späteren Organkultur in 400 µl DMEM-Medium + 1% P/S gelegt und auf Eis gelagert. Der gesamte restliche Dünndarm wurde daraufhin zur histologischen und immunhistologischen Weiterverarbeitung in 5%iger Formaldehyd-Lösung fixiert. Der Darmabschnitt wurde dazu mit dem proximalen Ende nach außen in der Histologiekassette zu einer sog. „Schweizer Rolle“ aufgerollt.

### 2.2.3. Histologische Methoden

Die Organe wurden nach Entfernung des Formaldehyds im Institut für Pathologie der Charité am CBF in Paraffin eingebettet, in 5 µm dünne Schichten geschnitten und über Nacht bei 37°C auf Objektträgern fixiert. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin (HE) bzw. mit der Immunoperoxidasefärbung gefärbt.

#### 2.2.3.1. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin

Die Objektträger wurden für die angegebene Zeit in Glasküvetten in folgende Lösungen getaucht:

Tab. 13.: HE-Färbung

Substanz	Dauer												
2 x Xylol	je 5 min												
<table style="border: none;"> <tr> <td style="border: none;"> <table style="border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Iso-Propanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">96%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">80%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">70%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Aqua dest.</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> </table> </td> <td style="border: none;">bis keine Schlieren zu sehen waren</td> </tr> </table>	<table style="border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Iso-Propanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">96%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">80%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">70%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Aqua dest.</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> </table>	Iso-Propanol	}	96%-Ethanol	}	80%-Ethanol	}	70%-Ethanol	}	Aqua dest.	}	bis keine Schlieren zu sehen waren	
<table style="border: none;"> <tr> <td style="border: none;">Iso-Propanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">96%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">80%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">70%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Aqua dest.</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> </table>	Iso-Propanol	}	96%-Ethanol	}	80%-Ethanol	}	70%-Ethanol	}	Aqua dest.	}	bis keine Schlieren zu sehen waren		
Iso-Propanol	}												
96%-Ethanol	}												
80%-Ethanol	}												
70%-Ethanol	}												
Aqua dest.	}												
Hämalaun	5 min												
Spülen in Aqua dest.													
kurz 1% HCl-Alkohol													
Spülen und Bläuen in Leitungswasser	5 min												
Eosin (Inkubationszeit je nach Frische des Eosins)	30 s-1 min												
Spülen in Aqua dest.													
<table style="border: none;"> <tr> <td style="border: none;">70%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">80%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">96%-Ethanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> <tr> <td style="border: none;">Iso-Propanol</td> <td style="border: none;">}</td> </tr> </table>	70%-Ethanol	}	80%-Ethanol	}	96%-Ethanol	}	Iso-Propanol	}	bis keine Schlieren zu sehen waren				
70%-Ethanol	}												
80%-Ethanol	}												
96%-Ethanol	}												
Iso-Propanol	}												
2 x Xylol	je 5 min												

Danach wurden die Schnitte mit Entellan und Deckgläsern eingedeckt.

### 2.2.3.2. Immunoperoxidasefärbung am Paraffinschnitt

Diese Färbung diente dem histologischen Nachweis von *T. gondii* in Gewebeschnitten. Es wurde immer ein positiver Kontrollschnitt (Darmrolle einer mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten C57BL/6-Maus) mitgeführt. Antikörper, Serum und Reagenzien wurden in PBS-Gebrauchslösung verdünnt.

Entparaffinieren der Schnitte:

**Tab. 14.:** Entparaffinieren für die Immunoperoxidasefärbung

Substanz	Dauer
2 x Xylol	je 5 min
Isopropanol	bis keine Schlieren zu sehen waren
abs. Ethanol	
80% Ethanol	
70% Ethanol	
Aqua dest.	

Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität im Gewebe wurden die Schnitte in einer Küvette in einer 3%igen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung für 20 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte mehrfach mit Aqua dest. und 2 x mit PBS gespült. Die Schnitte wurden aus der Spüllösung genommen, vorsichtig um den Schnitt herum abgewischt und auf die Objektträgerbank gelegt. Dann wurden 100 µl Schweineserum mit einer Pipette auf jeden der liegenden Schnitte aufgetragen und vorsichtig auf ihnen verteilt, sodass die Schnitte vollständig bedeckt waren. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das Serum abgekippt und 100 µl pro Schnitt des polyklonalen Primärantikörpers gegen *T. gondii* mit der Pipette auf die Schnitte aufgetragen. Die Schnitte inkubierten daraufhin über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte 2 x für 5 min mit PBS abgespült und sodann 100 µl pro Schnitt des Sekundärantikörpers mit der Pipette auf die Schnitte aufgetragen. Danach wurden die Schnitte für 30 min abgedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Spülschritt (2 x für 5 min mit PBS) wurden je 100 µl des PAP-Komplexes auf die Schnitte aufgetragen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Schnitte wurden erneut 2 x für 5 min in PBS gespült, sodann wurden je 4-5 Tropfen der DAB-Arbeitslösung mit einer 5-ml-Spritze und Rundfliter auf die Schnitte aufgebracht und für 5 min inkubiert. Die Objektträger wurden sodann 2 x in Aqua dest. gespült, bevor sie in einer Küvette für 5-7 min in CuSO<sub>4</sub>-Lösung inkubiert wurden. Anschließend erfolgte 2 x Spülung in Aqua dest.

## 2. Materialien und Methoden

Gegenfärben:

**Tab. 15.:** Gegenfärben der Immunperoxidasefärbung

Substanz	Dauer
Hämatoxylin	5 s
2 x Spülen in Aqua dest.	
1%ige Ammoniaklösung	15 s
2 x Spülen in Aqua dest.	
70%-Ethanol	bis keine Schlieren zu sehen waren
80%-Ethanol	
96%-Ethanol	
Iso-Propanol	
2 x Xylol	je 5 min

Danach wurden die histologischen Schnitte mit Entellan eingedeckt.

### 2.2.3.3. Auswertung der histologischen Schnitte und Dokumentation

In den HE-gefärbten Schnitten des Darms wurde bei 200-facher Vergrößerung die Schwere der pathologischen Veränderungen mittels eines histologischen Scores [148] beurteilt:

**Tab. 16.:** Histo-Score

Histologische Kriterien	Score
1. Normalbefund: Lamina propria liegt direkt an Epithel an, kein Ödem, Zotten intakt 2. Darminhalt aus fibrillären Komponenten, keine Zellen, kein Transsudat	0
1. Ödematöse Schwellung zwischen Lamina propria und Epithel, Zotten intakt 2. keine Zellen im Darmlumen, kein Transsudat	1
1. Transsudat im Darmlumen, aber Zotten intakt, Ödem vorhanden (kein Muss) 2. Darminhalt vorwiegend flüssig, kaum oder keine Zellen	2
wie 2, aber Darminhalt aus Transsudat und vorwiegend zellulärem Material (v.a. abgeschilferte Epithelzellen)	3
wie 3, massenhaft zelluläres Material im Lumen, dazu beginnende Nekrosen, d.h. das Epithel wird vor allem an der Spitze der Zotten abgeschilfert	4
Nekrosen deutlich ausgeprägt, v.a. distal, makroskopisch rot-violett gefärbtes Darmlumen, aber nicht über das gesamte Ileum verbreitet	5
Komplette Nekrose des Ileums, auch distal	6

In Darmschnitten, die mit der Immunperoxidase-Färbung gefärbt wurden, wurden die *T. gondii*-Vakuolen jeweils in einem zufällig ausgewählten 1 cm langen Stück distal und proximal bei

200-facher Vergrößerung gezählt. Repräsentative Ausschnitte der histologischen Schnitte wurden bei der jeweiligen Vergrößerung digital fotografiert.

### 2.2.4. ELISA & Proteinbestimmung

#### 2.2.4.1. Zytokin-ELISA

Die Zytokinkonzentrationen in Serum und Organkulturüberständen wurden nach 24-stündiger Inkubation der Organe in DMEM-Medium + 1% P/S mit den BD OptEIA™ ELISA Sets entsprechend den Hinweisen des Herstellers bestimmt. Sämtliche Organkulturüberstände wurden in 10%igem FBS wie folgt verdünnt: zur Bestimmung von IFN- $\gamma$  wurden die Organkulturüberstände aller naiven Tiere 1:2 und bei den infizierten Tieren die Milz 1:50, das Ileum 1:20 verdünnt. Zur Bestimmung von IL-6 wurden die Organkulturüberstände der naiven Tiere 1:5, Milz und Ileum der infizierten Tiere jeweils 1:10 verdünnt. Zuerst wurden Mikrotiterplatten mit je 50  $\mu$ l des entsprechenden Antikörpers beschichtet (Coating) und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Platten mit Waschpuffer zweimal gespült, mit 200  $\mu$ l/well Blockingpuffer beschickt und 60-90 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Platten wurden je 50  $\mu$ l/well der Proben und der Standards (1:2-Verdünnungsreihe mit 8 Verdünnungsstufen) sowie ein Leerwert aufgetragen, wonach 4h bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert wurde. Nachdem die Platten viermal gewaschen wurden, wurde der biotinylierte Antikörper gemeinsam mit der Streptavidin-Peroxidase-Lösung zu je 50  $\mu$ l/well aufgetragen und für 45 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Daraufhin wurde fünfmal gewaschen, 75  $\mu$ l/well der TMB-Lösung aufgetragen und für 15-30 min abgedunkelt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde mit 50  $\mu$ l/well 2M H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub> gestoppt und die Extinktion bei 450 nm im Tecan-ELISA-Reader gemessen und mit der Software (Serion evaluate, Median Software + Konzepte GmbH, Bonn, Deutschland) ausgewertet.

Mit dem Programm Microsoft Excel<sup>®</sup> (Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurde anhand der Extinktionen der Standards bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt, mit der die Zytokinkonzentrationen der Proben errechnet wurden. Die errechneten Zytokinonzentrationen der verdünnten Proben wurden sodann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und durch die jeweilige gemessene Proteinkonzentration (s. 2.2.4.2) der Probe dividiert, sodass die Angabe in ng Zytokin/mg Gesamtprotein der Probe erfolgt.

### 2.2.4.2. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurden jeweils 20  $\mu$ l/well der Proben, des Standards (Standard aus bovinem Albumin, verdünnt in PBS auf 1 mg/ml, sodann 1:2-Verdünnungsreihe mit 8 Verdünnungsstufen) sowie ein Leerwert auf eine 96-well-Platte aufgetragen. Danach wurden jedem well 80  $\mu$ l Roti-Nanoquant in 1:5-Verdünnung in PBS zugegeben. Nach Mischen des Ansatzes erfolgte die photometrische Messung innerhalb von 5-30 min im Tecan-ELISA-Reader bei 595 nm und 450 nm.

Aus den gemessenen Extinktionen wurde der Quotient gebildet. Sodann wurde mit dem Programm Microsoft Excel<sup>®</sup> anhand der Quotienten der Extinktionen der Standards bekannter Konzentration eine Standardkurve erstellt, mit der die Proteinkonzentrationen der Proben errechnet wurden.

### 2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zum Nachweis von SOCS-1, SOCS-3 und IL-23p19

Zur Quantifizierung der Expression von IL-23p19 aus Gewebeproben wurde nach der RNA-Extraktion eine One-Step Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt.

Da Exon-umspannende Primer sowohl für das IL-23p19-Gen als auch für das Housekeeping-Gen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) genutzt werden konnten, war eine besondere Aufreinigung der RNA nicht notwendig.

SOCS-1 und SOCS-3 wurden per RNA-Extraktion und nachfolgender Two-Step RT-PCR im Universitätsklinikum Heidelberg durch die AG Dalpke nachgewiesen. Da weder der für SOCS-1 noch der für SOCS-3 kodierende Genomabschnitt Introns besitzt, konnten keine Exon-umspannende Primer verwendet werden. Daher musste eine vollständige DNA-Eliminierung mit anschließender Umschreibung der verbliebenen RNA in cDNA erfolgen (RT). Als Housekeeping-Gen wurde murines  $\beta$ -Actin eingesetzt.

#### 2.2.5.1. RNA-Extraktion

Die RNA wurde mit dem RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini Kit extrahiert und aufgereinigt. Hierzu wurden die Gewebeproben auf maximal 30 mg gefrorenem bzw. 20 mg RNAlater<sup>®</sup>-stabilisiertem Material abgewogen. Danach wurde zur Zelllyse der im Kit enthaltene RLT-Puffer Plus kurz vor Gebrauch

mit 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt. Das Organmaterial wurde in einem 2-ml-Reaktionsgefäß mit 450  $\mu$ l RLT-Puffer Plus versetzt und 20-45 s im Rotor-Stator homogenisiert.

Für die RNA-Extraktion zur anschließenden Bestimmung von SOCS-1 und SOCS-3 wurde das Lysat dann für 3 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und vorsichtig der Überstand abpipettiert. Die im Kit enthaltene gDNA Spin-Säule (zur Bindung von genomischer DNA) wurde in einem 2 ml Collection-Tube platziert und der abpipettierte Überstand auf die Säule übertragen. Dann wurde für 30 s bei 12.000 rpm zentrifugiert und sodann die Säule verworfen, der Durchfluss aufgehoben.

Um die Bindungseigenschaften der RNA zu verbessern, wurden dem Überstand danach 350  $\mu$ l 70%iger Ethanol zugegeben und gemischt. Die RNeasy<sup>®</sup> Mini-Säule wurde in ein 2-ml-Collection-Tube platziert, und die 800  $\mu$ l mit Ethanol versetztes Homogenisat wurden auf die Säule gegeben, um die RNA an die mit Silicagel beschichtete Säule zu binden. Danach wurde für 15 s bei 12.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen.

Die nun an die Säule gebundene RNA wurde durch Auftragen von 700  $\mu$ l RW1-Puffer und Zentrifugieren für 15 s bei 12.000 rpm gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und danach im zweiten Waschschrift 500  $\mu$ l RPE-Puffer auf die Säule pipettiert und für weitere 15 s bei 12.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und der Waschschrift für 2 min bei 12.000 rpm wiederholt.

Nun wurden die Säulen auf ein neues 2-ml-Collection-Tube gegeben und für 1 min bei maximaler Drehzahl trocken zentrifugiert. Die Säulen wurden dann auf ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß zur Elution gegeben und mit 60  $\mu$ l RNase-freiem Wasser eluiert. Es wurde 1 min gewartet und sodann für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert.

Hierauf erfolgte die photometrische Konzentrationsmessung der isolierten RNA bei 260 nm gegen 280 nm.

### 2.2.5.2. Reverse Transkription (RT)

Zur Reversen Transkription mit Eliminierung von genomischer DNA wurde das QuantiTect<sup>®</sup> Reverse Transcription Kit verwendet. Es wurden von jeder Probe 500 pg RNA eingesetzt. Grundsätzlich wurden alle Reaktionen auf Eis durchgeführt.

Im ersten Schritt wurde die RNA auf Eis sowie der gDNA Wipeout-Puffer, die Quantiscript RT, der Quantiscript RT-Puffer, der RT Primer Mix und das RNase-freie Wasser bei Raumtemperatur aufgetaut. Jede Lösung wurde gemischt und kurz zentrifugiert. Danach wurden die

Reaktionsgefäße kurz gevortext, zentrifugiert, für 2 min bei 42°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert.

Sodann wurde auf Eis der RT-Master Mix wie in Tab. 10 beschrieben vorbereitet. In jedes Reaktionsgefäß mit 14 µl RNA-Vorlage wurden 6 µl RT-Master Mix gegeben. Dann wurde gevortext, zentrifugiert und auf Eis gelagert. Daraufhin wurden die Reaktionsgefäße im Thermocycler erst für 15 min bei 42°C inkubiert, um die reverse Transkription zu starten, und dann für 3 min bei 95°C inkubiert, um die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Die cDNA wurde daraufhin bei -20°C gelagert.

### 2.2.5.3. Real-Time-quantitative (RTQ)-PCR

Zur Quantifizierung der Expression von IL-23p19 wurde das SuperScript<sup>TM</sup>III One-Step RT-PCR System with Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase verwendet. Jede PCR-Reaktion wurde in Glaskapillaren durchgeführt, die jeweils die in Tab. 11 genannten Substanzen enthielten. Die Reaktion für IL-23p19 und HPRT wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 1 Zyklus bei 60°C für 30 min (RT),
2. 1 Zyklus bei 95°C für 2 min (Inaktivierung der RT),
3. 45 Zyklen bei jeweils  
95°C für 5 s (Denaturierung),  
58°C für 7 s (Primerhybridisierung),  
72°C für 5 s bzw. 10 s bei HPRT (Elongation)

mit einem einzigen Fluoreszenz-Detektionspunkt am Ende jedes Zyklus'.

Aqua dest. wurde als Negativkontrolle in jeder PCR mitgeführt, als Kalibrator wurde RNA benutzt, die aus dem Ileum von mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten Mäusen gewonnen wurde.

Zur Quantifizierung der Expression von SOCS-mRNA wurde der ABsolute<sup>TM</sup>QPCR Mix verwendet. Jede PCR-Reaktion wurde ebenfalls in Glaskapillaren durchgeführt, die jeweils die in Tab. 12 genannten Substanzen enthielten. Die Reaktion für SOCS-1, SOCS-3 und  $\beta$ -Actin wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

1. 1 Zyklus bei 95°C für 15 min (Enzymaktivierung),
2. 40 Zyklen bei jeweils  
95°C für 15 s (Denaturierung),  
60°C für 60 s (Primerhybridisierung/Elongation)

mit einem einzigen Fluoreszenz-Detektionspunkt am Ende jedes Zyklus'.

Die Spezifität der RT-PCR wurde durch no-template-Kontrollen (Kontrollen ohne cDNA-Vorlage) und no-RT-Kontrollen (Kontrollen, bei denen keine RT durchgeführt worden war) überprüft.

### *Real-time quantitative PCR Datenanalyse*

Die Fluoreszenz wurde mit der LightCycler<sup>®</sup> Data Analysis software 3.5 (F.Hoffmann-LaRoche AG) analysiert. Die „Crossing points“ (Cp) wurden mit der 2. Ableitung erstellt, auf gleiche Weise wurde die Expression der Zielgene auf die Expression der internen Standards bezogen. Die relative Quantifizierung analysiert die Menge eines Zieltranskripts relativ zu einem internen Standard (ein Housekeeping-Gen) im gleichen Probensample. Zudem wurden die Proben durch einen in jedem Lauf mitgeführten Kalibrator normalisiert, der das Resultat der PCR bei unterschiedlichen Detektionssensitivitäten korrigierte.

Die Ergebnisse wurden als Zielgen/interner Standard-Konzentrationsverhältnis der Probe, geteilt durch Zielgen/interner Standard-Konzentrationsverhältnis des Kalibrators angegeben. Da Zielgen und interner Standard verschiedene Sequenzen und verschiedene Amplicon-Längen hatten, war es wahrscheinlich, dass sie unterschiedliche PCR-Effizienzen haben würden. Die PCR-Effizienz wurde zuerst für jedes Primer-Paar bestimmt. Um dies zu erreichen, wurden fünf verschiedene Verdünnungen der Kalibrator-RNA als Quadruplikat quantifiziert. Die Expression von Cp versus dem *log* der Konzentration erlaubte es, eine Kalibrationskurve durch lineare Regression zu erstellen. Die PCR-Effizienz entsprach  $10^{-1/Steigung}$ . Diese Effizienzen wurden bei der relativen Quantifizierung berücksichtigt, die mit der RelQuant software (F.Hoffmann-LaRoche AG) durchgeführt wurde.

## **2.2.6. Durchflusszytometrie**

### **2.2.6.1. Isolierung von Zellen aus Milz und MLN**

Zur Analyse der Zellpopulationen wurden Zellen aus Milz und MLN isoliert und mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Um der Autolyse entgegenzuwirken wurden die Organe bis zur Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert. Die Organe wurden in ein Zellsieb überführt, mit einer Schere und einem Spritzenstempel zerkleinert und mit 10 ml RPMI/5% FBS/0,5% P/S (Medium) gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit Medium auf 45 ml aufgefüllt und bei 300 *g* für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 5 ml Lysepuffer aufgenommen und die Erythrozyten durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren nach ca. 1 min lysiert. Nach erneutem Auffüllen auf 45 ml wurde die Suspension bei 300 *g* für 10 min bei 4°C zentrifugiert und die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen. Die Zahl lebender Zellen

wurde durch Ausschlussfärbung mit Trypanblau (Verdünnung in Medium: 1:20) in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

### 2.2.6.2. Durchflusszytometrie

Zur Detektion von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen nach der beschriebenen Isolierung (siehe 2.2.6.1) gezählt und in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Die einzelnen Proben wurden mit  $100 \mu\text{l}$  FACS-Wash versetzt, bei  $300 g$  für  $10 \text{ min}$  bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert und mit einem anti-Fc $\gamma$ -Antikörper  $10 \text{ min}$  auf Eis inkubiert, um unspezifische Fc-Rezeptoren zu blockieren. Anschließend wurden die mit Fluorochrom markierten Antikörper für die entsprechenden Oberflächenantigene hinzugefügt. Nach einer Inkubation von  $20 \text{ min}$  wurden die Proben mit  $100 \mu\text{l}$  FACS-Wash versetzt, wie beschrieben zentrifugiert, dekantiert und entweder wieder in  $150 \mu\text{l}$  FACS-Wash aufgenommen und umgehend im Durchflusszytometer analysiert oder mit  $150 \text{ ml}$  FACS-Fix unter Lichtschutz  $20 \text{ min}$  fixiert und bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln bis zur Messung maximal eine Woche gelagert. Entsprechende Isotypkontrollen wurden für alle Färbungen in gleicher Weise mitgeführt.

Verdünnungen:

anti-Fc $\gamma$ -Antikörper:	$0,1 \mu\text{g}/100.000 \text{ Zellen}$
Fluorochrom-markierte Antikörper/Isotypen:	$0,1 \mu\text{g}/100.000 \text{ Zellen}$

Sämtliche Verdünnungen wurden in FACS-Wash vorgenommen.

### 2.2.7. Statistische Analyse

Für alle statistischen Auswertungen wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  festgelegt. Bei Durchführung eines statistischen Tests mit signifikantem Ergebnis ist das Wahrscheinlichkeitsmaß der Nullhypothese  $p$  angegeben. Da bei den ELISA-Messergebnissen der IL-6- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde die statistische Auswertung mit dem zweiseitigen Mann-Whitney-U-Test mit dem Programm statistiXL (Add-in für Microsoft Excel<sup>®</sup>) durchgeführt. Bei allen anderen Ergebnissen konnte von einer Normalverteilung der gemessenen Daten ausgegangen werden, weshalb der zweiseitige Student's  $t$ -Test für ungepaarte Stichproben mit der Software Microsoft Excel<sup>®</sup> durchgeführt wurde.

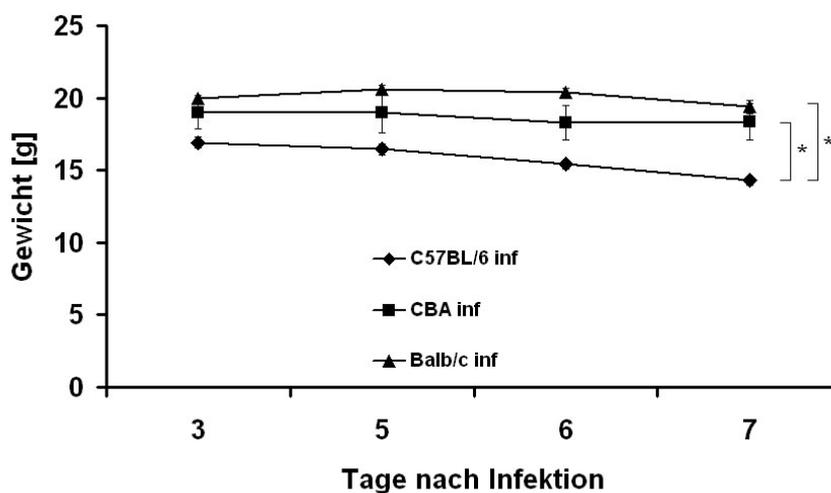
### 3. Ergebnisse

Um die Rolle von SOCS-1 und SOCS-3 bei der *T.gondii*-vermittelten Immunpathologie des Darms in Abhängigkeit von Suszeptibilität bzw. Resistenz gegenüber der Infektion zu klären, wurden C57BL/6-, Balb/c- und CBA/ca-Mäuse mit 100 Zysten *T. gondii* oral infiziert und der Verlauf der Infektion mit naiven Mäusen des gleichen genetischen Hintergrundes verglichen. Während C57BL/6-Mäuse suszeptibel gegenüber der Infektion sind, sind CBA/ca- und Balb/c-Mäuse resistent gegenüber einer Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* [6–10].

#### 3.1. Morbidität, Histologie und Parasitenlast nach oraler Infektion mit *T. gondii*

##### 3.1.1. Morbidität

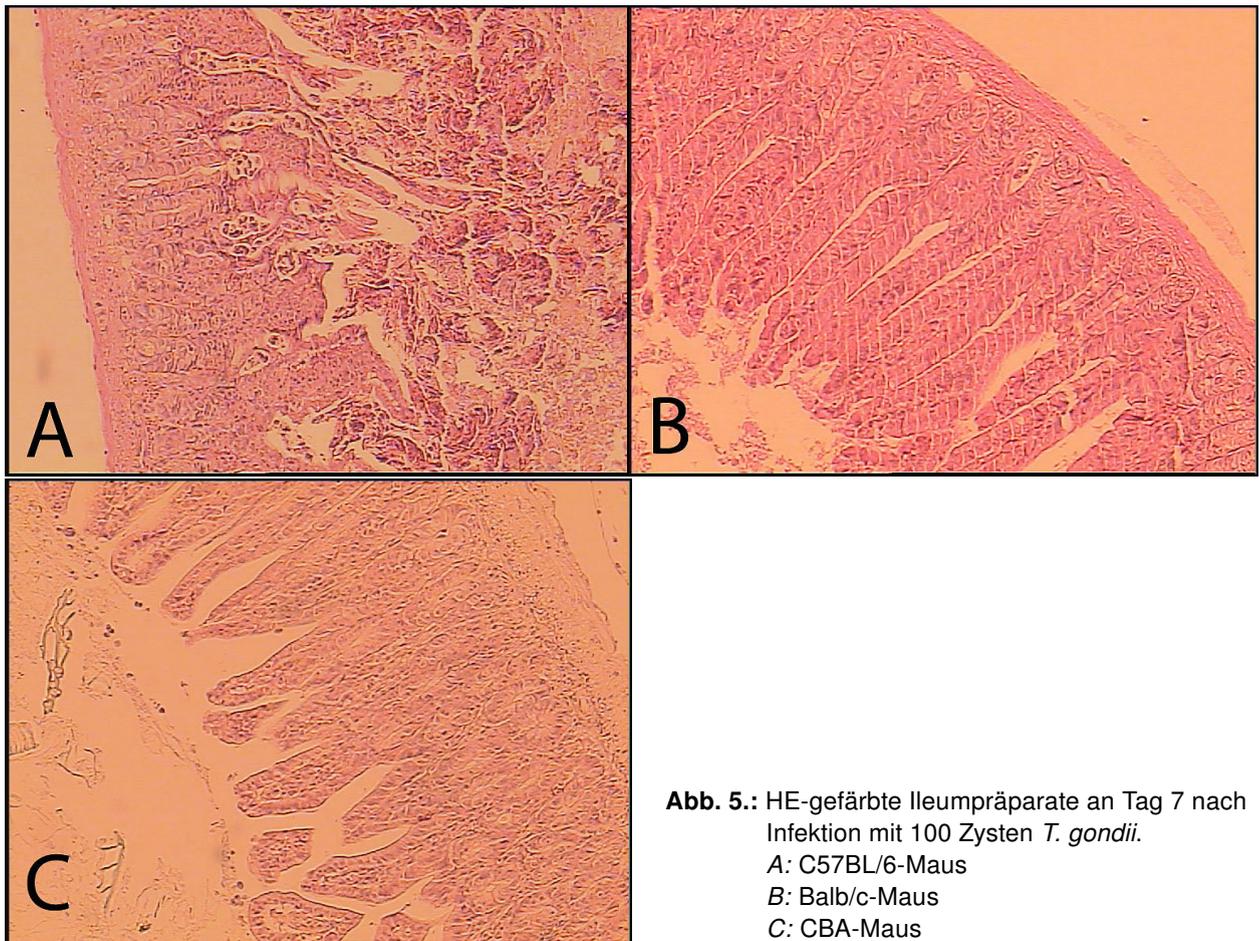
Es wurde initial untersucht, welche klinischen Auswirkungen die Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* auf die Mäuse der verschiedenen Mausstämme hat. Als Parameter für die Schwere der Erkrankung wurde hierbei das Gewicht an den Tagen 3, 5, 6 und 7 nach der Infektion herangezogen. Die C57BL/6-Mäuse zeigten einen signifikant höheren Gewichtsverlust als die resistenten CBA/ca- bzw. Balb/c-Mäuse im Laufe der Erkrankung ( $p < 0,05$ ). Der mittlere Gewichtsverlust von Tag 3 bis Tag 7 post infectionem betrug bei den C57BL/6-Mäusen 16,75%, bei den CBA/ca-Mäusen 3,22% und bei den Balb/c-Mäusen 2,85% (Abb. 4).



**Abb. 4.:** Gewichtsverlauf der C57BL/6-, Balb/c- sowie der CBA/ca-Mäuse von d3 bis d7 post infectionem. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus einem von vier durchgeführten Versuchen (n=9). \*  $p < 0,05$

#### 3.1.2. Histologische Veränderungen im Ileum

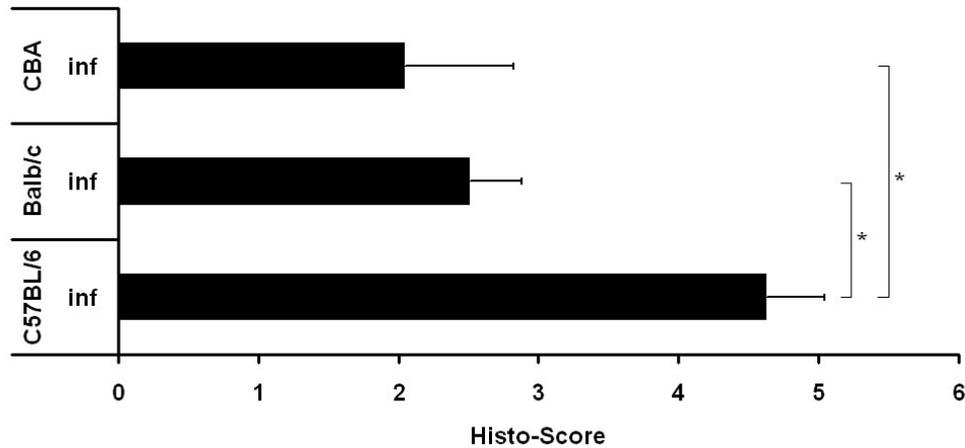
Abb. 5 zeigt repräsentative Ausschnitte des Ileums der oben genannten infizierten Mausstämme. Die C57BL/6-Mäuse zeigten ausgeprägte nekrotische Bereiche im Ileum mit zerstörten Zotten und Zelldetritus im Darmlumen (Abb. 5A), während Balb/c-Mäuse lediglich Transsudate ohne Zellen (Abb. 5B) und CBA/ca-Mäuse lediglich Ödeme zwischen Epithel und Lamina propria aufwiesen (Abb. 5C). Die Balb/c-Mäuse zeigten im Vergleich zu den CBA/ca-Mäusen keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Schwere der pathologischen Veränderungen im Ileum.



**Abb. 5.:** HE-gefärbte Ileumpräparate an Tag 7 nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*.  
A: C57BL/6-Maus  
B: Balb/c-Maus  
C: CBA-Maus

Abb. 6 zeigt die Ausprägung der pathologischen Veränderungen der drei Mausstämme im Vergleich, beurteilt anhand eines standardisierten Histo-Scores [148]. Die C57BL/6-Mäuse hatten einen signifikant höheren Histo-Score als die Balb/c- bzw. die CBA/ca-Mäuse ( $p < 0,05$ ). Zwischen den Histo-Scores der Balb/c- und der CBA/ca-Mäuse bestand kein signifikanter Unterschied.

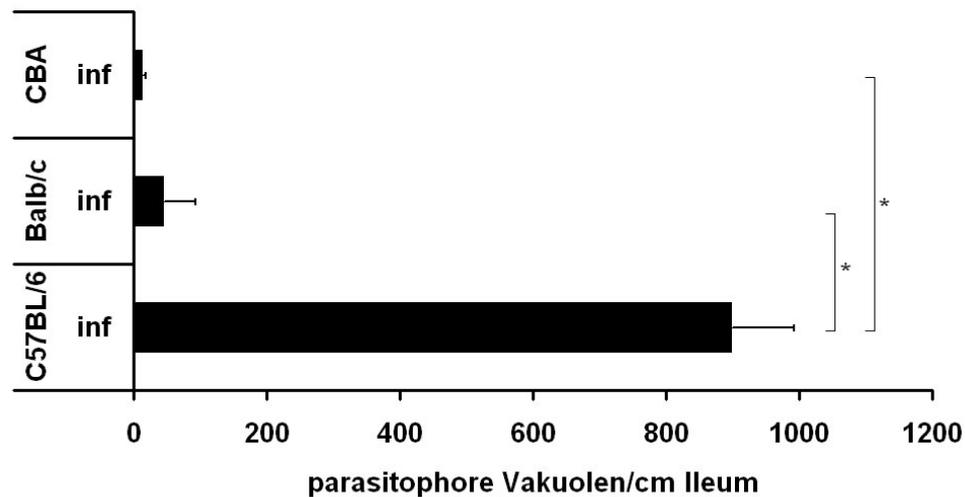
### 3. Ergebnisse



**Abb. 6.:** Histologischer Score der Darmpathologie. Histologische Beurteilung von jeweils 1 cm distalem Ileum anhand eines standardisierten Histo-Scores. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier durchgeführten Versuchen (n=8). \*  $p < 0,05$

#### 3.1.3. Parasitenlast

Neben der HE-Färbung der Darmschnitte wurde auch eine Immunoperoxidase-Färbung durchgeführt, um Parasiten im Darmgewebe sichtbar zu machen. *T. gondii* fand sich innerhalb des Ileums infizierter Mäuse bevorzugt im distalen Bereich des Ileums, v.a. in fokalen Arealen. Die C57BL/6-Mäuse wiesen im distalen Bereich des Ileums im Vergleich zu den Balb/c- sowie den CBA/ca-Mäusen signifikant mehr Parasiten auf ( $p < 0,05$ , Abb. 7).



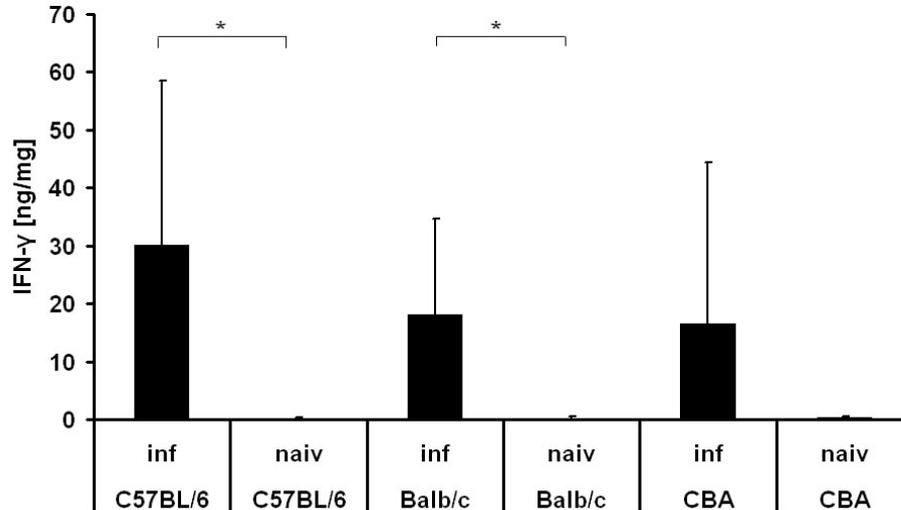
**Abb. 7.:** Anzahl parasitophorer Vakuolen/cm Ileum 7 Tage nach Infektion. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier durchgeführten Versuchen (n=8). \*  $p < 0,05$

### 3.2. Zytokinkonzentrationen in Ileum und Milz

Zur weiteren Charakterisierung der Immunantwort von mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten C57BL/6-, Balb/c- und CBA/ca-Mäusen im Vergleich zu naiven Kontrollmäusen wurden an Tag 7 nach der Infektion Organkulturen von Milz und Ileum angelegt.

#### 3.2.1. IFN- $\gamma$ -, IL-6- und IL-23p19-Konzentrationen im Ileum

Stellvertretend für die lokale Immunantwort wurden die Zytokinkonzentrationen im Ileum bestimmt. In Abb. 8 sind die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Ileum der infizierten und naiven Mäuse dargestellt. Sowohl die resistenten Balb/c- und CBA/ca- als auch die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse produzierten unter der Infektion lokal mehr IFN- $\gamma$  als im naiven Zustand, wobei der Anstieg bei den resistenten Balb/c- und bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen signifikant war. Zwischen den einzelnen drei Mausstämmen gab es unter der Infektion keine signifikanten Unterschiede.

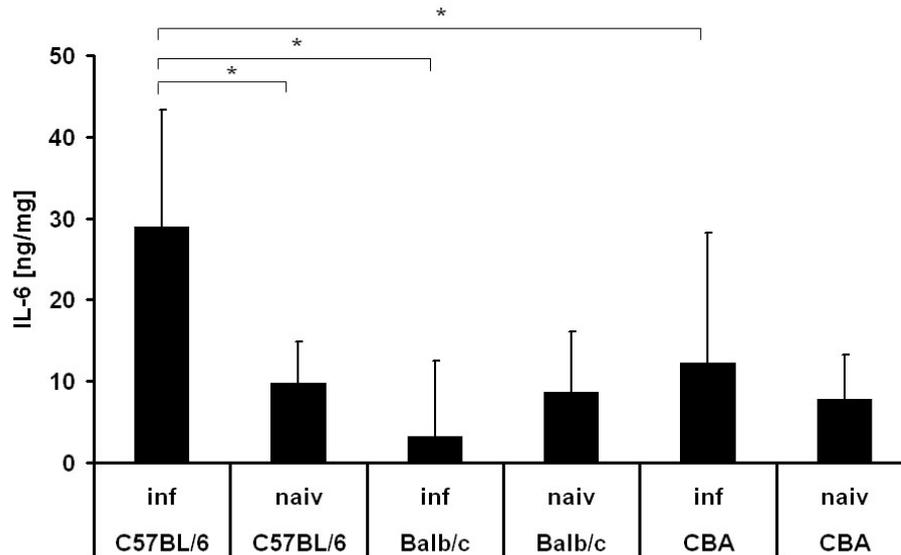


**Abb. 8.:** Die IFN- $\gamma$ -Produktion im Ileum naiver vs. infizierter Mäuse. Ergebnisse sind für zwei gepoolte repräsentative aus drei durchgeführten Versuchen gezeigt (n=40).  
\*  $p < 0,05$

Abb. 9 zeigt die Konzentrationen von IL-6 im Ileum der infizierten im Vergleich zu den naiven Tieren. C57BL/6-Mäuse, nicht aber Balb/c- und CBA/ca-Mäuse produzierten unter der Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* signifikant mehr IL-6 als im naiven Zustand. C57BL/6-Mäuse wiesen

### 3. Ergebnisse

zudem unter der Infektion im Ileum signifikant mehr IL-6 auf als die resistenten CBA/ca- und Balb/c-Mäuse.



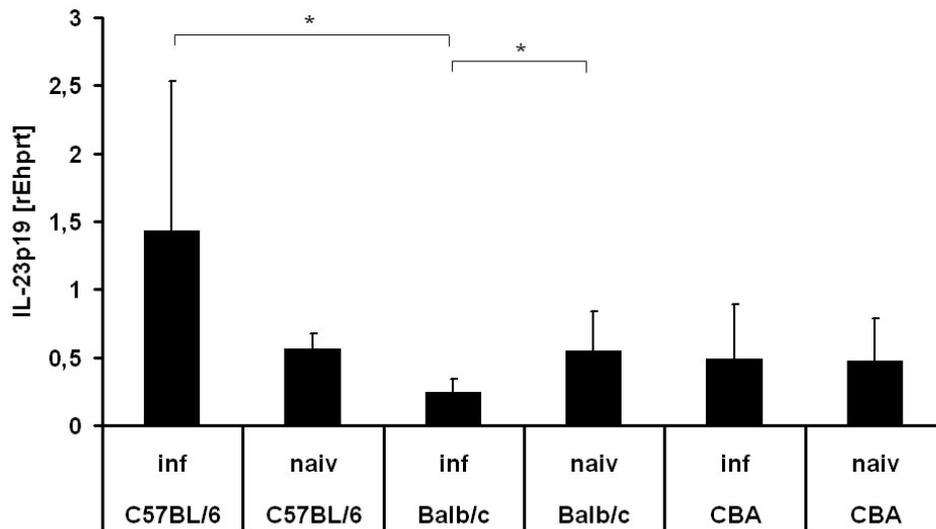
**Abb. 9.:** IL-6-Produktion in Ileum-Organkulturüberständen 7 Tage nach Infektion mit *T. gondii*. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse aus drei durchgeführten Versuchen (n=64). \*  $p < 0,05$

Da IL-23p19 eine wichtige Rolle in der Entstehung von Darmpathologien zugeschrieben wird [83, 84, 86, 87, 89], wurden die IL-23p19-mRNA-Konzentrationen im Ileum bestimmt (Abb. 10). Unter der Infektion stieg die Expression von IL-23p19 im Ileum der C57BL/6-Mäuse an und war signifikant höher als die der resistenten Balb/c-Mäuse sowie höher als die der CBA/ca-Mäuse. Dagegen war die Expression von IL-23p19 bei den resistenten Balb/c-Mäusen unter der Infektion sogar signifikant niedriger als im naiven Zustand.

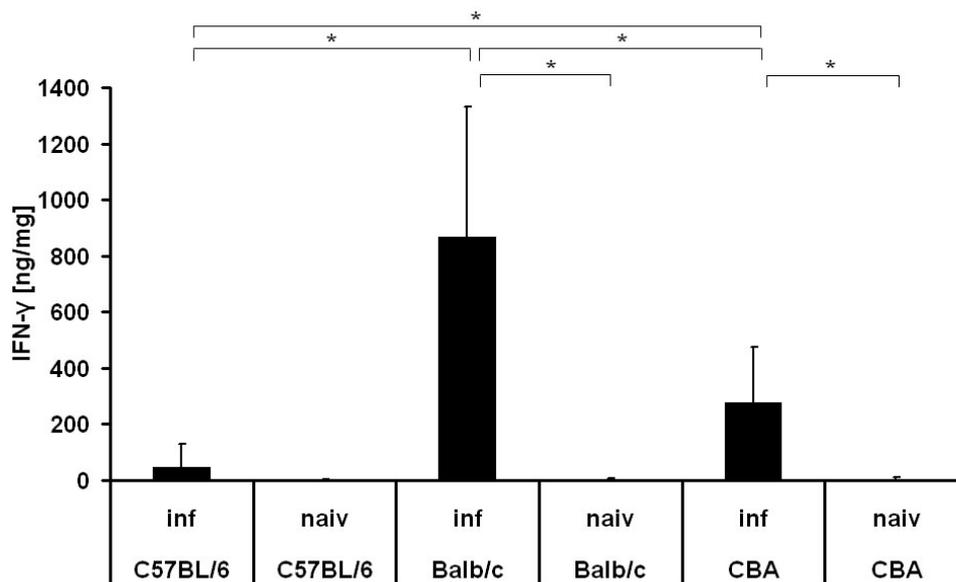
#### 3.2.2. IFN- $\gamma$ - und IL-6-Konzentrationen in der Milz

Die Milz wurde als Beispielorgan für die Untersuchung der systemischen Immunantwort ausgewählt. Abb. 11 zeigt, dass die resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäuse, nicht aber die suszeptiblen C57BL/c-Mäuse 7 Tage nach der Infektion signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Konzentrationen aufwiesen als naive Kontrolltiere. Die IFN- $\gamma$ -Produktion der Balb/c- sowie der CBA/ca-Mäuse war unter der Infektion signifikant höher als die der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse, wobei Balb/c-Mäuse systemisch ebenfalls signifikant mehr IFN- $\gamma$  produzierten als CBA/ca-Mäuse.

### 3. Ergebnisse



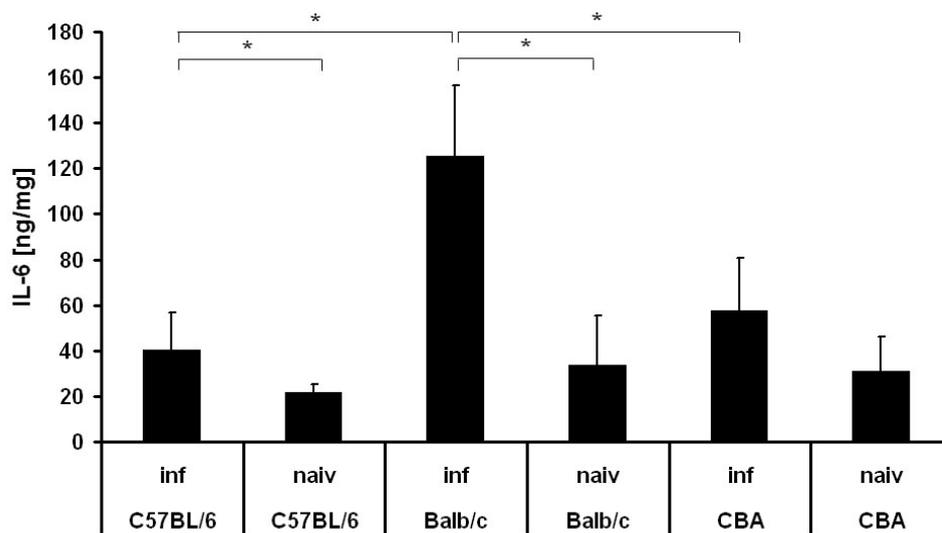
**Abb. 10.:** IL-23p19-mRNA-Konzentrationen im Ileum. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse aus zwei durchgeführten Experimenten (n=40). \*  $p < 0,05$



**Abb. 11.:** Die IFN- $\gamma$ -Produktion in der Milz naiver vs. infizierter Tiere. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse aus drei durchgeführten Versuchen (n=64). \*  $p < 0,05$

### 3. Ergebnisse

Ein ähnliches Bild bot sich bei Messung der IL-6-Konzentrationen in der Milz (Abb. 12). Infizierte Tiere aller Stämme produzierten mehr IL-6 als die jeweiligen naiven Tiere des gleichen genetischen Hintergrundes, wobei der Anstieg bei den resistenten Balb/c- und bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen signifikant war. Resistente Balb/c-Mäuse wiesen gegenüber suszeptiblen C57BL/6-Mäusen unter der Infektion eine signifikant erhöhte IL-6-Produktion auf. Infizierte Balb/c-Mäuse produzierten ebenfalls signifikant mehr IL-6 als infizierte CBA/ca-Mäuse.



**Abb. 12.:** Die IL-6-Produktion in der Milz 7 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse von zwei repräsentativen aus drei durchgeführten Versuchen (n=40). \*  $p < 0,05$

#### 3.2.3. Vergleich zwischen IFN- $\gamma$ - und IL-6-Konzentrationen in Ileum und Milz

Um die IFN- $\gamma$ -Produktion in lokalen und systemischen Kompartimenten zu vergleichen, wurden in Tab. 17 die Quotienten der IFN- $\gamma$ -Werte in Milz und Ileum der drei verschiedenen Mausstämmen dargestellt. Der Quotient der IFN- $\gamma$ -Produktion aus Milz und Ileum stieg bei allen drei Mausstämmen unter der Infektion an, am stärksten bei den resistenten Balb/c-Mäusen. Unter der Infektion waren die Quotienten bei den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen 24- bzw. 42-fach höher als bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen, was auf eine stark erhöhte systemische IFN- $\gamma$ -Produktion der resistenten Mausstämmen unter der Infektion bei einer vergleichsweise geringen lokalen IFN- $\gamma$ -Produktion hinweist.

In Tab. 18 sind die Quotienten der IL-6-Konzentration in Milz und Ileum der drei verschiedenen Mausstämmen dargestellt. Bei den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen erfolgte unter

### 3. Ergebnisse

---

**Tab. 17.:** Quotienten der IFN- $\gamma$ -Konzentration in Milz und Ileum. Dargestellt sind die gepoolten Quotienten von zwei repräsentativen aus drei durchgeführten Versuchen.

Mausstamm		IFN- $\gamma$ (Milz/Ileum)
C57BL/6	naiv	0,59
C57BL/6	inf	2,40
Balb/c	naiv	0,29
Balb/c	inf	58,78
CBA/ca	naiv	26,45
CBA/ca	inf	102,51

der Infektion eine Erhöhung dieses Verhältnisses, am deutlichsten bei den Balb/c- (etwa 4,5-fach), gefolgt von den CBA/ca-Mäusen (etwa 2,7-fach). Lediglich bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen fiel der Quotient unter der Infektion ab (etwa auf das 0,3-fache), was auf eine im Vergleich zu den resistenten Mausstämmen systemisch geringere und lokal höhere IL-6-Produktion unter der Infektion hinweist.

**Tab. 18.:** Quotienten der IL-6-Konzentration in Milz und Ileum. Dargestellt sind die Quotienten von einem repräsentativen aus drei durchgeführten Versuchen.

Mausstamm		IL-6 (Milz/Ileum)
C57BL/6	naiv	3,18
C57BL/6	inf	0,98
Balb/c	naiv	4,08
Balb/c	inf	18,19
CBA/ca	naiv	1,65
CBA/ca	inf	4,47

### 3.3. SOCS-Expressionen in Ileum und Milz

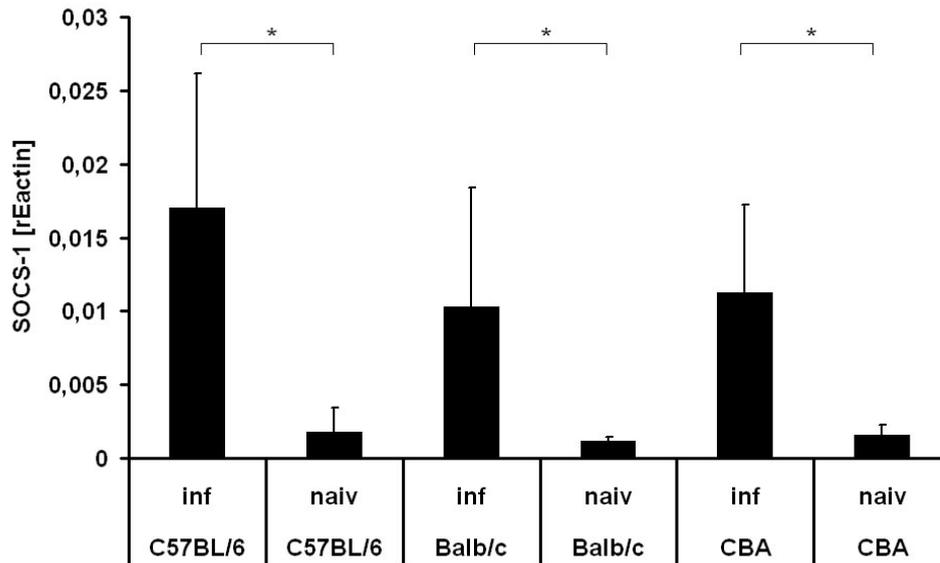
Zur Bestimmung der Rolle von SOCS-1 und SOCS-3 in der *T. gondii*-induzierten Immunpathologie wurden am 7. Tag post infectionem Milz und Ileum der Tiere entnommen und eine RT-PCR durchgeführt.

#### 3.3.1. SOCS-1- und SOCS-3-Expressionen im Ileum

Abb. 13 zeigt die Expression von SOCS-1 im Ileum der C57BL/6-, der Balb/c- sowie der CBA/ca-Mäuse an Tag 7 nach der Infektion. Alle drei Mausstämme exprimierten unter der Infektion

### 3. Ergebnisse

signifikant mehr SOCS-1 als nicht infizierte Vergleichstiere. Zwischen den verschiedenen Mausstämmen zeigten sich unter der Infektion keine signifikanten Unterschiede.



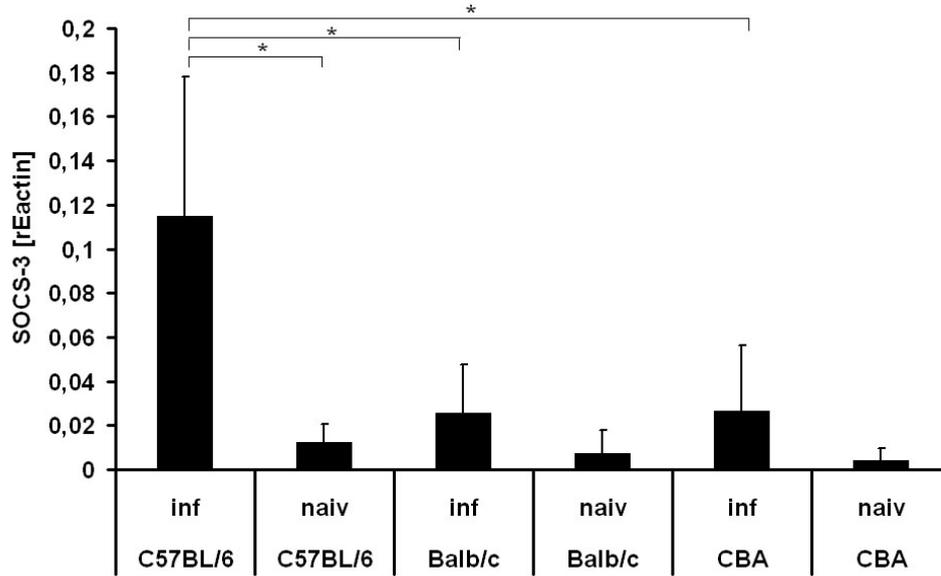
**Abb. 13.:** SOCS-1-mRNA-Konzentrationen im Ileum. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei gepoolten repräsentativen aus vier durchgeführten Versuchen (n=38). \*  $p < 0,05$

Nur C57BL/6-, nicht aber Balb/c- und CBA/ca-Mäuse zeigten im Ileum nach der Infektion signifikant höhere SOCS-3-Konzentrationen als naive Tiere (Abb. 14). Infizierte C57BL/6-Mäuse wiesen zudem signifikant mehr SOCS-3 auf als die beiden resistenten Mausstämmen.

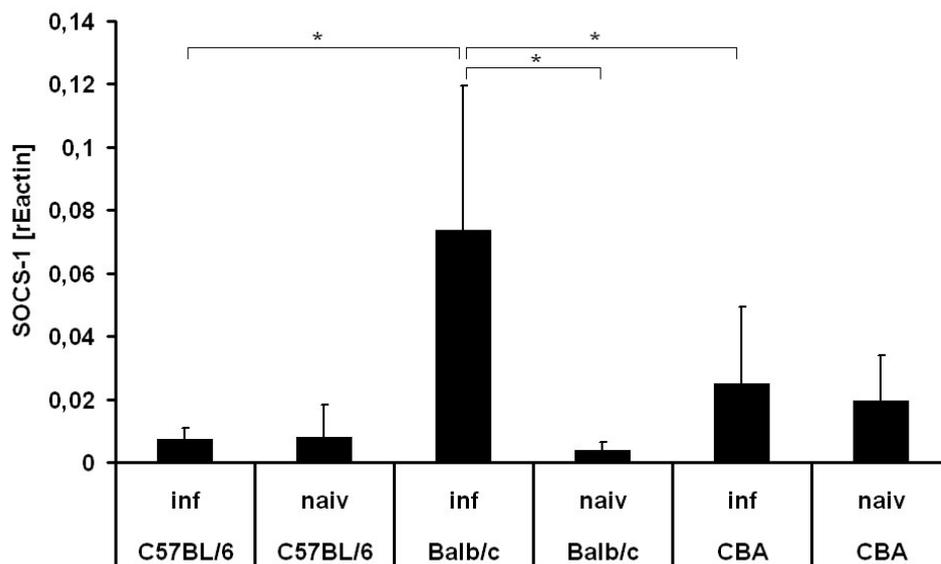
#### 3.3.2. SOCS-1- und SOCS-3-Expressionen in der Milz

Die Expression von SOCS-1 auf systemischer Ebene (Abb. 15) blieb bei den suszeptiblen C57BL/6- und den resistenten CBA/ca-Mäusen nach Infektion im Vergleich zu den naiven Tieren unverändert. Infizierte Balb/c-Mäuse exprimierten dagegen signifikant mehr SOCS-1 als naive Tiere. Die resistenten Balb/c-Mäuse exprimierten unter der Infektion auch signifikant mehr SOCS-1 als die suszeptiblen C57BL/6- und als die ebenfalls resistenten CBA/ca-Mäuse.

### 3. Ergebnisse



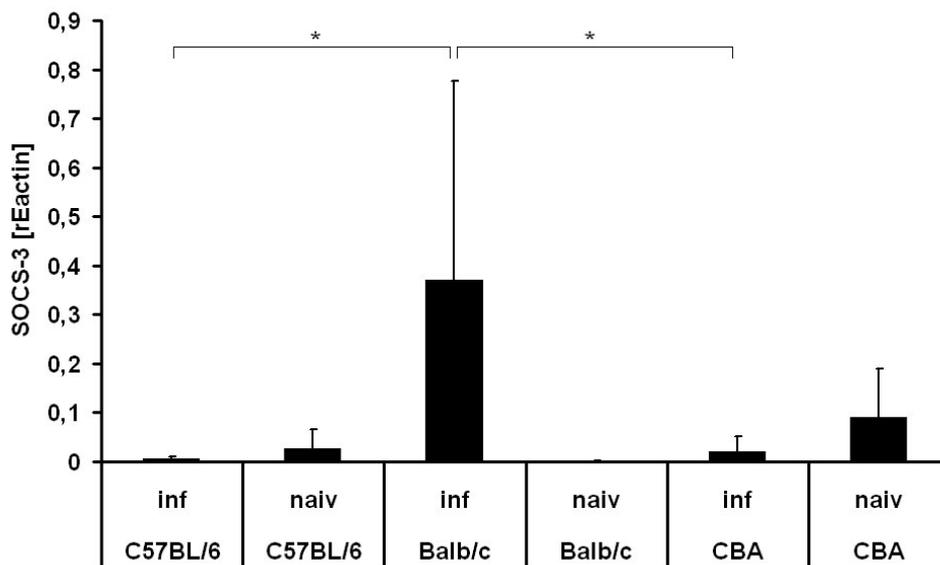
**Abb. 14.:** SOCS-3-mRNA-Konzentrationen im Ileum. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei gepoolten repräsentativen aus vier durchgeführten Versuchen (n=39). \*  $p < 0,05$



**Abb. 15.:** SOCS-1-mRNA-Konzentrationen in der Milz 7 Tage nach Infektion mit *T. gondii*. Dargestellt sind die gepoolten Ergebnisse von zwei repräsentativen aus vier durchgeführten Versuchen (n=35). \*  $p < 0,05$

### 3. Ergebnisse

Die Expression von SOCS-3 in der Milz war bei den naiven vs. infizierten C57BL/6- und CBA/ca-Mäusen unverändert, lediglich die Balb/c-Mäuse zeigten eine deutliche Steigerung der SOCS-3-Expression gegenüber den naiven Kontrolltieren (Abb. 16). Die Expression von SOCS-3 unter der Infektion war bei den resistenten Balb/c-Mäusen signifikant höher als bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen und ebenfalls signifikant höher als bei den CBA/ca-Mäusen.



**Abb. 16.:** SOCS-3-mRNA-Konzentrationen in der Milz 7 Tage nach Infektion mit *T. gondii*. Dargestellt sind die gepoolten Ergebnisse von zwei repräsentativen aus vier durchgeführten Versuchen (n=35). \*  $p < 0,05$

#### 3.3.3. Vergleich zwischen SOCS-1- und SOCS-3-Expressionen in Ileum und Milz

Der Vergleich der SOCS-1-Expressionen im Ileum bei jeweils infizierten und naiven Tieren aller drei Mausstämme zeigte, dass sich unter der Infektion im Ileum bei allen Mausstämmen eine signifikante Hochregulation der SOCS-1-Expression fand (vgl. Abb. 13). Diese war am stärksten bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen ausgeprägt. Der Vergleich der SOCS-3-Expressionen im Ileum zeigte, dass eine signifikante Erhöhung der Expression von SOCS-3 infizierter vs. naiver Mäuse im Ileum nur bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden konnte. Die C57BL/6-Mäuse exprimierten unter der Infektion im Ileum auch signifikant mehr SOCS-3 als die resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäuse (vgl. Abb. 14).

In der Milz war die SOCS-1-Expression unter der Infektion nur bei den resistenten Balb/c-Mäusen gegenüber den naiven Kontrollmäusen signifikant erhöht (vgl. Abb. 15). Die resistenten

Balb/c-Mäuse exprimierten in der Milz unter der Infektion signifikant mehr SOCS-1 und SOCS-3 als die C57BL/6- und die CBA/ca-Mäuse (vgl. Abb. 16).

## 3.4. Korrelation der SOCS-Expressionen mit Zytokinkonzentrationen

Um die lokale und systemische Expression der SOCS-Proteine mit den Konzentrationen der Zytokine zu korrelieren, wurden jeweils Quotienten aus SOCS-Expression und Zytokinkonzentration gebildet und anschließend zur besseren Darstellung mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert.

### 3.4.1. Korrelation der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-23p19 mit SOCS-Proteinen im Ileum

#### 3.4.1.1. IFN- $\gamma$ und SOCS-1 im Ileum

Der Quotient aus SOCS-1- und IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Ileum war bei allen Mausstämmen unter der Infektion deutlich herabgesetzt, was auf eine stärkere IFN- $\gamma$ - als SOCS-1-Induktion unter der Infektion hinweist (Tab. 19). Die Reduktion des Quotienten unter der Infektion erfolgte bei den C57BL/6- und bei den Balb/c-Mäusen auf jeweils etwa 2,2% des Ausgangswertes, bei den CBA/ca-Mäusen auf etwa 7,2% des Ausgangswertes.

**Tab. 19.:** Korrelation der Expression von SOCS-1 und der Konzentration von IFN- $\gamma$  im Ileum. Dargestellt sind die Quotienten von einem repräsentativen aus drei durchgeführten Versuchen.

Mausstamm		SOCS-1/IFN- $\gamma$ -Ratio im Ileum [ $\times 10^4$ ]
C57BL/6	naiv	146,71
C57BL/6	inf	3,27
Balb/c	naiv	242,33
Balb/c	inf	5,20
CBA/ca	naiv	99,94
CBA/ca	inf	7,25

#### 3.4.1.2. IL-6 und SOCS-3 im Ileum

Im Gegensatz dazu stieg der Quotient aus SOCS-3 und IL-6 unter der Infektion bei allen Mausstämmen an (Tab. 20), am deutlichsten bei den resistenten CBA/ca-Mäusen (etwa 10-fach, verglichen mit etwa 2,4-fach bei den Balb/c- und etwa 1,7-fach bei den C57BL/6-Mäusen).

### 3. Ergebnisse

Diese Daten weisen auf eine höhere SOCS-3- als IL-6-Induktion unter der Infektion hin, v.a. bei den resistenten CBA/ca-Mäusen.

**Tab. 20.:** Korrelation der Expression von SOCS-3 und der Konzentration von IL-6 im Ileum. Dargestellt sind die Quotienten von einem repräsentativen aus drei durchgeführten Versuchen.

Mausstamm		SOCS-3/IL-6-Ratio im Ileum [ $\times 10^4$ ]
C57BL/6	naiv	28,12
C57BL/6	inf	48,97
Balb/c	naiv	23,25
Balb/c	inf	55,31
CBA/ca	naiv	4,35
CBA/ca	inf	43,71

#### 3.4.1.3. IL-23p19 und SOCS-3 im Ileum

Die Korrelation der Expression von SOCS-3 mit der Produktion von IL-23p19 im Ileum (Tab. 21) zeigte, dass der Quotient aus SOCS-3 und IL-23p19 unter der Infektion bei allen Mausstämmen unter der Infektion anstieg. Bei den resistenten Balb/c-Mäusen stieg der Quotient etwa 23-fach an, bei den CBA/ca- etwa 7,2-fach und bei den C57BL/6-Mäusen etwa 2-fach. Dies weist auf eine v.a. bei den resistenten Mäusen höhere SOCS-3- als IL-23p19-Induktion unter der Infektion hin. Zudem war der Quotient bei den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen auch unter der Infektion gegenüber den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen erhöht.

**Tab. 21.:** Korrelation der Expression von SOCS-3 und der Konzentration von IL-23p19 im Ileum. Dargestellt sind die Quotienten von einem repräsentativen aus zwei durchgeführten Versuchen.

Mausstamm		SOCS-3/IL-23p19-Ratio im Ileum [ $\times 10^4$ ]
C57BL/6	naiv	86,77
C57BL/6	inf	170,25
Balb/c	naiv	17,40
Balb/c	inf	400,50
CBA/ca	naiv	30,52
CBA/ca	inf	219,38

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Quotienten aus SOCS-1 und IFN- $\gamma$  unter der Infektion im Ileum bei allen Mausstämmen deutlich abfielen, die Quotienten aus SOCS-3

### 3. Ergebnisse

---

und IL-6 bzw. IL-23p19 hingegen anstiegen. Dies deutet darauf hin, dass die IFN- $\gamma$ -Induktion unter der Infektion verglichen mit dem naiven Zustand um ein Vielfaches höher war als die Induktion von IL-6 bzw. IL-23p19.

Der Anstieg der Quotienten aus SOCS-3 und IL-6 bzw. IL-23p19 war jeweils bei den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen stärker ausgeprägt als bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen. Daraus folgt, dass die resistenten Mäuse unter der Infektion lokal eine stärkere Induktion von SOCS-3 verglichen mit der Induktion von IL-6 und IL-23p19 hatten als die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse.

In absoluten Zahlen produzierten die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse jedoch unter der Infektion lokal mehr IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-23p19 und exprimierten gleichzeitig mehr SOCS-1 und SOCS-3 als die resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäuse.

#### 3.4.2. Korrelation der Zytokine IFN- $\gamma$ und IL-6 mit SOCS-Proteinen in der Milz

##### 3.4.2.1. IFN- $\gamma$ und SOCS-1 in der Milz

Auch beim Vergleich der Konzentrationen von IFN- $\gamma$  und der Expression von SOCS-1 in der Milz zeigte sich wie schon im Ileum (vgl. Tab. 19) eine deutliche Reduktion des Quotienten unter der Infektion bei allen Mausstämmen, was auf eine stärkere IFN- $\gamma$ - als SOCS-1-Induktion unter der Infektion hinweist (Tab. 22). Der Quotient war bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen sowohl im naiven Zustand als auch unter der Infektion mehr als 2-fach gegenüber den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen erhöht, was auf eine erhöhte SOCS-1-Expression verglichen mit der Produktion von IFN- $\gamma$  hinweist.

**Tab. 22.:** Korrelation der Expression von SOCS-1 und der Konzentration von IFN- $\gamma$  in der Milz. Dargestellt sind die gepoolten Quotienten aus drei durchgeführten Versuchen.

Mausstamm		SOCS-1/IFN- $\gamma$ -Ratio in der Milz [ $\times 10^4$ ]
C57BL/6	naiv	61,02
C57BL/6	inf	1,92
Balb/c	naiv	30,39
Balb/c	inf	0,64
CBA/ca	naiv	27,19
CBA/ca	inf	0,77

#### 3.4.2.2. IL-6 und SOCS-3 in der Milz

Unter der Infektion stieg der Quotient aus SOCS-3-Expression und IL-6-Konzentration in der Milz bei den resistenten Balb/c-Mäusen erheblich an, was darauf hindeutet, dass eine stärkere Induktion von SOCS-3 als von IL-6 erfolgte (Tab. 23). Bei den C57BL/6- und den CBA/ca-Mäusen nahm der Quotient hingegen ab, d.h., dass die Induktion von IL-6 stärker war als die von SOCS-3.

**Tab. 23.:** Korrelation der Expression von SOCS-3 und der Konzentration von IL-6 in der Milz. Dargestellt sind die Quotienten von einem repräsentativen aus drei durchgeführten Versuchen.

Mausstamm		SOCS-3/IL-6-Ratio in der Milz [ $\times 10^4$ ]
C57BL/6	naiv	13,78
C57BL/6	inf	2,68
Balb/c	naiv	1,07
Balb/c	inf	39,76
CBA/ca	naiv	41,20
CBA/ca	inf	1,41

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass der Quotient aus SOCS-1 und IFN- $\gamma$  in den Mäusen aller Mausstämme in der Milz unter der Infektion deutlich abfiel, d.h. die Produktion von IFN- $\gamma$  nahm unter der Infektion stärker zu als die Expression von SOCS-1. Der Quotient war bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen sowohl im naiven Zustand als auch unter der Infektion mehr als 2-fach gegenüber den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen erhöht, was auf eine erhöhte SOCS-1-Expression verglichen mit der Produktion von IFN- $\gamma$  hinweist. Dennoch war sowohl die absolute IFN- $\gamma$ -Produktion als auch die absolute Expression von SOCS-1 der C57BL/6-Mäuse in der Milz geringer als die der resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäuse.

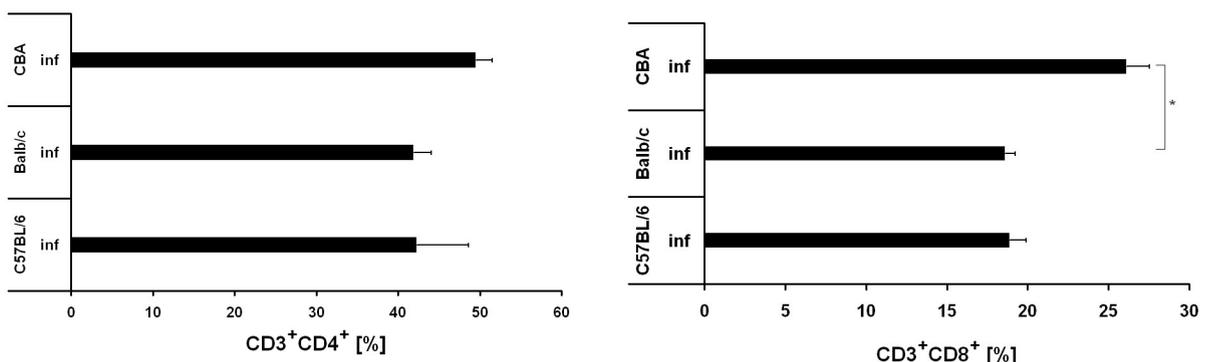
Der Quotient aus SOCS-3 und IL-6 stieg nur bei den resistenten Balb/c-Mäusen an, bei den C57BL/6- und den CBA/ca-Mäusen fiel er unter der Infektion deutlich ab. Dies weist darauf hin, dass bei den resistenten Balb/c-Mäusen die Expression von SOCS-3 unter der Infektion stärker anstieg als die Induktion von IL-6.

### 3.5. Bestimmung der Leukozytenpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz

Zur Bestimmung der an der *T. gondii*-vermittelten Immunpathologie beteiligten Leukozytenpopulationen wurden an Tag 7 nach der Infektion die mesenterialen Lymphknoten (MLN) und die Milz entnommen und Oberflächenmarker der Leukozyten per Durchflusszytometrie bestimmt. Es wurden Th-Zellen (=CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>), zytotoxische T-Zellen (=CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>), Makrophagen (=CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup>) und dendritische Zellen (=CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup>) bestimmt.

#### 3.5.1. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Abb. 17 zeigt die durchflusszytometrisch bestimmten Anteile von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den MLN der C57BL/6-, Balb/c- und CBA/ca-Mäuse als Beispiel für die lokale Immunantwort an Tag 7 nach der Infektion. Zeigten sich bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen, so konnte bei den CBA/ca-Mäusen ein signifikant höherer Prozentsatz zytotoxischer T-Zellen nachgewiesen werden als bei den Balb/c-Mäusen. Der prozentuale Anteil zytotoxischer T-Zellen war bei den CBA/ca-Mäusen ebenfalls deutlich höher als bei den C57BL/6-Mäusen.



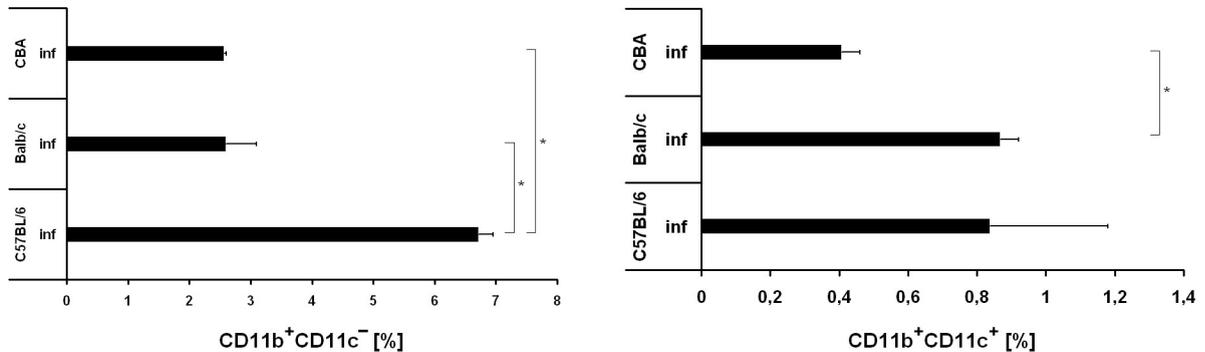
**Abb. 17.:** Durchflusszytometrische Messung der CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten. Dargestellt ist das Ergebnis aus einem durchgeführten Versuch (n=12). \*  $p < 0,05$

#### 3.5.2. Makrophagen und dendritische Zellen in den mesenterialen Lymphknoten

Die Messung von CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>-</sup> (Makrophagen) und CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (dendritische Zellen) in den MLN zeigte, dass der Anteil an Makrophagen bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen

### 3. Ergebnisse

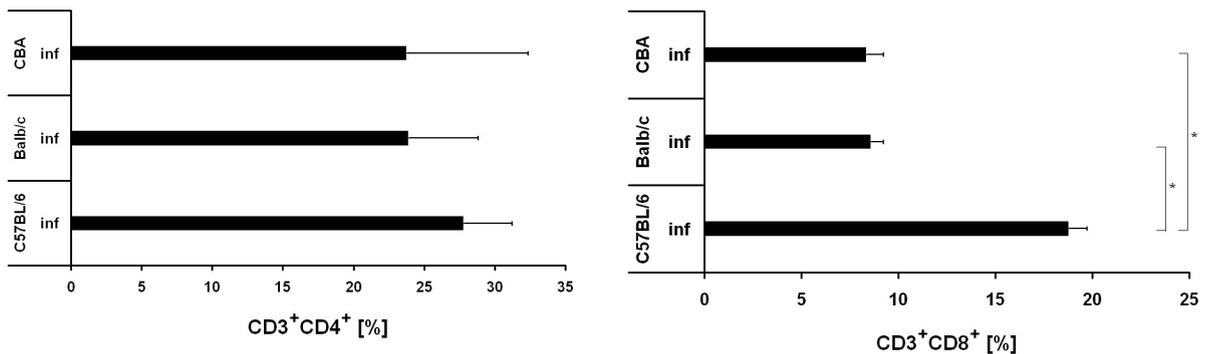
signifikant höher war als bei den beiden resistenten Mausstämmen. Für die DC's zeigte sich bei den Balb/c-Mäusen ein gegenüber den CBA/ca-Mäusen signifikant erhöhter prozentualer Anteil, zu den C57BL/6-Mäusen bestanden jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abb. 18).



**Abb. 18.:** Durchflusszytometrische Messung von Makrophagen und DC's in den mesenterialen Lymphknoten. Dargestellt ist das Ergebnis aus einem durchgeführten Versuch (n=12). \*  $p < 0,05$

#### 3.5.3. CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz

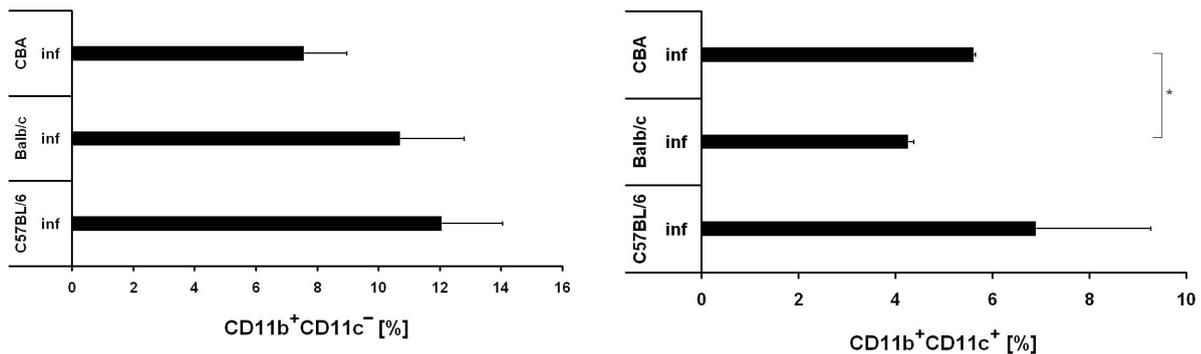
Bei der durchflusszytometrischen Bestimmung von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf systemischer Ebene (Milz) ergaben sich für die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der verschiedenen Mausstämmen. Der prozentuale Anteil der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen war jedoch bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen in der Milz gegenüber den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen signifikant erhöht (Abb. 19).



**Abb. 19.:** Durchflusszytometrische Messung von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der Milz. Dargestellt ist das Ergebnis aus einem durchgeführten Versuch (n=12). \*  $p < 0,05$

### 3.5.4. Makrophagen und dendritische Zellen in der Milz

Abb. 20 zeigt die prozentualen Anteile der Makrophagen und DC's in der Milz. Der Anteil der Makrophagen ( $CD11b^+CD11c^-$ ) war bei allen Mausstämmen vergleichbar hoch, während der Prozentsatz dendritischer Zellen ( $CD11b^+CD11c^+$ ) bei den CBA/ca- gegenüber den Balb/c-Mäusen signifikant erhöht war. Zu den C57BL/6-Mäusen bestanden keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 20.:** Durchflusszytometrische Messung der Zellpopulationen  $CD11b^+CD11c^-$  sowie  $CD11b^+CD11c^+$  in der Milz. Dargestellt ist das Ergebnis aus einem durchgeführten Versuch (n=12). \*  $p < 0,05$

### 3.5.5. Vergleich der Leukozytenpopulationen in mesenterialen Lymphknoten und Milz

In den lokalen Kompartimenten (MLN) zeigten sich hinsichtlich der  $CD3^+CD4^+$ -T-Zellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen. Bei den resistenten CBA/ca-Mäusen fand sich ein signifikant höherer Anteil zytotoxischer T-Zellen ( $CD3^+CD8^+$ ) als bei den beiden anderen Mausstämmen sowie ein signifikant niedrigerer Anteil dendritischer Zellen ( $CD11b^+CD11c^+$ ) als bei den Balb/c-Mäusen. Die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse zeigten lokal einen signifikant höheren prozentualen Anteil an Makrophagen ( $CD11b^+CD11c^-$ ) als die beiden resistenten Mausstämme.

Systemisch zeigten sich bei den  $CD4^+$ -T-Zellen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. In der Milz war jedoch der Anteil zytotoxischer T-Zellen bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen gegenüber den beiden resistenten Mausstämmen signifikant erhöht. Während sich bei den Makrophagen kein Unterschied zwischen den verschiedenen Mausstämmen zeigte, fand sich bei den CBA/ca-Mäusen ein signifikant höherer Anteil dendritischer Zellen als bei den Balb/c-Mäusen.

### 3. Ergebnisse

---

Der Vergleich der systemischen Zirkulation mit lokalen Kompartimenten zeigte, dass sich bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen ein erhöhter Anteil zytotoxischer T-Zellen in der systemischen Zirkulation im Gegensatz zu einem erhöhten prozentualen Anteil an Makrophagen in der Mukosaregion fand.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Mit 100-Zysten *T. gondii* oral infizierte C57BL/6-Mäuse versterben 7-14 Tage nach der Infektion an einer Darmpathologie, die durch massive Nekrosen im Ileum gekennzeichnet ist [7]. Diese Pathologie wird durch eine überschießende Th1 (und/oder sog. Th17)-Immunantwort verursacht, die große Ähnlichkeit mit der Immunkaskade hat, die bei Patienten mit M. Crohn und in Mausmodellen für entzündliche Darmerkrankungen beobachtet wurde [11]. CBA/ca-Mäuse dagegen erkranken erst in der chronischen Phase der Infektion an einer Enzephalitis [6], wohingegen Balb/c-Mäuse weder in der akuten, noch in der chronischen Phase erkranken [7–10]. Die kürzlich entdeckten SOCS-Proteine gelten als immunmodulatorische Moleküle, die die Wirkungen von Zytokinen hemmen können.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, inwieweit a) sich die Expression von SOCS-Proteinen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine zwischen naiven und infizierten Tieren der oben genannten Mausstämme unterscheidet, b) wie sich die lokale von der systemischen Expression dieser Immunmarker unterscheidet, und c) ob es eine Korrelation der SOCS-Expression und der Produktion proinflammatorischer Zytokine mit der Morbidität, der Schwere der histologischen Veränderungen und der Parasitenzahl im Ileum der Mäuse sowie mit den Frequenzen bestimmter Leukozytenpopulationen gibt.

Dazu wurden Tiere oben genannter Mausstämme mit 100-Zysten *T. gondii* oral infiziert und im Verlauf der Infektion gewogen. An Tag 7 nach der Infektion wurden Milz, MLN und Ileum der Tiere entnommen und die histologischen Veränderungen im Ileum, die Anzahl der Parasiten sowie die Konzentrationen der wesentlich an der Pathologie beteiligten Zytokine IFN- $\gamma$  [101–105, 149], IL-6 [77–80, 87, 150] und IL-23p19 [83, 84, 86, 87, 89] untersucht. Weiterhin wurde die Expression der SOCS-Proteine SOCS-1 und SOCS-3, die regulierend auf IFN- $\gamma$ , IL-6 [107, 116–119] und IL-23 [133, 134] wirken, auf mRNA-Ebene bestimmt. Durchflusszytometrisch wurden relative Frequenzen bestimmter Leukozytenpopulationen bestimmt.

### **4.2. Assoziation von Morbidität, Histologie, Parasitenlast und Leukozytenpopulationen infizierter Mäuse untereinander**

Der Vergleich des Gewichtsverlaufs der drei infizierten Mausstämme zeigt, dass die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse einen signifikant höheren Gewichtsverlust unter der Infektion als die

beiden resistenten Mausstämmen aufwiesen. Weiterhin zeigte die histologische Untersuchung von Ileumschnitten, dass es unter der Infektion im Ileum der C57BL/6-Mäuse erwartungsgemäß zu massiven pathologischen Veränderungen gekommen war, nicht jedoch im Ileum der Balb/c- und CBA/ca-Mäuse. Die Anzahl parasitophorer Vakuolen, die Tachyzoiten von *T. gondii* enthielten, war ebenfalls bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen gegenüber den resistenten Mäusen signifikant erhöht. Die C57BL/6-Mäuse unterschieden sich somit erwartungsgemäß in allen Entzündungsparametern signifikant von den beiden resistenten Mausstämmen [6–10].

Bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen fand sich in den MLN zudem ein gegenüber den beiden resistenten Mausstämmen signifikant erhöhter Anteil an CD11b<sup>+</sup>-Makrophagen. Diese verstärkte lokale Präsenz von Makrophagen könnte durch die massiv erhöhte Parasitenlast im Ileum der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse bedingt sein und ist insofern von Bedeutung, als Makrophagen wichtige Produzenten von IL-6 [74] und IL-23p19 [82, 83] sind, nicht jedoch von IFN- $\gamma$ . Ein erhöhter prozentualer Anteil an Makrophagen könnte somit die Herkunft dieser beiden im Ileum der C57BL/6-Mäuse vermehrt gebildeten proinflammatorischen Zytokine erklären. In der Milz fand sich bei den C57BL/6-Mäusen ein gegenüber den resistenten Mausstämmen signifikant erhöhter Anteil an zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Obwohl zytotoxische T-Zellen neben NK- und CD4<sup>+</sup>-Zellen die wichtigste Quelle für IFN- $\gamma$  darstellen, ist die Produktion von IFN- $\gamma$  jedoch in der Milz der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse signifikant geringer als bei den beiden resistenten Mausstämmen.

### 4.3. Assoziation der SOCS-Expressionen mit Entzündungsparametern

Die lokale SOCS-1-Expression war bei allen infizierten Tieren gegenüber den naiven Vergleichstieren signifikant erhöht, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen fanden. Die lokale SOCS-3-Expression war hingegen lediglich bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen signifikant gegenüber den naiven Tieren und zudem auch signifikant gegenüber den resistenten Mausstämmen erhöht. Im Gegensatz zur Expression von SOCS-1 korrelierte die lokale Expression von SOCS-3 mit den oben genannten Entzündungsparametern, da die resistenten C57BL/6-Mäuse sowohl die höchsten SOCS-3-Expressionen als auch die größte Morbidität, die schwersten pathologischen Veränderungen und die höchste Parasitenlast im Ileum aufwiesen.

In der Milz war die Expression von SOCS-1 nur bei den resistenten Balb/c-Mäusen signifikant höher als im naiven Zustand und auch signifikant höher als bei den suszeptiblen C57BL/6- und den resistenten CBA/ca-Mäusen. Die CBA/ca-Mäuse exprimierten ebenfalls deutlich mehr SOCS-1 als die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse. Für SOCS-3 in der Milz ergab sich unter der

Infektion keine signifikante Hochregulation gegenüber den naiven Kontrollmäusen, jedoch war die SOCS-3-Expression bei den Balb/c-Mäusen unter der Infektion signifikant höher als bei den C57BL/6- und den CBA/ca-Mäusen.

In der Literatur gibt es bisher nur Hinweise auf eine Induktion von SOCS-1 und SOCS-3 nach Infektion von Makrophagen mit *T. gondii* [151]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals gezeigt werden, dass die orale Infektion von Mäusen mit *T. gondii* unabhängig von Suszeptibilität oder Resistenz *in vivo* zu einer signifikanten lokalen Induktion von SOCS-1 führte; SOCS-3 dagegen wurde interessanterweise lokal nur bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen signifikant induziert. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der systemischen Zirkulation nur bei den resistenten Balb/c-Mäusen eine signifikante Induktion von SOCS-1; die SOCS-3-Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen infizierten und naiven Mäusen.

Die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse zeigten eine mit den resistenten Mausstämmen vergleichbare lokale SOCS-1-, jedoch eine signifikant stärkere SOCS-3-Induktion. Im Gegensatz dazu fand sich systemisch bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen eine signifikant geringere SOCS-1- und SOCS-3-Induktion als bei den resistenten Balb/c-Mäusen. Insbesondere die lediglich bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen lokal erhöhten SOCS-3-Werte könnten als eine Reaktion auf die überschießende lokale Immunantwort interpretiert werden, wohingegen der Schwerpunkt der Immunantwort und damit auch der Schwerpunkt der Kontrolle derselben bei den resistenten Mäusen eher in der systemischen Zirkulation zu liegen scheint.

#### **4.4. Assoziation der IFN- $\gamma$ -Produktion mit Entzündungsparametern und Korrelation mit der Expression der SOCS-Proteine**

Der Vergleich der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen naiver und infizierter Mäuse im Ileum zeigt, dass alle Mausstämme unter der Infektion lokal mehr IFN- $\gamma$  als die jeweiligen naiven Mäuse produzierten, wobei dieser Anstieg bei den suszeptiblen C57BL/6- und bei den resistenten Balb/c-Mäusen signifikant war. Ein Vergleich der drei Mausstämme untereinander zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede in der Produktion von IFN- $\gamma$ .

In der Milz fanden sich bei den resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäusen unter der Infektion gegenüber den naiven Kontrollmäusen signifikant erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktionen, nicht jedoch bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen. Auch im Vergleich zu den resistenten Mäusen war die IFN- $\gamma$ -Produktion der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse unter der Infektion signifikant geringer. Die Quotienten aus IFN- $\gamma$ -Produktion in Milz und Ileum waren zudem bei den Balb/c- und CBA/ca-Mäusen unter der Infektion 24- bzw. 42-fach gegenüber den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen

erhöht. Dies weist darauf hin, dass die IFN- $\gamma$ -Produktion bei den resistenten Mäusen unter der Infektion systemisch deutlich höher war als lokal, wohingegen die IFN- $\gamma$ -Produktion bei den C57BL/6-Mäusen systemisch nur geringfügig höher war als lokal. Diese Ergebnisse könnten als Folge einer Migration der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen von der systemischen Zirkulation in die lokale Mukosaregion bei den suszeptiblen Mäusen interpretiert werden.

Während bei Patienten mit M. Crohn sowohl eine erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  [101] als auch von IL-12 und IL-18, die an der IFN- $\gamma$ -Produktion beteiligt sind, nachgewiesen werden konnten [104, 105], ist die Rolle von IFN- $\gamma$  bei der Entstehung der experimentellen Kolitis unklar. In einem T-Zell-induzierten Kolitis-Mausmodell konnten Simpson *et al.* zeigen, dass die Behandlung der Tiere mit anti-IL-12-Antikörpern zu einer geringeren Anzahl an IFN- $\gamma$ -produzierenden T-Zellen führte und die Ausprägung der Erkrankung reduzierte [103]. Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass ein Fehlen des IFN- $\gamma$ -Rezeptors nicht vor Entstehung einer TNBS-induzierten Kolitis schützt, wohl aber ein Fehlen des IL-12-Gens [152]. In dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mausmodell konnte ebenfalls bereits die zweiseitige Rolle von IFN- $\gamma$  gezeigt werden; so konnte die Gabe eines Antikörpers gegen IFN- $\gamma$  an Tag 5 der Infektion die Erkrankung mildern, die Gabe des Antikörpers ab Tag 1 der Infektion jedoch führte zum frühzeitigen Tod der Mäuse [7]. Im derzeit einzig bekannten anderen Ileitis-Mausmodell, dem sog. SAMP1/Yit-Modell, wurde in Mäusen mit Ileitis eine gegenüber gesunden Mäusen signifikant erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion durch T-Zellen nachgewiesen [153].

Die signifikant erhöhte lokale IFN- $\gamma$ -Produktion unter der Infektion gegenüber den naiven Kontrollmäusen entsprach publizierten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe [7]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen lokal erhöhten IFN- $\gamma$ -Konzentrationen und der Entstehung der Pathologie gezeigt werden, da die bei den C57BL/6- gegenüber den resistenten Mäusen signifikant erhöhten Entzündungsparameter nicht mit gegenüber den resistenten Mäusen signifikant erhöhten lokalen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen korrelierten. In anderen Arbeiten konnte jedoch ebenfalls gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  zwar initial durch *T. gondii* induziert wird, die IFN- $\gamma$ -Konzentration jedoch nicht immer mit der Entstehung der Pathologie korreliert [154, 155].

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* unabhängig von Resistenz oder Suszeptibilität der Mäuse in Ileum zu einer signifikanten Induktion von IFN- $\gamma$  führte; in der Milz fand sich diese Induktion jedoch nur bei den resistenten Tieren. Die Produktion von IFN- $\gamma$  ist zudem genetisch reguliert, da sich die lokalen Zytokin-Konzentrationen in Abhängigkeit vom genetischen Hintergrund der Mäuse unterschieden.

Da SOCS-1 durch IFN- $\gamma$  induziert wird und daraufhin die Effekte von IFN- $\gamma$  hemmt [66, 67, 107, 135], war in der vorliegenden Arbeit die Korrelation der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen mit der

#### 4. Diskussion

---

Expression von SOCS-1 von Interesse. Im Ileum korrelierte die Produktion von IFN- $\gamma$  mit der Expression von SOCS-1. In allen drei Mausstämmen fanden sich unter der Infektion erhöhte IFN- $\gamma$ - und SOCS-1-Konzentrationen im Vergleich zu den jeweiligen naiven Kontrollmäusen, es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Mausstämmen. Daraus lässt sich folgern, dass es im Rahmen der Infektion zu einer gleichzeitigen Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen und gegenregulatorischen Molekülen kommt. Diese Assoziation zwischen SOCS-1 und IFN- $\gamma$  ist in der Literatur gut belegt. Zwar konnte gezeigt werden, dass SOCS-1 und SOCS-3 *in vitro* sowohl durch IFN- $\gamma$  als auch durch IL-6 induziert werden [66, 67, 129], doch scheint *in vivo* die negative Rückkopplung des IFN- $\gamma$ -Signals eher eine Funktion von SOCS-1 zu sein [135]. Tatsächlich korrelierte die IFN- $\gamma$ -Produktion im Ileum nicht mit der lokalen Expression von SOCS-3, da SOCS-3 im Gegensatz zu IFN- $\gamma$  nur bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu den naiven Kontrollmäusen und zu den resistenten Tieren signifikant induziert wurde.

Wenngleich eine deutliche Korrelation der lokalen Expression von SOCS-1 mit der Konzentration von IFN- $\gamma$  im Ileum gezeigt werden konnte, so konnte doch die in der Literatur beschriebene Hemmung der Effekte von IFN- $\gamma$  durch SOCS-1 [66, 67, 107] in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Auch eine signifikant erhöhte SOCS-1-Konzentrationen im Ileum der suszeptiblen Mäuse schützte diese nicht vor pathologischer IFN- $\gamma$ -Wirkung. Das Verhältnis der SOCS-1- zur IFN- $\gamma$ -Produktion war zudem im Ileum unter der Infektion bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen nur geringfügig niedriger als bei den resistenten Mäusen. Die Untersuchungen der SOCS-Expressionen wurden jedoch auf der Basis des gesamten Ileums durchgeführt, sodass keine Aussagen zur Expression von SOCS-1 in bestimmten Zellpopulationen getroffen werden können.

Die unterschiedliche Expression von SOCS-1 bei den verschiedenen Mausstämmen könnte einerseits auf einer in Abhängigkeit vom jeweiligen Mausstamm unterschiedlichen direkten genetischen Regulation beruhen, andererseits aber auch auf die genetisch regulierte IFN- $\gamma$ -Produktion zurückgehen. Doch ist auch eine direkte Induktion von SOCS-1 durch den Parasiten *T. gondii* denkbar, wie von Zimmermann *et al.* diskutiert [151]. Dagegen spricht jedoch, dass die resistenten Balb/c- und CBA/ca-Mäuse trotz signifikant niedrigerer Parasitenzahlen im Ileum verglichen mit den C57BL/6-Mäusen unter der Infektion eine signifikant erhöhte lokale Expression von SOCS-1 gegenüber den naiven Kontrollmäusen zeigten, die sich nicht von der der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse unterschied.

Wormald *et al.* konnten zeigen, dass eine kontinuierliche Stimulation von Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen mit IFN- $\gamma$  zu einer kontinuierlich hohen Expression von SOCS-1-mRNA führte, während die Phosphorylierung von STAT1, das für die Signalübertragung von IFN- $\gamma$

essentiell ist, nachließ [110]; d.h., dass auch bei einem bereits gehemmten intrazellulären IFN- $\gamma$ -Signal die Expression von SOCS-1 erhöht blieb. Dieser Mechanismus könnte die Tatsache erklären, dass sich nicht nur bei den suszeptiblen, sondern auch bei den resistenten Mäusen noch 7 Tage nach der Infektion im Ileum signifikant erhöhte SOCS-1-Expressionen finden.

#### **4.5. Assoziation der IL-6- und IL-23p19-Produktion mit Entzündungsparametern und Korrelation mit der Expression der SOCS-Proteine**

Die IL-6-Produktion im Ileum war lediglich bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen unter der Infektion verglichen mit den naiven Tieren signifikant erhöht und auch signifikant höher als bei den beiden resistenten Mausstämmen. In der Milz fanden sich bei den C57BL/6- und den Balb/c-Mäusen unter der Infektion gegenüber den naiven Kontrollmäusen signifikant erhöhte IL-6-Konzentrationen. Bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen, jedoch auch bei den resistenten CBA/ca-Mäusen waren diese signifikant niedriger als bei den Balb/c-Mäusen.

Bei Patienten mit M. Crohn konnte gezeigt werden, dass erhöhte IL-6-Konzentrationen im Serum mit der klinischen Ausprägung der Erkrankung korrelieren [77–79]. In Kolitis-Mausmodellen konnte zudem gezeigt werden, dass die Behandlung der Mäuse mit Antikörpern gegen IL-6 [80] bzw. die Blockade des IL-6-Rezeptors [150] die Erkrankung unterdrückt bzw. mildert, was für eine wichtige Rolle von IL-6 bei der Entstehung der Kolitis spricht.

Der Quotient der IL-6-Produktion aus Milz/Ileum stieg bei den beiden resistenten Mausstämmen unter der Infektion an, fiel jedoch bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen ab, was eine unter der Infektion lokal höhere IL-6-Produktion der C57BL/6-, nicht aber der Balb/c- und CBA/ca-Mäuse impliziert. Interessanterweise nahm die IL-6-Produktion jedoch im Ileum der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse nicht nur stärker zu als in der Milz derselben Mäuse, sie war auch signifikant höher als bei den resistenten Mausstämmen. Dies weist darauf hin, dass lokal erhöhtes IL-6 an der Entstehung der Immunpathologie im *T. gondii*-induzierten Mausmodell der Ileitis beteiligt sein könnte. Die bei den resistenten Balb/c- gegenüber den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen systemisch höheren IL-6-Konzentrationen hingegen weisen wiederum auf die Bedeutung des lokalen, nicht aber des systemischen Zytokinmilieus für die Immunpathologie hin.

Yen *et al.* konnten ursprünglich zeigen, dass IL-23p19 Gedächtnis-T-Zellen stimuliert, die daraufhin IL-17 und IL-6 produzieren und eine experimentelle Kolitis herbeiführen [87]. Die wichtige Rolle von IL-23 bei der Entstehung einer experimentellen Kolitis konnte auch in einem Modell der *Helicobacter hepaticus*-induzierten T-Zell-abhängigen Kolitis [86] gezeigt werden.

#### 4. Diskussion

---

Neuerdings wird jedoch eher davon ausgegangen, dass IL-23p19 weniger für die Induktion als vielmehr für die Aufrechterhaltung der sog. Th17-Antwort erforderlich ist [27–29], während die Induktion des sog. Th17-Phänotyps durch IL-6 zusammen mit TGF- $\beta$  geschieht [39–41]. Weiterhin weisen die kürzlich entdeckten Veränderungen im Gen für den IL-23-Rezeptor bei Patienten mit M. Crohn darauf hin, dass die sog. IL-23/Th17-Achse auch beim Menschen eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Erkrankung hat [89].

Dies ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vereinbar, da bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen die lokalen IL-6-Konzentrationen sowohl gegenüber den naiven Kontrollmäusen als auch gegenüber den infizierten resistenten Mäusen signifikant erhöht waren und auch die lokalen IL-23p19-Konzentrationen gegenüber den resistenten Balb/c-Mäusen signifikant erhöht waren. Bei infizierten C57BL/6-Mäusen zeigte sich zudem eine tendenzielle Erhöhung der IL-23p19-Konzentration gegenüber den naiven Kontrollmäusen, während die IL-23p19-Konzentration bei resistenten CBA/ca-Mäusen unverändert blieb und bei infizierten gegenüber naiven Balb/c-Mäusen sogar signifikant erniedrigt war. Durch unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass es sich bei dem verwendeten Mausmodell nicht um eine „klassische“ sog. Th17-vermittelte Immunpathologie handelt, da IL-17 in infizierten Mäusen gegenüber naiven Kontrollmäusen sogar signifikant erniedrigt war [AG Liesenfeld, unveröffentlichte Ergebnisse]. In der vorliegenden Arbeit korrelierte die lokal gegenüber den resistenten Mäusen signifikant erhöhte Produktion dieser proinflammatorischen sog. „Th17“-Zytokine IL-23 und IL-6 jedoch bei den suszeptiblen C57BL/6-Mäusen mit der gegenüber den resistenten Mäusen signifikant erhöhten Morbidität, den signifikant schwereren histologischen Veränderungen und der signifikant erhöhten Parasitenlast im Ileum. Dies weist auf eine mögliche Beteiligung dieser Zytokine an den oben genannten entzündlichen Veränderungen hin und lässt die IL-23- und IL-6-vermittelte „Th17“-Immunantwort einen interessanten Angriffspunkt für zukünftige Therapeutika erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass die Produktion von IL-6 in Milz und Ileum bzw. die Produktion von IL-23p19 im Ileum genetisch reguliert sind, da sich die Zytokinkonzentrationen nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* abhängig vom genetischen Hintergrund der Mäuse unterschieden.

Wie die Konzentration des Th1-Markers IFN- $\gamma$  mit SOCS-1, so korrelierte auch die Expression von SOCS-3 im Ileum mit den Konzentrationen der „Th17“-Zytokine IL-6 und IL-23. Unter der Infektion waren SOCS-3-Expression und IL-6-Produktion bei suszeptiblen C57BL/6-Mäusen gegenüber den naiven Kontrollmäusen und auch gegenüber den infizierten resistenten Mäusen signifikant erhöht, und auch die IL-23-Produktion der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse war signifikant höher als die der resistenten Balb/c-Mäuse. Die Assoziation zwischen SOCS-3

#### 4. Diskussion

---

und IL-6 ist vielfach beschrieben worden. Zwar werden SOCS-3 und SOCS-1 sowohl durch IFN- $\gamma$  als auch durch IL-6 induziert [66, 67, 129], doch scheint die negative Rückkopplung des IL-6-Signals eher eine Funktion von SOCS-3 zu sein [135]. Eine Induktion von SOCS-3 durch hohe IL-6-Konzentrationen lässt sich anhand der vorliegenden Arbeit nachvollziehen, nicht jedoch eine Induktion von SOCS-1, da SOCS-1 im Ileum im Gegensatz zu IL-6 bei allen Mausstämmen unabhängig von Suszeptibilität oder Resistenz signifikant induziert wurde.

Eine Induktion von SOCS-3 durch den Parasiten *T. gondii* erscheint unwahrscheinlich, obwohl die Parasitenzahl mit der SOCS-3-Expression korreliert. Zimmermann *et al.* beobachteten in ihrer Arbeit jedoch eine deutlich stärkere Induktion von SOCS-1 als von SOCS-3 durch *T. gondii* *in vitro* [151], wohingegen in der vorliegenden Arbeit die lokalen Konzentrationen von SOCS-3 höher waren als die von SOCS-1.

Wormald *et al.* konnten zeigen, dass eine kontinuierliche Stimulation von Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen mit IL-6 zu einer biphasischen Expression von SOCS-3-mRNA führte, mit einem frühen Maximum der IL-6 Wirkung nach etwa 15-30 min, gefolgt von einem Abfall und einem erneuten Anstieg der SOCS-3-mRNA-Expression nach etwa 180 min. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 240 min hielt sich danach die SOCS-3-mRNA-Expression konstant auf einem mittleren Niveau [110]. Diese bei Stimulation über einen längeren Zeitraum beobachtete konstante SOCS-3-Expression könnte die anhaltend erhöhten SOCS-3-mRNA-Konzentrationen im Ileum der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse erklären.

Sollte IL-6 an der Immunpathologie der 100-Zysten-Infektion mit *T. gondii* beteiligt sein, so konnte die in der Literatur beschriebene Hemmung der IL-6-Signalwirkung [129, 135, 136] in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden, da selbst eine signifikant erhöhte Konzentration von SOCS-3 im Ileum die suszeptiblen C57BL/6-Mäuse nicht schützte. Der Quotient aus SOCS-3-Expression und IL-6-Produktion im Ileum zeigte, dass SOCS-3 unter der Infektion bei allen Mausstämmen stärker induziert wurde als IL-6. Der Anstieg dieses Verhältnisses unter der Infektion war bei den resistenten CBA/ca- jedoch etwa 10-fach, verglichen mit einem etwa 2,4-fachen bzw. nur etwa 1,7-fachen Anstieg bei den bei den Balb/c- bzw. C57BL/6-Mäusen. Eine mögliche Interpretation dieser Ergebnisse wäre ein Schutz vor den pathologischen Wirkungen von IL-6 durch eine im Verhältnis starke Induktion von SOCS-3 bei den resistenten CBA/ca-Mäusen.

Die Funktion von SOCS-3 als negativer Regulator der IL-23- und IL-6-vermittelten „Th17“-Differenzierung [133] als Resultat verminderter IL-23-Produktion [134] konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Vielmehr wurden im Ileum der suszeptiblen C57BL/6-Mäuse sowohl erhöhte SOCS-3-Expressionen als auch erhöhte IL-23-Konzentrationen gemessen.

#### 4. Diskussion

---

Es wäre nun interessant, in weiteren Arbeiten durch Unterdrückung von SOCS-1 und SOCS-3 in den resistenten Mäusen bzw. durch Überexpression von SOCS-1 und SOCS-3 in den suszeptiblen Mäusen die Funktion der SOCS-Proteine im *T. gondii*-vermittelten Mausmodell der Kolitis zu klären. Interessant wäre zudem eine Untersuchung der Expressionen von Molekülen der IFN- $\gamma$ - bzw. IL-6-vermittelten intrazellulären Signalkaskade in demselben Mausmodell, um herauszufinden, ob die IFN- $\gamma$ - und IL-6-Signalwirkung tatsächlich wirksam durch SOCS-1 bzw. SOCS-3 unterdrückt werden. Auch wäre eine Klärung der Frage wichtig, inwieweit die „Th17“-vermittelte Immunantwort zur Entstehung der Darmpathologie in diesem Mausmodell beiträgt, z.B. durch Unterdrückung einzelner Effektormoleküle der „Th17“-Immunität wie IL-6, IL-22, IL-23 oder TGF- $\beta$ .

## 5. Zusammenfassung

Die orale Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* führt bei C57BL/6-Mäusen zu einer Immunpathologie, die durch Pan-Ititis und Tod der Mäuse innerhalb von 7-14 Tagen gekennzeichnet ist. Die Immunpathogenese der Infektion wird durch Th1- (und/oder sog. Th17)-Zellen vermittelt und zeigt weitreichende Parallelen zur Pathogenese des M. Crohn beim Menschen. Balb/c- und CBA/ca-Mäuse hingegen sind resistent und erkranken nicht an einer Darmpathologie. Die kürzlich entdeckten „Suppressor of Cytokine Signaling“ (SOCS)-Proteine gelten als immunmodulatorische Moleküle, die Zytokinwirkungen hemmen können.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Frage geklärt werden, inwieweit a) sich die Expression von SOCS-Proteinen und die Produktion proinflammatorischer Zytokine zwischen naiven und infizierten Tieren der oben genannten Mausstämmen unterscheidet, b) wie sich die lokale von der systemischen Expression dieser Immunmarker unterscheidet, und c) ob es eine Korrelation der SOCS-Expression und der Produktion proinflammatorischer Zytokine mit der Morbidität, der Schwere der histologischen Veränderungen und der Parasitenzahl im Ileum sowie mit den Frequenzen bestimmter Leukozytenpopulationen gibt. Dazu wurden Tiere der oben genannten Mausstämmen oral mit 100 Zysten *T. gondii* infiziert und im Verlauf der Infektion gewogen. An Tag 7 nach der Infektion wurden Milz, MLN und Ileum der Tiere entnommen und die histologischen Veränderungen im Ileum, die Anzahl der Parasiten sowie die Konzentrationen der wesentlich an der Pathologie beteiligten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-6 und IL-23p19 bestimmt. Weiterhin wurden die Expressionen von SOCS-1 und SOCS-3 sowie die relativen Frequenzen bestimmter Leukozytenpopulationen bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass die orale Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* zu einer Induktion des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$  und der „Th17“-Zytokine IL-6 und IL-23p19 führt, die genetisch reguliert ist. Die lokalen Konzentrationen der „Th17“-Zytokine, nicht aber die des Th1-Zytokins IFN- $\gamma$ , korrelierten hierbei mit Morbidität, histopathologischen Veränderungen und Parasitenlast im Ileum der Mäuse sowie mit einer erhöhten Frequenz von Makrophagen. Dies sollte auf eine wichtigere Rolle für die „Th17“- als für die Th1-Immunantwort bei der Entstehung der Pathologie hindeuten. Systemisch waren die Konzentrationen sowohl der Th1- als auch der „Th17“-Zytokine hingegen bei den resistenten Mausstämmen höher als bei den suszeptiblen Mäusen. Ob dies zur Resistenz der Mäuse gegenüber der Infektion beiträgt, könnte ein Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass es *in vivo* unter der Infektion mit *T. gondii* zu einer Induktion von SOCS-1 und SOCS-3 kommt, die mit der Produktion der proinflammatorischen Th1- und „Th17“-Zytokine in lokalen und systemischen

## 5. Zusammenfassung

---

Kompartimenten korreliert und daher vermutlich als Reaktion auf erhöhte Zytokinkonzentrationen zu betrachten ist. Auffällig war insbesondere eine bei den suszeptiblen Mäusen signifikant erhöhte lokale Induktion von SOCS-3, für das eine spezielle regulatorische Rolle von IL-6 angenommen wird. Die unterschiedliche Induktion der SOCS-Proteine sollte in weiterführenden Arbeiten durch Depletionsexperimente oder aber in Modellen von Knockout-Mäusen oder transgenen Tieren untersucht werden, um eine Rolle der SOCS-Proteine für die Resistenz oder Suszeptibilität gegenüber der Entwicklung der intestinalen Immunpathologie zu klären.

## A. Literaturverzeichnis

- [1] Kirsner, J. B. und R. G. Shorter: *Recent developments in “nonspecific“ inflammatory bowel disease (first of two parts)*. N Engl J Med, 306(13):775–785, Apr 1982.
- [2] Roses, Robert E und John L Rombeau: *Recent trends in the surgical management of inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 14(3):408–412, Jan 2008.
- [3] Kozuch, Patricia L und Stephen B Hanauer: *Treatment of inflammatory bowel disease: a review of medical therapy*. World J Gastroenterol, 14(3):354–377, Jan 2008.
- [4] Parronchi, P., P. Romagnani, F. Annunziato, S. Sampognaro, A. Becchio, L. Giannarini, E. Maggi, C. Pupilli, F. Tonelli und S. Romagnani: *Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn’s disease*. Am J Pathol, 150(3):823–832, Mar 1997.
- [5] Liesenfeld, O.: *Immune responses to Toxoplasma gondii in the gut*. Immunobiology, 201(2):229–39, 1999. 0171-2985 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Review.
- [6] Suzuki, Y., K. Joh, M. A. Orellana, F. K. Conley und J. S. Remington: *A gene(s) within the H-2D region determines the development of toxoplasmic encephalitis in mice*. Immunology, 74(4):732–739, Dec 1991.
- [7] Liesenfeld, O., J. Kosek, J. S. Remington und Y. Suzuki: *Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gamma-mediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with Toxoplasma gondii*. J Exp Med, 184(2):597–607, 1996. 0022-1007 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S.
- [8] Khan, I. A., J. D. Schwartzman, T. Matsuura und L. H. Kasper: *A dichotomous role for nitric oxide during acute Toxoplasma gondii infection in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(25):13955–60, 1997. 0027-8424 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S.
- [9] Liesenfeld, O., H. Kang, D. Park, T. A. Nguyen, C. V. Parkhe, H. Watanabe, T. Abo, A. Sher, J. S. Remington und Y. Suzuki: *TNF-alpha, nitric oxide and IFN-gamma are all critical for development of necrosis in the small intestine and early mortality in genetically susceptible mice infected perorally with Toxoplasma gondii*. Parasite Immunol, 21(7):365–76, 1999. 0141-9838 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S.

- [10] Mennechet, F. J., L. H. Kasper, N. Rachinel, W. Li, A. Vandewalle und D. Buzoni-Gatel: *Lamina propria CD4+ T lymphocytes synergize with murine intestinal epithelial cells to enhance proinflammatory response against an intracellular pathogen.* J Immunol, 168(6):2988–96, 2002. 0022-1767 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [11] Liesenfeld, O.: *Oral infection of C57BL/6 mice with Toxoplasma gondii: a new model of inflammatory bowel disease?* J Infect Dis, 185 Suppl 1:S96–101, 2002. 0022-1899 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- [12] Mosmann, T. R. und R. L. Coffman: *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.* Annu Rev Immunol, 7:145–73, 1989. 0732-0582 (Print) Journal Article Review.
- [13] Romagnani, S.: *Lymphokine production by human T cells in disease states.* Annu Rev Immunol, 12:227–57, 1994. 0732-0582 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- [14] Seder, R. A.: *Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells.* J Allergy Clin Immunol, 94(6 Pt 2):1195–202, 1994. 0091-6749 (Print) Journal Article Review.
- [15] Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel und M. Aguet: *Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor.* Science, 259(5102):1742–5, 1993. 0036-8075 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [16] Pearl, J. E., B. Saunders, S. Ehlers, I. M. Orme und A. M. Cooper: *Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-gamma-deficient mouse.* Cell Immunol, 211(1):43–50, 2001. 0008-8749 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [17] Broek, M. F. van den, U. Muller, S. Huang, R. M. Zinkernagel und M. Aguet: *Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors.* Immunol Rev, 148:5–18, 1995. 0105-2896 (Print) Journal Article Review.
- [18] Buchmeier, N. A. und R. D. Schreiber: *Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of Listeria monocytogenes infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 82(21):7404–8, 1985. 0027-8424 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [19] Kamijo, R., J. Le, D. Shapiro, E. A. Havell, S. Huang, M. Aguet, M. Bosland und J. Vilcek: *Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to*

- infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide.* J Exp Med, 178(4):1435–40, 1993. 0022-1007 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [20] Suzuki, Y., M. A. Orellana, R. D. Schreiber und J. S. Remington: *Interferon-gamma: the major mediator of resistance against Toxoplasma gondii.* Science, 240(4851):516–8, 1988. 0036-8075 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [21] Coffman, R. L., B. W. Seymour, D. A. Leberman, D. D. Hiraki, J. A. Christiansen, B. Shrader, H. M. Cherwinski, H. F. Savelkoul, F. D. Finkelman und M. W. Bond: *The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation.* Immunol Rev, 102:5–28, Feb 1988.
- [22] Murphy, K. M.: *T lymphocyte differentiation in the periphery.* Curr Opin Immunol, 10(2):226–232, Apr 1998.
- [23] Prete, G. Del, E. Maggi, P. Parronchi, I. Chrétien, A. Tiri, D. Macchia, M. Ricci, J. Ban-  
chereau, J. De Vries und S. Romagnani: *IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis  
induced in vitro by human T cell clones and their supernatants.* J Immunol, 140(12):4193–  
4198, Jun 1988.
- [24] Beissert, Stefan, Agatha Schwarz und Thomas Schwarz: *Regulatory T cells.* J Invest  
Dermatol, 126(1):15–24, Jan 2006.
- [25] Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh und M. Toda: *Immunologic self-tolerance  
maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown  
of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.* J Immunol,  
155(3):1151–1164, Aug 1995.
- [26] Asano, M., M. Toda, N. Sakaguchi und S. Sakaguchi: *Autoimmune disease as a conse-  
quence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.* J Exp Med, 184(2):387–  
396, Aug 1996.
- [27] Aggarwal, Sudeepta, Nico Ghilardi, Ming-Hong Xie, Frederic J de Sauvage und Austin L  
Gurney: *Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by  
the production of interleukin-17.* J Biol Chem, 278(3):1910–1914, Jan 2003.
- [28] Harrington, Laurie E, Robin D Hatton, Paul R Mangan, Henrietta Turner, Theresa L  
Murphy, Kenneth M Murphy und Casey T Weaver: *Interleukin 17-producing CD4+ effector  
T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.* Nat Immunol,  
6(11):1123–1132, Nov 2005.

- [29] Langrish, Claire L, Yi Chen, Wendy M Blumenschein, Jeanine Mattson, Beth Basham, Jonathan D Sedgwick, Terrill McClanahan, Robert A Kastelein und Daniel J Cua: *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 201(2):233–240, Jan 2005.
- [30] Liang, Spencer C, Xiang-Yang Tan, Deborah P Luxenberg, Riyez Karim, Kyriaki Dunussi-Joannopoulos, Mary Collins und Lynette A Fouser: *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, 203(10):2271–2279, Oct 2006.
- [31] Chen, Yi, Claire L Langrish, Brent McKenzie, Barbara Joyce-Shaikh, Jason S Stumhofer, Terrill McClanahan, Wendy Blumenschein, Tatyana Churakovsa, Justin Low, Leonard Presta, Christopher A Hunter, Robert A Kastelein und Daniel J Cua: *Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis*. J Clin Invest, 116(5):1317–1326, May 2006.
- [32] Cua, Daniel J, Jonathan Sherlock, Yi Chen, Craig A Murphy, Barbara Joyce, Brian Seymour, Linda Lucian, Wayne To, Sylvia Kwan, Tatyana Churakova, Sandra Zurawski, Maria Wiekowski, Sergio A Lira, Daniel Gorman, Robert A Kastelein und Jonathon D Sedgwick: *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 421(6924):744–748, Feb 2003.
- [33] Murphy, Craig A, Claire L Langrish, Yi Chen, Wendy Blumenschein, Terrill McClanahan, Robert A Kastelein, Jonathon D Sedgwick und Daniel J Cua: *Divergent pro- and anti-inflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation*. J Exp Med, 198(12):1951–1957, Dec 2003.
- [34] Fujino, S., A. Andoh, S. Bamba, A. Ogawa, K. Hata, Y. Araki, T. Bamba und Y. Fujiyama: *Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease*. Gut, 52(1):65–70, Jan 2003.
- [35] Manetti, R., P. Parronchi, M. G. Giudizi, M. P. Piccinni, E. Maggi, G. Trinchieri und S. Romagnani: *Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells*. J Exp Med, 177(4):1199–1204, Apr 1993.
- [36] Micallef, M. J., T. Ohtsuki, K. Kohno, F. Tanabe, S. Ushio, M. Namba, T. Tanimoto, K. Torigoe, M. Fujii, M. Ikeda, S. Fukuda und M. Kurimoto: *Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production*. Eur J Immunol, 26(7):1647–1651, Jul 1996.

- [37] Maggi, E., P. Parronchi, R. Manetti, C. Simonelli, M. P. Piccinni, F. S. Rugiu, M. De Carli, M. Ricci und S. Romagnani: *Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones*. J Immunol, 148(7):2142–2147, Apr 1992.
- [38] Wurster, Andrea L, Vikki L Rodgers, Abhay R Satoskar, Matthew J Whitters, Deborah A Young, Mary Collins und Michael J Grusby: *Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells*. J Exp Med, 196(7):969–977, Oct 2002.
- [39] Veldhoen, Marc, Richard J Hocking, Christopher J Atkins, Richard M Locksley und Brigitta Stockinger: *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells*. Immunity, 24(2):179–189, Feb 2006.
- [40] Bettelli, Estelle, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B Strom, Mohamed Oukka, Howard L Weiner und Vijay K Kuchroo: *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 441(7090):235–238, May 2006.
- [41] Mangan, Paul R, Laurie E Harrington, Darrell B O’Quinn, Whitney S Helms, Daniel C Bullard, Charles O Elson, Robin D Hatton, Sharon M Wahl, Trenton R Schoeb und Casey T Weaver: *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 441(7090):231–234, May 2006.
- [42] Perussia, B.: *Lymphokine-activated killer cells, natural killer cells and cytokines*. Curr Opin Immunol, 3(1):49–55, 1991. 0952-7915 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S. Review.
- [43] Sad, S., R. Marcotte und T. R. Mosmann: *Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines*. Immunity, 2(3):271–9, 1995. 1074-7613 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t.
- [44] Young, H. A.: *Regulation of interferon-gamma gene expression*. J Interferon Cytokine Res, 16(8):563–8, 1996. 1079-9907 (Print) Journal Article Review.
- [45] Carnaud, C., D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka und A. Bendelac: *Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells*. J Immunol, 163(9):4647–50, 1999. 0022-1767 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov’t Research Support, U.S. Gov’t, P.H.S.
- [46] Frucht, D. M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J. J. O’Shea und S. Koyasu: *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol,

- 22(10):556–60, 2001. 1471-4906 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Review.
- [47] Gessani, S. und F. Belardelli: *IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance*. Cytokine Growth Factor Rev, 9(2):117–23, 1998. 1359-6101 (Print) Journal Article Review.
- [48] Bancroft, G. J., R. D. Schreiber und E. R. Unanue: *Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse*. Immunol Rev, 124:5–24, Dec 1991.
- [49] Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann und M. Modolell: *Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation*. J Exp Med, 187(12):2103–8, 1998. 0022-1007 (Print) Journal Article.
- [50] Fukao, T., S. Matsuda und S. Koyasu: *Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells*. J Immunol, 164(1):64–71, 2000. 0022-1767 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [51] Otani, T., S. Nakamura, M. Toki, R. Motoda, M. Kurimoto und K. Orita: *Identification of IFN-gamma-producing cells in IL-12/IL-18-treated mice*. Cell Immunol, 198(2):111–9, 1999. 0008-8749 (Print) Journal Article.
- [52] Hardy, K. J. und T. Sawada: *Human gamma interferon strongly upregulates its own gene expression in peripheral blood lymphocytes*. J Exp Med, 170(3):1021–1026, Sep 1989.
- [53] Sen, G. C.: *Viruses and interferons*. Annu Rev Microbiol, 55:255–81, 2001. 0066-4227 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S. Review.
- [54] Schindler, H., M. B. Lutz, M. Rollinghoff und C. Bogdan: *The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4*. J Immunol, 166(5):3075–82, 2001. 0022-1767 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [55] Fukao, T., D. M. Frucht, G. Yap, M. Gadina, J. J. O'Shea und S. Koyasu: *Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses*. J Immunol, 166(7):4446–55, 2001. 0022-1767 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [56] Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog und M. O'Keeffe: *Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets*. J

- Immunol, 166(9):5448–55, 2001. 0022-1767 (Print) Comparative Study Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [57] Alexander, W. S., R. Starr, J. E. Fenner, C. L. Scott, E. Handman, N. S. Sprigg, J. E. Corbin, A. L. Cornish, R. Darwiche, C. M. Owczarek, T. W. Kay, N. A. Nicola, P. J. Hertzog, D. Metcalf und D. J. Hilton: *SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine*. Cell, 98(5):597–608, 1999. 0092-8674 (Print) Journal Article.
- [58] Major, A. S. und C. F. Cuff: *Effects of the route of infection on immunoglobulin G subclasses and specificity of the reovirus-specific humoral immune response*. J Virol, 70(9):5968–74, 1996. 0022-538X (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [59] Autenrieth, I. B., M. Beer, E. Bohn, S. H. Kaufmann und J. Heesemann: *Immune responses to Yersinia enterocolitica in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon*. Infect Immun, 62(6):2590–9, 1994. 0019-9567 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [60] Breen, F. N., D. A. Hume und M. J. Weidemann: *Interactions among granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, and IFN-gamma lead to enhanced proliferation of murine macrophage progenitor cells*. J Immunol, 147(5):1542–1547, Sep 1991.
- [61] Perussia, B., E. T. Dayton, V. Fanning, P. Thiagarajan, J. Hoxie und G. Trinchieri: *Immune interferon and leukocyte-conditioned medium induce normal and leukemic myeloid cells to differentiate along the monocytic pathway*. J Exp Med, 158(6):2058–80, 1983. 0022-1007 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [62] Young, H. A. und K. J. Hardy: *Role of interferon-gamma in immune cell regulation*. J Leukoc Biol, 58(4):373–81, 1995. 0741-5400 (Print) Journal Article Review.
- [63] Boehm, U., T. Klamp, M. Groot und J. C. Howard: *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 15:749–95, 1997. 0732-0582 (Print) Journal Article Review.
- [64] Finkelman, F. D., I. M. Katona, T. R. Mosmann und R. L. Coffman: *IFN-gamma regulates the isotypes of Ig secreted during in vivo humoral immune responses*. J Immunol, 140(4):1022–7, 1988. 0022-1767 (Print) Journal Article Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.

- [65] Groettrup, M., S. Khan, K. Schwarz und G. Schmidtke: *Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why?* Biochimie, 83(3-4):367–372, 2001.
- [66] Naka, T., M. Narazaki, M. Hirata, T. Matsumoto, S. Minamoto, A. Aono, N. Nishimoto, T. Kajita, T. Taga, K. Yoshizaki, S. Akira und T. Kishimoto: *Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor.* Nature, 387(6636):924–9, 1997. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [67] Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola und D. J. Hilton: *A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.* Nature, 387(6636):917–21, 1997. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [68] Lee, J. Y., D. Goldman, L. M. Piliero, M. Petri und K. E. Sullivan: *Interferon-gamma polymorphisms in systemic lupus erythematosus.* Genes Immun, 2(5):254–7, 2001. 1466-4879 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [69] Baechler, E. C., F. M. Batliwalla, G. Karypis, P. M. Gaffney, W. A. Ortmann, K. J. Espe, K. B. Shark, W. J. Grande, K. M. Hughes, V. Kapur, P. K. Gregersen und T. W. Behrens: *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 100(5):2610–5, 2003. 0027-8424 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [70] Panitch, H. S., R. L. Hirsch, A. S. Haley und K. P. Johnson: *Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon.* Lancet, 1(8538):893–5, 1987. 0140-6736 (Print) Clinical Trial Journal Article Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, Non-P.H.S. Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [71] Sarvetnick, N., D. Liggitt, S. L. Pitts, S. E. Hansen und T. A. Stewart: *Insulin-dependent diabetes mellitus induced in transgenic mice by ectopic expression of class II MHC and interferon-gamma.* Cell, 52(5):773–82, 1988. 0092-8674 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [72] Awata, T., C. Matsumoto, T. Urakami, R. Hagura, S. Amemiya und Y. Kanazawa: *Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM.* Diabetologia, 37(11):1159–62, 1994. 0012-186X (Print) Journal Article.

- [73] Wang, B., I. Andre, A. Gonzalez, J. D. Katz, M. Aguet, C. Benoist und D. Mathis: *Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 94(25):13844–9, 1997. 0027-8424 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [74] Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki und T. Taga: *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. Blood, 86(4):1243–1254, Aug 1995.
- [75] Naka, Tetsuji, Norihiro Nishimoto und Tadamitsu Kishimoto: *The paradigm of IL-6: from basic science to medicine*. Arthritis Res, 4 Suppl 3:S233–S242, 2002.
- [76] Kishimoto, Tadamitsu: *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine*. Arthritis Res Ther, 8 Suppl 2:S2, 2006.
- [77] Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, O. Ishida, H. Ikeda, O. Tsuruta, K. Harada, H. Tateishi, T. Nishiyama und K. Tanikawa: *Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6*. Gut, 36(1):45–49, Jan 1995.
- [78] Reinisch, W., C. Gasché, W. Tillinger, J. Wyatt, C. Lichtenberger, M. Willheim, C. Dejaco, T. Waldhör, S. Bakos, H. Vogelsang, A. Gangl und H. Lochs: *Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease: single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse*. Am J Gastroenterol, 94(8):2156–2164, Aug 1999.
- [79] Kemseke, C. Van, J. Belaiche und E. Louis: *Frequently relapsing Crohn's disease is characterized by persistent elevation in interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor serum levels during remission*. Int J Colorectal Dis, 15(4):206–210, Aug 2000.
- [80] Yamamoto, M., K. Yoshizaki, T. Kishimoto und H. Ito: *IL-6 is required for the development of Th1 cell-mediated murine colitis*. J Immunol, 164(9):4878–4882, May 2000.
- [81] Oppmann, B., R. Lesley, B. Blom, J. C. Timans, Y. Xu, B. Hunte, F. Vega, N. Yu, J. Wang, K. Singh, F. Zonin, E. Vaisberg, T. Churakova, M. Liu, D. Gorman, J. Wagner, S. Zurawski, Y. Liu, J. S. Abrams, K. W. Moore, D. Rennick, R. de Waal-Malefyt, C. Hannum, J. F. Bazan und R. A. Kastelein: *Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12*. Immunity, 13(5):715–725, Nov 2000.
- [82] Becker, Christoph, Stefan Wirtz, Manfred Blessing, Jaana Pirhonen, Dennis Strand, Oliver Bechthold, Julia Frick, Peter R Galle, Ingo Autenrieth und Markus F Neurath: *Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells*. J Clin Invest, 112(5):693–706, Sep 2003.

- [83] Uhlig, Holm H, Brent S McKenzie, Sophie Hue, Claire Thompson, Barbara Joyce-Shaikh, Renata Stepankova, Nicolas Robinson, Sofia Buonocore, Helena Tlaskalova-Hogenova, Daniel J Cua und Fiona Powrie: *Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology*. *Immunity*, 25(2):309–318, Aug 2006.
- [84] Hue, Sophie, Philip Ahern, Sofia Buonocore, Marika C Kullberg, Daniel J Cua, Brent S McKenzie, Fiona Powrie und Kevin J Maloy: *Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation*. *J Exp Med*, 203(11):2473–2483, Oct 2006.
- [85] Lieberman, Linda A, Fabiola Cardillo, Alexander M Owyang, Donna M Rennick, Daniel J Cua, Robert A Kastelein und Christopher A Hunter: *IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12*. *J Immunol*, 173(3):1887–1893, Aug 2004.
- [86] Kullberg, Marika C, Dragana Jankovic, Carl G Feng, Sophie Hue, Peter L Gorelick, Brent S McKenzie, Daniel J Cua, Fiona Powrie, Allen W Cheever, Kevin J Maloy und Alan Sher: *IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis*. *J Exp Med*, 203(11):2485–2494, Oct 2006.
- [87] Yen, David, Jeanne Cheung, Heleen Scheerens, Frédérique Poulet, Terrill McClanahan, Brent McKenzie, Melanie A Kleinschek, Alex Owyang, Jeanine Mattson, Wendy Blumenschein, Erin Murphy, Manjiri Sathe, Daniel J Cua, Robert A Kastelein und Donna Rennick: *IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6*. *J Clin Invest*, 116(5):1310–1316, May 2006.
- [88] Schmidt, Carsten, Thomas Giese, Bianca Ludwig, Ina Mueller-Molaian, Thomas Marth, Stefan Zeuzem, Stefan C Meuer und Andreas Stallmach: *Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis*. *Inflamm Bowel Dis*, 11(1):16–23, Jan 2005.
- [89] Duerr, Richard H, Kent D Taylor, Steven R Brant, John D Rioux, Mark S Silverberg, Mark J Daly, A. Hillary Steinhart, Clara Abraham, Miguel Regueiro, Anne Griffiths, Themistocles Dassopoulos, Alain Bitton, Huiying Yang, Stephan Targan, Lisa Wu Datta, Emily O Kistner, L. Philip Schumm, Annette T Lee, Peter K Gregersen, M. Michael Barmada, Jerome I Rotter, Dan L Nicolae und Judy H Cho: *A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene*. *Science*, 314(5804):1461–1463, Dec 2006.
- [90] Kamada, Nobuhiko, Tadakazu Hisamatsu, Susumu Okamoto, Hiroshi Chinen, Taku Kobayashi, Toshiro Sato, Atsushi Sakuraba, Mina T Kitazume, Akira Sugita, Kazutaka Koganei, Kiyoko S Akagawa und Toshifumi Hibi: *Unique CD14 intestinal macrophages*

- contribute to the pathogenesis of Crohn disease via IL-23/IFN-gamma axis.* J Clin Invest, 118(6):2269–2280, Jun 2008.
- [91] Shanahan, Fergus: *Crohn's disease.* Lancet, 359(9300):62–69, Jan 2002.
- [92] Hugot, J. P., M. Chamaillard, H. Zouali, S. Lesage, J. P. Cézard, J. Belaiche, S. Almer, C. Tysk, C. A. O'Morain, M. Gassull, V. Binder, Y. Finkel, A. Cortot, R. Modigliani, P. Laurent-Puig, C. Gower-Rousseau, J. Macry, J. F. Colombel, M. Sahbatou und G. Thomas: *Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease.* Nature, 411(6837):599–603, May 2001.
- [93] Ogura, Y., D. K. Bonen, N. Inohara, D. L. Nicolae, F. F. Chen, R. Ramos, H. Britton, T. Moran, R. Karaliuskas, R. H. Duerr, J. P. Achkar, S. R. Brant, T. M. Bayless, B. S. Kirschner, S. B. Hanauer, G. Nuñez und J. H. Cho: *A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.* Nature, 411(6837):603–606, May 2001.
- [94] Satsangi, J., M. Parkes, E. Louis, L. Hashimoto, N. Kato, K. Welsh, J. D. Terwilliger, G. M. Lathrop, J. I. Bell und D. P. Jewell: *Two stage genome-wide search in inflammatory bowel disease provides evidence for susceptibility loci on chromosomes 3, 7 and 12.* Nat Genet, 14(2):199–202, Oct 1996.
- [95] McGovern, Dermot P B, Pirro Hysi, Tariq Ahmad, David A van Heel, Miriam F Moffatt, Alisoun Carey, William O C Cookson und Derek P Jewell: *Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease.* Hum Mol Genet, 14(10):1245–1250, May 2005.
- [96] Pender, S. L., J. M. Fell, S. M. Chamow, A. Ashkenazi und T. T. MacDonald: *A p55 TNF receptor immunoadhesin prevents T cell-mediated intestinal injury by inhibiting matrix metalloproteinase production.* J Immunol, 160(8):4098–4103, Apr 1998.
- [97] Sebastiano, P. Di, F. F. di Mola, L. Artese, C. Rossi, G. Mascetta, H. Pernthaler und P. Innocenti: *Beneficial effects of Batimastat (BB-94), a matrix metalloproteinase inhibitor, in rat experimental colitis.* Digestion, 63(4):234–239, 2001.
- [98] Belladonna, Maria Laura, Jean-Christophe Renaud, Roberta Bianchi, Carmine Vacca, Francesca Fallarino, Ciriana Orabona, Maria Cristina Fioretti, Ursula Grohmann und Paolo Puccetti: *IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells.* J Immunol, 168(11):5448–5454, Jun 2002.
- [99] Kolls, Jay K und Anders Lindén: *Interleukin-17 family members and inflammation.* Immunity, 21(4):467–476, Oct 2004.

- [100] McKenzie, Brent S, Robert A Kastelein und Daniel J Cua: *Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway*. Trends Immunol, 27(1):17–23, Jan 2006.
- [101] Dotan, Iris, Matthieu Allez, Atsushi Nakazawa, Jens Brimnes, Micoll Schulder-Katz und Lloyd Mayer: *Intestinal epithelial cells from inflammatory bowel disease patients preferentially stimulate CD4+ T cells to proliferate and secrete interferon-gamma*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292(6):G1630–G1640, Jun 2007.
- [102] Blumberg, R. S., L. J. Saubermann und W. Strober: *Animal models of mucosal inflammation and their relation to human inflammatory bowel disease*. Curr Opin Immunol, 11(6):648–656, Dec 1999.
- [103] Simpson, S. J., S. Shah, M. Comiskey, Y. P. de Jong, B. Wang, E. Mizoguchi, A. K. Bhan und C. Terhorst: *T cell-mediated pathology in two models of experimental colitis depends predominantly on the interleukin 12/Signal transducer and activator of transcription (Stat)-4 pathway, but is not conditional on interferon gamma expression by T cells*. J Exp Med, 187(8):1225–1234, Apr 1998.
- [104] Monteleone, G., F. Trapasso, T. Parrello, L. Biancone, A. Stella, R. Iuliano, F. Lizza, A. Fusco und F. Pallone: *Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease*. J Immunol, 163(1):143–147, Jul 1999.
- [105] Pizarro, T. T., M. H. Michie, M. Bentz, J. Woraratanadharm, M. F. Smith, E. Foley, C. A. Moskaluk, S. J. Bickston und F. Cominelli: *IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells*. J Immunol, 162(11):6829–6835, Jun 1999.
- [106] Yoshimura, A., T. Ohkubo, T. Kiguchi, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, T. Hara und A. Miyajima: *A novel cytokine-inducible gene CIS encodes an SH2-containing protein that binds to tyrosine-phosphorylated interleukin 3 and erythropoietin receptors*. Embo J, 14(12):2816–26, 1995. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- [107] Endo, T. A., M. Masuhara, M. Yokouchi, R. Suzuki, H. Sakamoto, K. Mitsui, A. Matsumoto, S. Tanimura, M. Ohtsubo, H. Misawa, T. Miyazaki, N. Leonor, T. Taniguchi, T. Fujita, Y. Kanakura, S. Komiyama und A. Yoshimura: *A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases*. Nature, 387(6636):921–4, 1997. 0028-0836 (Print) Journal Article.
- [108] Hilton, D. J., R. T. Richardson, W. S. Alexander, E. M. Viney, T. A. Willson, N. S. Sprigg, R. Starr, S. E. Nicholson, D. Metcalf und N. A. Nicola: *Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(1):114–9, 1998. 0027-8424 (Print) Journal Article.

- [109] Yoshimura, Akihiko, Tetsuji Naka und Masato Kubo: *SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation*. Nat Rev Immunol, 7(6):454–465, Jun 2007.
- [110] Wormald, S., J. G. Zhang, D. L. Krebs, L. A. Mielke, J. Silver, W. S. Alexander, T. P. Speed, N. A. Nicola und D. J. Hilton: *The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling*. J Biol Chem, 281(16):11135–43, 2006. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [111] Albanesi, Cristina, Heather R Fairchild, Stefania Madonna, Claudia Scarponi, Ornella De Pità, Donald Y M Leung und Michael D Howell: *IL-4 and IL-13 negatively regulate TNF-alpha- and IFN-gamma-induced beta-defensin expression through STAT-6, suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, and SOCS-3*. J Immunol, 179(2):984–992, Jul 2007.
- [112] Jackson, Sharon H, Cheng-Rong Yu, Rashid M Mahdi, Samuel Ebong und Charles E Egwuagu: *Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling*. J Immunol, 172(4):2307–2315, Feb 2004.
- [113] Kubo, M., T. Hanada und A. Yoshimura: *Suppressors of cytokine signaling and immunity*. Nat Immunol, 4(12):1169–76, 2003. 1529-2908 (Print) Journal Article Review.
- [114] Yasukawa, H., H. Misawa, H. Sakamoto, M. Masuhara, A. Sasaki, T. Wakioka, S. Ohtsuka, T. Imaizumi, T. Matsuda, J. N. Ihle und A. Yoshimura: *The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop*. Embo J, 18(5):1309–20, 1999. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- [115] Narazaki, M., M. Fujimoto, T. Matsumoto, Y. Morita, H. Saito, T. Kajita, K. Yoshizaki, T. Naka und T. Kishimoto: *Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(22):13130–4, 1998. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [116] Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr und G. R. Stark: *Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins*. Science, 264(5164):1415–21, 1994. 0036-8075 (Print) Journal Article Review.
- [117] Lutticken, C., U. M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A. G. Harpur, A. F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga und et al.: *Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130*. Science, 263(5143):89–92, 1994. 0036-8075 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't.
- [118] Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini und et al.: *Association and activation of Jak-Tyk*

- kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components.* Science, 263(5143):92–5, 1994. 0036-8075 (Print) Journal Article Research Support, Non-U.S. Gov't Research Support, U.S. Gov't, P.H.S.
- [119] Guschin, D., N. Rogers, J. Briscoe, B. Witthuhn, D. Watling, F. Horn, S. Pellegrini, K. Yasukawa, P. Heinrich, G. R. Stark und et al.: *A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6.* Embo J, 14(7):1421–9, 1995. 0261-4189 (Print) Journal Article.
- [120] Naka, T., T. Matsumoto, M. Narazaki, M. Fujimoto, Y. Morita, Y. Ohsawa, H. Saito, T. Nagasawa, Y. Uchiyama und T. Kishimoto: *Accelerated apoptosis of lymphocytes by augmented induction of Bax in SSI-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1) deficient mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 95(26):15577–82, 1998. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [121] Starr, R., D. Metcalf, A. G. Elefanty, M. Brysha, T. A. Willson, N. A. Nicola, D. J. Hilton und W. S. Alexander: *Liver degeneration and lymphoid deficiencies in mice lacking suppressor of cytokine signaling-1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 95(24):14395–9, 1998. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [122] Marine, J. C., D. J. Topham, C. McKay, D. Wang, E. Parganas, D. Stravopodis, A. Yoshimura und J. N. Ihle: *SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality.* Cell, 98(5):609–16, 1999. 0092-8674 (Print) Journal Article.
- [123] Metcalf, D., S. Mifsud, L. Di Rago, N. A. Nicola, D. J. Hilton und W. S. Alexander: *Polycystic kidneys and chronic inflammatory lesions are the delayed consequences of loss of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1).* Proc Natl Acad Sci U S A, 99(2):943–8, 2002. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [124] Morita, Y., T. Naka, Y. Kawazoe, M. Fujimoto, M. Narazaki, R. Nakagawa, H. Fukuyama, S. Nagata und T. Kishimoto: *Signals transducers and activators of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor-1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) suppresses tumor necrosis factor alpha-induced cell death in fibroblasts.* Proc Natl Acad Sci U S A, 97(10):5405–10, 2000. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [125] Metcalf, D., W. S. Alexander, A. G. Elefanty, N. A. Nicola, D. J. Hilton, R. Starr, S. Mifsud und L. Di Rago: *Aberrant hematopoiesis in mice with inactivation of the gene encoding SOCS-1.* Leukemia, 13(6):926–34, 1999. 0887-6924 (Print) Journal Article.
- [126] Chen, Y., M. M. Chong, R. Darwiche, H. E. Thomas und T. W. Kay: *Severe pancreatitis with exocrine destruction and increased islet neogenesis in mice with suppressor of*

- cytokine signaling-1 deficiency*. Am J Pathol, 165(3):913–21, 2004. 0002-9440 (Print) Journal Article.
- [127] Marine, J. C., C. McKay, D. Wang, D. J. Topham, E. Parganas, H. Nakajima, H. Pendeville, H. Yasukawa, A. Sasaki, A. Yoshimura und J. N. Ihle: *SOCS3 is essential in the regulation of fetal liver erythropoiesis*. Cell, 98(5):617–27, 1999. 0092-8674 (Print) Journal Article.
- [128] Cassatella, M. A., S. Gasperini, C. Bovolenta, F. Calzetti, M. Vollebregt, P. Scapini, M. Marchi, R. Suzuki, A. Suzuki und A. Yoshimura: *Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation*. Blood, 94(8):2880–2889, Oct 1999.
- [129] Lang, R., A. L. Pauleau, E. Parganas, Y. Takahashi, J. Mages, J. N. Ihle, R. Rutschman und P. J. Murray: *SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling*. Nat Immunol, 4(6):546–50, 2003. 1529-2908 (Print) Journal Article.
- [130] Takatori, Hiroaki, Hiroshi Nakajima, Shin ichiro Kagami, Koichi Hirose, Akira Suto, Kotaro Suzuki, Masato Kubo, Akihiko Yoshimura, Yasushi Saito und Itsuo Iwamoto: *Stat5a inhibits IL-12-induced Th1 cell differentiation through the induction of suppressor of cytokine signaling 3 expression*. J Immunol, 174(7):4105–4112, Apr 2005.
- [131] Yamamoto, Koh, Mitsuko Yamaguchi, Nobuyuki Miyasaka und Osamu Miura: *SOCS-3 inhibits IL-12-induced STAT4 activation by binding through its SH2 domain to the STAT4 docking site in the IL-12 receptor beta2 subunit*. Biochem Biophys Res Commun, 310(4):1188–1193, Oct 2003.
- [132] Seki, Yoh ichi, Hiromasa Inoue, Naoko Nagata, Katsuhiko Hayashi, Satoru Fukuyama, Koichiro Matsumoto, Okiru Komine, Shinjiro Hamano, Kunisuke Himeno, Kyoko Inagaki-Ohara, Nicholas Cacalano, Anne O'Garra, Tadahilo Oshida, Hirohisa Saito, James A Johnston, Akihiko Yoshimura und Masato Kubo: *SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses*. Nat Med, 9(8):1047–1054, Aug 2003.
- [133] Chen, Zhi, Arian Laurence, Yuka Kanno, Margit Pacher-Zavisin, Bing-Mei Zhu, Cristina Tato, Akihiko Yoshimura, Lothar Hennighausen und John J O'Shea: *Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(21):8137–8142, May 2006.
- [134] Li, Yonghai, Niansheng Chu, Abdolmohamad Rostami und Guang-Xian Zhang: *Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo*. J Immunol, 177(3):1679–1688, Aug 2006.

- [135] Croker, B. A., D. L. Krebs, J. G. Zhang, S. Wormald, T. A. Willson, E. G. Stanley, L. Robb, C. J. Greenhalgh, I. Forster, B. E. Clausen, N. A. Nicola, D. Metcalf, D. J. Hilton, A. W. Roberts und W. S. Alexander: *SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo*. Nat Immunol, 4(6):540–5, 2003. 1529-2908 (Print) Journal Article.
- [136] Yasukawa, H., M. Ohishi, H. Mori, M. Murakami, T. Chinen, D. Aki, T. Hanada, K. Takeda, S. Akira, M. Hoshijima, T. Hirano, K. R. Chien und A. Yoshimura: *IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages*. Nat Immunol, 4(6):551–6, 2003. 1529-2908 (Print) Journal Article.
- [137] Nicholson, S. E., D. De Souza, L. J. Fabri, J. Corbin, T. A. Willson, J. G. Zhang, A. Silva, M. Asimakis, A. Farley, A. D. Nash, D. Metcalf, D. J. Hilton, N. A. Nicola und M. Baca: *Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130*. Proc Natl Acad Sci U S A, 97(12):6493–8, 2000. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [138] Stoiber, D., P. Kovarik, S. Cohny, J. A. Johnston, P. Steinlein und T. Decker: *Lipopolysaccharide induces in macrophages the synthesis of the suppressor of cytokine signaling 3 and suppresses signal transduction in response to the activating factor IFN-gamma*. J Immunol, 163(5):2640–7, 1999. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [139] Dalpke, A. H., S. Opper, S. Zimmermann und K. Heeg: *Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs*. J Immunol, 166(12):7082–7089, Jun 2001.
- [140] Roberts, A. W., L. Robb, S. Rakar, L. Hartley, L. Cluse, N. A. Nicola, D. Metcalf, D. J. Hilton und W. S. Alexander: *Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3*. Proc Natl Acad Sci U S A, 98(16):9324–9, 2001. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [141] Robb, L., K. Boyle, S. Rakar, L. Hartley, J. Lochland, A. W. Roberts, W. S. Alexander und D. Metcalf: *Genetic reduction of embryonic leukemia-inhibitory factor production rescues placentation in SOCS3-null embryos but does not prevent inflammatory disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 102(45):16333–8, 2005. 0027-8424 (Print) Journal Article.
- [142] Song, M. M. und K. Shuai: *The suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 and SOCS3 but not SOCS2 proteins inhibit interferon-mediated antiviral and antiproliferative activities*. J Biol Chem, 273(52):35056–62, 1998. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [143] Suzuki, A., T. Hanada, K. Mitsuyama, T. Yoshida, S. Kamizono, T. Hoshino, M. Kubo, A. Yamashita, M. Okabe, K. Takeda, S. Akira, S. Matsumoto, A. Toyonaga, M. Sata und

- A. Yoshimura: *CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation*. J Exp Med, 193(4):471–81, 2001. 0022-1007 (Print) Journal Article.
- [144] Lovato, P., C. Brender, J. Agnholt, J. Kelsen, K. Kaltoft, A. Svejgaard, K. W. Eriksen, A. Woetmann und N. Odum: *Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease*. J Biol Chem, 278(19):16777–81, 2003. 0021-9258 (Print) Journal Article.
- [145] Jo, D., D. Liu, S. Yao, R. D. Collins und J. Hawiger: *Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis*. Nat Med, 11(8):892–8, 2005. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [146] Tebbutt, N. C., A. S. Giraud, M. Inglese, B. Jenkins, P. Waring, F. J. Clay, S. Malki, B. M. Alderman, D. Grail, F. Hollande, J. K. Heath und M. Ernst: *Reciprocal regulation of gastrointestinal homeostasis by SHP2 and STAT-mediated trefoil gene activation in gp130 mutant mice*. Nat Med, 8(10):1089–97, 2002. 1078-8956 (Print) Journal Article.
- [147] Shouda, T., T. Yoshida, T. Hanada, T. Wakioka, M. Oishi, K. Miyoshi, S. Komiya, K. Kosai, Y. Hanakawa, K. Hashimoto, K. Nagata und A. Yoshimura: *Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis*. J Clin Invest, 108(12):1781–8, 2001. 0021-9738 (Print) Journal Article.
- [148] Heimesaat, Markus M, Stefan Bereswill, André Fischer, David Fuchs, Daniela Struck, Julia Niebergall, Hannah-Katharina Jahn, Ildikò R Dunay, Annette Moter, Dorothee M Gescher, Ralf R Schumann, Ulf B Göbel und Oliver Liesenfeld: *Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii*. J Immunol, 177(12):8785–8795, Dec 2006.
- [149] Papadakis, K. A. und S. R. Targan: *Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Annu Rev Med, 51:289–298, 2000.
- [150] Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schütz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J. F. Schlaak, H. A. Lehr, F. Autschbach, G. Schürmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P. R. Galle, S. Rose-John und M. F. Neurath: *Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo*. Nat Med, 6(5):583–588, May 2000.
- [151] Zimmermann, S., P. J. Murray, K. Heeg und A. H. Dalpke: *Induction of suppressor of cytokine signaling-1 by Toxoplasma gondii contributes to immune evasion in macrophages*

- by blocking IFN-gamma signaling.* J Immunol, 176(3):1840–7, 2006. 0022-1767 (Print) Journal Article.
- [152] Tozawa, Kotaro, Hiroyuki Hanai, Ken Sugimoto, Satoshi Baba, Haruhiko Sugimura, Taiki Aoshi, Masato Uchijima, Toshi Nagata und Yukio Koide: *Evidence for the critical role of interleukin-12 but not interferon-gamma in the pathogenesis of experimental colitis in mice.* J Gastroenterol Hepatol, 18(5):578–587, May 2003.
- [153] Kosiewicz, M. M., C. C. Nast, A. Krishnan, J. Rivera-Nieves, C. A. Moskaluk, S. Matsumoto, K. Kozaiwa und F. Cominelli: *Th1-type responses mediate spontaneous ileitis in a novel murine model of Crohn's disease.* J Clin Invest, 107(6):695–702, Mar 2001.
- [154] Mordue, D. G., F. Monroy, M. La Regina, C. A. Dinarello und L. D. Sibley: *Acute toxoplasmosis leads to lethal overproduction of Th1 cytokines.* J Immunol, 167(8):4574–4584, Oct 2001.
- [155] Vossenkämper, Anna, Daniela Struck, Cosme Alvarado-Esquivel, Tobias Went, Kioyshi Takeda, Shizuo Akira, Klaus Pfeffer, Gottfried Alber, Matthias Lochner, Irmgard Förster und Oliver Liesenfeld: *Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control.* Eur J Immunol, 34(11):3197–3207, Nov 2004.

## B. Abbildungsverzeichnis

1.	Entstehung der Kolitis . . . . .	11
2.	SOCS und die Th1/Th2-Balance . . . . .	13
3.	SOCS und sog. Th17-Zellen . . . . .	15
4.	Gewichtsverlauf . . . . .	36
5.	HE-Färbung Ileum . . . . .	37
6.	Histo-Score . . . . .	38
7.	Parasitenlast . . . . .	38
8.	IFN- $\gamma$ im Ileum . . . . .	39
9.	IL-6 im Ileum . . . . .	40
10.	IL-23p19 im Ileum . . . . .	41
11.	IFN- $\gamma$ in der Milz . . . . .	41
12.	IL-6 in der Milz . . . . .	42
13.	SOCS-1 im Ileum . . . . .	44
14.	SOCS-3 im Ileum . . . . .	45
15.	SOCS-1 in der Milz . . . . .	45
16.	SOCS-3 in der Milz . . . . .	46
17.	CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen in den MLN . . . . .	51
18.	Makrophagen und DC's in den MLN . . . . .	52
19.	CD4 <sup>+</sup> - und CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen in der Milz . . . . .	52
20.	Makrophagen und DC's in der Milz . . . . .	53

## C. Tabellenverzeichnis

1. Geräte . . . . .	17
2. Plastikware . . . . .	18
3. Chemikalien . . . . .	19
4. ELISA- und andere Kits . . . . .	20
5. Primer und Proben für IL-23p19 und HPRT . . . . .	21
6. Primer und Proben für SOCS-1, SOCS-3 und $\beta$ -Actin . . . . .	21
7. Durchflusszytometrie-Antikörper . . . . .	22
8. Immunhistologie . . . . .	22
9. DNA-Eliminierung . . . . .	24
10. RT-Master Mix . . . . .	25
11. PCR-Reaktion für IL-23p19 . . . . .	25
12. PCR-Reaktion für SOCS-1 und SOCS-3 . . . . .	25
13. HE-Färbung . . . . .	27
14. Entparaffinieren für die Immunperoxidasefärbung . . . . .	28
15. Gegenfärben der Immunperoxidasefärbung . . . . .	29
16. Histo-Score . . . . .	29
17. IFN- $\gamma$ in Milz und Ileum . . . . .	43
18. IL-6 in Milz und Ileum . . . . .	43
19. SOCS-1/IFN- $\gamma$ -Ratio im Ileum . . . . .	47
20. SOCS-3/IL-6-Ratio im Ileum . . . . .	48
21. SOCS-3/IL-23p19-Ratio im Ileum . . . . .	48
22. SOCS-1/IFN- $\gamma$ -Ratio in der Milz . . . . .	49
23. SOCS-3/IL-6-Ratio in der Milz . . . . .	50

## D. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
APC	antigen-präsentierende Zellen
bzw.	beziehungsweise
CBF	Campus Benjamin Franklin
CD	Cluster of Differentiation
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CIS	Cytokine-inducible-SH2-Domain-containing-Protein
Cp	Crossing points
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
d	Tag
d.h.	das heisst
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DC	dendritische Zellen
dest.	destillata
(c)DNA	(complementary)Desoxyribonukleinsäure
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Epo	Erythropoietin
<i>et al.</i>	et alia
FACS	Flourescence-activated Cell Sorting
FBS	fetales bovines Serum
Fc	fragment crystalline (des Immunglobulins)
FEM	Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin
g	Gramm
<i>g</i>	Erdschwerebeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
G	Gauge
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HE	Hämatoxylin/Eosin
H <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	Schwefelsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase

#### D. Abkürzungsverzeichnis

---

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
inf	infiziert
iNOS	induzierbare Stickstoffoxidsynthetase
i.p.	intraperitoneal
JAK	Januskinase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
<i>log</i>	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli- Meter
$\mu$	Mikro-
M. Crohn	Morbus Crohn
min	Minute
MLN	Mesenteriale Lymphknoten
MMP	Matrix-Metalloproteinase
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NK	Natürliche Killerzellen
NO	Stickstoffoxid
<i>NOD</i>	Nucleotide Oligomerization Domain
p	Piko-
$p$	Wahrscheinlichkeitsmaß der Nullhypothese
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
P/S	Penicillin/Streptomycin
RKI	Robert-Koch-Institut
(m)RNA	(messenger)Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
RTQ	Real-Time-quantitative
s.	siehe

#### D. Abkürzungsverzeichnis

---

s	Sekunde
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
sog.	sogenannt
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming Growth Factor
<i>T. gondii</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidindihydrochlorid
TNBS	Trinitrobenzonsulfonsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel

## E. Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Oliver Liesenfeld. Ich möchte mich bei Dir für die Überlassung des Themas und für die Geduld und Freundlichkeit bedanken, mit der Du mich während der gesamten Zeit unterstützt hast, insbesondere auch gegen Ende der Arbeit trotz großer räumlicher Entfernung.

Ebenso möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Alexander Dalpke und seinen Mitarbeitern im Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Universität Heidelberg für die Überlassung des Themas und für die Durchführung vieler PCR's bedanken.

Weiterer Dank gilt Herrn Uwe Lohmann, der mir durch seine große Kenntnis in fachlichen Fragen sowie in praktischen Arbeiten sehr geholfen hat.

Frau Daniela Struck und Frau Sabrina Lachenmaier danke ich für die unbeirrbar freundliche Einweisung in die Durchführung vieler praktischer Arbeiten sowie für die große freundschaftliche Unterstützung, die ich durch sie erhalten habe.

Bei Frau Solvy Wolke und bei Frau Michaela Wattrodt möchte ich mich ebenfalls für die freundliche Unterstützung während meiner Arbeit bedanken.

Den Tierpflegern der FEM der Charité Gabriela Dambon, Elfriede Decher und Thomas Strandt danke ich herzlich für die immer angenehme Atmosphäre während meiner Arbeit in den Tierställen.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Fritz Pokropp für die hervorragende Beratung zur statistischen Auswertung danken.

Meinen Eltern danke ich ganz herzlich für die große Geduld und immerwährende Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

## **F. Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## G. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Julius Hoehne, erkläre an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Die Rolle der „Suppressor of Cytokine Signaling“ (SOCS)-Proteine bei muriner Infektion mit *Toxoplasma gondii*“ von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Datum:

Unterschrift: