

### 3. Ergebnisse

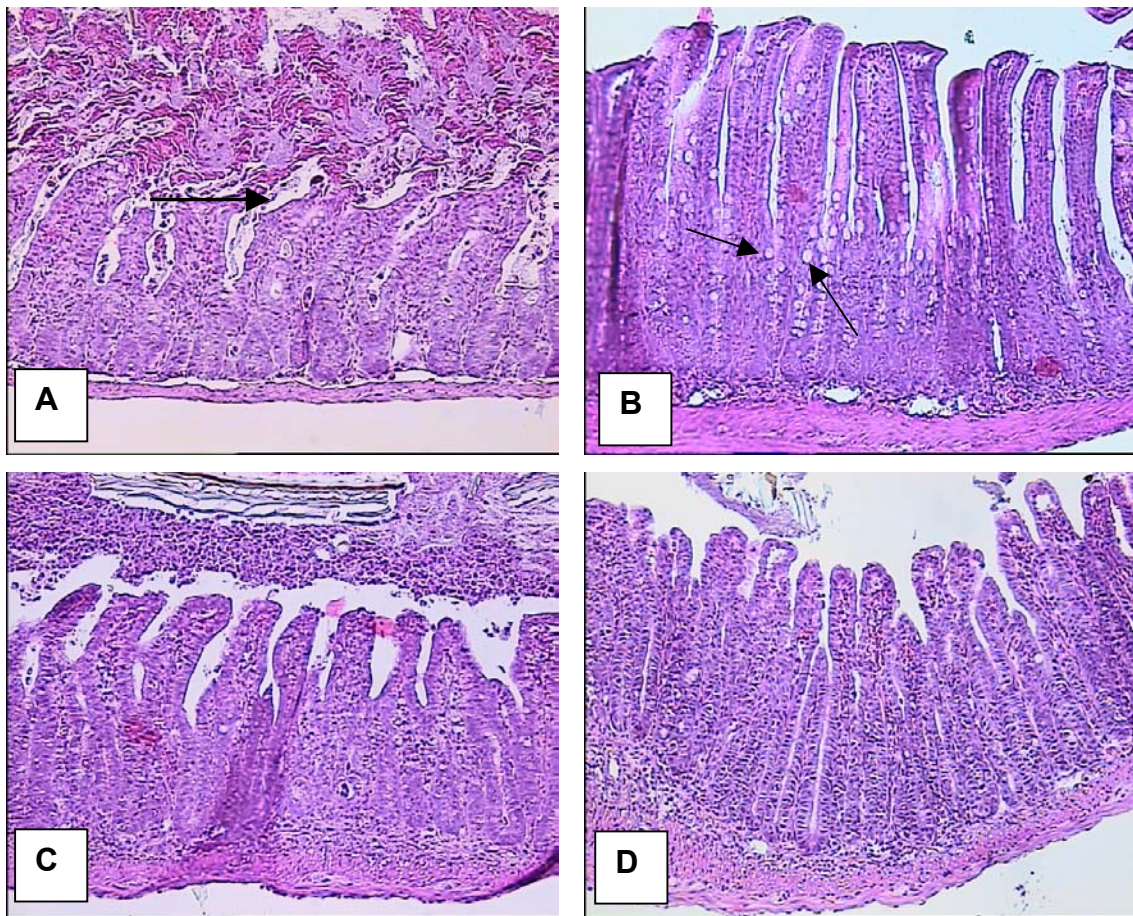
Um die Rolle von IL-18 nach der oralen Infektion der Maus mit *T. gondii* zu klären, wurden oral mit *T. gondii* infizierte IL-18-KO-Mäuse im Vergleich mit infizierten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen sowie mit KO-Mäusen für ICSBP (welche kein funktionsfähiges IL-12 bilden) und KO-Mäusen für den TNF- $\alpha$ -Rezeptor p55 untersucht. Überprüft werden sollte, ob infizierte IL-18-KO-Mäuse weniger Ileum- und Leberpathologie entwickeln als infizierte Kontrollmäuse und ob *T. gondii* in diesen Tieren unterschiedlich disseminiert. Außerdem wurde untersucht, ob die intraperitoneale Injektion von murinem anti-IL-18-Antikörper die Entstehung von Ileumnekrosen nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* verhindern kann bzw. welche Dosis des Antikörpers dazu nötig ist. Zusätzlich wurde die Neutralisation von IL-18 nach oraler Infektion hinsichtlich Nekrosenentwicklung und Parasitenausbreitung mit der Neutralisation von IL-12 verglichen.

#### 3.1 Vergleich von infizierten Knockout-Mäusen

##### 3.1.1 Nekrotische Veränderungen in Darm und Leber

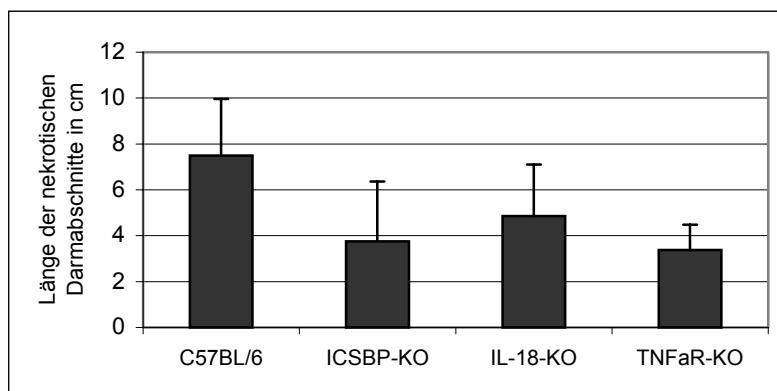
Es wurde untersucht, inwieweit C57BL/6-Mäuse, ICSBP-KO-Mäuse, IL-18-KO-Mäuse und TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse nach einer oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* in ihrem Ileum und der Leber Nekrosen entwickeln. Diese spiegeln das Ausmaß der stattgefundenen pathologischen Th1 Typ-Immunreaktion oder einer lokalen Parasitenvermehrung wider. Es sind die Ergebnisse von 2 Versuchen gezeigt. Die Gruppe der TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse enthält 4 Tiere, alle anderen Gruppen bestehen aus 7-8 Tieren.

An Tag 8 nach der Infektion wurden 10 cm des Ileums entnommen, histologisch aufgearbeitet und gefärbt. Abb. 1 zeigt repräsentative Ausschnitte des Ileums der oben genannten infizierten Mausstämme. Die C57BL/6-Mäuse zeigen ausgeprägte nekrotische Bereiche im Ileum mit zerstörten Zotten und Zelldetritus im Darmlumen, während ICSBP-KO-Mäuse und TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse signifikant weniger Ileumnekrosen und eine fast unversehrte Zottenarchitektur aufweisen.



**Abb. 1:** HE-Färbung des Ileums 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus. Pfeil an der Grenze zwischen Mukosa und Darmlumen. **B:** ICSBP-KO-Maus. Pfeile an Becherzellen. **C:** IL-18-KO-Maus. **D:** TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Maus.

Die IL-18-KO-Mäuse zeigen keinen signifikanten Unterschied bezüglich des Ausmaßes an nekrotischen Ileumabschnitten im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen. Bei den ICSBP-KO-Mäusen ist zudem eine Vermehrung der Becherzellen und Mastzellen in den Zotten zu erkennen. Abb. 2 zeigt das Ausmaß der Ileumnekrosen in cm.

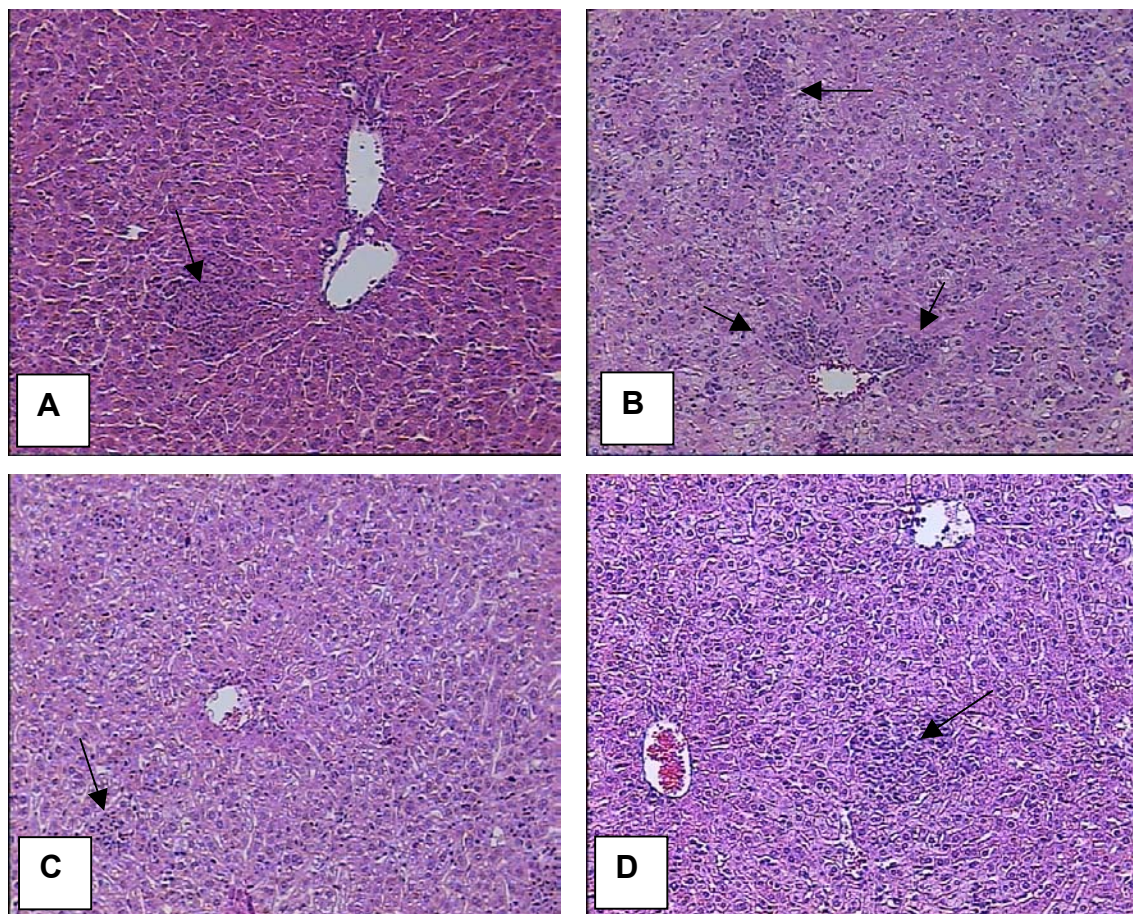


**Abb. 2:** Ausmaß der nekrotischen Darmbereiche in 10 cm entnommenem Ileum nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Es sind die Ergebnisse von 2 Versuchen gezeigt. Die Gruppe der TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse enthält 4 Tiere, alle anderen Gruppen bestehen aus 7-8 Tieren.  $p=0,02$  für ICSBP-KO vs. C57BL/6;  $p=0,04$  für TNF- $\alpha$ -Rp55-KO vs. C57BL/6.

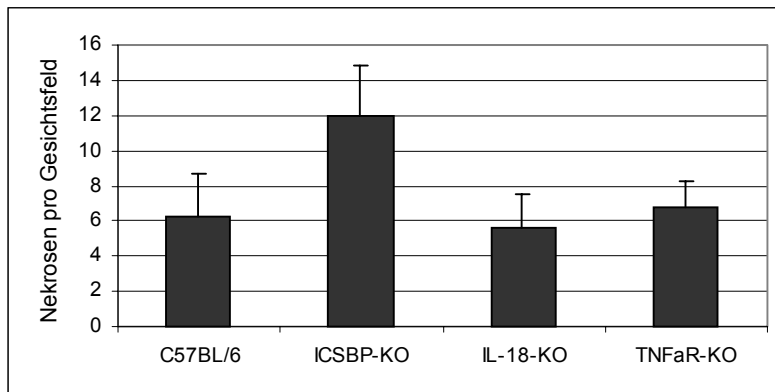


Neben dem Ileum wurde auch die Leber aller Tiere an Tag 8 nach Infektion histologisch auf nekrotische Veränderungen untersucht. Hierfür wurden die HE-gefärbten Schnitte bei 100facher Vergrößerung betrachtet und die Nekrosen in einem zufällig gewählten Gesichtsfeld gezählt. Abb. 3 zeigt repräsentative Ausschnitte der HE-gefärbten Leberschnitte mit Pfeilen zur Markierung der Nekrosen.

Es zeigt sich, dass infizierte C57BL/6-Mäuse in der Leber Entzündungsareale mit Nekrosen entwickeln. Die infizierten ICSBP-KO-Mäuse besitzen signifikant mehr Foci und Nekrosen innerhalb der Leber, als es bei den C57BL/6-Mäusen und den IL-18-KO-Mäusen der Fall ist. IL-18- und TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse entwickeln nach der Infektion in gleichem Umfang Lebernekrosen wie die C57BL/6-Mäuse. In Abb. 4 ist die Anzahl der Lebernekrosen der unterschiedlichen KO-Mäuse dargestellt.



**Abb. 3:** HE-Färbung der Leber 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*.  
A: C57BL/6-Maus. B: ICSBP-KO-Maus. C: IL-18-KO-Maus. D: TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Maus



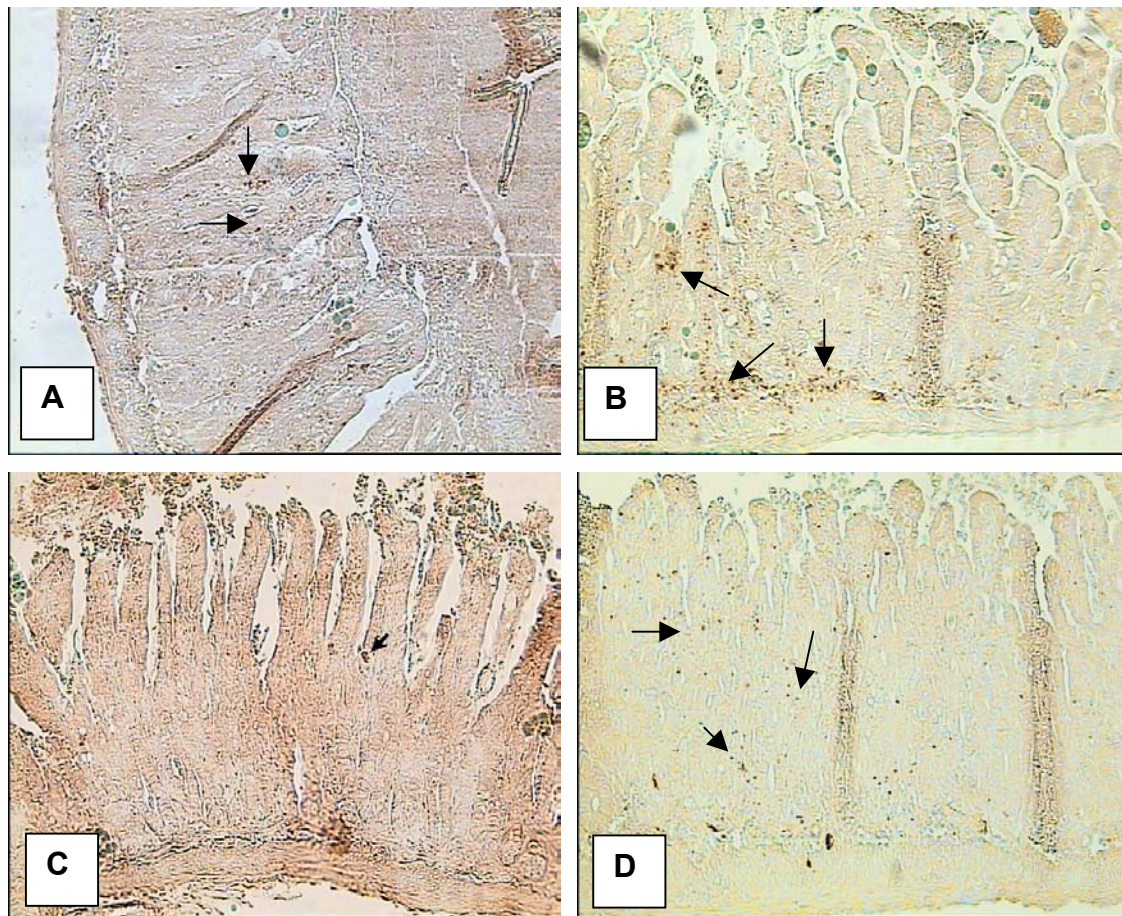
**Abb. 4:** Anzahl der Nekrosen pro Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*.  $p=0,005$  für ICSBP-KO vs. C57BL/6.  $p=0,0026$  für ICSBP-KO vs. IL-18-KO.

### 3.1.2 Dissemination von *T. gondii* im Darm und in der Leber

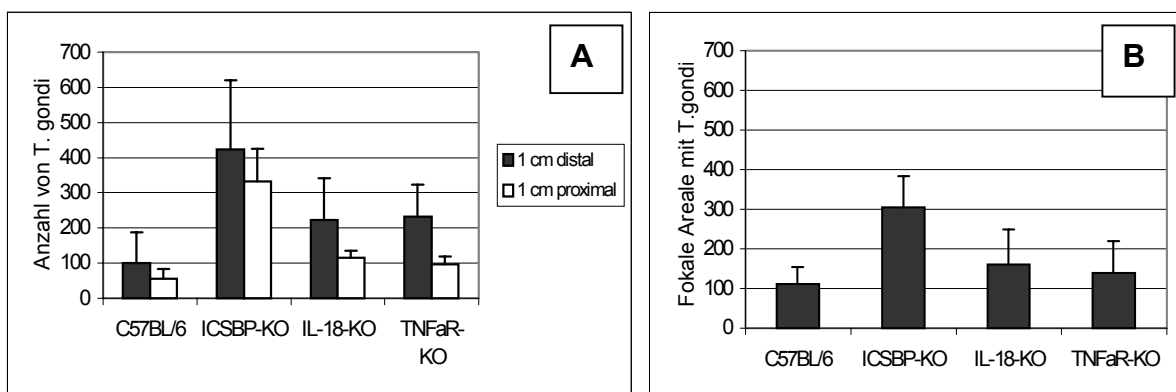
Neben der HE-Färbung der Darmschnitte wurde auch eine Immunoperoxidase-Färbung durchgeführt, um die Parasiten innerhalb des Darm- und Lebergewebes sichtbar zu machen. Abb. 5 zeigt repräsentative Ausschnitte der gegen *T. gondii* gefärbten Ileumschnitte.

*T. gondii* findet sich innerhalb des Ileums infizierter Mäuse bevorzugt im distalen Bereich in fokalen Arealen. IL-18-KO-Mäuse und C57BL/6-Mäuse weisen im distalen Bereich des Ileums gleiche Parasitenzahlen auf, im proximalen Abschnitt finden sich signifikant mehr Parasiten als bei den C57BL/6-Mäusen. Die ICSBP-KO-Mäuse weisen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen signifikant mehr Parasiten im Ileum auf. Dies zeigt sich sowohl in der absoluten Zahl der Parasiten pro cm Ileum als auch in der Anzahl der fokalen Areale, in denen sich die Parasiten gehäuft finden. Im Ileum der IL-18-KO-Mäuse und TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse finden sich gegenüber den ICSBP-KO-Mäusen signifikant weniger Parasiten. Verglichen mit den C57BL/6-Mäusen zeigen die TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse im distalen und proximalen Bereich signifikant höhere Parasitenzahlen. Bezüglich der Anzahl der fokalen Areale besteht zwischen C57BL/6-Mäusen, IL-18-KO- und TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen kein Unterschied. In Abb. 6 sind die Parasitenzahlen der verschiedenen KO-Mäuse gezeigt.



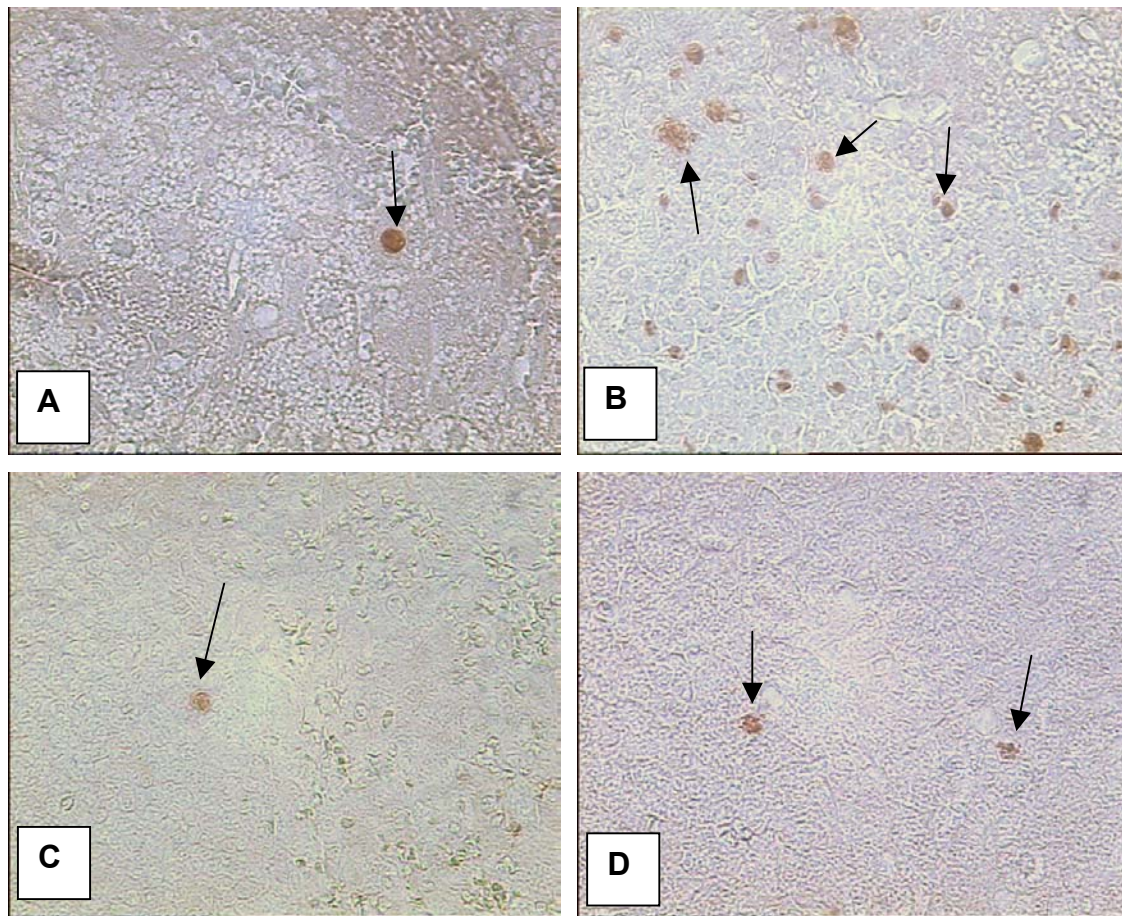


**Abb. 5:** Immunoperoxidase-Färbung gegen *T. gondii* im Ileum 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus. **B:** ICSBP-KO-Maus. **C:** IL-18-KO-Maus. **D:** TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Maus.



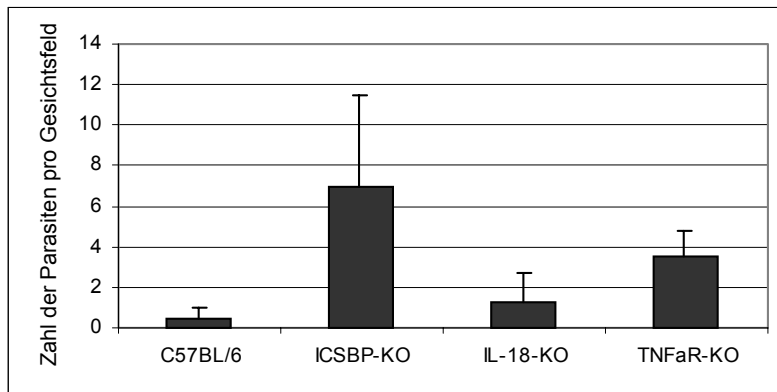
**Abb. 6 : A:** Anzahl der Parasiten in je 1 cm des distalen und proximalen Ileums von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*.  $p = 0,0006$  für dist. und  $p = 0,0003$  für prox. ICSBP-KO vs. C57BL/6;  $p = 0,0006$  für prox. IL-18-KO vs. C57BL/6;  $p = 0,04$  für dist. und  $p = 0,04$  für prox. TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO vs. C57BL/6.  $p = 0,04$  für dist. und  $p = 0,0003$  für prox. ICSBP-KO vs. IL-18-KO.  $p = 0,004$  für prox. ICSBP-KO vs. TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO.  
**B:** Anzahl der fokalen Areale mit *T. gondii* in 10 cm Ileum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*.  $p = 0,0007$  für ICSBP-KO vs. C57BL/6.  $p = 0,004$  für ICSBP-KO vs. IL-18-KO.  $p = 0,004$  für ICSBP-KO vs. TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO.





**Abb. 7:** Immunoperoxidase-Färbung gegen *T. gondii* in der Leber 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus. **B:** ICSBP-KO-Maus. **C:** IL-18-KO-Maus. **D:** TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Maus.

Das Vorkommen von *T. gondii* innerhalb der Leber der Mäuse an Tag 8 nach der Infektion wurde ebenfalls mittels der Immunoperoxidase-Färbung sichtbar gemacht. Die Parasiten wurden in einem zufällig gewählten Gesichtsfeld der Leberschnitte bei 400facher Vergrößerung gezählt. Die gezeigten histologischen Bilder der Leber in Abb. 7 stellen repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Gesichtsfelder dar. In der Leber der C57BL/6-Mäuse ist *T. gondii* kaum nachweisbar wie Abb. 8 zeigt. Die Zahl der Parasiten in der Leber von IL-18-defizienten Mäusen unterscheidet sich nicht signifikant von der in C57BL/6-Kontrollmäusen. Die ICSBP-KO-Mäuse weisen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen und IL-18-KO-Mäusen signifikant mehr Parasiten in der Leber auf. Auch die Parasitenzahl in der Leber von TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen ist gegenüber der von C57BL/6-Kontroll-Mäusen signifikant erhöht.

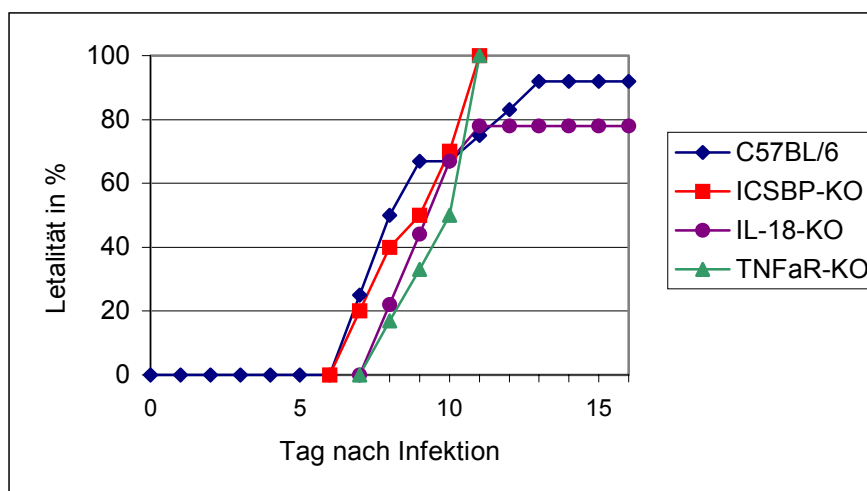


**Abb. 8:** Anzahl der Parasiten pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*.  $p = 0,0003$  für ICSBP-KO vs. C57BL/6;  $p = 0,006$  für TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO vs. C57BL/6.  $p = 0,0065$  für ICSBP-KO vs. IL-18-KO.

### 3.1.3 Letalität und Überlebenszeit nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

Neben den histologischen Veränderungen der infizierten Knockout-Mäuse wurde außerdem untersucht, wie lange die verschiedenen Knockout-Mäuse die Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen überleben.

Abb. 9 zeigt die Überlebenszeit der verschiedenen Mäuse nach der 100 Zysteninfektion.



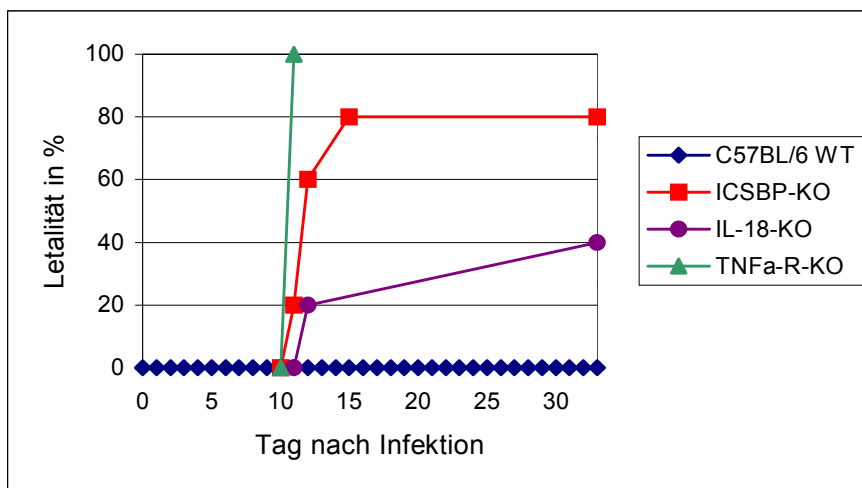
**Abb. 9:** Letalität von Mäusen nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Das Diagramm stellt die Daten von zwei Versuchen dar. Jede gezeigte Mausgruppe besteht aus 9-12 Tieren.

Es zeigt sich, dass ICSBP-KO-Mäuse und TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse an Tag 11 nach der Infektion zu 100 % versterben. C57BL/6-Mäuse sind in diesen Versuchen an Tag

13 zu 92 % verstorben. Die IL-18-KO-Mäuse sind an Tag 11 nach Infektion zu 80 % verstorben. Es besteht nach der 100 Zysten-Infektion kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Überlebenszeit zwischen den KO-Mäusen und den C57BL/6-Wildtyp-Mäusen.

### 3.1.4 Letalität und Überlebenszeit nach Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*

Da 100 Zysten *T. gondii* eine sehr hohe Infektionsdosis darstellen, bei der C57BL/6-Mäuse die akute Phase, also den Zeitraum bis zum 14. Tag nach der Infektion, nicht überleben, wurde die Letalität der gleichen KO-Mäuse auch nach einer 10-Zysten-Infektion mit der der C57BL/6-Mäuse verglichen.



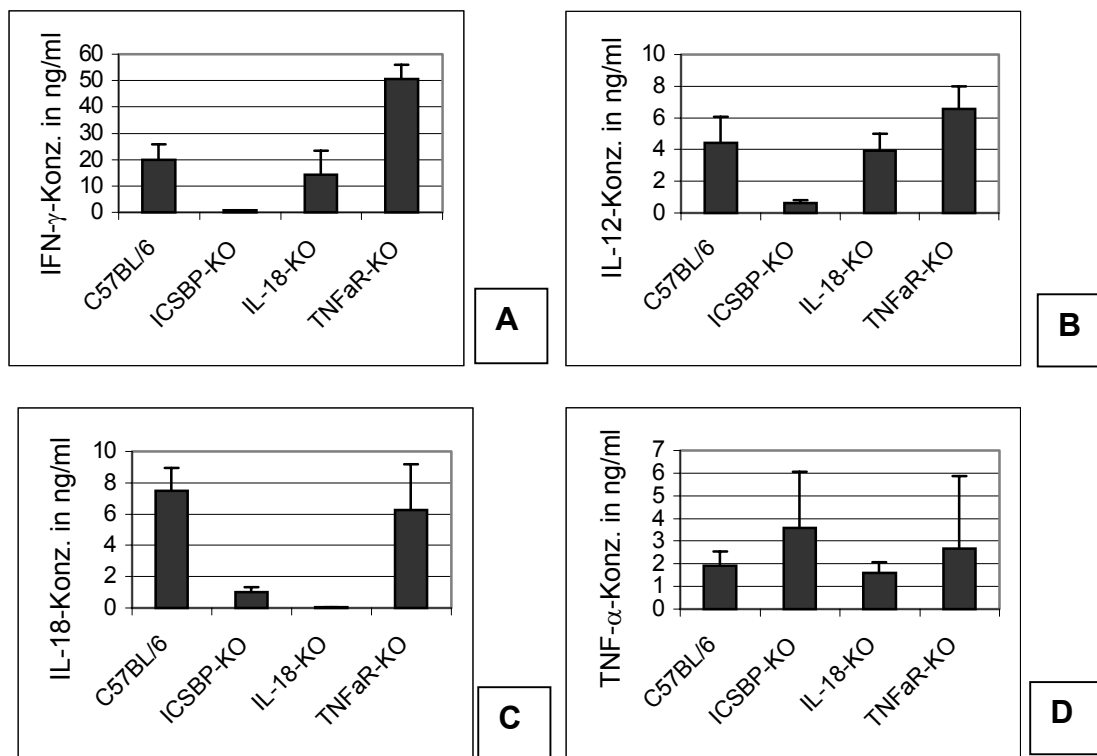
**Abb. 10:** Letalität von Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*. Jede Mausgruppe besteht aus 5 Tieren.  $p = 0,04$  für ICSBP-KO-Mäuse vs. C57BL/6.  $p = 0,008$  für TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO vs. C57BL/6.  $p = 0,0079$  für IL-18-KO-Mäuse vs. TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO.

Abb. 10 gibt die Letalität und Überlebenszeit nach der 10 Zysteninfektion wieder. ICSBP-KO-Mäuse und TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse versterben wie nach der Infektion mit 100 Zysten fast vollständig wenige Tage nach der Infektion, während C57BL/6-Mäuse zu 100% überleben. IL-18-KO-Mäuse überleben signifikant länger als TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse. Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen IL-18-KO- und C57BL/6-Mäusen.



### 3.1.5 Zytokine in Serum und Zellüberständen

Zur weiteren Charakterisierung der Immunantwort von ICSBP-KO-, IL-18-KO- und TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen auf eine orale Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*, wurde an Tag 8 nach der Infektion Blut der Tiere entnommen und im Serum die charakteristischen Zytokine der Th-1-Antwort bestimmt. In Abb. 11 sind die Zytokinkonzentrationen im Serum der Kontrollmäuse und der untersuchten KO-Mäuse dargestellt.

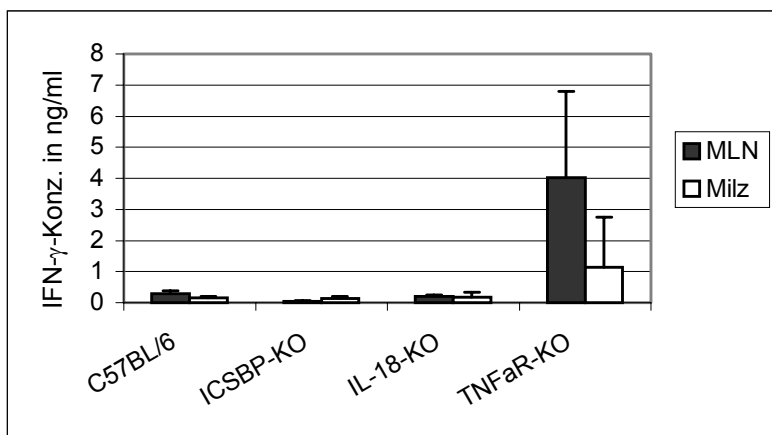


**Abb. 11:** Zytokinkonzentrationen im Serum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Bestimmung mittels ELISA. Die Diagramme zeigen die zusammengefassten Ergebnisse zweier Versuche. Es sind die Daten von 7-8 Tieren pro Gruppe gezeigt, nur die TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse-Gruppe enthält 4 Tiere. **A:** IFN- $\gamma$ -Konzentration.  $p = 0,0003$  ICSBP-KO vs. C57BL/6;  $p = 0,006$  TNF- $\alpha$ -Rp55-KO vs. C57BL/6. **B:** IL-12-Konzentration.  $p = 0,0003$  ICSBP-KO vs. C57BL/6. **C:** IL-18-Konzentration.  $p = 0,0003$  ICSBP-KO vs. C57BL/6. **D:** TNF- $\alpha$ -Konzentration.

Die Serumkonzentration von IFN- $\gamma$  ist bei infizierten ICSBP-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant geringer, die von TNF- $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen signifikant erhöht. Die IFN- $\gamma$ -Konzentration im Serum von infizierten IL-18-KO-Mäusen und Kontrollmäusen zeigt keinen signifikanten Unterschied. Die Serumkonzentration von IL-12 unterscheidet sich nicht zwischen Kontrollmäusen und IL-18-KO- sowie

TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen, während im Serum von ICSPB-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen signifikant weniger IL-12 nachweisbar ist. IL-18 ist im Serum von ICSPB-KO-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren ebenfalls signifikant erniedrigt. TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Mäuse weisen im Serum die gleiche Konzentration an IL-18 auf wie die Kontrollmäuse. Die Serumkonzentrationen von TNF-  $\alpha$  zeigen bei den genannten infizierten KO-Mäusen und den Kontrollmäusen keinen signifikanten Unterschied.

Um einen Einblick in die lokale Zytokinproduktion nach der Infektion zu bekommen, wurden Milz- und MLN-Zellen der verschiedenen Mäuse in Kultur genommen. In Abb. 12 sind die Konzentrationen von IFN-  $\gamma$  in Zellüberständen nach TLA-Stimulation der Zellen dargestellt. Die Konzentrationsbestimmung von IFN-  $\gamma$  in diesen Zellüberständen zeigt eine signifikant niedrigere Konzentration in den MLN-Überständen von ICSPB-KO-Mäusen verglichen mit den Überständen der C57BL/6-Kontrolltiere. Die IFN-  $\gamma$ -Konzentration in den Überständen von IL-18-KO-Mäusen und Kontrolltieren ist gleich. Eine signifikant höhere IFN-  $\gamma$  Konzentration ist in MLN-Überständen von TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO-Mäusen verglichen mit Kontrollmäusen nachzuweisen.



**Abb. 12:** IFN-  $\gamma$  -Konzentration in Zellüberständen nach 48 h Inkubation unter TLA-Stimulation. Die Zellen stammen aus MLN und Milz von mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten Mäusen. Gezeigt sind die Mittelwerte von jeweils vier Tieren.  $p = 0,03$  für MLN ICSPB-KO vs. C57BL/6.  $p = 0,03$  für MLN TNF-  $\alpha$ -Rp55-KO vs. C57BL/6.

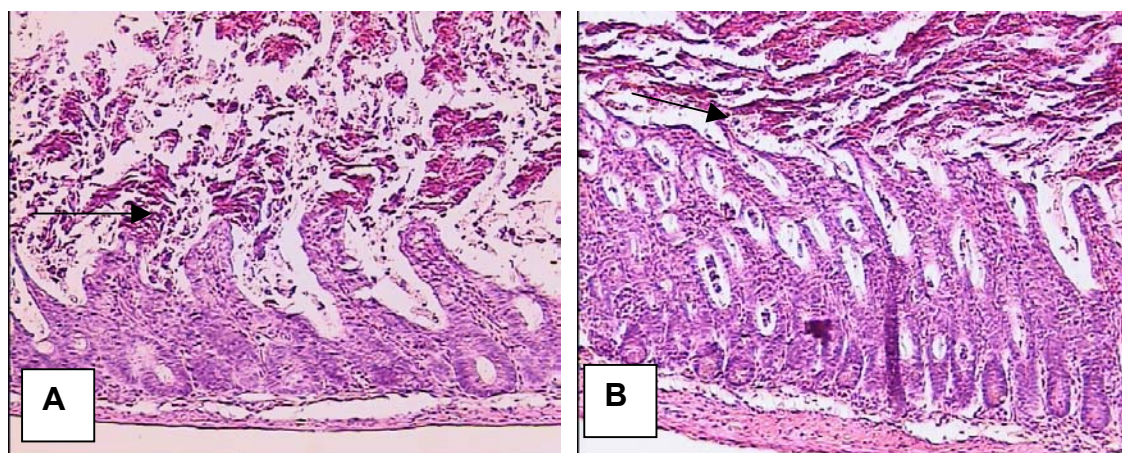
## 3.2 Behandlung infizierter Mäuse mit anti-IL-18

Da IL-18 eine wichtige Rolle bei der Induktion von Th1-Typ-Immunreaktionen spielt, wie sie durch *T. gondii* in der Maus ausgelöst wird, wurde untersucht, ob die Injektion eines Antikörpers gegen IL-18 die entstehende Immunpathologie der Mäuse mindern kann. Untersucht wurde außerdem, ob die AK-Gabe einmal oder zweimal durchgeführt werden muss, um einen signifikanten Unterschied zu den Kontrollmäusen zu erhalten.

### 3.2.1 Einmalige Behandlung von infizierten Mäusen mit anti-IL-18

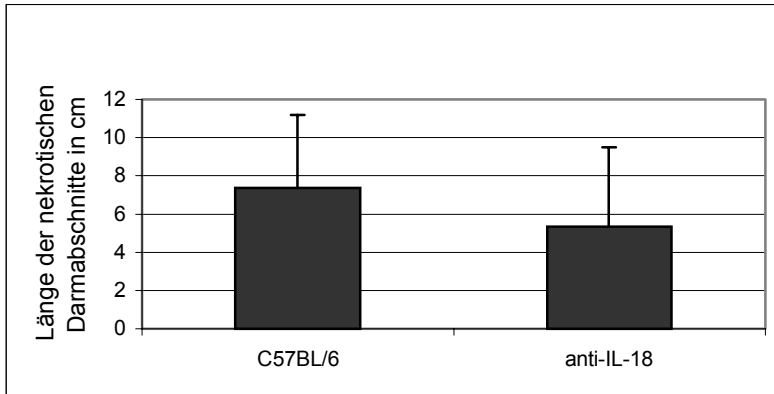
#### 3.2.1.1 Nekrotische Veränderungen in Darm und Leber

Der Einfluss einer einmaligen intraperitonealen Injektion von anti-IL-18 auf die Th1-vermittelte Immunpathologie des Ileums nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* wurde untersucht. Der Antikörper wurde an Tag 2 nach der Infektion in einer Dosis von 600 µg pro Tier injiziert. Sowohl die kontrollbehandelten als auch die mit anti-IL-18 behandelten Mäuse weisen an Tag 8 nach der Infektion ausgedehnte Nekrosen im Ileum auf, wie Abb. 13 zeigt. Hinsichtlich der Länge der nekrotischen Areale besteht zwischen den kontrollbehandelten und den anti-IL-18-behandelten Mäusen kein signifikanter Unterschied. Abb. 14 zeigt die Länge der nekrotischen Ileumabschnitte in cm.



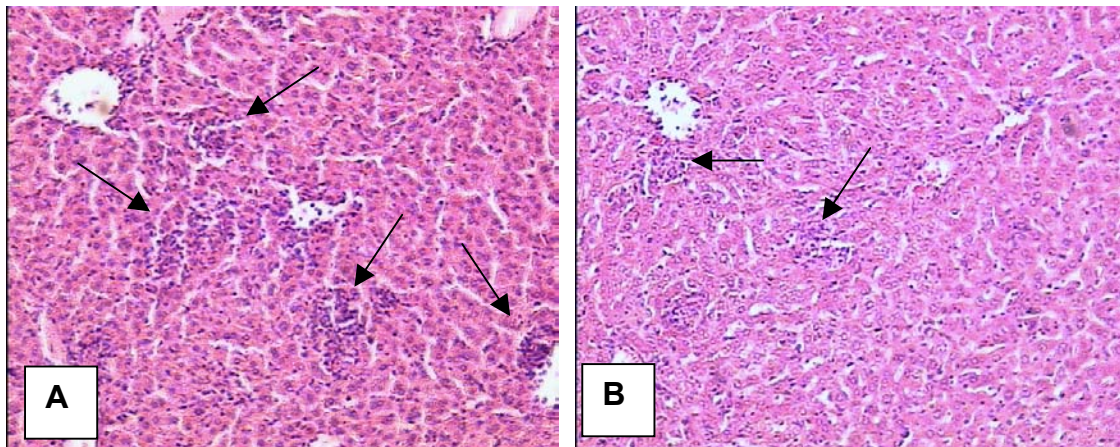
**Abb. 13:** HE-Färbung des Ileums 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Pfeil an der Grenze zwischen Mukosa und Darmlumen. **A:** C57BL/6-Maus, 200 µl PBS an Tag 2 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 600 µg anti-IL-18 an Tag 2 nach der Infektion.



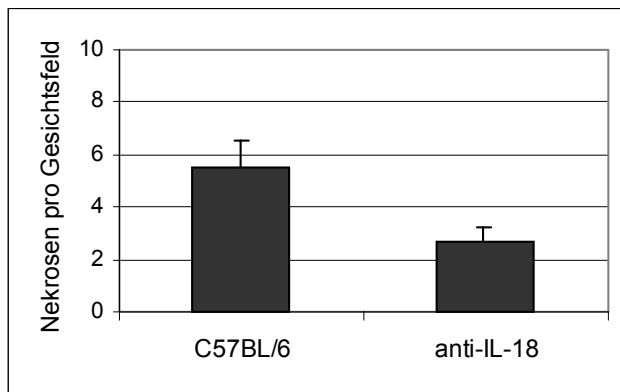


**Abb. 14:** Ausmaß der nekrotischen Darmbereiche in 10 cm entnommenem Ileum nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* bei C57BL/6-Mäusen, die 200  $\mu$ l PBS i.p. erhielten (C57BL/6, 4 Tiere) bzw. 600  $\mu$ g anti-IL-18 i.p. an Tag 2 (3 Tiere).

Die Leber der kontrollbehandelten C57BL/6-Mäuse ist nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* signifikant stärker von Nekrosen betroffen, als die der mit 600  $\mu$ g anti-IL-18 behandelten Tiere. Trotzdem weisen auch die anti-IL-18-behandelten Tiere deutlich nekrotische Bereiche innerhalb der Leber auf. Abb. 15 zeigt repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Gesichtsfelder, Abb. 16 zeigt die Anzahl der Nekrosen pro Gesichtsfeld.



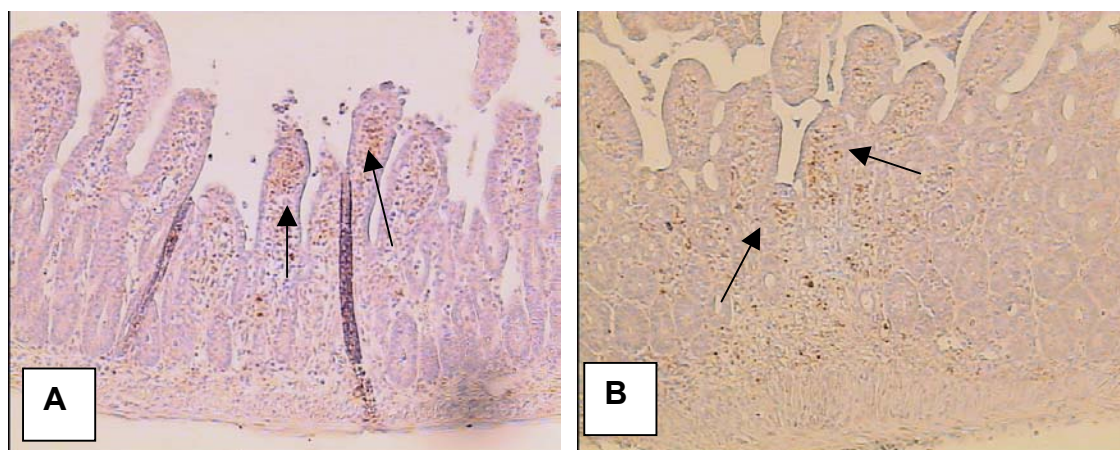
**Abb. 15:** HE-Färbung der Leber 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 200  $\mu$ l PBS an Tag 2 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 600  $\mu$ g anti-IL-18 an Tag 2 nach der Infektion.



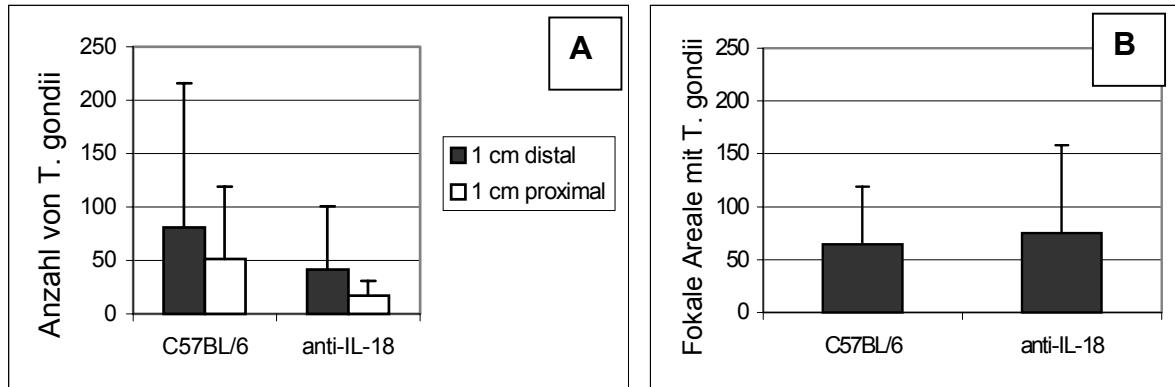
**Abb. 16:** Anzahl der Nekrosen pro Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse mit 200  $\mu$ l PBS (4 Tiere). anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse mit 600  $\mu$ g anti-IL-18 (3 Tiere).  $p=0,05$ .

### 3.2.1.2 Dissemination von *T. gondii* im Darm und in der Leber

Die Immunoperoxidase-Färbung des Ileums zeigt, dass sich die Dissemination von *T. gondii* zwischen den beiden Mausgruppen nicht signifikant unterscheidet. Beide Gruppen weisen eine deutliche Infiltration der Ileumzotten mit Parasiten auf, wie es in Abb. 17 in repräsentativen Ausschnitten dargestellt ist. Auch die Zahl der fokalen Areale mit Parasiten ist gleich. Die Anzahl der Parasiten im Ileum der beiden Mausgruppen ist in Abb. 18 gezeigt.

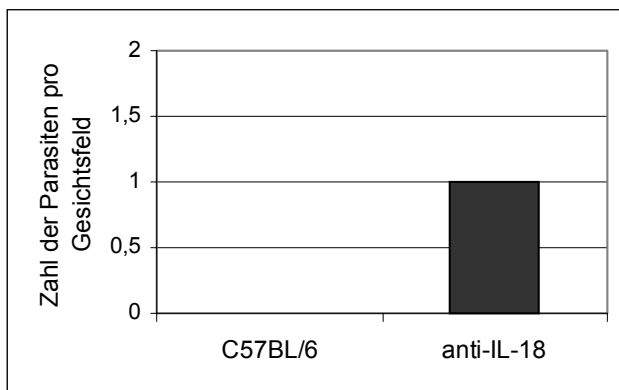


**Abb. 17:** Immunoperoxidase-Färbung gegen *T. gondii* im Ileum 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 200  $\mu$ l PBS an Tag 2 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 600  $\mu$ g anti-IL-18 an Tag 2 nach der Infektion.



**Abb. 18:** **A:** Anzahl der Parasiten im Ileum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* in jeweils 1 cm (distal und proximal im Ileum). **B:** Anzahl der fokalen Areale mit *T. gondii* in 10 cm Ileum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse mit 200  $\mu$ l PBS (4 Tiere). anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse mit 600  $\mu$ g anti-IL-18 (3 Tiere).

Nur in der Leber der anti-IL-18-behandelten Mäuse, nicht aber in der Leber der kontrollbehandelten Mäuse waren histologisch Parasiten nachweisbar, wie Abb. 19 zeigt.

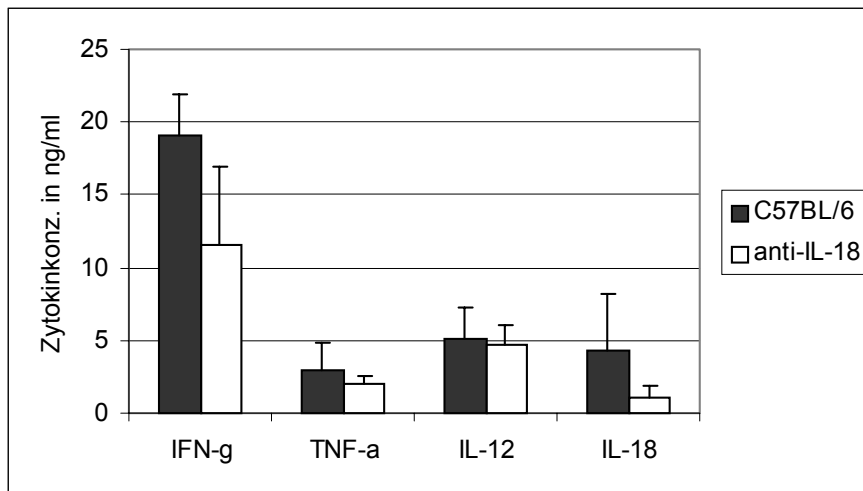


**Abb. 19:** Anzahl der Parasiten pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse mit 200  $\mu$ l PBS (4 Tiere). anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse mit 600  $\mu$ g anti-IL-18 (3 Tiere).

### 3.2.1.3 Zytokine im Serum

Neben der histologischen Untersuchung der Mäuse, wurden die charakteristischen Zytokine der Th1-Typ-Immunreaktion im Serum bestimmt. Die Konzentrationen der Zytokine sind in Abb. 20 wiedergegeben. Die kontrollbehandelten und die anti-IL-18-behandelten Mäuse weisen keine signifikanten Unterschiede bei den Serumkonzentrationen der untersuchten Zytokine auf.



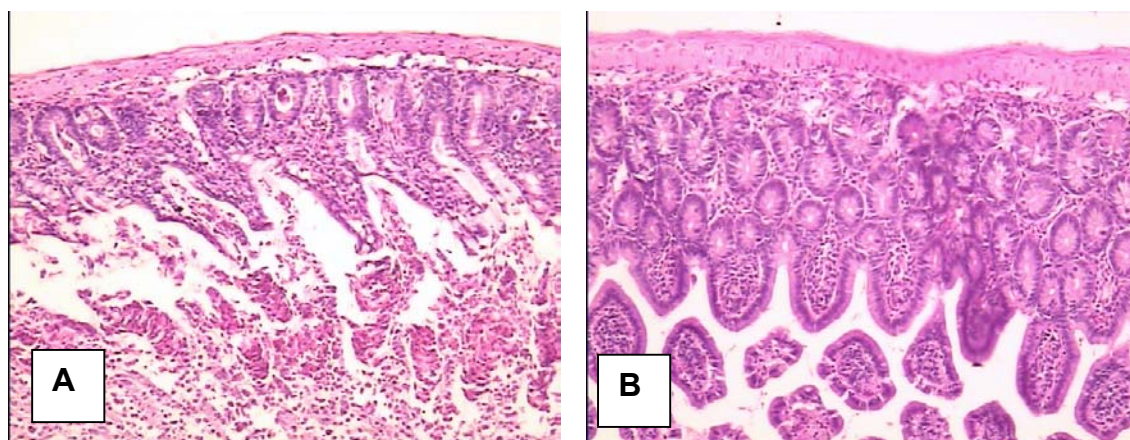


**Abb. 20:** Zytokinkonzentrationen im Serum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Bestimmung mittels ELISA. Es sind die Mittelwerte von 4 bzw. 3 Tieren pro Gruppe gezeigt. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse mit 200  $\mu$ l PBS (4 Tiere). anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse mit 600  $\mu$ g anti-IL-18 (3 Tiere).

### 3.2.2 Zweimalige Behandlung von infizierten Mäusen mit anti-IL-18

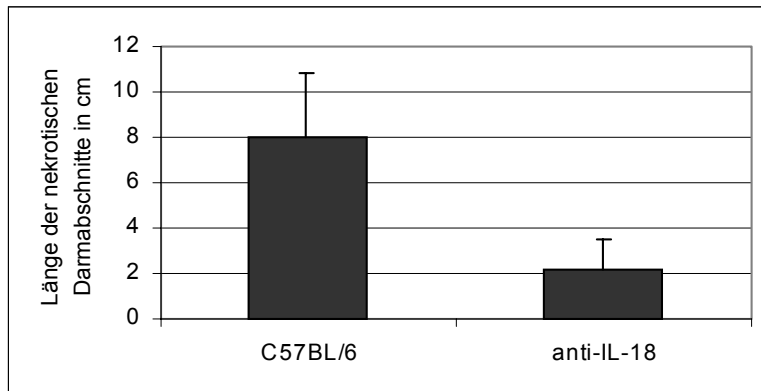
#### 3.2.2.1 Nekrotische Veränderungen in Darm und Leber

Da die einmalige Injektion des Antikörpers gegen IL-18 die Darmpathologie der infizierten Mäuse nicht verhindern kann, wurden infizierte Mäuse zweimal mit dem Antikörper behandelt, um zu überprüfen, ob eine Dosissteigerung zu einem signifikanten Effekt führt. Der Antikörper wurde an Tag 2 und 5 mit jeweils 500  $\mu$ g i.p. appliziert.



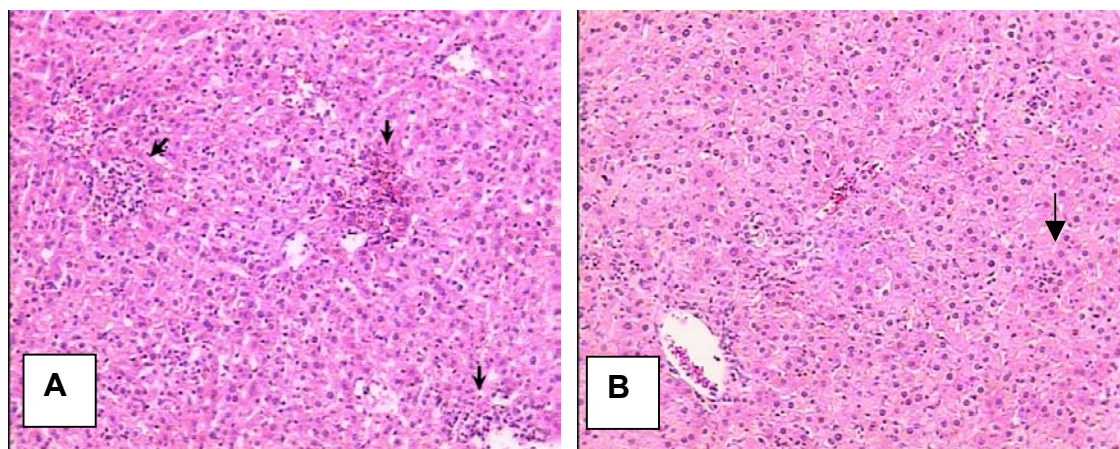
**Abb. 21:** HE-Färbung des Ileums 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 500  $\mu$ g Kontroll-AK (anti-*E. coli*- $\beta$ -Galaktosidase) an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 500  $\mu$ g anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.

Nach zweimaliger Injektion des Antikörpers weisen die Mäuse im Vergleich zu den kontrollbehandelten Tieren signifikant weniger Ileumnekrosen auf. Die Histologie ist in Abb. 21 in repräsentativen Ausschnitten des Ileums beider Mausgruppen gezeigt. Anti-IL-18-behandelte Mäuse weisen auch deutlich weniger entzündliche Infiltration im Ileum auf. Die Länge der nekrotischen Ileumareale ist in Abb. 22 wiedergegeben.

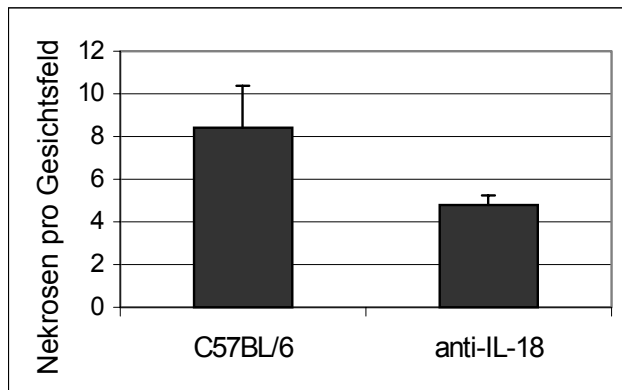


**Abb. 22:** Ausmaß der nekrotischen Darmbereiche in 10 cm entnommenem Ileum nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* bei C57BL/6-Mäusen, die zweimal 500 µg Kontroll-AK i.p. erhielten (C57BL/6, 7 Tiere) bzw. zweimal je 500 µg anti-IL-18 i.p. an Tag 2 und 5 (5 Tiere).  $p = 0,02$  für anti-IL-18 vs. C57BL/6.

Die mit dem Kontroll-AK behandelten Mäuse zeigen signifikant mehr und ausgeprägtere Nekrosen in ihrer Leber als die mit anti-IL-18 behandelten Tieren. Abb. 23 zeigt repräsentative Ausschnitte der HE-gefärbten Leberhistologien beider Mausgruppen. Die Anzahlen der Nekrosen in der Leber beider Gruppen zeigt Abb. 24.

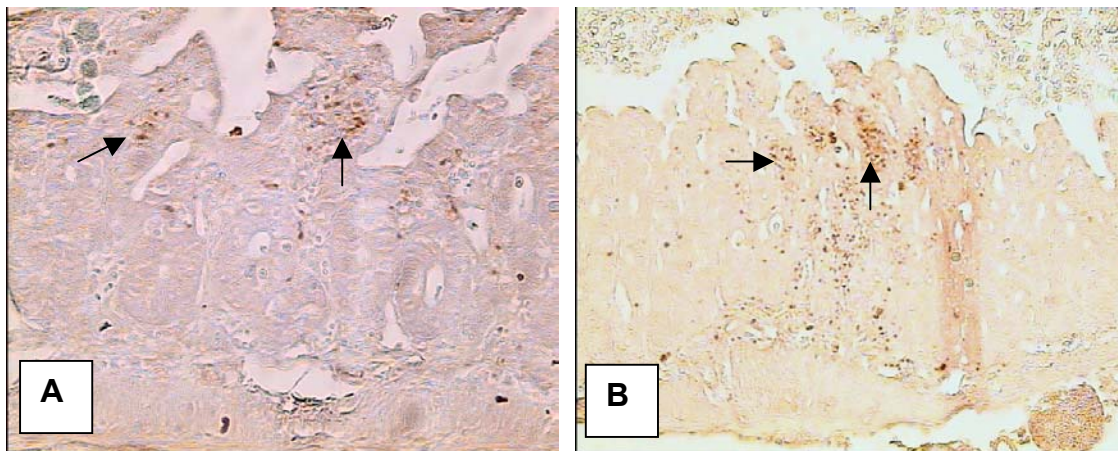


**Abb. 23:** HE-Färbung der Leber 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 500 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.



**Abb. 24:** Anzahl der Nekrosen pro Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: 500 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion (7 Tiere). anti-IL-18: 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion (5 Tiere).  $p = 0,003$  für anti-IL-18 vs. C57BL/6.

### 3.2.2.2 Dissemination von *T. gondii* im Darm und in der Leber

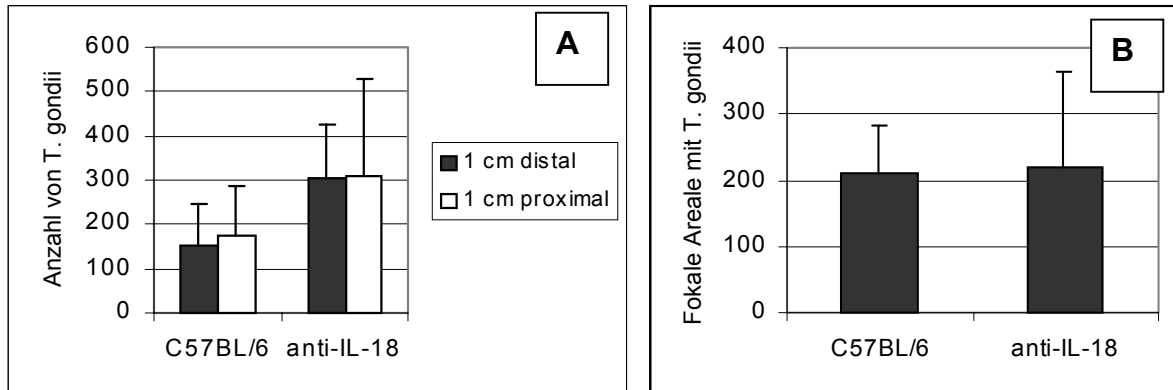


**Abb. 25:** Immunoperoxidase-Färbung gegen *T. gondii* im Ileum 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 500 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.

Im distalen als auch im proximalen Bereich des Ileums finden sich bei den mit anti-IL-18 behandelten Mäusen ebenso viele Parasiten wie bei den kontrollbehandelten Mäusen. In der Anzahl der fokalen Areale mit Parasiten unterscheidet sich die anti-IL-18-behandelte Gruppe ebenfalls nicht von der Kontrollgruppe. Abb. 25 zeigt reprä-

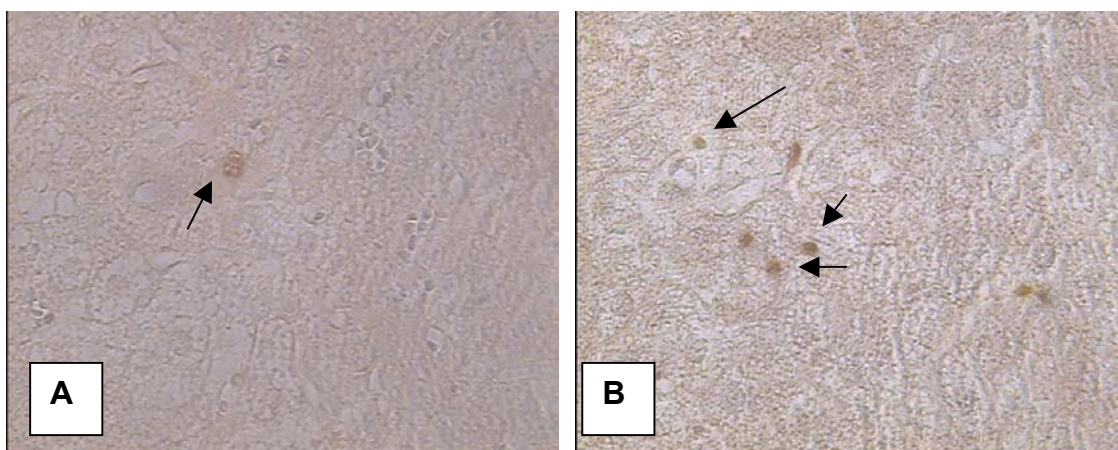


sentative Ausschnitte des Ileums. Abb. 26 zeigt die graphische Darstellung der Parasitenzahlen im Ileum.

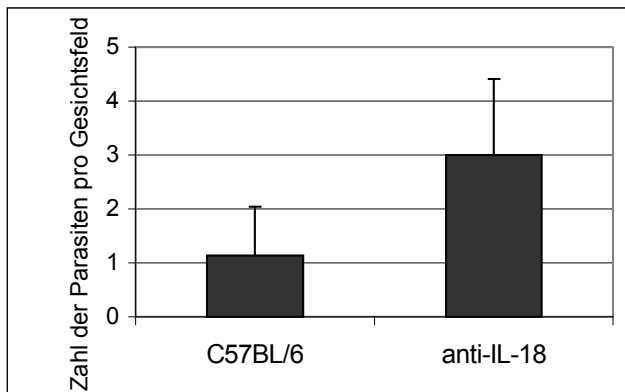


**Abb. 26:** **A:** Anzahl der Parasiten im Ileum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* in jeweils 1 cm (distal und proximal im Ileum). **B:** Anzahl der fokalen Areale mit *T. gondii* in 10 cm Ileum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse mit 500 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion (7 Tiere). anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse mit 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion (5 Tiere).

*T. gondii* breitet sich in der Leber der zweimalig mit anti-IL-18-behandelten Mäuse verglichen mit kontrollbehandelten Mäusen signifikant stärker aus. Abb. 27 zeigt repräsentative Ausschnitte des betrachteten Gesichtsfeldes der Leber beider Gruppen. Abb. 28 stellt die Parasitenzahlen innerhalb der Leber dar.



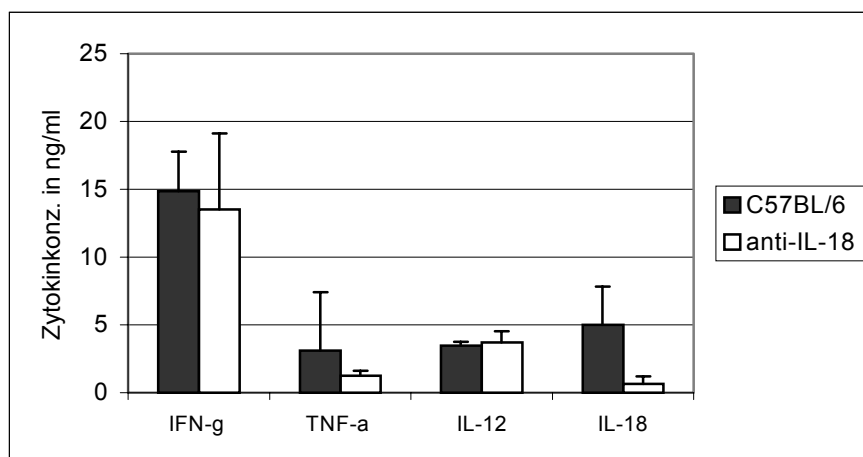
**Abb. 27:** Immunoperoxidase-Färbung gegen *T. gondii* in der Leber 8 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 500 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.



**Abb. 28:** Anzahl der Parasiten pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse mit 500 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion (7 Tiere). anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse mit 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion (5 Tiere).  $p = 0,04$  anti-IL-18 vs. C57BL/6.

### 3.2.2.3 Zytokine im Serum

Die zweimal mit anti-IL-18 behandelten Mäuse zeigen in ihrem Serum signifikant niedrigere IL-18-Werte als die kontrollbehandelten Mäuse. Die Serumkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12 weisen keine signifikanten Unterschiede bei den kontrollbehandelten Tieren verglichen mit den anti-IL-18-behandelten auf. Die Zytokinkonzentrationen zeigt Abb. 29.



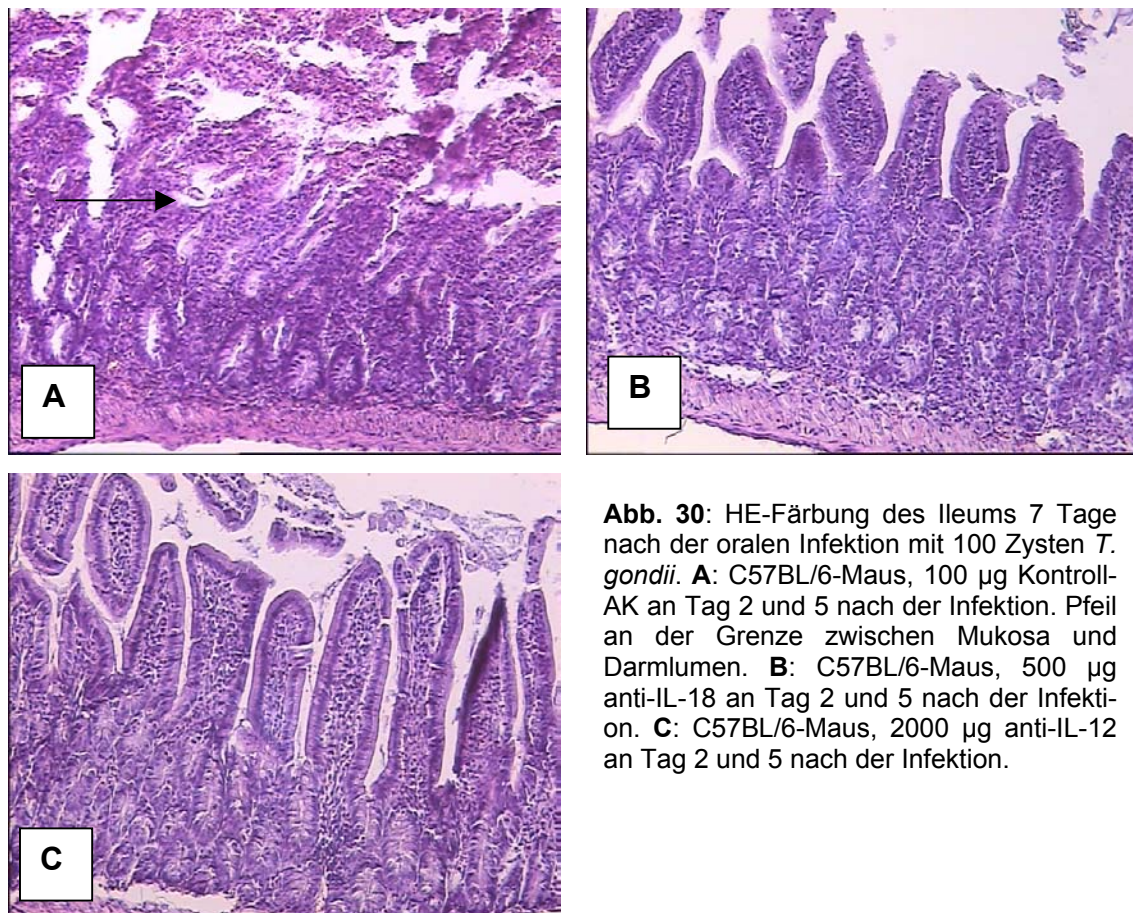
**Abb. 29:** Zytokinkonzentrationen im Serum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Bestimmung mittels ELISA. Es sind die Mittelwerte von 4 Tieren pro Gruppe gezeigt. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse mit 500 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse mit 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.  $p = 0,05$  für IL-18 C57BL/6 vs. anti-IL-18.

### 3.2.3 Behandlung mit anti-IL-18 versus anti-IL-12

#### 3.2.3.1 Nekrotische Veränderungen in Darm und Leber

IL-12 ist an der Induktion der Th1-Typ-Immunreaktion beteiligt. Da die Neutralisation von IL-12 die Entstehung der Immunpathologie blockiert, wurde untersucht, ob bzw. inwieweit sich der Effekt der Neutralisation von IL-18 gegenüber der von IL-12 in der infizierten Maus unterscheidet. Abb. 30 zeigt repräsentative Ausschnitte der HE-gefärbten Ileumschnitte der drei unterschiedlich behandelten Mausgruppen.

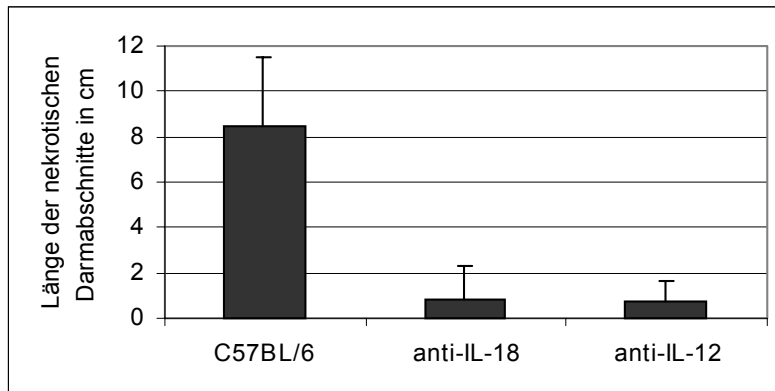
Die mit Kontroll-AK behandelten Mäuse weisen massive Nekrosen des Ileums auf, die signifikant stärker ausgeprägt sind verglichen mit sowohl den anti-IL-18- als auch den anti-IL-12-behandelten Mäusen. Die letzteren Gruppen zeigen im Ileum nur leichte entzündliche Veränderungen.



**Abb. 30:** HE-Färbung des Ileums 7 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 100 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. Pfeil an der Grenze zwischen Mukosa und Darmlumen. **B:** C57BL/6-Maus, 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **C:** C57BL/6-Maus, 2000 µg anti-IL-12 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.

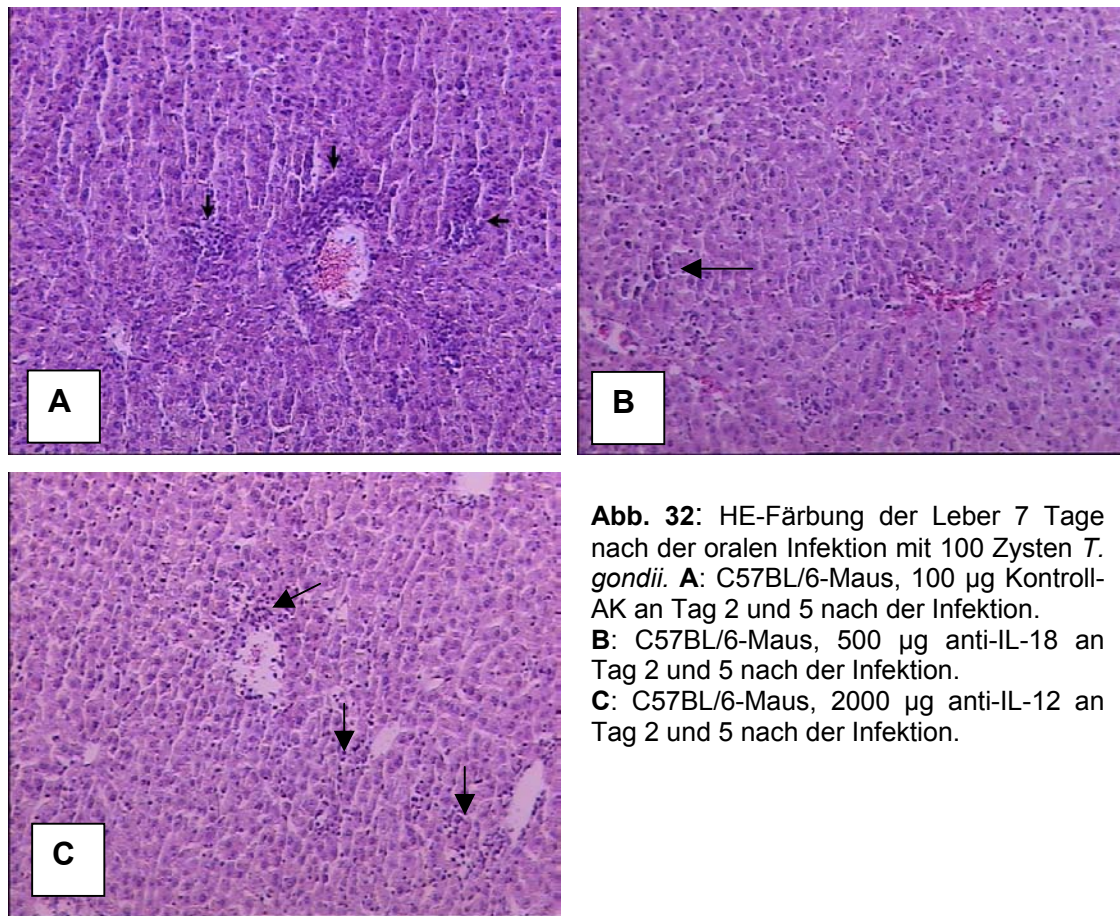


In Abb. 31 ist das Ausmaß der nekrotischen Ileumareale in cm wiedergegeben. Zwischen der Ausprägung der Ileumnekrosen bei anti-IL-18-behandelten Mäusen und der bei anti-IL-12-behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied.

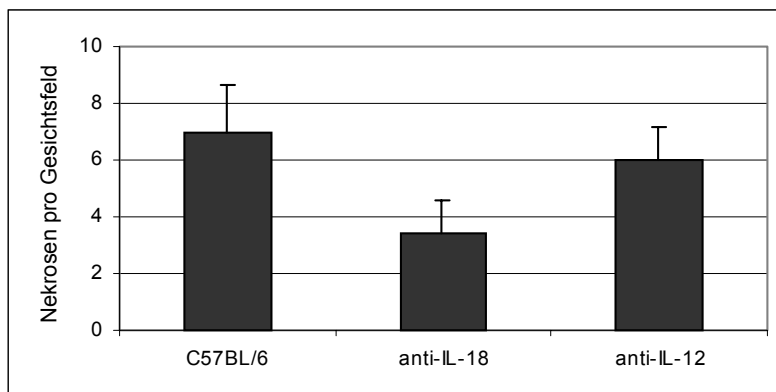


**Abb. 31:** Ausmaß der nekrotischen Darmbereiche in 10 cm entnommenem Ileum nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* bei C57BL/6-Mäusen. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse, zweimal 100 µg Kontroll-AK. anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse, zweimal 500 µg anti-IL-18. anti-IL-12: C57BL/6-Mäuse, zweimal 2000 µg anti-IL-12. AK-Gabe i.p. an Tag 2 und 5 nach der Infektion. Jeweils 7 Tiere pro Gruppe.  $p=0,0012$  für anti-IL-18 vs. C57BL/6.  $p=0,0033$  für anti-IL-12 vs. C57BL/6.

In der Leber der mit Kontroll-AK behandelten Mäuse finden sich signifikant mehr nekrotische Bereiche pro Gesichtsfeld als in den anti-IL-18-behandelten Mäusen. Verglichen mit den Kontrollmäusen zeigen die anti-IL-12-behandelten Tiere keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Lebernekrosen, während die anti-IL-12-behandelten Tiere signifikant mehr Nekrosen in der Leber verglichen mit den anti-IL-18-behandelten Mäusen aufweisen. Abb. 32 zeigt repräsentative Ausschnitte der HE-gefärbten Leberschnitte der kontrollbehandelten Mäuse im Vergleich mit Leberschnitten von anti-IL-18- und anti-IL-12-behandelten Mäusen. Abb. 33 zeigt die Zahl der Nekrosen in der Leber der drei Mausgruppen pro Gesichtsfeld.



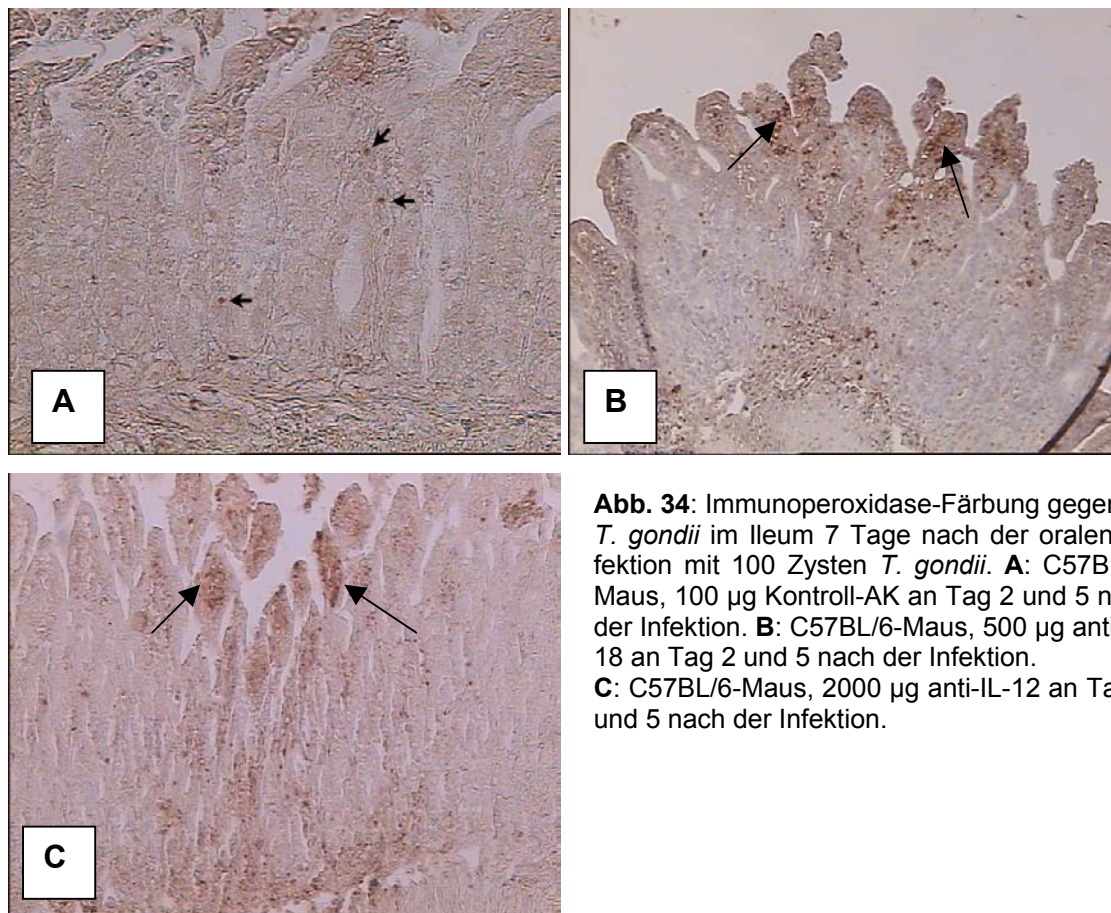
**Abb. 32:** HE-Färbung der Leber 7 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 100 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **C:** C57BL/6-Maus, 2000 µg anti-IL-12 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.



**Abb. 33:** Anzahl der Nekrosen pro Gesichtsfeld bei 100facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 7 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse, zweimal 100 µg Kontroll-AK. anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse, zweimal 500 µg anti-IL-18. anti-IL-12: C57BL/6-Mäuse, zweimal 2000 µg anti-IL-12. AK-Gabe i.p. an Tag 2 und 5 nach der Infektion. Jeweils 7 Tiere pro Gruppe.  $p=0,002$  für anti-IL-18 vs. C57BL/6.  $p=0,007$  für anti-IL-18 vs. anti-IL-12.

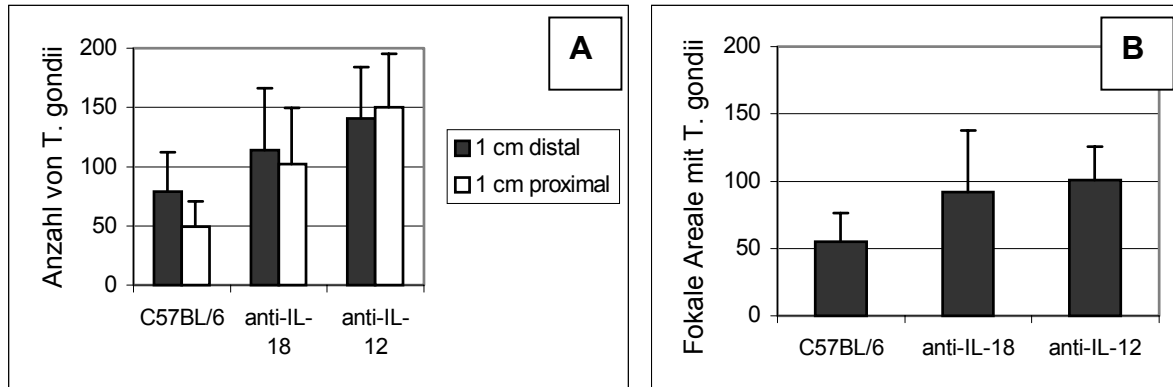
### 3.2.3.2 Dissemination von *T. gondii* im Darm und in der Leber

Die Dissemination von *T. gondii* im Ileum ist bei den kontrollbehandelten Mäusen verglichen mit den anti-IL-18-behandelten Mäusen für die Parasitenzahl im proximalen Bereich des Ileums signifikant geringer. Die Parasitenzahl im distalen cm des Ileums und die Anzahl der fokalen Arealen der Parasiten zeigen zwischen diesen beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. Verglichen mit der Kontrollgruppe sind die Parasitenzahlen der anti-IL-12-behandelten Mäuse signifikant höher. Ein signifikanter Unterschied des Parasitenvorkommens zwischen den anti-IL-18- und anti-IL-12-behandelten Tieren besteht nicht. In Abb. 34 sind die repräsentativen histologischen Schnitte des Ileums gezeigt. Abb. 35 gibt die Parasitenzahlen der verschiedenen Mausgruppen wieder.

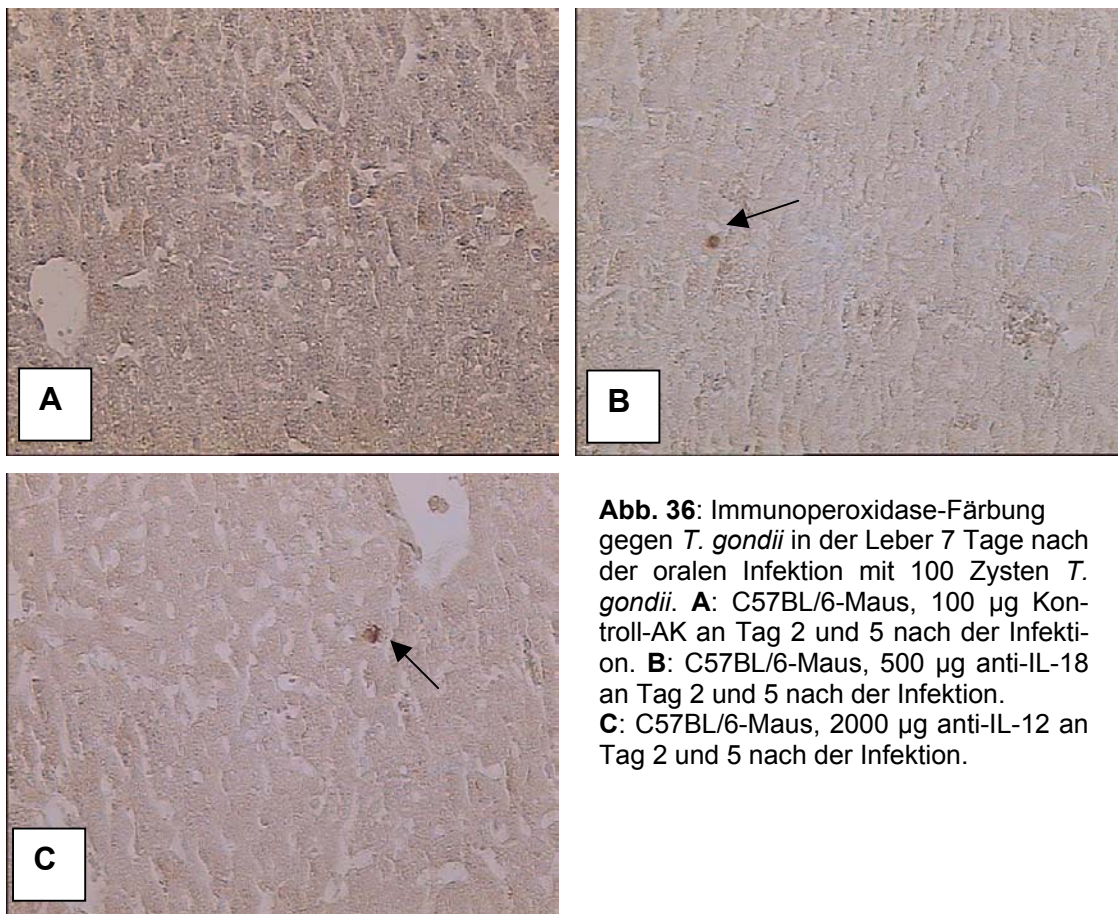


**Abb. 34:** Immunoperoxidase-Färbung gegen *T. gondii* im Ileum 7 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 100 µg Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 500 µg anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **C:** C57BL/6-Maus, 2000 µg anti-IL-12 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.



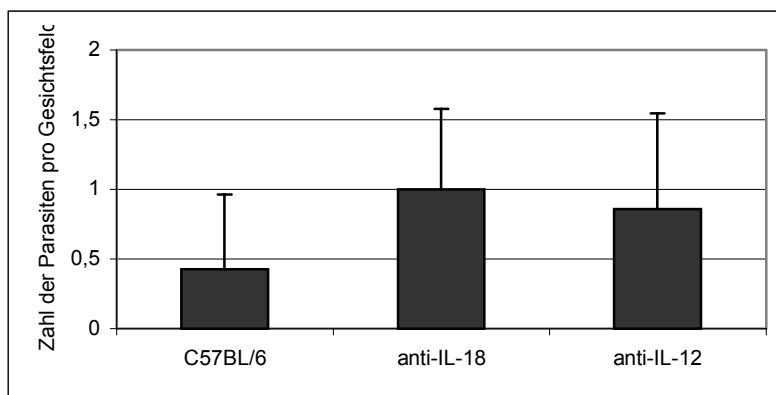


**Abb. 35:** **A:** Anzahl der Parasiten im Ileum von Mäusen 7 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* in jeweils 1 cm (distal und proximal im Ileum).  $p=0,03$  für prox. cm anti-IL-18 vs. C57BL/6.  $p=0,03$  für dist. cm,  $p=0,0006$  für prox. cm bei anti-IL-12 vs. C57BL/6. **B:** Anzahl der fokalen Areale mit *T. gondii* in 10 cm Ileum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse, zweimal 100  $\mu\text{g}$  Kontroll-AK. anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse, zweimal 500  $\mu\text{g}$  anti-IL-18. anti-IL-12: C57BL/6-Mäuse, zweimal 2000  $\mu\text{g}$  anti-IL-12. AK-Gabe i.p. an Tag 2 und 5 nach der Infektion. Jeweils 7 Tiere pro Gruppe.  $p=0,004$  für fokale Areale bei anti-IL-12 vs. C57BL/6.



**Abb. 36:** Immunoperoxidase-Färbung gegen *T. gondii* in der Leber 7 Tage nach der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. **A:** C57BL/6-Maus, 100  $\mu\text{g}$  Kontroll-AK an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **B:** C57BL/6-Maus, 500  $\mu\text{g}$  anti-IL-18 an Tag 2 und 5 nach der Infektion. **C:** C57BL/6-Maus, 2000  $\mu\text{g}$  anti-IL-12 an Tag 2 und 5 nach der Infektion.

Das Vorkommen von *T. gondii* in der Leber der kontrollbehandelten Mäuse unterscheidet sich nicht signifikant von dem in der Leber der anti-IL-18- und anti-IL-12-behandelten Mäuse, welche auch untereinander keinen Unterschied hinsichtlich der Parasitenzahl in der Leber aufweisen. Ausschnitte der Leberhistologien zeigt Abb. 36, die Parasitenzahlen in der Leber der verschiedenen Mausgruppen sind in Abb. 37 dargestellt.

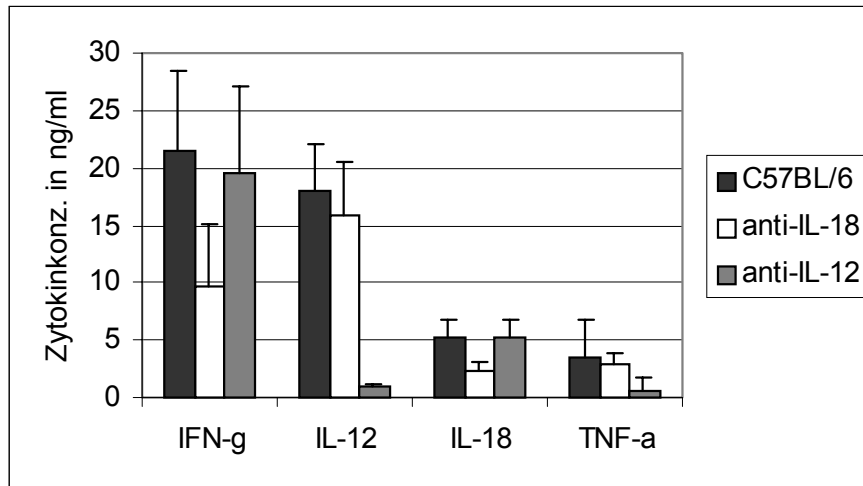


**Abb. 37:** Anzahl der Parasiten pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung innerhalb der Leber von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse, zweimal 100 µg Kontroll-AK. anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse, zweimal 500 µg anti-IL-18. anti-IL-12: C57BL/6-Mäuse, zweimal 2000 µg anti-IL-12. AK-Gabe i.p. an Tag 2 und 5 nach der Infektion. Jeweils 7 Tiere pro Gruppe.

### 3.2.3.3 Zytokine im Serum

Abb. 38 zeigt die Konzentrationen der charakteristischen Zytokine der Th1-Typ-Immunreaktion bei den mit Kontroll-AK behandelten Mäusen sowie der anti-IL-18- und anti-IL-12-behandelten Tiere. Bei der Kontrollgruppe sind verglichen mit den anti-IL-18-behandelten Mäusen signifikant höhere Werte für IFN- $\gamma$  und IL-18 zu messen. Hinsichtlich der Konzentrationen von IL-12 und TNF- $\alpha$  besteht zwischen diesen beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied. Vergleicht man die Kontrollgruppe mit der anti-IL-12-behandelten Gruppe, so finden sich bei der Kontrollgruppe signifikant höhere Werte für IL-12 und TNF- $\alpha$ , jedoch gleiche Werte bezüglich IFN- $\gamma$  und IL-18. Die anti-IL-18-behandelte Gruppe zeigt verglichen mit der

anti-IL-12-behandelten Gruppe signifikant höher Werte für IL-12 und TNF-  $\alpha$  und signifikant niedrigere Werte für IFN-  $\gamma$  und IL-18.



**Abb. 38:** Zytokinkonzentrationen im Serum von Mäusen 8 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Bestimmung mittels ELISA. C57BL/6: C57BL/6-Mäuse, zweimal 100  $\mu$ g Kontroll-AK. anti-IL-18: C57BL/6-Mäuse, zweimal 500  $\mu$ g anti-IL-18. anti-IL-12: C57BL/6-Mäuse, zweimal 2000  $\mu$ g anti-IL-12. AK-Gabe i.p. an Tag 2 und 5 nach der Infektion. Jeweils 7 Tiere pro Gruppe.  $p=0,007$  für IFN- $\gamma$ ,  $p=0,01$  für IL-18 bei anti-IL-18 vs. C57BL/6.  $p=0,0006$  für IL-12,  $p=0,03$  für TNF- $\alpha$  bei anti-IL-12 vs. C57BL/6.  $p=0,04$  für IFN- $\gamma$ ,  $p=0,0006$  für IL-12,  $p=0,01$  für IL-18,  $p=0,002$  für TNF- $\alpha$  bei anti-IL-18 vs. anti-IL-12.