

4. Diskussion

Die orale Infektion der C57BL/6-Maus mit dem Parasiten *T. gondii* ist ein Beispiel für eine Th1-Typ-Immunreaktion, die überschießend abläuft und im Ileum und, in milderer Form, in der Leber der Tiere zur Ausbildung von Nekrosen führt. Aufgrund der Immunpathologie versterben die Mäuse letztendlich 7-13 Tage nach der Infektion. Die Pathologie ist v. a. durch CD4⁺-T-Zellen, IFN- γ , TNF- α und NO als Effektormoleküle verursacht und nicht durch *T. gondii* selbst (12-14). Die Zytokine IL-12 und IL-18 sind hinsichtlich ihrer Bedeutung bei der Induktion einer Th1-Typ-Immunreaktion (27, 29) und der Abwehr von Mikroorganismen in Mausmodellen gut untersucht (37, 49). Ihre Rolle in überschießenden Immunantworten, die zur Immunpathologie führen, ist ebenfalls bekannt (44-47). Auch die orale Infektion der Maus mit *T. gondii* führt zu verstärkter Produktion von IL-18 und IL-12 (16).

Die Bedeutung von IL-18 in der Induktionsphase der Immunpathologie nach oraler Infektion mit *T. gondii* sollte in der vorliegenden Arbeit näher analysiert werden. Zum einen wurden dazu IL-18-KO-Mäuse mit Wildtypmäusen und KO-Mäusen für ICSBP bzw. den TNF- α -Rp55, welche somit ebenfalls Defekte in unterschiedlichen Molekülen der Th1-Typ-Immunreaktion haben, verglichen. Zum anderen wurde der Versuch einer Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-18 (48) untersucht. Es sollte geklärt werden, ob durch Neutralisation von IL-18 weniger Nekrosen im Sinne einer reduzierten Immunpathologie auftreten und ob die Parasitenreplikation beeinflusst wird. Das Infektionsmodell mit *T. gondii* (15) hat dabei gegenüber anderen Modellen der Darmentzündung (44-47) den Vorteil, dass neben dem Ausmaß der Gewebeschädigung im Rahmen der Immunantwort auch gleichzeitig die Abwehr eines Parasiten untersucht werden kann.

Der Vergleich von infizierten IL-18-KO-Mäusen, ICSBP-KO-Mäusen und TNF- α -Rp55-KO-Mäusen mit dem Wildtyp (C57BL/6-Mäuse) zeigt, dass in den IL-18-KO-Mäusen in gleichem Ausmaß Ileumnekrosen entstehen wie im Wildtyp, d. h. dass auch ohne IL-18 noch eine Immunpathologie im Ileum stattfindet. ICSBP-KO-Mäuse,

die kein IL-12p40 synthetisieren können, und TNF- α -Rp55-KO-Mäuse weisen signifikant weniger Ileumnekrosen als der Wildtyp auf, was darauf schließen lässt, dass IL-12 und TNF- α eine wesentlichere Rolle als IL-18 in der Immunpathologie durch *T. gondii* spielen. Die Nekrosenentstehung in der Leber der IL-18-KO-Mäuse nach der Infektion entspricht der der Wildtypmäuse, wohingegen die ICSBP-KO-Mäuse in der Leber vermehrt Nekrosen zeigen. Die ICSBP- und TNF- α -Rp55-KO-Mäuse zeigen im Ileum eine signifikant stärkere Parasitenvermehrung als der Wildtyp. Für IL-18-KO-Mäuse trifft dies nicht zu. Die ICSBP-KO-Mäuse weisen zudem signifikant höhere Parasitenzahlen als die IL-18-KO-Mäuse auf, was auf einen stärkeren Defekt der Parasitenabwehr in ICSBP-KO-Mäusen hinweist und Ursache der Zellschädigung in der Leber sein dürfte.

Die Untersuchung der Letalität und Überlebenszeit der IL-18-KO-Mäuse nach oraler Infektion mit *T. gondii* fand ebenfalls im Vergleich mit den ICSBP-KO- und TNF- α -Rp55-KO-Mäusen statt. In der vorliegenden Arbeit konnte mit geringen Fallzahlen keine verlängerte Überlebenszeit der IL-18-KO-Mäuse im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen nach einer Infektion mit 100 Zysten nachgewiesen werden. In neueren Arbeiten (AG Liesenfeld) konnte anhand von größeren Fallzahlen jedoch ein verlängertes Überleben der IL-18-KO-Mäuse nach der 100 Zysten-Infektion belegt werden. IL-18-KO-Mäuse zeigen allerdings im Gegensatz zu den ICSBP-KO- und TNF- α -Rp55-KO-Mäusen eine verlängerte Überlebenszeit nach einer oralen Niedrigdosisinfektion mit 10 Zysten. Dabei überleben sowohl die IL-18-KO-Mäuse als auch die Wildtyp-Tiere die Infektion um mehrere Wochen, während ICSBP-KO- und TNF- α -Rp55-KO-Mäuse innerhalb der ersten zwei Wochen versterben. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass IL-12 und TNF- α eine bedeutendere Rolle in der Immunantwort auf *T. gondii* spielen als IL-18 und eine defiziente Parasitenabwehr zumindest bei ICSBP-KO-Mäusen für den Tod der Tiere mitverantwortlich ist. Ursache hierfür dürften u. a. die erniedrigten Zytokinkonzentrationen sein.

Infizierte IL-18-KO-Mäuse weisen ähnliche Konzentrationen der charakteristischen Zytokine der Th-1-Reaktion auf wie infizierte Wildtyp-Mäuse. Dagegen haben infizierte ICSBP-KO-Mäuse an Tag 8 nach der Infektion signifikant weniger IFN- γ , IL-12 und IL-18 im Serum als Kontrolltiere. Es scheint, dass die IL-18-KO-Maus aufgrund

der Fähigkeit, IL-12 zu bilden, den IL-18-Mangel hinsichtlich Parasitenabwehr kompensieren kann und zu ausreichender Synthese von IFN- γ in der Lage ist. Die ICSP-KO-Maus, die neben dem Mangel an IL-12 auch eine niedrigere IL-18-Produktion und eine wohl daraus resultierende fehlende IFN- γ -Hochregulation zeigt, ist stärker in der Parasitenabwehr beeinträchtigt. Da IL-18-KO-Mäuse keine vermehrte Parasitenreplikation verglichen mit dem Wildtyp zeigen, scheint IL-18 für die Parasitenabwehr von geringerer Bedeutung zu sein als IL-12. Diese Dominanz von IL-12 über IL-18 findet sich auch in der Abwehr von *Chlamydia trachomatis* in Experimenten mit IL-12-KO- und IL-18-KO-Mäusen (50). Dort zeigen IL-12-KO-Mäuse eine geringere Fähigkeit *Chlamydia trachomatis* zu eliminieren als Mäuse, die kein IL-18 bilden. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Experimenten mit *Listeria monocytogenes* in KO-Mäusen für IL-12 bzw. IL-18, denen nach IL-18-KO-Mäuse größere Defekte in der Abwehr der Listerien hatten und schneller verstarben als IL-12-KO-Mäuse (37).

Die mit *T. gondii* infizierten TNF- α -Rp55-KO-Mäuse zeigen dagegen signifikant mehr IFN- γ in Serum und Zellüberständen der MLN als die Kontrolltiere, was als Kompensation des TNF- α -Rezeptormangels gedeutet werden kann. Da diese Tiere keine Ileumnekrosen aufweisen, scheinen hohe IFN- γ -Spiegel alleine ohne den Effekt von TNF- α keine Ileumnekrosen zu verursachen. Das Ergebnis, dass eine anti-TNF- α -Behandlung zu deutlich verminderten Ileumnekrosen nach einer 100 Zysteninfektion mit *T. gondii* führt, die IFN- γ -mRNA-Konzentration in den mononukleären Zellen der Lamina propria allerdings gegenüber infizierten Kontrollmäusen unverändert bleibt, unterstützt diese Vermutung (13).

Die Hemmung von IL-18 in Mausmodellen einer Darmentzündung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen durchgeführt. Es handelte sich jedoch jeweils um eine iatrogen verursachte Kolitis, wohingegen die Infektion mit *T. gondii* v. a. eine Ileitis auslöst. Sigmund *et al.* behandelten eine DSS (Dextran sulfate sodium)- Kolitis erfolgreich mit einem anti-Maus-IL-18-Serum vom Kaninchen (44), Kanai *et al.* konnten mit einem polyklonalen anti-IL-18-Antikörper die Schwere einer TNBS-Kolitis der Maus reduzieren (45). Die Verabreichung eines rekombinanten humanen IL-18-bindenden

Proteins nach Induktion einer TNBS-Kolitis durch Ten Hove *et al.* führte ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der histologischen Zeichen der Inflammation (46).

Die Behandlung von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen mit einem monoklonalen Antikörper gegen IL-18 in dieser Arbeit zeigte nur nach zweimaliger Injektion an Tag 2 und 5 nach der Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* einen Erfolg. Diese Mäuse wiesen signifikant weniger Nekrosen in Ileum und Leber auf als kontrollbehandelte Tiere. Eine einmalige Injektion reichte dazu nicht aus. Die zweimal behandelten Tiere litten trotz der durch Neutralisation von IL-18 bedingten Immunmodulation nicht unter einer Zunahme der Parasitenvermehrung im Ileum. Eine Zunahme der Parasiten in der Leber nach IL-18-Neutralisation wurde nur in einem Versuch festgestellt. Der genaue Grund für die erfolgreiche Blockade der Nekrosen nach zweimaliger IL-18-Behandlung konnte in dieser Arbeit nicht ausreichend geklärt werden. In zwei unabhängigen Versuchen mit zweimaliger Antikörper-Injektion traten in den anti-IL-18-behandelten Tieren keine Ileumnekrosen auf, der ursächlich vermutete resultierende IFN- γ -Abfall zeigte sich aber nur in einem der Versuche. Dies entspricht den Ergebnissen von Mordue *et al.* (16), in denen der positive Effekt einer IL-18-Blockade mit Antikörpern nach einer *T. gondii*-Infektion nicht auf eine Reduzierung der IFN- γ -Produktion zurückzuführen war. Demzufolge löst IL-18 nach der Infektion Effekte aus, die nicht durch IFN- γ vermittelt werden, z. B. eine direkte Makrophagenaktivierung. In der Arbeit von Ten Hove *et al.* löst die Hemmung von IL-18 in der TNBS-Kolitis eine Reduktion der TNF- α -Konzentration in Kolon-Homogenisaten aus, jedoch ebenfalls nicht eine Verminderung der IFN- γ -Konzentration (46).

Die Wirksamkeit einer anti-IL-12-Behandlung nach der Infektion mit *T. gondii* war bekannt (14) und wurde in der vorliegenden Arbeit der anti-IL-18-Behandlung gegenübergestellt. Nach der zweimaligen Injektion von anti-IL-12 zeigten die C57BL/6-Mäuse auch in dieser Arbeit signifikant weniger Ileumnekrosen als nach der Kontrollbehandlung. Allerdings führte die anti-IL-12-Behandlung im Vergleich zu der mit Kontroll-Antikörper zu einem signifikanten Anstieg der Parasitenzahlen im Ileum, was nach der anti-IL-18-Behandlung nicht zu beobachten war. Diese gestörte Parasiten-

abwehr kann dabei nicht Resultat eines IFN- γ -Mangels sein, da die anti-IL-12-behandelten Mäuse in gleichem Maß IFN- γ im Serum enthalten wie die Kontrolltiere. Die TNF- α -Konzentration im Serum ist allerdings signifikant niedriger, was wie bei TNF- α -Rp55-KO-Mäusen die Erklärung für das Ausbleiben von Ileumnekrosen in Kombination mit verstärkter Parasitenreplikation sein könnte.

Genauere Aussagen über die Zytokinprofile sowohl der infizierten KO-Mäuse als auch der behandelten Mäuse sind in dieser Arbeit nur begrenzt möglich gewesen, da meist nur die Zytokinkonzentrationen im Serum, d. h. der systemischen Produktion, sichere Ergebnisse brachten. Die lokale Zytokinproduktion wurde in Zellüberständen der MLN und Milz gemessen, war aber oft, v.a. für IL-18 und TNF- α nicht sicher oder überhaupt nicht zu bestimmen bzw. zeigte starke Unterschiede zwischen den Tieren einzelner Gruppen. Messungen von Zytokinen in Zellüberständen sind des Weiteren auch durch die Parasitenlast im jeweiligen Organ beeinflusst. Außerdem liegen in dieser Arbeit nur Zytokinwerte im Serum von Tag 8 nach der Infektion vor, also kurz bevor die Tiere gestorben wären. Mehrere Messungen über den gesamten Zeitraum von der Infektion bis zum Tod der KO-Mäuse und der behandelten Tiere würden genauere Aussagen über die Produktion von IFN- γ und TNF- α als Effektorzytokine in diesem Modell erlauben.

Zur Untersuchung der Auswirkung einer ausschließlichen IL-12-Defizienz auf die Immunpathologie und Parasitenabwehr sollten in weiterführenden Versuchen IL-12-KO-Mäuse verwendet werden, da ICSBP nicht nur ein Transkriptionsfaktor für IL-12p40 ist, sondern auch an der Regulation des IL-18-Gens beteiligt ist (25) und somit nicht klar ist, inwieweit die geringe IL-18-Produktion der ICSBP-KO-Mäuse durch die ICSBP-Defizienz verursacht ist.

In den Behandlungsversuchen wurde nur die Behandlung mit anti-IL-18 oder anti-IL-12 untersucht. Eine gleichzeitige Hemmung von IL-18 und IL-12 durch Antikörper bzw. eine Titration der beiden Antikörper gegeneinander nach einer Infektion mit *T. gondii* dürfte die Effekte auf die Produktion von IFN- γ und TNF- α genauer beleuchten.

Außerdem bleibt offen, welche Zellen nach der beschriebenen Infektion mit *T. gondii* die wesentlichen Produzenten des IL-18 sind. Im Fall der DSS-Kolitis (44) und des Modells der Transferkolitis (47) ist IL-18 im Wesentlichen im intestinalen Epithel nachweisbar, dahingegen finden sich im Modell der TNBS-Kolitis Makrophagen als Hauptquelle für IL-18 (45).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass IL-18-KO-Mäuse nicht vor der Entstehung von Nekrosen nach der Infektion mit *T. gondii* geschützt sind. Gleichzeitig wurde aber belegt, dass infizierte C57BL/6-Wildtyp-Mäuse durch die Behandlung mit anti-IL-18 vor den im Rahmen der auftretenden Immunpathologie der Th1-Reaktion entstehenden Nekrosen zu schützen sind und dabei keine gesteigerte Parasitendissemination beobachtet wird. Ein Defekt im TNF- α -System wie bei TNF- α -Rp55-KO-Mäusen oder mit anti-TNF- α -Antikörper behandelten Mäusen (12) führt dagegen zu geringen Ileumnekrosen auf Kosten der Abwehr von *T. gondii*. Die TNF- α -Rp55-KO-Mäuse sind in ihrer Abwehr so beeinträchtigt, dass sie auch nach einer Infektion mit nur 10 Zysten versterben, die von IL-18-KO-Mäusen überlebt wird. Die Ergebnisse, dass IL-18 geringere Bedeutung bei der Abwehr von einem Erreger, wie in diesem Modell *T. gondii*, hat als TNF- α und eine Hemmung von IL-18 therapeutisch bei einer überstimulierten Th1-Typ-Immunreaktion wirksam ist, lassen sich möglicherweise auf die Situation beim M. Crohn übertragen. Dort liegt ebenfalls eine überschießende Th1-Typ-Immunreaktion vor (2), die seit einigen Jahren in schweren Fällen durch eine Blockade von TNF- α behandelt wird (4,5). Aufgrund des erhöhten Erkrankungsrisikos durch v. a. reaktivierte Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* kann diese Therapie gefährlich werden (6). In Hinblick auf derartige Nebenwirkungen könnte eine Hemmung von IL-18 in diesen Patienten risikoärmer bezüglich des Auftretens opportunistischer Infektionen sein und dabei effektiv, die Th1-Immunpathologie der Patienten in ausreichendem Maß zu verringern.