

## 1. Einleitung

### 1.1 Schwierigkeiten in der Therapie des Morbus Crohn

Der M. Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die durch eine transmurale Entzündung gekennzeichnet ist, welche sich bei den meisten Patienten im terminalen Ileum und im Kolon manifestiert, jedoch jeden Teil des Gastrointestinaltraktes betreffen kann. Kompliziert wird die Erkrankung durch die Entstehung von Fisteln, Abszessen, Perforationen und Stenosen sowie extraintestinalen Manifestationen (1). Die gängige Therapie besteht in einer Entzündungshemmung mithilfe von Mesalazin und topisch oder systemisch wirksamen Glukokortikoiden bzw. einer immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin oder Methotrexat. Stenosen, Fisteln und Abszesse müssen meist chirurgisch therapiert werden (1). Viele der Patienten sind jedoch mit den genannten Medikamenten nur unzureichend zu behandeln. Da beim M. Crohn eine gesteigerte lokale Th1-Typ-Immunreaktion vorliegt (2), bei der erhöhte Werte für proinflammatorische Zytokine, u.a. TNF-  $\alpha$  festzustellen sind (3), wurde als Therapiemöglichkeit die Hemmung von TNF-  $\alpha$  durch den Antikörper Infliximab (Maus-humaner chimärer monoklonaler AK gegen TNF-  $\alpha$ ) entwickelt (4, 5). Etwa ein Drittel der Patienten, die auf die Standardtherapie nur unzureichend reagieren, sind mit Infliximab in Remission zu bringen (4). Bislang wurde allerdings von mindestens 70 Tuberkulosefällen (darunter 12 Todesfälle) unter einer Infliximabtherapie berichtet (6). Außerdem können andere Infektionen (z. B. Aspergillose, Candidose) (6) sowie die Bildung von antinukleären Antikörpern (7) und Antikörper gegen Infliximab auftreten (8). Letztere können die Wirksamkeit von Infliximab bei wiederholter Anwendung reduzieren. Andere Medikamente zur TNF-  $\alpha$ -Hemmung wie z. B. Thalidomid sind zwar z. T. erfolgreich (9), stehen jedoch den meisten Patienten nicht zur Verfügung. Da die TNF-  $\alpha$ -Hemmung die beschriebenen Risiken birgt, wird versucht, die übersteigerte Th1-Typ-Immunreaktion der Erkrankung durch Blockade anderer Mechanismen bzw. Zielmoleküle zu beeinflussen. Neben TNF-  $\alpha$  ist auch IL-18 in sowohl Serum als auch der Darmmukosa (10, 11) von Patienten mit M. Crohn verstärkt nachweisbar und scheint an der Entzündungsreaktion dieser Erkrankung beteiligt zu sein.

## 1.2 Orale Infektion der Maus mit *Toxoplasma gondii* als Modell des M. Crohn

Infiziert man C57BL/6-Mäuse oral mit 100 Zysten des Parasiten *T. gondii*, so entwickeln diese Tiere eine ausgeprägte Th1-Typ-Immunreaktion, bei der es im Rahmen der überschießenden Zytokinfreisetzung zu Nekrosen im Ileum und zum Versterben der Mäuse zwischen Tag 7 und 13 nach der Infektion kommt. Des Weiteren entstehen Nekrosen in Leber und Lunge. Sowohl Nekrosenbildung als auch die Parasitenabwehr sind abhängig von CD4<sup>+</sup>- $\alpha\beta$ -T-Zellen und IFN- $\gamma$  (12). Zusätzlich spielen TNF- $\alpha$  und NO eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Ileumpathologie der Mäuse (13). Die orale Infektion der Maus mit *T. gondii* ruft eine überschießende Immunreaktion mit vermehrter Aktivität der genannten proinflammatorischen Zytokine hervor, wie es auch beim M. Crohn der Fall ist. Die jeweilige Hemmung von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12 nach der Infektion schützt die Mäuse vor dem Auftreten der Ileumnekrosen (13, 14, 15). Aufgrund der ähnlich ablaufenden Immunpathologie kann die orale Infektion der Maus mit *T. gondii* als Modell zur Analyse von Immunmechanismen beim M. Crohn benutzt werden. IL-18 ist nach der Infektion in erhöhtem Maße im Serum nachweisbar (16), seine Rolle bei der Immunpathologie jedoch noch unklar. Eine Hemmung von IL-18 könnte das Entstehen der Ileumpathologie nach der Infektion reduzieren und somit als Therapiemodell für den M. Crohn gelten.

## 1.3 Interleukin-18

IL-18 ist ein Zytokin, das ursprünglich als „IFN- $\gamma$ -inducing factor“ (IGIF) beschrieben wurde (17). Das murine IL-18 besteht aus 192 Aminosäuren (humanes IL-18: 193 Aminosäuren bei 65% Homologie zum murinen IL-18) und entsteht aus einem Vorläufermolekül nach Spaltung durch die Caspase-1 (18). IL-18 wird vor allem von aktivierten Makrophagen (17), dendritischen Zellen (19), Keratinozyten (20), intestinalem (21) und respiratorischem Epithel (22) und Osteoblasten (23) gebildet. Das IL-18-Gen besitzt einen konstitutiv aktiven Promotor (reguliert durch PU.1, einem Transkriptionsfaktor, der durch LPS und IFN- $\gamma$  induziert wird) und einen aktivierbaren Promotor (reguliert durch ICSP, einem IRF (24), der durch u.a. IFN- $\gamma$  induziert wird) (25). Der IL-18-Rezeptor findet sich u. a. auf Th1-, NK-, B-, dendritischen Zellen, naiven T-Zellen und Makrophagen. Er besitzt eine IL-18-bindende  $\alpha$ -Untereinheit und eine signalvermittelnde  $\beta$ -Untereinheit (26). Die Signaltransduktion resultiert in

der Aktivierung von NF- $\kappa$ B und AP-1 (27, 28). Der IL-18-Rezeptor wird auf Th1-Zellen unter Einfluss von IL-12 verstärkt exprimiert (29).

Die wesentlichen bekannten Funktionen von IL-18 sind die Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion in T-Zellen (17, 29) und NK-Zellen (30) sowie (unter Kostimulation durch IL-12) in B-Zellen (31), Makrophagen (32) und dendritischen Zellen (33) und die Förderung der Th1-Zellfunktion und -proliferation im Beisein von IL-12 (27, 29). Außerdem induziert IL-18 *in vitro* und *in vivo* eine Chemotaxis auf humane CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen (34). IL-18 fördert unabhängig von IL-12 die Zytotoxizität von NK-Zellen und CD8<sup>+</sup> -T-Zellen (35, 36) und stimuliert die TNF- $\alpha$ -Produktion von Makrophagen (37). Zusammen mit IL-12 hemmt IL-18 die Th2-Differenzierung und die IgE-Produktion (38), wohingegen IL-18 alleine diese beiden Vorgänge fördert (39).

IL-18 werden wesentliche Funktionen bei der Abwehr intrazellulärer Erreger zugeschrieben (37), es scheint jedoch auch an entzündlichen Erkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis (40), Hepatitis C (41) und Lungensarkoidose (42) beteiligt zu sein.

#### **1.4 Hemmung von Interleukin-18 in experimenteller Kolitis der Maus**

In verschiedenen Modellen der experimentellen Kolitis in Mäusen wurde eine entzündliche Immunreaktion induziert, zu der proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 entscheidend beitragen (Übersicht in 43). Untersucht wurde, ob die Hemmung von IL-18 die Entzündung des Kolons der Mäuse verringern kann. Sowohl die Gabe von Kaninchen-AK gegen murines IL-18 (44, 45), rekombinantem IL-18-bindendem Protein (46) als auch IL-18-antisense mRNA (47) konnten die Ausprägung der Kolitis herabsetzen.

#### **1.5 Zielstellung der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von IL-18 auf die Immunpathologie der Maus nach der oralen Infektion mit *T. gondii* untersucht werden. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf die Rolle von IL-18 bei der Ausprägung der Nekrosen im Ileum als auch der Abwehr von *T. gondii* gelegt. Zielsetzung der Arbeit war die Untersuchung, ob sich die Ausprägung der Ileumpathologie der oral mit *T. gondii* infizierten Mäuse nach intraperitonealer Injektion des AK gegen IL-18 vermindern lässt. Gleich-

zeitig wurde untersucht, ob die Abwehr von *T. gondii* durch die Hemmung von IL-18 gestört wird. Außerdem wurde die Effektivität der Hemmung von IL-18 mit der einer Hemmung von IL-12 mittels Antikörper nach oraler Infektion verglichen. Zur Untersuchung der Rolle von IL-18 nach der Infektion wurde neben der Neutralisation durch Antikörper die Ileumpathologie in infizierten IL-18-KO-Mäusen im Vergleich mit infizierten TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen und ICSBP-KO-Mäusen (kein funktionsfähiges IL-12; s. 24) untersucht.

### **1.6 Methodischer Ansatz**

Während in den Modellen der Kolitis in Mäusen (44, 45) zur Hemmung von IL-18 nur polyklonale AK vom Kaninchen verwendet wurden, wurde in dieser Arbeit ein monoklonaler AK der Maus gegen murines IL-18 eingesetzt (48). Die orale Infektion erfolgte mit 100 Zysten *T. gondii*.

Folgende Aspekte wurden bearbeitet:

- Vergleich von infizierten IL-18-KO-Mäuse mit TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen und ICSBP-KO-Mäusen hinsichtlich Ileumpathologie, Parasitenvermehrung in Ileum und Leber, Veränderungen der Leber, Zytokinkonzentrationen in Serum und Zellüberständen von MLN und Milz sowie Letalität nach Infektion mit 100 Zysten und 10 Zysten *T. gondii*.

- Ausprägung der Ileumpathologie, Parasitenvermehrung im Ileum, Veränderungen der Leber bezüglich Nekrosen und Parasitenvorkommen und Zytokinkonzentrationen in Serum und Zellüberständen von MLN und Milz nach

a) einmaliger Injektion von 600  $\mu$ g anti-IL-18

b) zweimaliger Injektion von je 500  $\mu$ g anti-IL-18

c) zweimaliger Injektion von je 500  $\mu$ g anti-IL-18 im Vergleich mit einer zweimaligen Injektion von jeweils 2000  $\mu$ g anti-IL-12.

## 1.7 Kurzzusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die zweimalige Injektion von anti-IL-18 nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* Mäuse vor der Entstehung von Ileumnekrosen schützt. *T. gondii* breitete sich im Darm und anderen Organen der behandelten Mäusen und in den Kontrollmäusen gleichermaßen aus. Die Hemmung von IL-12 nach der Infektion reduzierte signifikant die Ileumnekrosenentstehung und führte zu deutlich erhöhten Parasitenzahlen im Ileum im Vergleich zu infizierten kontrollbehandelten C57BL/6-Mäusen. Der Effekt der Neutralisation von IL-18 und IL-12 nach oraler Infektion zeigte hinsichtlich der Nekrosenentstehung und Parasitenausbreitung im Ileum keinen signifikanten Unterschied.

IL-18-KO-Mäuse entwickelten nach einer 100 Zysten-Infektion ebenfalls Ileumnekrosen und wiesen die gleiche Parasitenausbreitung in Ileum und Leber auf wie infizierte C57BL/6-Mäuse. Infizierte TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse und ICSBP-KO-Mäuse zeigten dagegen signifikant weniger Ileumnekrosen und mehr Parasiten in Darm und Leber als die infizierten C57BL/6-Mäuse. Die Untersuchung der Überlebenszeit nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Überlebenszeit der verschiedenen KO-Mäuse und den C57BL/6-Kontrollmäusen.

Nach einer 10 Zysteninfektion war die Überlebenszeit der TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse und ICSBP-KO-Mäuse signifikant kürzer als die der C57BL/6-Mäuse. Es bestand kein Unterschied in der Überlebenszeit zwischen den C57BL/6-Mäusen und den IL-18-KO-Mäusen, welche die 10 Zysteninfektion über mehrere Wochen überlebten.