

Aus dem  
Institut für Immunologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Interleukin-12 unabhängige Wirkungen von  
p40-Zytokinen in der Infekt- und Tumorabwehr**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Christoph Werner  
aus Mannheim

Leipzig, 2002

meinen Eltern

Eingefahrene Wege geben sicheren Tritt –  
doch erreicht man über sie nur selten Neues!

Otto Bögeholz

<b>1</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	LITERATURÜBERSICHT .....	1
1.1.1	<i>Die angeborene Immunantwort .....</i>	<i>1</i>
1.1.2	<i>Die adaptive Immunantwort .....</i>	<i>4</i>
1.1.2.1	Typ 1- und Typ 2-Immunantworten .....	4
1.1.2.2	Zellen der Typ 1-Immunantwort .....	6
1.1.2.3	Zytokine der Typ 1-Immunantwort .....	7
1.1.2.3.1	Die p40-Zytokinfamilie .....	7
1.1.2.3.2	Die Aktivatormoleküle IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$ .....	11
1.1.3	<i>Verlauf der Immunantwort gegen Salmonella Enteritidis und Tumoren .....</i>	<i>11</i>
1.2	ZIELSETZUNG .....	15
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>16</b>
2.1	MATERIAL .....	16
2.1.1	<i>Geräte und Verbrauchsmaterial .....</i>	<i>16</i>
2.1.1.1	Geräte .....	16
2.1.1.2	Verbrauchsmaterial .....	16
2.1.1.3	Software .....	17
2.1.2	<i>Mäuse .....</i>	<i>17</i>
2.1.2.1	129Sv/Ev-Mäuse .....	17
2.1.2.2	BALB/c-Mäuse .....	17
2.1.2.3	C57BL/6-Mäuse .....	18
2.1.3	<i>Biologische Materialien .....</i>	<i>18</i>
2.1.3.1	Eukaryote Zelllinien .....	18
2.1.3.2	Bakterien .....	18
2.1.3.3	Plasmide .....	18
2.1.3.4	Proteine und Enzyme .....	19
2.1.3.4.1	Proteine .....	19
2.1.3.4.2	Enzyme .....	20
2.1.3.5	Antikörper und Proteine .....	20
2.1.3.5.1	Antikörper und Proteine für den ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) .....	20
2.1.3.5.2	Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen .....	21
2.1.3.6	Vorgefertigte Lösungen und Systeme („Kits“) .....	21

2.1.3.7	Lösungen, Puffer und Medien .....	22
2.1.3.7.1	Standardpuffer .....	22
2.1.3.7.2	Puffer und Lösungen für den ELISA .....	22
2.1.3.7.3	Puffer, Lösungen und Medien für die Zellkultur .....	23
2.1.3.7.4	Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie .....	23
2.2	METHODEN .....	24
2.2.1	<i>Zellkultur</i> .....	24
2.2.1.1	Allgemeines zur Arbeit mit Zellen in Kultur .....	24
2.2.1.2	Zelllinien .....	24
2.2.2	<i>Enzym gekoppelter Immuntest (ELISA)</i> .....	25
2.2.2.1	IL-12p40, IL-12p75 und IFN- $\gamma$ ELISA.....	25
2.2.3	<i>Immunhistochemie</i> .....	26
2.2.3.1	Entnahme der Gewebe und Herstellung der Gefrierschnitte.....	26
2.2.3.2	Immunhistochemische Färbung .....	26
2.2.3.3	Auswertung der Präparate .....	27
2.2.4	<i>Salmonellen Infektionsmodell</i> .....	27
2.2.4.1	In vivo Infektionsmodell .....	27
2.2.4.1.1	Infektion.....	27
2.2.4.1.2	Untersuchung der Mäuse am Ende des Experimentes.....	27
2.2.5	<i>Gentherapie im Tumormodell</i> .....	29
2.2.5.1	Arbeitsprinzip der Genkanone .....	29
2.2.5.2	Herstellung der Patronen für die Genkanone .....	30
2.2.5.2.1	Mengenkalkulation .....	30
2.2.5.2.2	Herstellen der DNA-Gold-Suspension (CaCl <sub>2</sub> -Präzipitation).....	30
2.2.5.3	Patronenherstellung.....	31
2.2.5.4	Transfektion in der Zellkultur .....	32
2.2.5.5	Implantation der Tumorzellen.....	32
2.2.5.6	Gentherapie am Tier.....	33
2.2.5.6.1	Gentherapie an der Maus .....	33
2.2.5.6.2	Erhebung der experimentellen Befunde.....	34
2.2.6	<i>Therapie der Tumore mit Zytokinen</i> .....	35
2.2.7	<i>In vitro Modelle</i> .....	35
2.2.7.1.1	Gewinnen der primären Zellkulturen.....	35
2.2.7.1.2	Infektion bzw. Stimulation der primären Zellkulturen .....	36

2.2.7.1.3	Gewinnen der Kulturüberstände .....	36
2.3	EXPERIMENTELLE SYSTEME .....	37
2.3.1	<i>Modell des Funktionsverlustes – Das Infektionsmodell</i> .....	37
2.3.2	<i>Modell des Funktionsgewinns – Das Tumormodell</i> .....	38
2.3.3	<i>Statistische Methoden</i> .....	41
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>42</b>
3.1	IL-12-UNABHÄNGIGE EFFEKTE VON P40-PROTEINEN IN DER IMMUNANTWORT GEGEN <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> .....	42
3.1.1	<i>Überleben der Mäuse nach der Infektion mit Salmonella Enteritidis</i> .....	42
3.1.2	<i>Untersuchung der frühen Infektionsphase</i> .....	44
3.2	EFFEKTE VON P40 IN DER TUMORABWEHR .....	47
3.2.1	<i>Effekt der Transfektion von Tumorzellen in vitro</i> .....	47
3.2.1.1	Untersuchung der Expression von p40 und IL-12 <i>in vitro</i> .....	47
3.2.2	<i>Gentherapie von Tumoren im Mausmodell</i> .....	48
3.2.2.1	Untersuchung der Eindringtiefe der Partikel <i>in vivo</i> .....	48
3.2.2.2	p40 Gentherapie von Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom .....	48
3.2.2.2.1	Wachstum der Tumoren .....	49
3.2.2.2.2	Immunhistochemische Untersuchung der Tumoren .....	50
3.2.2.3	Gentherapie des Melanom B16 .....	54
3.2.2.3.1	Wachstum der Tumoren .....	55
3.2.3	<i>Therapie von Tumoren im Mausmodell mit p40-abhängigen Zytokinen</i> .....	55
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR BEDEUTUNG DER P40-PROTEINE <i>IN VITRO</i> .....	57
3.3.1	<i>Untersuchung des Effektes der p40 Proteine auf naive Milzzellen</i> .....	57
3.3.2	<i>Untersuchungen zur Bedeutung der p40 Proteine in einem in vitro Infektionsmodell</i> .....	61
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>64</b>
4.1	PROTEKTIVE EFFEKTE VON P40-PROTEINEN OHNE IL-12 IN DER PRIMÄREN IMMUNANTWORT GEGEN <i>SALMONELLA ENTERITIDIS</i> .....	66
4.2	EFFEKTE VON P40 IN DER TUMORABWEHR .....	68
4.2.1	<i>Eine Gentherapie von Tumoren mit p40 führt zu reduziertem Tumorwachstum</i> .....	68
4.2.2	<i>Protektive Effekte durch verminderte Neoangiogenese und erhöhte Makrophagenimmigration</i> .....	70

4.2.3	<i>Sind (p40)<sub>2</sub> , IL-23 oder ein anderes Zytokin für die protektiven Effekte im Tumormodell verantwortlich?</i> .....	71
4.3	LASSEN SICH DIE <i>IN VIVO</i> EFFEKTE <i>IN VITRO</i> NACHVOLLZIEHEN? .....	72
4.4	SCHLUSSBETRACHTUNG.....	74
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>

---

## Abkürzungen

(p40) <sub>2</sub>	p40-Homodimer
°C	Grad Celsius
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ABTS	Azino-bis(3-Ethylbenz-Thiazolin-6-sulfat)
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
CD	Oberflächenmolekülbezeichnung ( <i>cluster of differentiation</i> )
CD4 <sup>+</sup> -T-Zelle	T-Zelle, die das CD4-Oberflächenmolekül trägt
CD8 <sup>+</sup> -T-Zelle	T-Zelle, die das CD8-Oberflächenmolekül trägt
cDNA	komplementäre DNA ( <i>copy DNA</i> )
DLR	DNA <i>loading ratio</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immuntest ( <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>horse raddish peroxidase</i> )
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-12R	Interleukin-12-Rezeptor
IL-12Rβ..	Untereinheit (beta-Kette) des IL-12R
IL-23R	Interleukin-23-Rezeptor
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase
IP-10	IFN-γ induzierbares Protein 10
Kb	Kilobasenpaare
KBE	Kolonie-bildende Einheiten
Kda	Kilodalton
l	Liter
LD <sub>50</sub>	halbe letale Dosis (Dosis, bei der 50% der Tiere sterben)
M	molar
m	milli (10 <sup>-3</sup> )

---

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
ml	Milliliter
MLQ	<i>microcarrier loading quantity</i>
mM	millimolar
NKSF	IL-12 ( <i>natural killer cell stimulatory factor</i> )
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
p35	p35-Untereinheit des IL-12
p35/40	p35- und p40-Untereinheit des IL-12
p40	p40-Untereinheit des IL-12
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
pRSC	Plasmid, das in dieser Arbeit verwendet wurde
pRSC-p40	Plasmid pRSC mit eingefügter p40-cDNA
PRSC-p40-revers	Plasmid pRSC mit verkehrt herum eingefügter p40-cDNA
PSI	Druck pro Fläche ( <i>pressure per square inch</i> )
PVP	Polyvinylpyrrolidon
STAT	Signaltransduktionsmolekül und Transkriptionsfaktor ( <i>signal transducer and activators of transcription</i> )
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor ( <i>transforming growth factor</i> )
Th1- und Th2-Zelle	T-Helferzelle vom Typ 1 und Typ 2
TNF	Tumor Nekrose Faktor
XLD	
ZTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
$\gamma\delta$ -T-Zelle	T-Zelle, die einen gamma-delta-T-Zellrezeptor trägt



# 1 LITERATURÜBERSICHT UND ZIELSETZUNG

## 1.1 Literaturübersicht

Säugetiere und Vögel haben viele unspezifische Barrieren wie die Haut und die Schleimhäute entwickelt, um sich gegen Krankheitserreger zu schützen. Trotzdem können Krankheitserreger diese Schranken überwinden oder es entstehen Bedrohungen für den Körper in seinem Inneren, wie im Falle von Krebs. Diese Vorgänge aktivieren ein körpereigenes Abwehrsystem, das Immunsystem.

Das Immunsystem lässt sich in zelluläre und humorale Komponenten gliedern. Die **Zellen des Immunsystems**, die Leukozyten oder weissen Blutkörperchen, sind in der Lage, körpereigene und körperfremde Strukturen (Antigene) zu unterscheiden. Vertreter der Zellen des unspezifischen, angeborenen Immunsystems sind beispielsweise Makrophagen, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und Granulozyten. Zu den Zellen des spezifischen Immunsystems zählen die B- und T-Lymphozyten. Sie alle sind in der Lage durch Botenstoffe, die sogenannten **Zytokine**, miteinander zu kommunizieren (Callard und Gearing, 1994). Es handelt sich um relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht von 10-20 Kilodalton (kDa). Da sie als Mediatoren zwischen Leukozyten dienen, werden sie als Interleukine (IL) bezeichnet. Andere dieser Mediatoren, wie Interferone, Tumornekrosefaktoren und Wachstumsfaktoren, haben ihre ursprünglichen Bezeichnungen behalten und sind nicht in die einheitliche Nomenklatur eingegangen. Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche je nach Zelltyp und Aktivierungsgrad eine variierende Kombination an Rezeptoren für diese Zytokine. Über spezifische Janus-Kinasen werden die Signale vom Rezeptor in das Zellinnere übermittelt (Ihle *et al.*, 1995). Durch Interaktion mit den STAT-Molekülen („signal transducer and activators of transcription“) kommt es letztendlich zur Aktivierung von STAT-abhängigen Genen (Ihle *et al.*, 1996; Ivashkiv, 1995; Jacobson *et al.*, 1995).

### 1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Eine wichtige **humorale Komponente des unspezifischen Immunsystems** stellt das Komplementsystem dar (Müller-Eberhard *et al.*, 1975). Es setzt sich aus verschiedenen Faktoren zusammen, die von Makrophagen sezerniert werden. Die Komplementfaktoren des alternativen Weges können direkt an die Oberfläche von

Pathogenen binden, ohne dass Antikörper hierfür notwendig wären (Janeway und Travers, 1994). Nach der Bindung des ersten Faktors an die Pathogenoberfläche setzt sich eine Kaskade in Gang, die mit der Lyse des Pathogens durch die Ausbildung von Poren in dessen Membran endet. Durch Sialinsäurereste auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen und die Bildung von Proteasen, die eine Komplementbindung hemmen, kann der Säugetierorganismus seine eigenen Zellen vor der Lyse durch sein Komplementsystem schützen (Lachmann, 1991).

In der Regel sind es **Zellen des unspezifischen Immunsystems** wie beispielsweise Makrophagen oder unreife Dendritische Zellen, die sich als Erste mit den den Körper bedrohenden Organismen auseinandersetzen. Als Phagozyten oder Fresszellen können sie Erreger, abgestorbene infizierte Zellen oder Tumorzellen aufnehmen. Sie erkennen die Pathogene an bestimmten Oberflächenstrukturen, die jeweils für eine Gruppe von Pathogenen charakteristisch sind („pattern recognition“) (Kaisho und Akira, 2000; Lien *et al.*, 1999). Dabei entstehen nach der Endozytose sogenannte Phagosomen, in denen sich die aufgenommenen Organismen befinden. Sie verschmelzen mit Lysosomen, in denen lysosomale Effektormoleküle enthalten sind, zu Phagolysosomen. In diesen werden die Pathogene prozessiert. Anschließend werden die degradierten Proteine als Peptidfragmente auf Haupthistokompatibilitätskomplex-II-Molekülen ((MHC-II-Molekülen) präsentiert. Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen werden Makrophagen und Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APZ) bezeichnet (Janeway und Travers, 1994).

Makrophagen und Dendritische Zellen repräsentieren zwei Gruppen mononukleärer Leukozyten. Beide entwickeln sich aus pluripotenten hämopoetischen Stammzellen im Knochenmark. In der Entwicklung der **Makrophagen** sind diese nach ihrer Reifung zu Monozyten im Blut zu finden. Sie sind im Körper weit verbreitet und entwickeln organbezogene spezifische Subpopulationen, wie die Kupferzellen der Leber oder die Alveolarmakrophagen der Lunge. Sie gehören zu den Phagozyten und können sowohl selbst auf Antigene reagieren wie auch andere Zellen, vor allem NK-Zellen, zytotoxische T-Lymphozyten und T-Helferzellen durch Signale in die Immunantwort einbeziehen. Sie prozessieren und präsentieren Antigen und stellen durch ihre Fähigkeit, auf Pathogene zu reagieren wie auch mit anderen Immunzellen zu interagieren, den zentralen Ausgangspunkt unspezifischer wie auch spezifischer Immunantworten dar. Auf Antigenreiz hin produzieren sie proinflammatorische Zytokine wie IL-12, Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IL-1 (Callard und Gearing,

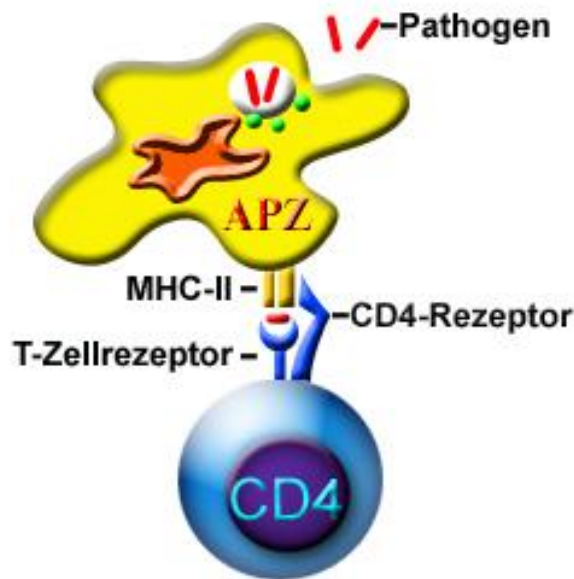
1994). Sie können aber auch Zytokine sezernieren, die die Immunantwort supprimieren, wie z.B. IL-10 oder TGF- $\beta$  (Maeda *et al.*, 1995; Wahl *et al.*, 1990).

**Dendritische Zellen** haben in mancher Hinsicht ähnliche Funktionen wie Makrophagen. Jedoch ist ihre Hauptaufgabe weniger die Bekämpfung von Erregern am Ort der Infektion, sondern vielmehr die Initiation und Aufrechterhaltung von Immunreaktionen. Sie liegen auch in nichtlymphatischen Geweben als unreife Dendritische Zellen, wie den Langerhans-Zellen der Haut, vor. Nach dem Kontakt mit Antigen wandern sie in die Milz und die Lymphknoten, um dort die spezifische Immunantwort in Gang zu setzen und aufrecht zu erhalten (Austyn, 1992; Steinmann, 1991). Durch kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie die B7-Moleküle und die CD40-CD40-Ligand-Interaktion treten sie in besonders engen Kontakt mit den T-Helferzellen, aktivieren sie durch Zytokine wie IL-12 und wirken so als die stärksten Aktivatoren der spezifischen Immunantwort (Bluestone, 1995; Cella *et al.* 1996; Lenschow *et al.* 1996; Noelle, 1996).

**Natürliche Killerzellen** (NK-Zellen) ähneln in einigen Eigenschaften den zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL, s. 1.1.2.2) des adaptiven Immunsystems, beispielsweise können beide Zelltypen das Oberflächenmoleküle tragen (z.B. CD3). Beide Zelltypen produzieren nach Exposition gegenüber IL-12 Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Tripp *et al.*, 1993). Wie ZTL töten sie ihre Zielzellen über Perforin oder den Fas-Liganden (King, 1993). Jedoch benötigen NK-Zellen im Gegensatz zu ZTL keinen MHC-I-Komplex zur Aktivierung. Vielmehr werden sie gerade durch das Fehlen des MHC-I-Komplexes oder mutierte MHC-I-Komplexe zur Zerstörung der Zielzelle aktiviert (Karre *et al.*, 1986; Liao *et al.*, 1991).

### 1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Nach der unspezifischen Aufnahme von Antigen durch Makrophagen oder unreife Dendritische Zellen können Zellen des spezifischen Immunsystems wie T-Helferzellen über ihren T-Zellrezeptor an MHC-II-Moleküle binden und das präsentierte Peptid gegebenenfalls als Antigen erkennen (Abb.1) (Jones und Janeway, 1981). Mit diesem wichtigen, initialen Schritt der Antigenpräsentation beginnen die spezifischen Abwehrmechanismen des Immunsystems.

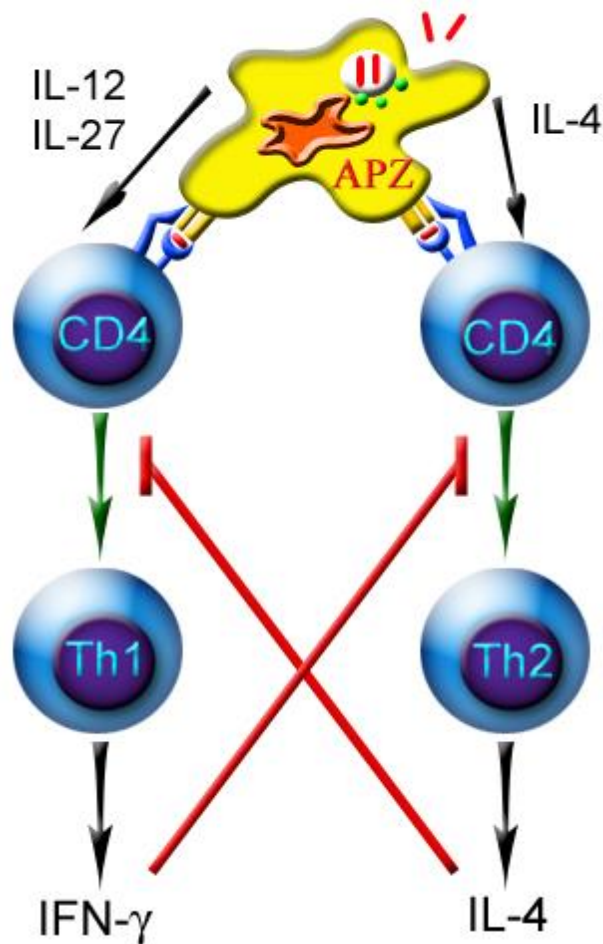


**Abb. 1: Darstellung der Interaktion zwischen einer Antigenpräsentierenden Zelle und einer T-Helferzelle.** Zunächst erfolgt die Aufnahme des Pathogens in das Phagosom der antigenpräsentierenden Zelle (APZ). Nach Verschmelzung von Phagosom (weiß, mit dem Pathogen) und Lysosomen (grün) entsteht das Phagolysosom. In diesem werden die Organismen degradiert und die Bruchstücke als Peptide auf MHC-II-Molekülen den T-Zellen präsentiert. Diese erkennen mit ihrem CD4 Rezeptor das MHC-II-Molekül und mit ihrem T-Zellrezeptor das auf dem MHC-II-Molekül liegende Antigen (nach Janeway und Travers, 1994).

#### 1.1.2.1 Typ 1- und Typ 2-Immunantworten

Das spezifische Immunsystem des Körpers hat zwei Hauptwege entwickelt, sich gegen die vielen infektiösen Erreger oder Entartungen von Zellen zu wehren. Zum einen existiert die zelluläre (Typ 1), zum anderen die humorale Immunität (Typ 2) (Salgame *et al.*, 1991). Typ 1-Immunantworten sind charakterisiert durch die

Aktivierung von T-Helferzellen vom Typ 1, NK-Zellen und ZTL. Typ 2-Immunantworten zeichnet sich vor allem durch die Produktion von Antikörpern durch Plasmazellen aus. Während für die Kontrolle von Tumoren und intrazellulären Erregern die Typ 1-Immunantwort die Hauptrolle spielt, ist für die Bekämpfung von beispielsweise helminthischen Infektionen die Typ 2-Immunantwort von großer Bedeutung. Jedoch ist ein Zusammenspiel beider Wege für die Elimination der Erreger oft unerlässlich (Hernandez-Pando *et al.*, 1994; Tilley *et al.*, 1995) und eine überschüssige oder ungebremste Immunantwort in eine Richtung führt zu Krankheitsbildern wie Allergien oder Autoimmunität (Charlton und Lafferty, 1995; Grunig *et al.*, 1998).



**Abb. 2: Die Th1/Th2-Dichotomie.** Nach Erkennung des Antigens durch naive, das CD4-Molekül tragende T-Zellen erfolgt deren Aktivierung. Es können Th1-Zellen (für die zelluläre Immunität) oder Th2-Zellen (für die humorale Immunität) entstehen. In diesem System hemmen die entstehenden Zytokine jeweils die Entstehung des anderen Zelltyps (nach Janeway und Travers, 1994).

Die Zelle, die im Mittelpunkt der beiden möglichen Hauptwege der Immunantwort steht, ist die **T-Helferzelle** (Th-Zelle). Mosmann *et al.* stellten 1986 zum ersten mal dar, dass dieser Zelltyp in zwei spezifischen Aktivierungsformen existiert. Die T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) repräsentieren hierbei die zelluläre Immunität, die T-Helferzellen vom Typ 2 (Th2-Zellen) die humorale Immunität (Carter und Dutton, 1996; Gemmell und Seymour, 1994). Die beiden Subtypen der Th-Zellen unterscheiden sich durch ein jeweils charakteristisches Muster ihrer Zytokinexpression. Während Th1-Zellen vor allem IFN- $\gamma$  und IL-2 produzieren, werden von Th2-Zellen hauptsächlich Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13 gebildet (Abb.2) (Morel und Oris, 1998). Dabei regulieren die Zytokine IL-4 und IFN- $\gamma$  die Entwicklung der jeweils entgegengesetzten Immunantwort negativ. IL-4 verhindert die Entstehung IFN- $\gamma$ -produzierender Zellen während IFN- $\gamma$  die Proliferation von Th2-Klonen inhibiert (Fernandez-Botran *et al.*, 1988; Gajewski *et al.*, 1988; Le Gros *et al.*, 1990).

### 1.1.2.2 Zellen der Typ 1-Immunantwort

**Th-Zellen** erkennen über ihren T-Zellrezeptor Antigene, welche von APZ auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Dabei handelt es sich zunächst um naive Th-Zellen. Die Bindung an die APZ findet über den T-Zellrezeptor und das Oberflächenmolekül CD4 statt, welches spezifisch für Th-Zellen ist und selektiv an MHC-II-Moleküle bindet (Doyle und Strominger 1987, Abb. 1). Nach der Bindung an den MHC-II-Peptid-Komplex und der Verstärkung des Zell-Zellkontaktes durch die Interaktion weiterer Oberflächenmoleküle auf beiden Zellen, wie CD40, CD40-Ligand, CD28 und B-7, werden sie durch Zytokine zur Differenzierung angeregt (Freedman *et al.*, 1991; Linsley *et al.*, 1991). Durch IL-12 und IL-27 erfolgt die Differenzierung zu Th1-Zellen (Hsieh *et al.*, 1990; Pflanz *et al.*, 2002). IL-4 und IL-13 sind für die Differenzierung zu Th2-Zellen verantwortlich (McKenzie *et al.*, 1998; Swain *et al.*, 1990). Das zusätzlich gebildete IL-2 gibt das Signal zur Proliferation der Th-Zellen (Schorle *et al.*, 1991; Taniguchi *et al.*, 1993). Th-Zellen antworten ihrerseits auf diese Stimuli durch Zytokine wie beispielsweise IFN- $\gamma$ , welche APZ aktivieren können.

**Zytotoxische T-Lymphozyten** besitzen die Fähigkeit, andere Zellen unter bestimmten Voraussetzungen zu zerstören. Alle Zellen des Körpersprozessieren die von ihnen gebildeten Proteine in ihrem Zytoplasma und präsentieren die so erhaltenen Bruchstücke auf MHC-I-Molekülen. Infizierte oder entartete Zellen

produzieren Proteine, welche nicht körpereigen und somit antigen sein können. Voraussetzung für die Aktivierung der ZTL und die Abtötung von derartig veränderten Zellen ist die Präsentation dieser Peptid-Antigene auf MHC-I-Molekülen und die Erkennung des Komplexes durch den T-Zellrezeptor (Carbone *et al.*, 1986; Zinkernagel, 1997). Des Weiteren erfolgt, ähnlich wie bei den Th-Zellen, eine zusätzliche Bindung über den CD8-Rezeptor, welcher selektiv MHC-I-Moleküle erkennt. Zytokine wie IL-2, IL-4 oder IL-12 können die ZTL zusätzlich aktivieren (Hefeneider *et al.*, 1983; Pardoux *et al.*, 1997; Widmer *et al.*, 1987). ZTL können nach Aktivierung durch den Peptid-MHC-I-Komplex und Zytokine wie IL-2 und IL-12 das für die zelluläre Immunität wichtige IFN- $\gamma$  produzieren. Sie töten andere Zellen durch die Ausschüttung von Molekülen wie Perforin und Granzym (Kummer *et al.*, 1995; Young *et al.*, 1989). Durch ein spezielles Oberflächenmolekül, den Fas-Liganden, können sie nach Interaktion mit dem Fas-Rezeptor auf der Zielzelle bei dieser Apoptose induzieren (Hanabuchi *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1994).

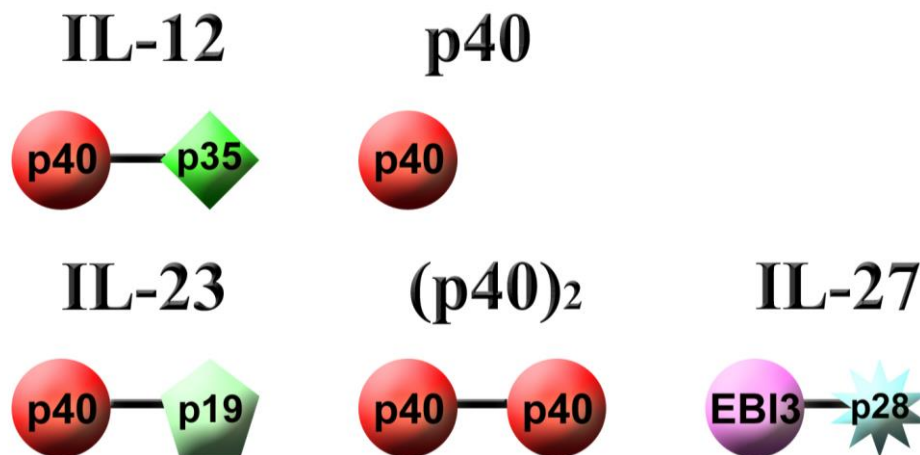
### 1.1.2.3 Zytokine der Typ 1-Immunantwort

#### 1.1.2.3.1 Die p40-Zytokinfamilie

Kobayashi *et al.* publizierten 1989 die Existenz eines Zytokins, welches NK-Zellen stimuliert und benannten es demzufolge zunächst als „Natural Killer Cell Stimulatory Factor“ (NKSF), das später in IL-12 umbenannt wurde. **IL-12** ist ein heterodimeres Zytokin. Es besteht aus zwei glykosylierten Untereinheiten, die über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden werden. Entsprechend ihres Molekulargewichtes werden sie als p40 (Molekulargewicht 40 kDa) und p35 (Molekulargewicht 35 kDa) bezeichnet (Abb. 3). Die Verknüpfung der Untereinheiten findet im endoplasmatischen Retikulum der Zelle statt (Murphy *et al.*, 2000). Während die p35-Untereinheit konstitutiv exprimiert wird, induzieren bakterielle und virale Antigene die Expression von p40 in starkem Maße (D'Andrea *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1997). IL-12 stellt, wie in den Arbeiten verschiedener Gruppen dargestellt, ein bedeutendes Zytokin in der zellulären Immunität dar (Gately *et al.*, 1998). IL-12 wird durch phagozytierende Zellen, insbesondere Makrophagen und Dendritischen Zellen, aber auch von Mastzellen sezerniert (Ma *et al.*, 1997). Es bindet vor allem auf NK- und T-Zellen an den IL-12-Rezeptor (IL-12R, Abb. 4) (Chizzonite *et al.*, 1992). Es stimuliert sowohl NK-Zellen als auch T-Zellen zur Produktion von IFN- $\gamma$  (Chan *et al.*, 1991; Tripp *et al.*, 1993). Der IL-12R besteht aus den Untereinheiten IL-12R $\beta$ 1 und

IL-12R $\beta$ 2, welche beide Homologien zur sogenannten gp130-Kette besitzen, die auch der Signaltransduktion von IL-6 und IL-11 dient (Chua *et al.*, 1994). Der IL-12R $\beta$ 1 scheint hauptsächlich für die Bindung des Zytokins über die p40-Untereinheit verantwortlich zu sein (Wu *et al.*, 1997). Der IL-12R $\beta$ 2 dient der Bindung von p35 und der Signaltransduktion über STAT4 (Bacon *et al.*, 1995; Chua *et al.*, 1995; Presky *et al.*, 1996).

Das Protein p40 wird im Körper in größeren Mengen produziert, als es in seiner Verbindung mit p35 als Zytokin IL-12 vorliegt. Neben p35, das nur in IL-12 vorkommt, kann p40 auch andere Zytokine bilden, indem es zum einen andere Proteine kovalent bindet und zum anderen als Monomer wie auch als Homodimer vorkommen kann (Abb. 3).

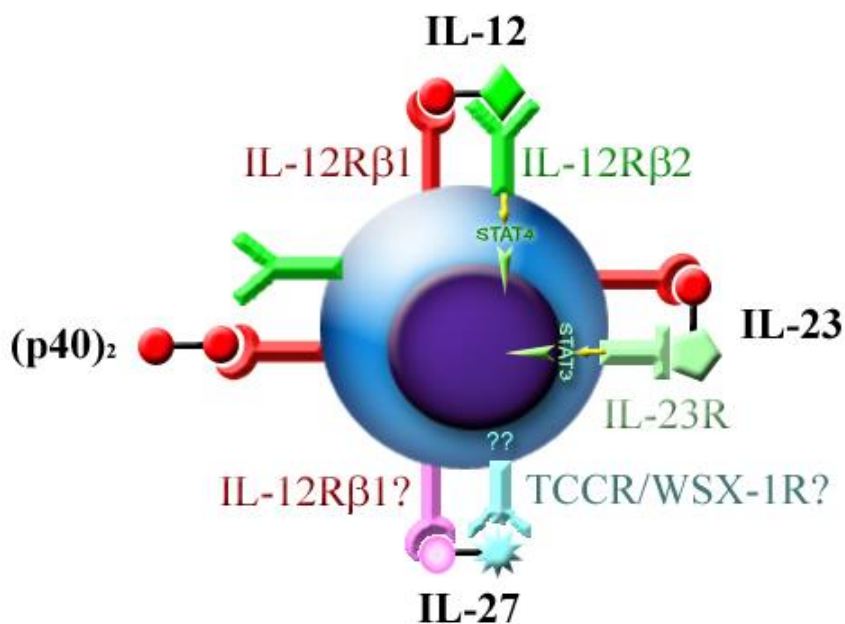


**Abb. 3: Schematische Übersicht über die p40-abhängigen Zytokine.** Die Zytokine der p40-Familie bestehen alle aus einer p40-Untereinheit, die sich mit unterschiedlichen Molekülen zu Zytokinen verbindet. Des Weiteren existiert ein zu p40 homologes Protein, EBI3, das gemeinsam mit einem p28-Molekül das Zytokin IL-27 bildet (nach Gately *et al.* 1998; Oppmann *et al.* 2000; Pflanz *et al.* 2002).

Das **p40-Monomer** bindet an den IL-12R $\beta$ 1. Seine Bindungsstärke an den Rezeptor bleibt jedoch hinter der des Homodimers ((p40)<sub>2</sub>) weit zurück (Wang *et al.*, 1999). Es antagonisiert IL-12 an seinem Rezeptor, jedoch 40-50fach schwächer als (p40)<sub>2</sub> (Gillissen *et al.*, 1995).



Mattner *et al.* konnten zeigen, dass es sich bei **(p40)<sub>2</sub>** um einen Antagonisten zu IL-12 handelt (Mattner *et al.*, 1993 und 1997). (p40)<sub>2</sub> bindet an eine Untereinheit des IL-12R, den IL-12Rβ1, jedoch nicht an die zweite Untereinheit, IL-12Rβ2 (Abb. 4). Der IL-12Rβ2 ist aber die für die Signaltransduktion wichtige Einheit und es kommt durch die Bindung von (p40)<sub>2</sub> zu einer Blockade des IL-12Rβ1 für das heterodimere IL-12. Obwohl (p40)<sub>2</sub> als IL-12-Antagonist wirkt, konnte auch eine von p40-Zytokinen abhängige protektive Immunantwort aufgezeigt werden, die unabhängig von IL-12 ist. Zur Untersuchung dieser Effekte von p40-Zytokinen (ohne die Beteiligung von IL-12) wird mit sogenannten „p35-Knock-out-Mäusen“ (p35<sup>-/-</sup>-Mäusen) gearbeitet, bei denen das Gen für p35 deletiert wurde. Diese sind somit defizient für die Bildung von funktionellem IL-12, können jedoch p40 und somit alle übrigen p40-abhängigen Zytokine (Abb. 3) sezernieren. Diese Effekte konnten bisher in verschiedenen Infektionsmodellen aufgezeigt werden (Carr *et al.*, 1999; Decken *et al.*, 1998, Hölscher *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 2001). Des Weiteren wurde eine agonistische Funktion des (p40)<sub>2</sub> zu IL-12 in einem Transplantationsmodell von Picotti *et al.* 1997 publiziert.



**Abb. 4: Schematische Darstellung der Ligand-Rezeptor-Bindung der p40-Proteine.** Abgebildet sind die unterschiedlichen Untereinheiten des IL-12-Rezeptors (β1 und β2), der IL-23-Rezeptor und der hypothetische IL-27-Rezeptorkomplex. Jede Untereinheit ist in der Abbildung nur einmal beschriftet. Es sind die Bindungsmöglichkeiten der Zytokine an die Rezeptoren und die bekannten Signaltransduktionswege dargestellt. (nach Oppmann *et al.*, 2000; Parham *et al.*, 2002; Pflanz *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2000)

Im November 2000 wurde mit **IL-23** eine mögliche Erklärung für die von IL-12 unabhängigen agonistischen Effekte durch p40-Proteine gefunden. IL-23 ist ein Heterodimer, das aus einem p40-Molekül und einer 19 kDa Untereinheit (p19) aufgebaut ist. Das p19-Molekül wurde von der Gruppe um Robert Kastelein über eine Computeranalyse der Gensequenzen von Proteinen bezüglich ihrer Homologie zur IL-6-Zytokinfamilie identifiziert. IL-23 war vorher in Anti-p40-*Western Blots* nicht nachweisbar gewesen. Noch ist wenig über dieses relativ neue Zytokin bekannt. In *in vitro* Versuchen konnte bisher gezeigt werden, dass IL-23 murine T-Gedächtniszellen zur Proliferation und IFN- $\gamma$  Produktion anregt. Des Weiteren bindet es ähnlich dem (p40)<sub>2</sub> an den IL-12R $\beta$ 1, nicht jedoch an den IL-12R $\beta$ 2 (Abb. 4). Schließlich aktiviert IL-23 wie auch IL-12 STAT4. Interessant war hierbei, dass diese STAT4-Aktivierung ohne Bindung an die IL-12R $\beta$ 2 Untereinheit erfolgt, es also eine weitere Rezeptoruntereinheit geben musste (Oppmann *et al.*, 2000). Parham *et al.* fanden 2002 diese Rezeptoruntereinheit, den IL-23-Rezeptor (IL-23R, Abb. 4), der gemeinsam mit dem IL-12R $\beta$ 1 IL-23 bindet und die Signaltransduktion ermöglicht. Diese Signaltransduktion verläuft im Gegensatz zur Signaltransduktion durch IL-12R $\beta$ 2 jedoch hauptsächlich über STAT3 und nicht, wie angenommen, nur über STAT4.

Die Überexpression von IL-23 in Mäusen führt zu Entzündungen in fast allen Organen sowie Minderwuchs, Unfruchtbarkeit und Früh Tod der Mäuse (Wiekowski *et al.*, 2001). In einem Tiermodell mit Mäusen, die in der Haut transgen p40 produzieren, wird vermutet, dass IL-23 für die schweren entzündlichen Hautveränderungen durch mononukleäre Zellinfiltrate bei diesen Tieren verantwortlich ist (Kopp *et al.*, 2001).

Es sei an dieser Stelle erwähnt, dass neben den p40-Proteinen auch noch ein dem p40 homologes Protein existiert. 1996 wurde von Devergne *et al.* dieses Epstein-Barr-Virus-induzierte Protein 3 (EBI3) beschrieben, welches nach damaliger Vermutung eine Verbindung mit p35 eingehen sollte. Pflanz *et al.* publizierten 2002, dass EBI3 an der Bildung eines neuen Zytokins beteiligt ist, dem **IL-27**. Dieses Zytokin besteht aus dem zu p40 homologen EBI3 und einer 28 kDa schweren p28 Untereinheit. Es bindet über den TCCR/WSX-1-Rezeptor, eventuell unter Beteiligung des IL-12R $\beta$ 1 (Abb. 4, Chen *et al.* 2000). Naive, den CD4 Rezeptor tragende T-Zellen (CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) werden durch IL-27 zur Proliferation angeregt.

So gut die Bedeutung von IL-12 erforscht wurde und so wichtig seine Funktion ist, so wenig ist derzeit über die Funktion und das Zusammenspiel der übrigen p40-Zytokine bekannt.

#### *1.1.2.3.2 Die Aktivatormoleküle IFN- $\gamma$ und TNF- $\alpha$*

**IFN- $\gamma$**  wird von ZTL, Th1-Zellen und NK-Zellen nach Aktivierung gebildet (Farrar *et al.* 1993). Hierbei ist von Bedeutung, dass T-Zellen den Zell-Zell-Kontakt mit einer APZ und IL-12 zur Stimulation benötigen, NK-Zellen hingegen auch ohne den direkten Zellkontakt auf IL-12 mit der Sekretion von IFN- $\gamma$  reagieren können (Ye *et al.*, 1995). Des Weiteren induziert auch IFN- $\gamma$  selbst die Produktion von IFN- $\gamma$  (Macatonia *et al.*, 1993), vermutlich durch die positive Regulation des IL-12R $\beta$ 2 (Wenner *et al.*, 1996). IFN- $\gamma$  aktiviert Makrophagen z.B. zur Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Durch das entstehende Stickstoffmonoxid (NO) verbessert sich die Abtötung aufgenommener Pathogene (MacMicking *et al.*, 1997). Ebenso werden reaktive Sauerstoff-Intermediate gebildet (Takao *et al.*, 1996). Neben der Verbesserung der Abtötung intrazellulärer Bakterien kommt es auch zu einer vermehrten Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen, wodurch sich die Antigenpräsentation verstärkt (Paul, 1998). IFN- $\gamma$  ist der zentrale Effektor der Typ 1-Immunantwort.

**TNF- $\alpha$**  wird durch Makrophagen und NK-Zellen gebildet. Er ist ein schwächerer Aktivator als IFN- $\gamma$ , besitzt jedoch die gleichen grundlegenden Effekte (Leenen *et al.* 1994). Es moduliert die Expression des Transkriptionsfaktors Interferon-regulierender Faktor 1 und beeinflusst über diesen Weg auch die Bildung antimikrobiell wirkender Moleküle wie NO. (Agresti *et al.* 1998; Xing *et al.* 2000)

### ***1.1.3 Verlauf der Immunantwort gegen Salmonella Enteritidis und Tumoren***

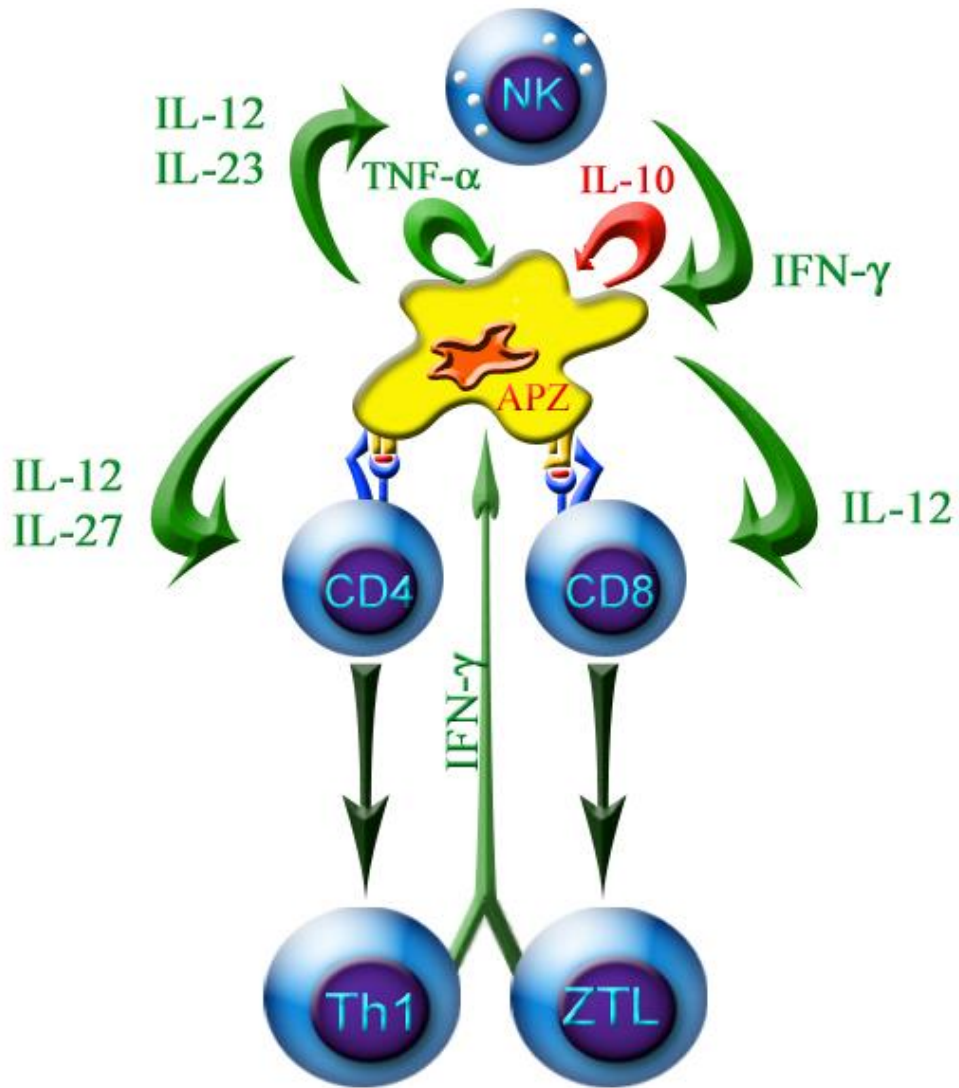
**Salmonella Enteritidis** ist ein gramnegatives, begeißeltes Bakterium. Es infiziert über das Hühnerei den Menschen und hat in den letzten Jahrzehnten als Erreger von Lebensmittelinfektionen zunehmend an Bedeutung gewonnen. 1997 waren in EU-Mitgliedsstaaten wie Belgien über 85% aller humaner Salmonellosen durch *Salmonella* Enteritidis verursacht (van Loock *et al.* 2000). Nach oraler Aufnahme der Salmonellen kommt es zur Invasion der Bakterien in das Darmepithel und den damit verbundenen akuten Entzündungserscheinungen in Form von Enteritiden. Nach

intrazellulärer Vermehrung erfolgt die systemische Ausbreitung. Werden Salmonellen durch Makrophagen aufgenommen, so können sie zunächst intrazellulär überleben und sich auch vermehren, weshalb sie als fakultativ intrazellulär bezeichnet werden. Des Weiteren sind sie in dieser Umgebung vor der humoralen Infektionsabwehr des Wirtes geschützt. Salmonellen besitzen wie viele andere intrazelluläre Bakterien die Möglichkeit, die Reifung des Phagosoms zum Phagolysosom zu verhindern. Somit haben die Pathogene die Möglichkeit, sich in einer wenig bedrohlichen als vielmehr sie schützenden Umgebung zu vermehren. Die Mechanismen dieser Überlebensstrategie sind bisher nur in Ansätzen geklärt (Fields *et al.*, 1989; Small *et al.* 1994). Wichtig für die initiale Eindämmung der intrazellulären bakteriellen Infektion ist die Sekretion von IL-12 durch die Makrophagen als erste Vermittler einer Körperabwehr (Germann *et al.*, 1993; Hsieh *et al.*, 1993). Durch die Produktion von IL-12 und die anschließende Aktivierung durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wird eine Abtötung der intrazellulären Pathogene durch reaktive Stickstoff- und Sauerstoffverbindungen ermöglicht. In der unspezifischen Phase werden vor allem NK-Zellen und naive T-Zellen durch IL-12 TNF- $\alpha$  zur IFN- $\gamma$  Produktion angeregt (Tripp *et al.*, 1993). Während der adaptiven Immunantwort greifen antigenspezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aber auch  $\gamma\delta$ -T-Zellen in das Geschehen ein und aktivieren durch IFN- $\gamma$  die Makrophagen (Chan *et al.*, 1991). Durch die Aktivierung kommt es zur verbesserten intrazellulären Abtötung in den Phagolysosomen durch iNOS (MacMicking *et al.*, 1997). und zu einer verstärkten Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche. Damit wiederum verbunden erfolgt eine vermehrte Präsentation von Salmonellenantigenen durch die infizierten Makrophagen (Paul, 1998). Es konnte auch gezeigt werden, dass ZTL für die Überwindung einer Salmonelleninfektion von Bedeutung sind. Ein genauer Mechanismus ist hierfür noch nicht bekannt. Es ist aber anzunehmen, dass intrazelluläre und somit vor den Immunzellen geschützte Salmonellen auf diesem Weg wieder dem Angriff durch das Immunsystem ausgesetzt werden (Lo *et al.*, 1999).

Im Falle einer Salmonelleninfektion bedrohen also Pathogene mit deutlich immunogenen Eigenschaften den Körper und induzieren somit auch die Abwehr. Im Falle einer Tumorerkrankung hingegen steht die Entartung einer körpereigenen Zelle am Anfang. Daher fällt es dem Immunsystem wesentlich schwerer, den Tumor als „fremd“ zu erkennen. Nur selten haben Tumore eine Aktivierung des unspezifischen Immunsystems zur Folge, da sie als körpereigene Zellen keine „danger“-Signale an

die Phagozyten übermitteln (Matzinger, 1994). Jedoch exprimieren Tumoren Proteine, die in normalen Zellen des adulten Körpers entweder nicht, nur in bestimmten Teilen des Körpers oder in kurzen Entwicklungsphasen vorkommen. Normalerweise nicht im Körper exprimiert werden sogenannte „spezifische Tumorantigene“. Diese entstehen durch die Mutation und Aktivierung von bestimmten Genen (Monach *et al.*, 1995). Im anderen Fall handelt es sich um die „Tumor-assoziierten Antigene“. Diese Antigene können von vielen oder sehr wenigen Zellen des übrigen Körpergewebes exprimiert werden. Beispielsweise handelt es sich hierbei um die karzinoembryogenen oder onkofetalen Antigene (Rettig und Old, 1998). Mit diesen kommen die Abwehrzellen normalerweise nicht in Kontakt. Nach dem Tod einer Tumorzelle und der erfolgten Aufnahme durch Makrophagen können solche Proteine als Antigen erkannt werden. Im Falle der Antigenerkennung durch eine spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zelle erfolgt, prinzipiell ähnlich wie bei der Salmonelleninfektion, die beschriebene gegenseitige Aktivierung über IL-12 und IFN- $\gamma$  und die Aktivierung von Makrophagen und spezifischen ZTL. Jedoch ist in diesem Fall der Kampf gegen den Krebs noch nicht gewonnen, da viele Tumorzellen selektiv die Expression ihrer MHC-I-Moleküle vermindern können und so wiederum die Präsentation von Tumorantigen reduzieren (Smith *et al.*, 1988). Zusätzlich kann aber durch das produzierte IL-12 und IFN- $\gamma$  eine Metastasierung des Tumors eingeschränkt werden. Durch IL-12, IFN- $\gamma$  und das durch IFN- $\gamma$  induzierbare Protein 10 (IP-10) kann die Angiogenese im Bereich des Tumors eingedämmt werden und somit sowohl ein Abschwemmen von Tumorzellen als auch die Ernährung des Tumorgewebes vermindert werden (Angiolillo *et al.*, 1995; Luster und Ravetch, 1987; Sgadari *et al.*, 1996). Durch den Aufbau einer zellulären Immunität und das gleichzeitige unspezifische Eindämmen des Tumorwachstums kann im günstigen Fall eine Tumorerkrankung überwunden werden.

Das beschriebene Zusammenspiel der Zellen und Zytokine im Verlauf einer Typ 1-Immunantwort ist schematisch in Abb. 5 dargestellt.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Interaktion der Immunzellen im Verlauf einer Typ-1 Immunantwort.** Die APZ ist mit intrazellulärem Pathogen dargestellt. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten reagieren über MHC-I- und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten über MHC-II-Moleküle mit dem Makrophagen. Stimulierende Wirkungen von Zytokinen sind grün (→), inhibierende rot (→) dargestellt. Schwarze Pfeile symbolisieren eine Differenzierung. (nach Janeway und Travers 1994)

## 1.2 Zielsetzung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Erarbeitung von möglichen protektiven Effekten im Sinn einer zellulären Immunantwort durch Mitglieder der p40-Zytokinfamilie ohne IL-12 im Tiermodell.

Zunächst sollte in einem Infektionsmodell mit *Salmonella* Enteritidis durch Verwendung verschiedener Depletionsmutanten im Mausmodell die Wirkung von p40-Zytokinen auf die Entwicklung einer zellulären Immunantwort unabhängig von IL-12 erarbeitet werden. Hierbei war das Augenmerk vor allem auf die unspezifische Immunantwort gerichtet.

Des Weiteren wurde die mögliche therapeutische Wirkung einer lokalen Applikation von p40-Zytokinen (wiederum unter Ausschluß einer Wirkung von IL-12) in zwei Tumormodellen untersucht. Die Applikation erfolgte durch eine Genkanone sowie durch lokale Proteininjektion. Als Modelltumoren dienten das Lewis-Lungenkarzinom und das Melanom B16.

Abschließend folgten Untersuchungen zum Zusammenspiel von IL-12, (p40)<sub>2</sub> und IL-23 *in vitro*. In diesem Teil werden zum einen die Wirkungen und Wechselwirkungen der rekombinanten Proteine, zum anderen die Effekte von endogenem p40 in einem *in-vitro*-Infektionsmodell mit Splenozyten verschiedener Depletionsmutanten dargestellt.

.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

##### 2.1.1.1 Geräte

Brutschränke für

Bakterien Modell 600 Haereus, Osterode

Zellen B5061 EC-CO2 Memmert, Schwabach

Coverplates® Shandon, Frankfurt

Kryostat 2800-Frigocut-N,  
Leica Instruments GmbH, Nussloch

Helios Gene gun® BioRad, München

Megafuge 2.0 R Haereus, Osterode

Mikroskope

Axioskop 2 plus

Axiovert 25 Carl Zeiss, Jena

Pipetten Eppendorf, Hamburg

Softmax ELISA-Reader© Molecular Devices, München

##### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterial

ELISA Platten, Maxisorp Nunc, Wiesbaden

Flüssigkeitsfilter

Nalgene 0,2µm Porengröße Nalge Nunc, Wiesbaden

Neolus Kanülen, 27G Terumo, Frankfurt

Objektträger Menzel, Braunschweig

Reaktionsgefäße Greiner, Frickenhausen

Spritzen, Plastipak 1ml Becton Dickinson, Heidelberg

Sterilfilter Merck, Darmstadt

XLD-Selektivnährboden Merck, Darmstadt



Zellkulturflaschen

75 cm<sup>2</sup>

Greiner, Frickenhausen

150 cm<sup>2</sup>

TPP, Trasadingen, Schweiz

Zellkultur-Platten, 6 und 48 Kavitäten Greiner, Frickenhausen

### **2.1.1.3 Software**

Für die Auswertung von Mikrotiterplatten wurde das Programm Softmax Pro 3.1.2 (Molecular Devices, München) verwendet. Die histologischen Aufnahmen wurden mit AxioVision (Carl Zeiss, Jena) angefertigt. Für statistische Analysen und die graphische Darstellung wurde mit Sigmastat 2.03 bzw. Sigmaplot 5.0 (beide Jandel Scientific, Erkrath) gearbeitet. Zur Darstellung der Ergebnisse und für Kalkulationen wurde Microsoft Office 2000 (Microsoft) verwendet. Zur Anfertigung von Grafiken diente Adobe Photoshop Elements (Adobe).

### **2.1.2 Mäuse**

Alle Tiere wurden unter spezifiziert pathogen freien Bedingungen in Thoren und Ehret Käfigsystemen in der Maushaltung des Instituts für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig gezüchtet und gehalten. Sie wurden mit autoklaviertem Futter und Wasser *ad libitum* ernährt und den gesetzlichen Richtlinien entsprechend behandelt. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 8-12 Wochen alt.

#### **2.1.2.1 129Sv/Ev-Mäuse**

Die Zuchtpaare der p35-gendefizienten (p35<sup>-/-</sup>) Mäuse (Magram *et al.*, 1996) und der p35/p40<sup>-/-</sup> Mäuse (Mattner *et al.*, 1996) wurden von Herrn Dr. H. Mossmann (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt. Durch die jeweilige Gendefizienz kommt es nicht zur Expression des funktionellen Proteins, in diesem Fall p35 und p40.

#### **2.1.2.2 BALB/c-Mäuse**

Die p35<sup>-/-</sup> und p40<sup>-/-</sup> Mäuse wurden ebenfalls ursprünglich im Stamm 129Sv/Ev erstellt (Mattner *et al.*, 1996) und 5 mal auf den Stamm BALB/c zurückgekreuzt. Die Zuchtpaare dieser gendefizienten Mäuse des BALB/c-Stammes sowie der Wildtyp-

Tiere wurden von Herrn Dr. H. Mossmann (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt.

### **2.1.2.3 C57BL/6-Mäuse**

Die p35/40<sup>-/-</sup> Mäuse wurden ursprünglich im Stamm 129Sv/Ev erstellt (Mattner *et al.*, 1996) und 5 mal auf den Stamm C57BL/6 zurückgekreuzt. Die Zuchtpaare der p35/40<sup>-/-</sup> Mäuse des C57BL/6-Stammes wurden von Herrn Dr. H. Mossmann (Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg) zur Verfügung gestellt.

## **2.1.3 Biologische Materialien**

### **2.1.3.1 Eukaryote Zelllinien**

Als Tumorzelllinien wurden das Melanom B16 und das Lewis-Lungenkarzinom, bezogen vom Deutschen Krebsforschungszentrum, Heidelberg, beziehungsweise Cell Line Service, Heidelberg, verwendet. Beide Zelllinien stammen aus der C57BL/6-Maus.

### **2.1.3.2 Bakterien**

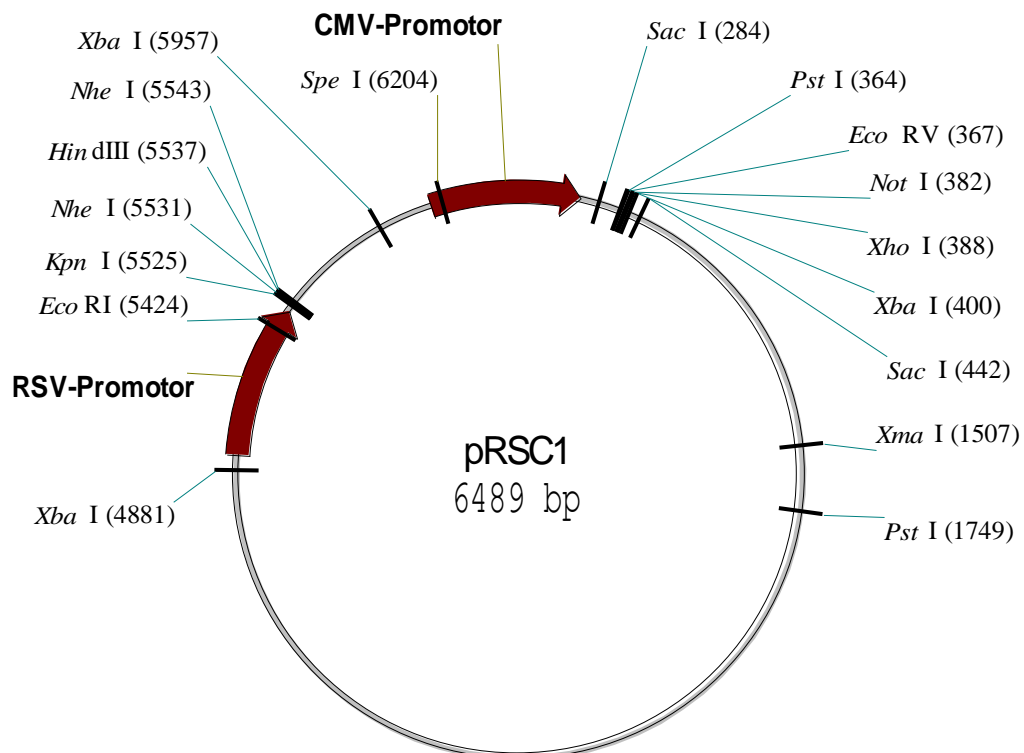
Zur Infektion der Tiere diente ein auxotropher (ade<sup>-</sup>/his<sup>-</sup>) Impfstamm von *Salmonella* Enteritidis, SalmoVac<sup>®</sup> (Impfstoffwerke-Dessau-Tornau, Dessau-Tornau). Die Bakterien wurden in Aliquots zu je 1 ml in einer Konzentration von 10<sup>9</sup> KBE/ml bei -80°C gelagert.

### **2.1.3.3 Plasmide**

Das Vektorplasmid pRSC [6,5kb] ist ein Konstrukt aus den Plasmiden pcDNA3 [5,4kb] und pREP4 [10,2kb]. Es besitzt zwei multiple Klonierungsstellen, wobei der einen ein RSV Promotor und der anderen ein CMV Promotor vorgeschaltet ist (Dietrich *et al.*, 2002).

Diese Promotoren, die die Transkription im Vektor regulieren, sind virale Promotoren, abgeleitet vom Rous-Sarkoma-Virus (RSV) und Zytomegalie-Virus (CMV). Die Sequenz für p40 wurde in die multiple Klonierungsstelle integriert, die dem RSV-Promoter nachgeschaltet ist. Dazu wurde pRSC an den vorgegebenen Schnittstellen durch die Restriktionsendonukleasen NheI und SpeI aufgeschnitten und es konnte Ligation der Fragmente von pRSC und der p40-cDNA durchgeführt werden. Die Plasmide pRSC und pRSC-p40 wurden von Katja Kraus unter der Leitung von Prof.

Dr. med. M. Schönfelder und Dr. med. A. Dietrich am Universitätsklinikum Leipzig und dem Institut für Virologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig hergestellt (Abb. 6, Dietrich *et al.*, 2002). Als weiteres Plasmid wurde von Dr. S. Al-Robayi am Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig pRSC-p40-revers konstruiert. Hier wurde die p40-cDNA an den vorgegebenen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Hin dIII* und *Eco RI* in umgedrehter Richtung eingefügt. Durch die verkehrte Lage der Start- und Stopkodons kann es nicht zur Expression eines Proteines kommen.



**Abb. 6: Der pRSC Vektor mit seinen multiplen Klonierungsstellen und Promotoren.** Der pRSC-Vektor besitzt zwei Promotoren, den RSV (Rous-Sarkom-Virus)- und den CMV (Cytomegalievirus)-Promotor. Die für p40 kodierende Sequenz wurde in pRSC-p40 zwischen *Nhe I* und *Spe I* und in pRSC-p40-revers zwischen *Hin dIII* und *Eco RI* eingefügt.

### 2.1.3.4 Proteine und Enzyme

#### 2.1.3.4.1 Proteine

##### (p40)<sub>2</sub> und IL-12

Das rekombinante, murine (p40)<sub>2</sub> (Ling *et al.*, 1995) und IL-12 (Schoenhaut *et al.*, 1992) stammen von Hoffman-La Roche AG, Nutley, NJ, USA.

### IL-23

Rekombinantes, murines IL-23 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. R. Kastelein, DNAX Research Institute, Palo Alto, CA, USA zur Verfügung gestellt. (Oppmann *et al.*, 2000)

#### 2.1.3.4.2 Enzyme

Das EDTA / Trypsin für die Zellkultur stammt von Biochrom AG, Berlin.

### **2.1.3.5 Antikörper und Proteine**

#### 2.1.3.5.1 Antikörper und Proteine für den ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

In Systemen mit biotiniliertem Antikörper wurde mit Streptavidin-HRP (*horse radish peroxidase*) von Southern Biotechnologies Associates Inc., Birmingham, Alabama, USA gearbeitet.

#### Antikörper und Proteine zum Nachweis von IL-12

Wandantikörper	monoklonaler Ratte-anti-Maus IL-12 Antikörper (Klon 2B5, Hoffmann-La Roche AG, Basel)
Detektionsantikörper	biotiniliertes polyklonales Ziege-anti-Maus p40 Antikörper (Hoffmann-La Roche AG, Basel)
Standard	rekombinantes murines IL-12 (Hoffmann-La Roche AG, Basel)

#### Antikörper und Proteine zum Nachweis von p40

Wandantikörper	monoklonaler Ratte-anti-Maus p40 Antikörper (Klon 5C3, Hoffmann-La Roche AG, Basel)
Detektionsantikörper	biotiniliertes polyklonales Ziege-anti-Maus p40 Antikörper (Hoffmann-La Roche AG, Basel)
Standard	rekombinantes murines IL-12 (Hoffmann-La Roche AG, Basel)

#### Antikörper und Proteine zum Nachweis von IFN- $\gamma$

Wandantikörper	monoklonaler Ratte-anti-Maus IFN- $\gamma$ Antikörper (Klon AN18, Hoffmann-La Roche AG, Basel)
----------------	---

Detektionsantikörper	HRP-markierter monoklonaler Ratte-anti-Maus Antikörper (Klon XMG1,2, Hoffmann-LaRoche, Basel)	IFN- $\gamma$
Standard	rekombinantes murines IFN- $\gamma$ (Hoffmann-La Roche AG, Basel)	

#### 2.1.3.5.2 Antikörper für die immunhistochemischen Untersuchungen

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden ausschließlich biotinierte Antikörper von Southern Biotechnologies Associates Inc., Birmingham, Alabama, USA verwendet. Im Einzelnen richtet sich die Bezeichnung nach den detektierten Oberflächenmolekülen. Für die verschiedenen Zellarten waren dies:

Makrophagen	Ratte-anti-Maus CD11b
NK-Zellen	Ratte-anti-Maus DX5
T-Lymphozyten	Ratte-anti-Maus CD3 $\epsilon$
B-Lymphozyten	Ratte-anti-Maus B220
Endothelzellen	Ratte-anti-Maus CD31

#### 2.1.3.6 Vorgefertigte Lösungen und Systeme („Kits“)

##### Für die Immunhistochemie

Avidin / Biotin Blocking Kit	Vector, Peterborough, England
Vector® VIP Substrat	Vector, Peterborough, England
Methylgrün	Vector, Peterborough, England
StreptABComplex/HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
TissueTek© Einbettmedium	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande

##### Für die Herstellung primärer Milzzellkulturen

OrthoMune© Lysepuffer	Ortho Diagnostic Systems Inc., Raritan, NJ, USA
-----------------------	---

### 2.1.3.7 Lösungen, Puffer und Medien

Die Hersteller der einzelnen Inhaltsstoffe waren, wenn nicht anders vermerkt, die Firmen E. Merck, Darmstadt, Carl Roth, Karlsruhe, Biochrom AG, Berlin oder Sigma, Deisenhofen.

#### 2.1.3.7.1 Standardpuffer

##### PBS 10-fach Konzentrat für ELISA und Histologie

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	104	mM
NaCl	1,45	M
pH=7,4		

##### PBS für die Zellkultur

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15	mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2(H <sub>2</sub> O)	130	mM
NaCl	136,9	mM
KCl	2,6	mM
pH=7,4		

##### PBS

PBS 10x            10% (v/v)

in *aqua dest*

pH=7.4

#### 2.1.3.7.2 Puffer und Lösungen für den ELISA

##### ABTS-Konzentrat

ABTS                    1% (w/v)  
in *aqua dest*

##### ABTS Arbeitslösung

ABTS-Konzentrat        10% (v/v)  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30%ig            0,1% (v/v)  
in McIlvains Puffer

##### Blockierungspuffer für ELISA

Ziegennormalserum    20% (v/v)  
in PBS

##### Gelatine-Konzentrat

Gelatine (Schwein)    2% (w/v)  
in *aqua dest*

##### McIlvains Puffer

Lösung A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>     200 mM  
Lösung B: Zitronensäure 110 mM  
Gebrauchslösung:

Lösung A                    46,8% (v/v)  
Lösung B                    53,2% (v/v)  
pH=4,6

##### PBS-Tween

Tween 20                    0,05% (v/v)  
in PBS

##### Probenverdünnungspuffer

Gelatine-Konzentrat    5% (v/v)  
Bovines Serumalbumin 0,5% (w/v)  
in PBS

## 2.1.3.7.3 Puffer, Lösungen und Medien für die Zellkultur

Einfriermedium

Dimethylsulfoxid 10% (v/v)  
in fötalem Kälberserum

Kulturmedium für das Lewis-Lungenkarzinom

Fötales Kälberserum 10% (v/v)  
Glukose 0,45% (w/v)  
L-Glutamin 4 mM  
Sodiumbikarbonat 1,5% (w/v)  
Streptomycin 100 µg/ml  
Penicillin 100 U/ml  
in DMEM

Trypsin/EDTA-Lösung

Trypsin 0,25% (w/v)  
EDTA 0,1% (w/v)

in PBS für die Zellkultur

## 2.1.3.7.4 Puffer und Lösungen für die Immunhistochemie

Blockierungspuffer

Gelatine (Schwein) 0,1% (w/v)  
Bovines Serumalbumin 0,5% (w/v)  
Ziegennormalserum 5% (v/v)

in PBS

PBS-Triton-X

Triton-X 0,1% (v/v)

in PBS

Kulturmedium für Melanom B16

Fötales Kälberserum 10% (v/v)  
Glutamin 1% (w/v)  
nicht essentielle Aminosäuren

1% (w/v)

Streptomycin 100 µg/ml

Penicillin 100 U/ml

in RPMI1640

Kulturmedium für primäre Milzzellen

Fötales Kälberserum 10% (v/v)

Streptomycin 100 µg/ml

Penicillin 100 U/ml

in RPMI 1640

Zambonis Fixativ

Paraformaldehyd 2% (w/v)

Gesättigte Pikrinsäure 15% (v/v)

in PBS

pH 7,2

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### **2.2.1.1 Allgemeines zur Arbeit mit Zellen in Kultur**

Alle Arbeiten mit Zellen in Kultur erfolgten unter Sterilwerkbänken. Gegenstände wurden vor dem Verbringen in den sterilen Bereich in geschlossenen Behältnissen autoklaviert und vor Gebrauch abgeflammt.

Die Arbeiten mit Zellen erfolgten auf Eis. Die Zentrifugation von Zellen erfolgte bei 300xg für 10 Minuten bei 4°C. Zum Zählen der Zellen wurden die Zellsuspension 1 : 1 mit Trypanblau (Gibco, Eggenstein) gemischt und anschließend die farblosen Zellen gezählt. Tote Zellen erscheinen blau, da sie durch den Farbstoff angefärbt werden. Ausgezählt wurden in der Neubauer-Zählkammer 16 Quadranten. Die erhaltene Zahl x ergab nach der Formel

$$\text{Zellzahl/ml} = x \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4/\text{ml}$$

die Zellzahl pro ml.

#### **2.2.1.2 Zelllinien**

Bei den verwendeten Zelllinien Lewis-Lungenkarzinom und Melanom B16 handelt es sich um Kulturen von chemisch induzierten Tumoren der C57BL-Maus. Die Zellen wurden durch Anwärmen bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Nach langsamer Zugabe von 1 ml entsprechendem Zellkulturmedium wurden sie in weiteren 9 ml Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche pipettiert. Es folgte eine Inkubation für 2 Stunden im Inkubator, bevor die Zellen zum Entfernen des Dimethylsulfoxides des Einfriermediums nochmals abgespült, abzentrifugiert und resuspendiert in die Zellkulturflaschen gegeben und im Inkubator kultiviert wurden.

Die Zelllinien wurden als teils adhärente, teils in Suspension befindliche Kulturen in Kunststoff-Flaschen kultiviert. Für beide Zelllinien wurden die jeweils spezifischen Medien (s. 2.1.3.7.3) verwendet. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Aufgrund der schwachen Adhärenz der Zellen genügte in der Regel ein Abspülen mit kaltem PBS. Bei Konfluenz der Adhäsionskulturen jedoch mussten die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst werden. Nach 1 : 5 Verdünnung wurden die Zellen weiter kultiviert. Alle Zellkulturen wurden im CO<sub>2</sub>-Inkubator (5 % CO<sub>2</sub>; 90 % relative Luftfeuchtigkeit; 37°C) kultiviert.



Zum Einfrieren der Zellen wurden diese aus der Zellkulturflasche gewonnen und abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in einer Konzentration von  $10^7$  Zellen/ml in Einfriermedium in Kryoreaktionsgefäße gegeben und bei  $-80^\circ\text{C}$  im Gefrierschrank verwahrt.

## **2.2.2 Enzym gekoppelter Immuntest (ELISA)**

### **2.2.2.1 IL-12p40, IL-12p75 und IFN- $\gamma$ ELISA**

96-Kavitäten-Mikrotiterplatten der Marke Maxisorp (Nunc, Wiesbaden) wurden mit  $100\ \mu\text{l/Kavität}$  Wandantikörper, der auf eine Konzentration von  $5\ \mu\text{g/ml}$  in PBS verdünnt war, über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  beschichtet. Nach einmaligem Waschen mit PBS-Tween ( $200\ \mu\text{l/Kavität}$ ) wurden die Platten mit  $200\ \mu\text{l/Kavität}$  Blockierungspuffer zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten zwei Waschschrte mit PBS-Tween und das Auftragen der Proben sowie des Standards in Verdünnungsreihen in Probenverdünnungspuffer ( $100\ \mu\text{l/Kavität}$ ) und deren Inkubation bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurde der zweite Antikörper ( $100\ \mu\text{l/Kavität}$ ) auf die Platte pipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nur wenn der zweite Antikörper mit Biotin markiert war erfolgte wiederum dreimaliges Waschen und eine anschließende 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Streptavidin-HRP in einer Verdünnung von  $1 : 3000$ , verdünnt in Probenverdünnungspuffer ( $100\ \mu\text{l/Kavität}$ ). Nach diesen Schritten wurde bei allen Tests fünfmal mit PBS-Tween gewaschen und anschließend  $200\ \mu\text{l/Kavität}$  des Substrats, ABTS-Arbeitslösung, auf die Platte pipettiert. Nachdem bei Raumtemperatur im Dunkeln bei der Standardverdünnungsreihe eine optimale Farbreaktion mit deutlicher Grünfärbung für die höchste und einer geringen Reaktion für die niedrigste Konzentration eingetreten war, wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von  $415\ \text{nm}$  im Softmax® ELISA-Reader bestimmt. Alle Inkubationen fanden in feuchten Kammern statt.

## **2.2.3 Immunhistochemie**

### **2.2.3.1 Entnahme der Gewebe und Herstellung der Gefrierschnitte**

Nach der Einbettung in Tissue-Tek-Einbettmedium und Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Von diesen Gewebestücken wurden mit dem Frigocut© Gefrierschnitte mit einer Schnittdicke von  $8\ \mu\text{m}$  angefertigt und auf Objektträger gebracht. Der Kryostat wurde für diese Arbeiten freundlicherweise von Herrn Prof. J. Seeger, Veterinär-Anatomisches Institut, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig zur Verfügung gestellt. Nach Trocknung der Präparate im Brutschrank bei  $40^{\circ}\text{C}$  für vier bis sechs Stunden wurden die Präparate bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und bis zu ihrer Verwendung gelagert.

### **2.2.3.2 Immunhistochemische Färbung**

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Präparate 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Der Fixierung für 4 Minuten in  $4^{\circ}\text{C}$  kaltem Azeton folgte ein Trocknungsschritt von 10 Minuten bei Raumtemperatur und eine weitere Fixierung für 2 Minuten in Zambonis Fixativ. Nach dreimaligem Waschen der Schnitte in PBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen durch 30-minütige Inkubation in Blockierungspuffer bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift in PBS wurden die Objektträger auf Coverplates® aufgezogen. Dadurch entstand ein kapillärer Spalt zwischen Objektträger und Coverplate®, in dem sich PBS oder in weiteren Schritten die jeweiligen Lösungen befinden. Durch diese Technik kann mit sehr kleinen Mengen an Lösungen gearbeitet werden. Nach Blockierung der Bindungsstellen des endogenen Biotins mit dem Streptavidin / Biotin-Blockierungs-Kit gemäss den Angaben des Herstellers, einmaligen Waschen mit PBS-Triton-X und zweimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit den biotinylierten Antikörpern in einer Verdünnung von 1 : 200 in PBS für 90 Minuten. Nach erneutem Waschen in PBS-Triton-X und zweimaligem Waschen in PBS wurden die Präparate für 20 Minuten mit dem StreptABComplex/HRP inkubiert. Im folgenden, abschließenden Waschschrift erfolgte zweimaliges Waschen mit PBS-Triton-X und dreimaliges Waschen mit PBS. Die Farbreaktion wurde durch 10-minütige Inkubation mit Vector® VIP-Substrat erreicht. Nach Entfernen der Coverplates und Waschen der Schnitte für 5 Minuten in

PBS in einer Küvette wurde mit Methylgrün gegengefärbt und nach erneutem dreimaligem Waschen in destilliertem Wasser die Deckgläser mit Kaisers Glyceringelatine auf den Schnitten fixiert. Alle Waschschrte während der Färbung erfolgten für jeweils zwei Minuten.

### **2.2.3.3 Auswertung der Präparate**

Die Präparate wurden zunächst unter dem Mikroskop auf Qualität der Färbung begutachtet. Die unterschiedlichen Schnitte wurden dann digital fotografiert und zur späteren Analyse archiviert. Sie wurden einem unabhängigen Beobachter zur Begutachtung vorgelegt und dessen Bewertung festgehalten.

## **2.2.4 Salmonellen Infektionsmodell**

### **2.2.4.1 In vivo Infektionsmodell**

#### *2.2.4.1.1 Infektion*

Tiefgefrorene Salmonellen wurden zunächst im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und durch zweimaliges Resuspendieren in 2 ml eiskaltem, sterilem PBS und anschließendem Abzentrifugieren gewaschen. Zur Infektion der Mäuse wurde eine Infektionsdosis Salmonellen in 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert (z.B. 10<sup>6</sup> KBE/ml). Die Tiere wurden zur Infektion im Nacken und am Schwanz fixiert und mit 1 ml der Infektionsdosis intraperitoneal infiziert. Zur Überprüfung der Infektionsdosis wurde diese in geeigneter Verdünnung auf XLD-Platten (Merck, Darmstadt) ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die gewachsenen Kolonien, sichtbar als schwarze Punkte, gezählt.

#### *2.2.4.1.2 Untersuchung der Mäuse am Ende des Experimentes*

Zur Tötung der Mäuse wurden diese in ein geeignetes Gefäß mit chloroformgetränkten Papiertüchern gesetzt. Nach etwa 1 Minute hörten die Tiere auf zu atmen und sie wurden mit Stecknadeln an den Pfoten auf einer mit Stanniolpapier abgedeckten Korkplatte fixiert. Nach der oberflächlichen Desinfektion der Tiere mit Ethanol wurde unter einer Sterilwerkbank mit sterilem Material gearbeitet. Für das weitere Arbeiten galten dieselben allgemeinen Regeln wie für das Arbeiten mit Zellen in Kultur (s. 1.2.1.1).

#### *2.2.4.1.2.1 Peritoneale Lavage*

Die Haut im Bereich des Bauches wurde vorsichtig vom Peritoneum getrennt. Mit einer 5 ml Spritze wurden 5 ml eiskaltes PBS in die Bauchhöhle injiziert. Die Bauchhöhle wurde mit einem Finger vorsichtig massiert, um eine bessere Verteilung des PBS im Bauchraum zu erreichen. Danach wurde es langsam wieder mit der Spritze aus der Bauchhöhle gewonnen, um Verletzungen der Zellen durch die an der Kanülenspitze entstehenden Scherkräfte zu verhindern. Es wurde darauf geachtet, dass es nicht zu Einblutungen in die Bauchhöhle kam. Die gewonnene Flüssigkeit sollte leicht opak sein und keine rötliche Färbung besitzen. Diese Lavage wurde pro Maus dreimal wiederholt. Zur Entfernung der extrazellulären Salmonellen wurde die Suspension je dreimal abzentrifugiert, der Überstand anschließend verworfen und die Zellen dann in jeweils 15 ml PBS wieder resuspendiert. Darauf folgte die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $10^5$  und  $10^6$  Zellen/ml in PBS eingestellt. Jeweils ein Milliliter der Suspension wurde auf eine XLD-Platte pipettiert und die Suspension durch Schwenken gleichmäßig auf der Platte verteilt. Durch Kontrolle unter dem Mikroskop wurde darauf geachtet, dass die Zellen vereinzelt auf dem Agar lagen. Unter sterilen Bedingungen wurden die Platten luftgetrocknet und anschließend im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Jede gewachsene Kolonie repräsentierte einen Salmonellen-infizierten Phagozyten.

#### *2.2.4.1.2.2 Entnahme und Verarbeitung der Organe*

Nach der Eröffnung der Bauchhöhle und des Brustkorbes wurde zunächst der Herzmuskel durchschnitten, mit einer Pipette das Blut gewonnen und in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Das Blut wurde über Nacht bei 4°C stehen gelassen. Nach erfolgter Koagulation wurde es bei 300xg für 15 Minuten zentrifugiert und das Serum in andere Reaktionsgefäße pipettiert. Zur weiteren Analyse wurde es bei -20°C gelagert.

Die Milz wurde mit sterilem chirurgischem Besteck von Blutgefäßen und Gekröse befreit. Die Milz wurde in ein Zellsieb mit 40 µm Maschenweite gelegt (Falcon, BD Biosciences, Heidelberg). Das Sieb befand sich in einer 6 Kavitäten Zellkulturplatte, in die pro Kavität 1 ml PBS vorgelegt worden war. Zur Passagierung der Milz durch das Sieb wurde sie unter ständiger rotierender Bewegung mit einem sterilen Glasstempel wie mit einem Pistill unter starkem Druck zerquetscht. Von der

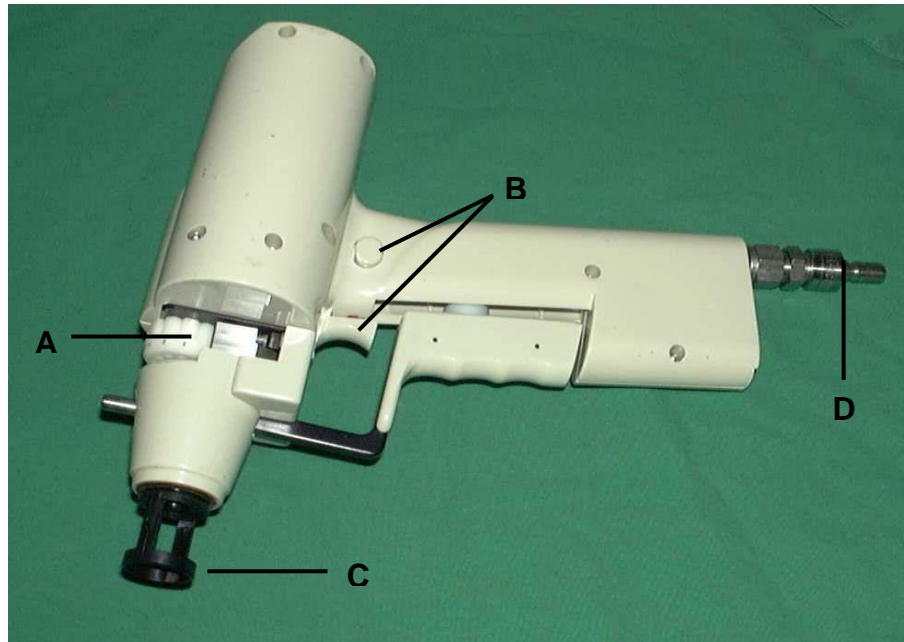
erhaltenen Suspension wurden Verdünnungen von 1:1 bis 1:10<sup>7</sup> in sterilem PBS angesetzt. Diese wurden auf XLD-Agar Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die gewachsenen Kolonien (Kolonie-bildenden Einheiten, KBE) ausgezählt und die Keimbelastung in KBE / Milz errechnet. Dabei wurde nur die niedrigste auszählbare Verdünnungsstufe berücksichtigt, um den Verdünnungsfehler möglichst klein zu halten. Die Formel, die zur Berechnung genutzt wurde, ist:

$$\text{Ausgezählte Kolonien} \cdot \text{Verdünnungsstufe} = \text{KBE} / \text{Milz}$$

## **2.2.5 Genterapie im Tumormodell**

### **2.2.5.1 Arbeitsprinzip der Genkanone**

Die Genkanone ist ein Handgerät zur Transfektion von Zellen *in vitro* wie zur Genterapie des lebenden Tieres mit Partikel-gebundener Plasmid-DNA. Zum einen muss hierzu Plasmid-DNA an Goldpartikel präzipitiert werden, um diese dann in einem zweiten Schritt mit Gasdruck in die Zellen einzubringen. Das Funktionsprinzip der Genkanone (Abb. 7) beruht auf der Beschleunigung der Goldpartikel durch Helium-Gasdruck, so dass ein Durchdringen der Zellen der oberen Hautschichten oder von Zellen in Kultur und somit deren Transfektion möglich wird. Durch einen Abstandhalter an der Austrittsöffnung der Genkanone wird stets ein definierter Streuradius der Partikel von etwa einem Zentimeter erreicht. Hierdurch wird zum einen der Druck verteilt und es kommt zu geringerer Zellschädigung, zum anderen kann eine größere Fläche und somit eine größere Zellzahl transfiziert werden.



**Abb. 7: Die Helios Gene Gun** (Biorad, München). Die Helios Gene Gun dient dem Einbringen partikel-gebundener Plasmid-DNA in Zellen. Ihre wichtigsten Elemente sind die Patronentrommel (A), der Sicherheits- und Auslöseknopf (B), der Abstandhalter (C) sowie der Anschluß für den Gasschlauch (D).

## 2.2.5.2 Herstellung der Patronen für die Genkanone

### 2.2.5.2.1 Mengenkalkulation

Für den Gentransfer und die Herstellung der Gold-DNA-Suspension wurden die vom Hersteller (BioRad, München) vorgegebenen Protokolle benutzt. Die Menge DNA, die auf 1 mg Goldpartikel geladen wird, ist als DLR („DNA-Loading-Ratio“) bezeichnet. Für die hier beschriebenen Transfektionsversuche wurde üblicherweise eine DLR von 3 µg DNA/mg Gold verwendet. Die Menge an Mikropartikeln pro Patrone wird als MLQ („Microcarrier Loading Quantity“) bezeichnet. In der Regel liegt diese bei 0,25-0,5 mg/Patrone für die Gentherapie der Maus, jedoch kann die MLQ für *in vitro* Transfektionen auch etwas geringer sein. Bei einer MLQ von 0,5 mg/Patrone ergibt sich aus einer DLR von 3 µg DNA für 1 mg Gold eine Ladung von 1,5 µg DNA/Patrone bzw. eine Menge von 1,5 µg DNA pro Transfektionsvorgang.

### 2.2.5.2.2 Herstellen der DNA-Gold-Suspension ( $\text{CaCl}_2$ -Präzipitation)

Für die Fertigung der DNA-Gold-Lösung wurde stets mit frischem Ethanol (gefriergetrockneter Alkohol 99,996%; Merck, Darmstadt) gearbeitet oder es wurden ungeöffnete Flaschen verwendet, da geöffnete Behälter Wasser absorbieren und das

Vorhandensein von Wasser in der Tefzel-Röhre während des Trocknungsvorganges zur Verklumpung und unvollständiger Beschichtung führt. PVP (Polyvinylpyrrolidon) diente als Adhäsivum während der Präparation der Patronen. Laut Hersteller sollte die Konzentration zwischen 0,01-0,1 mg/ml liegen. Zunächst wurden 35 mg Goldpartikel (Durchmesser 1,6  $\mu\text{m}$ ) abgewogen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Zu dieser Lösung wurden 105  $\mu\text{l}$  0,05 M Spermidin pipettiert und einige Sekunden gemischt. Dann wurden 105  $\mu\text{l}$  der Plasmid-DNA in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  zugegeben und wiederum gemischt. Zur Präzipitation der DNA auf die Mikropartikel wurde während des Mischvorgangs tropfenweise insgesamt 105  $\mu\text{l}$   $\text{CaCl}_2$  in die Lösung pipettiert. Es folgte eine 10 minütige Inkubationsphase, um das Gemisch bei Raumtemperatur präzipitieren zu lassen. Der Überstand war nun relativ klar, da sich das Gold als Pellet abgesetzt hatte. Um möglichst alle Wasserbestandteile aus der Suspension zu eliminieren, wurde dreimal für 10-15 Sekunden in der Mikrofuge abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet vorsichtig wieder in je 1 ml Ethanol resuspendiert. Schließlich wurde das Pellet in 4 ml der PVP-Stammlösung (0,01 mg PVP/ml Ethanol) aufgenommen und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Somit ergab sich eine Endkonzentration von 7 mg Gold/1 ml Ethanol.

### **2.2.5.3 Patronenherstellung**

Ein speziell beschichteter Plastikschlauch (Tefzel-Röhre, BioRad) wurde zunächst 15-20 min getrocknet. Dazu wurde der Schlauch in die entsprechende Vorrichtung der Patronenfertigungsanlage eingebracht und mit Stickstoff (0,3-0,4 l/min) getrocknet. Die vorbereitete Suspension wurde resuspendiert, um eine feine Verteilung des DNA-Gold-Gemisches zu erreichen. 5 ml dieser Suspension wurden mit einer Spritze in den Plastikschlauch eingesaugt, wozu der Schlauch kurz aus der Vorrichtung entnommen wurde. Diese Menge verteilt sich auf eine Länge von ca. 60 cm. Nachdem der Stickstoff-Gaszufluß abgestellt und der Plastikschlauch wieder in die Patronenfertigungsvorrichtung eingelegt wurde, folgte eine Inkubationszeit von 3-5 min. In dieser Zeit setzte sich das Gold am Boden des Schlauches ab und es konnte dann das Ethanol ohne die Goldpartikel abgesaugt werden. Das Absaugen erfolgt mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 cm/Sekunde. Nach dem Absaugen wurde die Tefzel-Röhre um 180° rotiert, wobei es zum Zerfließen der Gold-Suspension kam. Anschließend wurde für 20-30 Sekunden ohne Zustrom von Stickstoff rotiert,

wodurch sich die Partikel an der Wand des Plastikschauches verteilen. Dann wurde unter Zustrom von 0,3-0,4 l/min Stickstoff für 15 min getrocknet. Dabei sollte eine golden-metallische innere Beschichtung der Röhre entstehen, die sich gleichmäßig über die ganze Länge des Schlauches verteilt. Nachdem der Schlauch getrocknet war wurde er aus der Vorrichtung entnommen. Die Schlauchenden, an denen sich keine Goldbeschichtung befand, wurden abgeschnitten. Mit Hilfe des Tubing Cutters® (BioRad) wurden dann die Patronen als gleich lange Fragmente aus diesem Schlauchstück geschnitten und konnten bei 4°C in Behältern mit Trockenpellet, versiegelt mit Parafilm (American National Can, Menasha, WI, USA), einige Monate aufbewahrt werden.

#### **2.2.5.4 Transfektion in der Zellkultur**

Für Transfektionsexperimente *in vitro* wurden die Zellen in PBS resuspendiert und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt. Die Transfektion erfolgte in Platten mit 6 Kavitäten. Beim Arbeiten mit unterschiedlichen Plasmiden besteht prinzipiell die Gefahr einer Kreuzkontamination. Daher wurden zum einen für verschiedene Plasmide verschiedene Abstandhalter benutzt und zum anderen wurde der Beschuss mit unterschiedlichen Plasmiden auf getrennten Platten durchgeführt. Pro Transfektion wurden je 20 µl der Zellsuspension, also  $1 \times 10^6$  Zellen, in die Mitte einer Kavität auf die Platte pipettiert und kreisförmig auf einer Fläche von 1,5 cm Durchmesser ausgestrichen. Für die Transfektion der Zellkultur wurde nach Optimierung der Transfektionsversuche ein Gasdruck von 200 PSI („pressure per square inch“) verwendet. Zur Transfektion in der Zellkultur wurde die Genkanone mit dem Abstandhalter senkrecht zur Kulturplatte gehalten, so daß der Zellfilm dabei nicht berührt wurde. Die Zellen müssen anschließend in 2 ml Medium resuspendiert werden. Nach dem Beschuß wurden die Zellen in 2 ml Medium resuspendiert und bei 37°C 48 Stunden im Brutschrank inkubiert.

#### **2.2.5.5 Implantation der Tumorzellen**

Die Mäuse wurden im Injektionsbereich rasiert. Dazu wurde ihnen mit einem Langhaarschneider zunächst das Fell im Rückenbereich geschoren und anschließend die verbliebenen Haare mit einem Rasiermesser entfernt. Vor der Rasur und Injektion wurden die Mäuse zur Verminderung von Stress und Schmerzen sowie zur Ruhigstellung mit einer Kombination aus Ketamin (Urostamin, Serumwerk



Bernburg AG, Bernburg) und Xylazin (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen) narkotisiert. Ketamin und Xylazin wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und anschließend 30 µl/Maus intraperitoneal injiziert. Als Zellen zur Etablierung von Tumoren in der Maus wurden das Melanom B16 und das Lewis-Lungenkarzinom verwendet. Vor der Implantation wurden die Zellen aus den Kulturflaschen gewonnen und dreimal in sterilem PBS durch Zentrifugation und Resuspendierung gewaschen. Anschließend wurden sie gezählt und auf die gewünschte Konzentration in PBS eingestellt. Die Lagerung der Zellen bis zur Injektion erfolgte auf Eis. Das Aufziehen der Zellen in die 100µl-Spritze (Modell 1710TLL, Hamilton Co., Reno, Nevada, USA) wurde ohne Kanüle durchgeführt, um die Zellen nicht zu schädigen. Zur Injektion wurde mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand eine kleine Hautfalte gebildet, in die 20µl der Zellsuspension injiziert wurden. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Kanülenöffnung ventral gerichtet war und die Injektion möglichst oberflächennah erfolgte. Die Injektion wurde als erfolgreich gewertet, wenn sich eine deutliche Quaddel in der Haut der Maus bildete. Wenn die Injektion misslang, wurde die entsprechende Maus nicht im Versuch gewertet.

### **2.2.5.6 Genterapie am Tier**

#### *2.2.5.6.1 Genterapie an der Maus*

Nach Injektion der Tumorzellen und Resorption des PBS aus dem Injektionsgebiet wurde spätestens 12 Stunden nach der Implantation der Zellen zum ersten Mal ein Beschuss mit der Genkanone vorgenommen. Hierzu wurden die Tiere auf einer festen Unterlage sitzend am Schwanz festgehalten. Die geladene Genkanone wurde mit dem Abstandhalter auf die Injektionsstelle aufgesetzt (Abb. 8). Der Schuss konnte nach Betätigung des Sicherungsknopfes ausgelöst werden. Zur Ruhigstellung der Tiere war eine flache Inhalationsnarkose mit Äther nötig.

Die Behandlung erfolgte alle drei Tage. Bei Größe der Tumoren bis ca. 10 mm Durchmesser erfolgte pro Behandlung jeweils eine Transfektion direkt in das Tumorgewebe (1,5 µg DNA/Schuß, 300 PSI Gasdruck), bei größeren Tumoren in fortgeschrittenen Stadien erfolgte ein mehrfacher Beschuß des peritumoralen Gewebes (bis zu 3 mal pro Behandlung gleichmäßig um den Tumorrund). Ab einer Tumorgroße von ca. 20 mm Durchmesser wurde kein Beschuss mehr vorgenommen, da durch den auftreffenden Gasdruck die teils nekrotischen Tumoren stark verletzt worden wären.

#### 2.2.5.6.2 Erhebung der experimentellen Befunde

Die Tumoren waren in der Regel ab dem zehnten Tag makroskopisch erkennbar. Ab diesem Zeitpunkt wurde ihre Größe bestimmt. Hierzu wurden im ersten Versuch mit einer Schiebleere der größte Durchmesser des Tumors sowie der zu ihm senkrecht stehende Durchmesser und die Höhe gemessen. Durch Multiplikation der drei Größen wurde ein genähertes Volumen errechnet. Da die Volumenberechnung durch die schwierige Höhenbestimmung zur Ungenauigkeit neigt und das Wachstum auch durch den Flächeninhalt gut repräsentiert wurde, wurde die Messung in den Folgeexperimenten auf den Flächeninhalt des Tumors in der Horizontalebene beschränkt.

Die Gewebeproben zur immunhistochemischen Untersuchung wurden am Tag 9 nach der Implantation entnommen. Nach Tötung der Maus durch Narkose mit Chloroform und zervikaler Dislokation wurde der Tumor und das ihn unmittelbar umgebende Hautgewebe mit chirurgischem Besteck entfernt. Bei der Anfertigung der Präparate wurden sowohl Schnitte aus dem Randbereich wie auch aus den zentralen Bereichen des Tumors gewonnen.



**Abb. 8: Eine C57BL/6 Maus während der Genterapie.** Im rasierten Rückenbereich der Maus ist der braune Tumor, das Melanom B16, zu erkennen. Diese Aufnahme entstand zwei Wochen nach der Implantation des Tumors.

### **2.2.6 Therapie der Tumore mit Zytokinen**

Die Implantation der Tumorzellen erfolgte wie unter 2.2.5.5 beschrieben. Die Zellen waren zur Implantation in PBS mit 1% Normalserum der p35/40<sup>-/-</sup>-C57BL/6-Maus verdünnt. Die Zellsuspensionen für die Implantation enthielten zusätzlich die zur Behandlung verwendeten Zytokine in der Konzentration pro Zellinjektion, die auch in der späteren Behandlung pro Injektion eingesetzt werden sollte. Das bedeutet, dass beispielsweise die zur Implantation verwendete Zellsuspension der IL-12 therapierten Versuchsgruppe bereits eine Konzentration von 10 ng/ml IL-12 aufwies. Die Zellimplantation erfolgte wie unter 2.2.5.5 beschrieben.

Die Applikation der Proteine wurde alle drei und vier Tage durchgeführt. Unter Äthernarkose wurden hierzu mit einer Hamilton-Spritze (Modell 1710TLL) jeweils 20µl des in (1% Normalserum enthaltenden) PBS verdünnten Zytokins in den Tumor injiziert. Dabei muss beachtet werden, dass gerade zu Beginn der Therapie die Tumoren noch so klein waren, dass eine sichere Injektion in das Tumorgewebe nicht möglich war, sondern nur eine Injektion in das ihn direkt umgebende Gewebe.

### **2.2.7 In vitro Modelle**

#### *2.2.7.1.1 Gewinnen der primären Zellkulturen*

Nichtinfizierte Mäuse im Alter von 8-12 Wochen wurden durch Chloroform betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Unter sterilen Bedingungen wurden die Milzen der Tiere entnommen, in ca. 5 mm breite Teilstücke mit einer Schere zerschnitten und in Zellsiebe mit 70 µm Maschenweite gelegt, die sich in Platten mit 6 Kavitäten befanden. In die Kavitäten war zuvor je 1 ml PBS vorgelegt worden, um einem Austrocknen der Organstücke entgegenzuwirken. Mit einem sterilen Spritzenstempel wurden die Organe unter vorsichtigem Druck durch das Sieb passagiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert. Zur Entfernung der Erythrozyten wurden die Zellen in 1 ml OrthoMune Lysepuffer / Milz resuspendiert und in diesem für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte eine Verdünnung der Suspension mit PBS auf 10 ml und erneutes Zentrifugieren. Nach weiterem, zweimaligem Resuspendieren in PBS und Zentrifugieren wurden die Zellen gezählt und auf die gewünschte Dichte in Zellkulturmedium für primäre Zellkulturen eingestellt.

#### *2.2.7.1.2 Infektion bzw. Stimulation der primären Zellkulturen*

Nach Einbringen der Zellsuspension in Platten mit 48 Kavitäten in einer Menge von 1 ml/Kavität wurden die Platten zunächst für 2 Stunden im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>; 90 % relative Luftfeuchtigkeit; bei 37°C) belassen. Erst nach dieser Ruhezeit erfolgte die Infektion bzw. Stimulation. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zugegebenen Volumina der in Zellkulturmedium verdünnten Salmonellen oder Proteine immer ein Volumen von 50 µl hatten. Als Erreger dienten wiederum lebende Salmonellen des Impfstamms SalmoVac®. Die Salmonellen wurden wie unter 2.2.4.1.1 beschrieben aufgetaut und nach dem Verdünnen in Zellkulturmedium in die Zellsuspension pipettiert. Ein Überwuchern der Kultur durch die Bakterien war durch die Antibiotika im Medium nicht möglich. Die Proteine wurden entsprechend in Medium vorverdünnt.

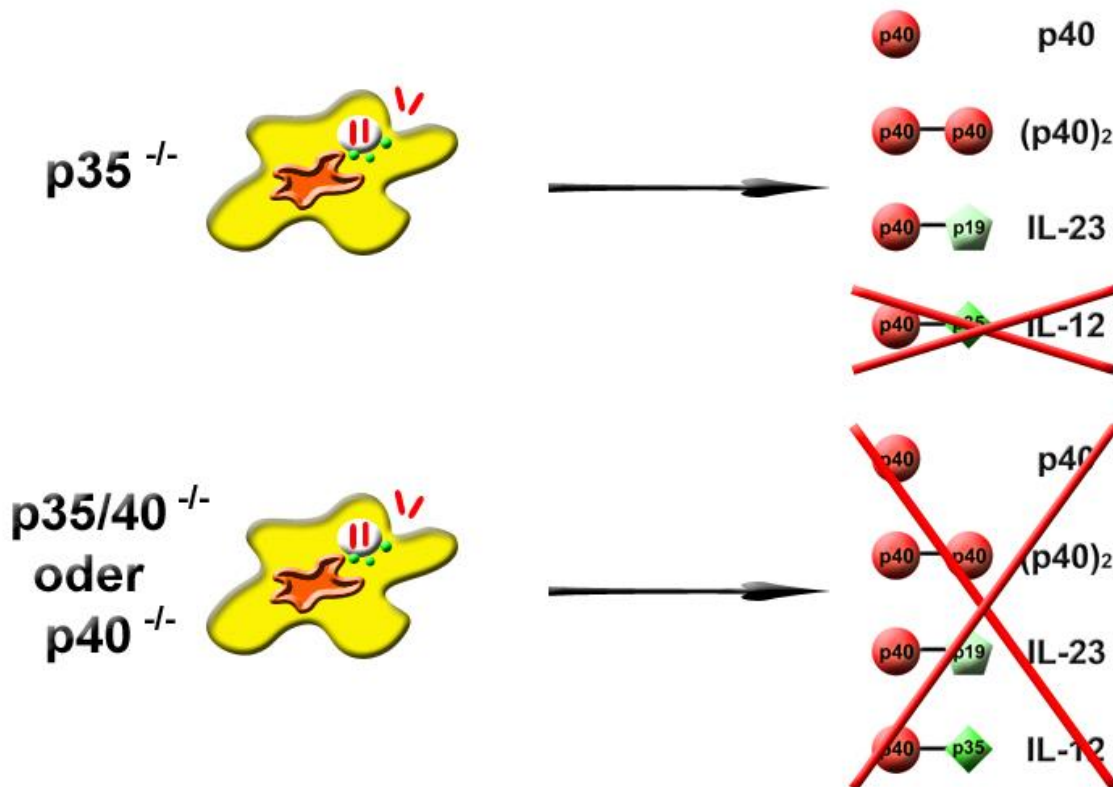
#### *2.2.7.1.3 Gewinnen der Kulturüberstände*

Nach Ablauf der Inkubationszeit von 72 Stunden wurden die Platten bei 300xg für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände vorsichtig mit 1000 µl Pipetten abgenommen und für die spätere Analyse bei –80°C gelagert.

## 2.3 Experimentelle Systeme

### 2.3.1 Modell des Funktionsverlustes – Das Infektionsmodell

Im Mausmodell können verschiedene Deletionsmutanten erzeugt werden. So können durch den Vergleich der unterschiedlichen Genotypen Rückschlüsse auf die Bedeutung eines Proteins gezogen werden. Zur Analyse der Wirkungsweise von der p40-Zytokine ohne IL-12 muss in einem System mit p35/40<sup>-/-</sup>- und p35<sup>-/-</sup>-Mäusen gearbeitet werden. Während p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse kein p40 bilden können, ist es p35<sup>-/-</sup>-Mäusen möglich, alle Zytokine der p40-Zytokinfamilie bis auf IL-12 zu produzieren (Abb. 9). Die Unterschiede zwischen diesen Genotypen sind dann auf die Effekte der p40-Zytokine unter Ausschluß der Wirkung von IL-12 zurückzuführen. Auf diese Weise konnten bereits in verschiedenen Infektionsmodellen Rückschlüsse auf die Bedeutung dieser Mitglieder der p40-Zytokinfamilie gezogen werden (Carr *et al.*, 1999; Decken *et al.*, 1998, Hölscher *et al.*, 2001; Lehmann *et al.*, 2001). Anstelle der p35/40<sup>-/-</sup>-Tiere können auch p40<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet werden, da das Protein p35 nicht ohne das Protein p40 aus der Zelle transportiert wird. Die Expression von p40 wird wiederum nur durch virales oder bakterielles Antigen induziert (Ma *et al.*, 1997). Diese beiden Mutanten, p35/40<sup>-/-</sup>- und p40<sup>-/-</sup>-Mäuse, besitzen somit zwar unterschiedliche Genotypen, jedoch den gleichen Phänotyp.



**Abb. 9: Schema des Versuchsaufbaus im Infektionsmodell.** Um die Wirkung der p40-Zytokine ohne Beteiligung von IL-12 zu erarbeiten, wurden  $p35^{-/-}$  und  $p40^{-/-}$  Mäuse mit Salmonellen infiziert. Nur in  $p35^{-/-}$ -Mäusen kann p40 exprimiert werden. Ist auch das Gen für p40 nicht vorhanden, wie in den  $p35/40^{-/-}$  und  $p40^{-/-}$ -Mäusen, kann kein p40 Protein gebildet werden. Beobachtete Unterschiede sind direkt auf das Vorhandensein von p40-Zytokinen zurückzuführen und sind unabhängig von IL-12.

### 2.3.2 Modell des Funktionsgewinns – Das Tumormodell

Während im Infektionsmodell *in vivo* und *in vitro* die Effekte der p40-Zytokine im Depletionsmodell dargestellt werden sollten, sollen im zweiten Teil der Arbeit die Ergebnisse einer Rekonstitution von Deletionsmutanten mit p40-Zytokinen, jedoch ohne IL-12, auf die Tumorabwehr dargestellt werden. Hierzu wird in Mäusen, die defizient für die Bildung von p40 und p35 sind, mit der p40-Plasmid-DNA eine lokale Expression fast aller p40-Zytokine erreicht, ohne dass jedoch IL-12 gebildet wird, da der Bindungspartner p35 in diesem System fehlt (Abb. 10). Zum einen ist dies eine neue Herangehensweise an die Problematik, da in bisher untersuchten Modellen die Bedeutung der IL-12-unabhängigen p40-Zytokine über ihre jeweiligen Deletionsmutanten untersucht wurde. Zum Zweiten wird die Expression von p40 nur durch Antigen, wie beispielsweise virales oder verschiedenes bakterielles Antigen,

induziert (Ma, 1997). Tumore jedoch sind nur schwach antigen und immunogen. Daher ist es unsicher, ob dieser schwache antigene Reiz zu einer Expression von p40 in p35<sup>-/-</sup>-Mäusen, wie im Infektionsmodell, führen würde. Durch die forcierte lokale Expression bzw. die Injektion eines Proteins kann im vorliegenden Tumormodell direkt auf die lokale therapeutische Bedeutung dieses Proteins geschlossen werden.

Um gezielt die Wirkung von p40-Zytokinen unter Ausschluss von IL-12 auf die Tumorabwehr untersuchen zu können, musste ein System gefunden werden, in dem endogene p40-abhängige Zytokine keinen Einfluss haben können. Das erforderte die Verwendung von p40<sup>-/-</sup>-Mäusen. p40<sup>-/-</sup>-Mäuse besitzen ein intaktes Gen für p35. Dieses Protein wird konstitutiv exprimiert, jedoch nicht sezerniert, bevor es über eine Disulfidbrücke an p40 gebunden wurde (Murphy *et al.*, 2000). Theoretisch ist es somit denkbar, dass p40<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Gentherapie mit einem für p40 kodierenden Plasmid IL-12 bilden können. Da dies nicht erwünscht war, waren Mäuse notwendig, die weder p40 noch p35 bilden konnten, also p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse. In einem Tumormodell müssen des Weiteren Zellen zur Etablierung des Tumors verwendet werden, die von der Maus nicht sofort als fremd erkannt und folglich abgestoßen werden. Die Zellen müssen somit denselben Haupthistokompatibilitätskomplex wie die Zellen der Maus besitzen. Da für die C57BL/6-Maus eine Reihe von Tumorzellen zur Verfügung steht, entschieden wir uns für die C57BL/6-p35/40<sup>-/-</sup>-Maus.

Als Kontrollvektoren im Gentherapiemodell wurde zum einen das leere Plasmid (pRSC) verwendet. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde die für p40 kodierende DNA verkehrt herum in das pRSC-Plasmid eingefügt (pRSC-p40-revers). Die dritte Gruppe wurde mit dem pRSC-Plasmid behandelt, in welches die p40-Sequenz in korrekter Richtung eingefügt wurde (pRSC-p40).

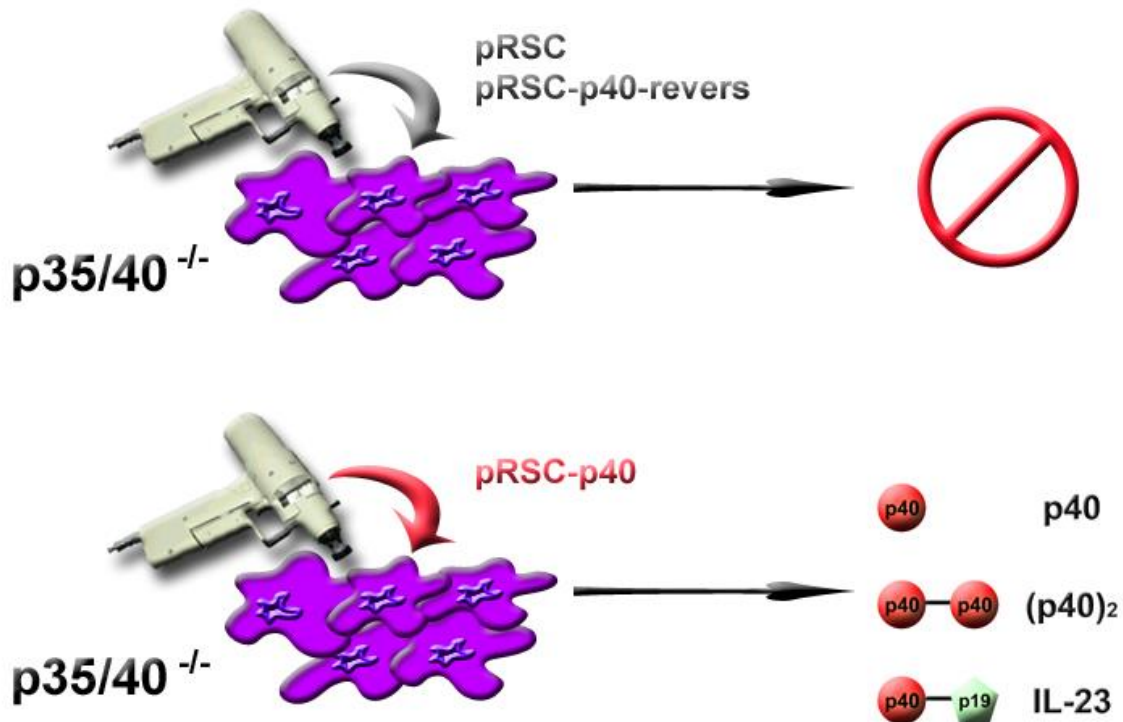
Während im vorhergehenden Abschnitt die Effekte der p40-Zytokine im Depletionsmodell gezeigt wurden, sollen im Folgenden die Ergebnisse einer Rekonstitution von Deletionsmutanten mit p40-Zytokinen, jedoch ohne IL-12, auf die Tumorabwehr dargestellt werden. Hierbei wird in Mäusen, die defizient für die Bildung von p40 und p35 sind, mit der p40-Plasmid-DNA eine lokale Expression fast aller p40-Zytokine erreicht, ohne dass jedoch IL-12 gebildet wird, da der Bindungspartner p35 in diesem System fehlt (Abb 3.6). Zum einen ist dies eine neue Herangehensweise an die Problematik, da in bisher untersuchten Modellen die Bedeutung der IL-12-unabhängigen p40-Zytokine über ihre jeweiligen

Deletionsmutanten untersucht wurde. Zum Anderen wird die Expression von p40 nur durch Antigen, wie beispielsweise virales oder verschiedenes bakterielles Antigen induziert (Ma *et al.*, 1997). Tumore jedoch sind nur schwach antigen und immunogen. Daher ist es unsicher, ob dieser schwache antigene Reiz zu einer Expression von p40 in p35<sup>-/-</sup>-Mäusen wie im vorhergehenden Infektionsmodell führen würde. Durch die forcierte lokale Expression bzw. die Injektion eines Proteins kann im vorliegenden Tumormodell direkt auf die lokale therapeutische Bedeutung dieses Proteins geschlossen werden.

Um gezielt die Wirkung von p40-Zytokinen unter Ausschluß von IL-12 auf die Tumorabwehr untersuchen zu können, musste ein System gefunden werden, in dem endogene p40-abhängige Zytokine keinen Einfluss haben können. Das erforderte die Verwendung von p40<sup>-/-</sup>-Mäusen. p40<sup>-/-</sup>-Mäuse besitzen ein intaktes Gen für p35. Dieses Protein wird konstitutiv exprimiert, jedoch nicht sezerniert, bevor es über eine Disulfidbrücke an p40 gebunden wurde (Murphy *et al.* 2000) Theoretisch ist es somit denkbar, dass p40<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Gentherapie mit einem für p40 kodierenden Plasmid IL-12 bilden können. Da dies nicht erwünscht war, waren Mäuse notwendig, die weder p40 noch p35 bilden konnten, also p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse. In einem Tumormodell müssen Zellen zur Etablierung des Tumors verwendet werden, die von der Maus nicht sofort als fremd erkannt und folglich abgestoßen werden. Die Zellen müssen somit denselben Haupthistokompatibilitätskomplex wie die Zellen der Maus besitzen. Da für die C57BL/6-Maus eine Reihe von Tumorzellen zur Verfügung stehen, entschieden wir uns für die C57BL/6-p35/40<sup>-/-</sup>-Maus.

Als Kontrollvektoren im Gentherapiemodell wurde zum einen das leere Plasmid (pRSC) verwendet. Als zusätzliche Negativkontrolle wurde die für p40 kodierende DNA verkehrt herum in das pRSC-Plasmid eingefügt (pRSC-p40-revers). Die dritte Gruppe wurde mit dem pRSC-Plasmid behandelt, in welches die p40 Sequenz in korrekter Richtung eingefügt wurde (pRSC-p40).





**Abb. 10: Schema des Versuchsaufbaus im Tumormodell.** Um die Wirkung der p40-Zytokine ohne die Beteiligung von IL-12 zu erarbeiten, wurden p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse mit dem für p40 kodierenden Plasmid oder Kontrollplasmiden, die nicht zur Expression von p40 führen, behandelt.

### 2.3.3 Statistische Methoden

Die statistischen Untersuchungen wurden mit dem Rang-Summen-Test nach Mann und Whitney durchgeführt. Wenn die Proben normalverteilt waren und die Varianzanalyse passierten erfolgte die Analyse durch den t-Test nach Student. Alle statistischen Untersuchungen wurden mit SigmaStat für Windows (Jandel, Erkrath) durchgeführt.

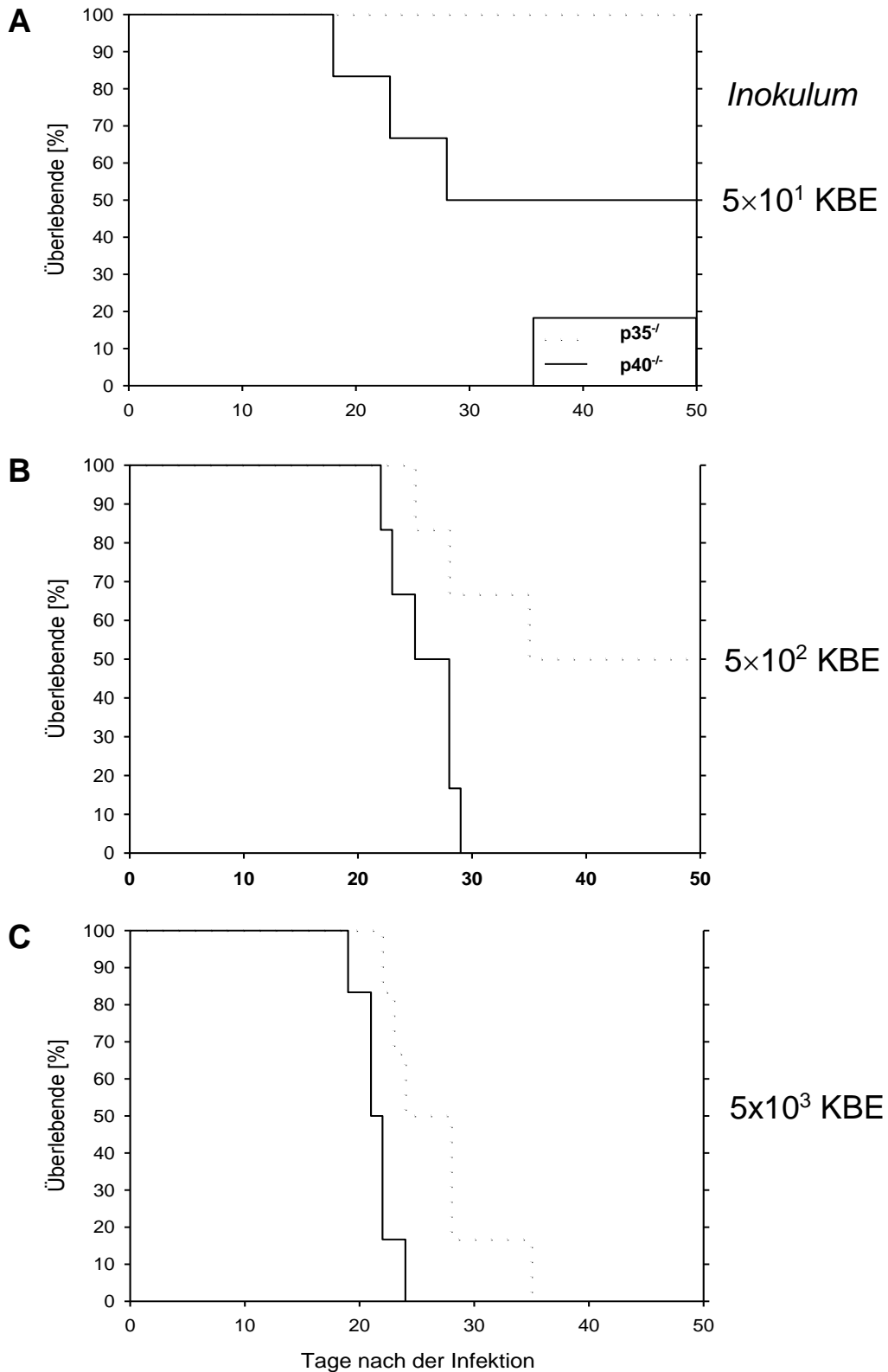
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 IL-12-unabhängige Effekte von p40-Proteinen in der Immunantwort gegen *Salmonella* Enteritidis

##### 3.1.1 Überleben der Mäuse nach der Infektion mit *Salmonella* Enteritidis

Zunächst sollte erfasst werden, ob Mitglieder der p40-Zytokine das Überleben der Tiere nach erfolgter Infektion unabhängig von IL-12 beeinflussen können. p35<sup>-/-</sup>- und p40<sup>-/-</sup>-Mäuse vom Stamm BALB/c wurden mit je drei unterschiedlichen Infektionsdosen infiziert und es wurde ihre Überlebensdauer bestimmt (Abb. 10).

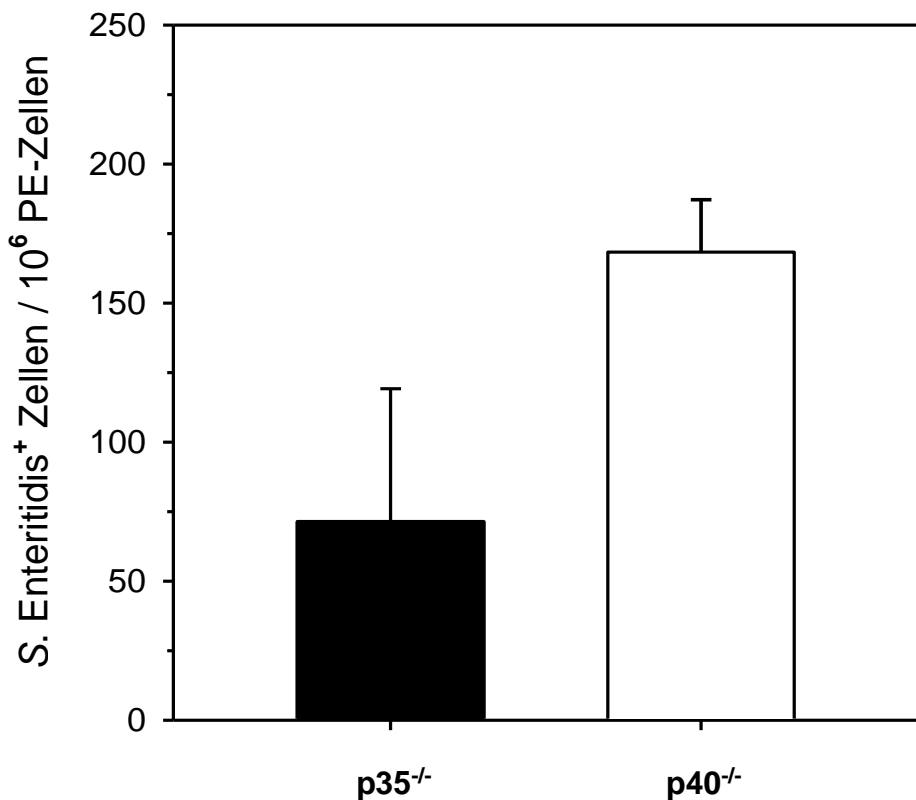
Bei Verwendung der niedrigsten Infektionsdosis von 50 Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) / Maus überlebten alle p35<sup>-/-</sup>-Mäuse das Experiment, während bereits die Hälfte aller p40<sup>-/-</sup>-Mäuse an der Infektion starb (Abb. 10 A). Die Infektionsdosis von 500 KBE / Maus stellte für die p35<sup>-/-</sup>-Mäuse die LD<sub>50</sub> (Infektionsdosis, bei der die Hälfte der infizierten Tiere stirbt) dar. Keine der p40<sup>-/-</sup>-Mäuse überlebte diese Infektion bis zum Tag 30 (Abb. 10 B). Bei einer Infektionsdosis von 5000 KBE/Maus schließlich starben alle Tiere bis zum Tag 46. Die p35<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine signifikant höhere durchschnittliche Überlebenszeit auf als die p40<sup>-/-</sup>-Mäuse (26,7 Tage gegen 21,5 Tage, p<0,05, t-Test nach Student) (Abb. 10 C).



**Abb. 10: Überleben von *p35*<sup>-/-</sup> und *p40*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Infektion mit unterschiedlichen Dosen von *Salmonella* Enteritidis.** Je 6 *p35*<sup>-/-</sup> (gepunktete Linie) und *p40*<sup>-/-</sup>-Mäuse (durchgezogene Linie) wurden mit 50 (A), 500 (B) und 5000 KBE (C) *Salmonella* Enteritidis / Tier intraperitoneal infiziert. Anschließend wurde das Überleben der Tiere dokumentiert.

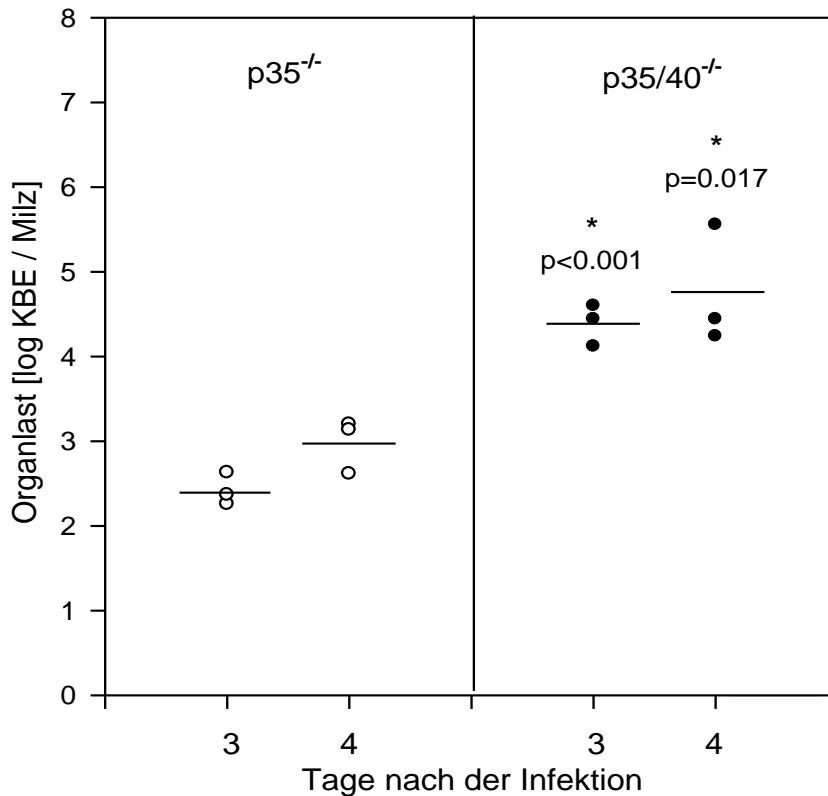
### 3.1.2 Untersuchung der frühen Infektionsphase

Um den Einfluss von p40-Zytokinen ohne IL-12 auf den Infektionsverlauf in der frühen Phase der Infektion analysieren zu können, wurden wieder BALB/c-p35<sup>-/-</sup> und p40<sup>-/-</sup>-Mäuse mit 10<sup>6</sup> KBE *Salmonella* Enteritidis infiziert. Zur Detektion Salmonellen-infizierter Phagozyten unter den Zellen der Bauchhöhle wurde eine neue Technik etabliert. Die Zellen wurden am Tag 4 durch eine peritoneale Lavage als Peritonealexsudat-Zellen (PE-Zellen) aus der Bauchhöhle gespült und die extrazellulären Salmonellen entfernt. Danach wurden 10<sup>6</sup> dieser Zellen vereinzelt und auf XLD-Selektivagar ausplattiert, ohne sie zu zerstören. Jede angewachsene Salmonellenkolonie auf dem Agar entsprach einer infizierten Zelle. Es zeigte sich, dass bei den p40<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant mehr Zellen in der Bauchhöhle mit Salmonellen infiziert waren. (Abb. 11).



**Abb. 11: Zahl infizierter Zellen aus einer peritonealen Lavage 4 Tage nach Infektion.** Je 3 p35<sup>-/-</sup> und p40<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit 10<sup>6</sup> Salmonellen / Maus infiziert. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Zahl infizierter Peritonealzellen (PE-Zellen) ermittelt (p<0,05, t-Test nach Student; eines von vier Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis)

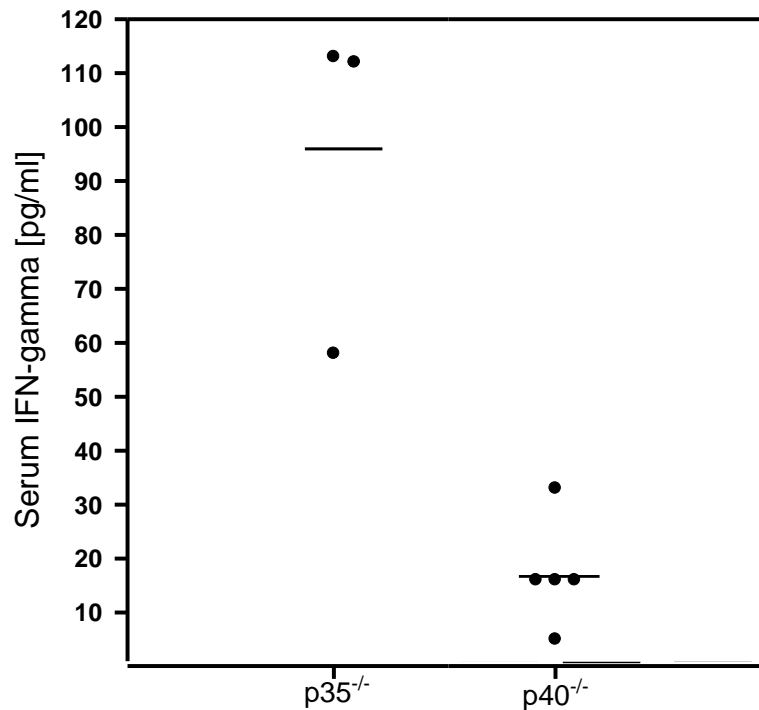
Um die systemische Ausbreitung der Salmonellen beurteilen zu können, sollte die Keimbelastung der Milz untersucht werden. Für die kurze Infektionsdauer wurde wieder eine höhere Infektionsdosis von  $10^6$  KBE Salmonellen / Maus gewählt. Nach 3 und 4 Tagen wurden die Mäuse getötet und die KBE in der Milz bestimmt (Abb. 12).



**Abb. 12: Keimbelastung der Milz von p35<sup>-/-</sup> und p35/40<sup>-/-</sup>-Mäusen nach drei und vier Tagen Infektion.** Je 3 129Sv/Ev-p35<sup>-/-</sup> und p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit  $10^6$  Salmonellen / Maus infiziert. Nach 3 und 4 Tagen wurden die Mäuse getötet und die Keimbelastung der Milz (log KBE/Milz) ermittelt. Dargestellt sind die Einzelwerte und der Mittelwert. Statistische Untersuchung mit t-Test nach Student. Eines von vier Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Als Ursache für eine bessere Bekämpfung der Salmonellen in dieser frühen Infektionsphase ist die Produktion von frühem systemischen IFN- $\gamma$  in den p35<sup>-/-</sup> Mäusen denkbar. p35<sup>-/-</sup> und p40<sup>-/-</sup> Mäuse wurden für diese Untersuchung mit  $10^7$  KBE / Maus intraperitoneal infiziert. Nach 2 Tagen wurde ihr Blut gewonnen und es wurden die Konzentrationen von p40 und IFN- $\gamma$  im Serum durch ELISA detektiert.

Es waren in den Seren von p35<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant höhere IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Vergleich zu den Seren der p40<sup>-/-</sup>-Mäuse nachweisbar.



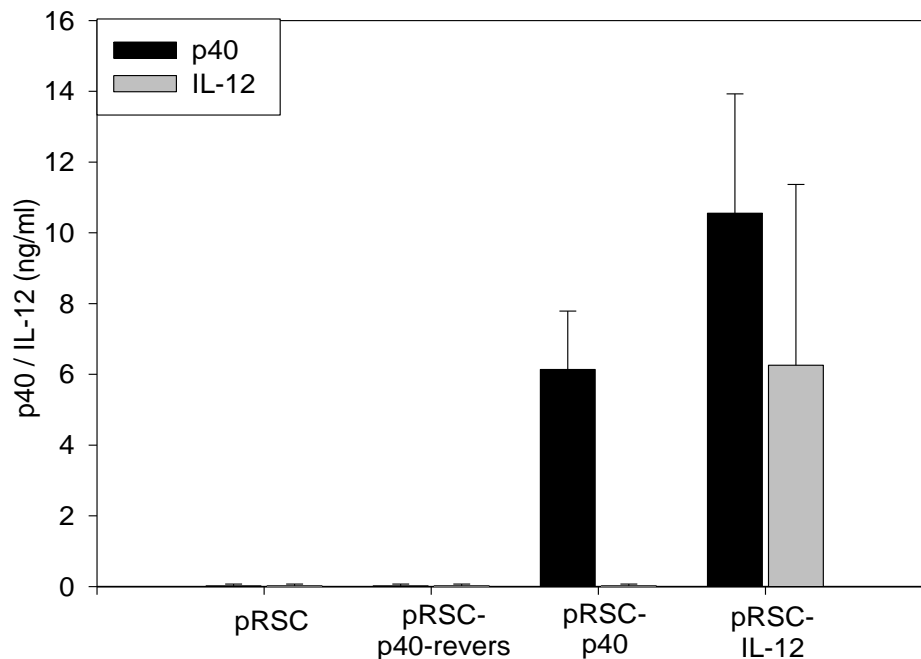
**Abb. 13: IFN- $\gamma$  im Serum Salmonellen-infizierter p35<sup>-/-</sup>- und p40<sup>-/-</sup>-Mäuse in der frühen Infektionsphase.** p35<sup>-/-</sup>- und p40<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden mit 10<sup>7</sup> KBE *Salmonella* Enteritidis / Maus intraperitoneal infiziert. Nach 48 Stunden wurden die Tiere getötet und ihr Blut gewonnen. Mit einem ELISA wurde IFN- $\gamma$  in den Serumproben quantifiziert. Dargestellt sind die Werte der Einzelmäuse und ihr Mittelwert. ( $p < 0,01$ , Student T-Test; eines von zwei Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis).

## 3.2 Effekte von p40 in der Tumorabwehr

### 3.2.1 Effekt der Transfektion von Tumorzellen *in vitro*

#### 3.2.1.1 Untersuchung der Expression von p40 und IL-12 *in vitro*

Es wurde untersucht, ob eine Transfektion mit den Plasmiden auch zur Expression der zu erwartenden Proteine führt. Es sollte gezeigt werden, dass kein IL-12 in den Kulturüberständen nach *in-vitro*-Transfektion mit pRSC-p40 messbar ist. Als Positivkontrolle für eine IL-12 Produktion durch die Zellen wurde ein Teil der Tumorzellen mit einem für IL-12 kodierenden Plasmid (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Dietrich, Universitätsklinikum Leipzig) transfiziert (Abb. 14).



**Abb. 14:** p40- und IL-12-Konzentrationen in Kulturüberständen von Lewis-Lungen Karzinom Zellen nach *in vitro* Transfektion.  $10^6$  Zellen wurden mit der Genkanone *in vitro* transfiziert und in zwei ml Medium kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Kulturüberstände abgenommen und auf durch die Zellen gebildetes p40 und IL-12 untersucht. Eines von zwei Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

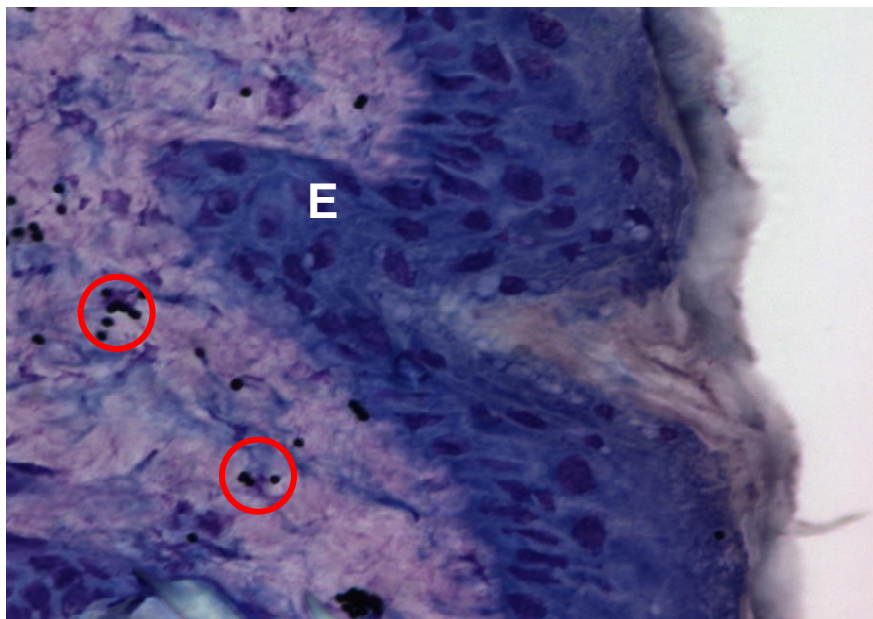
Nach Transfektion mit pRSC und pRSC-p40-revers wurden keine funktionellen p40-abhängigen Proteine durch die Zellen gebildet. Nach dem Beschuss mit pRSC-IL-12 waren im Kulturüberstand sowohl p40 als auch IL-12 nachweisbar. Die Transfektion der Zellen mit pRSC-p40 hingegen führte nur zur Expression von p40. IL-12 konnte

bei einem Detektionslimit von 0,035 ng / ml im Überstand der Kultur nicht nachgewiesen werden.

### **3.2.2 Gentherapie von Tumoren im Mausmodell**

#### **3.2.2.1 Untersuchung der Eindringtiefe der Partikel *in vivo***

Um die Wirkungsweise der Gentherapie *in vivo* einschätzen zu können und zu wissen, in welchen Schichten des Gewebes eine Proteinexpression nach Transfektion zu erwarten ist, war es zunächst nötig, die Eindringtiefe der Goldpartikel zu analysieren. Dabei zeigte sich, daß die Goldpartikel mit der präzipitierten Plasmid-DNA die Epidermis penetrierten und etwa 10-15 Zellschichten in das Gewebe eindringen (Abb. 15). Somit kam es nach Beschuss zu einer epidermalen und dermalen Penetration durch die Goldpartikel.



**Abb. 15: Histologischer Schnitt durch die Haut einer Maus nach Beschuss mit der Genkanone.** Die Goldpartikel (in den roten Kreisen) liegen in der Subkutis. Sie sind als kleine schwarze Partikel unterhalb der Zellen der Epidermis (E) zu erkennen.

#### **3.2.2.2 p40 Gentherapie von Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom**

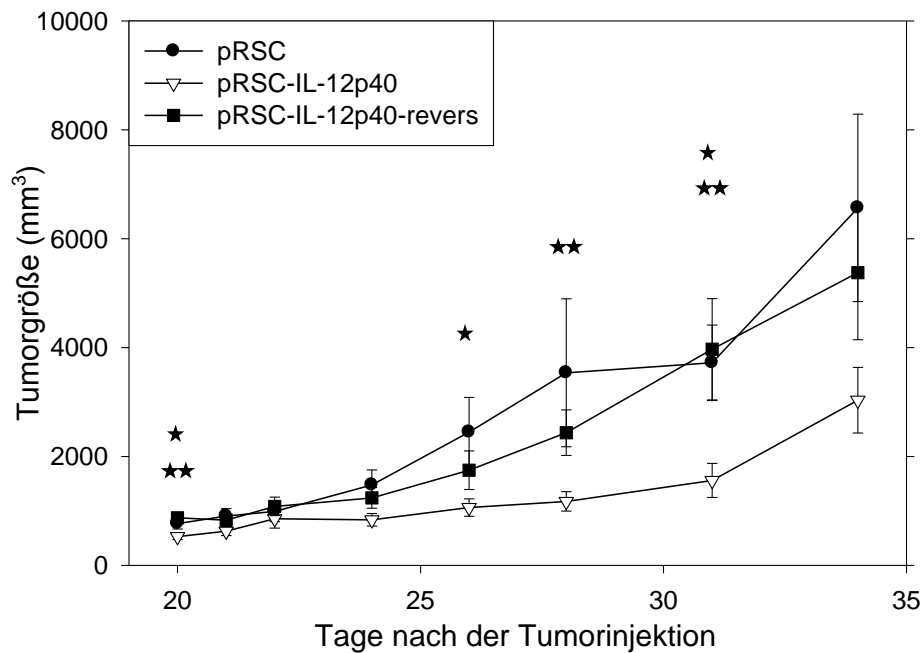
Um auch potenziell geringe Effekte des p40 auf die Tumorabwehr erkennen zu können, war zunächst die Verwendung eines wenig aggressiven Tumors nötig. Ein solcher relativ langsam wachsender Tumor ist das Lewis-Lungenkarzinom. Im Vergleich zu anderen Zellen benötigt man zur Etablierung eines Tumors in der Maus



hier vergleichsweise viele Zellen, nämlich  $1-5 \times 10^6$ /Maus. Die Mäuse sterben frühestens ab Tag 35. Während des Versuchs wurde die Tumorgöße beurteilt.

### 3.2.2.2.1 Wachstum der Tumoren

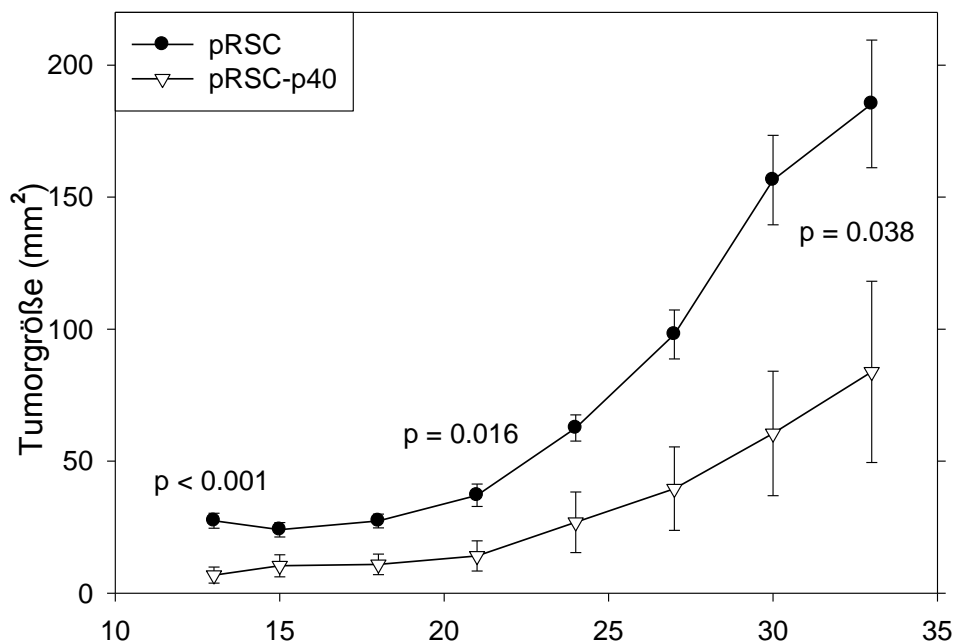
Ein äußerlich gut messbarer, wichtiger Parameter für die Bekämpfung des Tumors durch das Immunsystem ist die Entwicklung der Tumorgöße über die Dauer des Experimentes. Ein langsames Wachstum lässt auf eine erfolgreichere Eindämmung der Tumorentwicklung schließen.



**Abb. 16: Entwicklung der Tumorgößen während der Gentherapie von Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom.** 18  $p35/40^{-/-}$ -Mäusen wurden je  $10^6$  Zellen des Lewis-Lungenkarzinomes im Rückenbereich intradermal injiziert. Alle drei Tage wurden je 6 Mäuse mit pRSC-p40 (▽), dem Leerplasmid pRSC (●) oder pRSC-p40-revers (■) behandelt. Im Verlauf des Experiments wurde die Tumorgöße bestimmt. \* signifikanter Unterschied pRSC-p40 vs. pRSC ( $p < 0,05$ ), \*\* signifikanter Unterschied pRSC-p40 vs. pRSC-p40-revers ( $p < 0,05$ ). Keine signifikanten Unterschiede p40-revers vs. PRSC ( $p > 0,05$ ). Alle Ergebnisse statistisch überprüft mit dem t-Test nach Student.

Um eine eigene Wirkung der für p40 kodierenden DNA auszuschließen, wurde zunächst ein Experiment mit zwei Kontrollgruppen, zum einen mit dem leeren pRSC-Plasmid und zum anderen mit dem Plasmid pRSC-p40-revers durchgeführt (Abb. 16). Nachdem gezeigt war, dass das Plasmid mit der p40-revers DNA den gleichen

Effekt hatte wie das leere Plasmid, wurde in den weiteren Experimenten auf die pRSC-p40-revers Behandlung als Kontrolle verzichtet. Des Weiteren wurde in den Folgeexperimenten der Flächeninhalt der Tumore bestimmt, da die Messung des Volumens Messungenauigkeiten zu unterliegen schien. Das Tumorstadium in der pRSC-p40-behandelten Gruppe blieb in einem weiteren Experiment über die gesamte Zeit der vorgenommenen Messungen signifikant hinter dem der Kontrollgruppe zurück (Abb. 17).



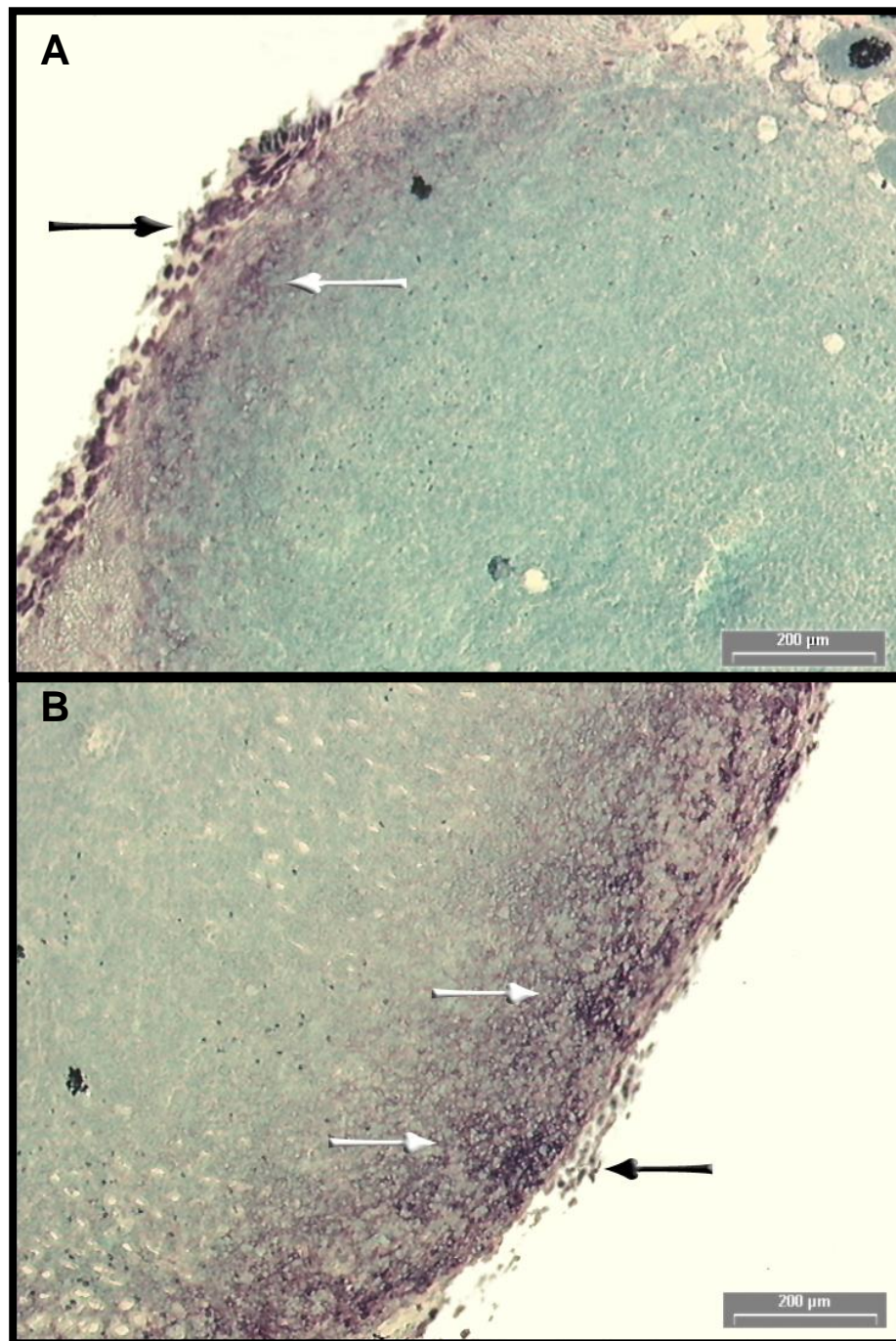
**Abb. 17: Entwicklung der Tumorgößen während der p40-Gentherapie von Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom.** 12 p35/40<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen des Lewis-Lungenkarzinomes im Rückenbereich intradermal injiziert. Alle drei Tage wurden je 6 Mäuse mit pRSC-p40 ( $\nabla$ ) beziehungsweise dem Leerplasmid pRSC ( $\bullet$ ) behandelt. Im Verlauf des Experiments wurde die Tumorgöße bestimmt. Die p-Werte der Tumorgößen sind für drei ausgewählte Zeitpunkte dargestellt. Alle p-Werte lagen zwischen  $p < 0,001$  und  $p < 0,05$  (t-Test nach Student).

#### 3.2.2.2.2 Immunhistochemische Untersuchung der Tumoren

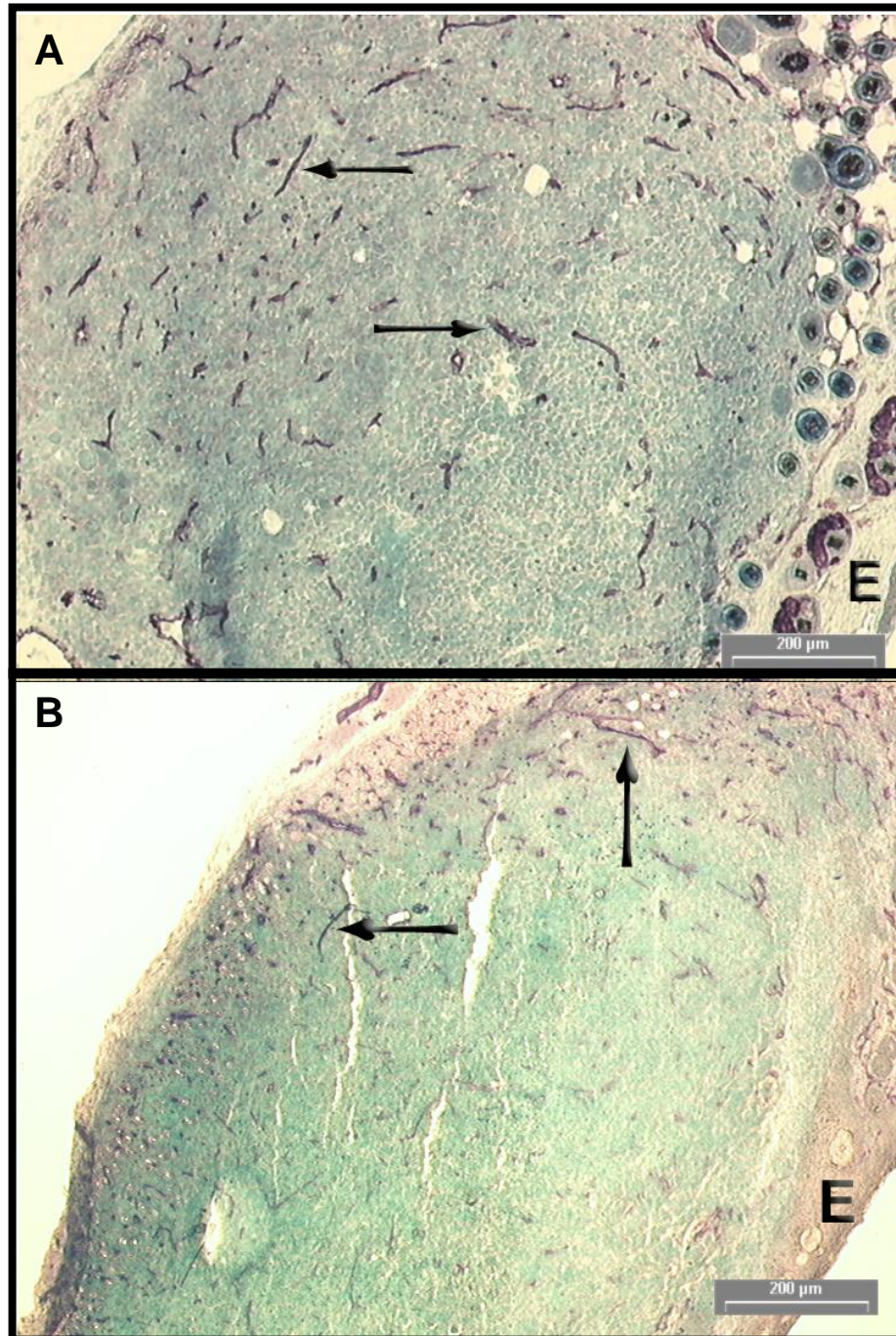
In weiteren Versuchen sollten die zugrundeliegenden Mechanismen dieser Phänomene untersucht werden. Hierzu wurde ein Experiment durchgeführt, um eventuelle entzündliche Zellinfiltrationen des Tumorgewebes zu untersuchen. Insgesamt 8 p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden wieder je zur Hälfte mit pRSC-p40 und pRSC

behandelt. Nach 9 Tagen wurden die Mäuse getötet und ihre Haut mit dem darin liegenden Tumor für die immunhistologische Untersuchung präpariert. Das Augenmerk richtete sich zum einen auf die Rekrutierung von Makrophagen (CD11b<sup>+</sup>) und die Infiltration des Tumors mit T- (CD8<sup>+</sup>), NK- (DX-5<sup>+</sup>) und Th -Zellen (CD4<sup>+</sup>). Des weiteren wurde die Gefäßversorgung des Tumors untersucht, indem die Gewebsschnitte mit Antikörpern gegen CD31, einem Oberflächenmolekül auf Endothelzellen, gefärbt wurden.

Bei den Kontrolltieren ist ein schmaler und lückenhafter Makrophagensaum im Randbereich des Tumors zu erkennen (Abb. 18 A), während bei den mit pRSC-p40 beschossenen Tumoren eine breite Barriere von Makrophagen mit Bildung von Makrophagennestern den Tumor abgrenzt (Abb. 18 B). T- und NK-Zellen konnten nach 9 Tagen im Gebiet des Tumors nicht gefunden werden. Die Blutgefäße im Tumor ließen sich bei der pRSC-behandelten Gruppe sowohl im Randbereich als auch im Zentrum und den der Hautoberfläche zugewandten Teilen darstellen. Der Tumor erschien insgesamt gut vaskularisiert (Abb. 19 A). Im Gegensatz hierzu waren Gefäßnetze bei den p40-behandelten Mäusen fast nur an den Tumorrändern sichtbar. Die Gewebsschichten an der Oberfläche der Tumoren, also jene Bereiche, die den durch die Transfektion veränderten Zellen am nächsten standen, wiesen weniger Gefäßstrukturen auf (Abb. 19 B).



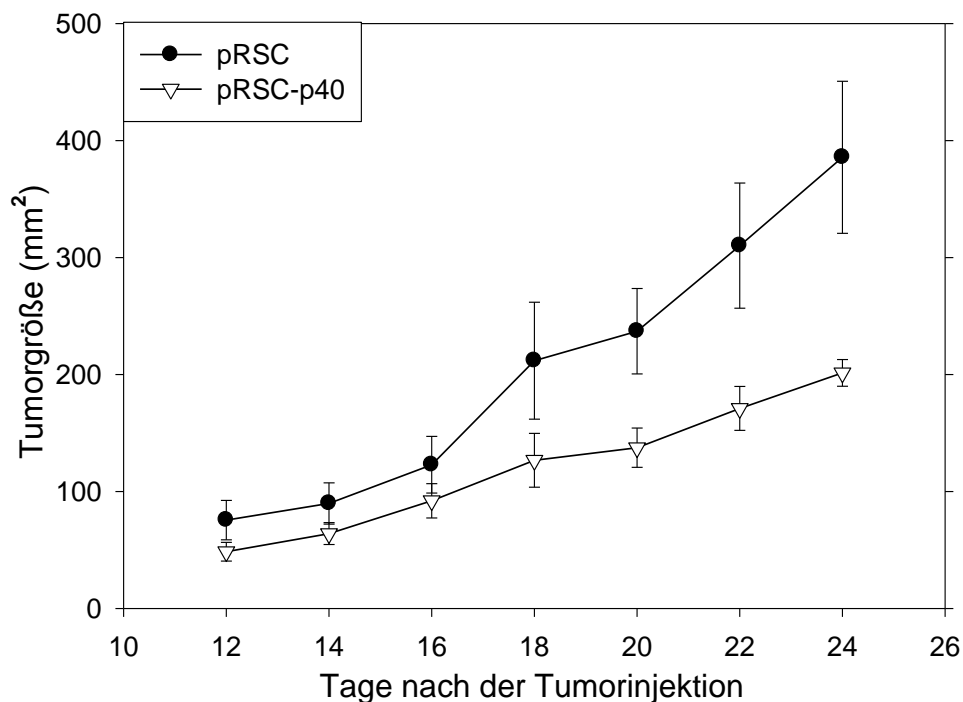
**Abb. 18: Immunhistologische Analysen des Lewis-Lungen Karzinoms am Tag 9 auf das Vorkommen von Makrophagen im subkutanen Grenzbereich des Tumors.** 8 p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden in zwei Gruppen geteilt und je zur Hälfte mit pRSC (A) bzw. pRSC-p40 (B) behandelt. Nach 9 Tagen erfolgte die Aufarbeitung und die Anfertigung immunhistologischer Präparate. Dargestellt ist die immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen CD11b. Die außerhalb des Tumors liegenden, stark angefärbten Zellen sind Fibrozyten (weiße Pfeile), im Tumorgewebe befinden sich Makrophagen (schwarze Pfeile, verifiziert durch die Gegenprobe mit einem Antikörper gegen F4/80, Daten nicht gezeigt)



**Abb. 19: Immunhistologische Analysen des Lewis-Lungen Karzinoms am Tag 9 auf das Vorkommen von Blutgefäßen im subkutanen Grenzbereich des Tumors.** 8 p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden in zwei Gruppen geteilt und je zur Hälfte mit pRSC (A) beziehungsweise pRSC-p40 (B) behandelt. Nach 9 Tagen erfolgte die Aufarbeitung und die Anfertigung immunhistologischer Präparate. Dargestellt ist die immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen CD31 (Oberflächenmolekül auf Endothelzellen). E bezeichnet den Bereich der Epidermis.

### 3.2.2.3 Gentherapie des Melanom B16

Nach den Experimenten mit dem Lewis-Lungenkarzinom sollte die Gentherapie mit p40 an einem aggressiveren Hauttumor getestet werden. Für die C57BL/6-Maus steht hier das Melanom B16 zur Verfügung. Insgesamt zwölf Mäusen wurden jeweils  $5 \times 10^5$  Zellen des Melanom B16, verdünnt in PBS, intradermal in die rasierte Rückenhaut. Eine Gruppe von sechs Mäusen wurde mit pRSC-p40, die andere Gruppe wurde mit dem Leerplasmid pRSC behandelt.



**Abb. 20: Entwicklung der Tumorgößen während der p40-Gentherapie von Mäusen mit Melanom B16.** 12 p35/40<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen des Melanom B16 im Rückenbereich intradermal injiziert. Alle drei Tage wurden je 6 Mäuse mit pRSC-p40 (▽) beziehungsweise dem Leerplasmid pRSC (●) behandelt. Im Verlauf des Experiments wurde die Tumorgöße bestimmt. Die Tumorgößen blieben tendenziell in der p40-behandelten Gruppe zu allen Zeitpunkten unter denen der pRSC-behandelten Gruppe.  $p > 0,05$  (t-Test nach Student)

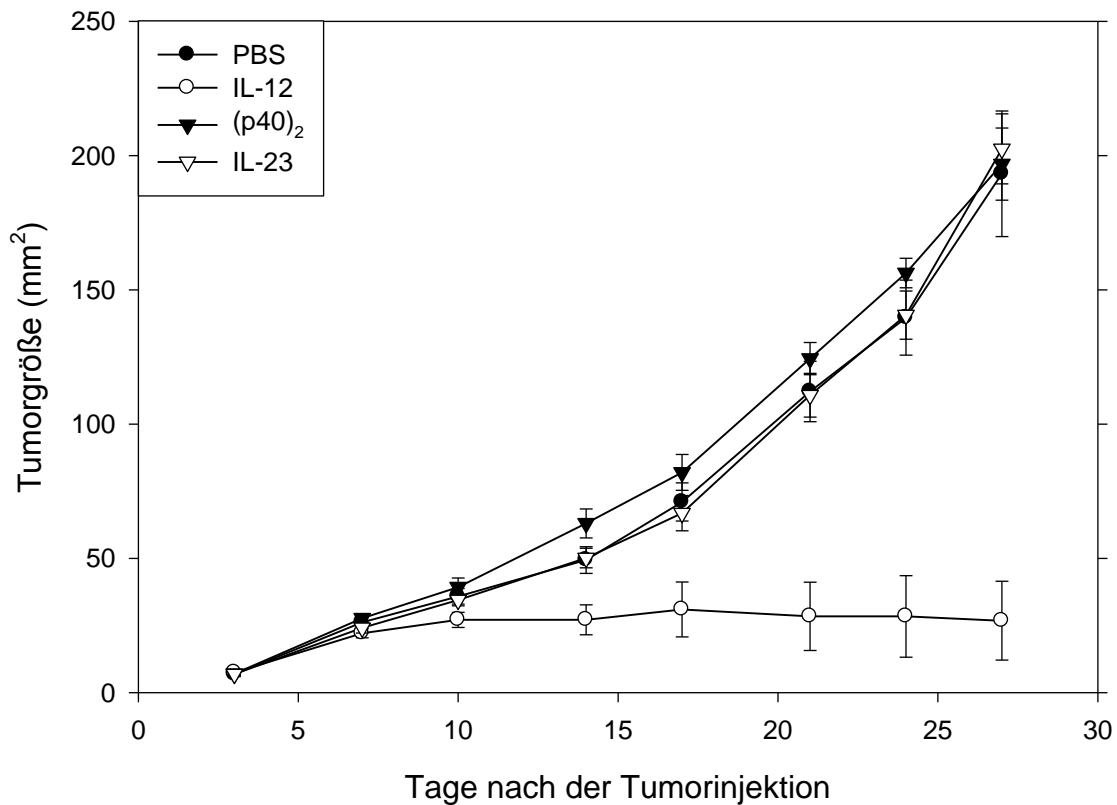
#### *3.2.2.3.1 Wachstum der Tumoren*

Die Tumorgrößen wurden über einen Zeitraum von 24 Tagen gemessen (Abb. 20). Es zeigte sich deutlich, dass eine Gentherapie mit p40 zu reduziertem Tumorwachstum führte. Die Tiere der Kontrollgruppe wiesen zu allen Zeitpunkten fast doppelt so grosse Tumore wie die Tiere der behandelten Gruppe auf. Diese Unterschiede zwischen beiden Gruppen waren jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

#### **3.2.3 Therapie von Tumoren im Mausmodell mit p40-abhängigen Zytokinen**

Um ein mögliches verantwortliches Zytokin der p40-Subfamilie zu identifizieren wurden in einem weiteren Experiment Tumore (Lewis-Lungenkarzinom) mit den Zytokinen in Proteinform behandelt. Die Applikation der Proteine erfolgte durch Injektion in den Tumor. Als Negativkontrolle diente PBS, als Positivkontrolle IL-12 (10ng/Injektion). Als Vertreter der p40-Subfamilie wurden (p40)<sub>2</sub> (1µg/Injektion) und IL-23 (100ng/Injektion) verwendet (Abb. 21).

Die Tumorgrößen der mit IL-12 therapierten Mäuse blieben nach einem kurzen Anstieg nahezu auf einem konstanten Wert stehen. Im Gegensatz hierzu nahmen die Tumoren der Mäuse der anderen Gruppen stetig an Größe zu. Auch ließen sich zwischen den Gruppen PBS, IL-23 und (p40)<sub>2</sub> keine Unterschiede feststellen.



**Abb. 21: Entwicklung der Tumorgößen während der Therapie von Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom mit p40-Proteinen.** 32 p35/40<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen des Lewis-Lungenkarzinoms im Rückenbereich intradermal injiziert. Zweimal pro Woche wurden je 8 Mäuse mit PBS (●), 10  $\mu\text{g}$  IL-12(p40)<sub>2</sub> (▲), 100ng IL-23 (▽) oder 10ng IL-12 (○) durch intratumorale Injektion behandelt. Im Verlauf des Experiments wurde die Tumorgöße bestimmt. Die Tumorgößen der mit IL-12 behandelten Tiere blieben ab Tag 14 signifikant hinter den Tumorgößen der Tiere der anderen Gruppen zurück ( $p < 0,05$ , t-Test nach Student). Dargestellt ist eines von zwei Experimenten mit gleichen Ergebnissen.

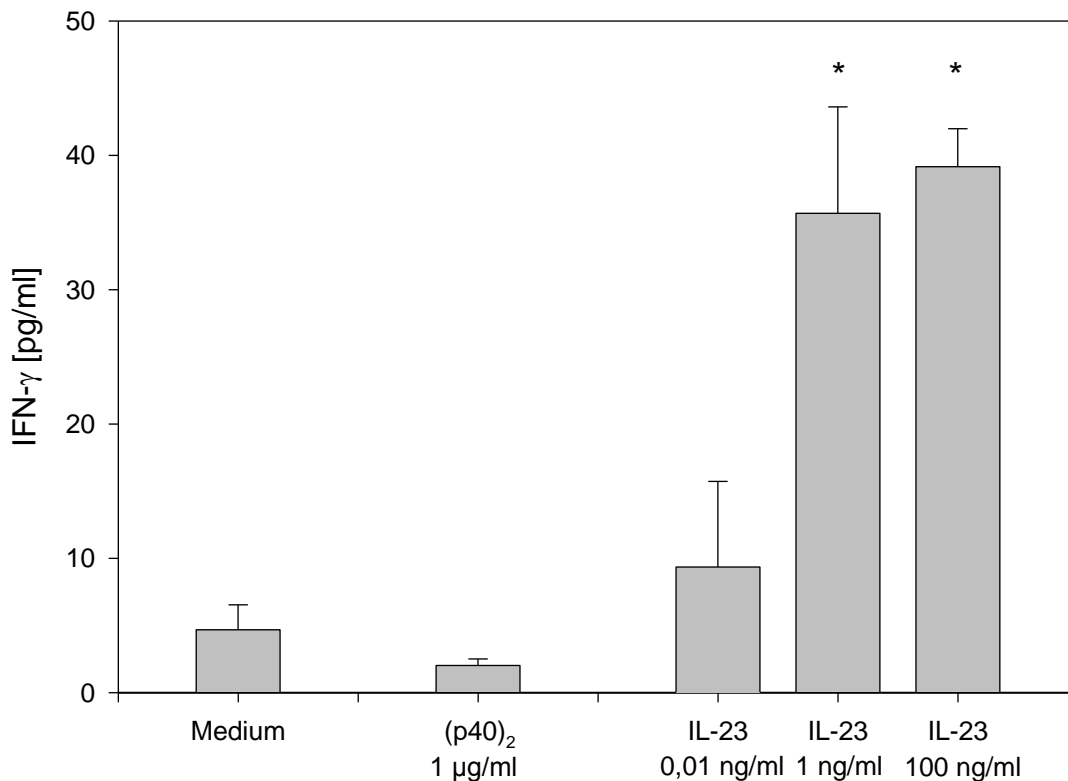


### **3.3 Untersuchungen zur Bedeutung der p40-Proteine *in vitro***

#### **3.3.1 Untersuchung des Effektes der p40 Proteine auf naive Milzzellen**

Da IL-23 noch nicht lange bekannt ist, sind potenzielle Effekte auf die zelluläre Immunantwort bisher nur ansatzweise geklärt. Eine mögliche Erklärung für die protektive Wirkung von p40-Proteinen ohne IL-12 *in vivo* wäre die Induktion einer zellulären Immunantwort, beispielsweise über IFN- $\gamma$ .

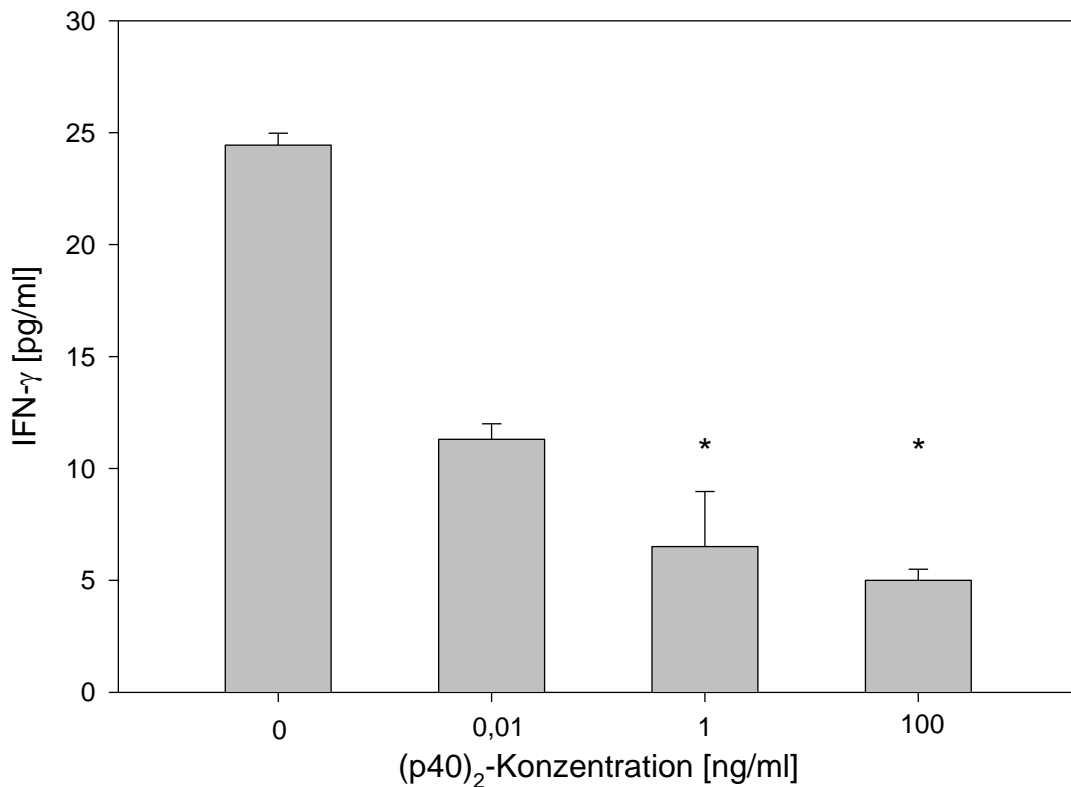
Um den Effekt und das Zusammenspiel von IL-12, (p40)<sub>2</sub> und IL-23 auf Immunzellen zu untersuchen, wurden primäre Zellkulturen mit den Zytokinen stimuliert. Um nahe an den natürlichen Verhältnissen zu arbeiten, wurden die Milzzellen aus BALB/c Wildtyp Mäusen präpariert. Nach Einstellen der Zellsuspension auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml wurden (p40)<sub>2</sub> und IL-23 in ansteigenden Konzentrationen von 10 pg/ml bis 100ng/ml zu den Suspensionen pipettiert. Erwartungsgemäß bildeten die Zellen nach Stimulation mit (p40)<sub>2</sub> kein IFN- $\gamma$ . Durch IL-23 Konzentrationen von 1 und 100 ng/ml ließen sich jedoch gegenüber der Mediumkontrolle signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentrationen erreichen ( $p < 0,05$ , Abb. 22).



**Abb. 22: IFN- $\gamma$  Produktion durch primäre Milzzellen nach Stimulation mit IL-23.**

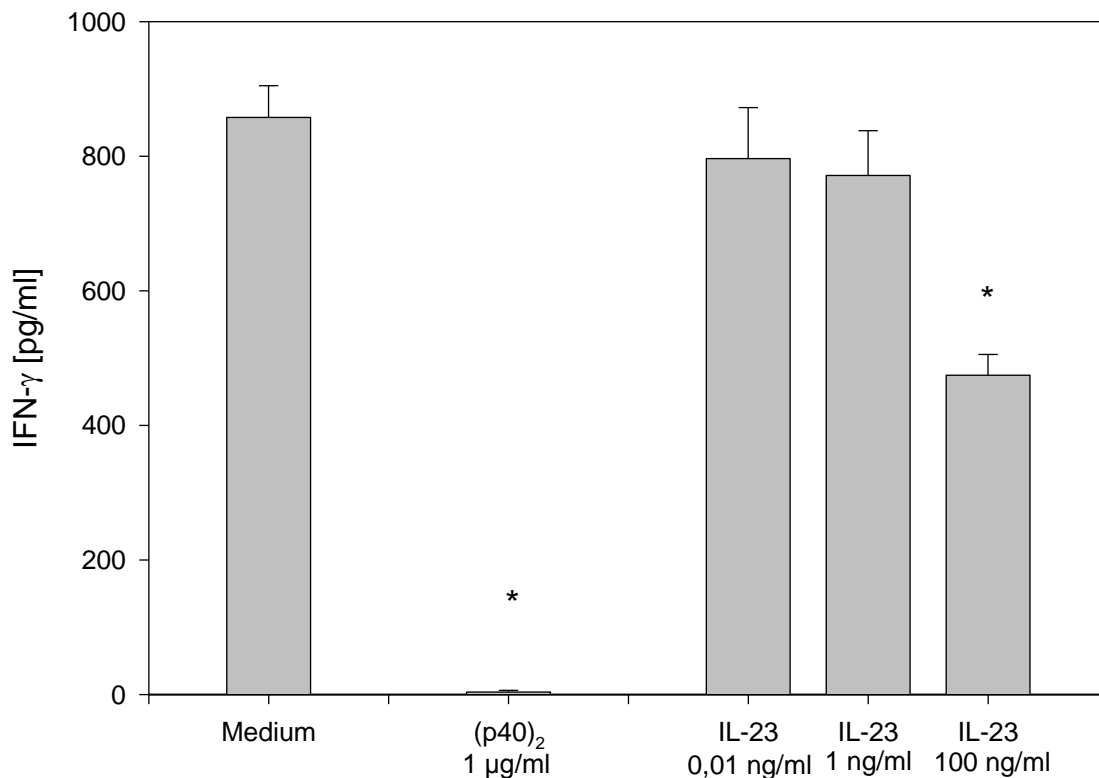
$5 \cdot 10^6$  primäre Milzzellen aus BALB/c-Wildtyp-Mäusen wurden mit (p40)<sub>2</sub> und unterschiedlichen Konzentrationen IL-23 stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mit einem ELISA auf gebildetes IFN- $\gamma$  untersucht. Nach Stimulation mit 1 und 100 ng/ml IL-23 konnten im Vergleich zu Medium- und (p40)<sub>2</sub>-Stimulation signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentrationen gemessen werden (\*  $p < 0,05$ , t-Test nach Student). Dargestellt ist eines von drei Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

IL-23 bindet wie auch IL-12 über den IL-12R $\beta$ 1 an die Zelle. Des Weiteren zeigt IL-23 *in vitro* im Gegensatz zu (p40)<sub>2</sub> agonistische Wirkung zu IL-12, da es wie IL-12 zur IFN- $\gamma$  Sekretion durch Milzzellen führt. Es ist auch bekannt, dass IL-12 durch (p40)<sub>2</sub> an seinem Rezeptor antagonisiert werden kann. Diese Zusammenhänge legten die Frage nahe, ob auch IL-23 durch IL-12(p40)<sub>2</sub> an seinem Rezeptor antagonisiert wird oder ob es unabhängig vom IL-12R $\beta$ 1 wirken kann. Zur Klärung dieser Frage wurden wiederum  $5 \cdot 10^6$  primäre Milzzellen zunächst für 1 Stunde mit unterschiedlichen Konzentrationen (p40)<sub>2</sub> inkubiert, um eine Blockade des IL-12R $\beta$ 1 zu ermöglichen. Es wurde dann IL-23 zur Kultur pipettiert, so dass eine Endkonzentration von 100 ng/ml erreicht wurde.



**Abb. 23: IFN- $\gamma$  Sekretion durch primäre Milzzellen nach Vorinkubation mit (p40)<sub>2</sub> und anschließender Stimulation mit IL-23.**  $5 \cdot 10^6$  primäre Milzzellen aus BALB/c-Wildtyp-Mäusen wurden zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen (p40)<sub>2</sub> inkubiert. Nach 30 Minuten wurde IL-23 zur Kultur pipettiert und so eine Konzentration von von 100ng IL-23 / ml in der Kultur erreicht. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden wurden die Kulturüberstände abgenommen und auf ihre IFN- $\gamma$  Konzentration untersucht. Durch (p40)<sub>2</sub> Konzentrationen von 1 und 100ng/ml konnte die IFN- $\gamma$  Produktion signifikant gehemmt werden (\*  $p < 0,05$ , Vergleich zu 0 ng/ml (p40)<sub>2</sub>, t-Test nach Student). Dargestellt ist eines von zwei Experimenten mit vergleichbarem Ergebnis.

Es war somit gezeigt, dass IL-23 zur Induktion einer IFN- $\gamma$  Produktion über den IL-12Rbeta1 binden muss, und es stellte sich als nächste Frage, ob auch durch geeignete Konzentrationen IL-23 das IL-12 an seinem Rezeptor antagonisiert werden kann.



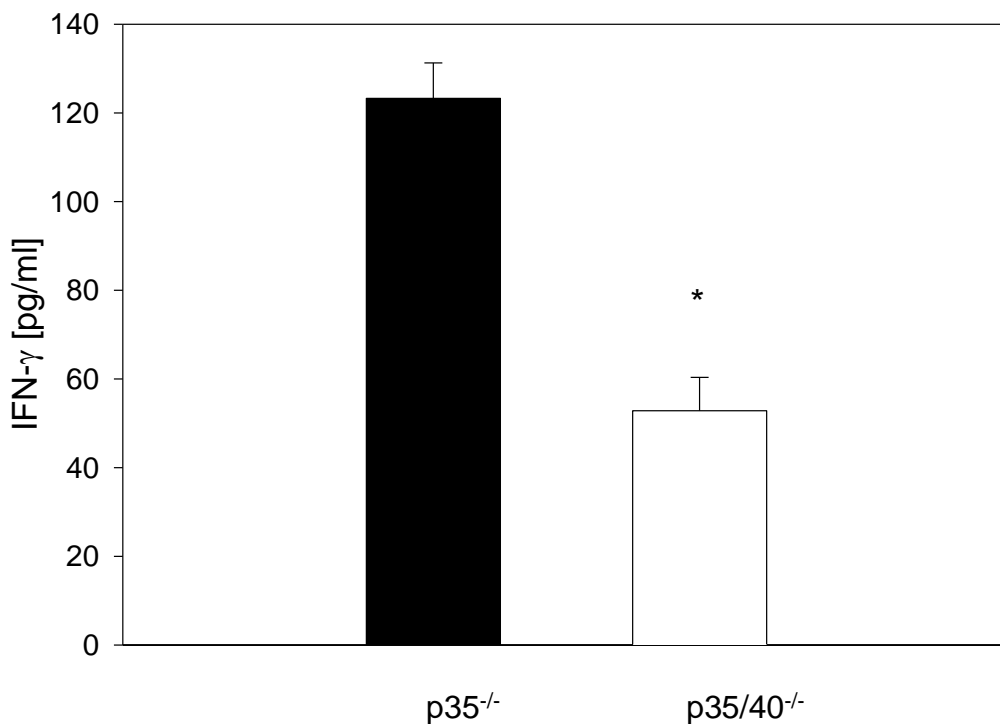
**Abb. 24: IFN- $\gamma$  Sekretion durch primäre Milzzellen nach Vorinkubation mit IL-23 und (p40)<sub>2</sub> und Stimulation mit IL-12.**  $5 \cdot 10^6$  primärer Milzzellen aus BALB/c Mäusen wurden 30 Minuten lang mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-23 inkubiert. Danach wurde 1 ng/ml IL-12 (Endkonzentration) zur Kultur pipettiert und nach 48 Stunden das gebildete IFN- $\gamma$  bestimmt. Durch 100 ng/ml IL-23 ließ ich die IFN- $\gamma$  Konzentration signifikant senken (\*  $p < 0,05$ , im Vergleich zur Mediumkontrolle, t-Test nach Student; eines von zwei Experimenten mit ähnlichem Ergebnis)

Hierzu wurden  $5 \cdot 10^6$  primäre Milzzellen zunächst eine Stunde lang mit IL-23 in unterschiedlichen Konzentrationen, (p40)<sub>2</sub> bzw. Medium inkubiert. Nach dieser Vorinkubation zur eventuellen Blockade des Rezeptors wurde IL-12p75 in einer Konzentration von 1 ng/ml zugegeben. Es zeigte sich, dass IL-12(p40)<sub>2</sub> erwartungsgemäß IL-12p75 vollständig antagonisiert und auch IL-23 in einer Konzentration von 100 ng/ml die Wirkung des IL-12p75 signifikant ( $p < 0,05$ ) herabsetzt.

### **3.3.2 Untersuchungen zur Bedeutung der p40 Proteine in einem *in vitro* Infektionsmodell**

Es konnte *in vivo* im Infektionsmodell gezeigt werden, dass die Aktivierung von Makrophagen in der Frühphase der Infektion bedeutend für die protektiven Effekte der p40-Subfamilien-Proteine ist. Die PE-Zellen der p35<sup>-/-</sup> Mäuse konnten die intrazelluläre Infektion der Phagozyten in der Bauchhöhle besser bekämpfen, was sich in niedrigeren Zahlen infizierter PE-Zellen ausdrückt. Somit konnte es zu diesem frühen Zeitpunkt bei p35<sup>-/-</sup>-Tieren zu einer Reduktion der die Milz befallenden Salmonellen kommen. *In vitro* konnte in einem Stimulationsmodell an primären Milzzellen gezeigt werden, dass IL-23, nicht jedoch (p40)<sub>2</sub> zu einer IFN- $\gamma$  Sekretion führt. Es interessierte daher die Frage, ob die beobachtete Aktivierung der Phagozyten nach Infektion direkt durch p40-Proteine erfolgt, und wenn ja, durch welche. Es wurde ein *in vitro* Modell zur gezielten Untersuchung dieser Zusammenhänge aufgebaut. Die frühe Abwehr von Krankheitserregern lässt sich mit Infektionen von primären Milzzellkulturen *in vitro* simulieren. Diese Experimente haben den Vorteil, dass ohne den Einsatz vieler Mäuse überschaubare und leicht zu manipulierende Systeme betrachtet werden können.

Als aussichtsreichster Kandidat als Aktivator für Makrophagen kommt IFN- $\gamma$  in Betracht. IFN- $\gamma$  wird nach IL-12 Stimulation durch NK-Zellen und naive T-Zellen gebildet. Es wurde eine Infektion simuliert, in deren Verlauf p40 gebildet wird.  $5 \cdot 10^6$  primäre Milzzellen aus p35<sup>-/-</sup> und p35/40<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden mit  $5 \cdot 10^6$  KBE lebenden *Salmonella* Enteritidis Bakterien *in vitro* infiziert. Die Abnahme der Überstände erfolgte nach drei Tagen. Es ist zu berücksichtigen, dass der einzige Unterschied zwischen den Kulturen im Vorliegen bzw. Fehlen der p40-Proteine außer IL-12 liegt. Tatsächlich waren nach der *in vitro* Infektion Unterschiede zwischen den beiden Genotypen erkennbar. Die p35<sup>-/-</sup>-Maus-Milzzellen produzierten auf den Antigenreiz hin deutlich mehr IFN- $\gamma$  als die Milzzellen, in deren System p40-abhängige Proteine fehlten (Abb. 25).

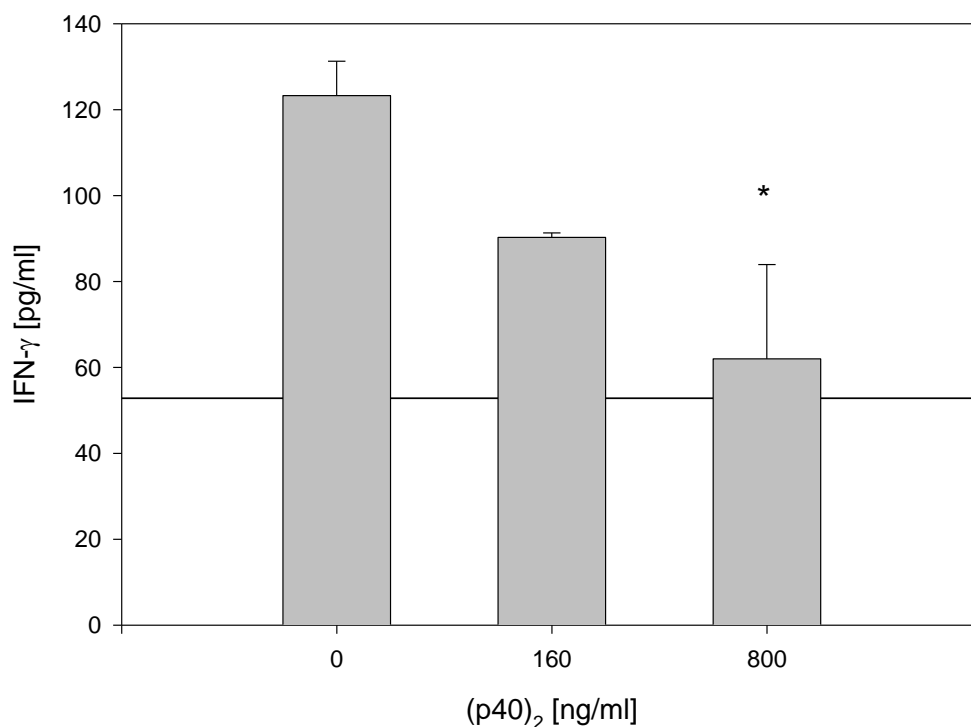


**Abb. 25: IFN- $\gamma$  Produktion durch primäre Milzzellen nach Salmonellen-Infektion *in vitro*.** Primäre Milzzellkulturen aus p35<sup>-/-</sup>- und p35/40<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $5 \cdot 10^6$  Zellen/ml) wurden mit Salmonellen ( $5 \cdot 10^6$  KBE/ml) unter Zugabe von Antibiotika infiziert. Nach drei Tagen wurde in den Kulturüberständen IFN- $\gamma$  durch einen ELISA bestimmt ( $p < 0,05$ , t-Test nach Student). Dargestellt ist eines von zwei Experimenten mit gleichem Ergebnis.

Es konnte gezeigt werden, dass Proteine der p40-Subfamilie die Expression des Makrophagen aktivierenden IFN- $\gamma$  anregen. Aus den bereits vorgestellten *in vitro* Daten geht hervor, dass (p40)<sub>2</sub> nicht zur Produktion von IFN- $\gamma$  führt. Vielmehr lassen sich durch (p40)<sub>2</sub> die IFN- $\gamma$  induzierenden p40-Proteine IL-12 und IL-23 an ihrem IL-12R $\beta$ 1 antagonisieren (Abb. 23 und 24).

Bis zur Fertigstellung dieser Arbeit stand kein ELISA zur Detektion von IL-23 in der Kultur zur Verfügung. Um dennoch indirekt zu zeigen, dass p40-Proteine außer IL-12 und (p40)<sub>2</sub> für die IFN- $\gamma$  Sekretion in diesem *in vitro* Infektionssystem verantwortlich sind, wurde in einem identischen Versuchsaufbau zu infizierten Milzzellkulturen aus p35<sup>-/-</sup>-Mäusen im folgenden Versuch (p40)<sub>2</sub> in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Es war aufgrund der bereits gezeigten Daten davon auszugehen, dass

es sich bei dem IFN- $\gamma$  induzierenden p40 Protein um ein anderes Zytokin als (p40)<sub>2</sub>, also p40-x oder IL-23 handelt. Diese Proteine müssten über den IL-12R $\beta$ 1 binden und somit, wie bereits gezeigt, durch (p40)<sub>2</sub> an ihrem Rezeptor antagonisierbar sein. Wie aus Abb. 26 hervorgeht, konnte durch (p40)<sub>2</sub> in einer Konzentration von 800 ng/ml die IFN- $\gamma$  Produktion von 120 pg/ml in der Mediumkontrolle auf die Hälfte reduziert werden. Der Effekt der p40-Proteine konnte somit durch 800 ng/ml (p40)<sub>2</sub> vollständig antagonisiert werden.



**Abb. 26: Interferon- $\gamma$  Produktion durch p35<sup>-/-</sup> Milzzellen in vitro mit und ohne Zugabe von (p40)<sub>2</sub>.** Primäre Milzzellkulturen von p35<sup>-/-</sup>-Mäusen ( $5 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden mit Salmonellen ( $5 \times 10^6$  KBE/ml) unter Zugabe von Antibiotika infiziert. Zusätzlich lagen in den Kavitäten unterschiedliche Konzentrationen an (p40)<sub>2</sub> vor. Nach drei Tagen wurde in den Kulturüberständen IFN- $\gamma$  über einen ELISA bestimmt. Die Referenzlinie stellt die IFN- $\gamma$  Produktion durch p35/40<sup>-/-</sup>-Maus-Milzzellen ohne den Zusatz von Zytokinen dar ( $p < 0,05$ , (p40)<sub>2</sub> 0 ng/ml verglichen mit (p40)<sub>2</sub> 800 ng/ml, t-Test nach Student; eines von zwei Experimenten mit ähnlichem Ergebnis).

## 4 DISKUSSION

IL-12 ist ein zentrales Zytokin in der Immunantwort des Körpers. Durch IL-12 kommt es sowohl zur Aktivierung des unspezifischen Teils des Immunsystems über NK-Zellen als auch zur Einleitung und Aufrechterhaltung der spezifischen Immunität über die Th1-Polarisierung von CD4<sup>+</sup> Zellen und die Stimulation von CD8<sup>+</sup> Zellen. So erfolgt der Aufbau eines starken immunologischen Netzwerks unter der Beteiligung von NK-, Th1- und zytotoxischen T-Zellen sowie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als Mediatoren und NO als Effektor (Gately *et al.*, 1998, MacMicking *et al.*, 1997). Durch diese protektiven Effekte hat das Immunsystem die Chance, sich exogenen Bedrohungen durch intrazelluläre Bakterien und Parasiten wie auch endogenen Bedrohungen durch Krebs zu erwehren.

In den letzten Jahren wurde viel Hoffnung in IL-12 als potenzielles Therapeutikum gesetzt. So könnte IL-12 als Adjuvans bei Immunisierungen gegen Mykobakterien und Parasiten eingesetzt werden (Lindblad *et al.* 1997, Afonso *et al.* 1994). Auch konnte in mehreren Tumormodellen eine starke antitumorale Wirkung von appliziertem IL-12 gezeigt werden (Brunda 1995, Yu *et al.* 1996). In klinischen Studien wurde bereits die Möglichkeit untersucht, IL-12 in der Tumorthherapie einzusetzen (Lotze *et al.*, 1996). Diesen positiven Effekten von IL-12 stehen jedoch seine pathologischen gegenüber. So kommt es bei einer akuten „Überdosis“ IL-12 zur Ausbildung des toxischen Schocks. Durch langanhaltende Th1-Polarisierung kann es zur Ausbildung von Autoimmunität kommen (Caspi, 1998). Jedoch entfernt sich die Fachwelt gerade auf dem Gebiet der pathologischen Th1-Antwort in Form der Autoimmunität immer mehr vom Th1-Th2-Paradigma. Vielmehr wird die Rolle sogenannter regulatorischer T-Zellen diskutiert, welche jede Form von Immunantwort abschwächen.

Der molekulare Aufbau von IL-12 als Heterodimer macht es möglich, dass die an seinem Aufbau beteiligten Moleküle p35 und p40 auch getrennt voneinander sezerniert werden könnten. Praktisch ist dies jedoch nur bei p40 der Fall, da p35 nicht ohne vorherige Bindung an p40 aus der Zelle transportiert wird (D'Andrea *et al.*, 1992; Ma *et al.*, 1997). Bekannte Proteine, an deren Aufbau sich p40 beteiligt, haben sich als Antagonisten zu IL-12 an seinem Rezeptor erwiesen. Studien von Mattner *et al.* hatten dies für p40 und (p40)<sub>2</sub> schon 1993 gezeigt. In viralen und bakteriellen Infektionsmodellen war es jedoch seit 1997 mehreren Gruppen gelungen, eindeutig



einen agonistischen Effekt zu demonstrieren. Es begann die Suche nach den möglichen Ursachen eines solchen Agonismus. Mit der Entdeckung von IL-23 ist ein möglicherweise in diesen Systemen verantwortlicher Agonist gefunden worden. Es besitzt zu IL-12 agonistische Effekte auf murine naive T-Zellen und wird wie auch IL-12 von Makrophagen und Dendritischen Zellen sezerniert (Oppmann *et al.*, 2000). Wie diese Zusammenhänge zeigen, handelt es sich bei den p40 Proteinen um ein so noch nicht bekanntes Modell in der Immunologie. Dass ein so wichtiger Mediator der zellulären Immunität wie IL-12 bei Austausch eines seiner Moleküle gleichzeitig sein eigener Antagonist wie auch Agonist sein kann, ist erstaunlich. Und dass zusätzlich Zytokine gefunden werden, die sich in ihrer Wirkung der Homologie zu den p40-Proteinen bedienen, unterstreicht die zentrale Rolle dieser Zytokinfamilie. Es ist wichtig, die Bedeutung und das Zusammenspiel der unterschiedlichen Mitglieder verstehen zu lernen, um die Möglichkeit des Einsatzes solcher Zytokine in der Therapie prüfen zu können. In Bezug auf die protektiven Effekte der p40 Proteine außer IL-12 ist von besonderem Interesse, wie Expression und Wirkung anderer Zytokine, wie beispielsweise IFN- $\gamma$ , beeinflusst werden. Gerade die aktuelle Bedeutung der Salmonelleninfektionen bei Geflügel, Mensch und Säugetier (van Loock *et al.* 2000) und die bereits Einzug haltende Gentherapie bei kleinen Haustieren (Keller *et al.*, 1996) machen es notwendig, ein breites Verständnis über die Wirkung und Funktion neuer Zytokine zu erarbeiten.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Bedeutung von p40-abhängigen Proteinen ohne IL-12 in einem Infektionsmodell mit *Salmonella* Enteritidis dargestellt werden. Hierzu wurden p35-defiziente Mäuse verwendet, die im Vergleich zu p40-defizienten Tieren alle p40-abhängigen Proteine außer IL-12 bilden können. In diesem Modell wurde in erster Linie auf die unspezifische Immunantwort eingegangen. Im zweiten Teil der Arbeit stand der therapeutische Einsatz von p40 im Tumormodell im Vordergrund. Durch die Verwendung p40-defizienter Mäuse konnten hier endogene p40-Proteine keine Rolle spielen. Zum einen wurde der Effekt einer Gentherapie mit p40-kodierenden Plasmiden untersucht, um im Folgenden durch Proteintherapie mit bekannten p40-Proteinen einen möglichen Kandidat für die protektiven Effekte in der Gentherapie zu finden. Im dritten Teil wurden die Effekte und das Zusammenspiel von IL-12, (p40)<sub>2</sub> und IL-23 *in vitro* untersucht.

#### 4.1 Protektive Effekte von p40-Proteinen ohne IL-12 in der primären Immunantwort gegen *Salmonella* Enteritidis

Es ist bekannt, dass IL-12 für eine protektive Immunantwort gegen Salmonellen essentiell ist, und zwar in unterschiedlichen Infektionsmodellen wie *Salmonella* Typhimurium und *Salmonella* Enteritidis (Mastroeni *et al.* 1996, Kincy-Cain *et al.* 1996). In dieser Arbeit steht jedoch nicht IL-12 im Mittelpunkt, sondern vielmehr die p40-Proteine außer IL-12. Zu diesem Zweck wurden gendefiziente Mäuse intraperitoneal mit *Salmonella* Enteritidis infiziert und zunächst auf das Überleben der Infektion untersucht. In unserem Labor vorangegangene Untersuchungen mit dem in dieser Arbeit verwendeten Impfstamm zeigten, dass Wildtyp-Mäuse Infektionen mit bis zu  $10^7$  KBE/Maus problemlos überleben können (Lehmann *et al.*, 2000). Dagegen waren für alle IL-12-defizienten (also sowohl p35- als auch p40-gendefiziente) Mäuse Infektionen mit über 5000 KBE/Maus tödlich. Ähnliche Ergebnisse erhielten Mastroeni *et al.* 1996 bei Verwendung eines polyklonalen Antikörpers gegen IL-12, der auch p40 und IL-23 neutralisiert. Auf das Überleben von hohen Infektionsdosen haben p40-Proteine bei Abwesenheit von IL-12 somit keinen Einfluss. Werden jedoch geringere, für Wildtyp-Mäuse subletale Infektionsdosen von 50 bis 5000 KBE/Maus gewählt, haben die p40-Proteine einen deutlichen Einfluss auf den Infektionsverlauf. Mäuse mit funktionellen p40-Proteinen überlebten eine Infektion mit 5000 KBE auch ohne IL-12 signifikant länger als p40<sup>-/-</sup>-Mäuse, die keinerlei p40-Proteine mehr bilden können. Bei niedrigen Infektionsdosen (50 und 500 KBE/Maus) ergaben sich sogar Unterschiede in der Überlebensrate. Ein Teil der p35<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte dank der p40-Proteine die Salmonellen auf Dauer bekämpfen. Dies deutet bereits auf einen protektiven Effekt der p40-Proteine in der initialen Phase einer Infektion mit geringen Erregermengen in diesem Infektionsmodell hin. Können die Salmonellen gleich zu Beginn der Infektion kontrolliert werden, so sterben in der Folge weniger Mäuse an einer stürmischen, systemischen Infektion. Längeres Überleben kann aber auch im Aufbau einer guten spezifischen Immunität begründet sein. Im Folgenden sollte jedoch untersucht werden, wie p40 über die initialen Prozesse wie die Phagozytose und Eliminierung der Erreger zur Protektion beitragen kann. Tatsächlich waren in der Bauchhöhle von p40<sup>-/-</sup>-Mäusen 4 Tage nach intraperitonealer Infektion deutlich mehr infizierte Zellen als bei p35<sup>-/-</sup>-Mäusen zu finden. Dies kann durch eine ungenügende Aktivierung der Makrophagen durch

Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  verursacht sein. Ohne diese Aktivierung kommt es nicht zur Bildung antimikrobiell wirkender Metabolite (Effektormoleküle) und so zu einem besseren intrazellulären Überleben der Salmonellen. Da in der Bauchhöhle residente Makrophagen als erste mit den Erregern in Kontakt kommen, kann es durch eine ungenügende Bekämpfung und Eindämmung des Pathogens vor Ort zu einer schnellen systemischen Infektion kommen. In weiteren Experimenten sollte der Verlauf des Organbefalls durch Salmonellen in dieser Anfangsphase der Infektion untersucht werden. Bereits nach 3 bis 4 Tage waren signifikante Unterschiede in der Keimbelastung in der Milz zu beobachten. Die Milzen der p40<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen eine signifikant höhere Keimbelastung auf als die der p35<sup>-/-</sup>-Tiere. Die p40-Proteine scheinen, direkt oder indirekt, durch die Aktivierung der Makrophagen zu einer Eliminierung aufgenommener Salmonellen und Reduktion der Bakterien an der Eintrittspforte zu führen. In der Folge sind in den Milzen der p35<sup>-/-</sup>-Mäuse weniger Bakterien als in den p40<sup>-/-</sup>-Mäusen zu finden. Ein möglicher Aktivator der Makrophagen ist IFN- $\gamma$ , da IFN-g über die iNOS zur verbesserten Bekämpfung intrazellulärer Bakterien führt und die antigenen Peptide vermehrt auf den MHC-I- und MHC-II-Molekülen präsentiert werden. IL-12 induziert die Freisetzung großer Mengen IFN- $\gamma$ . Wenn es sich um durch p40 vermittelte, zu IL-12 agonistische Effekte handelt, so läge es nahe, dass IFN- $\gamma$  das verantwortliche Aktivatormolekül ist. Nach zwei Tagen Infektion konnten tatsächlich signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Konzentrationen im Serum von p35<sup>-/-</sup> im Vergleich zu p40<sup>-/-</sup>-Mäusen gemessen werden. Die Konzentrationen an TNF- $\alpha$  hingegen waren nicht signifikant unterschiedlich (Daten nicht gezeigt).

Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich folgern, dass p40-Proteine zur Induktion einer IFN- $\gamma$  Produktion führen. Da es sich um sehr frühes IFN- $\gamma$  handelt, kommen NK-Zellen, aber auch die Makrophagen selbst als Produzenten in Frage (Munder *et al.*, 1998). IFN- $\gamma$  ist als starker Makrophagenaktivator bekannt. Durch dieses Aktivatormolekül wird den Makrophagen eine effektive Abtötung intrazellulärer Salmonellen ermöglicht. In der Folge ist durch die p40-Proteinen bereits nach kurzer Infektionszeit die Keimbelastung in der Milz von p35<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant niedriger als ohne. Eine bessere Überlebenschance existiert in diesem System vermutlich durch eine schnellere Bekämpfung der Salmonellen durch die Makrophagen schon in der Bauchhöhle. p40-defiziente Mäuse erliegen der Infektion leichter, da eine unzureichende Eindämmung durch die Phagozyten, verursacht

durch fehlendes IFN- $\gamma$ , in letzter Konsequenz zu einer stärkeren systemischen Infektion führt., was sich in den Keimbelastungen der Milz niederschlägt. Um die zentrale Rolle des IFN- $\gamma$  weiter herauszuarbeiten, könnten IFN- $\gamma$  neutralisierende Antikörper zum Einsatz gebracht werden, welche die positiven Effekte der p40-Proteine verhindern würden.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit klar gezeigt werden, dass p40-Proteine ohne IL-12 über die Induktion von IFN- $\gamma$  zur Eliminierung der Salmonellen in der Frühphase der Infektion führen.

## **4.2 Effekte von p40 in der Tumorabwehr**

Salmonellen, Mykobakterien und Viren wie MCMV können vom Körper relativ leicht als antigene Organismen erkannt werden und sie induzieren eine starke Immunantwort vom Typ 1, weshalb sie sich gut zur Erarbeitung p40-abhängiger protektiver Effekte im Depletionsmodell eignen. Tumoren werden vom Körper nicht als fremd erkannt und induzieren daher nur in prognostisch guten Fällen eine Immunantwort. Der Einfluss bestimmter Zytokine in der Tumorummunologie wird meist nicht durch Depletionsmodelle erarbeitet, sondern durch exogene Applikation der Proteine.

### **4.2.1 Eine Gentherapie von Tumoren mit p40 führt zu reduziertem Tumorwachstum**

Ein besonderer Weg der Applikation eines Zytokines ist die Gentherapie, bei der nur das Plasmid zur Produktion des Zytokines in die Zellen des Körpers eingebracht wird. Um lokale Gentherapien vornehmen zu können, wird mit einer Genkanone gearbeitet, die eine örtlich begrenzte Applikation zulässt und mögliche systemische Nebenwirkungen durch das exprimierte Zytokin auf ein Minimum reduziert. So konnte für IL-12 eine antitumorale Wirkung nach lokaler Gentherapie gezeigt werden (Rakhmilevich *et al.* 1996 und 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurden p35/40-gendefiziente Tiere verwendet. Nach Injektion der Tumorzellen in die Haut wurden diese mit Kontrollplasmiden oder für p40-kodierenden Plasmiden behandelt. Um einen unerwünschten Effekt von sogenannten CpG-Motiven im für p40 kodierenden Teil des Plasmides auszuschliessen, wurde als zusätzlicher Kontrollvektor pRSC-p40-revers verwendet. CpG-Motive können über den *toll-like*-Rezeptor auf Makrophagen oder Dendritischen

Zellen eine unspezifische Immunantwort vom Typ 1 in Gang setzen (Chuang *et al.*, 2002). Nach der Transfektion von Lewis-Lungenkarzinomzellen *in vitro* wurden nach 48 Stunden die Zellkulturüberstände auf p40-Proteine untersucht. Nach der Transfektion mit dem pRSC-p40-Plasmid kam es zur Expression von p40, nicht jedoch zur Expression von IL-12. Ob und in welchen Mengen IL-23 expremiert wurde, konnte leider nicht gezeigt werden, da bei Fertigstellung der Arbeit noch kein ELISA für dieses Zytokin zur Verfügung stand. Transfektionen mit dem pRSC und dem pRSC-p40-revers-Plasmid führten erwartungsgemäß nicht zur p40 Expression. Ein Effekt auf die Tumorabwehr ist somit in diesem System nur nach dem Beschuß mit pRSC-p40 nur von p40-Proteinen, nicht jedoch von IL-12 abhängig.

Durch Gentherapie *in vivo* gelangen die Goldkugeln mit den Plasmiden ca. 10-15 Zellschichten tief in die Haut. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Gruppen überein. Dort wurde zusätzlich zur Mikroskopischen Kontrolle der Eindringtiefe bereits auch gezeigt, daß die Plasmide von den Zellen dieser Hautschichten, expremiert werden (Lin *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 1990). Man kann daraus folgern, dass die Expression in den äußeren 15 Hautschichten erfolgt. Somit können alle Zellen der Dermis einschließlich der Langerhans-Zellen die Proteine expremieren und auch von den sezernierten Proteinen erreicht und eventuell auch aktiviert werden.

Die Gentherapie des Lewis-Lungenkarzinoms mit pRSC-p40 führte zu einer Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zu den Gruppen pRSC und pRSC-p40-revers. Effekte eventuell vorliegender CpG-Motive im Bereich der für p40-kodierenden DNA spielen also in diesem Gentherapiemodell keine Rolle. Nur die Tumorgrößen der pRSC-p40-Gruppe blieben deutlich in ihrem Wachstum zurück. Diese Unterschiede waren schon nach ca. 20 Tagen zu beobachten. Eine Regression des Tumors fand nie statt. Es war somit davon auszugehen, dass weitgehend unspezifische Mechanismen zur Eindämmung des Wachstums führten. Diese Vermutung findet in der Arbeit von Brunda *et al.* aus dem Jahr 1993 Bestätigung. Dort konnte gezeigt werden, dass eine Regression des Tumors nach IL-12-Gentherapie nur durch die Beteiligung von CD8<sup>+</sup>-Zellen möglich war. Da CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in der vorliegenden Arbeit nicht im Tumorgewebe detektiert werden konnten ist es wahrscheinlich, dass die Eindämmung des Tumorwachstums durch die Makrophagen erfolgte. Für eine Regression des Tumors, vermittelt durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen fehlte jedoch vermutlich die Wirkung des IL-12. Diese Wirkung wird vermutlich

durch eine starke IFN- $\gamma$  Produktion und damit verbundene IP-10 Sekretion vermittelt (Pertl *et al.*, 2001).

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Therapie an einem Hauttumor, dem Melanom B16 getestet werden. Dabei konnte ein Trend in der Reduktion des Tumorwachstums gezeigt werden. Wie aus der Arbeit von Rakhmievich *et al.* bekannt ist, wächst das Melanom B16 sehr schnell. (Rakhmievich *et al.*, 1996) In dieser Arbeit wurden C57BL/6-Wildtyp-Mäuse verwendet. Diese können das für die zelluläre Immunität wichtige IL-12 exprimieren. Zusätzlich wurden sie mit IL-12 kodierenden Plasmiden therapiert. Selbst bei diesem Versuchsaufbau konnte im Gegensatz zu anderen Tumorzelllinien keine Regression des Tumors beobachtet werden.

Die Transfektion von Tumorzellen mit pRSC-p40 *in vitro* führte zur Expression großer Mengen von p40-Proteinen. Die Gentherapie mit pRSC-p40 führte im Tumormodell mit dem Lewis.Lungenkarzinom zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums.

#### **4.2.2 Protektive Effekte durch verminderte Neoangiogenese und erhöhte Makrophagenimmigration**

Es konnten bis zum Tag 9, an dem die Präparate aus den Tieren entnommen wurden, keine CD4<sup>+</sup>-, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oder NK-Zellen im Bereich der Tumoren nachgewiesen werden. Dies deckt sich, wie bereits erwähnt, mit der Veröffentlichung von Brunda *et al.*, die 1993 in ihrer Veröffentlichung beschrieben, dass es erst nach einer Immigration von CD4, CD8 und NK-Zellen in das Tumorgewebe zur Regression kommt, in dem vorliegenden Modell eine Regression jedoch nur durch die IL-12-Proteintherapie erfolgt. pRSC-p40 behandelte Tumoren zeichneten sich durch einen sie umgebenden Saum aus Makrophagen aus. Des Weiteren waren die Tumoren zwar von Blutgefäßen umgeben, doch in ihrem Zentrum war nur spärlich Gefäßendothel nachzuweisen. Im Gegensatz hierzu waren bei der Kontrollgruppe kaum Makrophagen im Tumorgebiet zu detektieren und es befanden sich vermehrt Blutgefäße sowohl in der Peripherie, als auch im Zentrum des Tumors.

Ha *et al.* haben 1999 einen chemotaktischen Effekt von (p40)<sub>2</sub> auf Makrophagen veröffentlicht, was die Barriere aus Makrophagen erklären könnte. In einem *in vitro* Chemotaxis-Modell konnte dieser Effekt bei gleichem Versuchsaufbau im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden (Daten nicht gezeigt). Jedoch

finden die Autoren nach Injektion von Tumorzellen, die transgen für die Produktion von p40 sind, eine gesteigerte Migration von Makrophagen in das Tumorgewebe. Genauso publizierten Kopp *et al.* im Jahr 2001 den chemotaktischen Effekt von p40 auf Monozyten in einem System, das sich für die Produktion von p40 transgener Hautzellen bediente. Beide Autoren können jedoch eine Beteiligung von IL-23 oder anderen p40-x-Proteinen (wobei „x“ für einen bisher unbekanntem Liganden steht) als (p40)<sub>2</sub> in ihren *in-vivo*-Systemen nicht ausschließen. Nimmt man Bezug auf die Effekte von p40 im Infektionsmodell, wo klar gezeigt werden konnte, dass durch p40-Proteine IFN- $\gamma$  induziert wird, so kann der hemmende Effekt auf die Angiogenese im Tumorbereich durch IFN- $\gamma$  verursacht sein. So ist es möglich, dass über das IFN- $\gamma$  induzierbare Protein 10 (IP-10) das Gefäßwachstum verhindert wird. Dies wäre in Einklang mit den anderen zu IL-12 agonistischen Effekten, da auch IL-12 über IP-10 antiangiogenetisch wirkt (Angiolillo *et al.*, 1995; Luster und Ravetch, 1987; Sgadari *et al.*, 1996). Da in den histologischen Präparaten keine CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-Zellen und NK-Zellen zu finden waren, stellt sich die Frage nach einer möglichen Herkunft des IFN- $\gamma$ . Hierbei sollten die Veröffentlichungen von Munder *et al.* (1998) und Xing *et al.* (2000) beachtet werden, die die Möglichkeit der IFN- $\gamma$  Sekretion durch Makrophagen gezeigt haben. Somit wäre eine durch p40 induzierte IFN- $\gamma$  Produktion ohne die direkte Beteiligung anderer Zellen denkbar.

Die Gentherapie führte somit über die Immigration von Makrophagen und die Reduktion der Neoangiogenese im Tumorgebiet zur Eindämmung des Wachstums.

#### **4.2.3 Sind (p40)<sub>2</sub> , IL-23 oder ein anderes Zytokin für die protektiven Effekte im Tumormodell verantwortlich?**

Um die Frage nach dem verantwortlichen Zytokin zu klären, wurden p40-Proteine, die für die antitumorale Wirkung im Gentherapiemodell verantwortlich sein konnten, in den Tumor injiziert. Die Wahl der Dosierung von IL-12 fand in Anlehnung an Erfahrungswerte von Herrn Prof. G. Alber statt. Zu einer möglichen Dosierung von IL-23 gibt es in der Literatur noch keine Hinweise. Bisher sind nur *in vitro* Vergleiche der Wirkungsoptima für IL-12 und IL-23 erfolgt. Es wird davon ausgegangen, dass es sein Wirkungsmaximum bei der zehnfachen Dosis des IL-12 besitzt (R. Kastelein, persönliche Mitteilung). Erwartungsgemäß zeigte die Injektion von IL-12 eine optimale Wirkung in einer nahezu vollständigen Regression des Tumors. Hingegen hatten PBS und (p40)<sub>2</sub> keinerlei Einfluss auf das Tumorstadium.

Erstaunlicherweise konnte nach der Injektion von IL-23 ebenfalls keine Hemmung des Tumorwachstums nachgewiesen werden.

Ein Schluß aus diesem Experiment sollte jedoch mit großer Vorsicht gezogen werden. Die Therapieverläufe in der Positivkontrolle, IL-12, und der Negativkontrolle, PBS, sprechen für eine gute Auswahl von Applikationsform und Therapieintervallen. Unsicher ist, ob es sich für IL-23 bei der angewendeten Dosis um seine optimale *in vivo* Dosierung handelt. Es muss in nachfolgenden Experimenten durch eine Titration des IL-23 *in vivo* geklärt werden, ob höhere oder gegebenenfalls auch niedrigere Dosierungen zum Erfolg führen können. Nach den vorliegenden Ergebnissen muss allerdings der Schluss gezogen werden, dass weder (p40)<sub>2</sub> noch IL-23 die verantwortlichen Zytokine für die antitumoralen Effekte durch p40-Proteine sind.

Da durch die Gentherapie mit pRSC-p40 eine eindeutige Reduktion des Tumorwachstums erreicht werden konnte, nicht jedoch durch die Proteintherapie mit IL-23 oder (p40)<sub>2</sub>, muss es ein weiteres p40-Protein mit bisher unbekanntem Bindungspartner, ein „p40-x“, existieren. Dieses Protein muss wie IL-23 antagonistische Effekte zu IL-12 aufweisen.

### **4.3 Lassen sich die *in vivo* Effekte *in vitro* nachvollziehen?**

Oppmann *et al.* hatten in ihrer Publikation 2000 gezeigt, dass IL-23 im humanen System sowohl auf naive T-Zellen als auch auf T-Gedächtniszellen wirkt, im murinen System jedoch nur auf T-Gedächtniszellen. Eine IFN- $\gamma$  Sekretion nach IL-23 Stimulation wurde in primären Milzzellen nicht nachgewiesen. Für spezifische Mechanismen mit Beteiligung von T-Gedächtniszellen ist im Infektionsmodell die Infektionsdauer mit 3 bis 4 Tagen zu kurz. Im Tumormodell waren vor allem in den ersten 1 bis 3 Wochen deutliche Unterschiede in der Tumorgroße messbar. Auch die immunhistologischen Untersuchungen zeigten bereits nach 9 Tagen die jeweils charakteristischen Befunde. Wenn IL-23 in irgendeiner Weise an den unspezifischen Abwehrvorgängen beteiligt sein könnte, so müsste ein Effekt auf primäre murine Milzzellen vorliegen. Obgleich die sezernierten Mengen an IFN- $\gamma$  gering waren, war ein signifikanter Anstieg des IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit nur 1 ng/ml IL-23 nachweisbar, der sich durch höhere Dosen IL-23 nicht steigern ließ. Der IL-23R wird vor allem auf T-Gedächtniszellen, kaum jedoch auf naiven T-Zellen exprimiert (Perham *et al.* 2002). Dies könnte erklären, warum in einer primäre Milzzellkultur

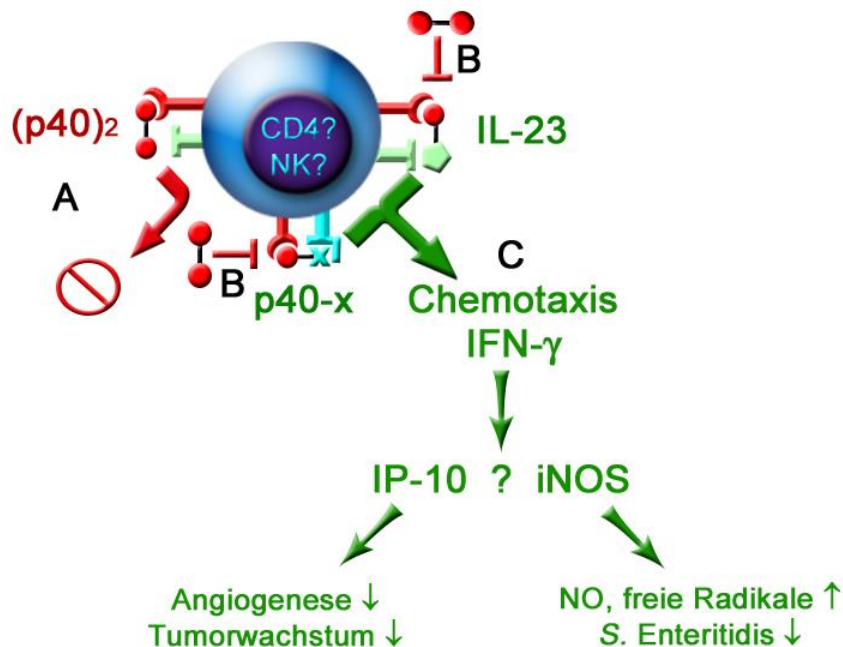


nach IL-23 Stimulation nur wenige Zellen reagieren und somit geringe Mengen IFN- $\gamma$  produziert werden. Zu diesem Ergebnis passt auch die beobachtete Antagonisierung des IL-12 durch IL-23, da nach Sättigung der wenigen IL-23R keine Signaltransduktion mehr erfolgen könnte, die Bindungsstelle IL-12R $\beta$ 1 für das IL-12 aber blockiert wäre. Bekannterweise führt eine Stimulation der Milzzellen mit (p40)<sub>2</sub> zu keiner IFN- $\gamma$  Sekretion. Vielmehr antagonisiert (p40)<sub>2</sub> das IL-12 an seinem IL-12R $\beta$ 1. Wie zu erwarten, konnte auch der Effekt des IL-23 durch 100 ng/ml (p40)<sub>2</sub> vollständig gehemmt werden. Da (p40)<sub>2</sub> und IL-23 wiederum die Rezeptoruntereinheit IL-12R $\beta$ 1 gemeinsam nutzen, ist auch der Antagonismus von (p40)<sub>2</sub> zu IL-23 erklärbar.

Um die *in vitro* beobachteten Effekte von IL-23 in direkten Zusammenhang mit dem Infektionsmodell bringen zu können, wurde ein *in vitro* Infektionsmodell etabliert. So kann die unspezifische, frühe Phase der Immunantwort gegen *Salmonella Enteritidis* nachvollzogen und beliebig manipuliert werden. Durch die Verwendung von Milzzellen unterschiedlichen Genotyps können die Effekte ähnlich dem *in vivo* Modell den p40-Proteinen zugeordnet werden. So ließ sich eine p40-abhängige IFN- $\gamma$  Produktion nach Antigenstimulation *in vitro* zeigen. Ebenso konnte der Effekt durch (p40)<sub>2</sub> antagonisiert werden. Somit konnte auch *in vitro* der Th1-gerichtete Effekt durch p40-Proteine gezeigt werden, der über den IL-12R $\beta$ 1 vermittelt wird. Ob das protektive Protein im Salmonellenmodell IL-23 oder wie vermutlich im Tumormodell ein anderes p40-abhängiges Protein ist, kann zum Zeitpunkt des Abschlusses dieser Arbeit nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Eine Untersuchung der Zellkulturüberstände nach Antigenstimulation sowie von Blutproben infizierter Mäuse mit einem ELISA für IL-23 könnte hierüber mehr Aufschluß geben.

#### 4.4 Schlussbetrachtung

Zusammenfassend erscheint die Gruppe der p40-Proteine äußerst heterogen. Auf der einen Seite existieren das  $(p40)_2$ , das sich als potenter Antagonist zu IL-12 und IL-23 erweist. Auf der anderen Seite gibt es das IL-23 als an der Typ 1-Immunantwort beteiligtes Zytokin. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit muss auch auf ein weiteres p40-x-Protein geschlossen werden, welches ebenfalls protektive Effekte vermittelt. Dieses Zytokin scheint entweder auf CD4<sup>+</sup>-T- oder NK-Zellen zu wirken, wie in der Abbildung 27 dargestellt. Es ist auch denkbar, daß es direkt auf Makrophagen wirkt.



**Abb. 27: Hypothetisches Modell zur Interaktion der p40-Zytokine bei der lokalen, unspezifischen Immunregulation.** Das  $(p40)_2$  antagonisiert sowohl IL-23 als auch p40-x an seinem Rezeptor IL-12R $\beta$ 1. Die Wirkungen von IL-23 und p40-x werden vermittelt durch IFN- $\gamma$  und seine chemotaktischen Eigenschaften. Durch IP-10 kommt es im Tumormodell zur Reduktion der Angiogenese bei gleichzeitiger Aktivierung der Makrophagen durch IFN- $\gamma$ . Im Infektionsmodell kann der Erreger durch Induktion der iNOS und Bildung antimikrobieller Effektoren besser kontrolliert werden.

Insgesamt erscheint in dieser Zytokinfamilie das p40-Protein als ein löslicher Rezeptor zu fungieren. Durch selektive Expression der unterschiedlichen Liganden kommt es zur Induktion oder Hemmung einer zellulären Immunantwort. Da die Wirkung der unterschiedlichen p40-Proteine ganz vom Bindungspartner des p40 abhängt, sollte in weiteren Untersuchungen besonderes Augenmerk auf die Induktion der Expression der unterschiedlichen p40-Bindungspartner gelegt werden. Hierbei sind vor allem die Stimuli, welche beeinflussen, welches Protein mit p40 verknüpft wird, von Interesse. Auch die zeitliche Abfolge der Regulation der Expression der Bindungspartner muß hier beachtet werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

### **Interleukin-12 unabhängige Wirkungen von p40-Zytokinen in der Infekt- und Tumorabwehr**

Christoph Werner

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

10/2002

79 Seiten; mit 27 Abbildungen und 122 Literaturangaben.

Interleukin-12 (IL-12) ist ein zentrales Zytokin in der Entwicklung einer protektiven Typ 1-Immunantwort. Es ist aus einer p40- und einer p35-Untereinheit aufgebaut. Es stimuliert NK- und T-Zellen zur Ausschüttung großer Mengen IFN- $\gamma$  und setzt so eine Typ 1-Immunantwort in Gang. Die p40-Untereinheit des IL-12 kommt auch in anderen biologisch wirksamen Vereinigungen wie beispielsweise als IL-23 (in Verbindung mit einer p28-Untereinheit) oder als Homodimer vor. Während das Homodimer als reiner Antagonist zu IL-12 zu wirken scheint, wurden für IL-23 bereits zu IL-12 agonistische Wirkungen demonstriert.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit stand die Erarbeitung p40-abhängiger Wirkungen unter Ausschluß der Effekte von IL-12. In den vorliegenden Untersuchungen wurde mit gendepletierten Mäusen gearbeitet, so dass IL-12 in diesen Systemen keine Rolle spielen kann sondern nur die p40-Proteine außer IL-12. Im Infektionsmodell mit *Salmonella* Enteritidis wurden p35-gendepletierte (p35<sup>-/-</sup>) und p40<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. Durch eine Induktion der p40-Expression waren Unterschiede auf die Wirkung der p40-Proteine zurückzuführen. Es zeigte sich, dass p40-Proteine durch die Induktion einer IFN- $\gamma$  Produktion eine Verbesserung der Abtötung intrazellulären Pathogens bewirkten. Dadurch gelang in den p35<sup>-/-</sup>-Mäusen die Eindämmung der systemischen Infektion besser und diese Mäuse überlebten länger.

In Tumormodellen mit dem Lewis-Lungenkarzinom und dem Melanom B16 wurden p35/40<sup>-/-</sup>-Mäuse, welche keine p40-Proteine bilden können, mit der für p40 kodierenden DNA genterapiert. Durch diese lokale Gentherapie kam es zu einer Reduktion des Tumorwachstums. In immunhistologischen Untersuchungen war eine

Immigration von Makrophagen und eine Hemmung der Angiogenese im Tumorbereich sichtbar. Durch lokale Proteintherapien mit dem Homodimer oder IL-23 hatten keinen Effekt auf das Wachstum des Tumors, was auf die Existenz eines weiteren p40-Proteins hindeutet.

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass IL-23 die IFN- $\gamma$ -Produktion induziert und wie IL-12 durch das Homodimer antagonisiert wird. Interessanterweise kann es in primären Milzzellkulturen auch IL-12 antagonisieren. Eine *in vitro*-Infektion führte zu einer p40-abhängigen IFN- $\gamma$  Produktion, die auch durch das Homodimer antagonisiert werden konnte.

Während die Effekte der p40-Proteine im Infektionsmodell auf IL-23 zurückgeführt werden können und diese Effekte auch durch *in vitro*-Untersuchungen gestützt werden, muss nach den Ergebnissen im Tumormodell auf die Existenz eines weiteren p40-Proteins, p40-x, geschlossen werden.

## 6 SUMMARY

### **Effects of p40-Cytokines in the Immunity to Infections and Tumors independent of Interleukin-12**

Christoph Werner

Institut of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

10/2002

79 pages; 27 figures and 122 references.

Interleukin-12 (IL-12) is a key cytokine in the development towards a protective Th1 immune response. It consists of a p40 and a p35 subunit. Following stimulation with IL-12, NK- and T-cells produce large amounts of IFN- $\gamma$  thus starting a type 1 immune response. The p40 subunit of IL-12 is also a part of other biologically active proteins like IL-23 (in combination with a p28 subunit) or the p40 homodimer. While the p40 homodimer is suspected to purely antagonize IL-12, IL-23 was demonstrated to have agonistic effects.

The aim of this study was to investigate p40-dependent effects excluding those of IL-12. In this experimental approach, gene depleted mice were used, so that IL-12 dependent mechanisms could not play a role but only p40-dependent proteins excluding IL-12.

In an infection model using *Salmonella* Enteritidis, p35-gene depleted (p35<sup>-/-</sup>) and p40<sup>-/-</sup> mice were used. As the expression of p40 was induced by bacterial antigen, differences between the strains were caused by the p40 proteins. During the infection p40 proteins induced IFN- $\gamma$  production thus improving the killing of intracellular pathogens. This resulted in a better control of the systemic infection by the p35<sup>-/-</sup> mice and their longer survival of the infection.

For the experiments in the tumor model using the Lewis-Lung carcinoma and the Melanoma B16 as tumors, p35/40<sup>-/-</sup> mice, which are unable to produce any p40 proteins, received gene therapy with DNA encoding for p40. This local gene therapy resulted in a reduced tumor growth. Immunohistochemical examination revealed an infiltration of the tumor tissue with macrophages and a reduced neoangiogenesis

within the tumor. This effect could not be achieved by local administration of IL-23 or the homodimer as a protein, indicating the existence of a yet unknown p40 protein.

*In vitro* experiments showed that IL-23 induces IFN- $\gamma$  and is antagonized by the homodimer, just like IL-12 is. Interestingly, IL-23 is also able to antagonize IL-12 in primary splenocyte cultures. *In vitro* infection with salmonella resulted in an p40 dependent IFN- $\gamma$  production that could also be antagonized by the homodimer.

The protective effects in the infection model seem to be caused by IL-23, which is supported by the *in vitro* results. On the other hand, in the tumor model IL-23 doesn't seem to be the player and it must be concluded that the protective effects are caused by an other p40-dependent protein, p40-x.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Agresti, C., Bernardo, A., Del Russo, N., Marziali, G., Battistini, A., Aloisi, F., Levi, G. und Coccia, E. M. (1998): Synergistic stimulation of MHC class I and IRF-1 gene expression by IFN-gamma and TNF-alpha in oligodendrocytes. *Eur. J. Neurosci.* 10:2975-2983
- Angiolillo, A. L., Sgdari, C., Taub, D. D., Liao, F., Farber, J. M., Kleinmann, H. K., Reaman, G. H. und Tosato, G. (1995): Human interferon inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J. Exp. Med.* 182:155–162.
- Austyn, J. M. (1992): Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin. Immunol.* 4:227-236.
- Bacon, C. M., Petricoin, E. F. III, Ortaldo, J. R., Rees, R. C., Lerner, A. C., Johnston, J. A. und O'Shea, J. J. (1995): Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:7307–7311.
- Bluestone, J. A. (1995): New perspectives of CD28-B7-mediated T cell co-stimulation. *Immunity.* 2:555–559.
- Brunda, M. J., Luistro, L., Warriar, R. R., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F. und Gately, M. K. (1993): Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J. Exp. Med.* 178:1223-1230.
- Callard, R. und Gearing, A. (1994): *The Cytokine Facts Book*. Academic Press London.
- Carr, J. A., Rogerson, J. A., Mulqueen, M. J., Roberts, N. A. und Nash, A. A. (1999): The role of endogenous interleukin-12 in resistance to murine cytomegalovirus (MCMV) infection and a novel action for endogenous IL-12 p40. *J. Interferon Cytokine Res.* 19:1145-1152.



- Carter, L. L. und Dutton, R. W. (1996): Type 1 and type 2: a fundamental dichotomy for all T-cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 336-342.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. und Alber, G.(1996): 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.* 184:747–752.
- Chan, S. H., Perussia, B., Gupta, J. W., Kobayashi, M., Papisil, M.; Young, H. A., Wolf, S. F., Young, D., Clark, S. C. und Trinchieri, G. (1991): Induction of interferon  $\gamma$  production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* 173, 869-879.
- Charlton, B. und Lafferty, K. J. (1995): The Th1/Th2 balance in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 7:793-798.
- Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M. H., Gurney, A., Grewal, I. S. und de Sauvage, F. J. (2000): Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature.* 407:916-920.
- Chizzonite, R., Truitt, T., Desai, B. B., Nunes, P., Podlaski, F. J., Stern, A. S. und Gately, M. K. (1992): IL-12 Receptor. I. Characterization of the receptor on phytohemagglutinin-activated human lymphoblasts. *J. Immunol.* 153, 128-136.
- Chua, A. O., Chizzonite, R., Desai, B. B., Truitt, T. P., Nunes, P., Minetti, L. J., Warriar, R. R., Presky, D. H., Levine, J. F., Gately, M. K. *et al.* (1994): Expression cloning of human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J. Immunol.* 153, 128-136.
- Chua, A. O., Wilkinson, V. L., Presky, D. H. und Gubler, U. (1995): Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-b component. *J. Immunol.* 155, 4286-4294.

- Chuang, T. H., Lee, J., Kline, L., Mathison, J. C. und Ulevitch, R. J. (2002): Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J. Leukoc. Biol.* 71:538-544.
- D'Andrea, A., Rengaraju, M., Valiante, N. M., Chehimi, J., Kubin, M., Aste, M., Chan, S. H., Kobayashi, M., Young, D. und Nickbarg, E. (1992): Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 176:1387-1398.
- Decken, K., Kohler, G., Palmer-Lehmann, K., Wunderlin, A., Mattner, F., Magram, J., Gately, M. K. und Alber, G. (1998): Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 66:4994-5000.
- Devergne, O., Birkenbach, M., und Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12041–12046.
- Dietrich, A., Kraus, K., Brinckmann, U., Friedrich, T., Müller, A., Liebert, U. G. und Schönfelder, M. (2002): Complex cancer gene therapy in mice melanoma. *Langenbeck's Arch. Surg.* 387:177-182
- Doyle, C. und Strominger, J.L. (1987): Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature.* 330:256-259.
- Farrar, M. A. und Schreiber, R. D. (1993): The molecular cell biology of interferon-g and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11:571-611.
- Fernandez-Botran, R., Sanders, V. M., Mosmann, T. R. und Vitetta, E. S. (1988): Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J. Exp. Med.* 168:543–558.
- Fields, P. I., Groisman, E. A. und Heffron, F. (1989): A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243:1059–1062.
- Freedman, A. S., Freeman, G. J., Rhyhart, K. und Nadler, L. M. (1991): Selective induction of B7/BB-1 on interferon-gamma stimulated

monocytes: a potential mechanism for amplification of T cell activation through the CD28 pathway. *Cell. Immunol.* 137:429-37.

Gajewski, T. F. und Fitch, F. W. (1988): Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140:4245-4252.

Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U. und Presky, D. H. (1998): The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16 :495-521.

Gemmell, E. und Seymour, G. J. (1994): Cytokines and T cell switching. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.* 5:249-279.

Germann, T., Gately, M. K., Schoenhaut, D. S., Lohoff, M., Mattner, F., Fischer, S., Jin, S. C., Schmitt, E. und Rude, E. (1993): Interleukin-12/T-cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 23:1762-1770

Gillessen, S., Carvajal, D., Ling, P., Podlaski, F. J., Stremlo, D. L., Familletti, P. C., Gubler, U., Presky, D. H., Stern, A. S. und Gately, M. K. (1995): Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist. *Eur. J. Immunol.* 25:200-206.

Grunig, G., Warnock, M., Wakil, A. E., Venkayya, R., Brombacher, F., Rennick, D. M., Sheppard, D., Mohrs, M., Donaldson, D. D., Locksley, R. M. und Corry, D. B. (1998): Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. *Science.* 282:2261-2263.

Hanabuchi, S., Koyanagi, M., Kawasaki, A., Shinohara, N., Matsuzawa, A., Nishimura, Y., Kobayashi, Y., Yonehara, S., Yagita, H. und Okumura, K. (1994): Fas and its ligand in a general mechanism of T-cell-mediated cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4930-4934.

Hefeneider, S. H., Conlon, P. J., Henney C. S. und Gillis, S. (1983): In vivo interleukin 2 administration augments the generation of alloreactive

- cytolytic T lymphocytes and resident natural killer cells. *J. Immunol.* 130:222-227.
- Hernandez-Pando, R. und Rook, G. A. (1994) The role of TNF-alpha in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82:591-595.
- Holscher, C., Atkinson, R. A., Arendse, B., Brown, N., Myburgh, E., Alber, G. und Brombacher, F. (2001): A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection. *J. Immunol.* 167:6957-6966.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A. und Murphy, K. M. (1993) Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science.* 260:547-549.
- Ihle, J. N. (1996): STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84, 331-334.
- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto K. und Silvennoinen, O. (1995): Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 13 :369-398.
- Ivashkiv, L. B. (1995): Cytokines and STATs: how can signals achieve specificity? *Immunity* 3:1-4.
- Jacobson, N. G., Szabo, S. J., Weber-Nordt, R. M., Zhong, Z., Schreiber, R. D., Darnell, J. E. und Murphy, K. M. (1995): Interleukin 12 signaling in T helper 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat) 3 and Stat4. *J. Exp. Med.* 181:1755-1762.
- Janeway, C. A. und Travers, P. (1994): *Immunobiology – The immune system in health and disease.* Current Biology Ltd., London.
- Jones, B. und Janeway, C. A. Jr. (1981): Cooperative interaction of B lymphocytes with antigen-specific helper T lymphocytes is MHC restricted. *Nature.* 292:547-549.

- Kaisho, T. und Akira, S. (2000): Critical roles of toll-like receptors in host defense. *Crit. Rev. Immunol.* 20:393-405.
- Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G. und Kiessling, R. (1986): Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 319:675-678.
- Keller, E. T., Burkholder, J. K., Shi, F., Pugh, T. D., McCabe, D., Malter, J. S., MacEwen, E. G., Yang, N. S., Ershler, W.B. (1996): In vivo particle-mediated cytokine gene transfer into canine oral mucosa and epidermis. *Cancer Gene Ther.*3:186-91.
- King, A., Wooding, P., Gardner, L. und Loke, Y.W. (1993): Expression of perforin, granzyme A and TIA-1 by human uterine CD56+ NK cells implies they are activated and capable of effector functions. *Hum. Reprod.* 8:2061-2067.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R. , Sherman, F., Perussia, B. und Trinchieri, G. (1989): Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170, 827-845.
- Kopp, T., Kieffer, J. D., Rot, A., Strommer, S., Stingl, G. und Kupper, T. S. (2001): Inflammatory skin disease in K14/p40 transgenic mice: evidence for interleukin-12-like activities of p40. *J. Invest. Dermatol.* 117:618-626.
- Kummer, J. A., Wever, P. C., Kamp, A. M., ten Berge, I. J., Hack, C. E., Weening, J. J. (1995): Expression of granzyme A and B proteins by cytotoxic lymphocytes involved in acute renal allograft rejection. *Kidney Int.* 47:70-77.
- Lachmann, P. J. (1991): The control of homologous lysis. *Immunol. Today* 12:312–315.
- Le Gros, G., Ben Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D. und Paul, W. E. (1990): Generation of interleukin-4 (IL-4)-producing cells in vivo and in

vitro—IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J. Exp. Med.* 172:921–929.

Leenen, P. J., Canono, B. P., Drevets, D. A., Voerman, J. S. und Campbell, P. A. (1994): TNF-alpha and IFN-gamma stimulate a macrophage precursor cell line to kill *Listeria monocytogenes* in a nitric oxide-independent manner. *J. Immunol.* 153:5141-5147.

Lenschow, D.J., Walunas, T. L. und Bluestone, J. A. (1996): CD28/B7 system of T cell co-stimulation. *Annu. Rev. Immunol.* 14:233–258.

Liao, N.S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R. und Raulet, D. (1991): MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science.* 253:199-202.

Lien, E., Sellati, T. J., Yoshimura, A., Flo, T. H., Rawadi, G., Finberg, R. W., Carroll, J. D., Espevik, T., Ingalls, R. R., Radolf, J. D. und Golenbock, D. T. (1999): Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J. Biol. Chem.* 274:33419-33425.

Lin, M. T., Pulkkinen, L., Uitto, J. und Yoon, K. (2000): The gene gun: current applications in cutaneous gene therapy. *Int. J. Dermatol.* 39:161-170.

Ling, P., Gately, M. K., Gubler, U., Stern, A. S., Lin, P., Hollfelder, K., Su, C., Pan, Y. C. und Hakimi, J. (1995): Human IL-12 p40 homodimer binds to the IL-12 receptor but does not mediate biologic activity. *J. Immunol.* 154:116-127.

Linsley, P. S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N. K. und Ledbetter, J. A. (1991): Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173:721-730.

Luster, A. D. und Ravetch, J. V.(1987): Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J. Exp. Med.* 166:1084-1097.

- Ma, X., Aste-Amezaga, M., Gri, G., Gerosa, F. und Trinchieri, G. (1997): Immunomodulatory functions and molecular regulation of IL-12. *Chem. Immunol.* 68, 1-22.
- Macatonia, S. E., Hsieh, C. S., Murphy, K. M. und O'Garra, A. (1993): Dendritic cells and macrophages are required for Th1 development of CD4+ T cells from ab transgenic mice: IL12 substitution for macrophages to stimulate IFN $\gamma$  production is IFN $\gamma$ -dependent. *Int. Immunol.* 5:1119–1128.
- MacMicking, J. D., North, R. J., LaCourse, R., Mudgett, J. S., Shah, S. K. und Nathan, C. F. (1997): Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94:5243-5248.
- Maeda, H., Kuwahara, H., Ichimura, Y., Ohtsuki, M., Kurakata, S. und Shiraishi, A. (1995): TGF-beta enhances macrophage ability to produce IL-10 in normal and tumor-bearing mice. *J. Immunol.* 155:4926-4932.
- Magram, J., Connaughton, S. E., Warriar, W. W., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D. A. und Gately, M. K. (1996): L-12 deficient mice are defective in IFN-g production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4:471-481.
- Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M. und Eisenbach, L. (1994): CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 369:67–71.
- Mattner, F., Fischer, S., Guckes, S., Jin, S., Kaulen, H., Schmitt, E., Rude, E. und Germann, T. (1993): The interleukin-12 subunit p40 specifically inhibits effects of the interleukin-12 heterodimer. *Eur J Immunol.* 23:2202-2208.
- Mattner, F., Magram, J., Ferrante, J., Launois, P., Di Padova, K., Behin, R., Gately, M. K., Louis, J. A. und Alber, G. (1996): Genetically resistant mice lacking interleukin-12 are susceptible to infection with *Leishmania major* and mount a polarized Th2 cell response. *Eur. J. Immunol.* 26:1553-1559.

- Mattner, F., Ozmen, L., Podlaski, F. J., Wilkinson, V. L., Presky, D. H., Gately, M. K. und Alber, G. (1997): Treatment with homodimeric interleukin-12 (IL-12) p40 protects mice from IL-12-dependent shock but not from tumor necrosis factor alpha-dependent shock. *Infect. Immun.* 65:4734-4737.
- Matzinger, P. (1994): Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991–1045.
- McKenzie, G. J., Emson, C. L., Bell, S. E., Anderson, S., Fallon, P., Zurawski, G., Murray, R., Grencis, R. und McKenzie, A. N. (1998): Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity.* 9:423-432.
- Monach, P. A., Meredith, S. C., Siegel, C. T. und Schreiber, H. (1995): A unique tumor antigen produced by a single amino acid substitution. *Immunity.* 2:45–59.
- Morel, P. A. und Oriss, T. B. (1998): Crossregulation between Th1 and Th2 cells. *Crit. Rev. Immunol.* 18:275-303.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. und Coffman, R. L. (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. und Coffman, R. L. (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136:2348-2357.
- Müller-Eberhard, H. J. (1975): Complement. *Annu. Rev. Biochem.* 44, 697-724.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K. und Modolell, M. (1998): Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187:2103-2108.



- Murphy, F. J., Hayes, M. P. und Burd, P. R. (2000): Disparate intracellular processing of human IL-12 preprotein subunits: atypical processing of the p35 signal peptide. *J. Immunol.* 164:839-847.
- Noelle, R. J. (1996): CD40 and its ligand in host defense. *Immunity* 4:415–419.
- Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., de Vries, J. und Spits, H. (1988): Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J. Immunol.* 141:849-855.
- Pardoux, C., Asselin-Paturel, C., Chehimi, J., Gay, F., Mami-Chouaib, F. und Chouaib, S. (1997): Functional interaction between TGF-beta and IL-12 in human primary allogeneic cytotoxicity and proliferative response. *J. Immunol.* 158:136-143.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A. M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D. M., Kastelein, R. A., de Waal Malefyt, R. und Moore, K. W. (2002): A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* 168:5699-5708.
- Paul, W. E. (1999): *Fundamental Immunology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
- Pertl, U., Luster, A. D., Varki, N. M., Homann, D., Gaedicke, G., Reisfeld, R. A. und Lode, H. N. (2001): IFN-gamma-inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor-specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy. *J. Immunol.* 166:6944-6951.
- Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D. und

- Kastelein, R. A. (2002): IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4(+) T Cells. *Immunity*. 16:779-790.
- Piccotti, J. R., Chan, S. Y., Li, K., Eichwald, E. J. und Bishop, D. K. (1997): Differential effects of IL-12 receptor blockade with IL-12 p40 homodimer on the induction of CD4+ and CD8+ IFN-gamma-producing cells. *J. Immunol*. 158:643-648.
- Presky, H. D., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C. Y., Gately, M. K. und Gubler, U. (1996): A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two b-type cytokine receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:14002-14007.
- Rakhmievich, A. L., Timmins, J. G., Janssen, K., Pohlmann, E. L., Sheehy, M. J. und Yang, N. S. (1999): Gene gun-mediated IL-12 gene therapy induces antitumor effects in the absence of toxicity: a direct comparison with systemic IL-12 protein therapy. *Immunother*. 22:135-144.
- Rakhmievich, A. L., Turner, J., Ford, M. J., McCabe, D., Sun, W. H., Sondel, P. M., Grota, K. und Yang, N. S. (1996): Gene gun-mediated skin transfection with interleukin 12 gene results in regression of established primary and metastatic murine tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 93:6291-6296.
- Rettig, W. J. und Old, L. J. (1998): Immunogenetics of human cell surface differentiation. *Annu. Rev. Immunol*. 7:481-511.
- Salgame, P., Abrams, J. S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R. L. und Bloom, B.R. (1991): Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*. 254:279-282.
- Schoenhaut, D. S., Chua, A. O., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Dwyer, C. M., McComas, W., Familletti, P. C., Gately, M. K. und Gubler, U. (1992): Cloning and expression of murine IL-12. *J. Immunol*. 148:3433-3440.

- Schorle, H., Holtshke, T., Hunig, T., Schimpl, A. und Horak, I. (1991): Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature*. 352:621–624.
- Sgadari, C., Angiolillo, A. L. und Tosato, G. (1996): Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein-10. *Blood*. 87:3877–3882.
- Small, P. L., Ramakrishnan, L. und Falkow, S. (1994): Remodeling schemes of intracellular pathogens. *Science*. 263:637–639.
- Smith, M. E., Bodmer, W. F. und Bodmer, J. G. (1988): Selective loss of HLA-A,B,C locus products in colorectal adenocarcinoma. *Lancet*. 1:823–824.
- Steinman, R.M. (1991): The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296.
- Swain, S. L., Weinberg, A. D., English, M. und Huston, G. (1990): IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J. Immunol.* 145:3796-3806
- Takao, S., Smith, E. H., Wang, D., Chan, C. K., Bulkley, G. B. und Klein, A. S. (1996): Role of reactive oxygen metabolites in murine peritoneal macrophage phagocytosis and phagocytic killing. *Am. J. Physiol.* 271:C1278-1284.
- Taniguchi, T and Minami, Y. (1993): The IL-2/IL-2 receptor system: a current overview. *Cell*. 73:5–8.
- Tilley, M., McDonald, V. und Bancroft, G. J. (1995): Resolution of cryptosporidial infection in mice correlates with parasite-specific lymphocyte proliferation associated with both Th1 and Th2 cytokine secretion. *Parasite Immunol.* 17:459-464.
- Tripp, C. S., Gately, M. K., Hakimi, J., Ling, P. und Unanue, E. R. (1994): Neutralization of IL-12 decreases resistance to listeria in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-g. *J. Immunol.* 152, 1883-1887.

- Tripp, C. S., Wolf, S. F. und Unanue, E. R. (1993): Interleukin 12 and tumor necrosis factor  $\alpha$  are costimulators of interferon  $\gamma$  production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3725-3729.
- Van Loock, F., Ducoffre, G., Dumont, J. M., Libotte-Chasseur, M. L., Imberechts, H., Gouffaux, M., Houins-Roulet, J., Lamsens, G., De Schrijver, K., Bin, N., Moreau, A., De Zutter, L. und Daube, G. (2000): Analysis of foodborne disease in Belgium in 1997. *Acta Clin. Belg.* 55:300-6.
- Wahl, S. M., McCartney-Francis, N., Allen, J. B., Dougherty, E. B. und Dougherty, S. F. (1990): Macrophage production of TGF- $\beta$  and regulation by TGF- $\beta$ . *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 593:188-196.
- Walsh, C. M., Glass, A. A., Chiu, V., Clark, W. R. (1994): The role of the Fas lytic pathway in a perforin-less CTL hybridoma. *J. Immunol.* 153:2506-2514.
- Wang, X., Wilkinson, V. L., Podlaski, F. J., Wu, C., Stern, A. S., Presky, D. H. und Magram, J. (1999) Characterization of mouse interleukin-12 p40 homodimer binding to the interleukin-12 receptor subunits. *Eur. J. Immunol.* 29:2007-2013.
- Wenner, C. A., Guler, M. L., Macatonia, S. E., O'Garra, A. und Murphy, K. M. (1996): Roles of IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  in IL-12-induced T helper cell-1 development. *J. Immunol.* 156:1442-1447.
- Widmer, M. B., Acres, R. B., Sassenfeld, H. M. und Grabstein, K. H. (1987): Regulation of cytolytic cell populations from human peripheral blood by B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4). *J. Exp. Med.* 166:1447-1455.
- Wiekowski, M. T., Leach, M. W., Evans, E. W., Sullivan, L., Chen, S. C., Vassileva, G., Bazan, J. F., Gorman, D. M., Kastelein, R. A., Narula, S. und Lira, S. A. (2001): Ubiquitous transgenic expression of the IL-23

subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J. Immunol.* 166:7563-7570.

Wu, C., Ferrante, J., Gately, M. K. und Magram, J. (1997): Characterization of IL-12 receptor beta1 chain (IL-12Rbeta1)-deficient mice: IL-12Rbeta1 is an essential component of the functional mouse IL-12 receptor. *J. Immunol.* 159:1658-1665.

Xing, Z., Zganiacz, A. und Santosuosso, M. (2000): Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J. Leukoc. Biol.* 68:897-902.

Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. und McCabe, D. (1990): In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 87:9568-9572.

Ye, J., Ortaldo, J. R., Conlon, K., Winkler-Pickett, R. und Young, H. A. (1995): Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J. Leukoc. Biol.* 58:225-233.

Young, L. H., Klavinskis, L. S., Oldstone, M. B. und Young, J. D. (1989): In vivo expression of Perforin by CD8+ lymphocytes during an acute viral infection. *J. Exp. Med.* 169:2159-2171.

Young, L. H., Klavinskis, L. S., Oldstone, M. B. und Young, J. D. (1989): In vivo expression of perforin by CD8+ lymphocytes during an acute viral infection. *J. Exp. Med.* 169:2159-2171.

Zinkernagel, R. M. (1997): The Nobel Lectures in Immunology. The Nobel Prize for Physiology or Medicine, 1996. Cellular immune recognition and the biological role of major transplantation antigens. *Scand. J. Immunol.* 46:421-436.

---

## Danksagung

Allen, die mir durch ihre Unterstützung, ihren Rat wie auch ihre Kritik diese Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht haben, möchte ich hiermit herzlichst danken.

Mein besonderer Dank gilt:

Allen voran **meinen Eltern**, ohne die (in jeglicher Hinsicht) diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Herrn **Prof. Dr. Gottfried Alber**, der in mir das Interesse für dieses Fachgebiet weckte und bereit war, die Leitung dieser Arbeit zu übernehmen.

Herrn **Dr. Jörg Lehmann**, für die Betreuung im Labor, die Geduld, einen Nicht-Biologen in die Welt der Biologie zu führen und das wissenschaftliche Wertegefühl.

Frau **Roswitha Haack**, von der ich eigentlich so ziemlich alles lernte, was ich heute im Labor kann.

Herrn **Dr. Arne Dietrich** für die Grundidee zum Tumorprojekt, die antreibenden Anrufe und die kleine Narbe.

Frau **Dr. Samiya Al-Robaay** und Frau **Dr. Katja Kraus** für die Anfertigung der Plasmide.

Herrn **Dr. Uwe Müller** für den steten Beweis, dass es da noch was hinter dem Tellerrand gibt. In der einen wie der anderen Richtung.

Herrn **Dr. Reinhard K. Straubinger** für die Kopfnüsse, die wertvollen Kritiken und den freundschaftlichen Beistand bei gutem, bayrischem Bier.

Frau **Nicole Schütze** für ihre unendliche Geduld und zwei tolle Jahre Zusammenarbeit.

Herrn **Christopher Mohr** und Herrn **Wulf-Iwo Bock** für die fachlichen und nichtfachlichen Gespräche.

Herrn **Prof. Dr. Johannes Seeger und allen Mitarbeitern des Veterinär-anatomisch-Histologischen Institutes**, die mich oft als Fremdkörper am Mikrotom duldeten und unterstützten.

**Petra Krumbholz** und **Juliane Richter** für all die Mäuse.

Ebenso der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** für die finanzielle Unterstützung.

**Barbara**, ohne deren stetes Quengeln diese Arbeit wohl nie fertig geworden wäre.

**Grete**, für die Spaziergänge und die nie gewagten Widerworte.

