### Aus dem

Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

# Die Bedeutung von IL-12 und IL-23 in der Immunantwort gegen *Toxoplasma gondii*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin

> vorgelegt von Daniela Struck Tierärztin aus Bad Pyrmont

> > Berlin 2008 Journal Nr. 3279

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Dekan:	UnivProf. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	UnivProf. Dr. Lothar H. Wieler
Zweiter Gutachter:	UnivProf. Dr. Oliver Liesenfeld, Charité
Dritter Gutachter:	UnivProf. Dr. Eberhard Schein

### Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

Toxoplasma gondii; mice; mice, knockout (MeSH), experimental animal, immune response, interleukin 12, interleukin 18, interleukin 23, interleukin-12 subunit p35 (MeSH), interleukin-12 subunit p40 (MeSH), bone marrow, radiation chimera (MeSH), bone marrow transplantation (MeSH) , bone marrow cells, immunopathology, t lymphocytes, th1 cells (MeSH), inflammatory bowel diseases

Tag der Promotion: 16.11.2009

#### Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <a href="http://dnb.ddb.de">http://dnb.ddb.de</a> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-713-8 Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008 Dissertation, Freie Universität Berlin D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law. No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved © mensch und buch verlag 2009 choriner str. 85 - 10119 berlin verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

INHALT	1
1. EINLEITUNG	6
1.1 Toxoplasma gondii	7
1.1.1 Biologie	
1.1.2 Epidemiologie und Klinik	
1.2 Die Immunantwort gegen <i>T. gondii</i>	
1.2.1 Zelluläre Arme der adaptiven Immunantwort gegen T. gondii	9
1.2.2 Zytokine in der adaptiven Immunantwort gegen T. gondii	
1.2.2.1 IL-12	
1.2.2.2 IL-23	14
1.3 MAUSMODELLE DER INFEKTION MIT TOXOPLASMA GONDII	
1.3.1 Infektion mit 10 Zysten	
1.3.2 Infektion mit 100 Zysten	
1.4 ZIELE	
2. MATERIAL	21
2.1 Tiere und Parasiten	21
2.1.1 Tiere	
2.1.2 Parasiten	
2.2 CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	
2.3 GERÄTE, PLASTIKWARE UND KOMMERZIELLE "KITS"	
2.3.1 Geräte und Materialien	
2.3.2 Plastikwaren	
2.3.3 Kommerzielle "Kits"	
2.4 Puffer und Lösungen	
2.5 OLIGONUKLEOTIDPRIMER UND –SONDEN	
2.6 Enzyme, Antikörper	
2.7 Nährmedien und Seren	
2.8 Sonstiges	
2.9 Software und Datenbanken	
3. METHODEN	
3.1 INFEKTION DER TIERE MIT <i>T. GONDII</i>	
3.2 TÖTUNG DER TIERE UND ORGANENTNAHME	
3.3 HISTOLOGISCHE METHODEN	
3.3.1 Färbung mit Hämatoxilin und Eosin	
3.3.2 Immunhistochemische Detektion von T. gondii	
3.3.3 Auswertung der histologischen Schnitte und Aufnahme der Fotos	
3.4 Serumgewinnung	
3.5 ORGANKULTUR UND ORGANHOMOGENISATE	

3.6 ENZYME-LINKED-IMMUNABSORBENT-ASSAY (ELISA)	
3.7 ISOLIERUNG VON ZELLEN AUS MILZ UND MLN	
3.8 DURCHFLUSSZYTOMETRIE	
3.8.1 Oberflächenfärbung	
3.8.2 Intrazelluläre Färbung	
3.9 Molekularbiologische Techniken	
3.9.1 Isolierung von DNA	
3.9.2 Isolierung von RNA	
3.9.4 Quantitative PCR	
3.9.4.1 Quantifizierung der DNA von T. gondii	
3.9.4.2 Quantifizierung von IL-17, IL-23p19, IL-22, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-3	
3.10 GENERIERUNG VON KNOCHENMARKCHIMÄREN	
3.10.1 Bestrahlung	39
3.10.2 Gewinnung und Transfer von Knochenmarkzellen und Milzzellen	39
3.10.3 Kontrolle des Chimärismus und der Rekonstitution der Zellen	
3.10.3.1 Qualitative PCR	
3.11 Zymographie	
3.12 Statistik	
4. ERGEBNISSE	
<ul> <li>4.1. Kolle ber UNTEREINHEITEN VON IL-12 IN DER PROTEKTIVEN IMMONANTWORT GegeNOBER 1. GO.</li> <li>4.1.1. Klinischer Verlauf, Gewicht und Überleben von IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/p40<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten T. gondii</li> <li>4.1.2. Histologische Veränderungen in IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/p40<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 1 Zysten T. gondii</li></ul>	<pre>vbii42 viii42 viii</pre>
4.1.5. Bestimmung von IL-12 und IL-18 nach Infektion mit T. gondii	
4.1.6. Rolle von IL-23 in der protektiven Immunantwort gegen T. gondii	49
4.1.7. IL-23p19-Expression in IL-12p35 <sup>-/-</sup> , p40 <sup>-/-</sup> und p35/p40 <sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 T. gondii	Zysten 49
4.1.8. IL-17-Konzentrationen in IL-12p35 <sup>-/-</sup> , p40 <sup>-/-</sup> , p35/p40 <sup>-/-</sup> , IRF-8 <sup>-/-</sup> und IL-18 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infel mit 10 Zysten T. gondii	ktion 50
4.2 DIE ROLLE VON IL-23 IN DER TH1-IMMUNPATHOLOGIE NACH ORALER INFEKTION MIT TOXOPLASMA	1
GONDII	
4.2.1. Gewicht und Überleben	51
4.2.2. Histopathologische Veränderungen und Parasitenlast im Darm von Wildtyp und IL-23p19 <sup>-/-</sup> M	läusen 52
4.2.3. Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (IL-12, IFN-γ, IL-6, IL-17) in Wildtyp- und IL	 
23p19 <sup></sup> Mäusen nach Infektion mit 100 Zysten T. gondii	54

4.2.4. Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen im Darm von IL-23 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion
mit 100 Zysten T. gondii
4.3. IL-18 und dendritische Zellen in der Th1-Immunpathologie
4.3.1. Suszeptibilität von Mäusen mit Knochenmarkchimärismus nach oraler Infektion mit 100 Zysten T. gondii
4.3.2. Histologische Veränderungen im terminalen Ileum nach oraler Infektion mit 100 Zysten T. gondii 61 4.3.3. IL-18-Konzentrationen in Wildtyp- und IL-18 <sup>-/-</sup> Mäusen nach Chimärismus und oraler Infektion mit 100 Zysten T. gondii
5. DISKUSSION
5.1 WELCHE ROLLE SPIELEN DIE EINZELNEN UNTEREINHEITEN VON IL-12 IN DER PROTEKTIVEN
IMMUNANTWORT NACH ORALER INFEKTION MIT T. GONDII?
5.2 IST IL-18 ESSENTIELL FÜR DIE PROTEKTIVE IMMUNANTWORT NACH ORALER INFEKTION MIT T. GONDII? 67
5.3 WELCHE ROLLE SPIELT IL-23 IN DER IMMUNPATHOLOGIE NACH ORALER INFEKTION MIT T.
GONDII?
6. ZUSAMMENFASSUNG73
7. REFERENZEN
8. ABKÜRZUNGEN
9. PUBLIKATIONEN

# 1. Einleitung

Das Immunsystem hat sich in seiner Entwicklung auf die Bekämpfung unterschiedlichster Krankheitserreger einstellen müssen. Derzeit wird angenommen, dass zur Bekämpfung intrazellulärer Erreger eine sogenannte Th1-Immunantwort induziert wird. Diese ist durch die v.a. von dendritischen Zellen vermittelte Aktivierung und nachfolgende Proliferation von  $CD4^+$  T-Zellen charakterisiert.  $CD4^+$  T-Zellen aktivieren durch Zytokine wie IFN- $\gamma$ Makrophagen, die so in die Lage versetzt werden, intrazelluläre Erreger abzutöten, bzw. deren Replikation zu hemmen. Typische Krankheitserreger des Menschen, bei denen eine Th1-Immunantwort dominiert, sind intrazelluläre Parasiten wie Toxoplasma gondii und Leishmania spp. oder intrazelluläre Bakterien wie Mycobacterium tuberculosis. Bei einem Zusammenbruch der CD4-T-Zellantwort (z.B. im Rahmen einer HIV-Infektion) vermehren sich intrazelluläre Erreger ungehindert im Wirtsorganismus, was klinisch als opportunistische, unbehandelt meist tödlich verlaufende Infektion imponiert. Neben der protektiven Th1-Antwort sind beim Menschen auch überschießende Th1-Immunantworten im Rahmen von Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (RA), Psoriasis und Morbus Crohn beschrieben. Die murine Infektion mit dem intrazellulären Protozoon Toxoplasma gondii stellt ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung sowohl protektiver als auch schädigender Th1-Immunantworten dar, da bei Immunsuppression eine unkontrollierte Vermehrung des Parasiten auftritt und bei suszeptiblen Mäusen eine überschießende Immunantwort (Pan-Ileitis nach oraler Infektion) beobachtet wird [1, 2]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welche Rolle pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin(IL)-12, IL-18 sowie das kürzlich entdeckte IL-23 auf die Immunantwort nach oraler Infektion mit *T. gondii* haben.

# 1.1 Toxoplasma gondii

### 1.1.1 Biologie

Toxoplasma gondii ist ein obligat intrazelluläres Protozoon, das dem Stamm Apicomplexa und der Ordnung Coccidien zuzuordnen ist. Der Parasit verfügt über zwei Vermehrungsformen. In seinem Endwirt, der Katze, kommt es nach Aufnahme von Gewebezysten aus dem Hirn oder anderen Organen oder durch Aufnahme von Oozysten (aus mit Katzenkot kontaminierter Umwelt) zur geschlechtlichen Vermehrung (Gametogonie). Deren Endprodukt, die Oozysten, werden mit dem Kot ausgeschieden. So können Oozysten wieder von Katzen oder aber von Nutztieren, wie zum Beispiel dem Schwein, aber auch dem Menschen aufgenommen werden. In diesen Wirten kommt es nach der Passage des Magens zur Lyse der Zystenwand und zum Durchtritt durch das Darmepithel. Nach Stadienkonversion zu Tachyzoiten disseminieren die Parasiten im Organismus und gelangen in Nerven- und Muskelzellen, in denen sie sich enzystieren und als Bradyzoiten lebenslang verbleiben. Nehmen andere Wirbeltiere diese Zysten oral auf (z.B. beim Verzehr von Mäusen durch Katzen oder dem Verzehr von kontaminiertem Fleisch durch den Menschen), werden im Magen wiederum Bradyzoiten freigesetzt, die sich in Tachyzoiten umwandeln. Nach Dissemination im gesamten Körper kommt es im Rahmen einer latenten Infektion zur Enzystierung in Nerven- oder Muskelzellen, womit der Lebenszyklus geschlossen ist [1, 3].



Tachyzoiten

Abb.1: Toxoplasma gondii

### 1.1.2 Epidemiologie und Klinik

Ein Drittel der Menschheit, in einigen Ländern sogar bis zu 60% der Bevölkerung, ist mit T. gondii infiziert. In Deutschland wird mit dem Alter ansteigend von einer Seroprävalenz von bis zu 70% ausgegangen. Die Infektion zeigt regional deutlich unterschiedliche Prävalenzen, was durch Risikofaktoren bedingt ist (Kontakt mit Katzenkot bzw. mit Katzenkotkontaminierter Umgebung vs. Verzehr von ungenügend gegartem oder rohem Fleisch). Während nur bei einer Minderheit der Patienten mit frischer Infektion eine leichte, grippeähnliche Symptomatik zu beobachten ist, kommt es bei Immunsupprimierten (AIDSoder Transplantationspatienten) zur Reaktivierung der latenten Infektion. Die klinischen Manifestationen der Reaktivierung bestehen aus psychischen oder neurologischen Auffälligkeiten, v.a. Bewusstseinsveränderungen oder motorische Störungen. Eine weitere Gefährdung stellt eine Erstinfektion während der Schwangerschaft dar, die zu konnataler Toxoplasmose des Neugeborenen führen kann. Symptome des Neugeborenen sind im zentralen Nervensystem und an der Retina vorherrschend. Die Augentoxoplasmose kann als Manifestation der akuten und konnatalen Infektion auftreten. Es ist derzeit unklar, ob Wirtsfaktoren und/oder parasitäre Faktoren (unterschiedliche Genotypen) für die Ausprägung der Krankheitssymptome verantwortlich sind [1, 3, 4].

### 1.2 Die Immunantwort gegen T. gondii

Die Infektion mit *T. gondii* führt zur Induktion verschiedener Arme des Immunsystems. Neben humoralen Faktoren (alle Antikörperklassen sind nachweisbar) spielt v.a. die zelluläre Immunität gegen den Erreger eine zentrale Rolle. Die zelluläre Immunantwort wird zum Teil durch angeborene Mechanismen, vor allem die Aktivität von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen sowie dendritische Zellen und Granulozyten, sowie durch die adaptive Immunität bewirkt, bei der v.a. T-Zellen eine zentrale Rolle spielen (3). Die Zytokine IL-12 und IL-18 sind als wichtige Induktoren der Th1-Immunantwort bekannt, während IFN-γ als das zentrale Effektormolekül angesehen wird [5-7].

### 1.2.1 Zelluläre Arme der adaptiven Immunantwort gegen T. gondii

Die adaptive Immunantwort wird v.a. durch professionelle antigenpräsentierende Zellen induziert. **Dendritische Zellen** nehmen hier eine zentrale Stellung ein [8, 9]. Über sogenannte "Toll-Like"–Rezeptoren (TLR) sind dendritische Zellen in der Lage, Antigen-Muster (z.B. Zellbestandteile wie LPS, Flagellin aber auch mikrobielle RNA- und DNA-Fragmente) zu erkennen [10]. Im Falle von *T. gondii* wurde der Erkennung von einem Profilin-ähnlichen Molekül durch TLR-11, aber auch die Erkennung von GPI-Ankern durch TLR-2 und TLR-4 eine zentrale Rolle zugewiesen [11-14]. Nach Aktivierung der Adaptermoleküle MyD88, MAL/TRAP, TRAM und TRIF werden zwei verschiedene Signaltransduktionskaskaden induziert, die über die Transkriptionsfaktoren NFκB und STAT 1 unter anderem zur Aktivierung von Zytokin- Genen wie IL-12 und IL-18 führt [10, 15]. Für *T. gondii* werden MyD88 sowie STAT 1 und 4 als essentiell diskutiert [16]. Werden die Zellen aktiv infiziert, erfolgt intrazellulär die Bildung eine parasitophoren Vakuole, aus der parasitäre Antigene über MHC-I präsentiert und CD8<sup>+</sup> Zellen aktiviert werden [17-19]. CD8<sup>+</sup> Zellen sind IFN-γproduzierende zytotoxische T-Zellen, die durch Ausschüttung von Perforin und Granzym in der Zielzelle Nekrosen auslösen können.

Nach Phagozytose der Toxoplasmen erfolgt eine Präsentation des Antigens über MHC-II und vermehrte Expression kostimulatorischer Moleküle, was für die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen essentiell ist [17].

CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren je nach Art des Antigens (z.B. intrazelluläre Erreger vs. Helminthen), des Zytokin-Milieus und beeinflußt von genetischen Faktoren zu unterschiedlichen T-Helfer (Th)-Subpopulationen, die durch die Expression spezifischer Transkriptionsfaktoren und Sekretion spezifischer Zytokinmuster charakterisiert sind. Derzeit bekannte Populationen sind Effektorzellen wie die IFN-γ-sezerniernden Th1-Zellen, des weiteren Th2-Zellen, die vornehmlich IL-4, IL-5 und IL-13 [19-21] sezernieren und die kürzlich entdeckten Th17-Zellen, die vor allem IL-17 und IL-22 sezernieren [22, 23]. Maßgeblich an der Differenzierung beteiligt sind die Zytokine IL-12 für Th1-, IL-4 für Th2-[24] sowie TGF- $\beta$  und IL-6 für Th17-Zellen [22, 25]. Des weiteren gibt es eine Population von regulatorisch wirksamen T-Zellen, die IL-10 und TGF- $\beta$ -produzierenden regulatorischen T-Zellen (T regs) [26].

Eine Infektion mit *T. gondii* setzt eine starke **Th1-Immunantwort** in Gang [2, 4]. Die Differenzierung von naiven  $CD4^+$  T-Zellen zu Th1-Zellen hat die Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , IL-2, und TNF- $\alpha$  sowie die Expression von CD40L zufolge, was Einfluss auf die klonale

Proliferation der Th1-Zellen, aber auch auf die Antikörperproduktion von B-Zellen und Aktivierung von Makrophagen nimmt und somit die Induktion der zellvermittelten Immunabwehr bedingt [27]. Eine weitere zentrale Position nehmen NK-Zellen ein, die nach IL-12-Stimulation in der frühen Phase der Infektion eine Hauptquelle für IFN-γ darstellen [28].

### 1.2.2 Zytokine in der adaptiven Immunantwort auf T. gondii

### 1.2.2.1 IL-12

Interleukin 12 ist ein durch Disulfidbrücken verbundenes Heterodimer aus einer 35kd- (p35) und einer 40kd (p40)- schweren Untereinheit [29, 30]. Im humanen Genom befinden sich die Gene für p35 und p40 an unterschiedlichen Loci, p40 auf dem Chromosom 5q31-q33, p35 auf 3p12-3q13.2 [31]. Während zwischen p35 und p40 keinerlei Sequenzhomologie existiert, bestehen Ähnlichkeiten zwischen p35 und IL-6, dem granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) und Chicken myelomonocytic growth factor [32]. p40 hingegen hat keinerlei Homologien zu anderen Zvtokinen, sondern gehört zu der Hämatopoetin-Rezeptor-Familie. wobei es am ehesten der extrazellulären Domäne des IL-6R entspricht [33, 34]. Die p40-Untereinheit von IL-12 wird im Gegensatz zur p35-Untereinheit nicht nur als Dimer, sondern auch unabhängig sezerniert. Sie kann als Monomer sowie als Homodimer vorliegen [35]. Dem Homodimer wurden sowohl antagonistische als auch agonistische Wirkungen zu IL-12 zugeschrieben [35-37]. Des Weiteren kann die IL-12p40-Untereinheit zusammen mit einem 19kd schweren Protein das IL-12-verwandte Zytokin IL-23 bilden [38] (siehe Kapitel 1.2.2.2). Der IL-12-Rezeptor (IL-12R) besteht aus einer  $\beta$ 1- und einer  $\beta$ 2-Untereinheit, die strukturelle Verwandtschaft zu Typ-1-Zytokinrezeptoren besitzen und Homologien zu der gp130-Untereinheit des IL-6-Rezeptors aufweisen. Die p35-Untereinheit bindet an die IL-12Rβ2-Kette, während die p40-Untereinheit die IL-12Rβ1-Kette besetzt [39].



Abb.2: Struktur von IL-12 und IL-23, ihre Rezeptoren und Hauptsignalwege

Der IL-12R ist auf aktivierten T-Zellen und NK-Zellen, aber auch auf dendritischen Zellen zu finden [39]. Eine unabhängige Expression von IL-12R $\beta$ 1 ist bei mehreren Zelltypen festzustellen, im Falle von IL-12R $\beta$ 2 jedoch nur bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen [40]. Eine Regulation der Expression von IL-12R $\beta$ 2 erfolgt über IL-10, Tumor growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )[41] und Nitrogen Oxid (NO) [42, 43]. Die Bindung beider Untereinheiten des IL-12 an den IL-12R führt zu einer Phosphorylierung der Janus Kinasen JAK2 und TYK2 [44] und der "Signal transducer and activator of transcription" (STAT)-1, -3, -4 und -5. Die Effekte der Rezeptorbindung sind hauptsächlich auf die Phosphorylierung von STAT4 zurückzuführen [44-47], die zur Transkription und Expression von IFN- $\gamma$  und des für Th1-Zellen charakteristischen Transkriptionsfaktors T-bet [48] führt, der wiederum die Expression des IL-12R steigert [49].

IL-12 wird von Monozyten, Makrophagen, DC, neutrophilen Granulozyten und B-Zellen sezerniert. Nach TLR-Bindung bedarf die IL-12-Synthese keiner zusätzlichen Stimulation durch T-Zellen [50]; findet jedoch eine Bindung parasitärer Antigene an den TCR statt, bedarf es eines Kostimulus durch CD40L der T-Zellen, um die IL-12 Produktion in Gang zu setzen [51]. Über MyD88, IRAK und TRAF6 [52] werden zum einen MAP-Kinasen aktiviert, die über JNK AP-1 beeinflussen. Zum anderen wird über cRel NF $\kappa$ B aktiviert und über einen bislang unbekannten Weg, auf den aber TLR-2 und -4 einwirken sollen, C/EBP [53-55]. Diese Transkriptionsfaktoren erhöhen die p40-Transkriptionsrate. Die IRF (Interferon regulatory factor)-Familie, zu der IRF-8 gehört, bildet einen ETS-Transkriptionskomplex, der ebenfalls an die Promoterregion bindet und so die IL-12p40-Transkription steigert. Die Transkription von IRF-8 wird von IFN- $\gamma$  stimuliert [56-58].

Die negative Regulation der IL-12p35/p40-Ausschüttung erfolgt auf unterschiedlichen Wegen. IL-10 [59], IL-4 [60] und TGF- $\beta$  [61], aber auch Th1-assoziierte Zytokine wie Typ-1-Interferone [62] und TNF [63] blockieren IL-12. IL-10 blockiert sowohl die p35- als auch die p40-Transkription [59, 64].

Eine weitere Regulation erfährt IL-12 über die "supressors of cytokine signalling" (SOCS)-Familie. SOCS-1 und SOCS-3 blockieren IL-12-Signalwege und führen zu einer verminderten IFN-γ-Produktion [65, 66].

Eine zentrale Rolle nimmt IL-12 bei der Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen in reife Th1-Effektor-Zellen sowie bei der Aktivierung von NK und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ein [67-69].

In murinen Modellen wurde die essentielle Bedeutung von IL-12 bei der Abwehr von intrazellulären Krankheitserregern demonstriert. Die Abwesenheit oder Blockade von IL-12 führt zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Infektionen mit *Leishmania major* [70], *L. donovani* [71], Mykobakterien [72, 73] und *T. gondii* [6]. Auch im Menschen bedingen Defekte im IL-12-Signalweg schwere Infektionen mit intrazellulären Erregern wie Salmonellen und Mykobakterien [74-76]. In Mausmodellen verschiedener intrazellulärer Infektionserreger wurde darüber hinaus eine differentielle Bedeutung der p35- und p40-Untereinheit beschrieben. So zeigte sich bei p35<sup>-/-</sup> Mäusen im Gegensatz zu Mäusen, denen auch die p40-Untereinheit des IL-12 fehlt, eine erhöhte Resistenz gegen Mykobakterien und die Infektion mit *M. bovis* wird auch bei Abwesenheit von p40 kontrolliert [36, 77-80]. Dabei zeigten sich in IL-12p35p40<sup>-/-</sup> Mäusen erhöhte Proliferationsraten des Erregers sowie eine verminderte IFN-γ-Produktion. Eine niedrig dosierte Infektion mit *Salmonella spp.* resultierte in erhöhter Sterblichkeit von p40<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu p35<sup>-/-</sup> Mäusen, die IFN-γ-

und TNF- $\alpha$ -Spiegel erniedrigt. Dieses Bild zeigte sich jedoch nur in der niedrig dosierten Infektion, bei einer hochdosierten Infektion verstrichen die Unterschiede [81]. Keinerlei Unterschiede zwischen p35<sup>-/-</sup> und p40<sup>-/-</sup>-Mäusen ergaben sich bei Infektionen mit *L. major* [82] und *Trypanosoma cruzi* [68] (Tab. 1).

Liebermann et al. untersuchten 2004 den Einfluss der einzelnen IL-12-Untereinheiten auf die intraperitoneale Infektion mit der attenuierten, temperatursensitiven *T. gondii*-Mutante ts4. In diesem Modell zeigten  $p35^{-/-}$  Mäuse gegenüber  $p40^{-/-}$  Mäusen einen deutlichen Überlebensvorteil und eine geringere Parasitenlast, die IFN- $\gamma$  Spiegel waren identisch [83].

Suszeptibilität*				
Pathogen	IL-12p35 <sup>-/-</sup>	IL-12p40 <sup>-/-</sup>	IL-23p19-/-	Referenzen
Mycobacterium tuberculosis	S	SS	-	Hölscher et al,2001; Khader et al, 2006
Mycobacterium bovis	(S)	S	-	Cooper et al, 2002; Chackerian et al, 2006
Mycobacterium avium	S	SS	-	Ehlers et al, 2005
Salmonella Enteritidis (high dose) <sup>2</sup>	=	=	n.d.	Lehmann et al, 2001
Salmonella Enteritidis (low dose)	S	SS	n.d.	
Cryptococcus neoformans	S	SS	S	Decken et al, 2001; Kleinschek et al, 2006
Francisella tularensis	S	SS	n.d.	Elkins et al, 2002
Klebsiella pneumoniae	S	SS	S	Happel et al, 2005
Leishmania major	=	=	n.d.	Park et al, 2002
Trypanosoma cruzi	=	=	n.d.	Mueller et al, 2002
Toxoplasma gondii i.p. (low dose)	S	SS	-	Lieberman et al, 2004
Toxoplasma gondii p.o. (low dose)	=	=	n.d.	(vorliegende Arbeit)

\*, = gleich, S erhöhte Suszeptibilitätt, SS stark erhöhte Suszeptibilität , - nicht suszeptibel, n.d. nicht untersucht)

# Tab.1: Suszeptibilität von IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup> und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen gegenüber verschiedenen Infektionserregern

Neben der beschriebenen Rolle bei protektiven Immunantworten spielt IL-12 eine wichtige Rolle bei überschießenden Immunantworten, zu denen durch Immunpathologie gekennzeichnete Erkrankungen des Menschen wie Morbus Crohn und Rheumatoide Arthritis (RA) zählen. Eine Behandlung mit anti-IL-12p40-Antikörpern brachte bei M. Crohn-Patienten eine Besserung der akuten Symptomatik [84]. In einem Mausmodell der RA und der Collagen-induzierten Arthritis (CIA) wiesen IL-12p35/p40<sup>-/-</sup> Mäuse eine weniger ausgeprägte Erkrankung auf [85]. Im Falle der Experimentellen Autoimmunen Enzephalitis (EAE), einem Mausmodell für Multiple Sklerose, verschlimmerte eine Gabe von rekombinanten IL-12p40 die Ausprägung der Entzündungsreaktion [85, 86].

### 1.2.2.2 IL-23

Vor wenigen Jahren wurde das Interleukin-23 identifiziert, in welchem ein 19 kd schweres Protein (p19) ein Heterodimer mit IL-12p40 bildet [38]. Sezerniert wird p19 vor allem von aktivierten DCs und phagozytierenden Zellen. IL-23 bindet an seinen Rezeptor, der dem IL-12 entsprechend aus zwei Ketten besteht: p40 bindet an die IL-12Rβ1-Kette, IL-23p19 an eine IL-23R genannte Kette. Die humanen Rezeptorketten werden vornehmlich auf aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen, NK-Zellen, aber auch zu einem geringen Grad auf Monozyten, Makrophagen und DCs exprimiert. Im murinen Organismus findet sich der Rezeptor auf aktivierten T-Zellen, aus Knochenmark generierten DCs sowie aktivierten Makrophagen [67, 69, 87, 88].

Die Bindung von IL-23 an den IL-12Rβ1/IL-23R-Komplex bewirkt eine Aktivierung von JAK-Kinasen, die den IL-23R phosphorylieren, so dass STATs (STAT 1, 3, 4 und 5) binden und ebenfalls phosphoryliert werden können. Über die Regulation der IL-23p19-Expression ist bislang wenig bekannt. Ebenso wie IL-12 wird die Transkription über Aktivierung von NFκB durch c-Rel beeinflußt [89-91]. Auch IRF-5 führt sowohl zur IL-12- als auch zur IL-23-Expression [92]. Bei Abwesenheit von IRF-1 und -8, die die IL-12-Expression stimulieren, scheint die IL-23-Synthese gesteigert [93]. Der TLR-2-Ligand PGN ist ein potenterer Induktor der IL-23-Expression als das TLR-4-bindende LPS [91, 94]. Des weiteren scheinen C-Typ Lektine bevorzugt zur Synthese von IL-23 zu führen [95], ebenso wie PGE2 und ATP [96, 97].

IL-23 spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr der Infektionen mit *Cryptococcus neoformans* und *Klebsiella pneumoniae*. Unter einer Infektion starben Mäuse mit einer Deletion des IL-23p19 eher als der Wildtyp und zeigten eine höhere Erregerlast [98, 99]. Bei einer intraperitonealen Infektion mit *T. gondii* bewirkte die Behandlung von IL-12p40<sup>-/-</sup> Mäusen mit rekombinantem IL-23 einen Überlebensvorteil gegenüber den unbehandelten Kontrollmäusen, die an ungehinderter Parasitenreplikation verstarben. IL-23p19<sup>-/-</sup> Tiere überlebten die Infektion jedoch genau wie der Wildtyp [83].

IL-23 und nicht IL-12 scheint die zentrale Rolle in der Pathogenese diverser Autoimmunerkrankungen wie EAE [100, 101], CIA [101] und experimenteller Colitis [102, 103] zu spielen. Die genetische Deletion von IL-23p19, nicht aber von IL-12p35, schützt Mäuse vor EAE und CIA. Im Rahmen der *Helicobacter*-induzierten T-Zell-abhängigen Colitis zeigten Mäuse mit einer p19-Defizienz eine leichtere Form der Erkrankung, während IL-12p35<sup>-/-</sup> Mäuse eine ausgeprägte Pathologie entwickelten [104, 105]. IL-10<sup>-/-</sup> Mäuse, nicht aber IL-10/p19-Doppel-Knockout-Mäuse entwickelten eine spontane IBD [103].

Als grundlegend für die Erregerabwehr und Autoimmunerkrankungen wird derzeit die von IL-23 beeinflusste IL-17-Produktion postuliert. IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen im Vergleich zu EAEsuszeptiblen Wildtyp-Mäusen gleiche Mengen an IFN-γ-produzierenden Zellen auf; die Menge IL-17-produzierender T-Zellen im ZNS war in den p19-defizienten Mäusen jedoch im Vergleich zu Kontrollmäusen reduziert [101, 106]. Auch führt die Stimulation von aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen in Anwesenheit von IL-23 zur Ausschüttung von IL-17 [101, 106]. IL-17 wirkt als proinflammatorisches Zytokin, welches im Stroma, Epithel und Endothel für eine Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-8, CXCL-1, TNF und G-CSF und somit für den Einstrom neutrophiler Granulozyten sorgt [107-109]. IL-17R-defiziente Mäuse sterben nach Infektion mit 15 Zysten des 76K-Stammes, während der Wildtyp zu 100% überlebt. Die Parasitenzahlen der IL17R<sup>-/-</sup> Mäuse sind im Vergleich zum Wildtyp erhöht, während sich der Einstrom von nGZ vermindert. Erhöht man die Infektionsdosis, sinkt die Überlebensrate des Wildtyps, der Zeichen einer Immunpathologie im Ileum entwickelt, während sich in der IL-17R<sup>-/-</sup> Maus nur geringe histopathologische Veränderungen entwickeln [109].

### 1.2.2.3 IL-18

Interleukin-18 gehört zur IL-1-Familie und wurde initial als Interferon-induzierender Faktor (IGIF) beschrieben [110]. Eine Vielzahl von Zellen wie Makrophagen, dendritische Zellen, Tund B-Zellen, Osteoblasten, Keratinozyten, Astrozyten und Mikroglia-Zellen sind in der Lage, IL-18 auszuschütten [111, 112]. Neben diesen Zellen wurde auch im Epithel von Darm und Lunge IL-18 nachgewiesen [113]. Die IL-18-Synthese erfolgt über ein Vorläufermolekül, welches durch Caspase-1 (ICE/IL-1 $\beta$  converting enzyme) in seine aktive Form umgewandelt wird [114, 115].

Der IL-18-Rezeptor besteht aus zwei Ketten, IL-18R $\alpha$  und IL-18R $\beta$ , die zur IL-1-Rezeptor-Superfamilie gehören. Die Bindung von IL-18R $\alpha$  an seinen Liganden bewirkt bei IL-18R $\beta$ eine Konformationsänderung und bedingt somit die Signalweiterleitung [116, 117]. IL-18R $\alpha$ wird vor allem auf Th-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen exprimiert, aber auch auf B-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Epithelzellen [118-120]. Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt über die sogenannte Toll-IL-1-Region und induziert NFκB [121, 122]. In IL-18-stimulierten Zellen wird auch die MAPK p38 aktiviert [123].

Die Sekretion von IL-18 kann über die Rezeptorexpression und über Modulationen des IL-18-Synthesewegs beeinflusst werden [114, 115]. Die Rezeptorexpression wird durch IL-12 und IL-2 erhöht, durch IL-4 jedoch verringert [118, 124-127]. Die Aktivierung der Caspase 3 inaktiviert IL-18 [128]. Beim Menschen bindet IL-1F7 an IL-18R $\alpha$ , allerdings ohne Bildung eines Signalkomplexes mit IL-18R $\beta$  [129]. Ebenfalls bedeutsam für die Regulation von IL-18 ist das IL-18-bindende Protein (IL-18bp) [130]. Die biologische Aktivität von IL-18 wird durch die hochaffine Bindung an IL-18bp inhibiert [130]. In der Maus wird IL-18bp vor allem in der Milz und intestinalen Gewebe exprimiert [131]. Im IL-18bp-Promoter konnten zwei von IFN- $\gamma$ -beeinflußte Elemente identifiziert werden [132], was auf eine Regulation der Expression durch IFN- $\gamma$  und somit eine Selbstregulation hinweist [133].

Die Hauptfunktion von IL-18 liegt in der mit IL-12-synergistischen Induktion der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung durch T-, B- und NK-Zellen [134]. Zusätzlich induziert es die Synthese von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ . IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 in verschiedenen Zellinien [135]. IL-18 bewirkt des weiteren eine verstärkte Expression der IL-12-Rezeptorkette  $\beta$ 2 auf T-Zellen [113, 136], wobei umgekehrt aber auch IL-12 die Expression des IL-18-R auf T- und B-Zellen steigert [118]. Ohne IL-12 kommt es bei naiven T-Zellen unter IL-18-Einfluß zu einer Differenzierung zu Th2-Zellen [137, 138].

IL-18 spielt wie IL-12 eine Rolle in der Abwehr intrazellulärer Bakterien (Mykobakterien [139], *Salmonella Typhimurium* [140, 141]), Viren (Herpes simplex [142], Vaccinia [143]), Pilzen (*Cryptococcus neoformans* [144], Candida [145]) und Protozoen (*T. cruzi* [146], *L. major* [147]). Auch in der Abwehr von Infektionen mit extrazellulären Erregern wie Yersinia spp. [148], *Pseudomonas aeruginosa* [149] und *Streptococcus spp*. [150] sowie ein Schutz vor LPS-induziertem Schock [151] wurde mit IL-18 in Verbindung gebracht. Eine Überproduktion von IL-18 und IL-12 wurde bei Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis [152], systemischen Lupus erythematosus [153] und entzündlichen Darmerkrankungen [154-156] beschrieben.

In Kolitis-Modellen der Maus und Ratte war der Schweregrad der Erkrankung mit dem IL-18-Spiegel in Gewebe und Serum positiv korreliert [113, 157-160]. Die Gabe von anti-IL-18 verminderte den Schweregrad der Erkrankung, ebenso eine Gabe von IL-18bp. Caspase-1<sup>-/-</sup> Mäuse sind resistent gegenüber der experimentellen Colitis [161]. Bei M. Crohn-Patienten wurde eine erhöhte IL-18 Ausschüttung im Serum und entzündlichen Darmgewebe nachgewiesen [154, 162-165]. Wir konnten zeigen, dass IL-18<sup>-/-</sup> Mäuse keine *T. gondii*- induzierte Dünndarmpathologie entwickeln und einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber an Darmpathologie versterbenden Kontrolltieren haben. Auch ist die antiparasitäre Abwehr in den IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nicht signifikant gestört [7].

### 1.3 Mausmodelle der Infektion mit Toxoplasma gondii

### 1.3.1 Infektion mit 10 Zysten

Nach einer oralen Infektion mit 10 Zysten des ME49- *T. gondii*-Stammes entwickelt sich eine protektive Th1-Immunantwort. Antigenpräsentierende Zellen produzieren IL-12 und IL-18 und werden durch IFN- $\gamma$  zur Synthese von u.a. TNF- $\alpha$  und NO stimuliert, wodurch das Erregerwachstum limitiert wird. Eine Hauptquelle für IFN- $\gamma$  stellen neben den T-Zellen auch NK-Zellen dar. Eine weitere entscheidende Rolle spielen CD8<sup>+</sup> (zytotoxische) T-Zellen, die proliferieren, ebenfalls IFN- $\gamma$  sezernieren und mit *T. gondii* infizierte Zellen abtöten [2, 4]. Der Erreger unterläuft jedoch gleichzeitig die Abwehrmechanismen und nutzt die intrazelluläre Lokalisation vermutlich sogar als "trojanisches Pferd", um im gesamten Körper zu disseminieren und schließlich in Nerven- und Muskelzellen zu gelangen [166]. Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Infektion und der beteiligten Abwehrmechanismen. Bei einer Störung der Th1-Immunantwort kommt es zu ungehinderter Parasitenreplikation. So sterben Mäuse mit einer Defizienz im IL-12p40-Gen und weisen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Parasitenlast bei vermindertem IFN- $\gamma$ -Spiegel auf [6].



Abb. 3: Schematische Darstellung der protektiven Th1-Immunantwort nach oraler Infektion mit *Toxoplasma gondii* 

### 1.3.2 Infektion mit 100 Zysten T. gondii

Im Gegensatz zum Verlauf der oralen Infektion mit 10 Zysten kommt es nach oraler Infektion mit 100 Zysten bei suszeptiblen Mäusen (H2<sup>b</sup>-Haplotyp) [167] zu einer überschießenden Th1-Immunantwort mit letalem Ausgang. Abb. 4 zeigt eine schematische Übersicht der Immunpathogenese. Der Parasit durchdringt, wie bei der niedrig dosierten Infektion, die Darmbarriere und infiziert vor allem Makrophagen und dendritische Zellen der Lamina propria. Diese sezernieren IL-12 und IL-18 und es kommt zur Differenzierung und klonalen Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die wiederum IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  produzieren. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Makrophagen, die TNF- $\alpha$  und NO ausschütten. Man geht davon aus, dass eine Barrierestörung der Darmschleimhaut entsteht, die eine Vermehrung und Translokation kommensaler Bakterien zur Folge hat. Der Kontakt mit bakteriellen Antigenen wie v.a. LPS führt zu einer überschießenden T-Zellantwort, die unter Beteiligung von Matrixmetalloproteinasen (MMP) in einer Zerstörung der Architektur des terminalen Ileums (Pan-Ileitis) resultiert. TGF-β sowie IL-10 wirken dieser überschießenden Immunantwort entgegen [2]. Weiterhin bedeutend sind NK-Zellen, die durch eigene IFN-γ-Ausschüttung die Immunpathologie unterstützen.



Abb. 4: Schematische Darstellung der Th1-Immunpathologie nach oraler Infektion von suszeptiblen Mäusen mit 100 Zysten *T. gondii* 

## 1.4 Ziele

Ziel der Arbeit war es, die Rolle von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen in der Immunantwort auf *T. gondii* zu untersuchen.

Dafür wurde zum einen die Infektion mit 10 Zysten genutzt, die in C57BL/6-Mäusen eine protektive Th1-Immunantwort auslöst. In IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup> und IRF-8<sup>-/-</sup> Mäusen wurde der Einfluss von Untereinheiten des IL-12 untersucht. Dabei wurde auch die Sekretion des kürzlich entdeckten IL-23, das die p40-Untereinheit mit IL-12 gemein hat, untersucht.

Da IL-18 eine synergistische Wirkung mit IL-12 zugesprochen wird, die Rolle dieses Zytokins in der Infektion mit 10 Zysten jedoch nicht bekannt ist, wurde in IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen die Rolle von IL-18 in der protektiven Immunantwort untersucht.

Der zweite Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Rolle von IL-23 in der Th1-Immunpathologie nach Infektion mit 100 Zysten. Außerdem wurde mithilfe von Knochenmarkschimären aus Wildtyp- und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen untersucht, welche Zellen das für die Immunpathologie essentielle IL-18 sezernieren.

# 2. Material

# 2.1 Tiere und Parasiten

### **2.1.1** Tiere

Die Mäuse wurden in der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité in Käfigen bis zu 10 Tieren gehalten. Die Tiere hatten sterilisiertes Futter sowie Wasser ad libitum zur Verfügung. Eine Genehmigung zur Durchführung der Versuchsvorhaben lag vom Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit vor (Genehmigungsnummern 0035/98, 0114/03, 0258/04, 0256/04).

### Mausstämme

Stamm	Herkunft
C57BL/6	FEM, Berlin
IL-18 <sup>-/-</sup> C57BL/6	K. Takeda, Department of Host Defense,
	Research Institute for Microbial Diseases,
	Osaka University, Japan
IL-12p35 <sup>-/-</sup> C57BL/6	H. Mossmann, MPI, Freiburg
IL-12p40 <sup>-/-</sup> C57BL/6	I. Förster, Institut für Mikrobiologie, TU
	München
IL-12p35/p40 <sup>-/-</sup> C57BL/6	H. Mossmann, MPI, Freiburg
IL-23p19 <sup>-/-</sup> C57BL/6	C. Hölscher, Borstel
NMRI	FEM, Berlin

### 2.1.2 Parasiten

Toxoplasma gondii ME49

Prof. J. Remington, Stanford University, USA

# 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Substanz
2-Mercaptoethanol
Acrylamid
Agarose
Ammoniumchlorid
Aqua dest.
Brefeldin A
Bromphenolblau
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )
Chloralhydrat
Concanavalin A
Coomassie BBR-250
DAB
Diethylpyrocarbonat
Dinatriumhydrogencarbonat
Dinatriumhydrogenphosphat
Eisessig
Entellan
Eosin
Essigsäure
Ethanol
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Ethidiumbromid
Formaldehyd (37%)
Gelatine
Hämatoxilin

### Hersteller/Zulieferer

Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe Roth, Karlsruhe Inst.f..Mikrobiologie Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldirch, Steinheim Promega GmbH, Mannheim Sigma- Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt

Ionomycin Isofluran (Forene<sup>®</sup>) Isopropanol Kalialaun (KAI( $SO_4$ )2x12H<sub>2</sub>O) Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) Methanol NaCl Natriumdihydrogencarbonat Natrium-Dodecyl Sulfat Natriumjodat Neomycin PAP Penicillin/Streptomycin Polymycin A (PMA) Saponin Schwefelsäure (H2SO4) Triton X-100 TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin) Trypanblau Tween 20 Wasserstoffperoxid (30%) Wasser, RNase-frei (DEPC)

Xylene Cyanol FF Xylol Zinksulfat (ZnSO<sub>4</sub>) Sigma-Aldrich, Steinheim Abbott, Illinois, USA Sigma-Aldrich Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Merck, Darmstadt Bio-rad, München Riedel-de Haen AG, Seelze Charité Hausapotheke DAKO, Hamburg Biochrom AG, Berlin Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Sigma-Aldrich, Steinheim Biochrom AG, Berlin Sigma-Aldrich, Steinheim Merck, Darmstadt 0,1% Diethylpyrocarbonat in Aqua dest, 12-16Std RT, dann autoklavieren Sigma-Aldrich, Steinheim J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA Sigma-Aldrich, Steinheim

# 2.3 Geräte, Plastikware und kommerzielle "Kits"

### 2.3.1 Geräte und Materialien

Gerätebezeichnung
Brutschrank

Hersteller Heraeus, Hanau

Cäsiumquelle	MPI, Berlin
Eksikkator:	
- Diaphragma Membranpumpe	Vacuubrand, Wertheim
- Glocke	Vacuubrand, Wertheim
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Färbeküvetten	VWR, Darmstadt
Färbeschiffchen	VWR, Darmstadt
Gefrierschrank –20°C	Liebherr, Rostock
Gefrierschrank –70°C	Sanyo-Fisher Sales, München
Schraubgläser	VWR, Darmstadt
Knopfkanüle	Roth, Karlsruhe
Kühlplatte	Microm, Walldorf
Light Cycler	Roche, Mannheim
Metallsieb, grob	Roth, Karlsruhe
Mikroskop Axiostar	Zeiss, Göttingen
Mörser	VWR, Darmstadt
Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Multistep Pipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten versch. Größen	Eppendorf, Hamburg
Pistill	VWR, Darmstadt
Plattenphotometer	Tecan Spectra, Crailsheim
Plattenzentrifuge	Heraeus, Hanau
Präparierbesteck	Aesculap/Braun, Melsungen
Rotationsmikrotom HM355	Microm, Walldorf
Rotor Stator, ART Miccra D-1	Roth, Karlsruhe
Schüttler	Braun, Melsungen
Sterile Werkbank,	
Lamina Air Flow Class 100	Gelman; Michigan, USA
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert, Heilbronn

### Zentrifuge, groß

### Heraeus, Hanau

### 2.3.2 Plastikwaren

FACS Tubes		Falcon, BD Biosciences, Heidelberg
Histologie-Kassetten		Simport, Bernard-Pilon
		Beloeil, QC, Canada
Kanülen 26G, 22G		BD Biosciences, Heidelberg
Küvette für Photometer		Eppendorf; Hamburg
Light Cycler Kapillaren		Roche, Mannheim
Mikrotiterplatte, beschichtet für EL	ISA	BD Biosciences, Heidelberg
Mikrotiterplatte, unbeschichtet, Ru	ndboden	Nunc, Wiesbaden
Fla	ichboden	Nunc, Wiesbaden
Parafilm		Pecheney Plastic Packaging, Chicago, IL,
		USA
Petrischalen		Nunc, Wiesbaden
Pipetten 5ml, 10ml, 25ml		Falcon, BD Biosciences, Heidelberg
Pipettensitzen versch. Größen		Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 0,5/1,5/2ml		Eppendorf, Hamburg
Röhrchen 15/50ml		Sarstedt, Sarstedt
Spritzen 1/5/10ml		Braun, Melsungen
Zellsiebe (70µm)		BD Biosciences, Heidelberg

# 2.3.3 Kommerzielle "Kits"

### Kitbezeichnung

BD OptEIA Mouse IFN-γ ELISA Set BD OptEIA Mouse TNF-α ELISA Set BD OptEIA Mouse IL-12p40 ELISA Set BD OptEIA Mouse IL-18 ELISA Set BD OptEIA Mouse IL-6 ELISA Set Quantikine Immunoassay mouse IL-17

### Hersteller

BD Biosciences, Heidelberg R&D Systems, Wiesbaden Rneasy Mini-Kit SuperScript<sup>TM</sup> III Platinum One Step Quantitative PCR System LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes Quiagen, Hilden

Invitrogen, Karlsruhe

Roche, Mannheim

# 2.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Agarosegel 2%ig	2%Agarose, TBE-Puffer 0,5%,
	Ethidiumbromid
ELISA Blocking Puffer	10% FCS in PBS
ELISA Coating Puffer	pH 6,5: 0,2M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 9,5: 0,1 M NaHCO <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
ELISA Substratpuffer	0,2M NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1M Zitronensäure
ELISA Waschpuffer	0,05% Tween 20/PBS
Ladepuffer für die Elektrophorese	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene
	Cyanol, 30% Glycerin
Eosin-Lsg.	Eosin, Eisessig, Aqua dest.
FACS Fix	3,7% Formaldehydlösung
FACS Wash	5% FCS in PBS
FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg
Hämatoxilin-Lösung	Hämatoxilin, Natriumjodat, Kalialaun
Hypochlorit	BD Biosciences, Heidelberg
Lysis Puffer für Erythrozyten	RPMi: Aqua dest. = 1:2
Lysis Puffer für DNA-Isolierung	100mM Tris-Hcl pH 8-8,5, 5mM EDTA
	pH 8, 0,2% SDS, 200mM NaCl,
	Proteinase K
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat buffered Saline (PBS)	Biochrom AG, Berlin
Taq-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
TBE(Tris-Borat-EDTA)-Puffer (10x)	Bio-Rad, München
TBE-Puffer 0,5%.	0,5% TBE-Puffer in dest.H <sub>2</sub> O

Tris-HClBio-Rad, MünchenTrypanblau 0,5%Trypanblau 0,5% in physiologischerKochsalzlösungKochsalzlösungWestern-Blot PufferTris, Glycerol, SDS, Bromphenolblau

# 2.5 Oligonukleotidprimer und -sonden

<u>Primer</u>	Sequenz 5'- 3'	Orientierung
HPRT	gTTggATACAggCCAgACTTTgT	sense
	CACAggACTAgAACACCTgC	antisense
Interleukin 23		
p19	CCAgCgggACATATgAATCTAC	sense
	TgCAAgCAgAACTggCTgTT	antisense
Toxoplasma Cry	ptic Gene	
TOX-9	ggAgAgATATCAggACTgTAg	sense
TOX-10as	gCgTCgTCTCgTCTAgATCg	antisense
MMP-9		
MMP-9 S	gCTTCAgAAgCAgCTCTCC	sense
MMP-9 A	gTTTTggATCCAgTATgTg	antisense
MMP-2		
MMP-2 S	gCAgTgCAATACCTgAACACTTTCTA	sense
MMP-2 A	TgCgggggAAgAAgTTgTAgT	antisense
TIMP-1		
TIMP-1 U	CCTTCTgCAACTCggACCTg	sense
TIMP-1 A	gCTTTCCATgACTggggTgTA	antisense
TIMP-3		
TIMP-3 S	CCAggATgCCTTCTgCAACTC	sense
TIMP-3 L	gCCCTgTCAgCAggTACTggTAT	antisense
x-Chromosom		
NDS2 (x)	TCCggAAAgCAgCCATTggAgA	sense
NDS1 (x)	ATgCTTggCCAgTgTACATAg	antisense

# y-Chromosom

SRY3 (y)	CTCTgTgTAggATCTTCAATC	sense
SRY1 (y)	gTgAgAggCACAAgTTggC	antisense

# <u>Sonden</u>

Name	Sequenz 5'- 3'
HPRT	
FL-Sonde	AAAgCCTAAgATgAgCgCAAgTTgA-FL
LC Red 705-Sonde	LC-TCTgCAAATACgAggAgTCCTgTTg-PH
Interleukin 23	
p19	
FL-Sonde (FL)	CCCgTATCCAgTgTgAAgATggTT-FL
LC Red640-Sonde (	LC) LC-TgACCCACAAggACTCAAggACAA-PH
Toxoplasma Crypti	ic gene
TOXO-HP-1 FL	gAgTCggAgAgggAgAAgATgTT-FAM
TOX-HP-2 LC	RED-640-CCggCTTggCTgCTTTTCCTg-PH
MMP-9	
MMP-9 FL	CgAATggCCTTTAgTgTCTggCT—FL
MMP-9 LC	LC Red640-TCCAgCTCACCAgTCTggggCA—PH
MMP-2	
MMP-2 FL	TCCgCATggTCTCgATggTgTTCTg—FL
MMP-2 LC	LC Red640-TCAAggTCACCTgTCTggggCAgCC—PH
TIMP-1	
TIMP-1 FL	AgATgCTAAAAggATTCAAggCTgTgg—FL
TIMP-1 LC	LC Red640-AAATgCCgCAgATATCCggTACgC—PH
TIMP-3	
TIMP-3 FL	CCCCTCCTTCACCAgCTTCTTTCCC—FL
TIMP-3 LC	LC Red640-CCACTTTggCCCggATCACgATgTPH

Alle Primer und Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin hergestellt.

### 2.6 Enzyme, Antikörper

### Produktbezeichnung

Enzyme: Collagenase D Collagenase/Dispase DNAse 1 dNTPs Proteinase K Streptavivin-Peroxidase (HRP) Taq Polymerase

### **ELISA-Antikörper:**

ELISA: Primärantikörper		
Purified rat-anti-mouse IL-4		
Purified rat-anti-mouse IL-5		
ELISA: Sekundär-AK		
Biotin rat-anti-mouse IL-4		
Biotin rat-anti-mouse IL-5		

### Immunhistologie-Antikörper

*T. gondii*-spez. Hyperimmunserum (Kaninchen) [7]

Biotin Schwein-anti-Kaninchen

### Durchflußzytometrie-Antikörper:

rat-anti-mouse CD4 APC rat-anti-mouse CD8α PE hamster-anti-mouse CD3 FITC rat-anti-mouse IFN-γ FITC rat-anti-mouse IL-17 PE rat IgG1 Isotype FITC rat IgG2a Isotype PE

### Hersteller

Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, Steinheim Roche, Mannheim Roth, Karlsruhe Quiagen, Hilden BD Biosciences, Heidelberg Invitrogen, Karlsruhe

BD Biosciences, Heidelberg BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg BD Biosciences, Heidelberg

Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité, Berlin DAKO, Hamburg

BD Biosciences, Heidelberg rat IgG2a Isotype APC hamster IgG1 Isotype FITC BD Biosciences, Heidelberg BD Biosciences, Heidelberg

# 2.7 Nährmedien und Seren

## Produktbezeichnung

Bovines Serum Albumin DMEM Fetales Kälber Serum RPMI (+Glutamax, +Hepes) Schweineserum

### Hersteller

Sigma-Aldrich, Steinheim GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe Biochrom AG, Berlin GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe DAKO, Hamburg

# 2.8 Sonstiges

Elektrophorese-Marker:	
Puc19/MSPI	Roth, Karlsruhe
Flüssigstickstoff	Fa. Messer, Griessheim

# 2.9 Software und Datenbanken

Acrobat Reader
Cellquest
Easy Measure (Version 1.0.30)
Easy Base (Version 1.0.30)
GeneAmp PCR System 2700
Mac OS 10 Software
LightCycler Software
Serion Evaluate

Adobe Systems GmbH, München BD Biosciences, Heidelberg Inteq, London, UK Inteq, London, UK Applied Biosystems, Darmstadt Apple, Cupertino, USA Roche, Mannheim Virion, Rüschlikon, Schweiz

# 3. Methoden

### 3.1 Infektion der Tiere mit T. gondii

Die Zysten des *T. gondii* ME49 Stammes wurden aus NMRI-Mäusen gewonnen, die 2-3 Monate vorher mit 10 Zysten intraperitoneal infiziert worden waren. Nach Tötung durch cervicale Dislokation wurde das Hirn entnommen und in 1 ml PBS mit Mörser und Pistill homogenisiert. Die Zahl der Zysten im Homogenisat wurde mikroskopisch bestimmt, mit PBS auf 10 bzw. 100 Zysten pro 0,3 ml eingestellt und den Mäusen in einer gebogenen Knopfkanüle oral verabreicht [168].

### 3.2 Tötung der Tiere und Organentnahme

Zu angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse mit Isofluran betäubt. Vollblut wurde mittels Herzpunktion gewonnen. Nach Tötung durch cervikale Dislokation wurde die Bauchhöhle eröffnet und Milz, mesenteriale Lymphknoten, Leber und Dünndarm entnommen. Nach Eröffnung des Thorax wurden Lunge und Herz entnommen.

### 3.3 Histologische Methoden

Nach Fixierung der Organe (Darm, Leber, Lunge, Herz) in Histologiekassetten über Nacht in 4% iger Formaldehydlösung wurden die Organe entwässert und anschließend in Paraffin gegossen (Institut für Pathologie, CBF, Berlin, Charité). Die Paraffinblöcke wurden auf einer Kühlplatte ausgehärtet und in Histologiekassetten eingebettet. Am Mikrotom wurden Schnitte mit einer Dicke von 4-6 µm angefertigt, auf Objektträger aufgenommen und bei 56° C über Nacht getrocknet. Die Schnitte wurden mit Hämatoxilin/Eosin (H&E) und der Immunperoxidase-Färbung gefärbt.

### 3.3.1 Färbung mit Hämatoxilin und Eosin

Die Hämatoxilin/Eosinfärbung wurde nach Entparaffinisieren in Xylol, Entwässern in einer absteigenden Alkohollösungsreihe (100%iges Isopropanol, 96%iges, 80%iges und schließlich 70%iges Ethanol) und anschließendem Waschen in destilliertem Wasser durchgeführt. Die Schnitte wurden 5 min in Hämatoxilin gefärbt, danach in 1%ige HCL getaucht, kurz in destilliertem Wasser und anschließend 5 min in Leitungswasser gespült. Nach erneutem Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte 30-60 sek mit Eosin gegengefärbt. Zum Abschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe bewässert, beginnend mit 70%igem, dann 80%igem, dann 96%igem Ethanol. Die Färbung wurde mit 100%igem Isopropanol und Xylol beendet. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mit Entellan.

#### 3.3.2 Immunhistochemische Detektion von T. gondii

Die immunhistochemische Detektion von T. gondii wurde mittels einer polyklonalen Immunperoxidase-Färbung durchgeführt. Nach Entparaffinisieren und Entwässern der Paraffinschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (siehe 3.3.1) wurden endogene Peroxidasen durch Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS blockiert. Nach einem Waschschritt mit PBS wurde eine Blockade mit Schweineserum vorgenommen. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde der Primärantikörper (Hyperimmunserum eines mit T. gondii infizierten Kaninchens [7] aufgetragen und über Nacht bei 4° C inkubiert. Nach einem Waschschritt in PBS wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (Schwein-Anti-Kaninchen) aufgetragen, 30 min bei RT inkubiert und nach einem weiteren Waschschritt der Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP)-Komplex hinzugegeben. Nach dem Spülen der Schnitte mit PBS wurde DAB-Lösung (1 DAB-Tablette in 5 ml destillierten Wasser unter Lichtschutz lösen, davon 5 ml mit 5 µl 30% igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mischen), aufgetragen und nach mikroskopischer Kontrolle des Färbeergebnisses nach spätestens 5 min mit PBS abgewaschen und in destilliertem Wasser gespült. Durch 5 minütige Inkubation in 0,5% iger CuSO<sub>4</sub>-Lösung wurde die Färbung verstärkt. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurde mit Hämatoxilin gegengefärbt und anschließend in 1%iger Ammoniumchlorid-Lösung differenziert, wiederum in destilliertem Wasser gespült, bevor die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe (3.3.1) durchliefen und in Entellan eingedeckt wurden.

Verdünnungen: Schweineserum: 1:10 Primärantikörper (Hyperimmunserum): 1:2000 Sekundärantikörper (Schwein-anti-Kaninchen): 1:100 PAP-Komplex: 1:100

Sämtliche Verdünnungen wurden in PBS vorgenommen.

### 3.3.3 Auswertung der histologischen Schnitte und Aufnahme der Fotos

Die H&E gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop unter 100- und 200-facher Vergrößerung nach einem standardisierten Scoring-Verfahren beurteilt (Tab. 2). Die Analyse erfolgte in einer geblindeten Untersuchung durch mindestens zwei Untersucher (D. Struck und M. Heimesaat bzw. O. Liesenfeld).

### Tab.2 : Histopathologischer Score

0: keine Ve	eränderungen
-------------	--------------

- 1: Ödem zwischen Zottenepithel und Lamina propria
- 2: Transsudat luminal, intaktes Epihel
- 3: intraluminales Zellabschilfern
- 4: beginnende Epithelauflösung
- 5: Mukosazerstörung < 50% der Ileumlänge
- 6: vollständige Nekrose über das gesamte Ileum

Die inflammatorischen Areale in H&E-gefärbten Schnitten der Leber wurden in 200-facher Vergrößerung mittels Zählkammer gemessen und gezählt.

Die mittels Immunperoxidase-Färbung gefärbten Leberschnitte wurden lichtmikroskopisch unter 200-facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurden pro Organ die Zahl der Tachyzoiten bzw. von freiem Antigen je 20 Gesichtsfelder ausgezählt und gemittelt. In immunhistologisch gefärbten Darmschnitten wurde mit 200-facher Vergrößerung die Zahl der Parasiten oder Parasitenantigene in je 1 cm Darm (proximal und distal) ausgezählt und gemittelt.

Repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Präparate wurden mit entsprechender Vergrößerung digital fotografiert.

### 3.4 Serumgewinnung

Zum Nachweis von Zytokinen im Blut wurde Serum gewonnen. Dazu wurde Vollblut aus dem Herzen entnommen und über Nacht bei 4° C gelagert. Im Anschluss an die Zentrifugation bei 7.000 g für 10 min wurde der Überstand bei –70° C tiefgefroren.

### 3.5 Organkultur und Organhomogenisate

Um die Zytokinsekretion in Milz, MLN und Ileum zu bestimmen, wurden die Organe entweder als Organkultur über Nacht inkubiert oder homogenisiert und die Zytokinkonzentrationen in Überständen per ELISA bestimmt. Um der Autolyse entgegenzuwirken wurden die Organe bis zur Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert.

Zur Messung von Zytokinen im Überstand von Organkulturen wurden Milz und MLN sowie 1 cm des längs eröffneten und durch Ausstreichen von Fäces befreiten Ileums über Nacht in 400 µl serumfreiem DMEM/0,5%Pen-Strep bei 37° C inkubiert. Der Überstand wurde entnommen und bis zur weiteren Verwendung bei -70° C weggefroren.

Zur Messung von Zytokinen in Homogenisaten wurden Milz, MLN und 1 cm Ileum über einer Petrischale mit 1 ml PBS zwischen zwei Objektträgern mit angerauten Oberflächen zerrieben. Bei 15.300 g wurden die Organhomogenisate für 10 min zentrifugiert und die gewonnenen Überstände bei 70° C weggefroren.

#### **3.6 Enzyme-Linked-Immunabsorbent-Assay (ELISA)**

Zur Bestimmung der Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p40, IL-18, IL-6 und IL-17 in Organkulturüberständen und -homogenisaten wurden die unter 2.3 aufgeführten ELISA-Kits nach den Anweisungen der Hersteller verwendet.

Zur Bestimmung der IL-4 und IL-5 Konzentration in Organkulturüberständen und Homogenisaten wurde eine beschichtete Platte mit 50  $\mu$ l des in Coatingpuffer (pH 9,5) verdünnten spezifischen Primärantikörpers inkubiert. Nach einer Übernachtinkubation bei 4° C wurde die Platte mit Waschpuffer (0,05% Tween 20 / PBS) gewaschen und anschließend mit ELISA-Blockingpuffer (PBS / 10 % FCS) für 45 min bei 37° C blockiert. Anschließend wurde die Platte gewaschen und mit 50  $\mu$ l Probe bzw. 50  $\mu$ l einer Standardverdünnungsreihe (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 in Blockingpuffer) beschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 4 Std bei RT oder über Nacht bei 4° C wurde die Platte erneut gewaschen und mit 50  $\mu$ l eines in Blockingpuffer verdünnten biotinylierten Sekundärantikörpers sowie Streptavidin-Peroxidase versetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 45 min bei RT wurde gewaschen und je 75  $\mu$ l Substratpuffer mit einer Tablette Tetramethylbenzidin (TMB) sowie 2  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro 10 ml Puffer hinzugefügt. Nach 15 min wurde die Reaktion mit 50  $\mu$ l 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und die optische Dichte mit einem Plattenphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Verdünnungen: IL-4 Primärantikörper auf 2 µg/ml

IL-4 Standard auf 50 ng/ml
IL-4 biotinylierter Sekundärantikörper auf 2 μg/ml
IL-5 Primärantikörper auf 2 μg/ml
IL-5 Standard auf 55 ng/ml
IL-5 biotinylierter Sekundärantikörper auf 2 μg/ml
Streptavidin Peroxidase 1:1000

### 3.7 Isolierung von Zellen aus Milz und MLN

Zur Analyse der Zellpopulationen wurden Zellen aus Milz und MLN isoliert und mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Um der Autolyse entgegenzuwirken, wurden die Organe bis zur Verarbeitung in PBS auf Eis gelagert. Die Organe wurden in ein Zellsieb überführt, mit einer Schere und einem Spritzenstempel zerkleinert und mit 10 ml RPMi/ 5% FCS/ 0,5% PenStrep (Medium) gespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde mit Medium auf 45 ml aufgefüllt und bei 300 g 10 min bei 4° C zentrifugiert. Anschließend wurden das Pellet in 5 ml Lysispuffer aufgenommen und die Erythrozyten durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren nach ca. 1 min lysiert. Nach erneutem Auffüllen auf 45 ml wurde die Suspension bei 300g 10 min bei 4° C zentrifugiert und die Zellen in 5 ml Medium aufgenommen. Die Zahl lebender Zellen wurde durch Ausschlußfärbung mit Trypanblau (Verdünnung in Medium: 1:20) in der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

### 3.8 Durchflusszytometrie

### 3.8.1 Oberflächenfärbung

Zur Detektion von Zelloberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie wurden die Zellen nach Isolierung (siehe 3.7) gezählt und in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen pro Färbung eingesetzt. Die einzelnen Proben wurden mit 100 µl FACS Wash versetzt, bei 300 g 10 min bei 4°C zentrifugiert und mit einem anti-Fcγ-Antikörper zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die mit Fluorochrom markierten Antikörper für die entsprechenden Oberflächenantigene hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20 min wurden die Proben mit 100 µl FACS Wash versetzt und wie beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen wurden entweder in 150 µl FACS Wash für die sofortige Analyse im Durchflusszytometer aufgenommen oder mit 150 ml FACS Fix unter Lichtschutz 20 min fixiert und bei 4°C im Dunkeln bis zur Messung (maximal eine Woche) gelagert. Entsprechende Isotypkontrollen wurden für alle Färbungen in gleicher Weise mitgeführt.

Verdünnungen: anti-Fcy-Antikörper: 0,1µg/100.000 Zellen

Fluorochrom markierte Antikörper/Isotypen: 0,1µg/100.000 Zellen Sämtliche Verdünnungen wurden in FACS Wash vorgenommen.

### 3.8.2 Intrazelluläre Färbung

Für die Detektion intrazellulärer Zytokine erfolgte eine Restimulation der Zellen mit 0,1 μM Polymycin A (PMA) und 1 μM Ionomycin in RPMi / 5% FCS / 0,5% PenStrep über 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Nach zwei Stunden Inkubation wurde 10 μg/ml Brefeldin A hinzugefügt, um die Ausschüttung der Zytokine zu verhindern. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen in einem ersten Färbeschritt mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene gefärbt (siehe 3.8.1), anschließend mit FACS Fix fixiert und 20 min bei 4°C ohne Lichteinfluss inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in FACS Wash/ Saponin0,5% zur Perforation der Zellwände aufgenommen. Nun erfolgte ein Blockierungsschritt mit anti-Fcγ-Antikörpern und die intrazelluläre Färbung mit Antikörpern
gegen Zytokine. Entsprechende Isotypkontrollen wurden für alle Färbungen in gleicher Weise mitgeführt.

#### 3.9 Molekularbiologische Techniken

Um die Parasitenlast im terminalen Ileum zu bestimmen, isolierten wir DNA und untersuchten diese mittels quantitativer PCR. Des weiteren wurde eine Bestimmung verschiedener Zytokine und Enzyme im Ileum auf RNA-Ebene durchgeführt. Gewebeproben von MLN, Milz, Darm und Leber für die PCR sowie Zymographie wurden direkt in Flüssigstickstoff überführt und anschließend bei -70°C gelagert.

#### 3.9.1 Isolierung von DNA

50-100 mg Ileum und Leber wurden mittels Rotor-Stator in 500 µl Lysis-Puffer homogenisiert, für 30 min bei 56°C geschüttelt und anschließend bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde abgezogen und die DNA mit dem identischen Volumen Isopropanol gefällt und anschließend bei 12.000 rpm pelettiert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

#### 3.9.2 Isolierung von RNA

Zur Isolierung von RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Quiagen benutzt, dem Protokoll folgend die RNA isoliert und in 60  $\mu$ l Rnase freiem Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

#### **3.9.4 Quantitative PCR**

#### 3.9.4.1 Quantifizierung der DNA von T. gondii

Für die Quantifizierung von *T. gondii*-DNA wurden Primer zur Amplifikation eines 162bp langen Fragmentes des Cryptic Genes benutzt [169]. Für die quantitative PCR wurde das LightCycler FastStart DNA Master Hybridization Probes-Kit genutzt. 500 ng der Template-DNA wurden mit 2 µl Enzymmix, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM jedes Oligonukleotid-Primers, 0,2 µM

der spezifischen Sonden zu einem Endvolumen von 10 µl in Light Cycler-Glaskapillaren zusammengefügt. Die PCR wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt: 10 min 95° C zur initialen Denaturierung, 50 Zyklen 95° C für 10 sek, 52° C für 20 sek und 72° C für 30 sek. Zum Abschluss erfolgte ein Zyklus bei 40°C für 30 sek mit einem einzelnen Aufnahmepunkt der Fluoreszenz am Ende. Als Negativkontrolle diente destilliertes Wasser. Mit jedem Lauf wurde parallel eine Standardkurve der Fluoreszenz von einer Verdünnungsreihe von 5 pg bis 500 pg *T. gondii*-DNA erstellt. Die Fluoreszenz wurde mittels Light Cycler Data Analysis Software 3.5 berechnet. Zur Bestimmung des Cp-Wertes (Crossing points) wurde die Methode der zweiten Ableitung benutzt.

## 3.9.4.2 Quantifizierung von IL-17, IL-23p19, IL-22, MMP-2, MMP-9, TIMP-1 und TIMP-3

Die aus Organen gewonnene RNA wurde mit dem SuperScript<sup>TM</sup> III Platinum One Step Quantitative PCR System umgeschrieben und als cDNA gemessen. In Glaskapillaren wurde 1  $\mu$ l RNA mit 3,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5% BSA, 0,5  $\mu$ M Primer, 0,15  $\mu$ M Sonden, 4% SuperScript<sup>TM</sup>III RT/ Platinum *Taq* Mix und 2-fachen Enzymmix vermengt und im Light Cycler analysiert. Die Reaktionskonditionen waren 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 sek/ 58° C für 7 sek/ 72° C für 5 sek, (10 sek bei der Amplifikation von HPRT) mit einer Detektion der Fluoreszenz am Ende des letzten Zyklus. Als Negativ-Kontrolle wurde destilliertes Wasser eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde mittels Light Cycler Data Analysis Software 3.5 berechnet. Zur Bestimmung des Cp-Wertes (Crossing point) wurde die Methode der zweiten Ableitung benutzt.

Die Quantifizierung von IL-17 und IL-22 wurde durch die AG R. Sabat, Klinik für Dermatologie, Charité Berlin vorgenommen [170].

#### 3.10 Generierung von Knochenmarkchimären

#### 3.10.1 Bestrahlung

24 Std vor Bestrahlung wurden eine antibiotische Behandlung mit Neomycin (2 mg/ml) im Trinkwasser begonnen. 16 Std vor der Bestrahlung wurde das Futter entfernt. C57BL6-Wildtyp und IL-18-defiziente Mäuse wurden einer Cäsiumquelle (MPI, Berlin) ausgesetzt und mit einer Dosis von 800 rad für 7 min und 30 sek bestrahlt.

#### 3.10.2 Gewinnung und Transfer von Knochenmarkzellen und Milzzellen

Einen Tag nach Bestrahlung wurden Knochenmarkzellen für den Transfer in die bestrahlten Tiere gewonnen. Dazu wurden C57BL/6-Wildtyp- und IL-18 defiziente Mäuse per cervikaler Dislokation getötet; nach gründlicher Desinfektion wurden ihre Hinterläufe abgetrennt. Haut und Muskulatur wurden von Femur und Tibia entfernt und die Pfoten im Tarsalgelenk abgesetzt. Anschließend wurden Femur und Tibia im Kniegelenk voneinander getrennt. Die Knochen wurden an beiden Enden aufgeschnitten und mit einer 26G Kanüle mit 10 ml Medium (RPMI/5%FCS/0,5%PenStrep) gespült. Die in einer Petrischale aufgefangene Zellsuspension wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren in eine Einzelzellsuspension überführt, mit Medium auf 45 ml aufgefüllt und schließlich bei 300 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse für 5 min in 6 ml Lysispuffer aufgenommen, mit Medium auf 45 ml aufgefüllt und erneut bei 300 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml PBS aufgenommen, durch ein 70  $\mu$ m Zellsieb gegeben, erneut zentrifugiert und schließlich in 5 ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden gezählt und in PBS auf 0,75 x 10<sup>7</sup> Zellen in 0,1 ml verdünnt.

Die Milzen wurden entnommen und Milzzellen, wie unter Punkt 3.7 beschrieben, gewonnen. Die Verdünnung wurde ebenfalls auf  $0,75 \times 10^7$  in 0,1 ml PBS eingestellt. Die Zellen aus Knochenmark und Milz wurden 1:1 gepoolt. Die bestrahlten Tiere erhielten je 0,2 ml der Zellsuspension i.v. durch Punktion der Schwanzvene.

#### 3.10.3 Kontrolle des Chimärismus und der Rekonstitution der Zellen

Um zu überprüfen, dass die Bestrahlung knochenmarkabhängige Zellen depletiert hatte, wurden Kontrollmäuse bestrahlt, erhielten aber keinen Zelltransfer. Zur Kontrolle der Rekonstitution mit Spenderzellen wurden als Empfänger ausschließlich weibliche, als Donoren männliche Tiere verwendet und das y-Chromosom der Spenderzellen im Blut der Empfängertiere nachgewiesen. Die Rekonstitution wurde in wöchentlichen Abständen mittels durchflußzytometrischer Bestimmung des relativen Anteils von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen im Blut der Mäuse mit Chimärismus im Vergleich zu unbestrahlten Mäusen kontrolliert. Hierzu wurde die Schwanzvene punktiert und ca. 30 µl Blut gewonnen, mit FACS Wash versetzt, bei 300 g für 10 min bei 4° C gewaschen und mit Lysispuffer versetzt. Nach Lysis der Erythrozyten wurde erneut gewaschen, der Überstand dekantiert und die Zellen in 100 µl FACS Wash mit anti-Fcy-Antikörpern für 10 min auf Eis inkubiert (siehe 3.8.1). Fluorochrom-markierte Antikörper gegen CD4 und CD8 wurden für 10 min hinzugegeben, mit FACS Wash gewaschen, mit FACS Fix fixiert und im Durchflusszytometer gemessen. Sobald der relative Anteil der Zellpopulationen in den bestrahlten Tiere dem Anteil in den Kontrolltieren entsprach, wurde die Rekonstitution als erfolgreich bewertet und die Tiere in den Versuch genommen.

#### 3.10.3.1 Qualitative PCR

Das x- und y-Chromosom in den Knochenmarkschimären wurde mittels qualitativen PCR nachgewiesen. Nach Isolierung der DNA aus Vollblut wurden in PCR-Tubes auf Eis Taq-Puffer, Mg<sup>2+</sup>, der Primermix, dNTPs, Wasser, Taq-Polymerase und das Template hinzugefügt. Die Denaturierung wurde für 5 min bei 94° C, das Annealing 30 sek bei 94° C, anschließend die Amplifikation 45 sek bei 57° C, 45 sek bei 72° C und weitere 10 min bei 72° C durchgeführt. Die Amplifikate wurden in einem 2%igen Agarosegel der Größe nach aufgetrennt.

#### 3.11 Zymographie

Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Matrixmetalloproteinasen bedienten wir uns der Zymographie (AG K. Danker, Institut für Biochemie, CBF, Charité). Dabei wurden Darmbioptate an Tag 7 der Infektion entnommen und in 200 µl einer Lösung aus 0,5% Triton X-100, 150 mM NaCl und 20 mM Tris (pH 7,4) homogenisiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde die Suspension bei 10.000 g zentrifugiert, die Proteinkonzentration bestimmt und Western Blot-Puffer hinzugefügt. Die Elektrophorese wurde auf einem Gel mit 9% Acrylamid und 2 mg/ml Gelatine bei 200 V durchgeführt. Das Gel wurde hierfür je dreimal 30 min in 50 ml einer Lösung aus 2,5% Triton X-100 und 50 mM Tris (pH=7,4) und anschließend zweimal 15 min in 50 ml A. dest. inkubiert. Nach Beladung mit je 10 µl Probe wurde es über Nacht bei 37° C in einem Puffer mit 50 mM Tris (pH 7,4), 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 mM ZnSO<sub>4</sub> inkubiert. Die Färbung erfolgte mit Coumassie BBR-250 für 20 min, entfärbt wurde mit 10% igem

Methanol und 10% iger Essigsäure, bis die Banden sichtbar wurden. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert.

#### 3.12 Statistik

Von mehrfach bestimmten Messwerten wurden Mittelwert und Standardabweichung berechnet. Soweit nicht anders angegeben erfolgte die statistische Signifikanzberechnung mit dem t-Test (Student's t-Test). Unterschiede zwischen den Gruppen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% (p>0,05) lag.

### 4. Ergebnisse

# 4.1. Rolle der Untereinheiten von IL-12 in der protektiven Immunantwort gegen *T. gondii*

Um die Bedeutung der beiden IL-12-Untereinheiten p35 und p40 in der protektiven Immunantwort gegen *T. gondii* zu untersuchen, wurden Infektionsversuche in Gen-Knockout-Mäusen durchgeführt. Neben dem Überleben wurden in diesen Mäusen das Gewicht, histologische Veränderungen sowie die Zytokinspiegel im Vergleich zu den Kontrollmäusen bestimmt. Mäuse mit einer Deletion des IRF-8-Gens und Mäuse mit einer Deletion des IL-18-Gens wurden ebenfalls untersucht.

# 4.1.1. Klinischer Verlauf, Gewicht und Überleben von IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/p40<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*

Alle Tiere zeigten nach 9 Tagen Krankheitssymptome wie raues Fell, Gewichtsverlust und Apathie. Der Gewichtsverlust der infizierten Mäuse unterschied sich nicht signifikant (Abb. 5).



**Abb. 5: Darstellung des Körpergewichts** (in Gramm) von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäuse nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49; angegeben sind Mittelwerte aus einem von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe)

Während Wildtyp- und IL-18<sup>-/-</sup> Mäuse keine weitere Verschlechterung der klinischen Symptome durchmachten und die akute Infektion überlebten, zeigten IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, und p35/p40<sup>-/-</sup> und IRF-8<sup>-/-</sup> Mäuse fortschreitende Apathie und verstarben zwischen Tag 9 und 12 (Abb. 6).



**Abb. 6: Überleben (in Prozent)** von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäuse nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49. Angegeben sind Werte aus einem von drei repräsentativen Experimenten (n=4/Gruppe).

# 4.1.2. Histologische Veränderungen in IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/p40<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*

Histologisch fielen an Tag 9 zahlreiche entzündliche Infiltrate in Leber, Lunge und Herz der infizierten Mäuse auf. In IL-12p35, p40, p35/p40 und IRF-8 defizienten Mäusen waren diese Infiltrate im Vergleich zum Wildtyp und der IL-18-defizienten Mäuse großflächiger (Abb. 7A, B).



**Abb. 7: Darstellung lymphozytärer Infiltrate** in der Leber von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49 A. Graphische Darstellung der Größe der Infiltrate, bestimmt mittels Zählraster (1mm<sup>2</sup>) bei 200facher Vergrößerung. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines von drei repräsentativen Experimenten (n=3-5/Gruppe); B. H&E gefärbte Schnitte der Leber, 200fache Vergrößerung.

#### 4.1.3. Zahl der Parasiten in der Leber

Um den Einfluss der Untereinheiten von IL-12 auf die Vermehrung des Parasiten zu untersuchen, wurde die Parasitenzahl in der Leber mittels Immunhistologie und Light-Cycler-PCR bestimmt.

In der Leber der IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/p40<sup>-/-</sup> Tiere konnten signifikant höhere Parasitenlasten als in Wildtyp- bzw. IL-18<sup>-/-</sup> Tieren detektiert werden (Abb. 8). Auch die Parasitenlasten in den IRF-8<sup>-/-</sup> Tieren lagen signifikant über denen der WT- und IL-18<sup>-/-</sup> Tiere. Im Vergleich dazu zeigten IL-18<sup>-/-</sup> Tiere gegenüber Wildtyp-Tieren keine erhöhten Parasitenlasten. Die immunhistologischen Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse der Light-Cycler-PCR (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 8: Darstellung der Parasitenlast** in der Leber von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe; \*p<0,05 im Vergleich zum Wildtyp,\*\*p<0,05 im Vergleich zu IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen).

# 4.1.4. Konzentrationen der Th1- und Th2-Zytokine in IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/p40<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*

Um die den oben beschriebenen Befunden zugrunde liegenden Immunantworten aufzudecken, wurden Th1- und Th2- Zytokine bestimmt. In Homogenisaten von Milzen der IL-12p35<sup>-/-</sup>,

p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup> und IRF-8<sup>-/-</sup> Mäuse fanden sich im Vergleich zu Wildtyptieren signifikant niedrigere IFN-γ-Spiegel (Abb. 9A). Die IFN-γ-Konzentrationen in Organhomogenisaten der IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/40<sup>-/-</sup> Mäuse unterschieden sich jedoch nicht. Im Gegensatz dazu ließen sich in Homogenisaten der Milz und MLN der IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup> und IRF-8<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wildtyp und IL-18<sup>-/-</sup> Tieren erhöhte TNF-α-Konzentrationen nachweisen (Abb. 9B). Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 waren in IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup> und IRF-8<sup>-/-</sup> Tieren, nicht aber in Wildtyp- bzw. IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen erhöht (Abb. 9C, D). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in MLN gefunden (Daten nicht gezeigt).





**Abb. 9:** IFN- $\gamma$  (A), TNF $\alpha$  (B), IL-4 (C) und IL-5 (D) Konzentrationen in Homogenisaten der Milz von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe; \*p<0,05 im Vergleich zum Wildtyp, \*\*p<0,05 im Vergleich zu IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen).

#### 4.1.5. IL-12- und IL-18-Konzentrationen nach Infektion mit T. gondii

IL-12p40- und IL-18-Konzentrationen wurden im Serum per ELISA bestimmt. Weder in IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, noch in p40<sup>-/-</sup> oder IRF-8<sup>-/-</sup> Mäusen ließ sich IL-12p40 nachweisen, während Wildtyp-, IL-18<sup>-/-</sup> und IL-12p35<sup>-/-</sup> Mäuse IL-12 in gleichem Maße produzierten.



**Abb. 10: Darstellung der IL-12p40-Werte** im Serum von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines von drei repräsentativen Experimenten (\*p<0,05 im Vergleich zum Wildtyp, n=3/Gruppe).

Die IL-18-Spiegel der Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup> und IRF-8<sup>-/-</sup> Mäuse unterschieden sich nicht signifikant; in IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen konnte kein IL-18 nachgewiesen werden.



**Abb. 11: Darstellung der IL-18 Werte** in Homogenisaten der Milz von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen eines von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe, \*p<0,05 im Vergleich zu Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup>).

#### 4.1.6. Rolle von IL-23 in der protektiven Immunantwort gegen T. gondii

Da die p40-Kette von IL-12 mit der p19-Kette das Zytokin IL-23 bildet und sogenannte Th17-Zellen beeinflusst, wurde die IL-23-Expression sowie IL-17-Konzentrationen im Darm nach Infektion bestimmt.

## 4.1.7. IL-23p19-Expression in IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*

In der quantitativen PCR aus Ileum und MLN ergab sich an Tag 9 kein Unterschied in der Expression von IL-23 zwischen IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> und dem Wildtyp.



**Abb. 12: Expression von IL-23p19-RNA** im Ileum von Wildtyp, IL-12p35<sup>-/-</sup>, IL-12p40<sup>-/-</sup>, IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* ME49, die Expression wurde mittels RT-PCR im LightCycler gemessen. Angegeben sind gegen einen Kalibrator normalisierte Mittelwerte eines von 3 repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe).

## 4.1.8. IL-17-Konzentrationen in Wildtyp-, IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*

Im ELISA fanden sich in Homogenisaten der Milz und MLN infizierter IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup>, p35/p40<sup>-/-</sup>, IRF-8<sup>-/-</sup> und IL-18<sup>-/-</sup> Mäuse keine messbaren IL-17-Konzentrationen (<5pg) ebenso wenig in naiven Tieren (Daten nicht gezeigt).

### 4.2 Die Rolle des proinflammatorischen Zytokins IL-23 in der Th1-Immunpathologie nach oraler Infektion mit *Toxoplasma gondii*

Da IL-23 in Modellen mukosaler Pathologie und von Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle zugeschrieben wurde, wurde die Rolle des IL-23 in der *T. gondii*-induzierten Th1-Immunpathologie untersucht.

Wildtyp- und IL-23p19-defiziente Mäuse wurden mit 100 Zysten *T. gondii* per os infiziert und der Infektionsverlauf anhand des Gewichts, Letalität, histopathologischer Veränderungen und Zytokinwerten untersucht.

#### 4.2.1. Gewicht und Überleben

Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten nach anfänglicher Gewichtszunahme ab Tag 5 zunehmend Krankheitssymptome wie gesträubtes Fell, gekrümmte Haltung und Gewichtsverlust. An Tag 7 hatten Mäuse beider Gruppen bis zu 20% ihres Ausgangsgewichts verloren (Abb. 13).



**Abb. 13: Gewichtsentwicklung** von Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup>-Mäusen nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* ME49. Angegeben sind Mittelwerte eines von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe).

Während alle Wildtyp-Tiere zwischen Tag 7 und Tag 10 verstarben, überlebten 55% der IL-23p19<sup>-/-</sup> Tiere die akute Phase der Infektion (Abb. 14).



**Abb. 14: Überlebensraten** von Wildtyp und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäuse nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii.* Dargestellt sind gepoolte Daten von zwei repräsentativen Experimenten (n=4-5/Gruppe).

## 4.2.2. Histopathologische Veränderungen und Parasitenlast im Darm von Wildtyp und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen

In H&E-gefärbten Schnitten des Darmes wiesen Wildtyp-Mäuse 7 Tage nach Infektion hochgradige Nekrosen des terminalen Ileums mit Verlust der Zottenstruktur und Blutungen auf, während in IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen lediglich Ödeme zwischen der Epithelschicht und der Lamina propria sowie eine geringgradige Abschilferung von Epithelzellen in das Darmlumen mit Exsudation zu beobachten war (Abb. 15). Die Auswertung der Veränderungen anhand des standardisierten Scores (siehe 3.3.3.) ergab signifikant geringere histopathologische Veränderungen in IL-23p19<sup>-/-</sup> im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Abb. 16).



Abb. 15: Histologische Veränderungen im terminalen Ileum in Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup>- Mäusen nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*, H&E Färbung des terminalen Ileums von repräsentativen Wildtyp- (A, 100-fache Vergrößerung, B, 200-fache Vergrößerung) und IL-23p19<sup>-/-</sup> (C, 100-fache Vergrößerung, D, 200-fache Vergrößerung) Mäusen.



**Abb. 16: Histopathologischer Ileitis-Score** in Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 7 nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe; \*p  $\leq$  0,05).

Um die Ursache für Unterschiede in den histopathologischen Veränderungen des Ileums zu klären, wurde die Parasitenlast in Ileumbioptaten mittels qPCR untersucht. Im Ileum zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Erregerlast zwischen Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen (Abb. 17).



**Abb. 17: Parasitenlast** im Ileum von Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus einem von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe).

### 4.2.3. Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine (IL-12, IFN-γ, IL-6, IL-17) in Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

Um die Immunantwort zu charakterisieren, wurden Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen in Serum, Ileum, MLN und Milz bestimmt. Die Konzentrationen von IL-12p40 unterschieden sich nicht signifikant zwischen Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen.



**Abb. 18: IL-12p40-Konzentrationen** in Kulturüberständen von IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum Wildtyp an Tag 7 nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* ME49. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (Daten aus drei Experimenten gepoolt, n=3/Gruppe).

Während die IFN-γ-Konzentrationen in Serum und Organkulturüberständen der Milz und des Ileums sich nicht zwischen Wildtyp und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen unterschieden, waren in MLN der IL-23p19<sup>-/-</sup> im Vergleich zu Wildtyp Mäusen erhöhte IFN-γ-Konzentrationen nachweisbar (Abb. 19A). Der Nachweis intrazellulärer IFN-γ-Sekretion ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen (Abb. 19B).



A



**Abb. 19: IFN-\gamma-Konzentrationen** in Organkulturüberständen und Serum von Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen 7 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen (A: ELISA) (n=3/Gruppe, Daten aus drei Experimenten gepoolt; p≤0,05) und (B) Prozentzahl der IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen in MLN und Milz nach Stimulation mit PMA/Ionophor (intrazelluläres FACS; n=4/Gruppe).

Die IL-6-Konzentrationen waren in der Milz nicht aber im Ileum der IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant höher als im Wildtyp.



**Abb. 20: IL-6-Konzentrationen** in Organkulturüberständen von IL-23p19<sup>-/-</sup> im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen 7 Tage nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3/Gruppe, Daten aus drei Experimenten gepoolt; \*p  $\leq$  0,05).

Da IL-23 die Sekretion von IL-17 durch Th17-Zellen aufrechterhält, wurden IL-17-Konzentrationen in Milz, MLN und Ileum untersucht. Während IL-17 mittels Durchflusszytometrie in MLN und Spleen nicht detektierbar war, zeigte sich in Organkulturen der IL-23p19<sup>-/-</sup> Tiere im Ileum eine signifikant geringere IL-17-Sekretion als in WildtypMäusen (Abb. 21). Im Ileum der beiden Mausstämme ließ sich mittels qPCR keine IL-17-Expression nachweisen.



Abb. 21: IL-17-Konzentrationen in Organkulturüberständen von IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum Wildtyp an Tag 7 nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3/Gruppe, Daten aus drei Experimenten gepoolt;  $*p \le 0.05$ )

Th17-Zellen produzieren neben IL-17 auch IL-22. Darmbioptate von IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im Gegensatz zum Wildtyp eine signifikant geringere Expression von IL-22 (Abb. 22).



**Abb. 22: IL-22-Expression** im Ileum von IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zum Wildtyp an Tag 7 nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem von drei repräsentativen Experimenten (n=3/Gruppe; \*p  $\le$  0,05)

### 4.2.4. Expression und Aktivität von Matrixmetalloproteinasen im Darm von IL-23<sup>-/-</sup> Mäusen nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

Gelatinasen wurde als Mitglieder der Familie der Matrixmetalloproteinasen (MMPs) eine Beteiligung an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen nachgewiesen [171, 172]. Da sie durch IL-23 beeinflußt werden [100, 103], wurde die Expression und Aktivität der Gelatinasen A (MMP-2) und -B (MMP-9) und ihrer Inhibitoren, den sogenannten "Tissue Inhibitors of Metalloproteinases" (TIMP) im Ileum untersucht.

Während sich auf RNA-Ebene kein Unterschied in der Expression von MMP-2 und MMP-9 im Ileum von Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen fand (Abb. 23A), ließ sich mittels Zymographie in IL-23<sup>-/-</sup> Mäusen eine geringere MMP-9- und MMP-2-Aktivität nachweisen (Abb. 23C). Die Expression von TIMP-1 und -3 in Ileumbioptaten war in Wildtyp- und IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäusen nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 23B).





**Abb. 23: Expression und Aktivität von MMP-2 und MMP-9** im Ileum IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zum Wildtyp an Tag 7 nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*; A: MMP-2- und MMP-9-RNA-Konzentrationen, B: TIMP-1- und TIMP-3-RNA-Konzentrationen, C: Aktivität von MMP-2 und MMP-9 (Zymographie), (n=3/Gruppe).

#### 4.3. IL-18 und dendritische Zellen in der Th1-Immunpathologie

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass IL-18 die Dünndarmpathologie induziert [7]. Da jedoch sowohl antigenpräsentierende Zellen als auch Epithelzellen als Quelle des IL-18 infrage kommen, wurde die zelluläre Herkunft des IL-18 untersucht [154, 162, 163]. Dazu wurden Knochenmarkchimären aus Wildtyp- und IL-18<sup>-/-</sup> Tieren generiert, indem C57BL6–Wildtyp-Mäuse letal bestrahlt und mit Zellen aus IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen rekonstituiert wurden. Daneben wurden Knochenmarkzellen aus IL-18<sup>-/-</sup> Tieren in Wildtyp-Tiere transferiert. Der Transfer von Wildtyp-Zellen in Wildtyp-Mäuse sowie von IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen wurde zur Kontrolle ebenfalls vorgenommen.

Rezipienten	Donoren	Zelluläre Quelle des IL-18
C57BL/6	C57BL/6	Epithel und/oder Knochenmark-abhängige - Zellen
IL-18 <sup>-/-</sup>	IL-18 <sup>-/-</sup>	_
IL-18 <sup>-/-</sup>	C57BL/6	Knochenmark-abhängige Zellen
C57BL/6	IL-18 <sup>-/-</sup>	Epithel

Tab. 2 Schematische Darstellung der Zellverteilung

### 4.3.1. Suszeptibilität von Mäusen mit Knochenmarkchimärismus nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

Nach einer Rekonstitutionsphase von 3 Monaten wurden die Mäuse oral mit 100 Zysten des *T. gondii* Stammes ME49 infiziert. 7 Tage nach Infektion fand sich bei allen Gruppen ein signifikanter Gewichtsverlust, der sich jedoch nicht zwischen den Kontrolltieren und Mäusen mit Chimärismus unterschied.



**Abb.24:** Gewichtsverlauf in rekonstituierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren 7 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte (n=3-6/Gruppe).

## 4.3.2. Histologische Veränderungen im terminalen Ileum nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

An Tag 7 nach oraler Infektion war in Wildtyp- und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen, die mit Knochenmark von IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen rekonstituiert worden waren, keine Dünndarmpathologie nachweisbar (Abb. 25). Auch unbehandelte IL-18<sup>-/-</sup> Kontrolltiere zeigten keine Dünndarmpathologie. Im Gegensatz dazu waren sowohl in IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen, die mit Knochenmarkzellen aus Wildtyp-Kontrolltieren rekonstituiert worden waren, als auch in unbehandelten Wildtyp-Kontrolltieren Nekrosen der Dünndarmmukosa im Sinne einer Pan-Ileitis nachweisbar. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die transferierten knochenmarkabhängigen Zellen die Quelle des IL-18 und für die histologischen Veränderungen verantwortlich sind.



**Abb. 25: Histologische Veränderungen** im terminalen Ileum von Wildtyp und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach Rekonstitution mit Knochenmarkzellen aus Wildtyp oder IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen, 7 Tage nach oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii.* Abgebildet sind H&E-gefärbte Schnitte des terminalen Ileums von repräsentativen Tieren in 100-facher Vergrößerung.

## 4.3.3. IL-18-Konzentrationen in Wildtyp- und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach Chimärismus und oraler Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*

Um die histologischen Veränderungen in den Mäusen mit Chimärismus mit der IL-18-Sekretion zu korrelieren, wurden in Überständen von Milz-, Ileum- und MLN-Bioptaten die Konzentrationen von IL-18 mittels ELISA gemessen. Die IL-18-Konzentrationen waren signifikant höher in Mäusen, die IL-18-kompetente Knochenmarkzellen besaßen als in Mäusen, die mit Knochenmark von IL-18<sup>-/-</sup> Tieren rekonstituiert worden waren (Abb. 26).



**Abb. 26: IL-18-Konzentrationen** in Überständen aus Organkulturen von Wildtyp- und IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen nach Rekonstitution mit Knochenmarkzellen aus Wildtyp- oder IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 7 nach Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n=3-6/Gruppe).

Diese Ergebnisse bestätigen die histologischen Befunde. Die Induktion der Immunpathologie nach oraler Infektion mit *T. gondii* wird demnach vorwiegend durch die Sekretion von IL-18 durch Knochenmark-abhängige Zellen, am ehesten Makrophagen und dendritische Zellen, vermittelt.

### 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden essentielle Faktoren der Abwehr gegen den obligat intrazellulären Parasiten *T. gondii* in Modellen protektiver und schädigender Immunantworten untersucht. Die Zytokine IL-12 und IL-18 spielen durch ihre Fähigkeit zur Induktion einer Th1-Immunantwort eine entscheidende Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Infektionserreger [67-69]. Die Bedeutung der zwei Untereinheiten p35 und p40 des IL-12 ist für einige intrazelluläre Erreger, nicht aber für die orale (natürliche) Infektion mit *T. gondii* geklärt [36, 77-80, 139, 150]. Neben der zentralen Rolle bei der Abwehr von Infektionserregern wurde IL-12 auch für durch Immunpathologie gekennzeichnete Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen als essentiell beschrieben [84]. Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass nicht IL-12 sondern das aus der IL-12-Untereinheit p40 und dem p19-Molekül gebildete Zytokin IL-23 die bedeutendere Rolle bei der Induktion von Immunpathologie, vermutlich durch die Induktion von sog. Th17-Zellen, spielt [100-103].

## 5.1 Welche Rolle spielen die Untereinheiten p35 und p40 des IL-12 in der oralen Infektion mit 10 Zysten *T. gondii*?

Um die Bedeutung von p35 und p40 im Verlauf der natürlichen (oralen) Infektion mit *T. gondii* zu klären, wurden Mäuse mit Defizienzen in IL-12p35, -p40 und -p35/p40 oral mit dem zystenbildenden Stamm *T. gondii* ME49 infiziert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in Überlebenszeit, Parasitenlast, und Zytokinkonzentrationen zwischen den verschiedenen IL-12-defizienten Mäusen. IL-12p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> und p35/p40<sup>-/-</sup> waren im Gegensatz zu Kontrollmäusen nicht in der Lage, ausreichend IFN- $\gamma$  zu produzieren und entwickelten eine kompensatorische Th2-Immunantwort mit Produktion von IL-4 und IL-5. Gleichwertige Bedeutung haben p35 und p40 auch für die Abwehr von *L. major, T. cruzi* und bei hochdosierter Infektion mit *S. Enteritidis*. In mit *L. major* infizierten, IL-12-defizienten Mäusen konnte ebenfalls eine kompensatorische Erhöhung Th2-assoziierter Zytokine festgestellt werden [173].

Unterschiedliche Bedeutungen der p35 und p40-Ketten fanden sich dagegen bei Infektionen mit Mykobakterien. So sind p35<sup>-/-</sup> und Wildtyp-Mäuse im Gegensatz zu Mäusen mit einer Defizienz im p40-Gen in der Lage, *M. bovis* [36] vollständig zu eliminieren und zeigen eine erhöhte Resistenz gegen *M. tuberculosis* [79] und *M. avium* [78]. p35p40<sup>-/-</sup> Mäuse zeigten im Vergleich zu IL-12p35 defizienten Tieren und dem Wildtyp eine erhöhte Bakterienlast nach Infektion mit *M. bovis* und entwickelten eine chronische Infektion. Während Wildtyp- und p35<sup>-/-</sup> Mäuse eine effiziente Immunantwort mit im Zeitverlauf sinkender Granulom- und Bakterienzahl zeigten, waren die Granulom- und Bakterienzahlen in p35/40<sup>-/-</sup> Mäusen konstant hoch [36].

Gegenüber der Infektion mit *M. tuberculosis* sind p40<sup>-/-</sup> Mäuse suszeptibler als p35<sup>-/-</sup> Mäuse; p35<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber p40<sup>-/-</sup> Mäusen auf, der mit einer erhöhten Bakterien-Clearence und einer verstärkten antigenspezifischen IFN-γ-Produktion einherging [79]. p40<sup>-/-</sup> Mäuse wiesen im Vergleich zu p35<sup>-/-</sup> Mäusen eine erhöhte Bakterienlast in der Lunge, allerdings keinen Unterschied in der Granulombildung und der IFN-γ-Sekretion auf [78]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass der p40-Kette in der Mykobakterien-Infektion im Gegensatz zur Infektion mit *T. gondii* wie auch Infektionen mit Leishmanien und Salmonellen eine wichtigere Rolle als der p35-Kette zukommt.

Liebermann et al. konnten 2004 zeigen, dass Mäuse mit einer p35-Defizienz die intraperitoneale Infektion mit dem thermosensitiven ts4-Stamm von *T. gondii* besser kontrollierten als Mäuse mit einer p40-Defizienz [83]. Neben einer verlängerten Überlebenszeit fand sich eine leicht erniedrigte Parasitenlast bei p35<sup>-/-</sup> Tieren. In der vorliegenden Arbeit fand sich nach oraler Infektion mit *T. gondii* ME49 kein Unterschied in der Überlebenszeit und der Parasitenlast in IL-12p35-, p40- und p35/p40-defizienten Mäusen. Im von Lieberman et al. genutzten Modell zeigten p35<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu p40<sup>-/-</sup> Mäusen nach i.p.-Infektion mit dem virulenteren ME49-Stamm eine geringere Parasitenlast, jedoch keinen Überlebensvorteil.

Die Abwehr von *Francisella tularensis* [174] sowie *Cryptococcus neoformans* [175] ist bei Fehlen der p35-Kette weniger eingeschränkt als bei Fehlen des p40 Proteins. Die Infektion mit *F. tularensis* überleben sowohl p35<sup>-/-</sup> als auch p40<sup>-/-</sup> Mäuse. Jedoch sind p40<sup>-/-</sup> Mäuse im Unterschied zu p35<sup>-/-</sup> Mäusen nicht in der Lage, den Erreger zu eliminieren. Die IFN-γ-Spiegel der IL-12p40- und IL-12p35-defizienten Mäuse sind dabei im Vergleich zum Wildtyp gleichermaßen verringert [174]. Nach Infektion mit *C. neoformans* starben p40<sup>-/-</sup> Mäuse früher als p35<sup>-/-</sup> Mäuse und zeigten eine erhöhte Erregerzahl in der Lunge, der Leber, der Milz und im Hirn. Während T-Zellen des Wildtyps in der Lage waren, große Mengen von IFN-γ zu synthetisieren, zeigten p35- und p40-defiziente Mäuse eine gleichsam verringerte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  [175]. Im Gegensatz zur oralen Infektion mit *T. gondii* spielt p40 also in beiden Infektionsmodellen eine p35-unabhängige Rolle, die jedoch vermutlich nicht IFN- $\gamma$ -vermittelt ist, da sich wie auch in der *T. gondii*-Infektion keine Unterschiede der IFN- $\gamma$ -Produktion nachweisen lassen.

Da IL-12p35<sup>-/-</sup> Mäuse in der Lage sind, IL-23 (p19+p40) zu synthetisieren und Überlebensvorteile gegenüber p40-defizienten Tieren nach Infektion mit Mykobakterien [36, 77-80] aufweisen, könnte die erhöhte Resistenz auf der Produktion von IL-23 basieren. p35<sup>-/-</sup> Mäuse weisen eine gegenüber p19<sup>-/-</sup> Mäusen verminderte Resistenz gegen Mykobakterien auf [77]. Auch IL-12p35/IL-23p19<sup>-/-</sup> weisen im Vergleich zu p35<sup>-/-</sup> Mäusen geringere CD4+ Zahlen auf, was für eine gewisse antibakterielle Bedeutung des IL-23 spricht [176].

Während in der Lunge von mit *M. bovis* oder *M. tuberculosis* infizierten Mäusen eine verstärkte IL-23p19-Expression festgestellt wurde [36, 79, 176], konnte in der vorliegenden Arbeit nach oraler Infektion mit *T. gondii* keine erhöhte Expression des IL-23p19 Gens im Ileum nachgewiesen werden. Auch in der Infektion mit *C. neoformans* wirkte IL-23 fungizid und kompensierte partiell eine IL-12-Defizienz [98, 99].

Lieberman et al. untersuchten die Wirkung von IL-23 in der intraperitonealen Infektion mit *T. gondii* [83]. Die Behandlung von IL-12p40<sup>-/-</sup> Mäusen mit rekombinantem IL-23 resultierte in einer erhöhten Resistenz. IL-23p19<sup>-/-</sup> Mäuse waren jedoch ebenso wie der Wildtyp resistent gegenüber dem Erreger. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-23 nur eine sehr beschränkte Rolle in der Abwehr der Infektion mit *T. gondii* spielt.

Neben der Bindung der p40-Kette an die p19-Kette stellt das Homodimer IL-12p80 eine zweite Möglichkeit der Kompensation des Fehlens von IL-12p35 dar. Als rekombinantes Protein verabreicht bewirkt IL-12p80 bei IL-12p40<sup>-/-</sup> Mäusen einen partiellen Schutz gegen die Infektion mit *M. bovis* [36]. Ehlers et al. postulieren, dass eher IL-12p80 als IL-23 eine Rolle in der Abwehr von Pathogenen wie *M. avium* spielt [78]. Bislang ist die Rolle des IL-12-Homodimers in der Infektion mit *T. gondii* nicht untersucht, ein IL-12p80-ELISA zeigte jedoch keine Unterschiede in der p80-Produktion in IL-12p35-, p40- bzw. p35p40-defizienten Mäusen an (Daten nicht gezeigt). Nach Infektion mit *L. major* zeigte IL-12p80 allerdings eine IL-12p70-antagonistische Wirkung und erhöhte die Suszeptibilität von Balb/c-Mäusen im Vergleich zu unbehandelten Mäusen entscheidend [177].

Vergleicht man T. gondii mit anderen Pathogenen wie z.B. M. tuberculosis und C. neoformans, die durch IL-23 eine Defizienz des IL-12p35/p40 kompensieren, wäre nun von Interesse, wie das Verhältnis der IL-12- zur IL-23-Expression reguliert wird, ob und wie die Zytokine interagieren und über welche Mechanismen IL-23 die Erregerabwehr beeinflußt. Smits et al. fanden heraus, dass gram-positive Bakterien die IL-12-Expression stärker stimulieren als die IL-23-Expression [178]. Außerdem wurden Unterschiede in der IL-12/IL-23-Balance festgestellt, je nachdem, ob lysiertes Bakterienmaterial oder ganze Bakterien genutzt wurden [179]. Auch wird postuliert, dass die Balance zwischen bioaktivem IL-12p35/p40 und IL-23 von der Aktivierung unterschiedlicher TLRs abhängt ist. So führt eine Aktivierung von TLR-4 in humanen DCs zur Expression von p35, p40 und p19, während Peptidoglycan, ein TLR-2-Ligand, eher zur IL-23 als zur p35 Expression führt. Die CpG-Bindung an TLR-9 der Maus bewirkt hingegen die Expression von IL-12p70 [93, 94, 180]. Bekannt ist weiterhin, dass nach der Infektion mit BCG IFN-y die Expression von IL-23 zugunsten von IL-12 unterdrückt, was eine geringere IL-17-Produktion zur Folge hat [181]. IL-23 ist wichtig zur Aufrechterhaltung von Th17-Zellen, die IL-17 und IL-22 produzieren [182, 183]. In der pulmonalen Infektion mit dem extrazellulären Bakterium Klebsiella pneumoniae wurde nachgewiesen, dass sowohl die IL-12p70-induzierte IFN-y-Ausschüttung als auch die IL-23-vermittelte IL-17-Produktion eine essentielle Rolle spielen [99, 184]. IL-17 bewirkt im Rahmen der Infektion unter anderem eine Ausschüttung von G-CSF und somit eine Aktivierung von nGZ, was für die Abwehr extrazellulärer Erreger elementar ist [99, 184]. Im Fall der Infektion mit T. gondii wurde ebenfalls eine IL-17R-vermittelte Granulozytenmigration als essentiell für die Abwehr der Infektion postuliert [109]. Im Verlauf der oralen Infektion mit 10 Zysten T. gondii konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine IL-17-Sekretion oder IL-17-Expression in Milz und MLN nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es in der niedrig dosierten, oralen Infektion mit *T. gondii* ME49 keinen Unterschied in der Bedeutung von IL-12p35 und p40 gibt und IL-23p19 sowie IL-12p80 eine untergeordnete Rolle spielen. Die Bedeutung von IL-12p40 scheint somit in Abhängigkeit des Infektionsmodells zu variieren.

## 5.2 Ist IL-18 essentiell für die protektive Immunantwort nach oraler Infektion mit 10 Zysten von *T. gondii*?

Während IL-18<sup>-/-</sup> und IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>-Mäuse nach der Infektion mit anderen intrazellulären Erregern wie *L. monocytogenes* eine höhere Parasitenzahl aufwiesen und früher starben als der Wildtyp [185], scheint IL-18 keine essentielle Bedeutung für die Resistenz gegenüber einer oralen Infektion mit 10 Zysten *T. gondii* zu haben.

Die Sterblichkeit, die Parasitenzahlen und die IFN-γ-Produktion der IL-18<sup>-/-</sup> Mäuse entsprachen denen des Wildtyps, während die IL-12p35-, p40- und p35/40- defizienten Mäuse eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Mortalität und eine deutlich erhöhte Parasitenzahl aufwiesen. In ähnlicher Weise war auch im Verlauf der i.p. Infektion mit *T. gondii* nach Neutralisation von IL-18 mittels spezifischer Antikörper eine geringe Senkung der initialen IFN-γ-Ausschüttung, nicht aber eine verminderte Parasitenabwehr zu beobachten [186].

In mit *S. Typhimurium* infizierten Mäusen zeigten Price et al., dass IL-18 zwar einen Einfluss auf die frühe IFN-γ-Ausschüttung hat, im späteren Verlauf der Infektion aber entbehrlich wird [187]. Zu gleichen Ergebnissen kamen Murray et al. 2006 in einem Mausmodell der Infektion mit *L. donovani* [71].

Ein anderes Bild zeigt sich in Infektionsmodellen mit extrazellulären Erregern. Nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* beeinflußt das IL-18 einerseits die IL-12-abhängige IFN-γ-Ausschüttung, andererseits besteht ein IL-12- und IFN-γ-unabhängiger antibakterieller Effekt [188]. Auch nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* zeigte sich bei IL-18<sup>-/-</sup>, nicht jedoch bei IL-12p35/p40<sup>-/-</sup>-Mäusen eine deutlich erhöhte Erregerlast [189]. Die antibakterielle Wirkung von IL-18 gegen *S. pneumoniae* war sowohl vom Mausstamm (BALB/c sind suszeptibel, C57BL/6 nicht) als auch vom Erregerstamm und dem Infektionsweg abhängig [150]. Durch die Infektionen mit *T. cruzi* und *P. aeruginosa* konnte gezeigt werden, dass IL-18 einen IL-12-unabhängigen Effekt auf die Ausschüttung von IFN-γ durch T-Zellen und somit die Erregerabwehr ausübt [146, 149].

Weitere IL-12–unabhängige Wirkungen des IL-18 sind z.B. der gesteigerte Einstrom von nGZ, vermutlich durch Steigerung der ICAM-1-Expression [190]. Auch die TNF- $\alpha$ -Sekretion nach der Infektion mit *P. aeruginosa* wurde als IL-18-abhängig beschrieben [149]. In der vorliegenden Arbeit konnten nach der Infektion mit *T. gondii* nGZ in der Leber, der Lunge und der Milz nachgewiesen werden, die Anzahl unterschied sich jedoch nicht zwischen

IL-18<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen (Daten nicht gezeigt). Auch die TNF- $\alpha$ -Sekretion in IL-18<sup>-/-</sup> entspricht der des Wildtyps.

Interessanterweise spielt das IL-18 jedoch eine wichtige Rolle im Rahmen der hochdosierten Infektion mit 100 Zysten des gleichen *T. gondii*-ME49-Stamms; die in diesem Modell beobachtete Th1-Typ-Immunpathologie im terminalen Ileum ist IL-18-abhängig [2]. IL-18 scheint somit keinen wesentlichen Einfluss auf die Parasitenabwehr zu haben, induziert aber überschießende Immunantworten durch synergistische oder additive Wirkung mit IL-12.

### 5.3 Welche Zellen sezernieren das für die Immunpathologie essentielle IL-18?

In der Darmschleimhaut wird IL-18 vornehmlich in Epithelzellen, Makrophagen und DCs exprimiert [154, 162, 163]. Bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu einer vermehrten Expression im entzündeten Darmgewebe [154, 162]. Durch die Generierung von Knochenmarkschimären konnte nachgewiesen werden, dass knochenmarksabhängige Zellen, also vermutlich DCs und/oder Makrophagen, nicht aber knochenmarksunabhängige Zellen wie Epithelzellen die Hauptproduzenten von IL-18 sind und so die *T. gondii*-induzierte Ileitis induzieren.

Pizarro et al. wiesen 1999 nach, dass sowohl Epithel- als auch mononukleäre Zellen der Lamina propria des Darms eine deutliche IL-18-mRNA-Expression in durch Morbus Crohn verursachten Läsionen aufweisen, wobei die Expression in den Epithelzellen überwog. Immunhistologisch konnte festgestellt werden, dass Epithelzellen konstitutiv IL-18 produzieren, sich in Läsionen jedoch eine Zunahme der Produktion und Ausdehnung in Zellen der Lamina propria, höchstwahrscheinlich Makrophagen und DCs, findet [154]. Siegmund et al. zeigten 2001 mithilfe konfokaler Lasermikroskopie, dass Enterozyten in der DSS-Kolitis vermehrt IL-18 produzieren [159].

Kanai et al. bedienten sich 2001 der Depletion von Makrophagen durch Saponin-gekoppelte Antikörper gegen das makrophagenspezifische  $\alpha$ -Integrin MAC-1 (CD11b). Im Modell der TNBS-Kolitis konnte so eine signifikante Verminderung der pathologischen Veränderungen in behandelten Mäusen nachgewiesen werden; nach Behandlung mit anti-IL-18 und in IL-18<sup>-/-</sup> Mäusen wurden gleiche Befunde erhoben [160]. Somit scheint den knochenmarksabhängigen Zellen eine wichtigere Rolle in der IL-18-Produktion zuzukommen als den Epithelzellen.

2004 postulierten Reuter und Pizarro, dass die IL-18-Produktion durch Epithelzellen in der frühen Phase chronisch inflammatorischer Darmerkrankungen eine IL-11-abhängige Schutzfunktion ausübt [191]. IL-11 soll hierbei von IL-18 induziert zu Epithelzellproliferation führen, die Apoptose verhindern und die Barrierefunktion erhalten. Im chronischen Verlauf beschrieben Pizarro et al. eine vorwiegende IL-18-Produktion durch Makrophagen und DCs [154]. Die Sekretion von IL-18 durch DCs und Makrophagen wirkt hier synergistisch mit IL-12 auf die IFN-γ-Ausschüttung und verstärkt somit die Th1-Immunantwort [192]. Inzwischen wird untersucht, ob IL-18 auch eine IL-23-synergistische Rolle bei der Induktion der IL-17-Expression zufällt [23].

Interessant ist, dass Mäuse mit Knochenmarkchimärismus eine geringer ausgeprägte Immunpathologie aufwiesen als die nicht-bestrahlten Kontrolltiere. Hier könnte eine bestrahlungsabhängige Veränderung der kommensalen Darmflora, die ihrerseits die Immunpathologie entscheidend beeinflusst [193], eine Rolle spielen.

## 5.4 Welche Rolle spielt IL-23 in der Entwicklung der Dünndarm-Immunpathologie?

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen des Menschen wie Morbus Crohn sind durch die Einwanderung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in die Darmmukosa gekennzeichnet. Über lange Zeit wurde IL-12 und eine dadurch ausgelöste überschießende Th1-Antwort für die Pathologie verantwortlich gemacht. Die Infektion mit 100 Zysten *T. gondii* löst eine der Immunpathogenese des M. Crohns ähnliche Kaskade von Immunmechanismen aus. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Mäusen, die mit 100 Zysten des ME49-Stammes von *T. gondii* infiziert worden waren, mit Antikörpern gegen IL-12 oder aber IL-18 die Entwicklung der Th1-Typ Immunpathologie blockierte [7]. 2003 wurde erstmals berichtet, dass IL-23, welches wie IL-12 eine p40-Kette besitzt, und nicht IL-12 die Pathologie der EAE [100] und der CIA induziert [101]. Auch Patienten mit Psoriasis weisen eine erhöhte IL-23p19-Expression in entzündlichen Hautarealen auf [194].

2006 konnten 3 Arbeitsgruppen nachweisen, dass dem IL-23 eine wichtigere Rolle als dem IL-12 bei intestinaler Entzündung in unterschiedlichen experimentellen Modellen zukommt [104, 105]. In verschiedenen Modellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen konnte gezeigt werden, dass eine Defizienz in IL-23 protektiv auf die Ausbildung einer Pathologie wirkt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Bedeutung von IL-23 für die *T. gondii*-induzierte Immunpathologie untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass IL-23-defiziente Mäuse eine geringer ausgeprägte Entzündung im Darm aufwiesen und einen signifikanten Überlebensvorteil gegenüber Wildtypmäusen nach einer Infektion hatten. Uhlig et al. postulierten 2006 eine differentielle Aktivität von IL-12 und IL-23. Während RAG1<sup>-/-</sup>/p35<sup>-/-</sup>-Mäuse eine durch die Gabe von anti-CD40-Antikörper induzierte Kolitis entwickeln, zeigen RAG1<sup>-/-</sup>/p19<sup>-/-</sup> Mäuse keine gastrointestinale Symptomatik sondern systemische Entzündungszeichen wie Gewichtsverlust und Splenomegalie [102].

Ein Grund für die differentielle Aktivität von IL-12 und IL-23 könnte die Regulation der Expression durch unterschiedliche TLR-Stimuli und die Zytokinumgebung sein. Ebenso denkbar wäre eine parallele Induktion von Th1- und Th17-Zellen.

Im Rahmen mykobakterieller Infektionen konnte eine parallele Induktion von Th1- und Th17-Zellen nachgewiesen werden, wobei die Th1-Antwort überwiegt [176]. Während IFN-γ die IL-12p70-Produktion steigert und die IL-23-Produktion senkt, blockiert IL-17 die IL-12-Produktion und steigert die IL-23-Ausschüttung [181, 195]. Auch in Stimulationsexperimenten mit Ovalbumin-spezifischen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass IFN-γ die Differenzierung IL-17-produzierender Zellen inhibiert [196, 197].

In mehreren Modellen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen wurde gezeigt, daß IL-23 eine Zytokinkaskade in Gang setzt, der erhöhte Spiegel von TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$  und IL-17 folgen [198]. Das von Th17-Zellen sezernierte IL-17 wurde bislang als wichtiger Faktor für die Induktion von einer Immunpathologie angesehen [100-106]. Hue et al. konnten im Darm von Mäusen mit *Helicobacter*-induzierter Kolitis eine erhöhte IL-17-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren nachweisen [105]. Eine Behandlung mit anti-p19 bewirkte eine Senkung der IFN- $\gamma$ -, IL-6- und IL-17-Konzentrationen und verringerte den Schweregrad der Kolitis. Im Transfer-Kolitis-Modell zeigten Darm und MLN von p19/RAG<sup>-/-</sup> Mäusen eine verminderte IFN- $\gamma$ - und IL-17-Ausschüttung [105]. Da IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse gegenüber der *T.gondii*-induzierten Ileitis resistent sind, wurde in Wildtyp-Mäusen eine Induktion von Th-17-Zellen und IL-17-Produktion erwartet. Nach der Infektion mit *T. gondii* fanden sich auf Proteinebene in unterschiedlichen Organsystemen in Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu IL-23<sup>-/-</sup>

<sup>/-</sup> Mäusen eine signifikant höhere IL-17-Konzentration, eine signifikant höhere IL-6

Produktion und eine signifikant verringerte IFN-γ-Produktion. Diese Ergebnisse stützen die Rolle der IL-23/IL-17-Kaskade. Auf mRNA-Ebene war jedoch kein IL-17 nachweisbar. Da IL-12-induziertes IFN-γ die Differenzierung von Th17-Zellen blockieren kann [25, 196, 197], müssen zukünftige Untersuchungen klären, ob die *T. gondii*-induzierte Immunpathologie IL-23-abhängig, aber IL-17-unabhängig ist. Da Th-17-Zellen neben IL-17 auch IL-22 produzieren können [182] und in IL-23p19-defizienten Mäusen eine verminderte IL-22-Konzentration nachgewiesen werden konnte, werden zukünftige Arbeiten auch die Funktion dieses Zytokins untersuchen.

Für die Parasitenkontrolle erscheint IL-23 bei der oralen Infektion mit *T. gondii* entbehrlich. Im Gegensatz zu IFN- $\gamma^{-/-}$  und auch IL-12p35/p40<sup>-/-</sup> Mäusen sterben IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse nicht an einer unkontrollierten Parasitenreplikation und zeigen auch keine erhöhte Parasitenlast.

Sollten IL-17 und/oder IL-22 für die *T. gondii*-induzierte Pathologie verantwortlich sein, so stellt sich weiterhin die Frage nach dem Effektormechanismus. Eine Imbalance zwischen MMPs und TIMPs spielt in chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eine wichtige Rolle [171, 199, 200]. In Mausmodellen der CED konnte ein Einfluss der Gelatinasen MMP-2 und - 9 auf die Pathologie gezeigt werden [201, 202]. In der vorliegenden Arbeit fand sich in IL-23p19-defizienten Mäusen eine verminderte Aktivität der Gelatinasen A und B, was auf eine Regulation der MMPs durch IL-23 hinweist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die *T. gondii*-induzierte Immunpathologie des Darmes IL-23-abhängig ist. Der Effektormechanismus wird derzeit in der Arbeitsgruppe untersucht. Abb. 27 zeigt eine schematische Darstellung der Immunpathogenese der oralen Infektion mit 100 Zysten *T. gondii*.



Abb. 27: Modell der T. gondii- induzierten Th1/Th17-Immunpathologie
## 6. Zusammenfassung

#### Die Bedeutung von IL-12 und IL-23 in der Immunantwort gegen Toxoplasma gondii

Nach Infektion mit *T. gondii* kommt es zu einer protektive Immunantwort vom Th1-Typ, die durch die IL-12-vermittelte IFN-γ-Produktion charakterisiert ist. Nach einer Hochdosis-Infektion entwickelt sich in empfänglichen Mäusen eine überschießende Th1-Immunantwort, die abhängig von IL-12 ist und der Immunpathologie des Morbus Crohn des Menschen gleicht. IL-12 besteht aus zwei Untereinheiten, p35 und p40, von denen p40 auch in dem kürzlich entdeckten IL-23 vorkommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Mausmodellen protektiver und überschießender Infektionen mit T. gondii der Einfluß der unterschiedlichen IL-12-Untereinheiten und des IL-23 untersucht. Dazu wurden Mäuse mit einer genetischen Deletion verschiedener IL-12-Untereinheiten oral mit einer niedrigen Dosis T. gondii infiziert. Die Überlebensrate, Parasitenlast und das Zytokinmuster unterschied sich nicht signifikant zwischen den Mäusen mit genetischer Deletion der p35, p40 oder beider IL-12-Ketten. Im Vergleich zum Wildtyp, der zu 100% überlebte, starben alle IL-12<sup>-/-</sup> Mäuse zwischen Tag 10 und 15. Sie zeigten eine erhöhte Parasitenlast bei geringerer IFN-y-Sekretion sowie eine erhöhte TNF-a- und Th2-Zytokinausschüttung. Im Gegensatz dazu kontrollierten Mäuse mit einer Defizienz des IL-18oder IL-23-Gens die Infektion mit 10 Zysten entsprechend der Wildtypkontrolle. Die beiden IL-12-Untereinheiten p35 und p40 scheinen somit gleichsam essentiell für den Aufbau einer protektiven Immunantwort gegen T. gondii zu sein, während IL-18 und IL-23 für die Kontrolle des Parasitenwachstums und damit für den Aufbau einer protektiven Immunantwort entbehrlich sind. Weiterhin wurde die Rolle von IL-23 im Modell der überschießenden Immunantwort auf eine Infektion mit T. gondii, die sich als Dünndarmpathologie manifestiert, untersucht. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, die zu 100% verstarben, überlebten 75% der IL-23<sup>-/-</sup> Mäuse und wiesen keine Nekrosen im Dünndarm auf. Interessanterweise konnte die IL-17-Sekretion als erniedrigt nachgewiesen werden, während die IL-22-Expression im Darm von Wildtyp- nicht aber von IL-23-defizienten Mäusen erhöht war. Weiterführende Arbeiten werden zeigen müssen, ob sich nach einer 100 Zysten-Infektion eine IL-23-abhängige, aber IL-17-unabhängige Immunpathologie entwickelt und welche Rolle in diesem Zusammenhang die sogenannten Th17-Zellen und IL-22 spielen.

Im letzten Teil der Arbeit wurde anhand von Knochenmarkschimären festgestellt, dass das für die Immunpathologie wichtige IL-18 von Knochenmarkszellen, nicht aber von Epithelzellen produziert wird. Somit sind vermutlich Makrophagen und/oder dendritische Zellen die Hauptquelle des IL-18. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten somit wichtige Beiträge zur Kenntnis über protektive und schädigende Immunantworten gegen *T. gondii* erbringen.

## 6. Summary

### The impact of IL-12 and IL-23 on immune response to Toxoplasma gondii

Following infection with *Toxoplasma gondii* a protective Th1-immune response is induced, characterized by IL-12 associated IFN-γ-production. Following high-dose infection, suszeptible mice develop a Th1-induced immunopathology, which is depending on IL-12 and similar to Crohns disease in humans. IL-12 contains two subunits, p35 and p40. p40 is also part of the recently discovered IL-23. This study examines the influence of the different subunits of IL-12 and IL-23 on immunity using murine modells of protectiv and detrimental immune responses.

Therefore mice with different genetic deletions of IL-12-subunits were infected with a low dose of *T. gondii*. Survival, parasite load and cytokine release did not differ comparing mice with a deletion in p35, p40 or both subunits. Comparing to wildtype animals, which survived up to 100%, IL-12-deficient mice all died after 10-15 days of infection. They displayed an increase in parasite load accompanied by decreased IFN- $\gamma$ -secretion and an increase in TNF- $\alpha$ - and Th2-cytokine-release. In contrast to IL-12-deficient mice, mice deficient in IL-18 controlled infection with 10 cysts. P35 and p40 both seem to be equally essentiell for protective immune responses to *T. gondii*, whereas IL-18 is dispensable for control of parasite replication and protective immune responses.

Furthermore, the role of IL-23 in a modell of Th1-induced immunopathology follwing highdose infection with *T. gondii*, which results in immunopathology in the terminal ileum, was examined. Compared to wildtype mice, which died up to 100%, 75% of IL-23<sup>-/-</sup> mice survived without any signs of necrosis in the ileum. Interestingly, no IL-17-expression could be shown in the gut, whereas in the terminal ileum of wildtype mice IL-22-expression but not IL-23expression was increased. Future studies have to reveal, if immunopathology following highdose infection with *T. gondii* is IL-23-dependent but indepent of IL-17, and examine the role of so called Th17 cells and IL-22.

In the concluding part of this study a model of bone marrow chimeras was used to show that the ammount of IL-18, which is essentiell for development of immunopathology is secreted by bone marrow descending cells, but not by epithelial cells. Therefore it is postulated that macrophages and/or dendritic cells resemble the main source of IL-18.

These results provide important contributions to knowledge and understanding of protective and detrimental immune responses to *T. gondii*.

## 7. Referenzen

- 1. Montoya, J.G. and O. Liesenfeld, *Toxoplasmosis*. Lancet, 2004. 363(9425): p. 1965-76.
- 2. Liesenfeld, O., *Immune responses to Toxoplasma gondii in the gut.* Immunobiology, 1999. 201(2): p. 229-39.
- 3. Tenter, A.M., A.R. Heckeroth, and L.M. Weiss, *Toxoplasma gondii: from animals to humans.* Int J Parasitol, 2000. 30(12-13): p. 1217-58.
- 4. Denkers, E.Y. and R.T. Gazzinelli, *Regulation and function of T-cell-mediated immunity during Toxoplasma gondii infection.* Clin Microbiol Rev, 1998. 11(4): p. 569-88.
- 5. Scharton-Kersten, T.M., et al., *In the absence of endogenous IFN-gamma, mice develop unimpaired IL-12 responses to Toxoplasma gondii while failing to control acute infection.* J Immunol, 1996. 157(9): p. 4045-54.
- 6. Yap, G., M. Pesin, and A. Sher, *Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii.* J Immunol, 2000. 165(2): p. 628-31.
- 7. Vossenkamper, A., et al., Both IL-12 and IL-18 contribute to small intestinal Th1type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii, but IL-12 is dominant over IL-18 in parasite control. Eur J Immunol, 2004. 34(11): p. 3197-207.
- 8. Maldonado-Lopez, R. and M. Moser, *Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses.* Semin Immunol, 2001. 13(5): p. 275-82.
- 9. Trinchieri, G., Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive *immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(2): p. 133-46.
- 10. Beutler, B., *Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling.* Nature, 2004. 430(6996): p. 257-63.
- 11. Yarovinsky, F., et al., *TLR11 activation of dendritic cells by a protozoan profilinlike protein.* Science, 2005. 308(5728): p. 1626-9.
- 12. Yarovinsky, F. and A. Sher, *Toll-like receptor recognition of Toxoplasma gondii*. Int J Parasitol, 2006. 36(3): p. 255-9.
- 13. Minns, L.A., et al., *TLR9 is required for the gut-associated lymphoid tissue response following oral infection of Toxoplasma gondii.* J Immunol, 2006. 176(12): p. 7589-97.
- 14. Debierre-Grockiego, F., et al., Activation of TLR2 and TLR4 by glycosylphosphatidylinositols derived from Toxoplasma gondii. J Immunol, 2007. 179(2): p. 1129-37.

- 15. Reis e Sousa, C., *Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls.* Semin Immunol, 2004. 16(1): p. 27-34.
- 16. Cai, G., et al., Identification of STAT4-dependent and independent mechanisms of resistance to Toxoplasma gondii. J Immunol, 2000. 165(5): p. 2619-27.
- 17. Dzierszinski, F.S. and C.A. Hunter, *Advances in the use of genetically engineered parasites to study immunity to Toxoplasma gondii.* Parasite Immunol, 2008.
- 18. Bertholet, S., et al., Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. J Immunol, 2006. 177(6): p. 3525-33.
- 19. Gubbels, M.J., et al., Class I major histocompatibility complex presentation of antigens that escape from the parasitophorous vacuole of Toxoplasma gondii. Infect Immun, 2005. 73(2): p. 703-11.
- 20. Romagnani, S., *T-cell responses in allergy and asthma.* Curr Opin Allergy Clin Immunol, 2001. 1(1): p. 73-8.
- 21. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. 383(6603): p. 787-93.
- 22. Liang, S.C., et al., Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J Exp Med, 2006. 203(10): p. 2271-9.
- 23. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties.* Immunity, 2006. 24(6): p. 677-88.
- 24. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. 2(12): p. 933-44.
- 25. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T*(*H*)17 *lineage*. Nature, 2006. 441(7090): p. 231-4.
- 26. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *CD4(+) regulatory T cells in autoimmunity and allergy.* Curr Opin Immunol, 2002. 14(6): p. 771-8.
- 27. Romagnani, P., et al., *Th1/Th2 cells, their associated molecules and role in pathophysiology.* Eur Cytokine Netw, 2000. 11(3): p. 510-1.
- 28. Sher, A., et al., *Toxoplasma gondii induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha.* J Immunol, 1993. 150(9): p. 3982-9.
- 29. Trinchieri, G. and P. Scott, *Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions.* Res Immunol, 1995. 146(7-8): p. 423-31.
- 30. Trinchieri, G., Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol, 1995. 13: p. 251-76.

- 31. Sieburth, D., et al., Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. Genomics, 1992. 14(1): p. 59-62.
- 32. Merberg, D.M., S.F. Wolf, and S.C. Clark, *Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family.* Immunol Today, 1992. 13(2): p. 77-8.
- **33.** Gearing, D.P. and D. Cosman, *Homology of the p40 subunit of natural killer cell stimulatory factor (NKSF) with the extracellular domain of the interleukin-6 receptor.* Cell, 1991. 66(1): p. 9-10.
- 34. Podlaski, F.J., et al., *Molecular characterization of interleukin 12.* Arch Biochem Biophys, 1992. 294(1): p. 230-7.
- 35. Gillessen, S., et al., *Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist.* Eur J Immunol, 1995. 25(1): p. 200-6.
- 36. Holscher, C., et al., A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. J Immunol, 2001. 167(12): p. 6957-66.
- 37. Gately, M.K., et al., Interleukin-12 antagonist activity of mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. Ann N Y Acad Sci, 1996. 795: p. 1-12.
- 38. Oppmann, B., et al., Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity, 2000. 13(5): p. 715-25.
- 39. Presky, D.H., et al., A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(24): p. 14002-7.
- 40. Rogge, L., et al., Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. J Exp Med, 1997. 185(5): p. 825-31.
- 41. Gorham, J.D., et al., Low dose TGF-beta attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells. J Immunol, 1998. 161(4): p. 1664-70.
- 42. Wu, C., et al., Regulation of interleukin-12 receptor beta1 chain expression and interleukin-12 binding by human peripheral blood mononuclear cells. Eur J Immunol, 1997. 27(1): p. 147-54.
- 43. Diefenbach, A., et al., *Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity.* Science, 1999. 284(5416): p. 951-5.
- 44. Bacon, C.M., et al., Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12. J Exp Med, 1995. 181(1): p. 399-404.
- 45. Bacon, C.M., et al., Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(16): p. 7307-11.

- 46. Naeger, L.K., et al., *Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling.* J Biol Chem, 1999. 274(4): p. 1875-8.
- 47. Yao, B.B., et al., *Direct interaction of STAT4 with the IL-12 receptor.* Arch Biochem Biophys, 1999. 368(1): p. 147-55.
- 48. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12dependent selection.* Science, 2001. 292(5523): p. 1907-10.
- 49. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells.* Nat Immunol, 2002. 3(6): p. 549-57.
- 50. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity.* Nat Immunol, 2001. 2(8): p. 675-80.
- 51. Cella, M., et al., Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. J Exp Med, 1996. 184(2): p. 747-52.
- 52. Medzhitov, R., et al., *MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways.* Mol Cell, 1998. 2(2): p. 253-8.
- 53. Rudolph, D., et al., Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. Genes Dev, 2000. 14(7): p. 854-62.
- 54. Plevy, S.E., et al., Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. Mol Cell Biol, 1997. 17(8): p. 4572-88.
- 55. An, M.R., et al., Evidence for posttranscriptional regulation of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression during the lipopolysaccharide-mediated acute-phase response. Mol Cell Biol, 1996. 16(5): p. 2295-306.
- 56. Ma, X., et al., Identification and characterization of a novel Ets-2-related nuclear complex implicated in the activation of the human interleukin-12 p40 gene promoter. J Biol Chem, 1997. 272(16): p. 10389-95.
- 57. Gri, G., et al., Synergistic regulation of the human interleukin-12 p40 promoter by NFkappaB and Ets transcription factors in Epstein-Barr virus-transformed B cells and macrophages. J Biol Chem, 1998. 273(11): p. 6431-8.
- 58. Salkowski, C.A., et al., *IL-12 is dysregulated in macrophages from IRF-1 and IRF-2 knockout mice.* J Immunol, 1999. 163(3): p. 1529-36.
- 59. Aste-Amezaga, M., et al., *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10.* J Immunol, 1998. 160(12): p. 5936-44.
- 60. Brombacher, F., *The role of interleukin-13 in infectious diseases and allergy.* Bioessays, 2000. 22(7): p. 646-56.
- 61. Du, C. and S. Sriram, *Mechanism of inhibition of LPS-induced IL-12p40* production by IL-10 and TGF-beta in ANA-1 cells. J Leukoc Biol, 1998. 64(1): p. 92-7.

- 62. Cousens, L.P., et al., *Two roads diverged: interferon alpha/beta- and interleukin 12-mediated pathways in promoting T cell interferon gamma responses during viral infection.* J Exp Med, 1999. 189(8): p. 1315-28.
- 63. Ma, X. and G. Trinchieri, *Regulation of interleukin-12 production in antigen*presenting cells. Adv Immunol, 2001. 79: p. 55-92.
- 64. D'Andrea, A., et al., Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. J Exp Med, 1993. 178(3): p. 1041-8.
- 65. Alexander, W.S., et al., SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. Cell, 1999. 98(5): p. 597-608.
- 66. Eyles, J.L., et al., Negative regulation of interleukin-12 signaling by suppressor of cytokine signaling-1. J Biol Chem, 2002. 277(46): p. 43735-40.
- 67. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein, *The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses.* Immunity, 2003. 19(5): p. 641-4.
- 68. Holscher, C., *The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases.* Med Microbiol Immunol, 2004. 193(1): p. 1-17.
- 69. Brombacher, F., R.A. Kastelein, and G. Alber, *Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses.* Trends Immunol, 2003. 24(4): p. 207-12.
- 70. Mattner, F., et al., Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with Leishmania major and mount a polarized Th2 cell response. Eur J Immunol, 1996. 26(7): p. 1553-9.
- 71. Murray, H.W., et al., Responses to Leishmania donovani in mice deficient in interleukin-12 (IL-12), IL-12/IL-23, or IL-18. Infect Immun, 2006. 74(7): p. 4370-4.
- 72. Cooper, A.M., et al., Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. J Exp Med, 1997. 186(1): p. 39-45.
- 73. Wakeham, J., et al., Lack of both types 1 and 2 cytokines, tissue inflammatory responses, and immune protection during pulmonary infection by Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin in IL-12-deficient mice. J Immunol, 1998. 160(12): p. 6101-11.
- 74. de Jong, R., et al., Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients. Science, 1998. 280(5368): p. 1435-8.
- 75. Altare, F., et al., *Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency.* Science, 1998. 280(5368): p. 1432-5.

- 76. Casanova, J.L. and L. Abel, *The human model: a genetic dissection of immunity to infection in natural conditions.* Nat Rev Immunol, 2004. 4(1): p. 55-66.
- 77. Khader, S.A., et al., Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection. J Exp Med, 2006. 203(7): p. 1805-15.
- 78. Ehlers, S., et al., Interleukin-12p40 mediates transient protection against Mycobacterium avium infection in the absence of interleukin-12. Immunobiology, 2005. 210(2-4): p. 217-27.
- 79. Cooper, A.M., et al., *Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen*specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. J Immunol, 2002. 168(3): p. 1322-7.
- 80. Chackerian, A.A., et al., Neutralization or absence of the interleukin-23 pathway does not compromise immunity to mycobacterial infection. Infect Immun, 2006. 74(11): p. 6092-9.
- 81. Lehmann, J., et al., *IL-12p40-dependent agonistic effects on the development of protective innate and adaptive immunity against Salmonella enteritidis.* J Immunol, 2001. 167(9): p. 5304-15.
- 82. Park, A.Y., et al., *The role of IL-12 in maintaining resistance to Leishmania major.* J Immunol, 2002. 168(11): p. 5771-7.
- 83. Lieberman, L.A., et al., *IL-23 provides a limited mechanism of resistance to acute toxoplasmosis in the absence of IL-12.* J Immunol, 2004. 173(3): p. 1887-93.
- 84. Mannon, P.J., et al., *Anti-interleukin-12 antibody for active Crohn's disease*. N Engl J Med, 2004. 351(20): p. 2069-79.
- 85. McIntyre, K.W., et al., *Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice.* Eur J Immunol, 1996. 26(12): p. 2933-8.
- 86. Leonard, J.P., K.E. Waldburger, and S.J. Goldman, *Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by interleukin-12.* Ann N Y Acad Sci, 1996. 795: p. 216-26.
- 87. Langrish, C.L., et al., *IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity.* Immunol Rev, 2004. 202: p. 96-105.
- 88. Hunter, C.A., New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. Nat Rev Immunol, 2005. 5(7): p. 521-31.
- 89. Sanjabi, S., et al., Selective requirement for c-Rel during IL-12 P40 gene induction in macrophages. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(23): p. 12705-10.
- 90. Grumont, R., et al., *c-Rel regulates interleukin 12 p70 expression in CD8(+)* dendritic cells by specifically inducing p35 gene transcription. J Exp Med, 2001. 194(8): p. 1021-32.

- 91. Carmody, R.J., et al., *Essential roles of c-Rel in TLR-induced IL-23 p19 gene* expression in dendritic cells. J Immunol, 2007. 178(1): p. 186-91.
- 92. Ouyang, X., et al., Cooperation between MyD88 and TRIF pathways in TLR synergy via IRF5 activation. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 354(4): p. 1045-51.
- 93. Goriely, S., M.F. Neurath, and M. Goldman, *How microorganisms tip the balance between interleukin-12 family members.* Nat Rev Immunol, 2008. 8(1): p. 81-6.
- 94. Re, F. and J.L. Strominger, *Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells.* J Biol Chem, 2001. 276(40): p. 37692-9.
- 95. LeibundGut-Landmann, S., et al., *Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17.* Nat Immunol, 2007. 8(6): p. 630-8.
- 96. Sheibanie, A.F., et al., *Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrowderived dendritic cells.* Faseb J, 2004. 18(11): p. 1318-20.
- 97. Schnurr, M., et al., Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. Blood, 2005. 105(4): p. 1582-9.
- 98. Kleinschek, M.A., et al., *IL-23 enhances the inflammatory cell response in Cryptococcus neoformans infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12.* J Immunol, 2006. 176(2): p. 1098-106.
- 99. Happel, K.I., et al., *Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against Klebsiella pneumoniae.* J Exp Med, 2005. 202(6): p. 761-9.
- 100. Cua, D.J., et al., Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature, 2003. 421(6924): p. 744-8.
- 101. Murphy, C.A., et al., Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. J Exp Med, 2003. 198(12): p. 1951-7.
- 102. Uhlig, H.H., et al., Differential activity of IL-12 and IL-23 in mucosal and systemic innate immune pathology. Immunity, 2006. 25(2): p. 309-18.
- 103. Yen, D., et al., *IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6.* J Clin Invest, 2006. 116(5): p. 1310-6.
- 104. Kullberg, M.C., et al., *IL-23 plays a key role in Helicobacter hepaticus-induced T cell-dependent colitis.* J Exp Med, 2006. 203(11): p. 2485-94.
- 105. Hue, S., et al., Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. J Exp Med, 2006. 203(11): p. 2473-83.
- 106. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation.* J Exp Med, 2005. 201(2): p. 233-40.

- 107. Aggarwal, S., et al., Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem, 2003. 278(3): p. 1910-4.
- 108. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation*. Immunity, 2004. 21(4): p. 467-76.
- 109. Kelly, M.N., et al., Interleukin-17/interleukin-17 receptor-mediated signaling is important for generation of an optimal polymorphonuclear response against Toxoplasma gondii infection. Infect Immun, 2005. 73(1): p. 617-21.
- 110. Okamura, H., et al., *Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells.* Nature, 1995. 378(6552): p. 88-91.
- 111. Stoll, S., et al., Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. Eur J Immunol, 1998. 28(10): p. 3231-9.
- 112. Nakanishi, K., et al., Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. Cytokine Growth Factor Rev, 2001. 12(1): p. 53-72.
- 113. Lochner, M. and I. Forster, *Anti-interleukin-18 therapy in murine models of inflammatory bowel disease*. Pathobiology, 2002. 70(3): p. 164-9.
- 114. Dinarello, C.A., Interleukin-18. Methods, 1999. 19(1): p. 121-32.
- 115. Gracie, J.A., S.E. Robertson, and I.B. McInnes, *Interleukin-18.* J Leukoc Biol, 2003. 73(2): p. 213-24.
- 116. Kim, S.H., et al., *Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18R beta chain.* J Immunol, 2001. 166(1): p. 148-54.
- 117. Debets, R., et al., *IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL-1RAcPL antibody, a potent antagonist of IL-18.* J Immunol, 2000. 165(9): p. 4950-6.
- 118. Yoshimoto, T., et al., *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. 161(7): p. 3400-7.
- 119. Nakamura, S., et al., *Expression and responsiveness of human interleukin-18 receptor (IL-18R) on hematopoietic cell lines.* Leukemia, 2000. 14(6): p. 1052-9.
- 120. Gerdes, N., et al., *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. 195(2): p. 245-57.
- 121. Dunne, A. and L.A. O'Neill, *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor* superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. Sci STKE, 2003. 2003(171): p. re3.

- 122. Bowie, A. and L.A. O'Neill, *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor* superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. J Leukoc Biol, 2000. 67(4): p. 508-14.
- 123. Kalina, U., et al., *IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21.* J Immunol, 2000. 165(3): p. 1307-13.
- 124. Sareneva, T., I. Julkunen, and S. Matikainen, *IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells.* J Immunol, 2000. 165(4): p. 1933-8.
- 125. Neumann, D. and M.U. Martin, *Interleukin-12 upregulates the IL-18Rbeta chain in BALB/c thymocytes.* J Interferon Cytokine Res, 2001. 21(8): p. 635-42.
- 126. Smeltz, R.B., et al., Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4(+) T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation. Critical downregulatory role of IL-4. J Exp Med, 2001. 194(2): p. 143-53.
- 127. Smeltz, R.B., et al., Role of IFN-gamma in Th1 differentiation: IFN-gamma regulates IL-18R alpha expression by preventing the negative effects of IL-4 and by inducing/maintaining IL-12 receptor beta 2 expression. J Immunol, 2002. 168(12): p. 6165-72.
- 128. Akita, K., et al., Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. J Biol Chem, 1997. 272(42): p. 26595-603.
- 129. Bufler, P., et al., A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(21): p. 13723-8.
- 130. Novick, D., et al., Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. Immunity, 1999. 10(1): p. 127-36.
- 131. Kim, S.H., et al., 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. 97(3): p. 1190-5.
- 132. Hurgin, V., D. Novick, and M. Rubinstein, *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. 99(26): p. 16957-62.
- 133. Paulukat, J., et al., *Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma.* J Immunol, 2001. 167(12): p. 7038-43.
- 134. Robinson, D., et al., *IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB.* Immunity, 1997. 7(4): p. 571-81.

- 135. Netea, M.G., et al., Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. Eur J Immunol, 2000. 30(10): p. 3057-60.
- 136. Chang, J.T., et al., The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigenspecific 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. 30(4): p. 1113-9.
- 137. Reddy, P., Interleukin-18: recent advances. Curr Opin Hematol, 2004. 11(6): p. 405-10.
- 138. Nakanishi, K., et al., *Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses.* Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 423-74.
- 139. Sugawara, I., et al., Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. Infect Immun, 1999. 67(5): p. 2585-9.
- 140. Dybing, J.K., N. Walters, and D.W. Pascual, *Role of endogenous interleukin-18 in resolving wild-type and attenuated Salmonella typhimurium infections.* Infect Immun, 1999. 67(12): p. 6242-8.
- 141. Mastroeni, P., et al., Interleukin 18 contributes to host resistance and gamma interferon production in mice infected with virulent Salmonella typhimurium. Infect Immun, 1999. 67(2): p. 478-83.
- 142. Fujioka, N., et al., Interleukin-18 protects mice against acute herpes simplex virus type 1 infection. J Virol, 1999. 73(3): p. 2401-9.
- 143. Tanaka-Kataoka, M., et al., *In vivo antiviral effect of interleukin 18 in a mouse model of vaccinia virus infection.* Cytokine, 1999. 11(8): p. 593-9.
- 144. Kawakami, K., et al., *IL-18 contributes to host resistance against infection with Cryptococcus neoformans in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK cells.* J Immunol, 2000. 165(2): p. 941-7.
- 145. Stuyt, R.J., et al., Role of interleukin-18 in host defense against disseminated Candida albicans infection. Infect Immun, 2002. 70(6): p. 3284-6.
- 146. Muller, U., et al., *IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18.* J Immunol, 2001. 167(6): p. 3346-53.
- 147. Monteforte, G.M., et al., *Genetically resistant mice lacking IL-18 gene develop Th1* response and control cutaneous Leishmania major infection. J Immunol, 2000. 164(11): p. 5890-3.
- 148. Hein, J., et al., Interleukin-12 and interleukin-18 are indispensable for protective immunity against enteropathogenic Yersinia. Microb Pathog, 2001. 31(4): p. 195-9.
- 149. Huang, X., et al., *IL-18 contributes to host resistance against infection with Pseudomonas aeruginosa through induction of IFN-gamma production.* J Immunol, 2002. 168(11): p. 5756-63.

- 150. Paterson, G.K., C.E. Blue, and T.J. Mitchell, *Role of interleukin-18 in* experimental infections with Streptococcus pneumoniae. J Med Microbiol, 2005. 54(Pt 4): p. 323-6.
- 151. Hochholzer, P., et al., Role of interleukin-18 (IL-18) during lethal shock: decreased lipopolysaccharide sensitivity but normal superantigen reaction in IL-18-deficient mice. Infect Immun, 2000. 68(6): p. 3502-8.
- 152. Liew, F.Y., *The role of innate cytokines in inflammatory response.* Immunol Lett, 2003. 85(2): p. 131-4.
- 153. Wong, C.K., et al., *Elevation of plasma interleukin-18 concentration is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus.* Rheumatology (Oxford), 2000. 39(10): p. 1078-81.
- 154. Pizarro, T.T., et al., *IL-18*, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. J Immunol, 1999. 162(11): p. 6829-35.
- 155. Naftali, T., et al., Interleukin-18 and its binding protein in patients with inflammatory bowel disease during remission and exacerbation. Isr Med Assoc J, 2007. 9(7): p. 504-8.
- 156. Kanai, T., et al., *Interleukin-18 and Crohn's disease*. Digestion, 2001. 63 Suppl 1: p. 37-42.
- 157. Camoglio, L., et al., *Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice.* Eur J Immunol, 2000. 30(5): p. 1486-95.
- 158. Ten Hove, T., et al., Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. Gastroenterology, 2001. 121(6): p. 1372-9.
- 159. Siegmund, B., et al., *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. 281(4): p. R1264-73.
- 160. Kanai, T., et al., *Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease.* Gastroenterology, 2001. 121(4): p. 875-88.
- 161. Siegmund, B., Interleukin-1beta converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. Biochem Pharmacol, 2002. 64(1): p. 1-8.
- 162. Monteleone, G., et al., *Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease*. J Immunol, 1999. 163(1): p. 143-7.
- 163. Kanai, T., et al., Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. Gastroenterology, 2000. 119(6): p. 1514-23.
- 164. Furuya, D., et al., Serum interleukin-18 concentrations in patients with inflammatory bowel disease. J Immunother, 2002. 25 Suppl 1: p. S65-7.

- 165. Ludwiczek, O., et al., *Elevated systemic levels of free interleukin-18 (IL-18) in patients with Crohn's disease*. Eur Cytokine Netw, 2005. 16(1): p. 27-33.
- 166. Lambert, H., et al., Induction of dendritic cell migration upon Toxoplasma gondii infection potentiates parasite dissemination. Cell Microbiol, 2006. 8(10): p. 1611-23.
- 167. Liesenfeld, O., et al., Association of CD4+ T cell-dependent, interferon-gammamediated necrosis of the small intestine with genetic susceptibility of mice to peroral infection with Toxoplasma gondii. J Exp Med, 1996. 184(2): p. 597-607.
- 168. Liesenfeld, O., Oral infection of C57BL/6 mice with Toxoplasma gondii: a new model of inflammatory bowel disease? J Infect Dis, 2002. 185 Suppl 1: p. S96-101.
- 169. Reischl, U., et al., Comparison of two DNA targets for the diagnosis of Toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. BMC Infect Dis, 2003. 3: p. 7.
- 170. Wolk, K., et al., *IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease.* J Immunol, 2007. 178(9): p. 5973-81.
- 171. Naito, Y. and T. Yoshikawa, *Role of matrix metalloproteinases in inflammatory bowel disease.* Mol Aspects Med, 2005. 26(4-5): p. 379-90.
- 172. Medina, C. and M.W. Radomski, *Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. 318(3): p. 933-8.
- 173. Mattner, F., K. Di Padova, and G. Alber, *Interleukin-12 is indispensable for* protective immunity against Leishmania major. Infect Immun, 1997. 65(11): p. 4378-83.
- 174. Elkins, K.L., et al., *In vivo clearance of an intracellular bacterium, Francisella tularensis LVS, is dependent on the p40 subunit of interleukin-12 (IL-12) but not on IL-12 p70.* Infect Immun, 2002. 70(4): p. 1936-48.
- 175. Decken, K., et al., Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with Cryptococcus neoformans. Infect Immun, 1998. 66(10): p. 4994-5000.
- 176. Khader, S.A., et al., *IL-23 compensates for the absence of IL-12p70 and is essential for the IL-17 response during tuberculosis but is dispensable for protection and antigen-specific IFN-gamma responses if IL-12p70 is available.* J Immunol, 2005. 175(2): p. 788-95.
- 177. Nigg, A.P., et al., Dendritic cell-derived IL-12p40 homodimer contributes to susceptibility in cutaneous leishmaniasis in BALB/c mice. J Immunol, 2007. 178(11): p. 7251-8.
- 178. Smits, H.H., et al., Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. Eur J Immunol, 2004. 34(5): p. 1371-80.

- 179. Kastelein, R.A., C.A. Hunter, and D.J. Cua, *Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation.* Annu Rev Immunol, 2007. 25: p. 221-42.
- 180. Edwards, A.D., et al., *Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering.* J Immunol, 2002. 169(7): p. 3652-60.
- 181. Cruz, A., et al., *Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection.* J Immunol, 2006. 177(3): p. 1416-20.
- 182. Zheng, Y., et al., Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. Nature, 2007. 445(7128): p. 648-51.
- 183. Bettelli, E., M. Oukka, and V.K. Kuchroo, *T*(*H*)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. Nat Immunol, 2007. 8(4): p. 345-50.
- 184. Happel, K.I., et al., *Cutting edge: roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to Klebsiella pneumoniae infection.* J Immunol, 2003. 170(9): p. 4432-6.
- 185. Neighbors, M., et al., A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to Listeria monocytogenes that extends beyond its effects on Interferon gamma production. J Exp Med, 2001. 194(3): p. 343-54.
- Cai, G., R. Kastelein, and C.A. Hunter, Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to Toxoplasma gondii. Infect Immun, 2000. 68(12): p. 6932-8.
- 187. Price, J.D., et al., Gamma interferon-independent effects of interleukin-12 on immunity to Salmonella enterica serovar Typhimurium. Infect Immun, 2007. 75(12): p. 5753-62.
- 188. Bohn, E., et al., *IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice.* J Immunol, 1998. 160(1): p. 299-307.
- 189. Lauw, F.N., et al., *IL-18 improves the early antimicrobial host response to pneumococcal pneumonia.* J Immunol, 2002. 168(1): p. 372-8.
- 190. Kohka, H., et al., Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. J Leukoc Biol, 1998. 64(4): p. 519-27.
- 191. Reuter, B.K. and T.T. Pizarro, Commentary: the role of the IL-18 system and other members of the IL-1R/TLR superfamily in innate mucosal immunity and the pathogenesis of inflammatory bowel disease: friend or foe? Eur J Immunol, 2004. 34(9): p. 2347-55.
- 192. Puren, A.J., et al., Interleukin-18 (IFNgamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNFalpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. J Clin Invest, 1998. 101(3): p. 711-21.

- 193. Heimesaat, M.M., et al., *Gram-negative bacteria aggravate murine small intestinal Th1-type immunopathology following oral infection with Toxoplasma gondii.* J Immunol, 2006. 177(12): p. 8785-95.
- 194. Piskin, G., et al., Clinical improvement in chronic plaque-type psoriasis lesions after narrow-band UVB therapy is accompanied by a decrease in the expression of IFN-gamma inducers -- IL-12, IL-18 and IL-23. Exp Dermatol, 2004. 13(12): p. 764-72.
- 195. Khader, S.A. and A.M. Cooper, *IL-23 and IL-17 in tuberculosis*. Cytokine, 2008. 41(2): p. 79-83.
- 196. Harrington, L.E., et al., Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1123-32.
- 197. Park, H., et al., A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1133-41.
- 198. McGovern, D. and F. Powrie, *The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD.* Gut, 2007. 56(10): p. 1333-6.
- 199. Kirkegaard, T., et al., *Expression and localisation of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fistulae of patients with Crohn's disease.* Gut, 2004. 53(5): p. 701-9.
- 200. von Lampe, B., et al., Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. Gut, 2000. 47(1): p. 63-73.
- 201. Santana, A., et al., Attenuation of dextran sodium sulphate induced colitis in matrix metalloproteinase-9 deficient mice. World J Gastroenterol, 2006. 12(40): p. 6464-72.
- 202. Garg, P., et al., Selective ablation of matrix metalloproteinase-2 exacerbates experimental colitis: contrasting role of gelatinases in the pathogenesis of colitis. J Immunol, 2006. 177(6): p. 4103-12.

# 8. Abkürzungen

Kürzel	Bezeichnung
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μΜ	Mikromolar
А	Adenosin
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AIDS	(engl.) Aquired-Immuno-Deficiency-Syndrome
AK	Antikörper
Anti-Fcg	Antikörper gegen den Fcy-Rezeptor
APC	(engl.) Antigen presenting cell
ATP	Adenosintriphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guerin
BMD-DC	(engl.) Bone marrow Derived- DC
bp	bindendes Protein
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	(engl.) Cluster of Differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	(engl.) cyclic DNA
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CIA	(engl.) Collagen-Induced Arthritis
cm	Zentimeter
Ср	(engl.) Crossing point
DC	(engl.) Dendritic Cell
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNTP	Nucleotidtriphosphat
DS	Daniela Struck
DSS	Dextransodiumsulfat

DTT	Dithiotreitol
EAE	(engl.) Experimental Autoimmune Encephalitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	(engl.) Enzyme-linked Immunosorbend Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	(lat) 'et alii', 'und andere'
FACS	(engl.) Flourescence Activated Cell Sorting -
	Durchflußzytometrie
FCS	(engl.) Fetal Calf Serum
FEM	Forschungseinrichtungen für experimentelle
	Medizin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszein
g	Erdbeschleunigung
g	Guanosin
G-CSF	(engl.) Granulocyte Colony Stimulating Factor
H&E	Hämatoxolin & Eosin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HP	(engl.) Hybridisation Probes
HPRT	Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl transferase
HRP	(engl.) Horse Radish Peroxidase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IBD	(engl.) Infectious Bowel Disease
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon gamma
IL	Interleukin
IRF	Interferon-regulierender Faktor
kd	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Knochenmark
LC	Light Cycler
LPL	Lamina propria Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid

MHC	(engl.) Major Histocompatibility Complex
min	Minuten
ml	Milliliter
MLN	Mesenteriale Lymphknoten
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MPI	Max-Planck-Institut
Mtb	Mykobakterium tuberculosis
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene
	(88)
n	Anzahl
NFkB	(engl.) Nuclear Factor-kappa B
ng	Nanogramm
nGZ	Neutrophile Granulozyten
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
o.b.	oben besprochen
p.o.	per os
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
pg	Picogramm
PGE2	Prostaglandin E2
PGN	Peptidoglycan
PMA	Polymycin A
qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
rad	(engl.) radium absorbed dosis
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	(engl.) rounds per minute

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
S.O.	siehe oben
sek	Sekunde
SOCS	(engl.) Supressors of Cytokine Signalling
spp.	Spezies
STAT	(engl.) Signal Transducers and Activators of
	Transcription
std.	Stunde
Т	Thymidin
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell Rezeptor
TGF	Tumor-growth-factor
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TLR	(engl.) Toll-like Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tregs	regulatorische T-Zellen
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VS.	versus
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

# 9. Publikationen

 Milanovic M, Terszowski G, Struck D, Liesenfeld O, Carstanjen D. "IFN consensus sequence binding protein (Icsbp) is critical for eosinophil development."
 J Immunol. 2008 Oct 1;181(7):5045-53.

2. Pawlowski NN, Struck D, Grollich K, Kuhl AA, Zeitz M, Liesenfeld O, Hoffmann JC.
"CD2 deficiency partially prevents small bowel inflammation and improves parasite control in murine Toxoplasma gondii infection."
World J Gastroenterol. 2007 Aug 21;13(31):4207-13.

 Heimesaat MM, Bereswill S, Fischer A, Fuchs D, Struck D, Niebergall J, Jahn HK, 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 Dec 15;177(12):8785-95.

4. 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):3197-207.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die durch ihren Einsatz diese Arbeit ermöglicht haben.

Zuvorderst sei Prof. Oliver Liesenfeld genannt, der stets mit viel Geduld, Verständnis, aber auch entscheidenden Impulsen an den richtigen Stellen zur Stelle war. Ebenso danke ich Prof. Wieler für seine Einsatzbereitschaft und die zahlreichen ermutigenden Worte.

Die gesamte AG Liesenfeld sei genannt - im Wandel der Jahre- begonnen mit Andrea Maletz und Dr. Ildiko Dunay, die meinen Einstieg in die experimentelle Arbeit unterstützten. Berit Söhl-Kielczynski, Dr. Hend Shubar, Sabrina Lachenmaier und Michaela Wattrodt, die mir immer hilfsbereit zur Seite standen.

Solvy Wolke, die mir zeigte, wie vielschichtig, allumfassend und vor allem lustig Teamarbeit sein kann, Markus M. Heimesaat von dem ich enorm viel über wissenschaftliches Arbeiten, Einsatzbereitschaft, eigene Grenzen und das Überschreiten derselben gelernt habe, Uwe Lohmann, der mich stets in allem unterstützte und durch seinen natürlichen Optimismus vorantrieb- diesen Dreien gilt mein besonderer Dank, denn sie haben mir auch viel über Freundschaft beigebracht.

Genannt sei auch Melba Munoz- es hätte keine bessere Nachfolgerin geben können!

Danken möchte ich den Mitarbeitern in unserem Tierstall, die unglaublichen Einsatz zeigten, um ich den unser Labor im Nachhinein noch beneide: Francesco Contini, Thomas Strandt, Elfi Decher und Gabi Dambon.

Weiterhin besonders erwähnen möchte ich unsere medizinischen Doktoranden Ingmar Frank, Julius Hoehne, Henriette Stephuhn und andere, die entscheidend zu unserem positiven Arbeitsklima beigetragen haben.

Die ehemalige AG Ignatius, die mir immer mit Rat, Tat und PMA/Iono zur Seite stand, namentlich Dr. Edith Jasni, Dr. Martin Eisenblätter, Ursula Rüschendorf, Pablo Renner und Prof. Dr. Ralf Ignatius.

Unsere Kooperationspartner Dr. Ulrich Steinhoff, PD Dr. Kerstin Bonhagen, Prof. Thomas Kamradt, Dr. Kerstin Danker, Dr. Robert Sabat, Dr. Christoph Hölscher und Prof. Gottfried Alber.

Und nicht zuletzt meine Familie und Freunde, die des Anfeuerns nie müde wurden!

## Danke!

## Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Daniela Struck

Berlin, den 18.10.2008