

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

**DISSERTATION**

**Die Bedeutung von IL-18-bindendem Protein in der  
*Toxoplasma gondii*-induzierten Immunpathologie des  
Ileums**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ingmar Frank

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld  
2. Prof. Dr. med. A. Stallmach  
3. Prof. Dr. U. Steinhoff

**Datum der Promotion: 07.09.2012**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1. Morbus Crohn: Epidemiologie, Ätiologie und aktuelle Behandlung.....	6
1.2. Th1-Immunreaktionen.....	7
1.2.1. IL-18.....	9
1.2.2. IL-18bp.....	10
1.2.3. Blockade von IL-18 bei Entzündungsreaktionen im Darm .....	11
1.3. Die orale Infektion der C57BL/6-Maus mit <i>T. gondii</i> als Tiermodell des M. Crohn.....	13
1.4. Fragestellung.....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1. Material</b> .....	<b>16</b>
2.1.1. Tiere und Parasiten.....	16
2.1.1.1. Mäuse.....	16
2.1.1.2. Parasiten.....	16
2.1.2. Geräte, Materialien und Plastikwaren.....	16
2.1.2.1. Geräte und Materialien.....	16
2.1.2.2 Plastikwaren.....	17
2.1.3. Chemikalien, Puffer, Lösungen, Oligonukleotidprimer, -sonden, Enzyme, Antikörper.....	18
2.1.3.1. Chemikalien.....	18
2.1.3.2. Puffer und Lösungen.....	19
2.1.3.3. Oligonukleotidprimer, -sonden, Enzyme, Antikörper.....	21
2.1.3.3.1. Oligonukleotidprimer und -sonden.....	21
2.1.3.3.2. Enzyme und Antikörper.....	22
2.1.3.4. Kommerzielle „Kits“.....	22
2.1.3.5. Software und Datenbanken.....	23
<b>2.2. Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.2.1. Infektion der Mäuse.....	24
2.2.2. Behandlung der C57BL/6-Mäuse mit IL-18bp und IL-12p40-Fusionsprotein.....	24
2.2.3. Entnahme der Organe, des Blutes und Probengewinnung.....	25
2.2.4. Histologische Verfahren.....	25

2.2.4.1. H&E-Färbung und Histologie-Score.....	25
2.2.4.2. Immunperoxidase (PAP)-Färbung.....	26
2.2.4.3. Fotodokumentation.....	27
2.2.5. Bestimmung der Zytokin-Konzentration mittels ELISA.....	27
2.2.6. Proteinbestimmung.....	28
2.2.7. Bestimmung der Stickoxid (NO)-Konzentration.....	28
2.2.8. Bestimmung der Affinität von humanem IL-18bp zu murinem IL-18...28	
2.2.9. Quantifizierung der IL-18bp-RNA.....	29
2.2.10. Statistik.....	29
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>31</b>
3.1. Expression von IL-18bp nach oraler Infektion mit <i>T. gondii</i> .....	31
3.2. Einfluss des IL-18bp auf den Verlauf der Infektion durch <i>T. gondii</i> .....	32
3.2.1. Pathologische Veränderungen im Ileum.....	32
3.2.2. Replikation von <i>T. gondii</i> in Ileum und Leber.....	34
3.2.3. Pathologische Veränderungen in der Leber.....	35
3.3. Zytokin- und Stickoxid (NO)-Konzentrationen in Serum und Organen.....	37
3.4. Untersuchungen zum Vergleich der Wirkung verschiedener Dosierungen von IL-18bp bei Infektion mit 100 Zysten <i>T. gondii</i> .....	40
3.5. Affinität von humanem IL-18bp zu murinem IL-18.....	41
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>49</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>51</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>8. Lebenslauf.....</b>	<b>63</b>
<b>9. Danksagung.....</b>	<b>64</b>



# 1. Einleitung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa) sind häufige Erkrankungen, deren Ätiologie bisher nicht ausreichend geklärt ist. Die bestehenden therapeutischen Möglichkeiten können nur den Verlauf der Erkrankung beeinflussen, eine Heilung ist derzeit jedoch nicht möglich. Zudem bergen die verwendeten Substanzen die Gefahr zum Teil erheblicher Nebenwirkungen und Risiken, sodass neue therapeutische Optionen nötig sind. Experimentelle Untersuchungen bei Tieren und Menschen weisen auf eine überschüssige Immunreaktion (Immunpathologien) als Ursache der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin. Bei M. Crohn scheint vor allem eine pathologische Th1-Immunantwort vorzuliegen, deren Charakterisierung und Behandlung in dieser Arbeit näher untersucht werden soll. Eine bedeutende Rolle fällt hierbei den Zytokinen der Th1-Immunantwort, IL-12, IL-18, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  zu.

Kürzlich wurde ein regulatorisches Zytokin, IL-18bp, beschrieben, welches das proinflammatorische IL-18 inhibieren kann. In verschiedenen Tiermodellen konnten durch die Behandlung mit IL-18bp Therapieerfolge erzielt werden. Während jedoch die hauptsächliche Krankheitsaktivität des M. Crohn im distalen Ileum vorliegt, gibt es nur wenige experimentelle Modelle, in denen eine Immunpathologie im Dünndarm untersucht werden kann. Die meisten experimentellen Modelle zeichnen sich durch Entzündungsreaktionen im Kolon aus. Im hier verwendeten Modell der oralen Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *T. gondii* wird eine Th1-Immunpathologie im Ileum der Maus ausgelöst, die weitreichende Parallelen zum immunpathologischen Geschehen bei M. Crohn aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Bedeutung von IL-18bp als Therapieansatz zur Blockade überschüssiger Th1-Immunreaktionen im Toxoplasma-Infektionsmodell untersucht.

## 1.1 Morbus Crohn: Epidemiologie, Ätiologie und aktuelle Behandlung

M. Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung. Er zeichnet sich durch eine transmurale Entzündungsreaktion aus, die im gesamten Gastrointestinaltrakt vorkommen kann, aber meist im distalen Ileum auftritt (1). Folgen dieser Erkrankung sind die Bildung von Fisteln, Abszessen, Stenosen und extraintestinalen Manifestationen wie Arthralgien oder Hautveränderungen bis hin zu Perforationen.

Die Inzidenz der Erkrankung liegt in Mitteleuropa zwischen 5,2 und 8,6 pro 100.000 Einwohner (2–4). Die Prävalenz liegt bei 120-200 pro 100.000. M. Crohn ist eine Erkrankung von vor allem jungen Menschen, die höchste altersspezifische Inzidenz findet sich bei den 15- bis 34-Jährigen (4).

Untersuchungen beim Menschen (5–7), aber auch in experimentellen Modellen des M. Crohn (8), deuten darauf hin, dass für die Entwicklung der pathologischen Veränderungen vor allem eine sog. T-Helfer-1 (Th1)-Immunreaktion, vermutlich auf bakterielle Antigene der Darmflora, verantwortlich ist. So konnten in Arealen mit aktivem M. Crohn vermehrt Th1-Zytokine der Th1-Immunreaktion (IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$ ) nachgewiesen werden (5–7; 9–11). Interessanterweise werden auch andere chronisch entzündliche Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose als überschiessende Th1-Immunreaktionen angesehen (12).

Die Therapie des M. Crohn besteht in erster Linie in einer entzündungshemmenden Therapie. Zur Anwendung kommen 5-Aminosalicylsäure (5-ASA), Kortikosteroide, Azathioprin, Methotrexat und sog. „Biologicals“, insb. anti-TNF-Antikörper oder TNF-Fusionsproteine (13). Komplikationen des M. Crohn wie Fisteln oder bakterielle Infektionen bedürfen einer chirurgischen oder antibiotischen Therapie.

5-ASA wird für die Behandlung milder bis moderater Krankheitsverläufe eingesetzt. Bei der Behandlung des M. Crohn sind im Gegensatz zur Colitis ulcerosa mit 5-ASA allerdings nur geringe Behandlungserfolge zu erzielen (13; 14).

Deutlich bessere Ergebnisse werden durch die Verwendung von topisch oder systemisch verabreichten Glukokortikoiden erreicht (15–17). Relevante Nebenwirkungen gewinnen jedoch bei systemischer Anwendung und zunehmender Therapiedauer und Dosis an Bedeutung. Neben dem steroidinduzierten Diabetes mellitus können Osteoporose und gastrale/duodenale Ulcera auftreten (18).

In zweiter Linie kommen auch andere immunsuppressive Therapien mit Azathioprin oder Methotrexat in Betracht (13). Die therapeutischen Effekte dieser Medikamente kommen erst nach längerer Behandlung zum Tragen, sodass sie nicht für die Behandlung des akuten Schubes zur Verfügung stehen. Als wichtigste Nebenwirkungen treten hier die Hepato- und Myelotoxizität in den Vordergrund, welche häufig die Anwendung limitieren (13; 14; 19–21). Bei Nichtansprechen auf Corticoide und Immunsuppressiva oder bei therapielimitierenden Nebenwirkungen kommen anti-TNF- $\alpha$ -Antikörper (Infliximab) zum Einsatz, deren therapeutische Wirkung in mehreren Studien belegt werden konnte (13; 14; 22). In einigen Fällen kommt es allerdings zu relevanten Nebenwirkungen wie der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose (23). Zudem besteht auch die Möglichkeit der Bildung von antinukleären Antikörpern und Antikörpern gegen Infliximab, die eine weitere Therapie nicht zulassen (24; 25).

Eine alternative Form der Inhibierung von TNF- $\alpha$  stellt Etanercept dar. Ein positiver Effekt auf den Verlauf des M. Crohn konnte jedoch nicht belegt werden (14; 26; 27).

Weitere Versuche, direkt in die Signalkaskade der Immunreaktion einzugreifen, sind Antikörper gegen IL-12 (28), die Verwendung von IL-10 (29–31) oder Antagonisten des Transkriptionsfaktors  $\text{nf}\kappa\text{B}$  (32). Wesentliche Nebenwirkungen wurden in den genannten Studien bisher nicht nachgewiesen.

## **1.2. Die Th1-Immunreaktion**

CD4<sup>+</sup>-Zellen spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem. Sie sind an der Produktion von Antikörpern durch B-Zellen beteiligt, aktivieren Makrophagen, NK-Zellen und rekrutieren Granulozyten in entzündete Areale (33; 34).

In Abhängigkeit verschiedener Faktoren wie dem präsentierten Antigen und dem Zytokinmilieu entwickeln sich naive Th-Zellen in verschiedene Subzellpopulationen. Gut charakterisiert sind bislang Th1-, Th2-, Th17- und Treg-Zellen (Abb. 1) (34).

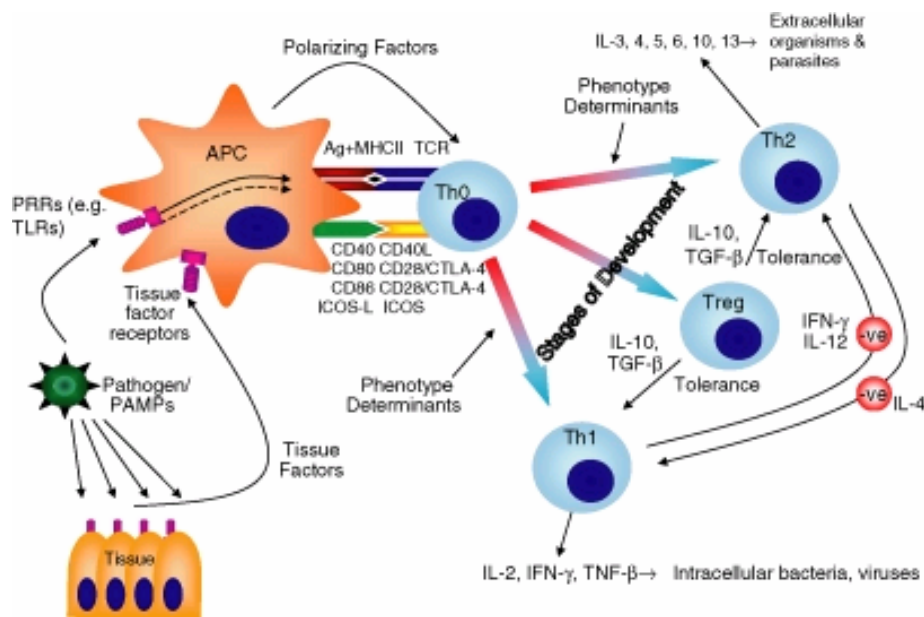


Abb. 1: Schematische Darstellung der bei der T-Zell-Differenzierung beteiligten Faktoren (34).

IL-12 und IL-18 induzieren die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th1-Zellen, die v.a. bei Infektionen mit intrazellulären Erregern von Bedeutung ist (12; 35). Die Th1-Immunreaktion ist durch Sekretion von IFN- $\gamma$  gekennzeichnet (12; 33; 35), wodurch Makrophagen aktiviert und B-Zellen zur Produktion von IgG2-Antikörpern angeregt werden (35). Die Th1-Antwort wird durch die Signaltransduktionsmoleküle Stat1 und T-bet in T-Zellen vermittelt (34). Gleichzeitig wird der IL-12R $\beta$ 2 vermehrt exprimiert, und durch einen positiven Feedbackmechanismus resultiert die weitere Sezernierung von IFN- $\gamma$  durch IL-12. Bei überschüssiger Th1-Reaktion entsteht eine Immunpathologie wie z.B. bei rheumatoider Arthritis und M. Crohn (Abb. 2) (33–35).

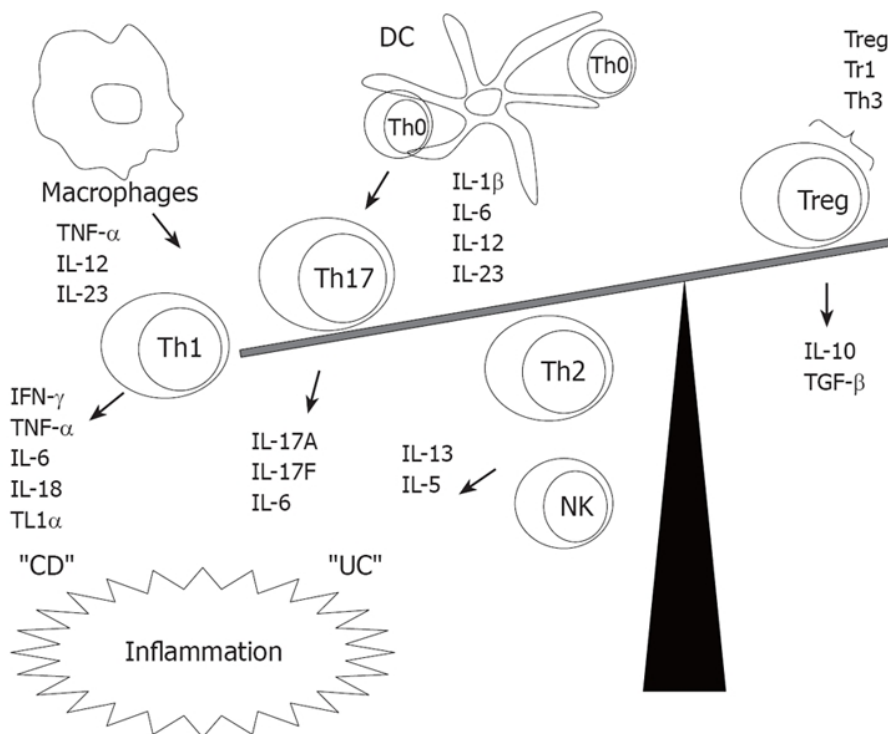
Die Th2-Reaktion ist durch das Interleukin IL-4 charakterisiert. Eine Differenzierung zu Th2-Zellen erfolgt vorwiegend nach Infektion mit extrazellulären Erregern und vermittelt über IL-4 eine Aktivierung von B-Zellen mit Produktion von Antikörpern, Eosinophilen (IL-5) und Mast-Zell-Proliferation und –Degranulation (IL-3 und IL-4). Als Immunpathologie tritt die Th2-Immunreaktion im Rahmen von Allergien, Asthma oder auch Colitis ulcerosa in Erscheinung (33; 34).

Erst seit kurzem bekannt sind Th17-Zellen, denen eine wichtige Rolle in der Abwehr gegen einige extrazelluläre Pathogene eingeräumt wird (33). Die Th17-Immunreaktion ist durch die Sekretion von IL-17, IL-6, IL-21, IL-22 und TNF- $\alpha$  gekennzeichnet. Bisherige Ergebnisse lassen darauf schließen, dass diese Th17-Zellen eine wichtige Rolle bei Infektionen mit extrazellulären Bakterien wie Listerien und Salmonellen oder auch Candida-Infektionen

spielen (33); auch bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoider Arthritis, M. Crohn, Psoriasis und allergischen Reaktionen werden Th17-Zellen als Mediatoren der Pathologie diskutiert (33; 34; 36–39).

Eine Differenzierung zu Treg-Zellen erfolgt durch die Sekretion inhibierender Zytokine durch dendritische Zellen (DC) (34).

Treg (regulatorische T-Zellen) sezernieren IL-10 und TGF- $\beta$ , welche einen suppressiven Effekt auf andere Th-Zellen haben und darüber eine Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen bewirken (34). Insbesondere scheinen Treg wichtig für die Toleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu sein, da die Inhibierung ihrer Funktion z. B. zur Ausbildung eines systemischen lymphoproliferativen Autoimmun-Syndroms führte (33).



**Abb. 2:** Schematische Darstellung der an der Entwicklung des M. Crohn und der Colitis ulcerosa beteiligten pro- und anti-inflammatorischen Zellen und Zytokine (40).

### 1.2.1. IL-18

IL-18 wurde zunächst als IFN- $\gamma$ -inducing-factor beschrieben (41). Es ist strukturell mit IL-1 verwandt, hat aber unterschiedliche biologische Wirkungen. Produziert wird es hauptsächlich von Makrophagen, aber auch von Nicht-Immunzellen, wie z. B. Keratinozyten (42), intestinalen Epithel- (43) und anderen Zellen (44–46). IL-18 wird als inaktives „precursor“

Protein produziert und erst nach Spaltung durch Caspase-1 als aktives Protein sezerniert (47; 48).

Der IL-18-Rezeptor (IL-18R) ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus einer extrazellulären, IL-18 bindenden Einheit (IL-1Rrp oder IL-18R $\alpha$ ) und einer nichtbindenden, signaltransduzierenden Einheit (AcPL oder IL-18R $\beta$ ) (12; 49–52). Er wird auf vielen Zelltypen exprimiert, darunter Makrophagen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, Endothelzellen, T-Zellen und Zellen der glatten Muskulatur (53–56). Durch IL-12 wird der IL-18R verstärkt auf naiven T-Zellen, Th1-Zellen und B-Zellen exprimiert (50; 57).

Die hauptsächliche Wirkung von IL-18 besteht in der Induktion der IFN- $\gamma$ -Sekretion durch Th1- und NK-Zellen (12). IL-18 allein ist jedoch nicht in der Lage, Th1-Zellen zu stimulieren. Es ist dabei abhängig von der Anwesenheit von IL-12 (57–59). In Abwesenheit von IL-12 induziert IL-18 eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen (12).

Insgesamt ist IL-18 essentiell für die Elimination von intrazellulären Erregern. Die Abwesenheit von IL-18 führt zu einer verminderten, jedoch nicht aufgehobenen Abwehr gegen z.B. *Leishmania major*, *Cryptococcus neoformans* oder *Mycobacterium avium* (12; 60). Zudem spielt IL-18 eine wichtige Rolle bei der Abwehr gegen Viren durch die Aktivierung von NK-Zellen (12; 60), und auch tumorsuppressive Eigenschaften werden IL-18 zugesprochen (12).

IL-18 ist auch an der Entwicklung einer pathologischen (überschiessenden) Th1-Immunpathologie beteiligt. So wurden bei Patienten mit M. Crohn in den entzündlichen Arealen der Darmschleimhaut stark erhöhte Konzentrationen von IL-18 gefunden (61; 62). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis, Graft versus host disease und Sepsis gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von IL-18 im Sinne einer Verstärkung der Entzündungsreaktion (12).

Da IL-18 die durch IL-12 ausgelöste Entzündungskaskade verstärkt, aber für die Abwehr gegen Erreger nicht essentiell ist, wird die Inhibition von IL-18 als wirksame und sichere Behandlungsoption bei M. Crohn und anderen Th1-Immunpathologien diskutiert (63–65).

### **1.2.2 IL-18bp**

IL-18bp ist ein ca. 40kDa schweres Protein, das spezifisch an IL-18 bindet und dessen biologische Aktivität u.a. die Induktion von IFN- $\gamma$  in vivo und in vitro inhibiert (66–69). Es ist strukturell mit Rezeptoren der IL-1-Familie verwandt und gehört zur Ig-Superfamilie (66). IL-18bp besitzt keinen transmembranären Abschnitt, ist also ein lösliches Protein (66). Beim

Menschen sind 4 verschiedene Spleißvarianten bekannt (IL-18bp a-d), von denen IL-18bpa und IL-18bpc in der Lage sind, IL-18 zu binden (70). IL-18bpa besitzt die höchste Affinität zu IL-18 (70). Bei der Maus sind 2 Isoformen bekannt (IL-18bp c und d), die beide murines IL-18 binden. Murines IL-18bp bindet zusätzlich auch humanes IL-18 (70). Eine Hemmung von >95% wird durch IL-18bp erreicht, wenn es in doppelter molarer Menge vorliegt; bei gleichen Mengen von IL-18 und IL-18bp wird eine Hemmung der biologischen Aktivität von ca. 50% erreicht (70).

Die Regulation des IL-18bp findet auf Transkriptionsebene statt (71). Hauptverantwortlich für die Induktion von IL-18bp scheint IFN- $\gamma$  zu sein (71–75). Aber auch andere Th1-Zytokine wie IL-12, IL-2, IL-15 und IL-18 führen zu gesteigerter Synthese und Sekretion von IL-18bp (74). Die Induktion des IL-18bp durch IL-18 ist weniger stark als die durch IFN- $\gamma$  (74). IL-18bp scheint daher Teil eines negativen Feedback-Mechanismus zur Regulation der Aktivität von IL-18 zu sein.

In der Submukosa des Darmes des Menschen sind Endothelzellen und Makrophagen die Hauptquelle für IL-18bp (73). Bei aktivem M. Crohn konnte sowohl eine vermehrte Expression von IL-18- und IL-18bp-mRNA, als auch eine vermehrte Sezernierung der Proteine IL-18 und IL-18bp beobachtet werden (64; 73). Bei Patienten mit M. Crohn finden sich im Serum und in der Darmschleimhaut höhere Konzentrationen von IL-18 und IL-18bp als bei Gesunden. Auch wenn ein Großteil des IL-18 durch IL-18bp gebunden vorliegt, sind die Konzentrationen des frei vorliegenden IL-18 bei Patienten mit M. Crohn höher als bei Gesunden (64). Die zusätzliche therapeutische Gabe von IL-18bp könnte hier eine Verringerung des frei und als aktive Form vorhandenen IL-18 und damit eine Milderung der Entzündungsreaktion bewirken.

### **1.2.3. Blockade von IL-18 bei Entzündungsreaktionen im Darm**

Die Effekte einer Blockade von IL-18 wurden in Tiermodellen, die sich durch die Entwicklung von Immunpathologie auszeichnen, untersucht. So konnte bei DSS-induzierter Kolitis durch Behandlung mit Antikörpern gegen IL-18 und durch die Administration von IL-18bp die Schwere der intestinalen Entzündung gemildert und die Verkürzung des Kolons nahezu verhindert werden (67; 76; 77). Eine Milderung der Entzündungsreaktion wurde ebenfalls bei mit Anti-IL-18 behandelten und IL-18-Knockout-Mäusen beobachtet (78). Auch die Behandlung mit IL-18bp von Tieren mit TNBS-Kolitis resultierte in einer reduzierten Entzündungsreaktion (79). In einer weiteren Studie konnte ein ähnlicher Effekt auch mit der

Administration von IL-18 antisense mRNA im Modell der durch Transfer von CD62L<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-Zellen in SCID-Mäusen induzierten Kolitis erreicht werden (80). Neben den entzündlichen Darmerkrankungen konnten auch die Symptome der Kollagen-Arthritis der Maus durch die Gabe von IL-18bp um ca. 50% gemildert und das Auftreten der Entzündung verzögert werden (68).

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung der Ileum-Pathologie von IL-18 abhängig ist und die Darmpathologie durch Anti-IL-18 (und in IL-18-Knockout-Mäusen) signifikant reduziert wird (63).



### 1.3. Die orale Infektion der C57BL/6 Maus mit *T. gondii* als Tiermodell des M. Crohn

Der Einfluss von IL-18 und dessen Neutralisation auf die Entwicklung einer Th1-Immunpathologie im Darm wurde in Tiermodellen wie der DSS- oder TNBS-induzierten Kolitis beschrieben (76; 77; 79). Während die Manifestationen des M. Crohn zumeist im Dünndarm zu finden sind, zeichnen sich diese Tiermodelle jedoch durch pathologische Veränderungen im Kolon aus.

Beispiele für Veränderungen im Ileum sind die Modelle der SAMP1/YitFc-Mäuse (81) und der heterozygoten TNF( $\Delta$ ARE/WT)-Mäuse (82).

Die Infektion von C57BL/6-Mäusen mit 100 Zysten des *T. gondii* Stammes ME49 resultiert in einer Th1-Typ Immunantwort, bei der, vermittelt durch IL-12 und IL-18 sowie IFN- $\gamma$ , NO und TNF- $\alpha$  Nekrosen im Dünndarm, vor allem im distalen Ileum auftreten (83). Die Vorgänge sind schematisch in Abb. 3 gezeigt. Nach Eindringen von *T. gondii* durch die Darmschleimhaut kommt es zu einer Infektion von Makrophagen und dendritischen Zellen, welche über die Produktion von IL-12 und IL-18 die Proliferation von Th1-Zellen bewirken. Diese wiederum sezernieren IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , wodurch Makrophagen stimuliert werden NO und TNF- $\alpha$  zu sezernieren. Vermutlich kommt es dabei zu einer Störung der Epithelbarriere, wodurch Bakterien der Darmflora zu einer weiteren Stimulation der T-Zellen beitragen, was zu nekrotischen Veränderungen der Darmschleimhaut führt. Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion sterben C57BL/6-Mäuse innerhalb von 7-10 Tagen (83; 84). Als gegenregulatorische Proteine sind TGF- $\beta$  und IL-10 beschrieben (84).

Kürzlich konnte die Arbeitsgruppe zudem zeigen, dass die Immunpathologie nach oraler Infektion mit *T. gondii* nicht nur durch eine Th1-Antwort gekennzeichnet ist, sondern auch durch die Produktion von IL-22 die Pathologie vermittelt (85). Interessanterweise ist IL-22 Bestandteil von Th-17 Reaktionen; im beschriebenen Modell spielt IL-17 im Gegensatz zu IL-22 jedoch keine essentielle Rolle.

Da für die Pathogenese des M. Crohn beim Menschen ebenfalls eine überschüssige Th1-Immunreaktion angenommen wird, eignet sich die perorale Infektion von C57BL/6-Mäusen mit *T. gondii* als Modell zur Untersuchung der Immunpathogenese eines M. Crohn (5–7; 9; 83).

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von IL-18 mittels spezifischer Antikörper in diesem Modell das Auftreten von Nekrosen verhindern kann, ohne dabei die Immunabwehr des Parasiten zu beeinflussen (63). Es wurde jedoch nicht die Rolle des IL-18 untersucht.

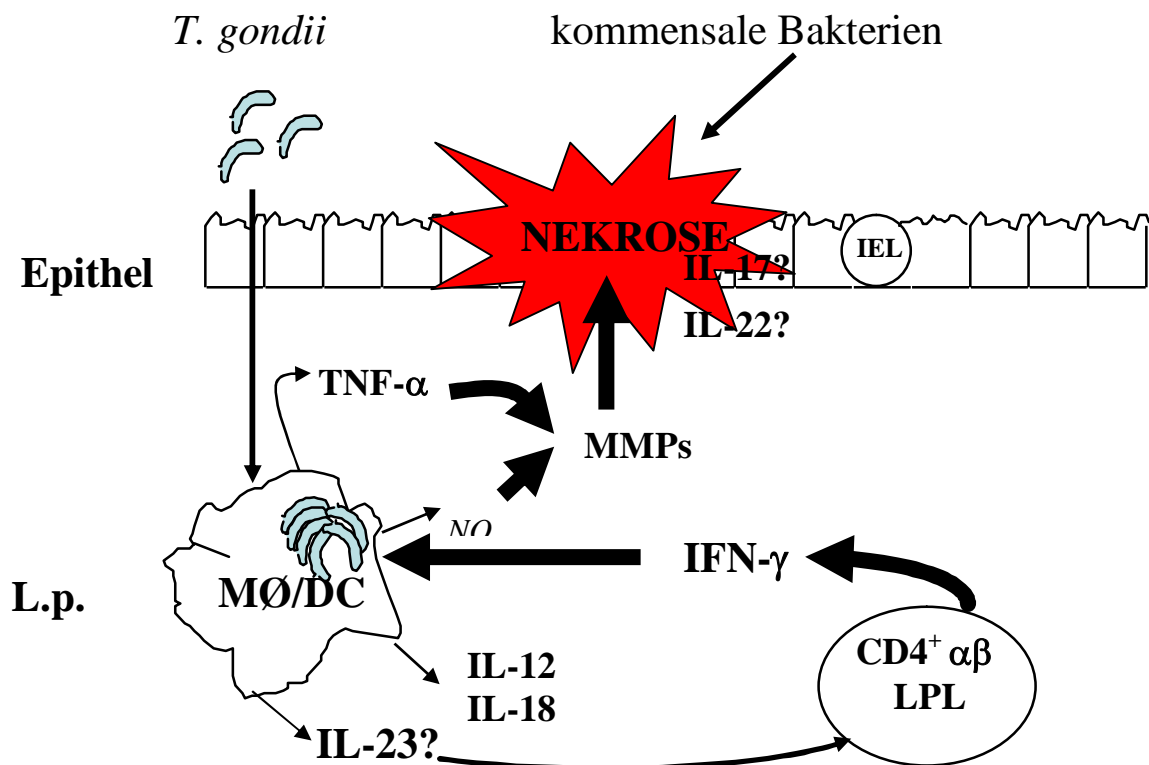


Abb. 3: Schematische Darstellung der Th1-Immunpathologie nach oraler Infektion von suszeptiblen Mäusen mit 100 Zysten *T. gondii*

#### 1.4. Fragestellung

Herkömmliche Therapien des M. Crohn sind mit starken Nebenwirkungen behaftet. Neuere Therapien des M. Crohn durch Antikörper gegen Entzündungsmediatoren wie TNF oder durch Fusionsproteine sind mit dem Problem der Immunsuppression behaftet, das sich in einer verminderten Immunantwort gegen Krankheitserreger, insb. der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose, manifestiert (86).

Die Inhibierung des IL-18-Signalweges wird als sicherere Alternative diskutiert, da IL-18 anti-inflammatorisch wirkt, aber keine wichtige Rolle bei der Abwehr von Infektionen zu spielen scheint. Auf diesem Weg könnte eine Milderung der Entzündungsreaktion ohne Schwächung der Immunabwehr erreicht werden.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, den Effekt von intraperitoneal appliziertem IL-18bp im Modell der intestinalen Immunpathologie nach oraler Infektion mit *T. gondii* zu untersuchen. Insbesondere die folgenden Fragen sollten im Detail beantwortet werden:

1. Kann IL-18bp die Entwicklung von intestinalen Nekrosen nach peroraler Infektion mit *T. gondii* verhindern oder abschwächen?
2. Wird durch die Therapie mit IL-18bp die Immunabwehr gegen *T. gondii* beeinflusst?
3. Ist der therapeutische Effekt der Therapie mit IL-18bp dosisabhängig?
4. Wie hoch ist die Affinität von IL-18bpa zu IL-18?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Tiere und Parasiten

##### 2.1.1.1. Tiere

Weibliche C57BL/6-Mäuse aus der Zucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) der Charité, Campus Benjamin Franklin, waren 8-12 Wochen alt und wurden in klimatisierten Räumen mit einem 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus gehalten. Das Futter bestand aus Pellets, Wasser stand unbegrenzt zur Verfügung. Zuchtpaare der IL-18-KO-Mäuse wurden von K. Takeda, Department of Host Defense, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University, Japan, zur Verfügung gestellt. Diese wurden in den Tierhaltungsräumen des FEM der Charite verpaart und gehalten. NMRI-Mäuse stammten ebenfalls aus der Zucht des FEM.

(Genehmigungsnummern: 035/98, 303/99 114/03, 258/04,)

##### 2.1.1.2. Parasiten

Es wurden Parasiten des *T. gondii* Stammes ME49 (Prof. J. Remington, Stanford University, USA), zystenbildend und maus-avirulent (Typ-II-Stamm) verwendet. Zur Gewinnung der Parasiten wurden NMRI-Mäuse mit 20 Zysten intraperitoneal infiziert. Nach 2-3 Monaten wurden Zysten gewonnen und zur oralen Infektion verwendet.

#### 2.1.2. Geräte, Materialien und Plastikwaren

##### 2.1.2.1. Geräte und Materialien

###### Gerät:

Biacore X-Instrument

Brutschrank

Färbeküvetten

Färbeschiffchen

###### Hersteller:

Biacore AB, GE-Healthcare, UK

Heraeus, Hanau

VWR, Darmstadt

VWR, Darmstadt

Gefrierschrank –20°C	Liebherr, Rostock
Gefrierschrank –70°C	Sanyo-Fisher Sales, München
Kanülen Sterican Größe 12	Braun, Melsungen
Knopfkanülen	Roth, Karlsruhe
Kühlplatte CP60	Microm, Walldorf
Light Cycler	Roche, Mannheim
Mikroskop Axiostar	Zeiss, Göttingen
Mikroskop mit Digitalkamera	Zeiss, Göttingen
Mörser	VWR, Darmstadt
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Plattenphotometer	Tecan Spectra, Crailsheim
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Präparierbesteck	Aesuclap/Braun, Melsungen
Rotationsmikrotom HM355	Microm, Walldorf
Sensor Chip CM5	Biacore AB, GE-Healthcare, UK
Sterile Werkbank , Lamina Air Flow Class 100	Gelman, Michigan, USA
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, groß	Heraeus, Hanau

### **2.1.2.2. Plastikwaren**

Histologiekassetten	Simport, Bernard-Pilon Beloeil, QC, Kanada
Light Cycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Microslide Objektträger	Corning, Amsterdam
Mikrotiterplatten-Module	Nunc-Immuno Modules, Langenselbold
Objektträger	DAKO, Hamburg
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml	Falcon, BD Biosciences, Heidelberg

Pipettenspitzen versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15/50ml	Sarstedt, Sarstedt
Spritzen 1/5/10ml	Braun, Melsungen

### **2.1.3. Chemikalien, Puffer, Lösungen, Oligonukleotidprimer und –Sonden, Enzyme, Antikörper**

#### **2.1.3.1. Chemikalien**

1% ige Ammoniaklösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aqua dest.	Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charite
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
CuSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
DAB-Tablette	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eisessig	Sigma-Aldrich, Steinheim
Entellan	Merck, Darmstadt
Eosin (gelblich)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Flüssigstickstoff	Fa. Messer, Griessheim
Haematoxilin	Merck, Darmstadt
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Steinheim
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85,1%	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Kalialaun	Merck, Darmstadt
Lyophilized Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
0,85% NaCl-Lösung	Merck, Darmstadt
NaHCO <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaNO <sub>2</sub> gelöst in Aqua dest.	Sigma-Aldrich, Steinheim
Naphthylethylenediamine	Sigma-Aldrich, Steinheim

Natriumjodat	Riedel-DE Haen AG, Seelze
PAP	Dako, Hamburg
1% Phloxinlösung	
Protein A/G	Pierce Chemicals, Fenton, MO, USA
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich, Steinheim
TMB-Tablette	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween	Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Zitronensäure	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.1.3.2. Puffer und Lösungen

Steriles PBS	Bio Whittaker, Walkersville, MD, USA
--------------	---

#### Haemalaun nach Mayer:

- Haematoxilin 9g
- Natriumjodat 0,6g
- Kalialaun 150g
- Chloralhydrat 130g
- Zitronensäure 3g
- Ad 3l Aqua dest.

#### Eosin nach Mayer:

- 780 ml 96% Ethanol
- 10 ml 1% Phloxinlösung
- 100 ml wässrige Eosinlösung
  - o Eosin (gelblich) 1g
  - o Eisessig 3 Tropfen
  - o ad 100 ml aqua dest
- 10 ml Eisessig

#### mPBS-Stammlösung

- 150,4 g  $K_2HPO_4$

- 26 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
- 800 ml Aqua dest.

#### mPBS-Gebrauchslösung

- 20 ml mPBS-Stammlösung
- 480 ml Aqua dest.

#### DAB-Lösung: DAB-Tablette in 5 ml PBS

#### DAB-Arbeitslösung:

- 2 ml des Überstandes der DAB-Lösung.
- 10  $\mu\text{l}$  3% iges  $\text{H}_2\text{O}_2$

#### Cu-Sulfat-Lösung

- 0,5 g  $\text{CuSO}_4$
- 100 ml 0,85%  $\text{NaCl}$ -Lösung

#### Roti-Nanoquant

Roth, Karlsruhe

Standard: Bio-Rad protein Assay Standard II,  
Lyophilized Bovine Serum Albumin (BSA)

Bio-Rad, München

#### Coating Puffer: 0,1 M $\text{NaHCO}_3$ in PBS

$$M = 84,01 \text{ g/mol} \rightarrow 0,8401 \text{ g in 100 ml PBS}$$

#### Blockingpuffer: 1% BSA in PBS

#### Waschpuffer:

- 1 ml Tween
- 2 l PBS

#### Substratpuffer: Ansatz für 500 ml:

- 128,5 ml  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (0,2M)
- 121,5 ml Zitronensäure (0,1M)
- 250,0 ml Aqua dest.



TMB-Substrat-Lösung:

- Eine TMB-Tablette
- 10 ml Substratpuffer
- kurz vor dem Auftragen 2 µl 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugeben

Lösung zum Reaktionsstopp: 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in Aqua dest.

Coupling Buffer: Sodium Acetate pH 4.5

Biacore AB, GE-Healthcare, UK

Laufpuffer:

- PBS
- 0.001% Tween 20
- 3 mM EDTA

### 2.1.3.3. Oligonukleotidprimer und –sonden, Enzyme, Antikörper

#### 2.1.3.3.1. Oligonukleotidprimer und –sonden

Primer und Proben für LightCycler Real-Time RT-PCR Detektion von Mouse IL-18bp und HPRT

#### Primer

<b>Primer<sup>a</sup></b>	<b>Sequenz 5'- 3'<sup>b</sup></b>	<b>Orientierung</b>
IL-18BP	AGAAGTGCCACTGAATGGAACT	Sense
	TGTTCCCTGTGCTCGCGAC	Antisense
HPRT	gTTggATACAggCCAgACTTTgT	Sense
	CACAggACTAgAACACCTgC	Antisense

<sup>a</sup>Alle Primer wurden speziell für LightCycler bei TIB MOLBIOL (Berlin, Germany) entwickelt.

<sup>b</sup>Alle cDNA Sequenzen wurden der GenBank database entnommen.

## Sonden

<u>Sonden</u>	<u>Sequenz 5'-3'</u>
IL-18BP	
FL-Sonde	AGGATGCTGAAGTAGGGGAAGC-FL
LC Red640-Sonde	LC-CTGCAGGCAGTACAGGACAAGGTC-PH
HPRT	
FL- Sonde	AAAgCCTAAgATgAgCgCAAgtTgA-FL
LC Red705- Sonde	LC-TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTg-PH

### 2.1.3.3.2. Enzyme und Antikörper

Control rat Ig-G	Anti-E. coli- $\beta$ -Galaktosidase, Klon GL113, Konz.: 3,8 mg/ml, Prof. J. Remington, Stanford University, USA
IL-12p40-Ig-G-Fusionsprotein	Prof. Stallmach, Dresden, Konz.: 420 $\mu$ g/ml
IL-18bp	Dr. med. Carsten Schmidt, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg Konz.: 2,33 mg/ml
Schweineserum	Dako, Glostrup, DK
Primär-AK (Kaninchen-Serum)	AG Liesenfeld (63)
Sekundär-AK: Schweine-anti-Kaninchen-	Dako, Glostrup, DK
Immunglobulin	
Streptavidin-Peroxidase	Amersham, GE-Healthcare, UK

### 2.1.3.4. Kommerzielle „Kits“

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
BD OptEIA Mouse IFN- $\gamma$ ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA Mouse TNF- $\alpha$ ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA Mouse IL-12p40 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
BD OptEIA Mouse IL-18 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg
RNeasy Mini-Kit	Quiagen, Hilden
SuperScript <sup>TM</sup> III Platinum	

One Step Quantitative PCR System  
LightCycler FastStart DNA Master  
Hybridization Probes  
Amine Coupling KIT

Invitrogen, Karlsruhe

Roche, Mannheim

Biacore AB, GE-Healthcare, UK

#### **2.1.3.5. Software und Datenbanken**

Acrobat Reader

Adobe Systems GmbH, München

Easy Measure (Version 1.0.30)

Inteq, London, UK

Easy Base (Version 1.0.30)

Inteq, London, UK

GeneAmp PCR System 2700

Applied Biosystems, Darmstadt

LightCycler Software

Roche, Mannheim

Microsoft Office Software

Microsoft, Redmond, USA

Serion Evaluate

Virion, Rüslikon, Schweiz

SPSS

IBM, Ehningen

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1 Infektion der Mäuse**

Zur Gewinnung der Zysten wurden NMRI-Mäuse mit CO<sub>2</sub> getötet und das Gehirn unter sterilen Kautelen entnommen. Das Gehirn wurde in 1 ml PBS mit Hilfe eines Mörsers zerrieben und die Anzahl der Zysten in 20 µl Hirnsuspension unter dem Mikroskop bestimmt. Diese Suspension wurde dann auf eine Konzentration von 100 Zysten/0,2 ml mit PBS verdünnt. 0,2 ml dieser Suspension wurden C57BL/6-Mäusen mittels einer Knopfkanüle peroral verabreicht.

### **2.2.2. Behandlung der C57BL/6-Mäuse mit IL-18bp und IL-12p40-Fusionsprotein**

Es wurden Gruppen von jeweils 5 Tieren gebildet. Die Kontrolltiere erhielten 100 µg rat IgG, während die Verumgruppen mit 50, 90, oder 200 µg IL-18bp behandelt wurden. Weitere Tiere wurden mit 2 µg IL-12p40-FP behandelt. Die Injektionen erfolgten täglich ab dem ersten Tag nach Infektion intraperitoneal mit einem Volumen von 0,2 ml.

### **2.2.3 Entnahme der Organe, des Blutes und Probengewinnung**

Am 7. Tag nach Infektion wurden die Tiere mit Halothan betäubt und zuerst 0,5 - 1,0 ml Blut mittels Punktion des Herzens entnommen. Für die Histologie wurden ca. 10 cm distales Ileum in einer Histologiekassette aufgerollt (sog. Schweizer Rolle), wobei sich das distale Ende in der Mitte der Rolle befand, sowie ein Leberlappen, die mesenterialen Lymphknoten und ½ Milz entnommen und sofort in 5%iger Formalin-Lösung fixiert. Für die PCR wurde ein weiterer Zentimeter des distalen Ileums entnommen, ausgestrichen und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren. Für die Bestimmung der Zytokine im ELISA wurden mesenteriale Lymphknoten (MLN), ½ cm des distalen Endes des Ileum und ½ Milz entnommen und zunächst in 1 ml PBS auf Eis gestellt. Im Anschluss an die Präparation der Tiere wurden die Proben für die Zytokinbestimmung mit Hilfe zweier Objektträger mit rauem Ende homogenisiert, bei 10.000 Umdrehungen/min 10 min zentrifugiert und der Überstand bei minus 70°C konserviert. Die Blutproben wurden auf die gleiche Weise zentrifugiert und das so gewonnene Serum bei -70°C aufbewahrt.

### **2.2.4. Histologische Verfahren**

Nach Entfernung des Formalins im Institut für Pathologie der Charite, Campus Benjamin Franklin, wurden die Proben in Paraffin eingebettet und 5 µm dicke Schnitte mit Hilfe des Rotationsmikrotom angefertigt, auf Objektträger übertragen und über Nacht bei 37°C fixiert.

#### **2.2.4.1. H&E-Färbung und Histologie-Score**

Die histologischen Schnitte wurden nacheinander in Glasküvetten mit folgendem Inhalt getaucht: zweimal Xylol 5 min.; abs. Isopropanol 5 min.; 96% Ethanol 5 min.; 80% Ethanol 5 min.; 70% Ethanol 5 min.; Haematoxilin 5 min.; Leitungswasser 6 min.; Eosin 2 min.; kurzes Spülen mit Aqua dest.; dann die aufsteigende Alkoholreihe mit jeweils 5 min. 70% Ethanol, 80% Ethanol, 96% Ethanol, abs. Isopropanol und zweimal Xylol. Anschließend wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop nach folgendem Beurteilungsschema (87):

- 0: keine Veränderungen
- 1: Ödem zwischen Zottenepithel und Lamina propria
- 2: Transsudat luminal, intaktes Epithel
- 3: Transsudat plus Zellabschilferung luminal
- 4: Einblutungen ins Lumen, leichte Nekrosen der Mukosa, beginnende Epithelauflösung
- 5: starke Nekrosenbildung, Mukosazerstörung < 50% der Ileumlänge
- 6: vollständige Nekrose über das gesamte Ileum

Zusätzlich zum Grad der Entzündung wurde die Länge der nekrotischen Abschnitte bestimmt. In der Leber wurde die Anzahl der entzündlichen Areale in 5 Gesichtsfeldern unter 100-facher Vergrößerung bestimmt. Die Begutachtung erfolgte unabhängig voneinander durch den Dissertanden und einen weiteren Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (Daniela Struck). Ergebnisse der beiden Begutachtungen wurden gemittelt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte pro Untersuchungsgruppe  $\pm$  Standardabweichung angegeben.

#### **2.2.4.2. Immunperoxidase (PAP)-Färbung**

Als Positivkontrolle der Färbung wurden immer Dünndarmschnitte mit hoher Parasitendichte aus früheren Experimenten mitgeführt. Nach Entfernen des Paraffins (s.o.) erfolgte zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität eine Inkubation in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 min. Nach mehrmaligem Spülen mit Aqua dest. folgte die Inkubation in mPBS für 5 min. Danach wurden die Schnitte auf eine Objektträgerbank gelegt, um den Schnitt herum mit einem Papiertuch getrocknet und das Schweineserum mit einer Pipette aufgetragen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Schnitte vollständig bedeckt waren. Die Inkubation erfolgte für 30 min. Nach der Inkubation wurde überflüssige Flüssigkeit um den Schnitt herum abgetrocknet und mit einer Pipette 200  $\mu$ l des zuvor mit mPBS im Verhältnis 1:2000 verdünnten Primär-AK (anti-*T. gondii*-Hyperimmunserum) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Die Schnitte wurden dann mit mPBS gespült und für 5 min. in einer Küvette mit mPBS inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation des Sekundär-AK (Rabbit Ig) für 30 min. bei Raumtemperatur unter Lichtschutz. Die Schnitte wurden nochmals mit mPBS gespült, für 5 min. in mPBS inkubiert, und wieder auf eine Objektträgerbank gelegt. Um die Schnitte herum wurde überflüssiges PBS abgetrocknet, PAP aufgetragen und für 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Spülen und Inkubation mit mPBS erfolgte das Auftragen der DAB-Arbeitslösung. Das Färbeergebnis wurde unter dem Mikroskop anhand

der Positivkontrolle kontrolliert (bräunliche Färbung der Parasiten im Gewebe) und die Inkubationszeit entsprechend angepasst. Anschließend wurden die Schnitte mit mPBS gespült und jeweils 5 min. in mPBS und Aqua dest. inkubiert. Zur Gegenfärbung wurde in einer Küvette 7 min. mit Cu-Sulfat-Lösung inkubiert, dann mehrmals unter fließendem Leitungswasser gespült, für 5 sek. mit Hämatoxin gebläut, nochmals unter fließendem Wasser gespült und für 15 sek. in einer 1%igen Ammoniaklösung inkubiert. Zum Entwässern der Schnitte folgte nun eine aufsteigende Alkoholreihe (s.o.). Die Schnitte wurden mit Entellan eingedeckt.

Die Beurteilung der Schnitte erfolgte unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung. Es wurden durch zufällige Auswahl je ein 1 cm langes distales und proximales Stück mit einem Filzstift auf dem Objektträger markiert und in diesem Bereich die Zahl der parasitophoren Vakuolen ausgezählt. Die Angabe der Parasitenlast erfolgte in Zahl der parasitophoren Vakuolen/cm Ileum.

#### **2.2.4.3. Fotodokumentation**

Repräsentative Abschnitte der histologischen Präparate wurden digital mit der Kamera des Mikroskops fotografiert. Die Helligkeit wurde mit der zur Anlage gehörenden EasyBase<sup>®</sup>-Software des Herstellers bearbeitet.

#### **2.2.5. Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen mittels ELISA**

Die Konzentration der Zytokine in den Proben wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Die Durchführung der ELISA erfolgte anhand der folgenden Schritte:

Coating der Mikrotiterplatte: Mit den entsprechenden Coating-Puffern wurden die Coating-Antikörper 1:250 verdünnt. Anschließend wurden 50µl/well pipettiert und die Platte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen. Aus dem Standard (rekombinantes Zytokin) wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe in Blockingpuffer mit 9 Schritten hergestellt. Die Platte wurde mit jeweils 50 µl Standard und 50 µl der Proben beschickt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C bzw. über 4h bei Raumtemperatur. Die Platte wurde dann fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden die entsprechenden Verdünnungen der biotinylierten Detektions-Antikörper mit Blockingpuffer hergestellt, die Streptavidinperoxidase im Verhältnis 1:250 dazugegeben und 50µl/well pipettiert. Darauf folgte eine Inkubation für 45 min. bei Raumtemperatur. Die Platte wurde

wieder fünfmal gewaschen. Die TMB-Tablette wurde dann in 10 ml Substratpuffer gelöst und kurz vor dem Auftragen mit 30%igem  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemischt. 75  $\mu\text{l}$ /well dieser Lösung wurden aufgetragen und abgedunkelt für 15-30 min. inkubiert, bevor die Reaktion mit 2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (50 $\mu\text{l}$ /well) gestoppt und die Extinktionen im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen wurde. Das Erstellen der Standardkurve und die Errechnung der Konzentrationen in den Proben erfolgten anhand eines vorgefertigten Excel-basierten Protokolls der Arbeitsgruppe.

### **2.2.6. Proteinbestimmung**

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge in den Organproben wurde zunächst eine 1:2 Verdünnungsreihe des Protein-Standards hergestellt und dann je 20 $\mu\text{l}$ /well des Standards und der Probe auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Roti-Nanoquant-Reagenz wurde aufgetragen, nach 5-30 min. erfolgte die Messung der optischen Dichte bei 595 und 450 nm. Aus den Messwerten wurde ein Quotient (595/450) gebildet, aus welchem dann anhand der Standardkurve die Konzentrationen in den Proben abgelesen wurden.

### **2.2.7. Bestimmung der NO-Konzentration**

Zur Bestimmung von NO wurde die Griess-Reaktion genutzt. Dazu wurde zunächst mit  $\text{NaNO}_2$  eine Standardverdünnungsreihe hergestellt. 50 $\mu\text{l}$ /well des Standards und der Probe wurden aufgetragen, und Lösungen aus 50  $\mu\text{l}$  1% Sulfanilamid und 50  $\mu\text{l}$  0,1% Naphthylethylendiamin hinzupipettiert. Nach 20 min. wurden die Extinktionen bei 540 nm gemessen, die Standardkurve erstellt und die NO-Konzentrationen in den Proben errechnet.

### **2.2.8. Bestimmung der Affinität von humanem IL-18bp zu murinem IL-18**

Mit Hilfe des BIACORE X wurde die Dissoziationskonstante der Bindung zwischen humanen IL-18bp und rekombinantem Maus-IL-18 bestimmt. Zur Bindung des IL-18bp auf dem CM5-Sensorchip wurde zunächst Protein A/G auf einem CM5-Sensorchip nach Anweisung des Herstellers immobilisiert. So konnten 2100 RU (response units) Protein A/G auf dem Chip gebunden werden. Mit Ethanolamin wurden freie NHS-Ester geblockt. Zur weiteren Stabilisierung der Oberfläche wurden noch dreimalig 100 mM Phosphorsäure auf den Chip gegeben. Eine weitere Messeinheit des Chips wurde als Kontrolle auf die gleiche Weise ohne Zugabe von Protein A/G behandelt. Mit einer Fließgeschwindigkeit von 30  $\mu\text{l}/\text{min}$  wurden



nun 30 µl IL-18bp in einer Konzentration von 10 µg/ml über den Chip gegeben. Nach Stabilisierung der neuen Grundlinie nach ca. 1 Minute wurde die Bindung des IL-18 in Laufpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 30 µl/min über eine Zeit von 600 s gemessen. Jeweils 100 µl IL-18 (25 pM, 50 pM, 75 pM, 100 pM, 125 pM) wurden über den Chip gegeben. Zur Oberflächenregeneration wurden 4 M MgCl<sub>2</sub> bei 10 µl/min über 360 s hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde Laufpuffer ohne Zugabe von IL-18 verwendet. Die Dissoziationskonstanten wurden mithilfe der BIAevaluation Software 4.1 unter Annahme einer 1:1-Bindung errechnet.

### **2.2.9. Quantifizierung der IL-18bp-RNA**

Die Gesamt-RNA wurde mithilfe des RNeasy Mini Kit (Quiagen) nach Anweisungen des Herstellers isoliert. Die Konzentrationen der isolierten RNA und die Absorptionsratio bei 260 und 280 nm (A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> ratio) wurden am Eppendorf BioPhotometer 6131 gemessen. Die so gewonnene RNA wurde in das SuperScript<sup>TM</sup>III Platinum®One-Step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen) in cDNA transferiert. Es wurden die oben angegebenen Primer für IL-18bp und das „housekeeping gene“ HPRT genutzt, sodass eine spezielle Aufreinigung der RNA nicht nötig war. Sämtliche PCR-Reaktionen wurden in Glaskapillaren mit einem Gesamtvolumen von 10 µl (1 µl RNA-Probe, 3,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5% BSA, 0,5 µM Primer, 0,15 µM Sonden, 4% SuperScript<sup>TM</sup>III RT-/-Platinum® Taq-Mix, 2xReaction Mix) durchgeführt. Die Reaktionen erfolgten für IL-18bp und HPRT unter folgenden Bedingungen: 1 Zyklus bei 60° C für 30 min (reverse Transkription), 1 Zyklus bei 95° C für 2 min (Denaturierung), 45 Zyklen zur Amplifikation bei 95° C für 5 s/ 58° C für 7 s/ 72° C für 5 s, (10 s bei der Amplifikation von HPRT) mit einer Detektion der Fluoreszenz am Ende des letzten Zyklus. Als Negativkontrolle wurde in jeder PCR Aqua dest. genutzt. Die Fluoreszenz wurde mittels LightCycler Data Analysis Software 3.5 berechnet. Zur Bestimmung des Cp-Wertes (Crossing point) wurde die Methode der zweiten Ableitung benutzt.

### **2.2.10. Statistik**

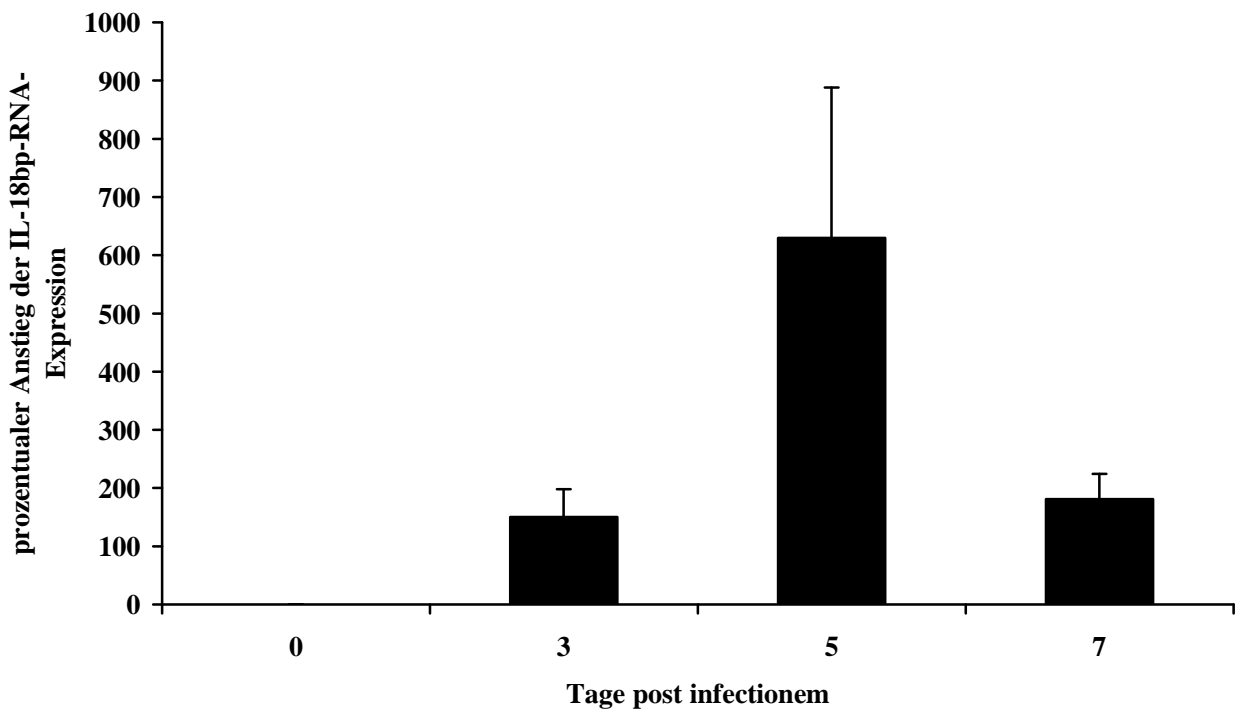
Für die statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel<sup>®</sup> und SPSS benutzt. Zur Berechnung der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde der Student t-Test für zwei Stichproben ungleicher Varianz durchgeführt. Da bei der geringen Zahl der Tiere nicht von einer

Normalverteilung auszugehen war, wurden signifikante Ergebnisse mit dem Mann-Whitney-U-Test überprüft. Die Ergebnisse gelten als signifikant, wenn  $p \leq 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Expression von IL-18bp nach oraler Infektion mit *T. gondii*

Um zu klären, ob als Antwort auf die Infektion mit *T. gondii* IL-18bp-RNA exprimiert wird, wurde C57BL/6-Mäusen an Tag 0, 3, 5 und 7 post infectionem das Ileum entnommen und mittels quantitativer PCR die IL-18bp-Expression bestimmt. Während bei naiven Tieren keine IL-18bp-Expression nachweisbar war, zeigte sich bei infizierten Tieren eine mit dem Verlauf der Entzündungsreaktion ansteigende Expression, die an Tag 5 ihr Maximum erreichte, um danach wieder abzufallen (Abb. 1).



**Abb. 1:** Nachweis der IL-18bp-RNA-Expression im Verlauf der Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* im Vergleich zu naiven Kontrolltieren (d0). Gezeigt ist das Ergebnis eines repräsentativen Experimentes mit 2-3- Mäusen/Zeitpunkt.

Zusätzlich zur quantitativen PCR wurde auch mittels Affymetrix-Gen-Chip-Analyse die Expression des IL-18bp Gens in Ileumproben von naiven und *T.-gondii*-infizierten Mäusen untersucht. Dabei zeigte sich eine um den Faktor 4-6 erhöhte Expression des IL-18bp-Gens in infizierten vs. naiven Mäusen an Tag 7 nach Infektion (naiv  $95,81 \pm 32,13$  vs. infiziert  $454,015 \pm 44,64$ ).

Diese Ergebnisse zeigen, dass nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* die Expression von IL-18bp-RNA zunimmt.

### **3.2. Einfluss des IL-18bp auf den Verlauf der Infektion durch *T. gondii*.**

Um zu klären, welche Rolle IL-18bp in der durch *T. gondii* induzierten Th1-Immunantwort spielt, wurden C57BL/6-Mäuse mit 100 Zysten des ME49-Stammes oral infiziert und ab Tag 1 post infectionem täglich mit IL-18bp i.p. behandelt. Kontrolltiere wurden mit Ratten-IgG in gleicher Form behandelt. Die Gabe von IL-12p40-FP erfolgte in einer separaten Untersuchungsgruppe, um einen zuvor beschriebenen therapeutischen Effekt des Fusionsproteins bei intestinaler Inflammation zu untersuchen (88).

#### **3.2.1. Pathologische Veränderungen im Ileum**

Um zu klären, ob IL-18bp die IL-18-abhängige durch Pan-Ileitis charakterisierte Immunpathologie nach oraler Infektion mit *T. gondii* beeinflussen kann, wurden C57BL/6-Mäuse mit 100 Zysten infiziert und mit IL-18bp behandelt.

Nicht behandelte Tiere entwickelten 7 Tage nach oraler Infektion eine ausgeprägte nekrotisierende Entzündung des Ileums mit Verlust der Zottenarchitektur, vor allem im distalen Ileum. Das histologische Bild reichte von ödematösen Schwellungen bis zu langstreckigen Nekrosen aller Schleimhautschichten (Abb. 2). Durch die Behandlung mit 90 µg IL-18bp/Tag konnte die Ausprägung der Entzündung signifikant gemildert werden (Abb. 2). Die mit 90 µg IL-18bp behandelten Tiere zeigten nur milde Veränderungen der Darmschleimhaut mit Ödemen zwischen Epithel und Lamina propria und Abflachung der Zottenarchitektur. In der mit IL-18bp behandelten Gruppe zeigten sich zwar auch nekrotische Areale, allerdings in signifikant geringerem Umfang als in der Kontrollgruppe (Abb. 2, 3).

Auch die Behandlung mit IL-12p40-FP führte zu einer signifikanten Milderung der Entzündungsreaktion im Ileum (Abb. 3). Bei IL-18<sup>-/-</sup>-Tieren war keine intestinale Nekrose nachweisbar (Abb. 2).

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Blockierung von IL-18 durch exogen zugeführtes IL-18bp und die Administration von IL-12p40-FP einen therapeutischen Effekt auf die Entwicklung der *T. gondii*-induzierten Immunpathologie des Ileums haben.

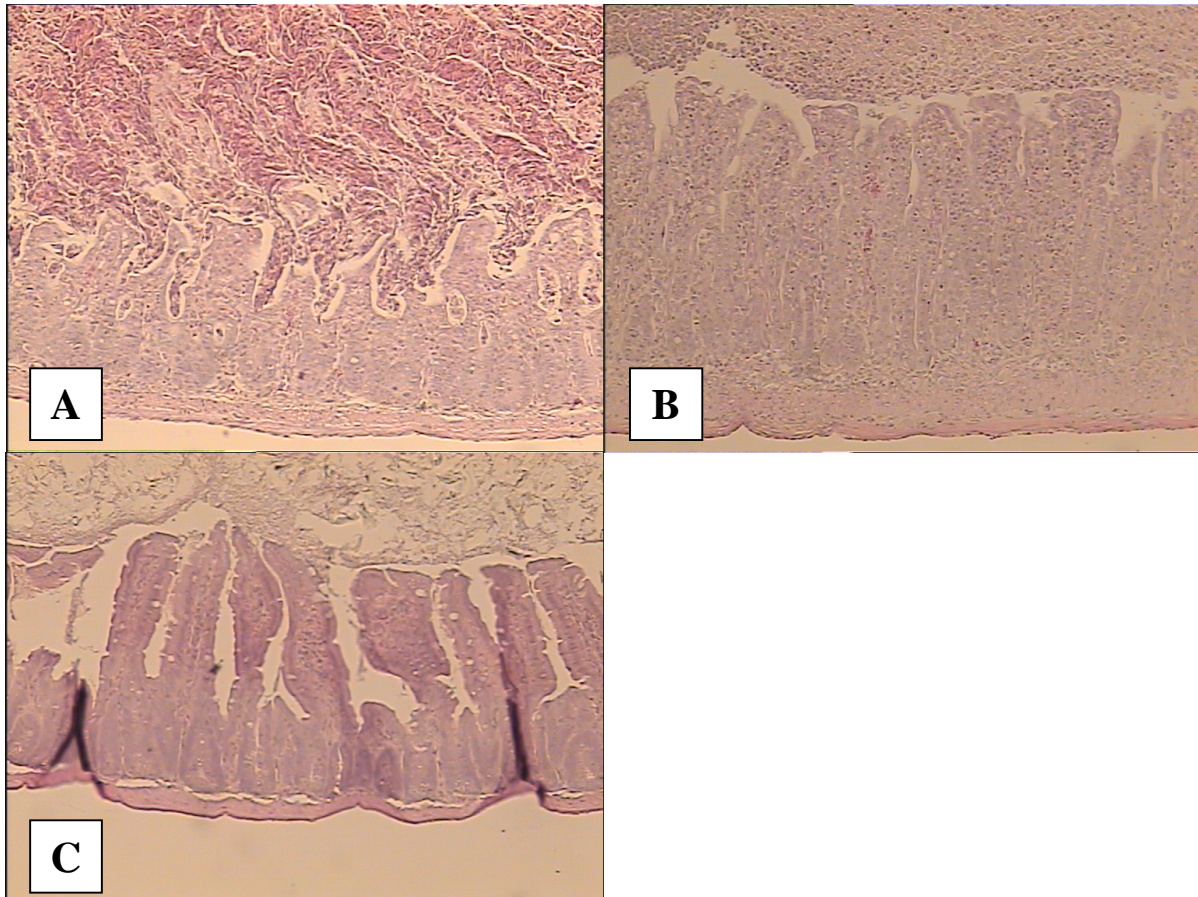
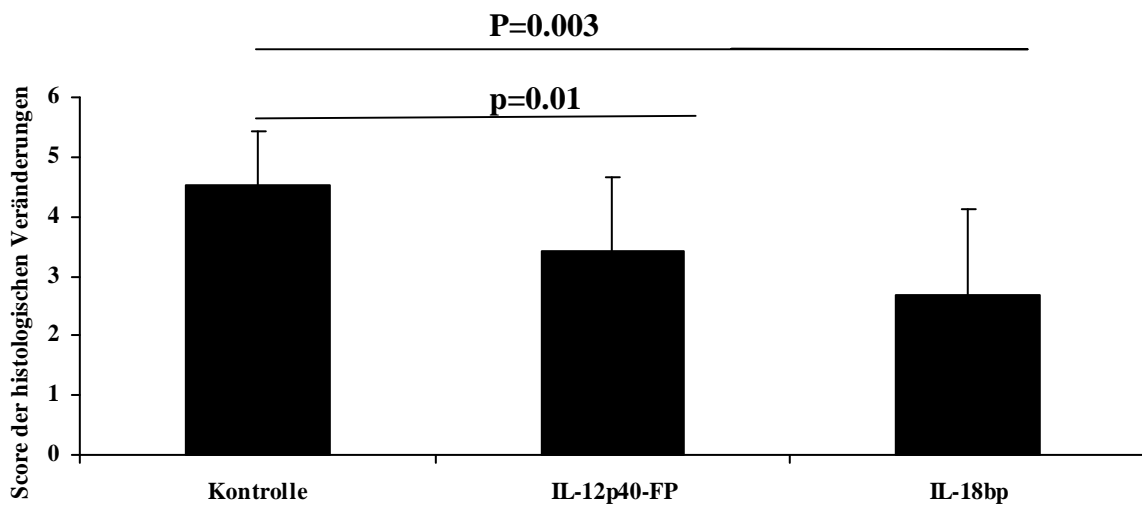


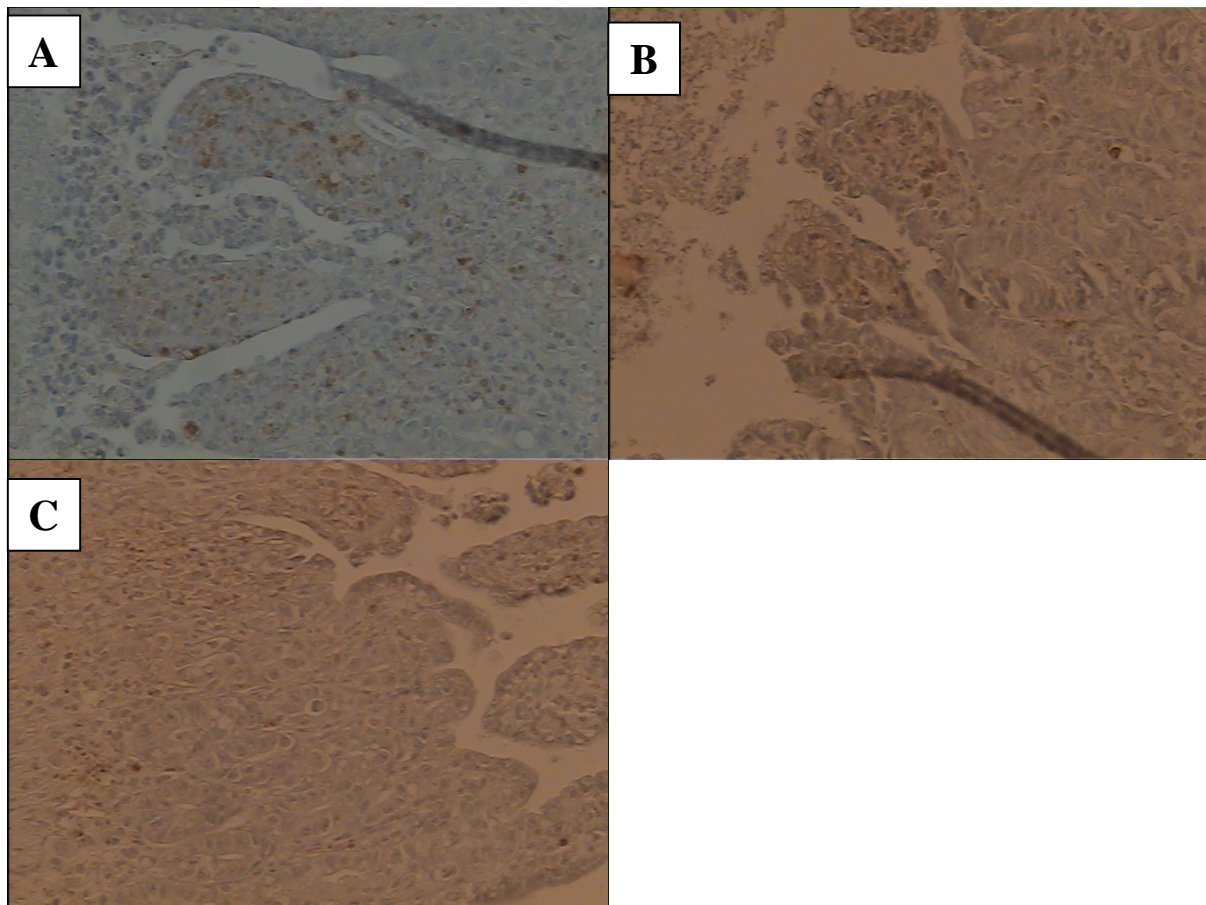
Abb. 2: Repräsentative H&E-gefärbte Schnitte des Ileum einer mit 100 Zysten *T. gondii* infizierten C57BL/6-Kontrollmaus (A), einer täglich mit 90 µg IL-18bp behandelten C57BL/6-Maus (B), und einer IL-18<sup>-/-</sup>-Kontrollmaus (C). A: Ausgeprägte Nekrosen der Zottenarchitektur des Ileums. B: Abschilferung von Epithelzellen, ödematös aufgelockerte Schleimhaut ohne Nekrosen und erhaltene Zottenarchitektur. C: Erhaltene Zottenarchitektur mit zellfreiem Exsudat.



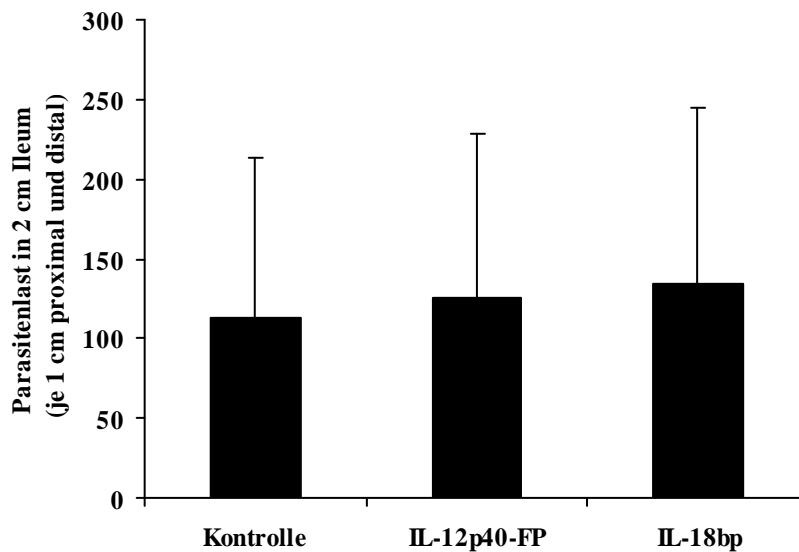
**Abb. 3: Ausmaß der Pathologie des Ileums in C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen (13-14 Tiere/Gruppe).**

### **3.2.2. Replikation von *T. gondii* in Ileum und Leber**

Zur Untersuchung der Frage ob, die Administration von IL-18bp nicht nur die Immunpathologie mildert, sondern auch die Vermehrung von *T. gondii* beeinflusst, wurde immunhistologisch die Parasitenlast in Ileum und Leber bestimmt. Bei Vergleich der mit IL-18bp behandelten Tiere mit Tieren der Kontrollgruppe fanden sich keine signifikant unterschiedlichen Parasitenzahlen (Abb. 4, 5). Auch zwischen der Kontrollgruppe und den mit IL-12p40-FP behandelten Tieren fand sich kein signifikanter Unterschied in der Parasitenlast (Abb. 4, 5).



**Abb. 4: Nachweis von *T. gondii* in Ileum 7 Tage nach Infektion mit 100 Zysten mittels Immunperoxidase (PAP)-Färbung. A: Kontrolle, B: Mit IL-18bp behandelte Tiere, C: mit IL-12p40-FP behandelte Tiere**



**Abb. 5: Anzahl der parasitophoren Vakuolen in 2 cm Ileum von C57BL/6-Mäusen 7 Tage post infectionem mit 100 Zysten *T. gondii*. Gezeigt sind gepoolte Daten aus drei unabhängigen Experimenten (13-14 Tiere/Gruppe).**

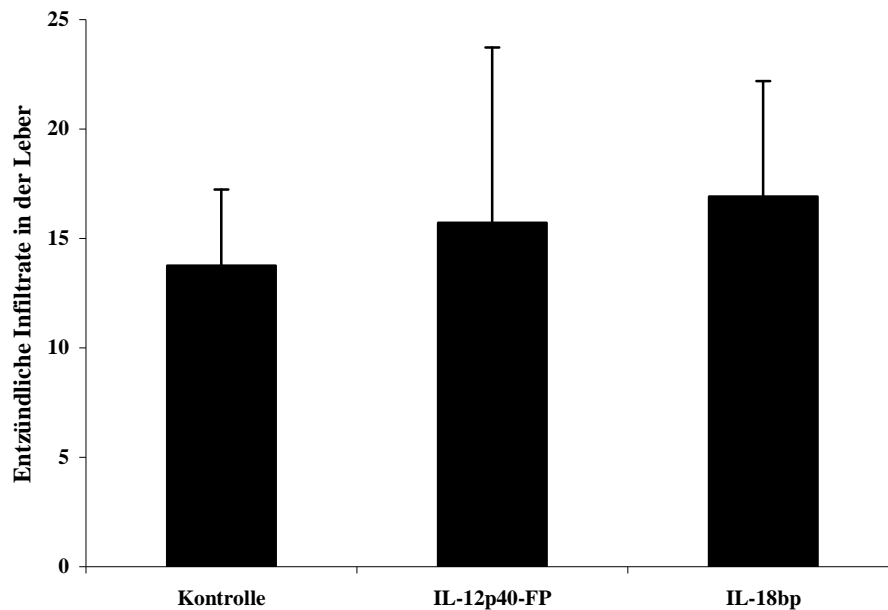
In der Leber konnte in keinem von drei unabhängigen Experimenten *T. gondii* mit der Immunoperoxidase-Färbung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Gabe von IL-18bp oder IL-12p40-FP keinen Effekt auf die Immunabwehr gegen *T. gondii* hat.

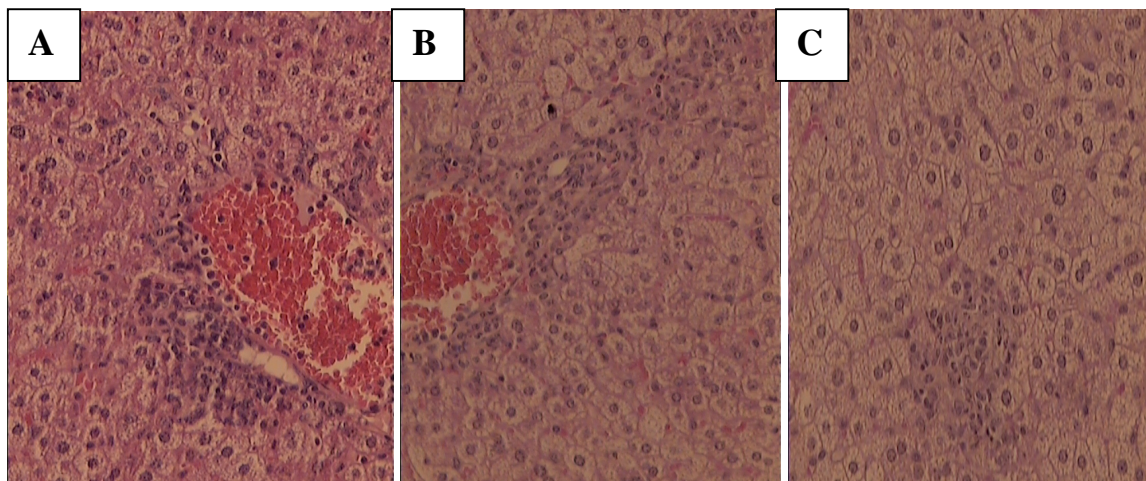
### 3.2.3. Pathologische Veränderungen in der Leber

Neben der Pathologie im Ileum entwickeln mit 100 Zysten *T. gondii* infizierte C57BL/6-Mäuse entzündliche Areale mit Nekrosen in der Leber. Unbehandelte und mit IL-18bp behandelte C57BL/6-Mäuse wiesen die gleiche Menge an entzündlichen Arealen in der Leber auf (Abb. 6, 7). Auch im Vergleich mit IL-12p40-FP-behandelten Mäusen fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 6, 7).





**Abb. 6: Anzahl der inflammatorischen Areale in der Leber von C57BL/6-Mäusen 7 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Ausgezählt wurden 5 Gesichtsfelder in 100-facher Vergrößerung. Gezeigt sind die gepoolten Ergebnisse aus 3 Versuchen (13-14 Tiere/Gruppe).**



**Abb. 7: Exemplarische histologische Schnitte der inflammatorischen Areale in der Leber (H&E-Färbung) 7 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. A: Kontrolle, B: Mit IL-18bp behandelte Tiere, C: mit IL-12p40-FP behandelte Tiere**

Diese Daten zeigen, dass die Behandlung mit IL-18bp und IL-12p40-FP keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung inflammatorischer Areale in der Leber nach oraler Infektion mit *T. gondii* hat.



### 3.3. Zytokin- und NO-Konzentrationen in Serum und Organen

Zur weiteren Charakterisierung der immunologischen Effekte der Gabe von IL-18bp und IL-12p40-FP nach oraler Infektion mit *T. gondii* wurden an Tag 8 post infectionem Zytokine der Th1-Immunantwort mittels ELISA bestimmt. Zur Detektion der systemischen Immunantwort wurde das Serum der Tiere herangezogen. Im Serum der infizierten Mäuse waren die charakteristischen Th1-Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-18 und IL-12 nachweisbar (Abb. 8). Zwischen der Kontrollgruppe und den mit IL-18bp bzw. IL-12p40-FP behandelten Gruppen fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied in den Zytokinkonzentrationen (Abb. 8).

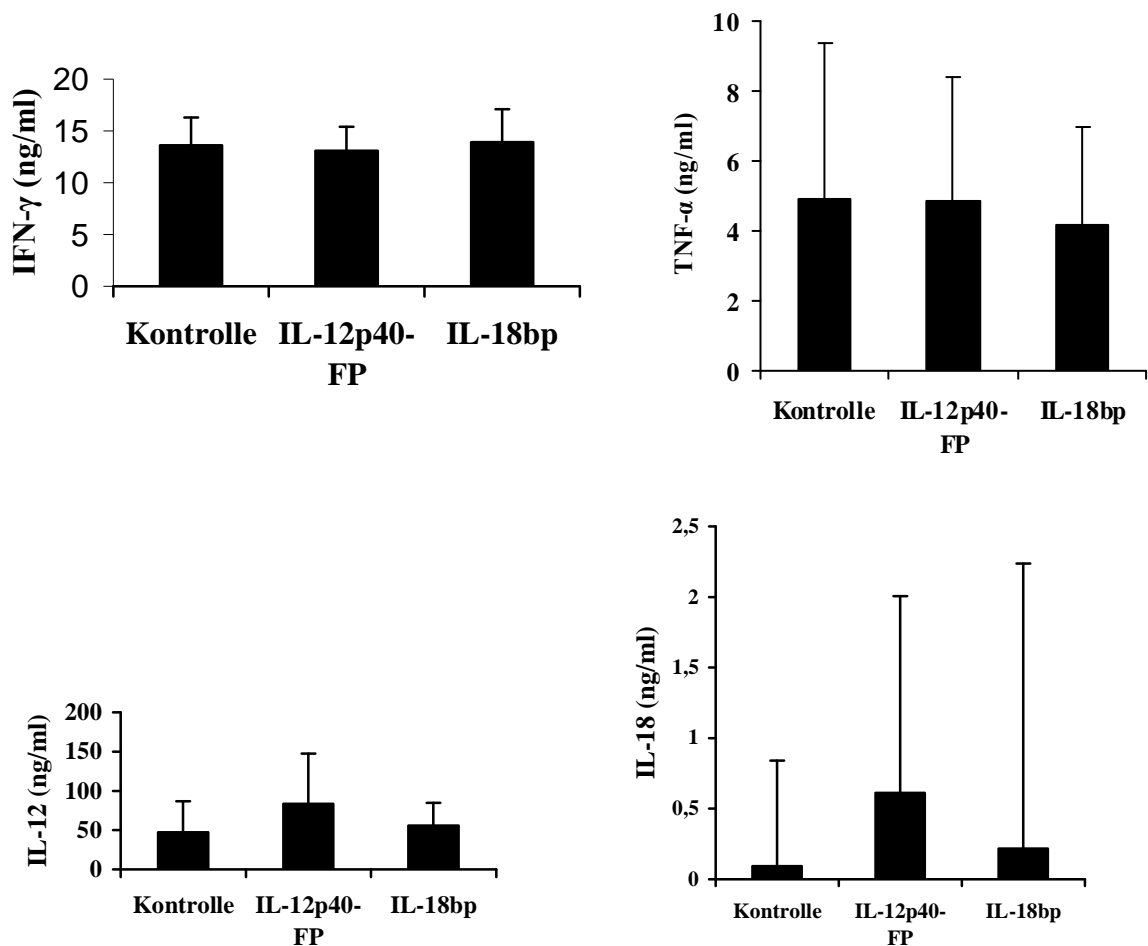
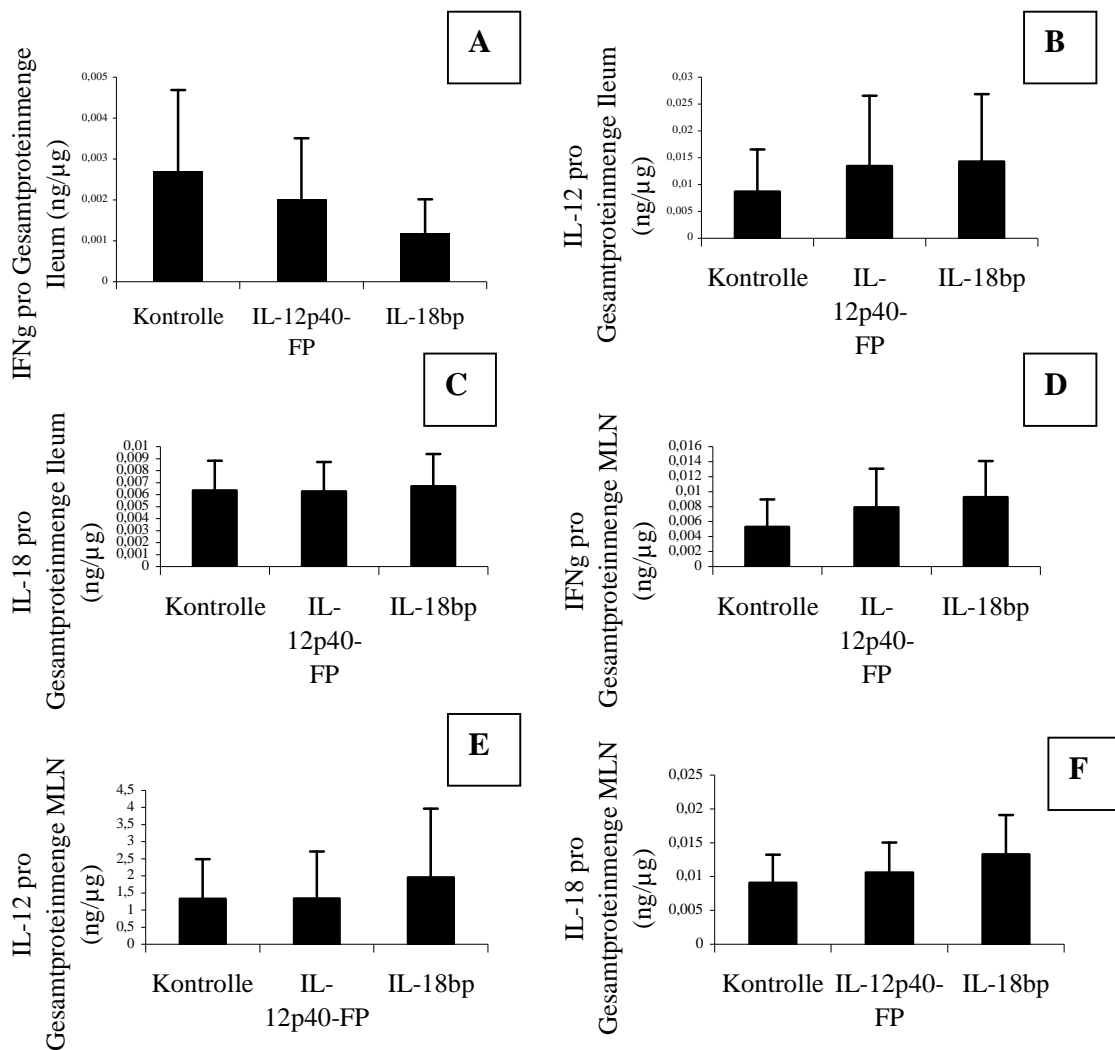


Abb. 8: Serum-Konzentrationen der Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 in C57BL/6 8 Tage nach Infektion mit *T. gondii*. Gezeigt sind gepoolte Ergebnisse aus drei Experimenten (12-13 Tiere/Gruppe)

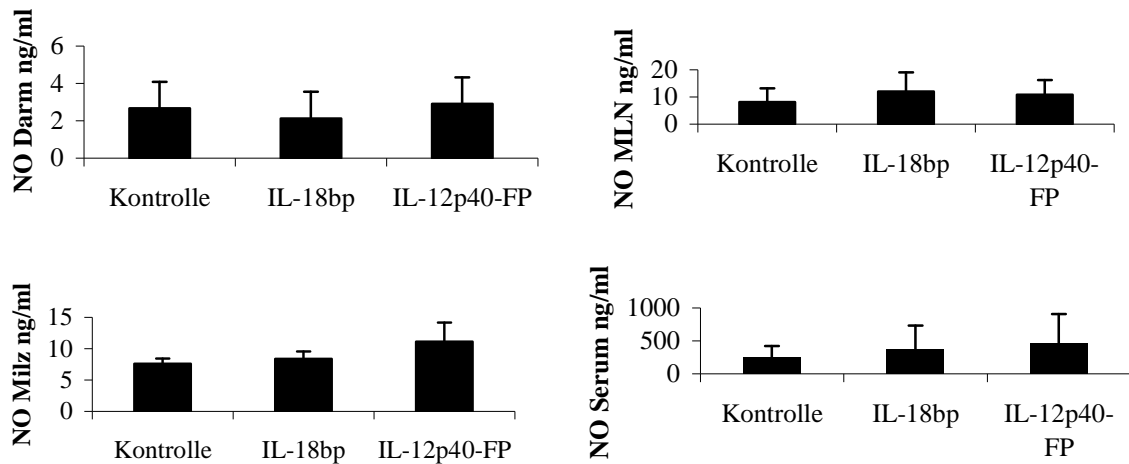
Das lokale Zytokinmilieu wurde durch die Bestimmung der Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-18 aus Ileum- und MLN-Bioptaten gemessen. Auch in den MLN- und Ileumbioptaten waren die charakteristischen Zytokine der Th1-Immureaktion nachweisbar. Es ergab sich jedoch auch in der lokalen Immunantwort kein signifikanter Unterschied zwischen den IL-18bp-behandelten und Kontroll-Gruppen (Abb. 9).

Auch die Bestimmung von NO in Serum- und Darmproben ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tieren der mit IL-18bp und mit IL-12p40-FP behandelten Gruppe (Abb. 10).

Ein Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen ist aufgrund der hohen Schwankungsbreite der Messergebnisse nicht sicher aussagekräftig.



**Abb. 9: A-F: Konzentration der Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-12 und IL-18 bezogen auf die Gesamtproteinmenge in Homogenisaten eines Stückes Ileum (A-C), bzw. MLN (D-F) aus C57BL/6-Mäusen 8 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Gezeigt sind gepoolte Daten aus zwei Versuchen mit insgesamt 8-10 Tieren pro Gruppe.**



**Abb. 10: NO-Konzentrationen in Darm MLN, Milz und Serum in C57BL/6 8 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Gezeigt sind gepoolte Ergebnisse aus drei Experimenten (12-13 Tiere/Gruppe).**

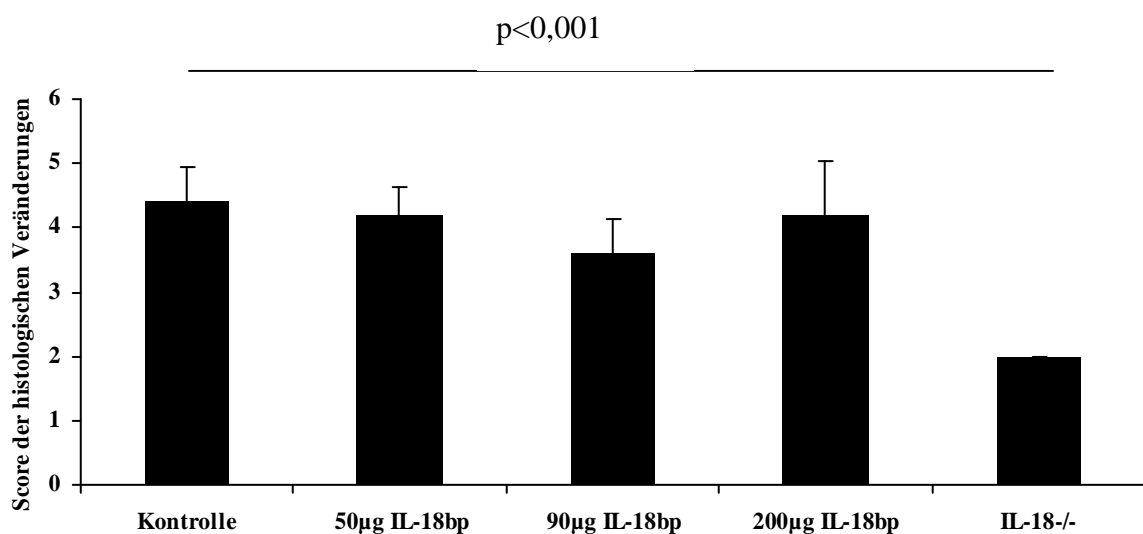
Zur Klärung der Frage, ob sich nach Administration von IL-18bp eine reflektorische Th2-Immunantwort einstellt, wurde in Serum, Ileum und MLN die Konzentration von IL-4 mittels ELISA gemessen. Die Konzentrationen von IL-4 waren in allen an Tag 8 gewonnenen Serum- und Darmproben unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA (Daten nicht gezeigt).

Die Administration von IL-18bp scheint nach diesen Ergebnissen keinen Einfluss auf die lokale und systemische Ausschüttung der untersuchten Zytokine zu haben. Auch die Behandlung mit IL-12p40-FP führte nicht zu signifikanten Unterschieden in den nachweisbaren Konzentrationen der untersuchten Zytokine. Es fällt jedoch auf, dass die Zytokinkonzentrationen systemisch deutlich höher sind als lokal im Ileum oder den MLN. Eine reflektorische Th2-Immunantwort lässt sich dabei nicht nachweisen.

### 3.4. Untersuchungen zum Vergleich der Wirkung verschiedener Dosierungen von IL-18bp bei Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

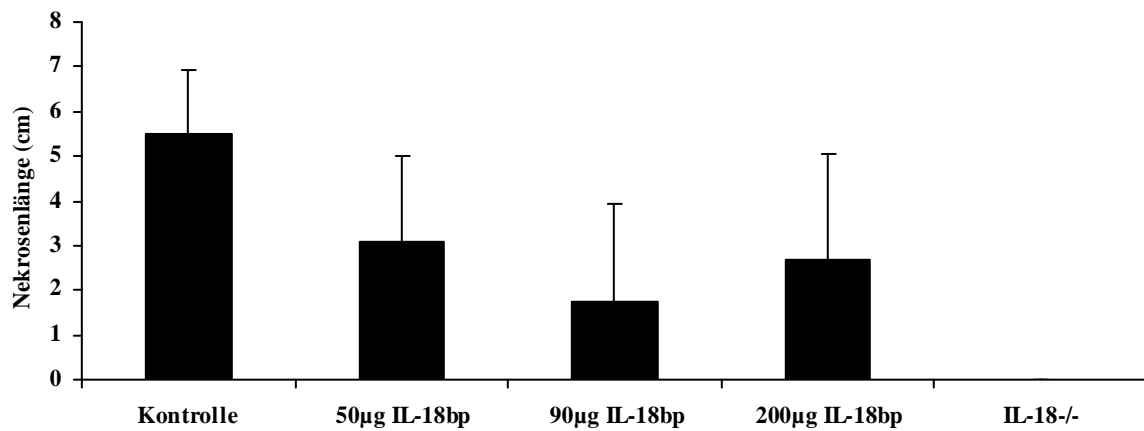
Nach Charakterisierung des therapeutischen Effekts der Gabe von 90 µg IL-18bp sollte in weiteren Experimenten die optimale Dosierung der Gabe von IL-18bp herausgearbeitet werden. Mit 100 Zysten *T. gondii* infizierte C57BL/6-Mäuse wurden deshalb über 7 Tage mit 50, 90 bzw. 200 µg IL-18bp/Tag behandelt. Als Kontrollen wurden unbehandelte C57BL/6- und IL-18<sup>-/-</sup>-Tiere verwendet.

Während die unbehandelten C57BL/6-Mäuse erwartungsgemäß ausgedehnte Nekrosen im Ileum zeigten, entwickelten unbehandelte IL-18<sup>-/-</sup>-Tiere keinerlei nekrotische Areale nach Infektion; es waren jedoch milde Entzündungsreaktionen mit Bildung von Transsudaten bei erhaltener Epithelarchitektur vorhanden (Abb. 11). Die mit IL-18bp behandelten Tiere entwickelten wie die unbehandelten C57BL/6-Mäuse ausgedehnte Nekrosen. Eine signifikante Reduktion des Ausmaßes der Nekrosen und des histopathologischen Scores im Vergleich zu unbehandelten C57BL/6-Mäusen wurde nicht beobachtet (Abb. 11, 12).



**Abb. 11: Histopathologischer Score der Ileum-Pathologie in C57BL/6-Mäusen nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* nach Gabe von 50, 90, 200 µg IL-18bp. Gezeigt ist das Ergebnis eines Experimentes mit 5 Tieren pro Gruppe.**

p<0,001

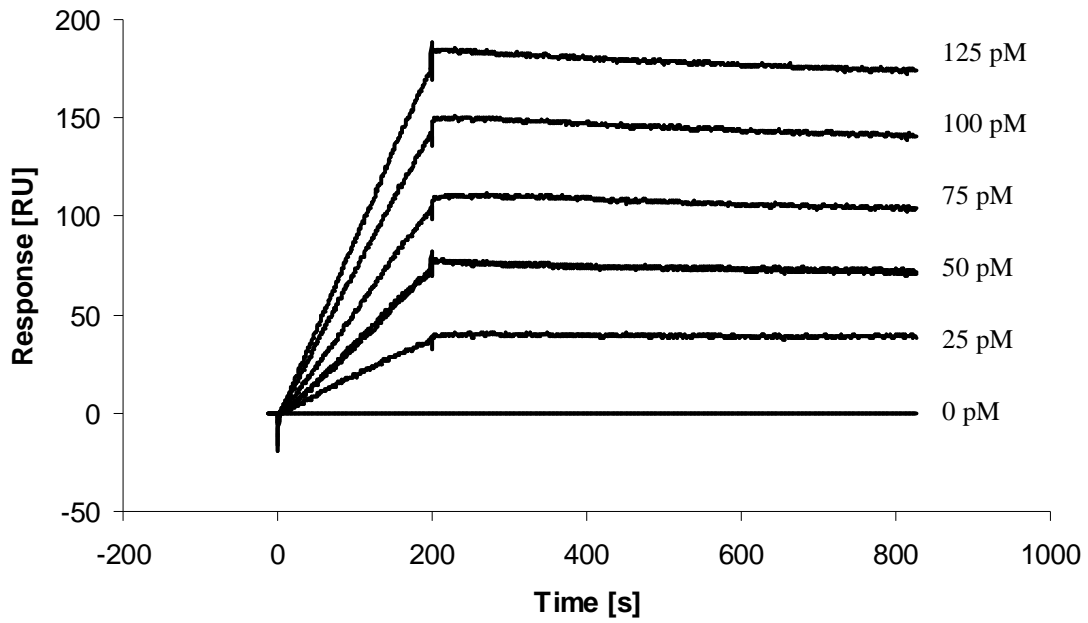


**Abb. 12:** Länge der Nekrosen im Ileum nach oraler Infektion mit *T. gondii* in Abhängigkeit der verabreichten IL-18bp-Menge. Gezeigt ist das Ergebnis eines Experimentes mit 5 Tieren pro Gruppe.

### 3.5. Affinität von humanem IL-18bp zu murinem IL-18

Dinarello et al. berichteten, dass IL-18bpa von den 4 Isoformen des IL-18bp die höchste Affinität zu IL-18 besitzt (70). Da das humane IL-18bpa und IL-18bp der Maus große strukturelle Homologien aufweisen (66; 70), bestimmten wir die Affinität des in der vorliegenden Arbeit verwendeten IL-18bpa zu murinem IL-18 mittels Oberflächen-Plasma-Resonanz-Messungen im BIACORE X-System.

Wie in Abb. 13 gezeigt, ist das in dieser Arbeit verwendete humane IL-18bp in der Lage, IL-18 der Maus mit hoher Affinität zu binden (Dissoziationskonstante  $k_{\text{off}} 9,72 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ). In der Kontrollmessung ohne Zugabe von IL-18 zeigte sich keine Änderung der RU. Die Geschwindigkeit der Assoziation und der Dissoziation ist dabei nicht konzentrationsabhängig. Nach ca. 200 s ist das Maximum der Bindung erreicht, auch nach ca. 800 s ist nur eine geringe Verringerung der Menge des gebundenen IL-18 zu beobachten.



**Abb. 13: Assoziation und Dissoziation von huIL-18bpa und muIL-18, gemessen im BIACORE X-System. Die Höhe der RU korreliert hierbei mit der Menge des gebundenen IL-18. IL-18bp wurde auf dem Chip immobilisiert und IL-18 in den angegebenen Konzentrationen zugeführt.**

## 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von intraperitoneal verabreichtem IL-18bp auf die Entzündungsreaktion im distalen Ileum der C57BL/6-Maus nach Infektion mit *T. gondii* untersucht. Diese Infektion und die Entwicklung der Immunpathologie des Darmes stellt ein Modell für eine überschießende Th1-Immunreaktion im Darm, ähnlich wie bei M. Crohn, dar (83). Th1-Immunreaktionen spielen eine wesentliche Rolle bei der Abwehr vor allem intrazellulärer Erreger. Bei einer überschießenden Reaktion ist die Th1-Reaktion aber auch an Autoimmunerkrankungen wie M. Crohn, Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose beteiligt (9; 10; 12). IL-18 spielt in der Entwicklung der Th1-Immunantwort eine wichtige Rolle. Es verstärkt die Wirkung von IL-12 bei der Induktion der Produktion von IFN- $\gamma$  und der Proliferation von Th1-Zellen. Eine Neutralisation von IL-18 hat jedoch keine vermehrte Replikation von *T. gondii* in diesem Modell zur Folge (63).

IL-18bp ist ein Protein, welches in vivo und in vitro in der Lage war, die Wirkung von IL-18 zu inhibieren (66–69). In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass IL-18bp bei der Behandlung einer chemisch induzierten Kolitis wirksam ist (76; 79).

Das Toxoplasma-Infektionsmodell hat gegenüber den genannten Modellen der experimentellen Kolitis den Vorteil, dass die Entzündungsreaktion sich im Ileum abspielt und neben der Wirkung von IL-18bp auf die Dünndarm-Entzündung auch die Auswirkung auf die Abwehr des Parasiten untersucht werden kann. Neben der Untersuchung des therapeutischen Effekts ist die Untersuchung der Effekte auf intrazelluläre Erreger von Bedeutung, um beim möglichen Einsatz in der Therapie des M. Crohn bekannte Risiken wie die Reaktivierung von latenten Infektionen mit intrazellulären Erregern wie v.a. der Tuberkulose auszuschliessen (23; 89).

Beim Vergleich der Entwicklung von Nekrosen im Ileum nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* zwischen der Kontrollgruppe und mit IL-18bp behandelten Tieren entwickelten die Tiere in den Behandlungsgruppen signifikant weniger Nekrosen als die Tiere in der Kontrollgruppe. Hier konnte also durch die Bindung von IL-18 ein therapeutischer Effekt erzielt werden. Dieses Ergebnis ist mit Ergebnissen anderer Arbeiten vergleichbar, in denen durch Inhibierung von IL-18 durch spezifische Antikörper und in IL-18-defizienten Tieren (63) eine Milderung der Darmpathologie erreicht werden konnte (76; 79). Die therapeutische Gabe von IL-18bp ist sowohl in Modellen der experimentellen Kolitis (79; 90; 91), als auch in anderen Modellen zur Untersuchung der Th1-Immunreaktion, z.B. bei durch Kollagen

induzierte Arthritis (68) oder durch DNFB induzierte Dermatitis (92) erfolgreich eingesetzt worden.

Um zu untersuchen, ob die Behandlung mit IL-18bp die Abwehr gegen den Parasiten beeinträchtigt, wurde in der PAP-Färbung die Dissemination und Vermehrung des Parasiten in der Darmschleimhaut und in der Leber untersucht. Da in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, dass entzündliche Areale in der Leber mit dem Vorhandensein von *T. gondii* assoziiert sind (63), konnte auch die Anzahl entzündlicher Areale in der Leber als ein Maß für die Dissemination angesehen werden. Hierbei fanden sich keine Unterschiede im Vergleich der mit IL-18BP behandelten Tiere mit den Tieren der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis korreliert mit anderen Arbeiten (63), und ist ein Hinweis darauf, dass die Abwehr gegen *T. gondii* durch die Inhibierung von IL-18 durch IL-18BP nicht beeinträchtigt wird. IL-18bp könnte damit bei Th1-Immunpathologie ein wirksamer und sicherer Immunmodulator sein.

Der aktuelle Ansatz einer direkt in die Th1-Immunantwort eingreifenden Therapie mit TNF- $\alpha$ -blockierenden Substanzen wie Infliximab, Etanercept und Adalimumab birgt das Risiko einerseits der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose (23; 89), andererseits kam es bei der Anwendung auch vermehrt zu opportunistischen Infektionen, hier vor allem zu Pilzinfektionen (89). Somit ergibt sich für diese Substanzen zum Einen das Risiko der o.g. Infektionen, zum Anderen muss bei entsprechendem Risikoprofil auf die Behandlung verzichtet werden.

IL-18bp könnte hier eine wirksame und sichere Behandlungsoption bei Th1-Immunpathologien sein.

Um zu klären, ob die Behandlung mit IL-18bp einen Einfluss auf die Produktion der Th1-Zytokine hat, wurden die typischen Zytokine der Th1-Immunreaktion (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18) im Serum bestimmt. Hier zeigte sich keine Veränderung durch die Behandlung mit IL-18bp im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Zur Bestimmung des lokalen Zytokinmilieus wurden die Zytokine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-18 in Homogenisaten des Darmes und der MLN bestimmt. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen den mit IL-18bp behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Ein fehlender Effekt der Neutralisation von IL-18 auf die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen ist überraschend, wurde aber auch in anderen Arbeiten unter erfolgreicher Neutralisation von IL-18 beobachtet (63; 79). Dies deutet darauf hin, dass entweder die angewendete Methode zum Nachweis von IFN- $\gamma$  (ELISA aus Serum und Organhomogenisaten) keine ausreichende Differenzierung zulässt, oder dass es neben der Induktion von IFN- $\gamma$  noch andere



Mechanismen gibt, über die IL-18 die Th1-Immunreaktion reduziert. Für die 2. Hypothese sprechen Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, bei denen auch IFN- $\gamma$ - oder IFN- $\gamma$ -R-defiziente Tiere eine Kolitis nach der Gabe von TNBS entwickelten (93). Mögliche IL-18-abhängige Mechanismen wären hier eine direkte Makrophagenaktivierung oder andere IL-18-abhängige Signalwege.

Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass die hier durchgeführten Zytokinbestimmungen nur begrenzte Aussagekraft haben. Bei großer Schwankungsbreite innerhalb der einzelnen Gruppen sowohl bei Untersuchung der systemischen (Serum) als auch der lokalen (Darm, MLN) Zytokinkonzentrationen scheint diese Methode eher ungenau zu sein. Zudem liegen nur Untersuchungen zu Konzentrationen an Tag 7 bzw. 8 vor, also zu einem Zeitpunkt, zu dem die Tiere bereits in einem fortgeschrittenen Zustand der Immunpathologie waren. Genauere Aussagen könnten bei Untersuchung des zeitlichen Ablaufs der Zytokinkonzentrationen getroffen werden.

In dieser Arbeit ist zudem keine Aussage möglich bezüglich der Mengen an frei vorliegendem IL-18, da der verwendete ELISA auch an IL-18bp gebundenes IL-18 erkennt (Daten nicht gezeigt).

In dieser Arbeit wurden zusätzlich Untersuchungen zur Dosisabhängigkeit durchgeführt. Hier zeigte sich keine signifikante Reduzierung des histopathologischen Scores und der Nekrosenlänge. Dies dürfte in diesem Fall der geringen Fallzahl zuzuschreiben sein. Eine dosisunabhängige Wirkung konnte im Arthritis-Modell (68) nachgewiesen werden. Demgegenüber stehen Ergebnisse aus Untersuchungen bei durch DSS induzierter Kolitis (76). Hier konnte im Vergleich der intraperitonealen Gabe von 60 bzw. 600  $\mu\text{g}$  IL-18bp in beiden Fällen eine signifikante Reduzierung des Gewichtsverlustes beobachtet werden, wobei der Effekt bei Gabe von 600 $\mu\text{g}$  pro Tag deutlicher war (76). Bei täglicher Gabe von bis zu 50  $\mu\text{g}$  pro Tag konnte kein Effekt auf diesen Parameter gesehen werden, dieser war nur bei Gabe von 200  $\mu\text{g}$  pro Tag zu beobachten (79). In beiden Arbeiten konnte eine deutliche Reduzierung der Entzündungsreaktion mit fehlender Entwicklung von Ulcera erreicht werden (76; 79). Angaben zu einer Dosisabhängigkeit wurden für diesen Parameter leider nicht gemacht.

In der vorliegenden Arbeit wurden scheinbar Dosen im Grenzbereich der Wirksamkeit verwendet (50-200  $\mu\text{g}$ ). Die signifikante Milderung der Entzündung im Ileum in den IL-18-KO-Mäusen im Vergleich zu den mit IL-18bp behandelten Tieren legt nahe, dass durch die Gabe von 50, 90 oder 200  $\mu\text{g}$  IL-18bp pro Tag die Aktivität von IL-18 nicht vollständig

unterbunden werden konnte. Hier könnten weitere Untersuchungen auch mit höheren Dosierungen (z.B. bis 600 µg wie in (76)) weitere Erkenntnisse bringen.

Nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* entwickeln C57BL/6-Mäuse neben der Pathologie im Ileum Nekrosen in der Leber. Nach Invasion durch Epithelzellen und Lamina propria der Darmmukosa gelangt *T. gondii* in die Blutzirkulation und darüber u.a. in die Leber. Hier kommt es dann zur perivaskulären Infiltration mit entsprechenden entzündlichen Infiltraten. Bei weiterer Dissemination kommt es dann auch zu entzündlichen Veränderungen im Parenchym (83). Bei Vergleich der Anzahl nekrotischer Areale in der Leber nach Behandlung mit IL-18bp vs. Kontrollantikörpern fanden sich keine Veränderungen in der Entwicklung der Leberpathologie. In vorangegangenen Arbeiten (63) wurde eine signifikante Reduktion der nekrotischen Areale in der Leber nach Behandlung mit anti-IL-18 gefunden. Dieser Unterschied in den Ergebnissen könnte daran liegen, dass in der vorliegenden Arbeit die Entnahme der Proben zu einem Zeitpunkt erfolgte, zu dem die Tiere sich bereits in einem schlechteren Zustand befanden.

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit der Effekt eines IL-12p40-Fusionsproteins (IL-12p40-FP) untersucht. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass IL-12p40-FP eine TNBS-induzierte Kolitis deutlich mildern kann (88). Zudem zeigte sich ein Anstieg des Th2-Zytokins IL-10 und eine Minderung der TNF- $\alpha$ -Produktion (88). In dieser Arbeit konnte, wie bei der Anwendung von IL-18bp, eine Milderung der Entzündungsreaktion beobachtet werden. Das Zytokinmilieu wurde durch die Behandlung mit IL-12p40-FP nicht beeinflusst. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse bzgl. der Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-10 können die niedrige Dosierung (hier 2 µg/Tag, bei Stallmach et al. 20 µg/Tag) oder auch die insgesamt heftige Reaktion nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* sein.

Überraschenderweise fand sich auch keine gesteigerte Replikation des Erregers bei der Neutralisation des IL-12 durch IL-12p40-FP. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bei Neutralisation von IL-12 durch einen Antikörper eine vermehrte Replikation lediglich im proximalen Ileum beobachtet werden. Eventuell war die Infektionsdosis mit 100 Zysten zu hoch, als dass eine wirksame Reduktion der Immunantwort erreicht werden konnte, oder der Einfluss des IL-12p40-FP auf die Entzündungsreaktion ist weniger ausgeprägt als der des IL-12-Antikörpers. Zudem erfolgte die Sektion der Tiere in dieser Arbeit zu einem späten Zeitpunkt. Überraschend ist auch das völlige Fehlen von *T. gondii* in der Leber. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Immunreaktion in so geringem Maße eingeschränkt wird, dass hierdurch eine Verbreitung von *T. gondii* verhindert werden konnte.

Antikörper gegen IL-12p40 werden schon zur Therapie des M. Crohn bei Unverträglichkeit oder nicht ausreichender Wirkung von Infliximab eingesetzt (94–96). Klinische Studien konnten hier eine gute Wirksamkeit belegen, schwere Nebenwirkungen sind nicht berichtet worden (96).

Mittels Oberflächen-Plasma-Resonanz-Messungen wurde die Affinität des hier verwendeten huIL-18bpa zum IL-18 der Maus untersucht. Bisher wurde nur die Affinität von murinem IL-18bp zu humanem IL-18 untersucht (70). Diese Affinität ist gekennzeichnet durch eine niedrige Dissoziationskonstante mit einer sehr langsamen Dissoziationsrate. Somit konnte hier gezeigt werden, dass das verwendete IL-18bp in der Lage ist, IL-18 mit hoher Affinität zu binden. Ähnliche Werte wurden schon von Kim et al. berichtet (70). Diese hohe Affinität könnte ein Faktor für die antiinflammatorische Wirkung des IL-18bp sein.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass IL-18bp eine durch *T. gondii* induzierte Th1-Immunantwort im Ileum von C57BL/6 Mäusen mildern kann, während die Abwehr des Parasiten durch diese Behandlung nicht eingeschränkt wurde. IL-18bp könnte so in Zukunft eine sicherere Behandlungsoption bei M. Crohn oder anderen Th1-Immunpathologien sein. Ein weiterer Vorteil von IL-18bp gegenüber Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  könnte sein, dass IL-18bp auch natürlich vorkommt und daher ein geringeres Risiko für die Entwicklung von Antikörpern oder allergischen Reaktionen gegen die verabreichten Antikörper birgt.

Einschränkend ist hinzuzufügen, dass eine neuere Studie darauf hindeutet, dass eine Überproduktion von IL-18 nur bei einem Teil der Patienten mit M. Crohn vorliegt (97). Eine Behandlung mit IL-18 inhibierenden Medikamenten könnte demzufolge nur für diese Subgruppe sinnvoll sein (97). Auch in der Therapie mit Infliximab kann nur bei einem Teil der Patienten ein sehr gutes Ansprechen und eine Remission erreicht werden (98). Die dem M. Crohn zugrunde liegenden Mechanismen scheinen daher nicht auf wenige Zytokine zu reduzieren zu sein. In Zukunft könnte es verschiedene, zielgerichtete Therapiemöglichkeiten geben.

IL-18 spielt vorrangig eine Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger, es sind aber auch Beispiele für eine tragende Rolle von IL-18 bei der Abwehr extrazellulärer Erreger, wie *Y. enterocolitica* (99), *S. pneumoniae* (100; 101) oder auch *P. aeruginosa* (102), bekannt. Somit besteht bei einer Behandlung mit IL-18 hemmenden Substanzen potentiell ein erhöhtes Risiko

der Entwicklung entsprechender Infektionen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde auch bei anderen Modellen der Dünndarmentzündung verifiziert werden können und ob eine therapeutische Blockade von IL-18 bei Patienten mit M. Crohn effektiv und sicher ist.

## 5. Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen (M. Crohn, Colitis ulcerosa) sind häufige entzündliche Erkrankungen, deren Ätiologie bisher nicht ausreichend geklärt ist. Die bestehenden therapeutischen Möglichkeiten können nur den Verlauf der Erkrankung beeinflussen, eine Heilung ist derzeit jedoch nicht möglich. Zudem bergen die verwendeten Substanzen das Risiko zum Teil erheblicher Nebenwirkungen und Risiken, wie z.B. der Reaktivierung einer latenten Tuberkulose, sodass neue therapeutische Optionen nötig sind. Experimentelle Untersuchungen bei Tieren und Menschen weisen auf eine überschüssige Immunreaktion (Immunpathologie) als Ursache der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hin. Beim M. Crohn scheint vor allem eine pathologische Th1-Immunantwort vorzuliegen, im Rahmen derer den Zytokinen IL-12, IL-18, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  eine bedeutende Rolle zufällt. Die Charakterisierung und Behandlung wurde in dieser Arbeit anhand eines Mausmodells näher untersucht.

Kürzlich wurde ein regulatorisches Zytokin, IL-18bp beschrieben, welches das proinflammatorische IL-18 inhibieren kann. In verschiedenen Tiermodellen der Kolitis-Erkrankungen konnte durch die Behandlung mit IL-18bp ein Therapieerfolg erzielt werden. Während jedoch die pathologischen Veränderungen des M. Crohn vorwiegend im distalen Ileum lokalisiert sind, gibt es nur wenige experimentelle Modelle, in denen sich die Immunpathologie im Dünndarm manifestiert.

Im hier verwendeten Modell der oralen Infektion mit dem intrazellulären Parasiten *Toxoplasma gondii* wird eine Th1-Immunpathologie im Ileum der Maus ausgelöst, die weitreichende Parallelen zum immunpathologischen Geschehen beim M. Crohn aufweist. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Bedeutung von IL-18bp als Therapie zur Blockade überschüssiger Th1-Immunreaktionen im Toxoplasma-Infektionsmodell untersucht. Neben der Untersuchung des therapeutischen Effekts wurde auch der Einfluß der Therapie mit IL-18bp auf die Immunabwehr gegen *T. gondii*, die Dosisabhängigkeit des therapeutischen Effekts, sowie die Affinität von IL-18bpa zu IL-18 untersucht.

In den hier dargestellten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit IL-18bp die Schwere der Entzündungsreaktion mildern kann, ohne diese jedoch vollständig zu unterdrücken. Auch ein Einfluss auf das lokale und systemische Zytokinmilieu bzw. die antiparasitäre Aktivität des Immunsystems wurde nicht beobachtet. Eine Dosisabhängigkeit konnte mit den hier verwendeten Dosierungen nicht festgestellt werden. Mittels Oberflächen-Plasma-Resonanz wurde die Affinität des hier verwendeten humanen IL-18bp zum IL-18 der

Maus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL-18bp IL-18 mit sehr hoher Affinität bindet.

Zusammenfassend weisen diese Daten darauf hin, dass IL-18bp die Immunpathologie im Rahmen der *T. gondii*-induzierten Ileitis der Maus mildern kann, ohne dabei die Immunabwehr gegen *T. gondii* zu beeinflussen. IL-18bp könnte so in Zukunft eine sicherere Behandlungsoption bei M. Crohn oder anderen Th1-Immunpathologien sein. Auch das natürliche Vorkommen von IL-18bp dürfte mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung von Antikörpern oder allergischen Reaktionen im Vergleich zur Therapie mit Antikörpern wie anti-TNF- $\alpha$  oder anti-IL-1 einhergehen.

Weitere Untersuchungen müssen so zeigen, ob die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde bei anderen Modellen der Entzündung verifiziert werden können, und ob eine therapeutische Blockade von IL-18 bei Patienten mit M. Crohn effektiv und sicher ist.

## 6. Literatur

1. Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH. Clinical Aspects and Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Rev* 2002 Jan;15(1):79–94.
2. Timmer A, Breuer-Katschinski B, Goebell H. Time trends in the incidence and disease location of Crohn's disease 1980-1995: a prospective analysis in an urban population in Germany. *Inflamm. Bowel Dis* 1999 Mai;5(2):79–84.
3. Vind I, Riis L, Jess T, Knudsen E, Pedersen N, Elkjaer M, Bak Andersen I, Wewer V, Nørregaard P, Moesgaard F, Bendtsen F, Munkholm P. Increasing incidences of inflammatory bowel disease and decreasing surgery rates in Copenhagen City and County, 2003-2005: a population-based study from the Danish Crohn colitis database. *Am. J. Gastroenterol* 2006 Juni;101(6):1274–1282.
4. Shivananda S, Lennard-Jones J, Logan R, Fear N, Price A, Carpenter L, van Blankenstein M. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe: is there a difference between north and south? Results of the European Collaborative Study on Inflammatory Bowel Disease (EC-IBD). *Gut* 1996 Nov;39(5):690–697.
5. Niessner M, Volk BA. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). *Clin. Exp. Immunol* 1995 Sep;101(3):428–435.
6. Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J. Clin. Immunol* 1996 Mai;16(3):144–150.
7. Desreumaux P, Brandt E, Gambiez L, Emilie D, Geboes K, Klein O, Ectors N, Cortot A, Capron M, Colombel JF. Distinct cytokine patterns in early and chronic ileal lesions of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1997 Juli;113(1):118–126.
8. Pizarro TT, Arseneau KO, Bamias G, Cominelli F. Mouse models for the study of Crohn's disease. *Trends Mol Med* 2003 Mai;9(5):218–222.
9. Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol. Clin. North Am* 1995 Sep;24(3):475–507.
10. Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995 Okt;109(4):1344–1367.
11. Leach ST, Messina I, Lemberg DA, Novick D, Rubenstein M, Day AS. Local and systemic interleukin-18 and interleukin-18-binding protein in children with inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis* 2008 Jan;14(1):68–74.
12. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu. Rev. Immunol* 2001;19:423–474.
13. Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F, Buhr HJ, Häuser W, Herrlinger K, Höhne W, Koletzko S, Krieglstein CF, Kruis W, Matthes H, Moser G, Reinshagen M, Rogler G,

- Schreiber S, Schreyer AG, Sido B, Siegmund B, Stallmach A, Bokemeyer B, Stange EF, Zeitz M. [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Z Gastroenterol* 2008 Sep;46(9):1094–1146.
14. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med* 2002 Aug;347(6):417–429.
  15. Campieri M, Ferguson A, Doe W, Persson T, Nilsson LG. Oral budesonide is as effective as oral prednisolone in active Crohn's disease. The Global Budesonide Study Group. *Gut* 1997 Aug;41(2):209–214.
  16. Bar-Meir S, Chowers Y, Lavy A, Abramovitch D, Sternberg A, Leichtmann G, Reshef R, Odes S, Moshkovitz M, Bruck R, Eliakim R, Maoz E, Mittmann U. Budesonide versus prednisone in the treatment of active Crohn's disease. The Israeli Budesonide Study Group. *Gastroenterology* 1998 Okt;115(4):835–840.
  17. Greenberg GR, Feagan BG, Martin F, Sutherland LR, Thomson AB, Williams CN, Nilsson LG, Persson T. Oral budesonide for active Crohn's disease. Canadian Inflammatory Bowel Disease Study Group. *N. Engl. J. Med* 1994 Sep;331(13):836–841.
  18. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol. Ther* 2002 Okt;96(1):23–43.
  19. Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD000545.
  20. Pearson DC, May GR, Fick G, Sutherland LR. Azathioprine for maintaining remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2000;(2):CD000067.
  21. Bastida Paz G, Nos Mateu P, Aguas Peris M, Beltrán Niclós B, Rodríguez Soler M, Ponce García J. [Optimization of immunomodulatory treatment with azathioprine or 6-mercaptopurine in inflammatory bowel disease]. *Gastroenterol Hepatol* 2007 Nov;30(9):511–516.
  22. Rutgeerts P, Diamond RH, Bala M, Olson A, Lichtenstein GR, Bao W, Patel K, Wolf DC, Safdi M, Colombel JF, Lashner B, Hanauer SB. Scheduled maintenance treatment with infliximab is superior to episodic treatment for the healing of mucosal ulceration associated with Crohn's disease. *Gastrointest. Endosc* 2006 März;63(3):433-442; quiz 464.
  23. Keane J, Gershon S, Wise RP, Mirabile-Levens E, Kasznica J, Schwiertman WD, Siegel JN, Braun MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. *N. Engl. J. Med* 2001 Okt;345(15):1098–1104.
  24. Development of antinuclear antibodies and its clinical impact in patients with Crohn's disease treated with chimeric monoclonal anti-TNF[alpha] antibodies (infliximab) [Internet]. [date unknown];15 Available from: [http://journals.lww.com/eurojgh/Fulltext/2003/04000/Development\\_of\\_antinuclear\\_antibodies\\_and\\_its.3.aspx](http://journals.lww.com/eurojgh/Fulltext/2003/04000/Development_of_antinuclear_antibodies_and_its.3.aspx)
  25. Ricart E, Sandborn WJ. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999 Nov;117(5):1247–1248.



26. Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, Tremaine WJ, Johnson T, Diehl NN, Zinsmeister AR. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2001 Nov;121(5):1088–1094.
27. Van den Brande JMH, Braat H, van den Brink GR, Versteeg HH, Bauer CA, Hoedemaeker I, van Montfrans C, Hommes DW, Peppelenbosch MP, van Deventer SJH. Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 2003 Juni;124(7):1774–1785.
28. Schmidt C, Marth T, Wittig BM, Hombach A, Abken H, Stallmach A. Interleukin-12 antagonists as new therapeutic agents in inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002 2003;70(3):177–183.
29. van Deventer SJ, Elson CO, Fedorak RN. Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997 Aug;113(2):383–389.
30. Schreiber S, Fedorak RN, Nielsen OH, Wild G, Williams CN, Nikolaus S, Jacyna M, Lashner BA, Gangl A, Rutgeerts P, Isaacs K, van Deventer SJ, Koningsberger JC, Cohard M, LeBeaut A, Hanauer SB. Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000 Dez;119(6):1461–1472.
31. Fedorak RN, Gangl A, Elson CO, Rutgeerts P, Schreiber S, Wild G, Hanauer SB, Kilian A, Cohard M, LeBeaut A, Feagan B. Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000 Dez;119(6):1473–1482.
32. Hommes D, van den Blink B, Plasse T, Bartelsman J, Xu C, Macpherson B, Tytgat G, Peppelenbosch M, Van Deventer S. Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002 Jan;122(1):7–14.
33. Wan YY, Flavell RA. How diverse--CD4 effector T cells and their functions. *J Mol Cell Biol* 2009 Okt;1(1):20–36.
34. Kaiko GE, Horvat JC, Beagley KW, Hansbro PM. Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 2008 März;123(3):326–338.
35. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996 Okt;383(6603):787–793.
36. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med* 2005 Jan;201(2):233–240.
37. Yen D, Cheung J, Scheerens H, Poulet F, McClanahan T, McKenzie B, Kleinschek MA, Owyang A, Mattson J, Blumenschein W, Murphy E, Sathe M, Cua DJ, Kastelein RA, Rennick D. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J. Clin. Invest* 2006 Mai;116(5):1310–1316.

38. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol* 2005 Nov;6(11):1123–1132.
39. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang Y-H, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol* 2005 Nov;6(11):1133–1141.
40. Sanchez-Muñoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008 Juli;14(27):4280–4288.
41. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 1995 Nov;378(6552):88–91.
42. Stoll S, Müller G, Kurimoto M, Saloga J, Tanimoto T, Yamauchi H, Okamura H, Knop J, Enk AH. Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J. Immunol* 1997 Juli;159(1):298–302.
43. Takeuchi M, Nishizaki Y, Sano O, Ohta T, Ikeda M, Kurimoto M. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor („interleukin-18“) in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res* 1997 Sep;289(3):499–503.
44. Cameron LA, Taha RA, Tscopoulos A, Kurimoto M, Olivenstein R, Wallaert B, Minshall EM, Hamid QA. Airway epithelium expresses interleukin-18. *Eur. Respir. J* 1999 Sep;14(3):553–559.
45. Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, Kurimoto M, Chambers TJ, Martin TJ, Gillespie MT. Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J. Exp. Med* 1997 März;185(6):1005–1012.
46. Wheeler RD, Culhane AC, Hall MD, Pickering-Brown S, Rothwell NJ, Luheshi GN. Detection of the interleukin 18 family in rat brain by RT-PCR. *Brain Res. Mol. Brain Res* 2000 Mai;77(2):290–293.
47. Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 and interleukin-1 beta: two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J. Clin. Immunol* 1999 Jan;19(1):1–11.
48. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 1997 Jan;275(5297):206–209.
49. Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikata T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J. Biol. Chem* 1997 Okt;272(41):25737–25742.

50. Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, Akira S. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J. Immunol* 1999 Mai;162(9):5041–5044.
51. Parnet P, Garka KE, Bonnert TP, Dower SK, Sims JE. IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. *J. Biol. Chem* 1996 Feb;271(8):3967–3970.
52. Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J. Biol. Chem* 1998 Nov;273(45):29445–29450.
53. Leung BP, Culshaw S, Gracie JA, Hunter D, Canetti CA, Campbell C, Cunha F, Liew FY, McInnes IB. A role for IL-18 in neutrophil activation. *J. Immunol* 2001 Sep;167(5):2879–2886.
54. Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, Hiroishi K, Takeda K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kayagaki N, Kurimoto M, Okamura H, Hada T, Yagita H, Akira S, Nakanishi K, Higashino K. IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J. Immunol* 1999 Feb;162(3):1662–1668.
55. Gerdes N, Sukhova GK, Libby P, Reynolds RS, Young JL, Schönbeck U. Expression of interleukin (IL)-18 and functional IL-18 receptor on human vascular endothelial cells, smooth muscle cells, and macrophages: implications for atherogenesis. *J. Exp. Med* 2002 Jan;195(2):245–257.
56. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol* 2002 Juni;3(6):549–557.
57. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J. Immunol* 1998 Okt;161(7):3400–3407.
58. Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB, Menon S, Kastelein R, Bazan F, O’Garra A. IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity* 1997 Okt;7(4):571–581.
59. Chang JT, Segal BM, Nakanishi K, Okamura H, Shevach EM. The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur. J. Immunol* 2000 Apr;30(4):1113–1119.
60. Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001 März;12(1):53–72.
61. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn’s disease. *J. Immunol* 1999 Juli;163(1):143–147.

62. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J. Immunol* 1999 Juni;162(11):6829–6835.
63. Vossenkämper A, Struck D, Alvarado-Esquivel C, Went T, Takeda K, Akira S, Pfeffer K, Alber G, Lochner M, Förster I, Liesenfeld O. 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* 2004 Nov;34(11):3197–3207.
64. Naftali T, Novick D, Gabay G, Rubinstein M, Novis B. Interleukin-18 and its binding protein in patients with inflammatory bowel disease during remission and exacerbation. *Isr. Med. Assoc. J* 2007 Juli;9(7):504–508.
65. Dinarello CA. Targeting interleukin 18 with interleukin 18 binding protein. *Ann. Rheum. Dis* 2000 Nov;59 Suppl 1:i17-20.
66. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999 Jan;10(1):127–136.
67. Siegmund B, Sennello JA, Lehr HA, Senaldi G, Dinarello CA, Fantuzzi G. Frontline: interferon regulatory factor-1 as a protective gene in intestinal inflammation: role of TCR gamma delta T cells and interleukin-18-binding protein. *Eur. J. Immunol* 2004 Sep;34(9):2356–2364.
68. Banda NK, Vondracek A, Kraus D, Dinarello CA, Kim S-H, Bendele A, Senaldi G, Arend WP. Mechanisms of inhibition of collagen-induced arthritis by murine IL-18 binding protein. *J. Immunol* 2003 Feb;170(4):2100–2105.
69. Faggioni R, Cattley RC, Guo J, Flores S, Brown H, Qi M, Yin S, Hill D, Scully S, Chen C, Brankow D, Lewis J, Baikalov C, Yamane H, Meng T, Martin F, Hu S, Boone T, Senaldi G. IL-18-binding protein protects against lipopolysaccharide-induced lethality and prevents the development of Fas/Fas ligand-mediated models of liver disease in mice. *J. Immunol* 2001 Nov;167(10):5913–5920.
70. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, Dinarello CA. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2000 Feb;97(3):1190–1195.
71. Hurgin V, Novick D, Rubinstein M. The promoter of IL-18 binding protein: activation by an IFN-gamma-induced complex of IFN regulatory factor 1 and CCAAT/enhancer binding protein beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2002 Dez;99(26):16957–16962.
72. Paulukat J, Bosmann M, Nold M, Garkisch S, Kämpfer H, Frank S, Raedle J, Zeuzem S, Pfeilschifter J, Mühl H. Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma. *J. Immunol* 2001 Dez;167(12):7038–7043.
73. Corbaz A, ten Hove T, Herren S, Graber P, Schwartsburd B, Belzer I, Harrison J, Plitz T, Kosco-Vilbois MH, Kim S-H, Dinarello CA, Novick D, van Deventer S, Chvatchko Y. IL-18-binding protein expression by endothelial cells and macrophages is up-regulated during active Crohn's disease. *J. Immunol* 2002 Apr;168(7):3608–3616.

74. Veenstra KG, Jonak ZL, Trulli S, Gollob JA. IL-12 induces monocyte IL-18 binding protein expression via IFN-gamma. *J. Immunol* 2002 März;168(5):2282–2287.
75. Schuhmann D, Godoy P, Weiss C, Gerloff A, Singer MV, Dooley S, Böcker U. Interfering with interferon- $\gamma$  signalling in intestinal epithelial cells: selective inhibition of apoptosis-maintained secretion of anti-inflammatory interleukin-18 binding protein. *Clin. Exp. Immunol.* 2011 Jan;163(1):65–76.
76. Sivakumar PV, Westrich GM, Kanaly S, Garka K, Born TL, Derry JM, Viney JL. Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. *Gut* 2002 Juni;50(6):812–820.
77. Siegmund B, Fantuzzi G, Rieder F, Gamboni-Robertson F, Lehr HA, Hartmann G, Dinarello CA, Endres S, Eigler A. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 2001 Okt;281(4):R1264-1273.
78. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Sato T, Yamazaki M, Okamoto S, Ishii H, Totsuka T, Iiyama R, Okamoto R, Ikeda M, Kurimoto M, Takeda K, Akira S, Hibi T. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2001 Okt;121(4):875–888.
79. Ten Hove T, Corbaz A, Amitai H, Aloni S, Belzer I, Graber P, Drillenburger P, van Deventer SJ, Chvatchko Y, Te Velde AA. Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology* 2001 Dez;121(6):1372–1379.
80. Wirtz S, Becker C, Blumberg R, Galle PR, Neurath MF. Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. *J. Immunol* 2002 Jan;168(1):411–420.
81. Gorfu G, Rivera-Nieves J, Hoang S, Abbott DW, Arbenz-Smith K, Azar DW, Pizarro TT, Cominelli F, McDuffie M, Ley K. Beta7 integrin deficiency suppresses B cell homing and attenuates chronic ileitis in SAMP1/YitFc mice. *J. Immunol.* 2010 Nov;185(9):5561–5568.
82. Werner T, Wagner SJ, Martínez I, Walter J, Chang J-S, Clavel T, Kisling S, Schuemann K, Haller D. Depletion of luminal iron alters the gut microbiota and prevents Crohn's disease-like ileitis. *Gut* 2011 März;60(3):325–333.
83. Liesenfeld O. Oral infection of C57BL/6 mice with *Toxoplasma gondii*: a new model of inflammatory bowel disease? *J. Infect. Dis* 2002 Feb;185 Suppl 1:S96-101.
84. Liesenfeld O. Immune responses to *Toxoplasma gondii* in the gut. *Immunobiology* 1999 Dez;201(2):229–239.
85. Muñoz M, Heimesaat MM, Danker K, Struck D, Lohmann U, Plickert R, Bereswill S, Fischer A, Dunay IR, Wolk K, Loddenkemper C, Krell H-W, Libert C, Lund LR, Frey O, Hölscher C, Iwakura Y, Ghilardi N, Ouyang W, Kamradt T, Sabat R, Liesenfeld O. Interleukin (IL)-23 mediates *Toxoplasma gondii*-induced immunopathology in the gut via matrixmetalloproteinase-2 and IL-22 but independent of IL-17. *J. Exp. Med* 2009 Dez;206(13):3047–3059.

86. Hoentjen F, van Bodegraven AA. Safety of anti-tumor necrosis factor therapy in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol* 2009 Mai;15(17):2067–2073.
87. Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, Jahn H-K, Dunay IR, Moter A, Gescher DM, Schumann RR, Göbel UB, Liesenfeld O. Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol* 2006 Dez;177(12):8785–8795.
88. Stallmach A, Marth T, Weiss B, Wittig BM, Hombach A, Schmidt C, Neurath M, Zeitz M, Zeuzem S, Abken H. An interleukin 12 p40-IgG2b fusion protein abrogates T cell mediated inflammation: anti-inflammatory activity in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Gut* 2004 März;53(3):339–345.
89. Hochberg MC, Lebowitz MG, Plevy SE, Hobbs KF, Yocum DE. The benefit/risk profile of TNF-blocking agents: findings of a consensus panel. *Semin. Arthritis Rheum.* 2005 Juni;34(6):819–836.
90. Siegmund B, Sennello JA, Lehr HA, Senaldi G, Dinarello CA, Fantuzzi G. Frontline: interferon regulatory factor-1 as a protective gene in intestinal inflammation: role of TCR gamma delta T cells and interleukin-18-binding protein. *Eur. J. Immunol* 2004 Sep;34(9):2356–2364.
91. Lochner M, Förster I. Anti-interleukin-18 therapy in murine models of inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 2002 2003;70(3):164–169.
92. Plitz T, Saint-Mézard P, Satho M, Herren S, Waltzinger C, de Carvalho Bittencourt M, Kosco-Vilbois MH, Chvatchko Y. IL-18 binding protein protects against contact hypersensitivity. *J. Immunol* 2003 Aug;171(3):1164–1171.
93. Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur. J. Immunol* 2000 Mai;30(5):1486–1495.
94. Ryan C, Thrash B, Warren RB, Menter A. The use of ustekinumab in autoimmune disease. *Expert Opin Biol Ther* 2010 Apr;10(4):587–604.
95. Elliott M, Benson J, Blank M, Brodmerkel C, Baker D, Sharples KR, Szapary P. Ustekinumab: lessons learned from targeting interleukin-12/23p40 in immune-mediated diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009 Dez;1182:97–110.
96. Scherl EJ, Kumar S, Warren RU. Review of the safety and efficacy of ustekinumab. *Therap Adv Gastroenterol* 2010 Sep;3(5):321–328.
97. Schmidt C, Giese T, Goebel R, Schilling M, Marth T, Ruether A, Schreiber S, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A. Interleukin-18 is increased only in a minority of patients with active Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2007 Sep;22(9):1013–1020.
98. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, Rachmilewitz D, Wolf DC, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002 Mai;359(9317):1541–1549.

99. Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Kurimoto M, Heesemann J, Autenrieth IB. IL-18 (IFN- $\gamma$ -Inducing Factor) Regulates Early Cytokine Production in, and Promotes Resolution of, Bacterial Infection in Mice. *The Journal of Immunology* 1998 Jan;160(1):299–307.
100. Lauw FN, Branger J, Florquin S, Speelman P, van Deventer SJH, Akira S, van der Poll T. IL-18 Improves the Early Antimicrobial Host Response to Pneumococcal Pneumonia. *The Journal of Immunology* 2002 Jan;168(1):372–378.
101. Paterson GK, Blue CE, Mitchell TJ. Role of interleukin-18 in experimental infections with *Streptococcus pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* 2005 Apr;54(Pt 4):323–326.
102. Huang X, McClellan SA, Barrett RP, Hazlett LD. IL-18 contributes to host resistance against infection with *Pseudomonas aeruginosa* through induction of IFN-gamma production. *J. Immunol.* 2002 Jun;168(11):5756–5763.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A.	Aqua
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
APC	(engl.) Antigen presenting cell
5-ASA	5-Aminosalicylsäure
bp	bindendes Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	(engl.) Cluster of Differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
cm	Zentimeter
Cp	(engl.) Crossing point
DAB	Diaminobenzidine
DC	(engl.) Dendritic Cell
dest.	destillata
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNFB	2,4-Dinitro-1-fluorbenzol
DSS	Dextransodiumsulfat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	(engl.) Enzyme-linked Immunosorbend Assay
FEM	Forschungseinrichtungen für experimentelle Medizin
FP	Fusionsprotein
H&E	Hämatoxolin & Eosin
HP	(engl.) Hybridisation Probes
HPRT	Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase
HRP	(engl.) Horse Radish Peroxidase
huIL-18	humanes IL-18
i.p.	intraperitoneal
IBD	(engl.) Infectious Bowel Disease



IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-18 <sup>-/-</sup> /IL-18-KO	IL-18-Knockout
IRF	Interferon-regulierender Faktor
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LC	LightCycler
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
M. Crohn	Morbus Crohn
MHC	(engl.) Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MLN	Mesenteriale Lymphknoten
mm	Millimeter
mM	Millimolar
n	Anzahl
NFκB	(engl.) Nuclear Factor-kappa B
ng	Nanogramm
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
MS	Multiple Sklerose
muIL18	murines IL-18
NO	Nitroxid
p.o.	per os
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pg	Picogramm
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	(engl.) rounds per minute

RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
RU	Response units
sek	Sekunde
TGF	Tumor-growth-factor
T. gondii	Toxoplasme gondii
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBS	Trinitrobenzoesäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tregs	regulatorische T-Zellen

## 8. Lebenslauf

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

## 9. Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei meiner Familie und allen Freunden für ständiges Anfeuern und tatkräftige Unterstützung bedanken.

Ein großes Dankeschön an Franki fürs Korrekturlesen, Solvy für Hilfe auch zu undankbaren Uhrzeiten, Oliver für scheinbar unendliche Geduld und Dani für „Bei der Stange Halten“.

Insbesondere bedanke ich mich bei meiner Frau und meinen Kindern dafür, dass sie da sind.

**Danke!!!**

## **Erklärung**

„Ich, Ingmar Frank, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:  
Die Bedeutung von IL-18-bindendem Protein in der *Toxoplasma gondii*-induzierten  
Immunpathologie des Ileums  
selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne  
die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten  
dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift