

Chirurgische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J. R. Siewert)

**Klonierung von IL-10 und IL-10 Homologen und Funktionsanalyse in einem
Mausmodell der polymikrobiellen Sepsis**

Kristina Frisch geb. Görg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades
eines

Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann
2. Univ.-Prof. Dr. G.A. Häcker

Die Dissertation wurde am 07.06.2004 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 29.09.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	7
1.1	Sepsis	7
1.2	Interleukin 10	9
1.3	virales Interleukin-10 ohne proinflammatorische Aktivität	10
1.4	Zytokin-Fc-Fusionsproteine	11
1.5	Interleukin-22	12
1.6	Ziel der Arbeit	14
2.	Material und Methoden	16
2.1	Bezugsquellenachweis	16
2.1.1	Chemikalien	16
2.1.2	Reagenzien	17
2.1.3	Enzyme	17
2.1.4	Reagenziensammlungen („Kits“)	18
2.1.5	Geräte	18
2.1.6	Tiere	19
2.2	Medien und Puffer	20
2.2.1	Medien für Escherichia coli Bakterien	20
2.2.2	Zellkulturmedien	20
2.2.3	Stammlösungen und Puffer	21
2.3	Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper	25
2.3.1	Bakterienstämme	25
2.3.2	Zelllinien	25
2.3.3	Antikörper	26
2.4	Klonierungsvektoren, Plasmide und Oligonukleotide	27
2.4.1	Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide	27

2.4.2	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide	28
2.4.3	Oligonukleotide (Primer)	28
2.5	Molekularbiologische Methoden	30
2.5.1	Präparation von RNS	30
2.5.2	Synthese radioaktiv markierter antisense RNS-Sonden für den Ribonuklease Protection-Assay (RPA)	30
2.5.3	Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNS-Sonden	31
2.5.4	Elektrophoretische Auftrennung von RNS, Transfer und Detektion	31
2.5.5	cDNS Synthese	32
2.5.6	Amplifizierung von DNS-Stücken durch PCR	33
2.5.7	Klonierung von PCR-Produkten in pCR 2.1 (TOPO TA Cloning)	34
2.5.8	Plasmidpräparation für analytische Zwecke (Mini Preps)	34
2.5.9	Plasmidpräparation für präparative Zwecke (Midi u. Maxi Preps)	35
2.5.10	Schneiden von DNS mit Restriktionsendonukleasen	35
2.5.11	Dephosphorylierung von 5`-Enden	35
2.5.12	Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase	36
2.5.13	Auftrennen von DNS-Fragmenten im Agarosegel	36
2.5.14	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen	36
2.5.15	Sequenzierung von DNS	37
2.5.16	Herstellung kompetenter E.coli Bakterien	37
2.5.17	Transformation kompetenter E.coli Bakterien	37
2.5.18	Langzeitlagerung von bakteriellen Wirtsstämmen und transformierten Bakterien	38
2.6	Gewinnung von ex vivo Zellen	39
2.6.1	Makrophagen Gewinnung aus Peritoneallavage	39
2.7	Zellbiologische Methoden	40
2.7.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	40
2.7.2	Transiente Transfektion von 293T Zellen	40
2.7.3	Stimulation von Zelllinien zur Gewinnung von RNS	41
2.7.4	Durchflußzytometrie „Flourescence activated cell sorting“ (FACS)	41

2.7.5	Herstellung von Organextrakten zur Zytokinbestimmung	41
2.7.6	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay” (ELISA)	42
2.8	Expression und Aufreinigung des Fusionsproteine	43
2.8.1	Präzipitation mit Protein A Sepharose	43
2.8.2	Aufreinigung von Fc-Fusionsproteinen	43
2.8.3	Dialyse	44
2.9	Proteinanalytische Methoden	45
2.9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	45
2.9.2	Färbung von Proteinen im Gel mit Coomassie blue	47
2.9.3	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose	47
2.9.4	Western Blot Analyse	47
2.10	Tierexperimentelles Sepsismodel	49
2.10.1	Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)	49
3.	Ergebnisse	50
3.1	Regulation von IL-10 während der Sepsis im CASP Model	52
3.1.1	Expressionsanalyse von IL-10 mRNA während der Sepsis mittels RPA	52
3.1.2	Analyse der Regulation von IL-10 Protein während der Sepsis	54
3.2	Klonierungen	56
3.2.1	Herstellung eines IL-10-Fc Fusionsproteins	56
3.2.2	Herstellung von IL-10-M-Fc (ohne proinflammatorische Komponente)	60
3.2.3	Herstellung von IL-22-Fc	63
3.2.4	Herstellung von SP-Fc (Kontrolle)	65
3.3	Expressionsanalyse	69
3.3.1	Transfektion und Überprüfung der Transfektionsraten im FACS	69
3.3.2	Nachweis der Expression mit ELISA	70
3.3.3	Nachweis der Expression der Fusionsproteine im Western Blot	71

3.4	Aufreinigung der Fusionsproteine	73
3.4.1	Präzipitation mit Protein A Sepharose	73
3.4.2	Aufreinigung	73
3.4.3	Konzentration	74
3.4.4	Überprüfung der Aufreinigung im Western Blot	74
3.4.5	Proteinkonzentrationsbestimmung im Coomassie Gel	75
3.5	Testung der Fusionsproteine an ex vivo isolierten Zellen	77
3.5.1	TNF α Suppression durch Transfektionsüberstände	77
3.5.2	TNF α Suppression durch gereinigte Fusionsproteine	82
4.	Diskussion	84
5.	Zusammenfassung und Ausblick	92
6.	Literatur	94
7.	Anhang	99
7.1	Danksagung	99
7.2	Curriculum Vitae	102

Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Bp	Basenpaar(e)
cDNS	„complementary“ DNS
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotide (Sammelbegriff für dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FKS	Fötale Kälberserum
GFP	“green fluorescence protein”
h	Stunde
Ig	Immunglobulin
IL-10	Interleukin 10
i.p.	intraperitoneal
kBp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
M	Mol
mA	Milliampere
mM	Millimol
mRNS	Boten-RNS (“messenger RNS”)
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	Phycoerythrin
rmIL-10	rekombinantes, murines Interleukin 10
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI	„Roswell Park Memorial Institute“

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
SACS	heat killed staph. aureus cell surface
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TE	Tris-EDTA
TENS	Tris-EDTA-Natrium-SDS
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

1. Einleitung

1.1 Sepsis

Die Sepsis ist eine durch eine Infektion ausgelöste systemische Reaktion, die mit Fieber oder Hypothermie, Leukozytose, Vasodilatation, Thrombozytopenie, disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC) und metabolischen Veränderungen einhergeht und schließlich durch Multiorganversagen zum Tode führen kann. Der septische Schock ist eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen und stellt trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten, vor allem nach größeren chirurgischen Eingriffen, ein ungelöstes Problem dar. Die Mortalitätsrate der Sepsis liegt auch heute noch bei 30 – 40% (van der Poll et al., 2001).

Zunächst hatte man eine überschießende Immunantwort des Körpers auf die bakterielle Infektion für die klinische Symptomatik verantwortlich gemacht. Eine Reihe von Studien haben eine Überproduktion von Immunmediatoren im Rahmen einer exzessiven inflammatorischen Reaktion auf Endo- und Exotoxine nachgewiesen, die zur Schwere des Krankheitsverlaufs beitrug. Man ging folglich von einer uneingeschränkten inflammatorischen Immunantwort als Pathogenese der Sepsis aus (van der Poll et al., 1999).

Dieses Konzept wurde allerdings durch den mangelnden Erfolg antiinflammatorischer Therapie-Strategien in Frage gestellt (Abraham et al., 1998). Neuere Studien haben gezeigt, daß Immunsuppression eine wichtige Rolle bei der Entstehung der Sepsis spielt. So zeigten Monozyten septischer Patienten sowohl eine stark verminderte Fähigkeit IL-12, IL-10, IL-1 β und TNF α zu produzieren (Weighardt et al., 2000), als auch eine verminderte Expression von MHC Klasse II Molekülen (Heidecke et al., 2000). Auch die Antigen Präsentations Kapazität der Makrophagen erwies sich als stark eingeschränkt. Diese Ergebnisse gaben Anlaß zur Spekulation, daß größere chirurgische Eingriffe zu einer exzessiven inflammatorischen Reaktion des Körpers führen, die von einer Paralyse der zellvermittelten Immunantwort gefolgt ist, die wiederum die Anfälligkeit des Organismus für eine anschließende Sepsis erhöht (Angele und Faist, 2002). In einer klinischen Studie wurde von Patienten vor ausgedehnten visceralchirurgischen Eingriffen Monozyten aus dem peripheren Blut isoliert und die LPS und IFN γ induzierte Produktion von IL-10 und IL-12 untersucht.

Die präoperative IL-12 Produktion war bei Patienten, die eine letale postoperative Sepsis entwickelten, signifikant niedriger als bei Patienten mit komplikationslosem Verlauf (Weighardt et al., 2001). Im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Modell von Angele und Faist zeigte sich also bereits vor der Operation eine Immunsuppression der Patienten mit letalem Ausgang der späteren Sepsis. Durch ein präoperatives Screening können so Patienten mit einem besonders hohen Risiko für eine letale Sepsis nach einer Operation identifiziert werden. Die Stimulation des supprimierten Immunsystems vor der Operation könnte eine Therapiemöglichkeit bei diesen Patienten darstellen.

Allen gegenwärtigen Sepsis Modellen ist gemeinsam, daß sie nicht mehr von einer einseitigen Reaktion des Körpers im Sinne von einer uneingeschränkten inflammatorischen Reaktion oder einer Immunsuppression allein ausgehen. Die einzelnen pathophysiologischen Vorgänge bei der Entwicklung einer Sepsis bedingen sich vielmehr gegenseitig und sind als ein System zu verstehen, das aus dem Gleichgewicht geraten ist. So geht das Modell von Bone davon aus, daß es durch eine Verletzung oder Infektion zu einer inflammatorischen Reaktion, dem sog. SIRS (systemic inflammatory response syndrome) kommt, das wiederum reaktiv ein sog. CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome) auslöst. Erreichen die pro- und die antiinflammatorischen Mediatoren ein Gleichgewicht, so ist die Homöostase des Körpers wiederhergestellt. Wird aber kein Gleichgewicht erreicht, resultieren je nach dominierender Immunantwort verschiedene klinische Bilder wie kardiovaskulärer Schock, Multiorganversagen oder Immunsuppression (Bone, 1996). Die Erkenntnis, daß die IL-12 Produktion bei Patienten, die später eine letale postoperative Sepsis entwickeln, bereits präoperativ signifikant niedriger ist, als bei Patienten mit komplikationslosem Verlauf, spricht allerdings dafür, daß eine Immunsuppression auch als Erstreaktion möglich ist (Weighardt et al., 2001). Der unterschiedliche präoperative Immunstatus verschiedener Patienten liefert unterschiedliche Voraussetzungen für den Verlauf einer späteren Sepsis.

In der Pathogenese der Sepsis scheint also sowohl eine massive Aktivierung inflammatorischer Kaskaden, als auch eine Immunparalyse eine Rolle zu spielen. Es bleibt zu klären in welchen Zusammenhang die beiden Komponenten zu sehen sind und in welcher zeitlichen Abfolge sie auftreten. Plausibel sind nicht nur zeitlich streng hintereinander auftretende Reaktionen, sondern auch parallel ablaufende Vorgänge. Ziel ist es, die Pathophysiologie der Sepsis weiter aufzuklären und zu verstehen, wie

sie am besten zu beeinflussen ist, um optimale Therapie-Optionen entwickeln zu können.

1.2 Interleukin 10

Interleukin 10 (IL-10) wird von aktivierten Th2-Zellen, B-Zellen, Keratinozyten und Monozyten/Makrophagen produziert. Es ist ein wichtiges Zytokin mit antiinflammatorischer Wirkung. Es inhibiert die Synthese proinflammatorischer Zytokine (z.B. TNF, IL-12) und die Freisetzung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Intermediate durch Monozyten und Dendritische Zellen. Außerdem vermindert es die antigenpräsentierende Funktion dieser Zellentypen. IL-10 supprimiert zudem die Zytokinproduktion, die proliferative und zytotoxische Antwort von Th1-Zellen.

Durch Behandlung von Mäusen mit IL-10 kann ein Endotoxin-Schock durch exzessive Produktion proinflammatorischer Zytokine verhindert werden (Howard et al., 1993). Untersuchungen an Tiermodellen von rheumatoider Arthritis, Thyreoiditis, Autoimmundiabetes und durch Kollagen induzierte Arthritis wiesen ferner auf eine hemmende Wirkung von IL-10 auf autodestruktive Immunprozesse hin (Katasikis et al., 1994; Mignon-Godefroy et al., 1999; Zheng et al., 1997; Kasama et al., 1995). IL-10 defiziente Mäuse zeigen durch eine mangelnde Th 2 Reaktion eine polarisierte Th 1 Immunantwort und entwickelten eine chronische Enterokolitis (Rennick et al., 1997).

Neben den dokumentierten antiinflammatorischen Eigenschaften weist IL-10 auch ausgeprägte proinflammatorische Aktivitäten auf. So verstärkt IL-10 z.B. die Produktion von TNF durch periphere Monozyten nach LPS Stimulation in Vollblutassays (Adib-Conquy et al., 1999). In Kombination mit IL-2, IL-18 oder IL-12 fördert IL-10 die Proliferation und Zytotoxizität von NK Zellen und die Sekretion von $\text{INF}\gamma$, GM-CSF und TNF (Cai et al., 1999). Außerdem stimuliert IL-10 die Proliferation von Thymozyten, Mastzell-Progenitor-Zellen und B-Zellen. Es verstärkt die Expression von MHC Klasse II Proteinen und die Antikörper Sekretion von B-Zellen (Go et al., 1990).

Vielfältige Arbeiten haben versucht, die Rolle von IL-10 in der Pathophysiologie der Sepsis besser verständlich zu machen. In einem Modell der septischen Peritonitis nach CLP (cecal ligation and puncture) konnte gezeigt werden, daß die Zunahme der

Schwere der Sepsis, ausgelöst durch größere Durchmesser der Punktionsnadel, mit einer Abnahme der im Serum und in den Organen gemessenen IL-10 Spiegel einher geht (Walley et al., 1990). Ebenso konnten Mäuse durch die Behandlung mit rekombinantem IL-10 vor einem LPS-induzierten Endotoxin-Schock geschützt werden (Howard et al., 1993). Es stellte sich die Frage, ob der protektive Effekt von IL-10 unter anderem auf die Hemmung der TNF α Synthese während der Entzündungsreaktion zurückzuführen ist. Die Gabe eines monoklonalen anti-TNF α -Antikörpers in der Sepsis konnte das Überleben der Versuchstiere allerdings nicht verbessern. Die Applikation eines anti-IL-10-Antikörpers resultierte in höheren TNF α Serum-Spiegeln und einer höheren Mortalität nach CLP (van der Poll et al., 1995). Spätere Untersuchungen anhand Expressionshemmung von IL-10 mittels AS101 (ammonium trichloro tellurate) zeigten die Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Suppression von IL-10. Während die Gabe von AS101 und somit die Senkung des IL-10-Spiegels vor CLP zu einer erhöhten Mortalitätsrate führte, bewirkte die Gabe von AS101 12h nach CLP eine signifikant niedrigere Mortalitätsrate (Kalechman et al., 2002).

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß IL-10 in unterschiedlichen Stadien der Sepsis unterschiedliche Wirkungen entfaltet. Somit ist es wichtig, seine Rolle in den komplexen immunpathologischen Vorgängen in der Sepsis weiter im Detail zu untersuchen.

1.3 Virales Interleukin 10 ohne proinflammatorische Aktivität

Humanes und murines IL-10 besitzen eine große Sequenz- und Strukturhomologie zu dem BCRF-1 Genprodukt des Epstein-Barr Virus, das demnach auch als virales IL-10 bezeichnet wird. Obwohl das murine und das virale IL-10 viele immunosuppressive Eigenschaften gemeinsam haben, fehlt dem viralen Homolog die immunstimulatorische Funktion. Ding et al. konnten zeigen, daß eine einzige Aminosäure in Position 87 des murinen IL-10 für die immunstimulatorische Funktion verantwortlich ist (Ding et al., 2000). Wird Isoleuzin in dieser Position durch Alanin im murinen IL-10 ausgetauscht, so erhält man ein IL-10 Derivat (im folgenden als IL-10-M bezeichnet), dem wie dem viralen IL-10 die proinflammatorische Komponente fehlt. Thymozyten und Mastzellen können durch IL-10-M nicht mehr zur Proliferation

stimuliert werden. Die antiinflammatorische Funktion bleibt dabei aber erhalten, da IL-10-M die Produktion von $IFN\gamma$ weiterhin inhibiert und die Abstoßungsreaktion nach Herztransplantationen verzögert. Viren könnten von dieser Form des IL-10 ohne proinflammatorische Wirkung insofern profitieren, als es zu einer Abschwächung der Immunantwort des Wirts durch die antiinflammatorische Wirkung führt. Die Kenntnis der Mutation im viralen IL-10 ermöglichte es, IL-10 ohne proinflammatorische Komponente herzustellen und lieferte die Voraussetzung dafür, die immunstimulatorische und die immunsuppressive Wirkungsweise von IL-10 getrennt voneinander untersuchen zu können.

1.4 Zytokin-Fc-Fusionsproteine

Zytokine besitzen nur sehr kurze Serum-Zirkulationshalbwertszeiten in vivo. Der Einsatz von IL-10 im Mausmodell führt z.B. zu einem therapeutischen Effekt mit ca. 30 min Halbwertszeit, was eine repetitive Gabe nötig macht (Gerard et al., 1993). Dadurch kommt es zu großen Konzentrationsschwankungen. Konstante Zirkulationskonzentrationen durch Verlängerung der Halbwertszeiten können durch Kopplung des Zytokins an den $Fc\gamma 2a$ Teil des Antikörpermoleküls erreicht werden (Zheng et al., 1995). Um die Bindung der Fc-Domäne an den $Fc\gamma RI$ Rezeptor zu verhindern wurde die Aminosäure Leuzin in Position 235 der Fc-Rezeptor-Bindungsstelle durch Glutamin ersetzt. Analog dazu wurden die Aminosäuren Glutamin in Position 318 und Lysin in Position 320 und 322 durch Alanin ausgetauscht, um die Bindung an C1q des Komplementsystems unmöglich zu machen. Der so generierte Fc-Teil besitzt weder eine Antikörper-abhängige Zell-vermittelte zytotoxische Aktivität, noch eine Komplement-abhängige zytotoxische Aktivität. Dieses nicht-lysierende $Fc\gamma 2a$ -Fragment ist nun zur Herstellung von Zytokin-Fusionsproteinen geeignet, die eine verlängerte Halbwertszeit aufweisen. Generiert man auf diese Weise ein IL-10-Fc Fusionsprotein, entsteht ein antikörperähnliches Molekül, in welchem IL-10 durch die Kopplung an den Fc-Teil als Dimer vorliegt. Daraus ergibt sich ein zusätzlicher Vorteil, da IL-10 in vivo auch als Homodimer an seinen Rezeptor bindet. Das so entstandene Fusionsprotein weist alle biologische Funktionen von IL-10 auf und hat außerdem eine verlängerten

Zirkulationshalbwertszeit (Zheng et al., 1995). Zugleich wird durch die eingeführte Mutation vermieden, daß IL-10 Rezeptor exprimierende Zellen lysiert werden.

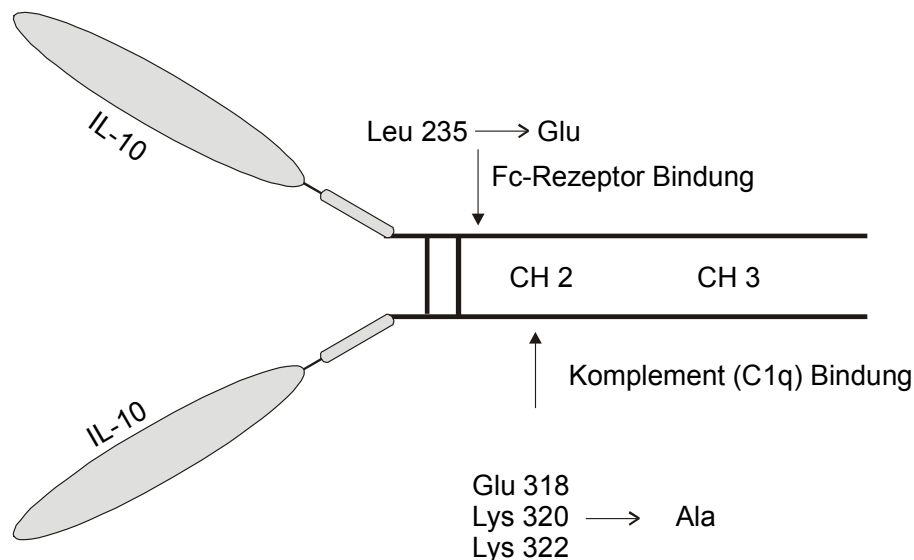


Abb. 1:

Nicht-lysierendes Fc-Fusionsprotein

1.5 Interleukin 22

Interleukin 22 wird auch als IL-TIF (IL-10 related T cell-derived inducible factor) bezeichnet. Es zeigt eine Identität auf Aminosäureebene von 22% mit IL-10 und wird von IL-9 stimulierten Thymozyten, T-Zellen, Mastzellen und von Lektin stimulierten Milzzellen sezerniert (Dumoutier et al., 2000). Im Gegensatz zu IL-10 inhibiert IL-22 nicht die Produktion von $\text{TNF}\alpha$. So führt die Inkubation von Monozyten mit IL-22 vor LPS Stimulation im Unterschied zu IL-10 nicht zu einer verminderten $\text{TNF}\alpha$ Sekretion (Xie et al., 2000).

Wie auch der IL-10-Rezeptor setzt sich der IL-22-Rezeptor aus zwei funktionellen Rezeptorketten zusammen. Die beiden Ketten des IL-10 Rezeptors werden als IL-10R1 und IL-10R2 bezeichnet. Der IL-22 Rezeptorkomplex besteht aus der CRF2-9 (IL-22-R1) und der IL-10R2 (=CRF2-4) Rezeptorkette, die auch als zweite Kette des

heterodimeren IL-10-Rezeptorkomplexes dient. Beide Ketten können IL-22 unabhängig voneinander binden, aber zur Signaltransduktion kommt es nur durch Bindung von IL-22 an den funktionalen Rezeptorkomplex, der aus beiden Rezeptorketten besteht (Kotenko et al., 2000).

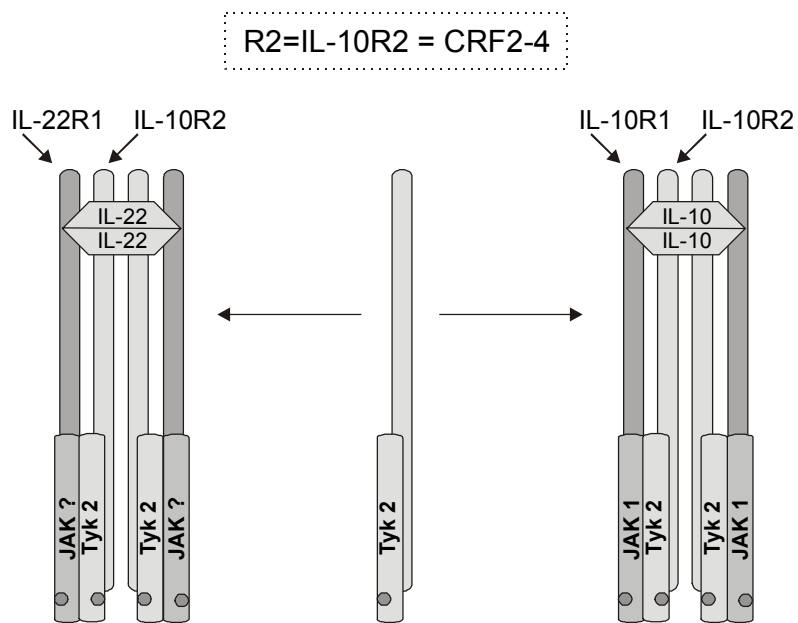


Abb. 2:

IL-10 und IL-22 Rezeptorkomplex:

Der IL-22 Rezeptorkomplex besteht aus 2 Rezeptorketten, der IL-22R1 und der IL-10R2 Kette. Die IL-10R2 Kette ist eine gemeinsame Kette des IL-22 und des IL-10 Rezeptorkomplexes. IL-10R2 wird auch als CRF2-4 bezeichnet.

1.6 Ziel der Arbeit

Septische Komplikationen nach größeren chirurgischen Eingriffen stellen ein häufiges Problem dar und sind auch heute noch mit einer Mortalitätsrate von 30 – 40% behaftet (van der Poll et al., 2001). Um effektive Therapieansätze zu entwickeln, ist es nötig, die Pathogenese der Sepsis weiter aufzuklären. Zytokine spielen bei der Modulation der Immunantwort während einer Infektion eine entscheidende Rolle. In einem Modell der polymikrobiellen Sepsis zeigten Kupferzell-depletierte Mäuse, die stark verminderte systemische IL-10 Spiegel aufwiesen, signifikant geringere Überlebensraten als Kontrollmäuse (Emmanuilidis et al., 2001). Rekonstituierte man die Kupferzell depletierten Mäuse mit mrIL-10 oder IL-10-Fc, konnte die Überlebensrate auf die der Kontrollmäuse angehoben werden. Die höhere Mortalität der IL-10 depletierten Mäuse war allerdings nicht durch ein toxisches Zytokin-Syndrom bedingt. Es fanden sich kaum erhöhte IL-12, TNF, IL-1 α , und IL-18 Spiegel. Statt dessen war die Produktion von IFN γ von Milzzellen stark vermindert. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die protektive Funktion von IL-10 in der Sepsis nicht auf die antiinflammatorische Wirkung beschränkt ist. Es stellt sich die Frage, welche Aktivitätskomponente von IL-10, d.h. die anti- oder die proinflammatorische im immunologischen Regelwerk, ggf. zu unterschiedlichen Phasen der Sepsis, dominiert und somit ein Überleben der Versuchstiere in der abdominalen Sepsis begünstigt. Dazu wurde zunächst die Expression von IL-10 RNA in Abhängigkeit von der Zeit nach Induktion der Sepsis im tierexperimentellen CASP Modell untersucht. Analog dazu wurde die Regulation von IL-10 als Protein bestimmt. Die Arbeitsgruppe um Ding konnte zeigen, daß die proinflammatorische Komponente durch den Austausch einer Aminosäure entfernt werden kann (Ding et al., 2000). Deshalb war es möglich, in dieser Arbeit IL-10 ohne proinflammatorische Wirkung zu generieren, um die Wirkung der anti- und der proinflammatorischen Komponente von IL-10 getrennt von einander zu untersuchen. Dazu wurde zunächst IL-10-Fc kloniert, das durch Kopplung an einen modifizierten Fc γ 2a-Teil eine verlängerte Serum-Zirkulationshalbwertszeit in vivo aufweist. Durch Modulation der Aminosäure in Position 87 dieses Fusionsproteins wurde dann IL-10-M-Fc generiert, dem die proinflammatorische Komponente fehlt. In den folgenden Versuchen konnten dann die Wirkungsweisen der beiden Fusionsproteine IL-10-Fc und IL-10-M-Fc

miteinander verglichen werden. Aufgrund der strukturellen Homologien zwischen IL-22 und IL-10 und der gemeinsamen Rezeptorkette der beiden Rezeptorkomplexe erschien es sinnvoll, analog ein IL-22-Fc Fusionsprotein zu generieren und in die Untersuchungen einzubeziehen. Da für IL-22 proinflammatorische Funktionen nachgewiesen wurden, stellt sich die Frage, ob diese der proinflammatorischen Funktion von IL-10 ähnlich sind.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

α -[³³ P]- UTP	ICN; Ohio, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamid 30/0,8	National Diagnostics, U.S.A.
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein
Agarose Seakem GTG	Biozym Diagnostika, Hameln
Amipicillin	Boehringer, Mannheim
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	Bio-Rad, München
N,N'-Methylen-bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Deisenhofen
Coomassie R250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Boehringer, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
L-Glutamin	Seromed, Biochrom, Berlin
Glyzerin	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid)	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Fluka, Neu-Ulm
Protein A Sepharose	Sigma, Deisenhofen
PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)	Biochrom, Berlin
SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamid)	Serva, Heidelberg
Thioglykolat (Brewer Thioglycollate Medium)	Difco, Detroit MI, U.S.A.
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Merck, Darmstadt

X-Gal (β -D-Galaktopyranosid) Sigma, Deisenhofen

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen wurden bei den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) oder Serva (Heidelberg) erworben.

2.1.2 Reagenzien

DNS-1kB-Standard	Gibco BRL, Eggenstein
Filterpapier 3MM	Whatman, U.S.A.
Nitrocellulose, Protran	Schleicher und Schüll, Dassel
Parafilm M	American National Can™ Chicago, U.S.A
pH-Indikatorstäbchen, pH-Fix	Macherey-Nagel, Düren
Proteinstandard	
“SeeBlue Prestained Standard”	Novex, San Diego, U.S.A
Röntgenfilme X-OMAT LS	Kodak, Stuttgart
	Hyperfilm, Amersham Pharmacia, Little Chalfont
Sterilfilter 0,4 μ m, Celluloseacetat	Satorius, Göttingen
Zellkulturgefäße, Plastik	Nunclon, Dänemark
	Falcon, U.K.
Zentrifugenfilter, “Microcon”	Milipore, Eschborn

2.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme	Gibco, Karlsruhe
	Boehringer, Mannheim
RNase A	Invitrogen, Karlsruhe

Superscript II plus reverse Transkriptase	Gibco, Karlsruhe
T4 DNS Ligase	Boehringer, Mannheim
Taq-polymerase TM	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.4 Reagenziensammlungen („Kits“)

Advantage RT-for-PCR Kit	Clontech, Palo Alto, CA, U.S.A
ECL Kit	Amersham, Braunschweig
Immunoassay (ELISA), Quantikine M	R & D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Qiaprep Plasmid Purification Kit (Midi und Maxi)	Qiagen GmbH, Hilden
RNase Protection Assay Template Set (RPA)	BD PharMingen, San Diego, USA
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.5 Geräte

β-Counter	Direct β-Counter Matrix TM96, Packard, USA
Elektrophoresekammer für DNS	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer für Proteine	Biometra, Göttingen
Eukaryontische Zellkultur	Brutschrank B5060 Ek/Co ₂ , Heraeus, Hanau Sterilbank Lamin Air, Heraeus, Hanau
Fluoreszenz- Zellsorter	Epics XL Cytometer, Coulter Cooperation, Florida, U.S.A.
Geltrockner	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifuge	Beckmann J2-21, Palo Alto, U.S.A. Biofuge 28RS, Heraeus, Hanau

Mikroskope	Megafuge 2.0 R, Heraeus, Hanau Zeiss Mikroskop ID 03
Nukleinsäuredeektion	GelDoc 1000, Bio-Rad, München
Photometer	Spectronic, Genesys 5 Spectronic Instruments
pH-Meter	761 Kalimatic, Knick
Proteintransfer	Transblot SD, Bio-Rad, München
Reinstwasseranlage	Millipore, Eschborn
Rotationsrad	Renner, Darmstadt
Schüttler	Innova 4230, Refridgerated Inkubator New Brunswick Scientific, Edison, NJ, U.S.A
Spannungsquellen	Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Thermocycler	Perkin Elmer, Überlingen Gene Amp, PCR Systems 9600 / 9700
Tischzentrifuge	Eppendorf 5415 R
Videophotographie	Gel Doc 1.000, Bio-Rad, München
Waagen	Satorius, Göttingen
Zellhomogenisator	Ultra Turrax, Janke & Kunkel

2.1.6 Tiere

Mäuse des Inzuchtstammes C57 BL/6	Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln
-----------------------------------	----------------------------------

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Medien für Escherichia coli Bakterien

LB (Luria-Bertani)-Medium

1 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

pH 7,2

(für die Herstellung fester Nährböden wurde das Medium mit

1,5 % Agar versetzt)

SOC-Medium

2 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCl

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

pH 7

Alle Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert, Glukose wurde dem autoklavierten SOC-Medium nach Abkühlen steril zugegeben.

Bei Bedarf wurde das Medium nach dem Autoklavieren mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt (Stammlösung in H₂O : 100 mg/ml).

2.2.2 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien ebenso wie Zusätze wurden von der Firma Gibco BRL (Karlsruhe) und der Firma Biochrom (Berlin) bezogen. Fötales Kälberserum (FKS)

(Biochrom, Berlin) wurden zur Inaktivierung von Komplementfaktoren vor Gebrauch für 30 min auf 56°C erhitzt.

Dulbeco`s Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose

10 % FKS

100 U / ml Penicillin

100 U / ml Steptomycin

Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium

10 % FKS

100 U / ml Penicillin

100 mg / ml Streptomycin

Einfriermedium

FKS 90%

DMSO 10%

2.2.3 Stammlösungen und Puffer

Alle hier aufgeführten Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

2x BBS-Puffer: für die Transfektion eukaryontischer Zellen

50 mM BES

280 mM NaCl

1,5 mM NaCl

pH 6,96

steril filtrieren

Erythrozyten-Lyse-Puffer (10x)

9 Vol.T. 0,83% NH₄Cl

1 Vol.T. Tris (2C, 594 g/L ; pH auf 7,65 mit HCl einstellen)

pH 7,2

KCM-Puffer (5x)

500 mM KCl
150 mM CaCl₂
250 mM MgCl₂

Laemmli-Puffer (3x): Auftragepuffer für Proteine

187,5 mM Tris/HCl pH 7,5
6 % SDS
30 % Glycerin
0,01 % Bromphenolblau
3 % β-Mercaptoethanol

Ligase-Puffer (10x)

660 mM Tris/HCl pH 7,5
50 mM MgCl₂
50 mM DTT
10 mM ATP

PCR-Puffer (10x)

200 mM Tris/HCl pH 8,4
50 mM MgCl₂
500 mM KCl
0,1 % Gelatine

SD-Transblot Puffer (10x)

480 mM Tris/HCl pH 7,5
390 mM Glycin

vor Gebrauch wird der 1x Puffer mit 20 % Methanol versetzt

TAE (10x)-Puffer: Laufpuffer für Agarosegele

400 mM Tris/HCL pH 8,0

10 mM EDTA

20 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml in H₂O) pH 8,0

TBS-Puffer: Waschpuffer für Western Blot

150 mM NaCl

10 mM Tris/HCl, pH 7,5

TBST-Puffer : Waschpuffer für Western Blot

500 mM NaCl

20 mM Tris/HCl pH 7,5

0,05 % Tween 20

0,2 % Triton X-100

TE (10x)-Puffer

100 mM Tris/HCl pH 8

10 mM EDTA pH 8

TENS-Puffer

0,1 M NaOH

5 % SDS

85% TE

Tris Glycin-SDS (10x)-Puffer : Laufpuffer für SDS Polyacrylamidgele

248 mM Tris/HCl pH 7,5

1,9 M Glycin

1 % SDS

2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

2.3.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , (r_{κ}^{-} m_{κ}^{+}), <i>supE44</i> , <i>thi1gyrA</i> (NaI^r), <i>relA12</i>	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> TOPO 10F ⁻	F ⁻ (<i>lac</i> ^q Tn10 (Tet ^R)) <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80/ <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galK</i> <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.3.2 Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Referenz
293T	Humane embryonale Fibroblasten aus der Niere	ATCC, Rockville, USA
ANA-1	Maus-Makrophagen	
BW 5147	Murine T-Lymphom Zellen	ATCC, Rockville, USA
J 774A.1	Murine Monozyten-Makrophagen	DSMZ, Braunschweig
KKT2	Spontanes T-Zell Lymphom der AKR Maus	J. Immunol. 123: 1548 (1979)
RAW 264.7	Maus-Makrophagen	ATCC, Rockville, USA
TK1	Spontanes T Zell Lymphom der AKR/cum Maus	ATCC, Rockville, USA

2.3.3 Antikörper

Der im Western Blot verwendete sekundäre Antikörper wurde 1:5.000 verdünnt.

Antikörper	Spezies/Isotyp	Spezifität	Referenz
POD (Peroxidase)	Ziege	Maus IgG, Fc γ - Fragment	Dianova

2.4 Klonierungsvektoren, Plasmide und Oligonukleotide

2.4.1 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Eigenschaften	Referenz
pEF-SEM	Expressionsplasmid mit EF-1 α -Promotor CMV-Promotor von pcDNA3 durch EF-1 α Promotor aus pEF-BOS ersetzt.	H. Häcker, 1997
pCR2.1-TOPO	durch überhängendes 3`Desoxythymidin (T) direkte Ligation mit PCR-Produkten möglich (TOPO TA Cloning Kit)	Invitrogen, Karlsruhe
pCR2.1-Fc	Insert: IgG2aFc-Teil (nicht Komplement aktivierend, nicht Phagozytose vermittelnd)	Zheng, 1997
pEGFP-N-1	grün fluoreszierendes Protein aus der lumineszierenden Qualle <i>Aequorea victoria</i> ; Transfektionskontrolle	Clontech, Heidelberg

2.4.2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide

Zwischenprodukte

Name	Eigenschaften	Klonierungsenzyme Vektor/Insert
pCR-IL-10	rmIL-10 in pCR.2.1-TOPO	Not, Xba
pCR-IL-10-M	Austausch der AS Isoleuzin gegen Alanin in Position 87 des IL-10	Not, EcoRI
pCR-SP	Signalpeptid von rmIL-10	Not, BamHI
pCR-IL-22	rmIL-22 in pCR2.1-TOPO	Not, Xba
pEF-IL-10	rmIL-10 in pEF-SEM	Not, Xba

Endprodukte

Fusionsproteine wurden hergestellt aus IgG2aFc-Anteil aus pCR2.1, der an das 3'Ende des IL-10 im pEF-SEM Vektor kloniert wurde. Ausgehend von diesem IL-10-Fc Plasmid, wurde das IL-10 Insert durch IL-10-M, SP oder IL-22 ausgetauscht.

Name	Eigenschaften	Klonierungsenzyme Vektor/Insert
pEF-IL-10-Fc	rmIL-10 mit Fc-Teil in pEF-SEM	BamHI, Xba
pEF-IL-10-M-Fc	rmIL-10-M (s.o.) mit Fc-Teil in pEF-SEM	EcoRI, EcoRI
pEF-SP-Fc	Signalpeptid mit Fc-Teil in pEF-SEM	Not, BamHI
pEF-IL-22-Fc	rmIL-22 mit Fc-Teil in pEF-SEM	Not, BamHI

2.4.3 Oligonukleotide (Primer)

Alle hier aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion, Martinsried bezogen. Für die weitere Klonierung der amplifizierten DNS-Fragmente wurden die Primer am 5'-Ende mit Restriktionsenzym-Schnittstellen versehen. Um die Erkennung dieser

Schnittstellen durch die Enzyme zu optimieren, wurden jeweils unspezifische Nukleotide (G und A) angefügt.

Primer	Sequenz
IL-10-Fc fwd	gAg AgA gCg gCC gCC AAA gCC ACA AAG CAg CCT TgC AgA AAA gAg
IL-10-Fc rev	AgA gTC TAg AAg ggA TCC gAT TTC ATT TTg ATC ATC ATg TAT gC
IL-10-M-EcoRI rev	CTC ACC CAg ggA ATT CAA ATg CTC CTT ggC TTC Tgg gCC ATg
SP-Fc rev	gAg Agg ATC CTg gCC CCT gCT gAT CCT CAT
IL-22-Fc fwd	gAg AgC ggC CgC ACA CTT gTg CgA TCT CTg ATg
IL-22-Fc rev	AgA gAT CTA gAg Agg ATC CAC gCA AgC ATT TCT CAg Aga

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Präparation von RNS

Zur Gewinnung von RNS (für cDNS, „complementary DNA“, Synthese) wurde der „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Gewebe wurde zunächst mit einem Zellhomogenisator (Ultra Thurrax, Janke & Kunkel) zerkleinert und jeweils ca. 30 mg mit 600 µl RLT Puffer (mit 1% Mercaptoethanol) versetzt. Zellen aus der Zellkultur wurden 1x mit PBS gewaschen und bis zu 5×10^6 Zellen mit 350µl RLT Puffer, bzw. 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen mit 600 µl RLT Puffer versetzt. Das weitere Vorgehen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers.

Zur Gewinnung von RNS für den Ribonuklease Protection-Assay (RPA) wurde gesamt-RNS aus Organen isoliert. Lungen wurden mit PBS perfundiert, entnommen, kurz in PBS gespült, sofort auf Eis gegeben und zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Leber und Milz wurden entnommen, in PBS gespült und eingefroren. Die Organe wurden in 0,5ml Tri-Reagenz aufgenommen und mit einem Zellhomogenisator zerkleinert. Die Zellsuspension wurde mit erneut 0,5 ml Tri-Reagenz verdünnt, 30sek. gemixt und 5min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200µl Chloroform wurde erneut gemixt und anschließend 15min inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt von 13.000 Upm für 15min und bei 4°C befand sich die RNS im farblosen Überstand. Der Überstand wurde mit 500µl Isopropanol gemischt, 10min bei RT inkubiert und pelletiert (10min, 13.000 Upm, 4°C). Der Niederschlag wurde in 1ml 75% Ethanol gewaschen (7500U/min, 5min, 4°C), für 5-10min getrocknet und in 100µl DEPC-Wasser resuspendiert. Die RNS wurde für 10min bei $55-60^{\circ}\text{C}$ gelöst und die Menge photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Je 10µg-Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

2.5.2 Synthese radioaktiv markierter „antisense“ RNS-Sonden für den Ribonuklease Protektion-Assay (RPA)

Zur radioaktiven Markierung von „antisense“ RNS-Sonden wurde der "RiboQuant™ *In vitro* Transcription Kit" von BD PharMingen verwendet. Es wurde das Template-

Set (Matrizenset) mCK-1 eingesetzt. Es handelte sich hierbei um ein Gemisch aus DNS-Sequenzen unterschiedlicher Länge, die für bestimmte Proteine codieren. Zu einem Über-schuß eines Nukelotidgemischs (GACU-Pool) wurde das Template-Set und α -[³³P]-UTP gegeben und laut Herstellernachweis unter Verwendung einer DNS-abhängigen RNS-Polymerase die radioaktiv-markierte „antisense“ Sonde synthetisiert, gereinigt und aufkonzentriert. Im β -Counter wurde die Radioaktivitätsmenge gemessen. Die Sonden wurden in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration in Hybridisierungspuffer aufgenommen.

2.5.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten RNS-Sonden

10 μ g–Aliquots der RNS, die wie unter 2.5.1 beschrieben aus Organen isoliert wurden, wurden mit den markierten „antisense“ RNS-Sonden gemischt. Nach einem kurzem Denaturierungsschritt bei 90°C fand die Hybridisierung bei 56°C ü.N. im Wasserbad statt. Ein Doppelstrang aus RNS und Sonde ist bei der nachfolgender RNase-Behandlung geschützt, während einzelsträngige RNS durch das Enzym abgebaut wird. Die RNase-Behandlung und die nachfolgende Beseitigung der RNase wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die RNS-Doppelstränge wurden aufgereinigt und aufkonzentriert. In Loadingpuffer gelöst wurden diese für eine elektrophoretische Auftrennung eingesetzt.

2.5.4 Elektrophoretische Auftrennung von RNS, Transfer und Detektion

Die Auftrennung der RNS erfolgte im Acrylamidgel. Zur Herstellung des Gels wurden folgende Reagenzien verwendet.

Reagenzien	Vol/Menge
TBE (10x)	14,9ml
Acrylamid 40%	17,7ml
bis Acrylamid 2%	18,62ml
Urea (Harnstoff)	71,64g
ddH ₂ O	30ml

Zunächst wurden die Reagenzien gemischt und im Wasserbad bei 37°C inkubiert, bis sich der Harnstoff gelöst hat. Das homogene Gel wurde auf 4°C abgekühlt. In der Zwischenzeit wurden die Gelplatten vorbereitet. Die Gelplatten wurden erst mit dH₂O und dann mit 70% Ethanol gut geputzt. Die kleinere Platte wurde silanisiert und dann noch einmal gesäubert. Die Platten wurden zusammengefügt, indem die kleinere Platte durch zwei Spacer getrennt auf die größere Platte gelegt wurde. Die Platten wurden durch Klammern fixiert, die Kanten wurden mit Klebeband versiegelt. Nach dem Abkühlen des Gels im Kühlschrank wurde diesem 900µl APS (10%) und 110µl TEMED zugegeben. Das Gel wurde vorsichtig zwischen die vorbereiteten Platten gegossen und war nach 1h bei RT polymerisiert. Die Gelplatten wurden mit dem Gel in die Gelkammer gegeben und ein Vorlauf mit 500ml 0,5x TBE-Puffer für 45min bei 45 Watt gestartet. Die radioaktivmarkierten RNS-Doppelstränge, die wie unter 2.4.3 beschrieben, gewonnen wurden, wurden 5min bei 95°C denaturiert. Nach dem unmittelbaren Abkühlen auf Eis wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese fand zunächst für 10 min bei 25 Watt und dann bei 50 Watt statt. Das Gel wurde nach Beendigung des Laufs aus den Platten entnommen und auf Blottingpapier gelegt. Im Geltrockner erfolgte der Transfer in 1-2h. Der Blot wurde für 24h auf dem Phosphorimager oder für 1 Woche bei -80°C auf Röntgenfilm in Kassetten mit Verstärkerfolie exponiert. Die Auswertung fand mit dem Programm "Imagequant" statt.

2.5.5 cDNS-Synthese

Mit Hilfe von reverser Transkriptase ist es möglich, RNS in komplementäre DNS (cDNS) umzuschreiben. Synthetische Oligonukleotide, die an den RNS-Strang binden, dienen dabei als Primer für die Synthese des cDNS Stranges. Das Verfahren der cDNS-Synthese beruht auf den Erkenntnissen der Replikation von Retroviren (Houts *et al.*, 1979; Kotewicz *et al.*, 1985; Gerad *et al.*, 1986). Für die cDNS-Synthese wurden 30 µl RNS Eluat mit jeweils 2,5 µl 10 µM Oligo-dT- und „random hexamer“- Primer für 10 min auf 70°C erhitzt und auf Eis rasch wieder abgekühlt, um Sekundärstrukturen in der RNS aufzulösen. Anschließend wurden dem Ansatz 10 µl 5x Transkriptionspuffer („first strand buffer“), 5 µl 0,1 M DTT, 2,5 µl dNTP-Mix (200 µM) und 2,5 µl Superskript II Plus (200 E / µl) zugeben. Das Reaktionsgemisch

wurde 50 min bei 42°C inkubiert. Danach wurde das Enzym durch Erhitzen auf 70°C für 15 min inaktiviert.

Alternativ wurde auch der cDNS-Synthese Kit „Advantage-RT-for-PCR Kit“ (Clontech, Palo Alto, CA) verwendet.

Für die Amplifizierung einer spezifischen DNS-Sequenz wurden 10 µl des Reaktionsansatzes in die PCR-Reaktion eingesetzt.

2.5.6 Amplifikation von DNS-Stücken durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) bietet die Möglichkeit bestimmte DNS-Sequenzen selektiv zu vervielfältigen. Durch Hitzedenaturierung werden zunächst die Doppelstränge der DNS voneinander getrennt. An die Randbereiche des zu amplifizierenden DNS-Fragments binden in der „Annealingreaktion“ synthetische Oligonukleotide (Primer). Die gebundenen Oligonukleotide dienen hitzestabilen DNS-Polymerasen als Startpunkte für die Synthese eines komplementären DNS-Stranges („Extensions“). Durch zyklische Wiederholung dieser drei Schritte (Denaturierung, „Annealing“ und „Extension“) wird die spezifische DNS-Sequenz exponentiell angereichert. (Mullis und Faloona, 1987; Saiki *et al.*; 1988). Um die angereicherten DNS-Fragmente gezielt subklonieren zu können, wurden die Primer an ihren 5`-Enden mit Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen versehen.

In einem 50 µl Ansatz wurden je 50 pmol 5` und 3` Primer, 5 µl 10x PCR Puffer, 1,5 µl dNTPs (je 10 mM), 1,5 µl 25 mM MgCl₂ und 1 µl (4 Einheiten) Taq-Polymerase gemischt.

Für die Polymerasekettenreaktion wurden folgende Programmschritte gewählt:

5 min	95°C	Denaturierung
-------	------	---------------

35 Zyklen:

1 min	95°C	Denaturierung
1 min	60°C	Annealing
1 min	72°C	Extension

am Schluß:

10 min 72°C Extension

Nach Beendigung der Reaktion wurden die Ansätze bei 4°C gelagert.

Die PCR-Produkte konnten durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. (Aufreinigung ausgeschnittener Banden für Klonierungsansätze siehe unten).

2.5.7 Klonierung von PCR-Produkten in pCR 2.1 (TOPO TA Cloning Kit)

Mittels des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen, Karlsruhe) konnten Taq-Polymerase amplifizierte PCR-Produkte direkt in einen Plasmid Vektor eingesetzt werden.

Die Taq-Polymerase hat eine Matrizen unabhängige terminale Transferase Aktivität, die ein Desoxyadenosin (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts anhängt. Der linearisierte pCR.2.1 Vektor hat ein überhängendes 3'-Desoxythymidin (T). Auf diese Weise kann das PCR-Insert mit dem Vektor ligieren.

2.5.8 Plasmidpräparation für analytische Zwecke (Mini Preps)

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen von DNS durch alkalische Lyse präpariert. 1,5 ml einer stationären ü.N.-Kultur von transformierten Bakterien wurden 5 min bei 13.000 UpM abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, das Bakterienpellet in 300 µl TENS (siehe Abschnitt 2.2) resuspendiert. Durch Zugabe von 150 µl 3,0 M Natriumacetat pH 5,2, kräftiges Mischen und Inkubation für 5 min auf Eis wurden die Proteine und die bakterielle DNS ausgefällt. Der Ansatz wurde bei 13.000 UpM (5 min, 4°C) abzentrifugiert. Die Plasmid DNS im Überstand wurde mit 750 µl 96% Ethanol für 5 min gefällt und anschließend durch Zentrifugieren (13.000 UpM, 5 min, 4°C) sedimentiert. Das DNS-Pellet wurde einmal mit 70% Äthanol gewaschen, um Reste von Natriumacetat zu entfernen, anschließend getrocknet und in 100 µl H₂O/20 µl/mg RNase A aufgenommen und bei 37°C für 15 min inkubiert.

Für eine Restriktionsanalyse wurden 5 µl der DNS-Lösung eingesetzt.

2.5.9 Plasmidpräparation für präparative Zwecke (Midi u. Maxi Preps)

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNS in großem Maßstab wurden Puffer und Silicagelsäulen der Firma QIAGEN (Hilden) verwendet. 250 ml Kulturmedium (100µl Ampicillin/100 ml LB-Medium) wurden mit einem Aliquot einer Bakterienübernachtskultur oder einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft und unter Selektionsdruck über Nacht auf einem Schüttler bei 37°C inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 4.000 UpM geerntet und durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNS durch Anionenaustauschchromatographie erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Reinheit und Konzentration der isolierten DNS wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt.

2.5.10 Schneiden von DNS mit Restriktionsendonukleasen

DNS-Moleküle, die über Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen verfügen, können sequenzspezifisch gespalten werden. Restriktionen erfolgen in den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern für mindestens 1h bei der jeweiligen optimalen Temperatur. Pro Reaktionsansatz wurden ca. 1-5 µg DNS eingesetzt und in einem Volumen von 15 µl mit 5-20 Einheiten Restriktionsenzym verdaut.

2.5.11 Dephosphorylierung von 5`-Enden

Um Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurden die 5`-Enden mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Dafür wurden 5-10 µg Plasmid-DNS in einem Volumen von 50 µl Puffer (CIP Puffer, siehe Abschnitt 2.2.3) mit alkalischer Phosphatase (1 Einheit) für 1h bei 37°C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 70°C (10 min) wurde die Reaktion abgestoppt. Die Fragmente wurden mit einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und anschließend mit einem Elutionskit („Qiaquick“, Qiagen, siehe unten) aufgereinigt.

2.5.12 Verknüpfung von DNS-Fragmenten mit T4-DNS-Ligase

Die Ligation zweier kompatibler DNS-Enden wurde mit Hilfe der T4-DNS-Ligase durchgeführt. Die T4-DNS-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5`-Phosphat- und 3`-Hydroxylgruppen unter ATP-Verbrauch. Geschnittene und gereinigte Vektor-DNS wurde mit einem 3 bis 10 fachen molaren Überschuss des zu klonierenden DNS-Fragments gemischt. Die Ligation wurde in einem Volumen von 15 µl in Gegenwart von T4-DNS-Ligase (1 Einheit) und Ligasepuffer (siehe Abschnitt 2.2.3) über Nacht bei 16°C durchgeführt.

2.5.13 Auftrennen von DNS-Fragmenten im Agarosegel

Die Gelelektrophorese bietet die Möglichkeit doppelsträngige DNS-Moleküle ihrer Größe nach aufzutrennen. Diese Methode wurde zur analytischen sowie zur präparativen Trennung von Restriktionsfragmenten oder PCR-Produkten angewandt. Zur Auftrennung wurden meist 1% ige Gele verwendet, die Fragmente von 200 Basenpaaren (Bp) bis 10 kBp ausreichend trennen. Für Fragmente, die kleiner als 100 Bp waren, wurden Gele speziell für DNA mit niedrigem Molekulargewicht eingesetzt (Biogel, Bio 101 mit rasch schmelzender Agarose). Die DNS-Proben wurden mit 6x Auftragepuffer gemischt und je nach Größe der Gelkammer bei 30-100 Volt 1-2 h aufgetrennt. Der Laufpuffer (1 x TAE), der auch zum Aufkochen der Agarose verwendet wurde, enthielt 0,1 µg/ml Ethidiumbromid. Die aufgrund des eingelagerten Ethidiumbromids fluoreszierenden DNS-Banden konnten so in einem Transluminator sichtbar gemacht werden. Durch Videophotographie (Gel Doc 1000, Bio Rad, München) konnten die Resultate protokolliert werden.

2.5.14 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Um Strangbrüche der DNS aufgrund der Einwirkung von UV Licht zu verhindern, wurden die DNS Banden mit einer energiearmen Handlampe sichtbar gemacht und zügig ausgeschnitten. Im Anschluss wurden die DNS-Fragmente mit Hilfe eines

Aufreinigungs-Kits der Firma Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert, wobei die Auflösung der Agarose in einer Natriumjodidlösung unter Wärmeeinfluß (50°C) erfolgte. Durch Adsorption an einer Silikamatrix wurden DNS-Moleküle aus dem Ansatz isoliert. Nach einem Waschschrift wurden die DNS-Fragmente mit 30 µl H₂O_{bidest} von der Silikamatrix eluiert.

2.5.15 Sequenzierung von DNS

Alle Sequenzierungen wurden durch die Firma GATC Biotech AG, Konstanz durchgeführt.

2.5.16 Herstellung chemisch kompetenter E.coli Bakterien

Für die Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde die Methode von Chung und Miller (1988) angewendet. 250 ml LB-Medium wurden mit Bakterien einer Übernachtskultur 1:100 angeimpft, bei 37°C inkubiert und nach Erreichen der frühen logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ :0,5 – 0,6) durch Zentrifugation bei 4°C für 10 min bei 4.000 UpM geerntet. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 25 ml eiskaltem TSB-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.3) und 10 min Inkubation auf Eis, wurden 500 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei –80°C gelagert.

2.5.17 Transformation kompetenter E.coli Bakterien

Zur Transformation wurden ca. 1 µg der DNS mit 20 µl 5x KCM-Puffer (siehe Abschnitt 2.2.3) in einem Gesamtvolumen von 100 µl gemischt, auf 4°C vorgekühlt und mit 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien gemischt. Nach 20 min Inkubation auf Eis und einer Minute Hitzeschock bei 42°C wurden die transformierten Bakterien in 800 µl LB-Medium transferiert und zur phänotypischen Expression der Antibiotika-Resistenz für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Selektion erfolgte über Nacht bei 37°C auf Antibiotika-haltigen Agarplatten. Mit dieser Methode kann

eine Transformationseffizienz von ca. 10^6 Transformanden pro 1 μg DNS erreicht werden.

2.5.18 Langzeitlagerung von bakteriellen Wirtsstämmen und transformierten Bakterien

Die längerfristige Aufbewahrung von Bakterienstämmen oder Klonen erfolgte als Glycerinkultur. 10 ml einer Übernachtskultur wurden abzentrifugiert (5 min, 4.000 UpM), das Pelett in einem 1:1 Glycerin / LB-Medium Gemisch resuspendiert und aliquotiert bei -80°C gelagert.

2.6 Gewinnung von ex vivo Zellen

2.6.1 Makrophagengewinnung aus Peritoneallavage und Stimulation mit Zellüberständen

Um die Migration von Makrophagen in die Bauchhöhle anzuregen, wurde den Mäusen 800 μ l Thioglykolat i.p. injiziert. 4 bis 5 Tage später wurde eine Peritoneallavage mit einem Spülvolumen von 10 ml PBS an den vorbehandelten Mäusen durchgeführt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde nach Lyse der Erythrozyten und einem Waschschrift mit PBS, in Medium (RPMI) aufgenommen und die Zellzahl auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Für jede Einheit einer Flachboden 96-Loch-Platte (Nunclon) wurden 2×10^5 Zellen (100 μ l) eingesetzt und 100 μ l des jeweiligen Überstands bzw. Mediums zugegeben. Die Zellen wurden so 2h bzw. 16h (über Nacht) im Brutschtank bei 37°C und 7 % CO₂ vorinkubiert und dann mit jeweils 10 ng/Einheit LPS stimuliert. 20h nach der LPS-Stimulation wurden die Zellüberstände abgenommen und sofort im ELISA (siehe unten) vermessen oder bei -20°C gelagert.

2.7 Zellbiologische Methoden

2.7.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37°C, 7% CO₂, und wasserdampfgesättigter Atmosphäre in Kultur gehalten. Alle Arbeiten mit den Zellen erfolgten zur Vermeidung von Kontaminationen an Sterilbänken. Suspensionszellen wurden je nach Wachstum 3 bis 4 mal pro Woche in frischem Medium verdünnt. Adhärenente Zellen wurden spätestens bei Erreichen der Konfluenz von den Plastikschalen abgelöst und auf frische Plastikschalen verteilt. Für eine Lagerung von Zellen über längere Zeit wurden abzentrifugierte Zellen in 10% DMSO in FKS aufgenommen, in Einfrierröhrchen (Nunc) überführt, 24h bei -80°C eingefroren und anschließend in einen Aufbewahrungstank mit flüssigem Stickstoff überführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer.

2.7.2 Transiente Transfektion von 293T Zellen

In einer 10 cm Zellkulturschale wurden 1×10^6 293T-Zellen in einem Volumen von 8 ml DMEM (10% FKS) ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. 16 µg der zu transfizierenden DNS wurden in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon) mit 40 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung und H₂O in einem Gesamtvolumen von 400 µl gemischt. Unter ständigem Durchmischen mit Hilfe eines „Vortex“-Schüttlers wurden zu der CaCl₂-DNS Suspension 400 µl 2x BBS-Puffer pipettiert. Damit sich Komplexe aus Calcium-Phosphat und DNS ausbilden können, wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Lösung unter vorsichtigem Schwenken der Schalen, tropfenweise zu den Zellen gegeben. Danach wurden die Zellen ca. 16 h lang bei 37°C in einer 3%igen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Das Medium wurde gegen neues Medium ersetzt, das mit 1% Protein A Sepharose 2x jeweils min. 6h IgG-depletiert worden war. Dann wurden die Zellen für weitere 72h in einem Brutschrank mit 7% CO₂ inkubiert. Die Transfektionsrate wurde durch die grüne Fluoreszenz von, mit GFP transfizierten Kontrollzellen, am 2.Tag nach Transfektion im FACS (s.u.) bestimmt.

2.7.3 Stimulation von Zelllinien zur Gewinnung von RNS

Zur Gewinnung von IL-10 mRNA wurden T-Zelllinien (TK1, KKT2, BW 5147) mit je 40 ng/ml IL-12 (pro 5×10^5 Zellen) versetzt oder in Zellkulturschalen pipettiert, die zuvor 1h bei 37°C mit je 20 µg/ml anti-CD3 vorbeschichtet worden waren. Makrophagenzelllinien (J 774A.1, ANA-1, RAW 264.7) wurden mit je 50 ng/ml LPS (pro 5×10^5 Zellen) stimuliert. Nach 20 h Inkubation wurde aus den Zellen mittels des „RNeasy Mini Kits“ (siehe 2.5.1) RNS isoliert.

2.7.4 Durchflußzytometrie, „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS)

Bei der Durchflußzytometrie werden die Fluoreszenzeigenschaften von Zellen bzw. die Fluoreszenzstärke zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern beladener Zellen untersucht, die in einer Einzelzellsuspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet werden. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, wird durch einen Photodetektor registriert. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granulartät der Zelle gewonnen.

Auf diese Weise kann die Bindung von Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern an Zellen, bzw. die Expression von GFP (Green Fluorescence Protein aus der lumineszierenden Qualle *Aequorea victoria*) transfizierter Zellen gemessen werden. GFP hat die Eigenschaft, unter UV-Licht intensiv grün zu fluoreszieren und eignet sich deshalb als Reporter-Gen.

2.7.5 Herstellung von Organextrakten zur Zytokinbestimmung

Leber, Lunge und Milz wurden nach 0h, 3h, 6h, oder 12h nach Peritonitisinduktion entnommen und schnell in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen

wurden sie in PBS mit Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) homogenisiert und zentrifugiert. (6,000 g für 20 min. bei 4 °C) wurde der Überstand auf seinen Gehalt an Zytokinen mittels ELISA untersucht. Die gemessenen Zytokinkonzentrationen wurden gegen die Gesamtproteinmenge in den Proben normalisiert.

2.7.6 „Enzym-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Alle ELISAs wurden mit Kits von R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt) nach dem Prinzip des quantitativen enzymgekoppelten „Sandwich“-Immunoassays durchgeführt: 96-Loch-Platten werden mit polyklonalen Antikörpern, die für das nachzuweisende Zytokin spezifisch sind, beschichtet. Standards, Kontrollen und Proben werden in die Einheiten der Platte pipettiert und das nachzuweisende Zytokin wird, falls vorhanden, an die immobilisierten Antikörper gebunden. Nachdem alle ungebundenen Substanzen durch Waschen entfernt wurden, wird ein enzymgekoppelter Antikörper gegen das jeweilige Zytokin zugegeben. Alle ungebundenen enzymgekoppelten Antikörper werden wieder durch einen Waschschrift entfernt und anschließend eine Substratlösung hinzugefügt. Die Enzymreaktion führt zu einem blau gefärbten Produkt, das ins Gelbe umschlägt, wenn die Reaktion durch Ansäuern abgestoppt wird. Die Intensität der im Photometer gemessenen Farbe ist proportional zur Menge des jeweiligen Zytokins in den Proben.

2.8 Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine

2.8.1 Präzipitation mit Protein A Sepharose

Fusionsproteine, die den Fc-Teil von Immunglobulinen enthalten, können mit Hilfe von an Sepharose gekoppeltem Protein A aufgereinigt werden. Den Zellkulturüberständen wurde im Verhältnis 1:100 (v/v) Protein A Sepharose zugefügt. Anschließend wurden die Proben ü.N. bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert, um die Bindung des Proteins an Protein A Sepharose zu ermöglichen. (Weitere Schritte der Fusionsprotein-Aufreinigung siehe unten).

Zur Analyse der Proben in der SDS-PAGE wurde das Sepharose Pellet einmal mit PBS gewaschen, in 25 µl Laemmli-Puffer für 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf ein Gel aufgetragen.

2.8.2 Aufreinigung von Fc-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von Fusionsproteinen aus Zellkulturüberständen transfizierter Zellen, wurde das Sepharose Pellet aus 40 ml Überstand zunächst 3x mit 150 mM NaCl gewaschen. Um das Protein von seiner Bindung an die Protein A Sepharose wieder zu lösen, wurde der pH-Wert der Proben mit Citrat-Puffer (pH 3) abgesenkt und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (5 min bei 13.000 UpM) wurde der pH-Wert des Überstands sofort mit Tris-HCl (1M, pH 10) angehoben um eine Denaturierung des eluierten Proteins zu verhindern. Das Sepharose Pellet wurde daraufhin erneut mit Citrat-Puffer versetzt und der Elutionsschritt noch 2x wiederholt. Die gesammelten Eluate wurden abschließend zur vollständigen Entfernung der Sepharose zentrifugiert und dem Überstand 30 µl Protease-Inhibitoren (Pepstatin, Leupeptin, Antipain) zugefügt.

Zur Erfolgskontrolle der Aufreinigung wurden von den einzelnen Schritten jeweils 20 µl Fraktionen entnommen und im Western Blot analysiert.

2.8.3 Dialyse

Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden durch einem Zentrifugenfilter (Microcon) konzentriert und umgepuffert. Dazu wurden die Proben in das Probenreservoir des Filters (Membranaustauschvolumen von 10 kd) pipettiert und bei 14.000 UpM für 13 min zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die konzentrierte Proteinlösung in PBS aufgenommen (Pufferwechsel) und erneut zur Konzentration zentrifugiert.

2.9 Proteinanalytische Methoden

2.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SDS-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur aufgefaltet. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so daß ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird. Durch das im Laemmli-Puffer enthaltene β -Mercaptoethanol werden intra- und intermolekulare Disulfidbrücken reduziert.

Um eine optimale Auftrennung der Proteine im zu erhalten, kann die Porengröße eines Geles variiert werden. Die Porengröße wird bei der Polymerisation durch die Konzentrationen von Acrylamid und Bisacrylamid festgelegt. Die in den Vorschriften angegebenen Gelkonzentrationen beziehen sich auf die Konzentration von Acrylamid im Gel. Im Laemmli-System werden die Proteinproben zunächst in einer Sammelgelschicht konzentriert, bevor sie in das eigentliche Trenngel einwandern.

Sammelgel (5ml)

Reagenzien	3%
Acrylamidlg. (30% / 0,8%)	0,5 ml
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	1,2 ml
10 % SDS	50 μ l
H ₂ O	3,2 ml
10 % APS	50 μ l
TEMED	2,5 μ l

Trenngel (20 ml)

Reagenzien	7%	10%	12%
Acrylamidlg. (30%/0,8%)	5 ml	6,7 ml	8 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	5 ml	5 ml	5 ml
10 % SDS	230 µl	230 µl	230 µl
H ₂ O	9,7 ml	8,0 ml	6,7 ml
10 % APS	60 µl	60 µl	60 µl
TEMED	11,4 µl	11,4 µl	11,4 µl

Die Proteinproben wurden in Auftragspuffer 5 min bei 95°C denaturiert und in die mit Laufpuffer gespülten Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese fand bei 60 – 90 mV statt.

Als Molekulargewichtsstandard wurde folgendes Proteingemisch verwendet:
(See Blue Pre-Stained Standards, Invitrogen, Karlsruhe)

Protein	Molekulargewicht (kD)
Myosin	250
BSA	98
Glutamatdehydrogenase	64
Alkoholdehydrogenase	50
Carboanhydrase	36
Myoglobin	30
Lysozym	16
Aprotinin	6
Insulin, β-Kette	4

2.9.2 Färbung von Proteinen im Gel mit Coomassie

Zur Anfärbung der Proteine im Gel wurde eine Lösung mit Coomassie-Brilliant Blau R-250 (Sigma, Deisenhofen) verwendet. Dieser Farbstoff bildet Komplexe mit Proteinen. Die Polyacrylamidgele wurden ca. 10 min in der Coomassie Färbelösung (0,25g Coomassie, 90 ml Methanol, 10 ml Essigsäure) geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung (90 ml Methanol, 20 ml Essigsäure, 90 ml H₂O) inkubiert, bis die Proteinbanden sichtbar waren. Mit dieser Methode können Proteinmengen von 1 µg gerade noch detektiert werden.

2.9.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Elektrophorese aus den SDS-Gelen auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Gershoni & Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot Puffer durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf einer „Semidry“- Blotapparatur, wobei für 2h ein Strom von 72 mA (bzw. entsprechend der Größe der Nitrocellulose) floß.

2.9.4 Western Blot Analyse

Um die spezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulose zu verhindern, wurde diese mit Proteinen abgesättigt. Die Nitrozellulose wurde 2x 10 min in TBS gewaschen und dann in 5% fettfreiem Trockenmilchpulver in TBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde sie 2x mit TBST und dann 2x mit TBS gewaschen, um das Milchpulver vollständig zu entfernen.

Zur Detektion wurden monoklonale, Peroxidase gekoppelte Fc-spezifische Antikörper verwendet. Die Antikörper wurde gemäß Herstellerangaben 1 : 5.000 in 1,5 % fettfreiem Trockenmilchpulver in TBS verdünnt.

Der Blot wurde für min 1h bei RT mit der Antikörperlösung inkubiert, danach 4x für 10 min mit TBST gewaschen.

Die Detektion erfolgt durch Chemilumineszenz. Hierfür wurde der ECL Kit (Amersham, Braunschweig) verwendet. Durch das Enzym Peroxidase kommt es zur Umsetzung des Substrates Wasserstoffperoxid, wobei Sauerstoff frei wird. Hierdurch wird die Oxidation von Luminol im alkalischen Milieu katalysiert. Durch die Oxidation

wird Luminol auf ein höheres Energieniveau transferiert. Beim Rückfall in den Grundzustand wird diese Energie als Chemielumineszenz frei. Durch den Zusatz von „Enhancern“ wird die Menge des emittierten Lichtes erhöht und zugleich die Emission verlängert (Thorpe *et al.*, 1985).

Zur Detektion wurde der Blot in einer 1:1 Mischung von ECL Reagenz 1 und 2 unter Schwenken für 1 min inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Zellophan luftblasenfrei abgedeckt und dann sofort auf einem Röntgenfilm für verschiedene Zeiten, 30 sec-15 min, in Abhängigkeit von der Stärke der Chemilumineszenz exponiert.

2.10 Tierexperimentelles Sepsismodell

2.10.1 Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Für die Induktion einer Peritonitis wird ein Stent mit einem definierten Durchmesser durch die Wand des Colon ascendens gestochen, um somit eine kontinuierliche Verbindung zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle herzustellen. Das CASP Modell wurde von Zantl detailliert beschrieben (Zantl et al., 1997).

Die Versuchstiere werden zunächst mit Ether narkotisiert. Vor der Operation wird ein Venenkatheter (16 G) so präpariert, daß ein etwa 3 mm langes Stück von der Öffnungsseite her mit einem Skalpell kreisförmig so eingeschnitten wird, daß nur eine kleine Verbindungsstelle stehenbleibt. Unter Betäubung und nach Desinfektion des Abdomens wird dieses durch einen 1 cm langen mittigen Schnitt in der Linea alba eröffnet. Das Colon ascendens wird herausgelegt, der präparierte Katheter wird durch die antimesenterische Wand, etwa 10 mm von der ileozökalen Klappe entfernt, in das Lumen des Colon ascendens eingebracht und mit zwei Stichen (7/0 Ethilonfaden), fixiert. Danach wird die Nadel aus dem Stent entfernt und dieser an der präparierten Schnittstelle abgeschnitten. Vorsichtig wird Stuhl aus dem Zökum über das Colon ascendens in den Stent gedrückt, bis ein kleiner Tropfen Stuhl aus dem Stent austritt, der als initiale Infektionsdosis wirkt. Um den Flüssigkeitshaushalt der Tiere auszugleichen, wird intraoperativ 0,5 ml sterile Saline in die Peritonealhöhle injiziert. Der Verschluss der Bauchdecke erfolgt im Bereich der Muskulatur mit einer fortlaufenden Nahttechnik. Die Haut wird mit Einzelknopfnähten verschlossen (4/0 Ethilonfaden)

3. Ergebnisse

Die Theorie, daß der Sepsis eine überschießende und uneingeschränkte inflammatorische Reaktion zugrunde liegt, wurde durch den mangelnden Erfolg einer antiinflammatorischen Behandlung septischer Patienten zunehmend in Frage gestellt. Stattdessen sammeln sich Hinweise, daß Immunosuppression eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielt. So konnten z.B. stark erniedrigte Konzentrationen einiger proinflammatorischer Zytokine wie IL-12, IL-1 β , IL-6 und TNF sowie eine verminderte Expression von MCH Klasse II Molekülen nachgewiesen werden. Man könnte annehmen, daß die Immunosuppression Folge einer exzessiven Produktion antiinflammatorischer Mediatoren wie z.B. IL-10 sein könnte, doch die Produktion von IL-10 durch Monozyten ist eher vermindert. Substituiert man IL-10 bei Makrophagen depletierten Mäusen, kann man die Mortalität in einer anschließenden Sepsis senken (Emmanuilidis et al., 2001). Es stellt sich die Frage, ob der protektive Effekt von IL-10 durch seine anti- oder proinflammatorische Komponente oder durch beide vermittelt wird.

Zytokine haben eine sehr kurze Zirkulationshalbwertszeit (z.B. $t_{1/2}$: 30 min). Um die Auswirkungen von IL-10 in vivo leichter untersuchen zu können, wurde ein Fusionsprotein aus IL-10 und murinem Fc γ 2a erstellt. Dieses IL-10-Fc Fusionsprotein besitzt sowohl die biologischen Eigenschaften von IL-10, als auch eine verlängerte Zirkulationshalbwertszeit durch den Immunglobulinanteil. Durch Einführung von Mutationen in den Komplement(C1q)- und in den Fc γ R1 Bindungsteil des Fc γ 2a-Fragments, wurden sowohl die antikörperabhängige, zellvermittelte, zytotoxische Aktivität als auch die komplementabhängige, zytotoxische Aktivität des Ig-Anteils entfernt. Wie das nativ exprimierte IL-10, ist auch das Fusionsprotein ein Homodimer. Das Resultat ist eine biologisch aktive, nicht-lysierende Form von IL-10, die eine verlängerte Halbwertszeit in vivo aufweist (Zheng et al., 1995).

Der modifizierte Fc-Teil kann an jedes beliebige Zytokin angefügt werden und so dessen Zirkulationshalbwertszeit verlängern.

Um die pro- und antiinflammatorische Wirkung von IL-10 in der Sepsis getrennt untersuchen zu können, wurde im Folgenden durch Austausch der Aminosäure Isoleuzin in Position 87 durch Alanin ein IL-10 ohne proinflammatorische Komponente (IL-10-M) kloniert (Ding et al., 2000). Um die Zirkulationshalbwertszeit zu

verlängern, wurde auch an IL-10-M der oben beschriebene modifizierte Fc-Teil angefügt (IL-10-M-Fc). Zur Kontrolle der beiden Konstrukte wurde das Signalpeptid von IL-10 ohne den Rest von IL-10 ebenso als Fc-Fusionsprotein erstellt (SP-Fc).

IL-22 (ursprünglich: IL-10 related T cell-derived inducible factor = IL-TIF) ist ein Zytokin, das Homologie zu IL-10 aufweist und an einen Zytokin-Rezeptor der Klasse II bindet. Sowohl IL-10 als auch IL-22 binden an heterodimere Rezeptoren. Eine der beiden Ketten des IL-22 Rezeptors CRF2-4 (= R2c) dient auch dem IL-10 Rezeptorkomplex als eine Komponente, der aus IL-10R1 und R2 besteht (Kotenko et al., 2000).

IL-22 wird von IL-9 stimulierten T-Zellen produziert und induziert selbst die Produktion von Akutphase Proteinen. Deshalb kann auf eine proinflammatorische Rolle von IL-22 geschlossen werden (Xu et al., 2001).

Die Homologie zu IL-10 und die gemeinsame Kette des IL-22 und IL-10 Rezeptors ließen es sinnvoll erscheinen auch IL-22-Fc zu klonieren und in die Untersuchung der Wirkungsweise von IL-10 einzubeziehen.

3.1 Regulation von IL-10 während der Sepsis im CASP Modell

3.1.1 Expressionsanalyse von IL-10 mRNA während der Sepsis mittels RPA

Zur Induktion einer Peritonitis wurden die Versuchstiere wie unter 2.10.1 beschrieben nach dem CASP Modell operiert. Leber, Lunge und Milz wurden entweder 0h, 3h, 6h oder 12h nach der Operation entnommen und die gesamte RNS aus dem Organen isoliert (siehe 2.5.1). Zur Bestimmung der enthaltenen Menge an IL-10 RNA wurden radioaktiv markierte antisense-RNS-Sonden zur Hybridisierung mit der aus den Organen isolierten RNS eingesetzt (siehe 2.5.2; 2.5.3). Die so entstandenen RNS-Doppelstränge wurden denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde auf Blotting Papier transferiert und anschließend für 24h im Phosphoimager belassen und schließlich mit dem Programm Imagequant ausgewertet (siehe 2.5.4). Die graphische Darstellung der Ergebnisse in Abb.3 zeigt die Menge der detektierten IL-10 mRNA anhand der gemessenen relativen Dichte. Während in der Leber die höchste Konzentration an IL-10 mRNA erst 12h postoperativ erreicht wird, ist der Konzentrationsgipfel in der Lunge bereits nach 6h und in der Milz schon nach 3h erreicht. Nach Erreichen des Maximalwertes kommt es in den Organen wieder zu einem Abfall der IL-10 mRNA.

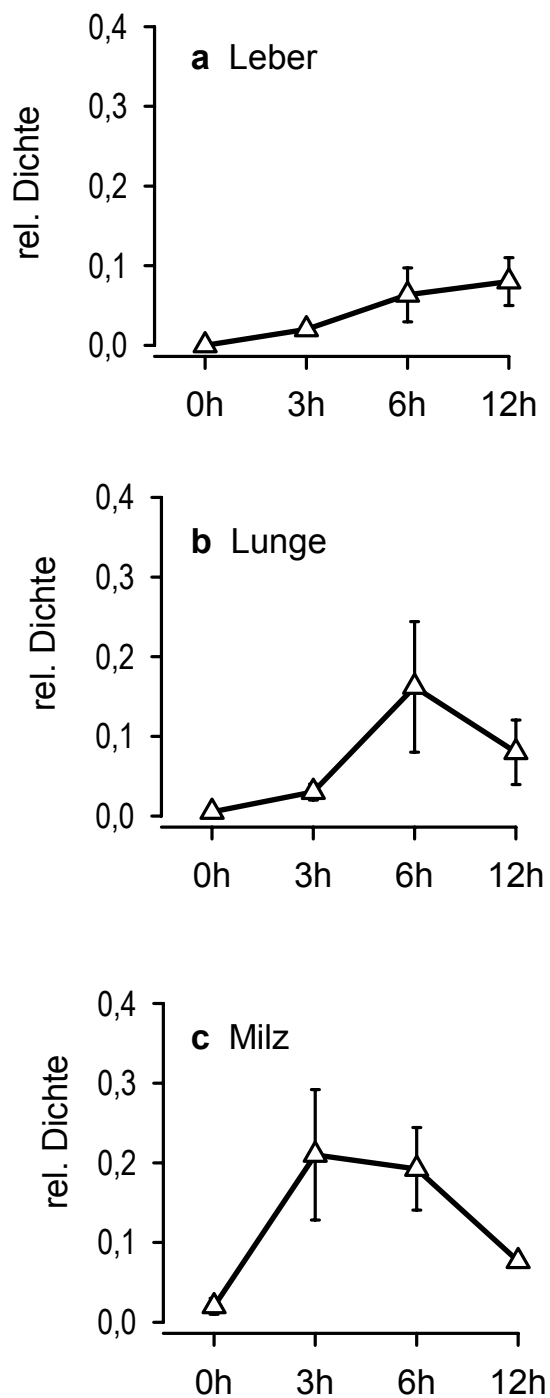


Abb. 3:

Expressionsanalyse von IL-10 mRNA in den Organen (a) Leber, (b) Lunge und (c) Milz während der Sepsis im CASP Modell. Die höchste Konzentration an IL-10 mRNA wurde in der Leber 12h nach CASP, in der Lunge nach 6h und in der Milz nach 3h mittels Ribonuklease Protection Assay gemessen.

3.1.2 Analyse der Regulation von IL-10 Protein während der Sepsis

Analog zur mRNA Expressionsanalyse wurden die IL-10 Protein Spiegel 0h, 3h, 6h oder 12h nach der CASP Operation gemessen. Die Organe wurden jeweils zu den genannten Zeitpunkten entnommen, homogenisiert und zentrifugiert (siehe 2.7.5). Der so gewonnene Überstand bzw. das Serum wurden mittels ELISA auf seinen Gehalt an IL-10 untersucht (siehe Abb. 4). In allen Organen wurde die maximale IL-10 Konzentration erst nach 12h postoperativ erreicht, also ca. 6h nach dem Konzentrationsgipfel an IL-10 mRNA in der Lunge, 9h nach dem IL-10 mRNA Maximum in der Milz und zeitgleich mit dem Maximalwert an mRNA in der Leber. Die höchste Konzentration an IL-10 im Serum wurde ebenfalls nach 12h gemessen. Die zeitlich versetzten Konzentrationsmaxima zwischen mRNA und Protein in den Organen lassen sich durch die Dauer der Proteinbiosynthese erklären.

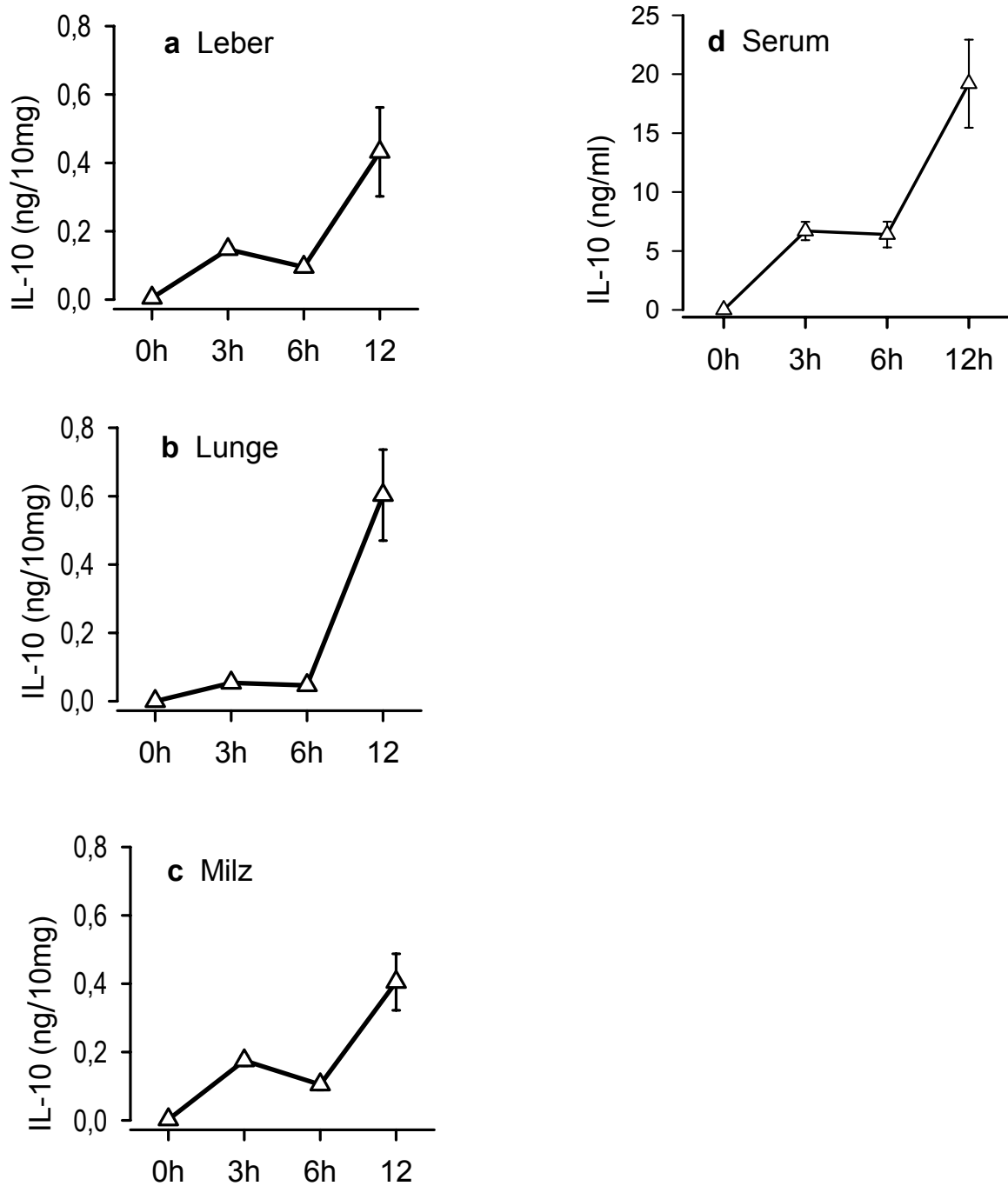


Abb. 4:

Analyse der IL-10 Regulation in der Leber (a), in der Lunge (b), in der Milz (c) und im Serum (d) während der Sepsis im CASP Modell mittels ELISA. In allen Organen wurde die maximale IL-10 Konzentration nach 12h gemessen, also zeitlich verzögert zu den Konzentrationsgipfeln an IL-10 mRNA.

3.2 Klonierungen

3.2.1 Herstellung des IL-10-Fc Fusionsproteins

Da T-Zellen und Makrophagen nach Stimulation IL-10 produzieren können, wurden zur Gewinnung von IL-10 mRNA im Vorversuch verschiedene Zelllinien untersucht. T-Zelllinien (TK1, KKT2, BW 5147) wurden mit je 40 ng/ml IL-12 oder 20 µg/ml anti-CD3 stimuliert und Makrophagenzelllinien (J 774A.1, ANA-1, RAW 264.7) mit 50 ng/ml LPS Zellen stimuliert und 20h inkubiert (siehe 2.7.3). Mittels ELISA wurden IL-10 Konzentrationen in den Zellüberständen bestimmt. Ausschließlich in den Überständen der LPS stimulierten RAW Zellen konnte eine signifikante IL-10 Produktion nachgewiesen werden (Abb. 5).

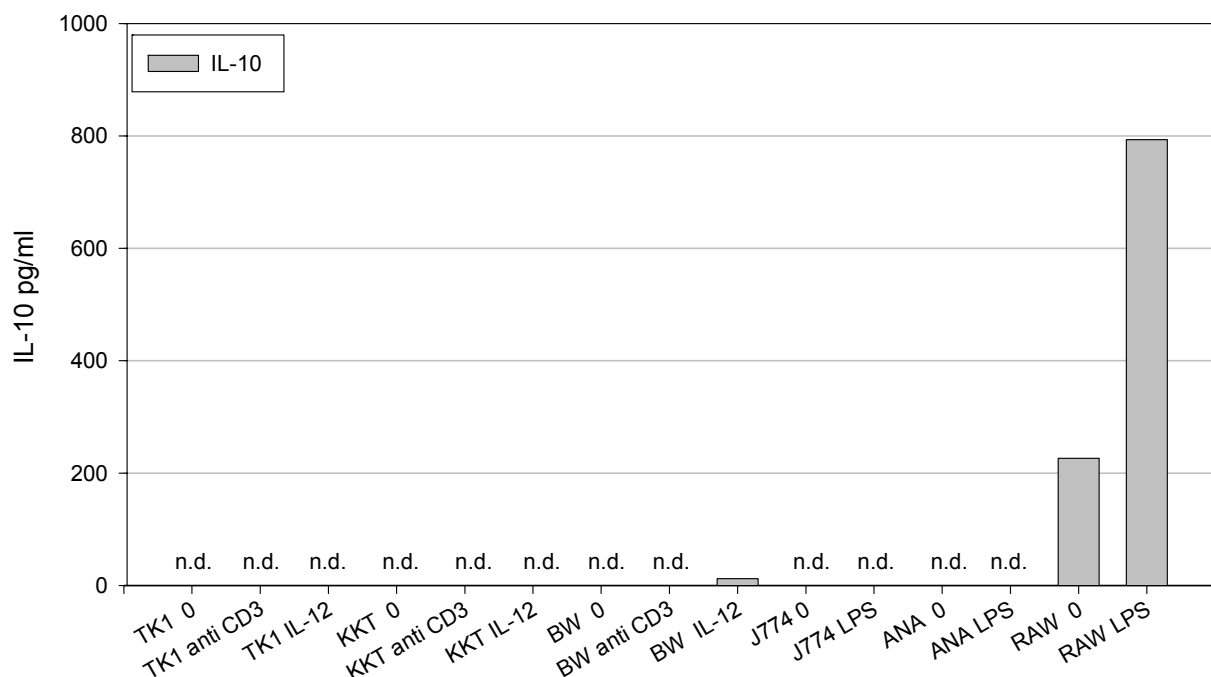


Abb. 5:

Stimulation von T-Zelllinien (TK1, KKT2, BW 5147) mit je 40 ng/ml IL-12 oder 20 µg/ml anti-CD3 und von Makrophagenzelllinien (J 774A.1, ANA-1, RAW 264.7) mit je 50 µg/ml LPS. Nach 20 h Inkubation wurde die IL-10 Konzentration in den Zellüberständen mittels IL-10 ELISA bestimmt. Nur die RAW Makrophagen zeigten eine signifikante IL-10 Produktion.

Um den Zeitpunkt der maximalen mRNA-Induktion zu bestimmen, wurde eine Kinetik der LPS Stimulation von RAW Makrophagen angefertigt. Abb. 6 zeigt, daß bereits nach 4h ausreichend IL-10 mRNA produziert wurde.

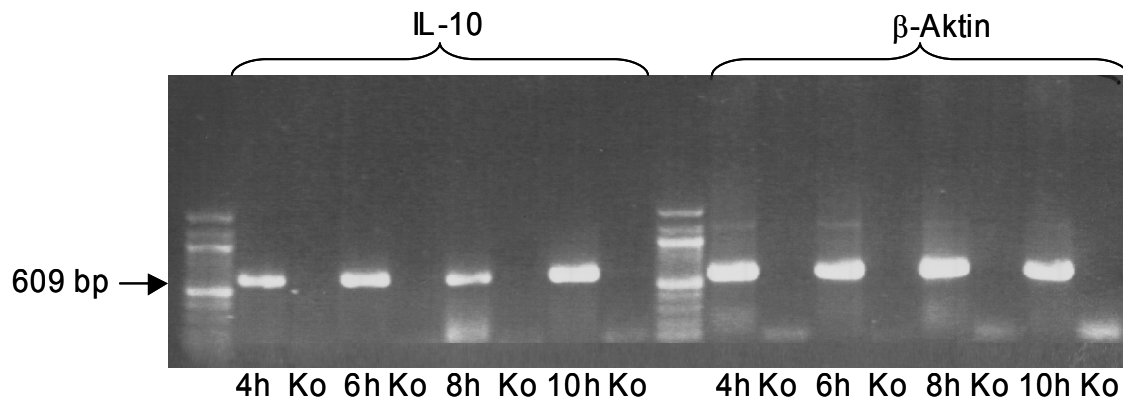


Abb. 6:

RT-PCR zum Nachweis von IL-10. β -Aktin wurde als Kontrolle parallel amplifiziert. RAW Makrophagen waren für 4h, 6h, 8h und 10h mit je 50 μ g/ml LPS stimuliert worden. Nach Präparation von RNS aus den stimulierten Zellen wurde cDNS synthetisiert und für die PCR eingesetzt. Als Kontrolle wurden Proben ohne DNS verwendet. Bereits nach 4h zeigte sich eine ausreichende IL-10 Expression (609 bp).

Aus diesem Grund wurden Makrophagen nach 4h Stimulation verwendet, um mit dem „Rneasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) RNS zu isolieren und diese anschließend mittels reverser Transkriptase in cDNS umzuschreiben.

Mit den Primern IL-10-Fc fwd und IL-10-Fc rev wurde in einer RT-PCR eine cDNS mit den Erkennungssequenzen für NotI am 5`Ende und für BamHI und XbaI am 3`Ende generiert (siehe Abb. 7). Das PCR-Produkt wurde zunächst in den Klonierungsvektor pCR2.1 subkloniert. Dieses Vektorsystem macht sich die Eigenschaft der Taq-

Polymerase zunutze, matrizenunabhängig ein Desoxyadenosin (A) an das 3`Ende des PCR-Produkts anzuhängen. Da der linearisierte pCR2.1 Vektor ein überhängendes 3`Desoxythymidin aufweist, können PCR-Produkt und Vektor mittels Topoisomerase I ligieren.

Über die Schnittstellen für NotI und XbaI wurde IL-10 dann in den pEF-SEM Vektor subkloniert. Der IgG2aFc Teil, der von X. X. Zheng, Harvard Medical School, zur Verfügung gestellt wurde, wurde aus dem pCR2.1 Vektor mit BamHI und XbaI ausgeschnitten und in den pEF-IL-10 Vektor an IL-10 angefügt. Der resultierende Vektor wurde als pEF-IL-10-Fc bezeichnet.

pEF-IL-10-Fc

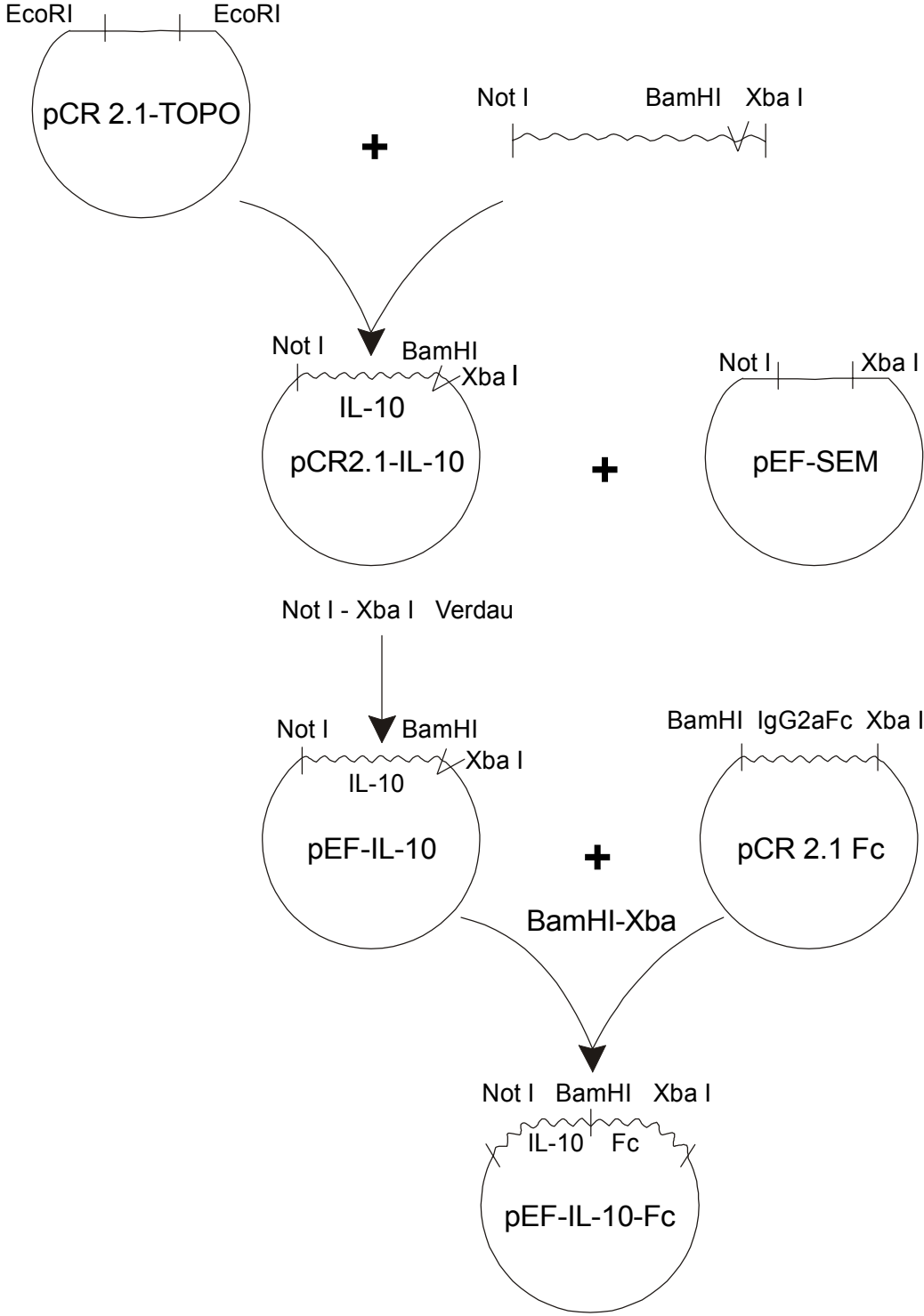


Abb. 7:
Klonierungsstrategie von IL-10-Fc

3.2.2 Herstellung von IL-10- Fc ohne proinflammatorische Komponente (IL-10-M-Fc)

IL-10 hat einerseits eine proinflammatorische Wirkung (z.B. T-Zell Proliferation) und andererseits eine antiinflammatorische Wirkung (z.B. Suppression der TNF α Sekretion).

Die Arbeitsgruppe um Ding et al. hat beschrieben, daß der Austausch einer einzigen Aminosäure zum Verlust der proinflammatorischen Funktion von IL-10 führt (Ding et al., 2000). Die Generierung dieser Mutante erlaubt es, die beiden Wirkungseigenschaften getrennt von einander zu untersuchen. Dazu wurde die Aminosäure Isoleuzin in Position 87 durch Alanin ausgetauscht und so ein IL-10-Derivat ohne proinflammatorische Komponente erstellt. Die Einführung dieser Mutation in den pEF-IL-10-Fc Vektor wird im Folgenden beschrieben (siehe Abb. 8).

Die Klonierungsstrategie macht sich eine interne EcoRI Schnittstelle zunutze, die 14 bp 3' der einzuführenden Mutation in der IL-10 Sequenz liegt. Als 3' Klonierungsprimer wurde der Primer IL-10-M-EcoRI rev generiert, der den Basenaustausch ATC \rightarrow GCC und die EcoRI Schnittstelle als Klonierungsschnittstelle enthielt. Für die PCR wurde außerdem IL-10-Fc fwd als 5' Primer und pEF-IL-10-Fc als Template verwendet. Das resultierende PCR-Produkt, das die Aminosäure Alanin anstelle von Isoleuzin enthielt, wurde zunächst in den pCR2.1-TOPO Vektor eingesetzt. Zur Subklonierung wurde sowohl der pCR-IL-10-M-Fc als auch der pEF-IL-10-Fc Vektor mit EcoRI verdaut. Durch Ligation konnte daraufhin das Wildtyp IL-10 durch IL-10-M ersetzt werden. Das PCR-Produkt konnte sich prinzipiell durch den Verdau mit nur einem Enzym in zwei verschiedenen Orientierungen in den pEF-IL-10-Fc Vektor einfügen. Um Klone auswählen zu können, die das Fragment in der gewünschten Orientierung aufwiesen, wurde Mini Prep DNS mit NotI und XbaI verdaut. In der darauf folgenden Elektrophorese zeigten sich Klone, aus denen ein langes Fragment (1.300 bp) ausgeschnitten worden war (richtige Orientierung) und Klone, aus denen ein deutlich kleineres Fragment (ca. 900 bp) entstand (falsche Orientierung). Auf diese Weise war es möglich, Klone zu selektionieren, die pEF-IL-10-M-Fc in gewünschter Sequenz enthielten. Die Auswahl wurde anschließend durch Bestimmung der Nukleotidsequenz verifiziert.

pEF-IL-10-M-Fc

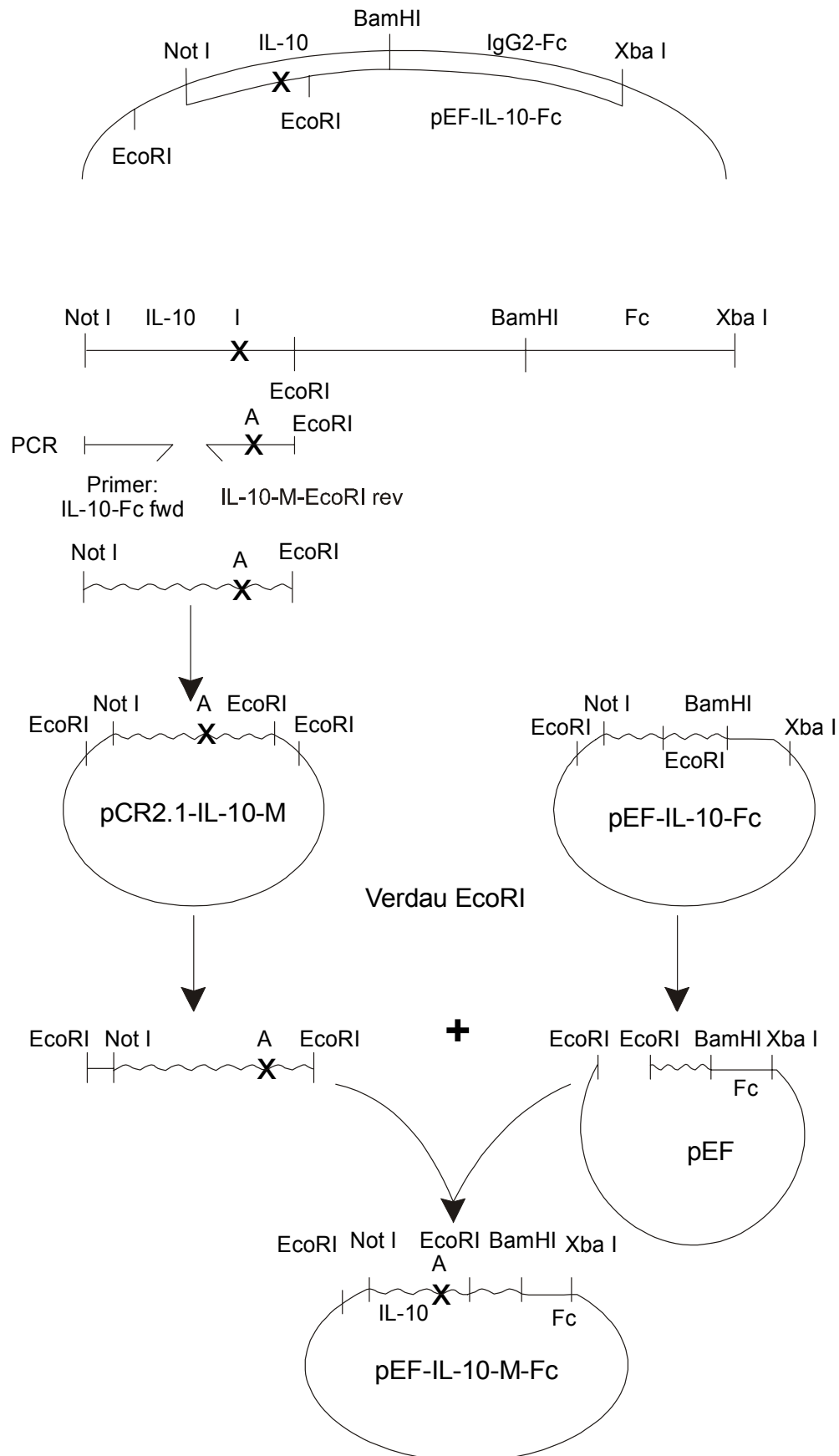
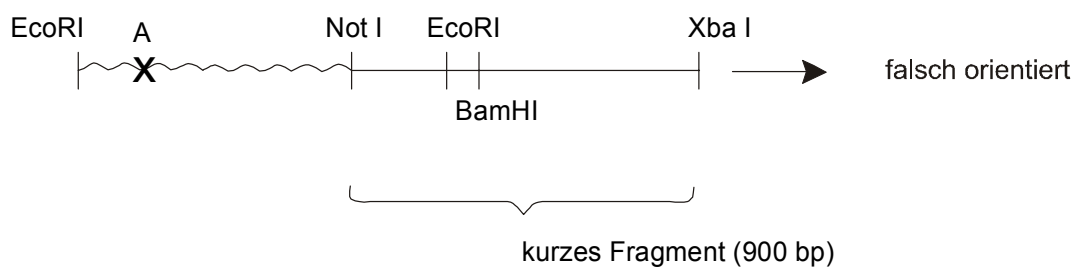
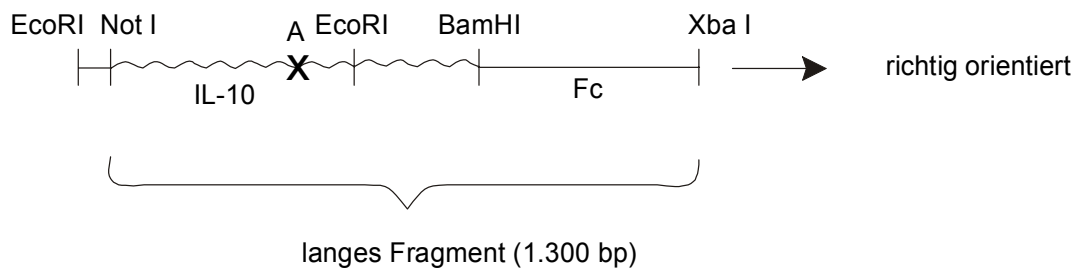


Abb. 8:

Richtige Orientierung des subklonierten Fragments? Verdau mit Not I-Xba I:



Klonierungsstrategie von IL-10-M-Fc

3.2.3 Herstellung von IL-22-Fc

IL-22 gehört zur IL-10-Familie und hat vermutlich proinflammatorische Wirkung (Dumoutier et al., 2000). Es wird von IL-9 stimulierten Th2-Zellen produziert und induziert selbst die Sekretion von Akutphaseproteinen. IL-22 bindet an CRF2-4, ein Mitglied der Klasse II Zytokin Rezeptorfamilie. CRF2-4 dient auch als eine Komponente des IL-10 Rezeptor-Komplexes (Xie et al., 2000). Auf Grund der strukturellen Homologie und der gemeinsamen Rezeptorkette war es interessant, IL-22 in die Untersuchung der Wirkung von IL-10 einzubeziehen und zu diesem Zweck auch ein IL-22-Fc Fusionsprotein zu erstellen.

IL-22-Fc wurde analog dem Prinzip von IL-10-Fc kloniert. Das PCR-Produkt wurde zunächst in den pCR2.1-TOPO Vektor eingefügt (siehe Abb. 9). Über die durch die Primer IL-22-Fc fwd und IL-22-Fc rev eingeführten Schnittstellen NotI und BamHI wurde IL-22 in den pEF-IL-10-Fc Vektor subkloniert, aus dem zuvor über die selben Schnittstellen IL-10 entfernt worden war. Es resultierte der pEF-IL-22-Fc Vektor.

pEF-IL-22-Fc

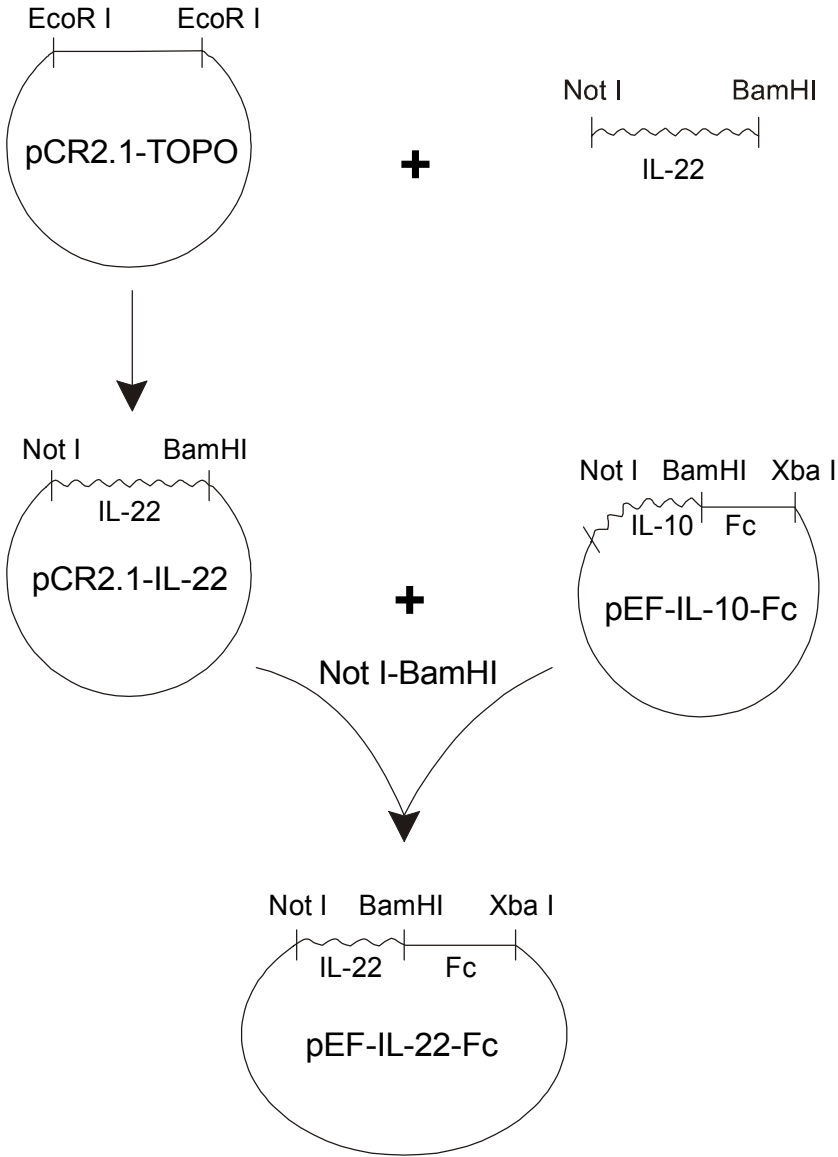


Abb. 9:
Klonierungsstrategie von IL-22-Fc

3.2.4 Herstellung von SP-Fc (Kontrolle)

Um eine geeignete Kontrolle für die Fusionsproteine mit einer vergleichbaren Expression zu haben, wurde pEF-SP-Fc konstruiert (siehe Abb. 10). Signalpeptide dienen dazu Proteine aus Zellen auszuschleusen. Mittels Domänenanalyse (SMART, EMBL, Heidelberg) konnte die Sequenz des Signalpeptids von IL-10 bestimmt werden.

Ausgehend von pEF-IL-10-Fc als Template wurde mit dem IL-10-Fc fwd Primer und einem SP-Fc rev Primer durch PCR das Signalpeptid amplifiziert und in den pCR2.1-TOPO Vektor eingesetzt. Anschließend wurde der pEF-IL-10-Fc Vektor mit NotI und BamHI verdaut und das IL-10 Fragment durch das bloße Signalpeptid aus dem pCR-SP Vektor ersetzt. Der resultierende Kontrollvektor wurde als pEF-SP-Fc bezeichnet.

pEF-SP-Fc

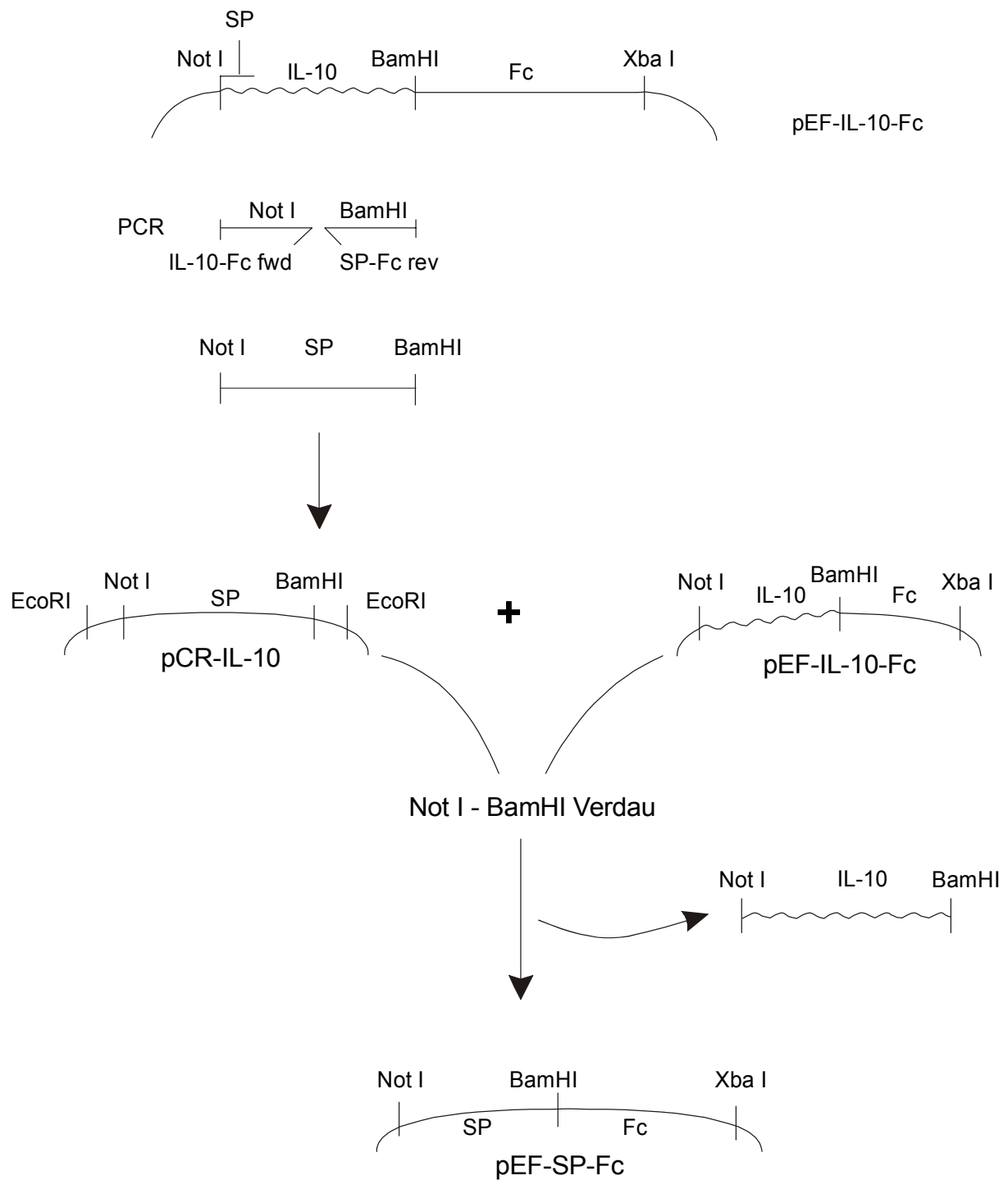
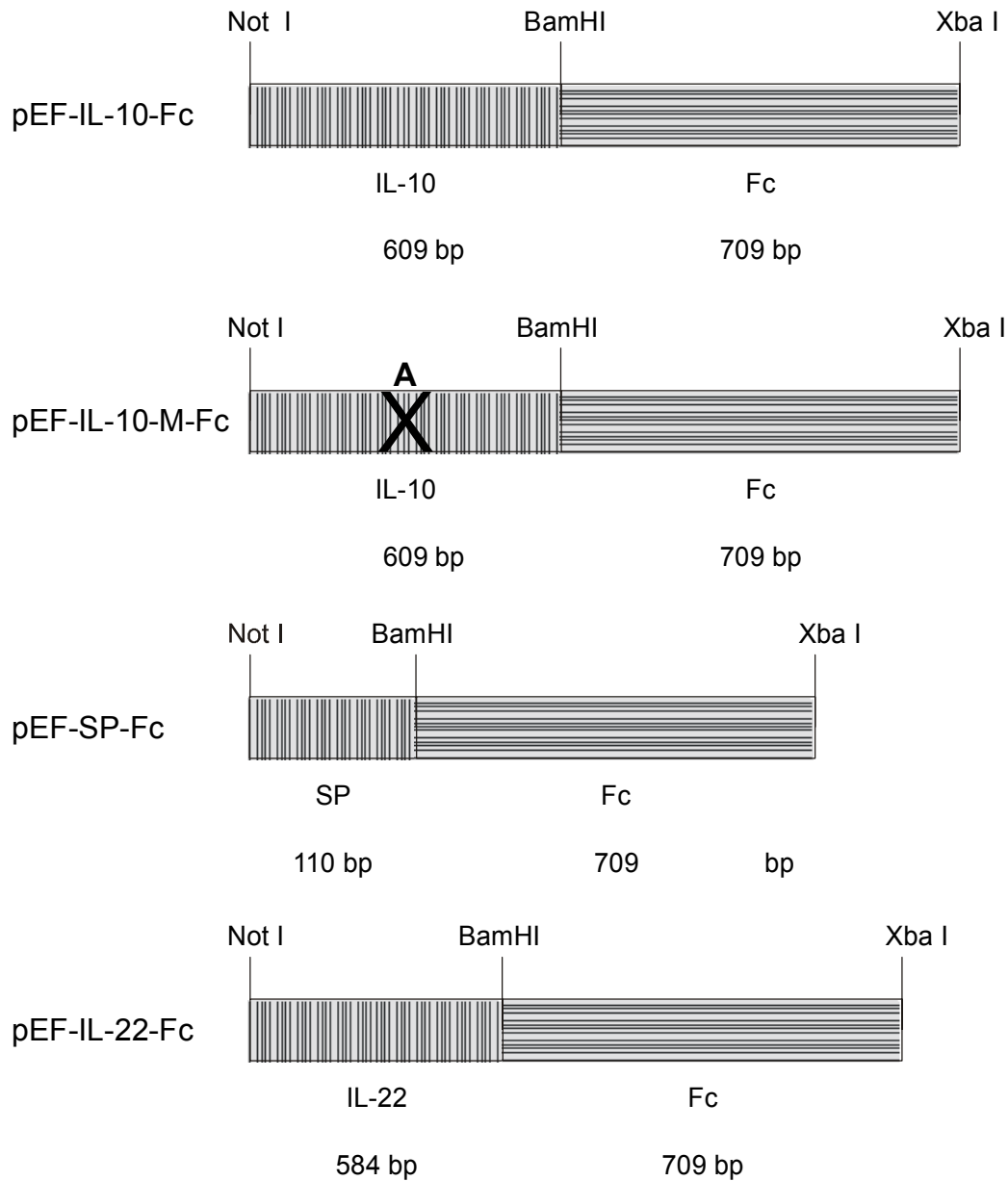


Abb. 10:
Klonierungsstrategie von SP-Fc

Übersicht über die in der Arbeit erstellten Konstrukte



Legende

A = Alanin
 I = Isoleuzin
 X = Mutation

Abb. 11: Übersicht über alle erstellten Konstrukte

Die Sequenzen wurde jeweils durch DNS-Sequenzanalyse (2.5.12) verifiziert.

3.3 Expressionsanalyse

3.3.1 Transiente Transfektion von 293T Zellen und Überprüfung der Transfektionsraten mit Durchflußzytometrie

Die erstellten Vektoren pEF-IL-10-Fc, pEF-IL-10-M-Fc, pEF-SP-Fc und pEF-IL-22-Fc wurden durch Transformation in E.coli Bakterien wie in 2.5.6 beschrieben vervielfältigt und die Konzentration der gereinigten DNS photometrisch bestimmt. Zur Expression wurden 293T Zellen transient mit den Vektoren mit der Calcium-Phosphat Methode transfiziert (siehe 2.7.2) und die Überstände der Zellen nach 3 Tagen gesammelt. Um die Transfektionsraten zu überprüfen wurde jeweils eine Kontrolltransfektion mit pEGFP-N-1 (grün fluoreszierendes Protein) durchgeführt und die Zellen 48 h später im Durchflußzytometer analysiert (siehe 2.7.3). Durch den Anteil der grün fluoreszierenden Zellen der Kontrolltransfektion konnte auf die Transfektionsrate der Konstrukte geschlossen werden. Durchschnittlich wurden Transfektionsraten von über 90% erreicht.

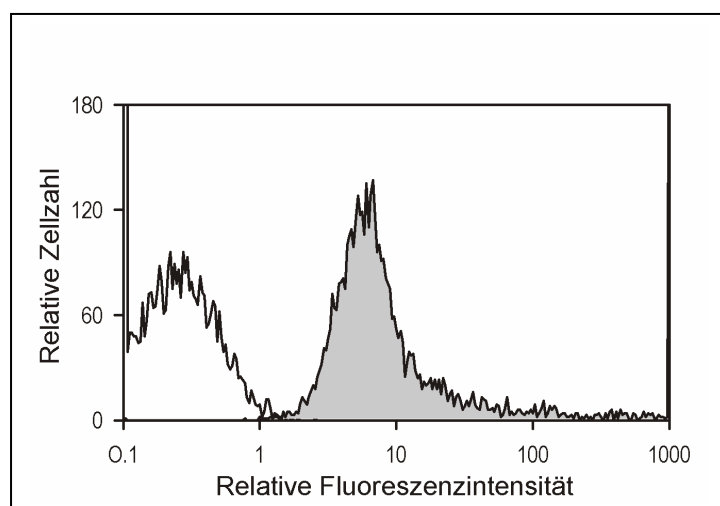


Abb. 12:

Durchflußzytometrische Analyse pEF-SEM transfizierter 293T Zellen (weiß) und GFP transfizierter Zellen (grau). Die GFP-Transfektionsrate liegt bei über 90%.

3.3.2 Nachweis der Expression von IL-10 und IL-10-M mittels ELISA

Um den Erfolg der Transfektionen zu prüfen, wurden Zellkulturüberstände, die IL-10-Fc, IL-10-M-Fc oder IL-22-Fc, SP-Fc und pEF-SEM als Kontrollen enthielten, mit einem ELISA für rm-IL-10 vermessen (siehe 2.7.4).

Abb. 13 zeigt, daß im Gegensatz zu den Überständen der mit pEF-SEM, SP-Fc oder IL-22 transfizierten Zellen in den Überständen von IL-10-Fc und IL-10-M-Fc, IL-10 Konzentrationen von bis zu 2.000 pg/ml nachgewiesen werden konnten.

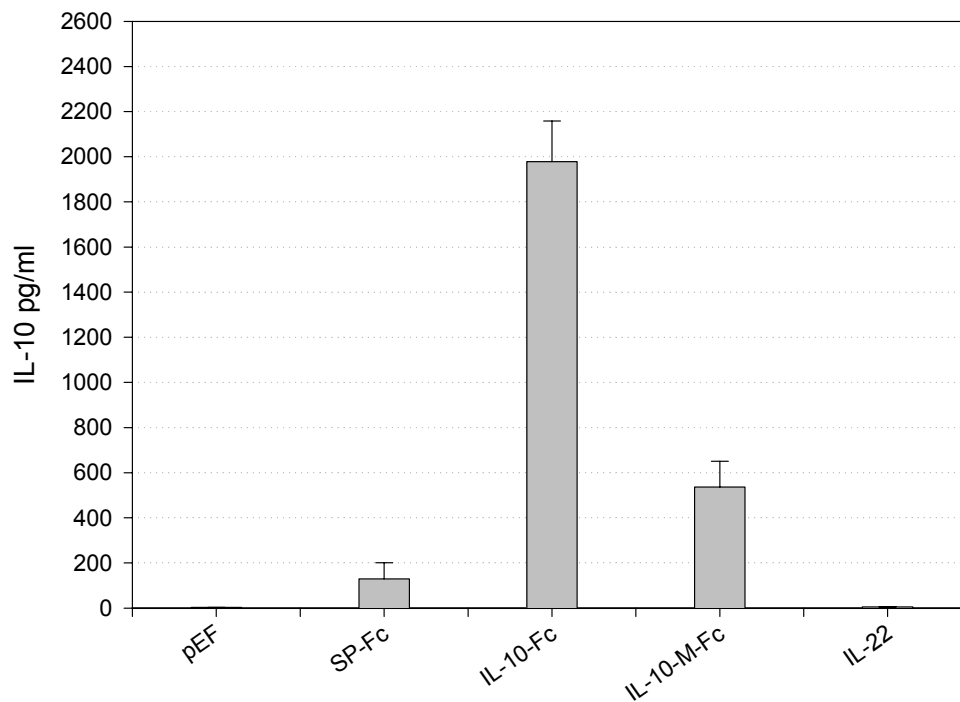


Abb. 13:

Analyse der Transfektionsüberstände von pEF, SP-Fc, IL-10-Fc, IL-10-M-Fc und IL-22-Fc mittels IL-10-ELISA. In den Überständen von IL-10-Fc und IL-10-M-Fc konnte IL-10 eindeutig detektiert werden.

3.3.3 Nachweis der Expression der Fusionsproteine im Western Blot

Der Nachweis aller vier Fusionsproteine konnte im Western Blot erbracht werden.

Der Fc-Teil der Konstrukte ermöglichte es, diese mit einem monoklonalen, Peroxidase gekoppeltem Antikörper nachzuweisen, der spezifisch für das Fc γ -Fragment muriner IgG ist.

Dazu wurden zunächst Zellüberstände zuvor transfizierter Zellen gesammelt und mit Protein A Sepharose präzipitiert (siehe 2.8.1). Das gebundene Protein wurde dann in einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert (siehe 2.9.3). Zur Detektion der Fusionsproteine wurde die Nitrozellulose nach Inkubation mit einem monoklonalen, Peroxidase gekoppelten Fc-spezifischen Antikörper mit dem Substrat Luminol (ECL-Kit) versetzt. Die durch Umsetzung des Substrats entstehende Chemilumineszenz konnte auf einem Röntgenfilm detektiert werden.

Auch auf diese Weise konnte die Expression der Fusionsproteine IL-10-Fc, IL-10-M-Fc, IL-22-Fc (jeweils ca. 50 kDa) und SP-Fc (ca. 30 kDa) erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 14).

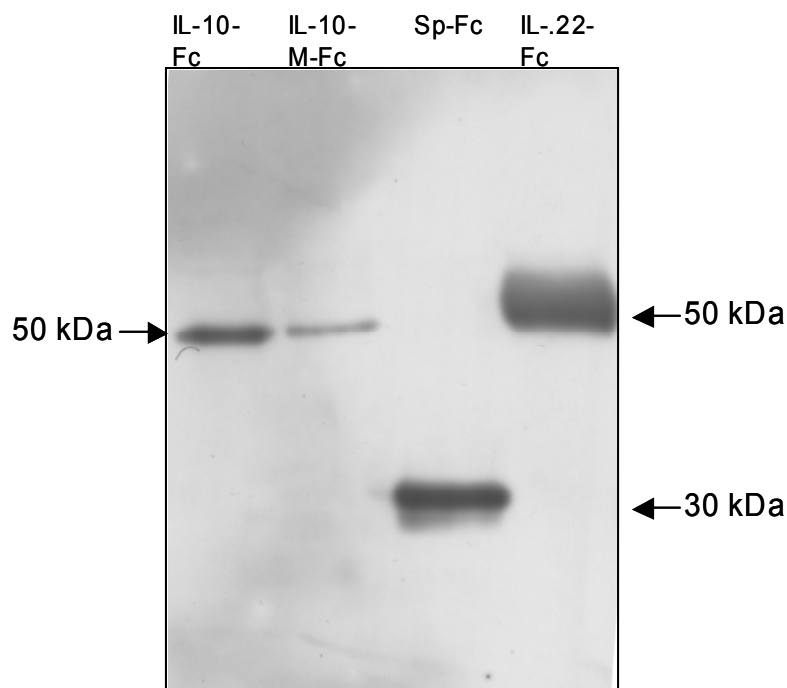


Abb. 14:

Western Blot Analyse zur Detektion der Fusionsproteine aus Überständen transfizierter Zellen

Die in Abb. 14 erkennbar starke Expression von SP-Fc ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß Fusionsproteine umso stärker exprimiert werden, je kürzer die Sequenz ist, die an den Fc-Teil angehängt wird. Mit 110 bp ist das Signalpeptid deutlich kürzer als IL-10 oder IL-22. IL-22-Fc wird wiederum stärker exprimiert als IL-10-Fc, was eventuell durch die unterschiedlichen Signalpeptide begründet sein könnte. Vergleicht man IL-10-Fc und IL-10-M-Fc, so zeigen sich bei IL-10-M-Fc regelmäßig schwächere Banden als bei IL-10-Fc. Der Grund dafür ist nur schwer ersichtlich, da sich die beiden Konstrukte nur durch eine Aminosäure unterscheiden. Sowohl IL-10-Fc als auch IL-10-M-Fc haben den selben Vektorhintergrund und benutzen das selbe Signalpeptid. Sequenzanalysen haben mehrfach die Richtigkeit der Sequenzen bestätigt und beide Konstrukte konnten im rIL-10 ELISA und mittels eines Fc-spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen werden.

3.4 Aufreinigung der Fusionsproteine

Die Fusionsproteine wurden in die Zellkulturüberstände der transfizierten Zellen sezerniert. Die Expression von IL-10-Fc, IL-10-M-Fc, IL-22-Fc und SP-Fc konnte sowohl im Western Blot als auch mit ELISA nachgewiesen werden. Mit diesen Überständen wurden einige Experimente an ex vivo isolierten Zellen (siehe 3.5.1) erfolgreich durchgeführt. Um aber die Wirkung der Konstrukte unbeeinflusst durch Verunreinigungen aus den Zellüberständen beurteilen zu können, mußten die Fusionsproteine aus den Überständen aufgereinigt werden. Für die geplanten Experimente an Mäusen war es zudem nötig, die Proteine in größeren Mengen zu gewinnen, denn Vorarbeiten hatten gezeigt, daß 2 µg Fusionsprotein pro Maus eingesetzt werden müssen (Emmanuilidis et al., 2001).

3.4.1 Präzipitation mit Protein A Sepharose

Der Fc-Teil der Fusionsproteine ermöglichte die Präzipitation des Proteins aus den Zellüberständen durch Bindung an Protein A Sepharose (siehe 2.8.1).

Es wurden jeweils 1×10^6 Zellen pro 10 cm Schale ausplattiert und am Tag darauf transfiziert (siehe 2.7.3). Nach einem Mediumwechsel ca. 16h nach Transfektion wurden die Zellüberstände nach weiteren 72h abgenommen und gesammelt. Das verwendete Medium enthielt IgG depletiertes Serum um die Präzipitation von Serum-Antikörpern und die dadurch entstehende Verunreinigung zu vermeiden. Jeweils 40 ml Medium wurden mit 250 µl Protein A Sepharose versetzt und bei 4°C über Nacht auf einem Drehrad inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Sepharose Pellet 3x mit 150 mM NaCl gewaschen und dann zur Aufreinigung eingesetzt.

3.4.2 Aufreinigung

Die Reinigung der Proteine erfolgte wie unter 2.8.2 beschrieben durch Lösung des Proteins aus der Bindung an Protein A Sepharose mittels Absenken des pH-Werts durch Citrat-Puffer (pH 3). Um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern, wurde

der pH der Eluate sofort mit Tris-HCl (1M, pH 10) wieder angehoben. Zu Beginn wurde die genaue Einstellung des pH in jedem Schritt durch pH-Indikatorstäbchen (Macherey-Nagel, Düren) überprüft. Nach einigen erfolgreichen Durchläufen und Optimierung der Pufferbedingungen wurde darauf verzichtet.

3.4.3 Konzentration

Um die Fusionsproteine für Tierexperimenten einsetzbar zu machen, war es nötig, diese nach der Aufreinigung umzupuffern und zu konzentrieren. Dazu wurde ein Zentrifugenfilter (Microcon) wie unter 2.8.3 beschrieben verwendet.

3.4.4 Überprüfung der Aufreinigung im Western Blot

Um sicher zu stellen, daß durch die Elution das Protein aus der Protein A Sepharose Bindung gelöst werden konnte ohne zu degradieren, wurde von den einzelnen Schritten der Aufreinigung jeweils Proben entnommen und im Western Blot analysiert. Abb. 15 a-d zeigt, daß das Ausgangspellet der Proben (Sepharose Pellet im ersten Waschpuffer) das meiste Protein enthielt. In den Eluaten verringerte sich die Proteinmenge von Eluat 1 bis 3 kontinuierlich und im Rest-Pellet (Pellet nach Elution) wurde am wenigsten Protein bzw. idealer Weise gar nichts mehr nachgewiesen. Auf diese Weise konnte der Erfolg der Aufreinigung überprüft werden und auch ausgeschlossen werden, daß das Protein durch den Vorgang degradiert wurde, da weder in den Eluaten noch im Rest-Pellet Banden anderer Größe als der der intakten Proteine nachgewiesen werden konnten.

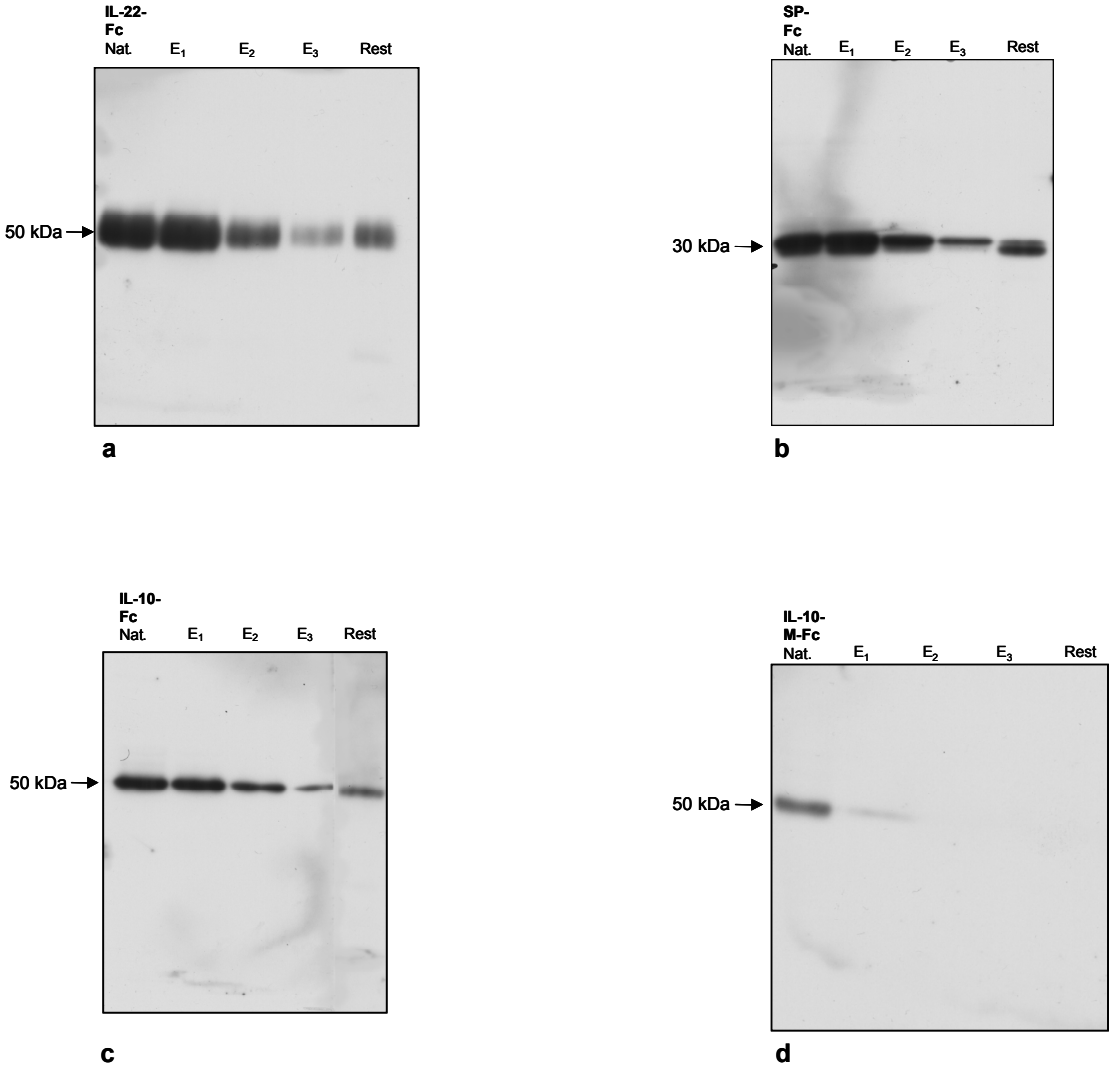


Abb. 15:
Western Blot Analyse der Aufreinigung der Fusionsproteine IL-22-Fc (a), SP-Fc (b),
IL-10-Fc (c), IL-10-M-Fc (d);
Nat. = Nativ Pellet (Sephrose im 1. Waschpuffer); E₁ - E₃ = Eluate ; Rest = Rest Pellet

3.4.5 Proteinkonzentrationsbestimmung im Coomassie Gel

Zur Bestimmung der Konzentration der aufgereinigten Fusionsproteine, wurden die Proben zusammen mit Proben von BSA (Bovines Serum Albumin) in bekannten Konzentrationen in einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Blau gefärbt.

Die Nachweisgrenze für Protein im Coomassie Gel liegt ungefähr bei 1 µg.

Je 40 ml Transfektionsüberstand der Konstrukte ergaben nach Aufreinigung und Konzentration z.B. 240 µl SP-Fc, 120 µl IL-10-Fc, 150 µl IL-10-M-Fc und 300 µl IL-22-Fc. Bei Einsatz von je 30 µl dieser Konzentrate für eine SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit anschließender Coomassie Färbung entstand das in Abb. 16 gezeigte Gel. Durch Vergleich der Bandenstärke der BSA Proben bekannter Konzentration mit den Konstrukten ergaben sich etwa 5 µg SP-Fc, 1 µg IL-10-Fc, kein Nachweis für IL-10-M-Fc und ca. 5 µg IL-22-Fc. Rechnerisch ergeben sich so aus jeweils 40 ml Transfektionsüberstand 40 µg SP-Fc, 20 µg IL-10-Fc und 50 µg IL-22-Fc. Die Konzentration von IL-10-M-Fc lag bei Einsatz von 30 µl unter der Nachweisgrenze der Coomassie Färbung, daß heißt unter 1 µg. Obwohl im Medium der Zellen nur FKS enthalten war, das zuvor 2fach IgG depletiert worden war, zeigten sich im in der Coomassie Färbung noch Verunreinigungen durch Antikörper aus dem Fetalen Kälberserum.

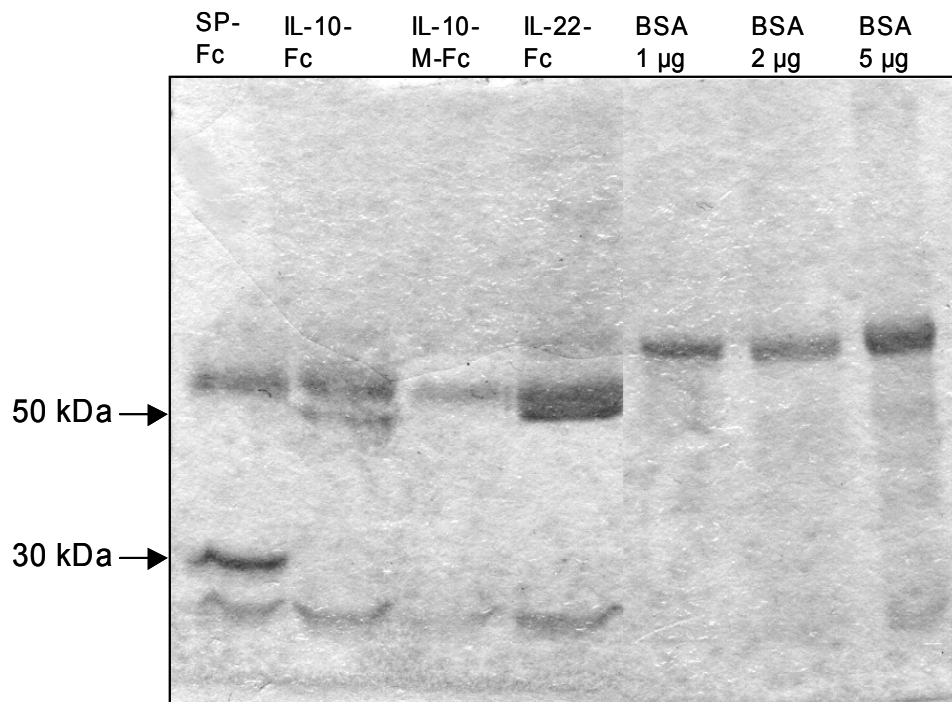


Abb. 16:

Coomassie Blue Färbung einer PAGE zur Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Fusionsproteine anhand von BSA-Vergleichsproben bekannter Konzentration. Aus 40 ml Transfektionsüberstand ergeben sich etwa 40 µg SP-Fc, 20 µg IL-10-Fc und 50 µg IL-22-Fc. Die Konzentration des aus 40 ml aufgereinigten IL-10-M-Fc lag unter der Nachweisgrenze der Coomassie Färbung. Trotz der ausschließlichen Verwendung von 2fach IgG depletierem FKS im Zellkulturmedium zeigten sich in der Coomassie Blau Färbung noch Verunreinigungen durch Antikörper, die sich als Banden größer 50 kDa und kleiner als 30 kDa darstellen.

3.5 Testung der Fusionsproteine an ex vivo Zellen

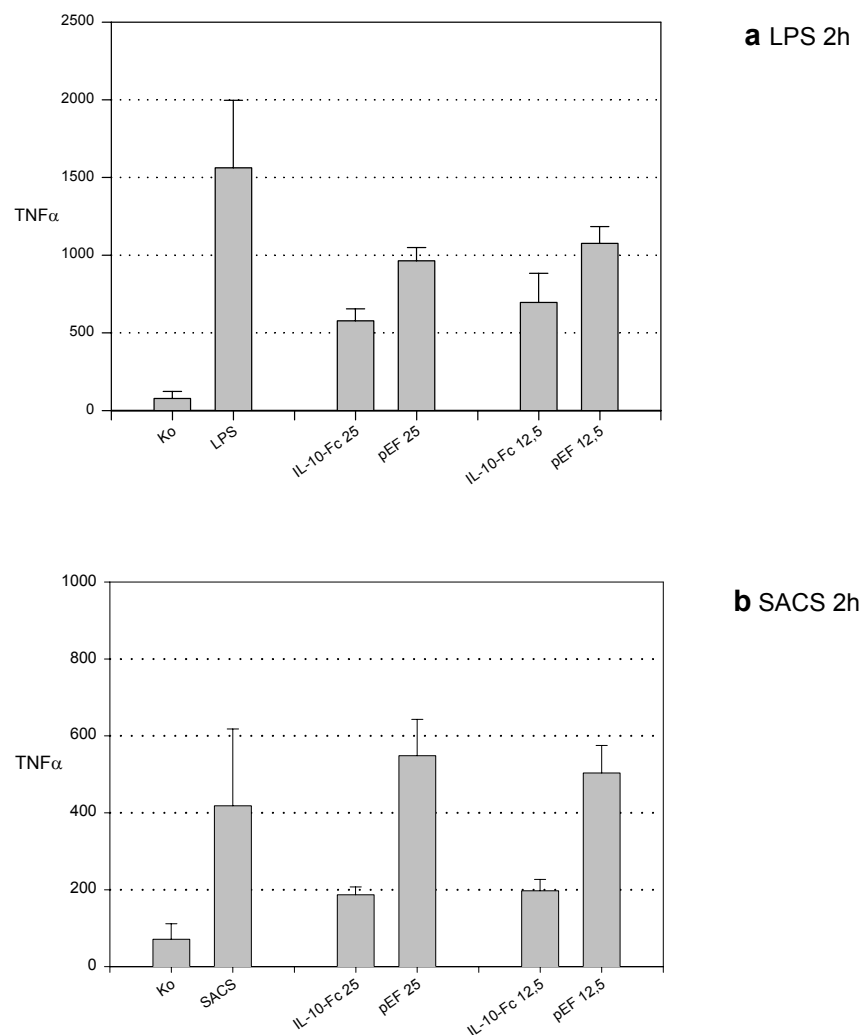
3.5.1 TNF α Suppression durch Transfektionsüberstände

Die Arbeitsgruppe von X. X. Zheng hat beschrieben, daß die Behandlung von Mäusen mit nicht-lysierendem IL-10-Fc Fusionsprotein die Expression proinflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF α in Pankreas-Inselzellen inhibiert (Zheng et al., 1997). Um das selbst klonierte IL-10-Fc zu testen, wurde die Suppression der TNF α Produktion durch das Fusionsprotein von ex vivo isolierten Makrophagen bestimmt, die zuvor mit TLR-Liganden stimuliert worden waren. Da durch die Einführung der Mutation in IL-10-M-Fc nur die proinflammatorische Komponente von IL-10, nicht aber die antiinflammatorische Wirkung verloren gegangen sein sollte, wurde von IL-10-M-Fc die gleiche TNF α Suppression erwartet, wie von IL-10-Fc. Das Kontrollprotein SP-Fc, sowie das Protein des pEF-SEM Vektors sollten dagegen die TNF α Expression nicht inhibieren.

Zu diesem Zweck wurden Makrophagen aus der Bauchhöhle von Mäusen gewonnen, denen 4 bis 5 Tage zuvor 800 μ l Thioglykolat (Thio-broth, Difco) i.p. injiziert worden war. Nach Aufbereitung der Zellen (siehe 2.6) wurden jeweils 2×10^5 Zellen (in 100 μ l) für eine Einheit einer Flachboden 96-Loch-Platte (Nunclon) eingesetzt und verschiedene Mengen von Überständen transfizierter Zellen, die die Fusionsproteine enthielten zugegeben. Um 25% Fusionsprotein einzusetzen wurden zu den 100 μ l Zellsuspension 50 μ l Transfektionsüberstand zugegeben und für 12,5% Fusionsprotein 25 μ l Überstand und 75 μ l RPMI Medium. Als Kontrolle wurde zu der Zellsuspension 100 μ l Medium zugegeben und als positiv Kontrolle für die maximal ungehemmte TNF α Expression, 50ng/ml des TLR-Liganden.

Die Zellen wurden 2h bzw. 16 h mit den Transfektionsüberständen bei 37°C vorinkubiert und dann mit 50 ng/ml der verschiedenen TLR-Liganden stimuliert um die TNF α Expression anzuregen. 20 h nach der Stimulation mit den TLR-Liganden wurden die Zellüberstände abgenommen und mit ELISA die TNF α Konzentrationen gemessen (Xie et al., 2000).

In Abb. 17 ist die Stimulation von Makrophagen mit den zwei TLR-Liganden LPS (Lipopolysaccharid), SACS (heat killed staph.aureus cell surface) nach 2h Vorinkubation mit 25% oder 12,5% Überständen von mit IL-10-Fc oder pEF-SEM transfizierten Zellen gezeigt. Man sieht, daß sich die TNF α Synthese durch beide TLR-Liganden verglichen mit der Kontrolle stark anregen ließ. Durch Vorinkubation mit IL-10-Fc ließ sich die TNF α Expression deutlich supprimieren und zeigte einen erneuten Anstieg bei verminderter Konzentration von IL-10-Fc. Die Vorinkubation der Makrophagen mit pEF-SEM Transfektionsüberständen in gleichen Konzentrationen bewirkte dagegen eine viel schwächere Inhibition der TNF α Expression nach Stimulation mit LPS oder SACS. Die TNF α Menge entsprach aber nicht der der Positivkontrollen, denen nur Medium und TLR-Ligand zugefügt wurde. Andere von 293T Zellen in das Medium sekretierte Inhaltsstoffe könnten dafür verantwortlich sein.

**Abb. 17:**

Stimulation ex vivo isolierter Makrophagen mit LPS (a) und SACS (b) nach 2h Vorinkubation mit 25% und 12,5 % der Überstände IL-10-Fc bzw. pEF transfizierter Zellen. Die mittels TNF α ELISA gemessenen Werte zeigen, daß IL-10-Fc die LPS induzierte TNF α Produktion in beiden Konzentration stärker supprimiert, als pEF.

Abb. 18 zeigt die selben Versuchbedingungen wie in Abb. 17 mit dem Unterschied, daß die Makrophagen vor Stimulation mit den TLR-Liganden 16h lang (über Nacht) mit den Transfektionsüberständen der Fusionsproteine vorinkubiert wurden. Auch hier sieht man eine Suppression der TNF α Synthese durch die beiden IL-10-Fc Konzentrationen, die durch pEF-SEM Überstände nur in viel geringerem Maße erreicht wurde.

Insgesamt zeigte die Stimulation mit LPS den stärksten Anstieg der TNF α Konzentration, so daß in den folgenden Versuchen mit den übrigen Fusionsproteinen nur noch mit LPS stimuliert und auf SACS verzichtet wurde.

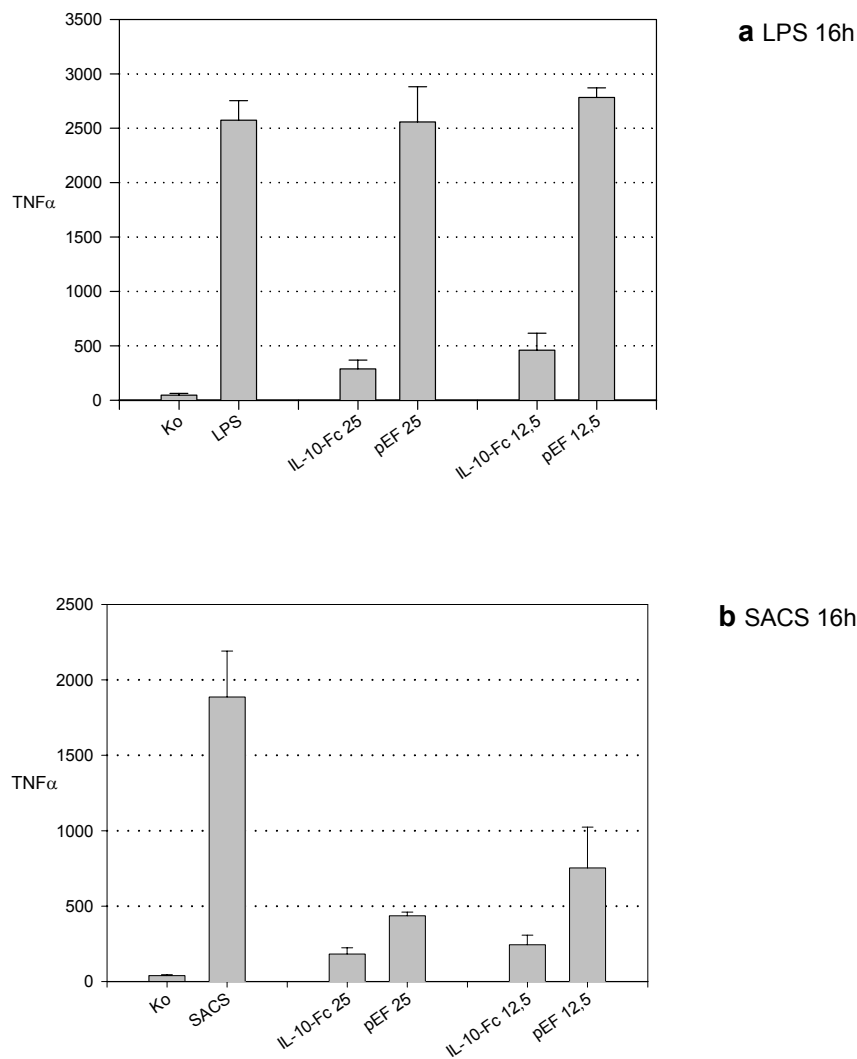


Abb. 18:

Stimulation ex vivo isolierter Makrophagen mit LPS (a) und SACS (b) nach 16h Vorinkubation mit 25% und 12,5 % der Überstände IL-10-Fc bzw. pEF transfizierter Zellen. Auch hier zeigt sich in der Analyse der TNF α Konzentrationen mittels ELISA eine stärkere Suppression der LPS induzierten TNF α Produktion durch die Überstände IL-10-Fc transfizierter Zellen, als durch die der pEF transfizierten Zellen.

In Abb.19 ist die TNF α Suppression durch Überstände IL-10-Fc, IL-10-M-Fc und SP-Fc transfizierter Zellen dargestellt. Wie oben beschrieben wurden auch hier ex vivo isolierte Makrophagen über 2h mit den Überständen vorinkubiert, dann mit 50 ng/ml LPS stimuliert und die Zellüberstände nach weiteren 20h im TNF α ELISA analysiert. Wie erwartet wurde die TNF α Synthese sowohl durch IL-10-Fc als auch durch IL-10-M-Fc im Vergleich zur LPS Kontrolle inhibiert. Je weniger Transfektionsüberstand prozentual eingesetzt wurde, desto geringer war die TNF α Suppression. Die Transfektionsüberstände von SP-Fc führten ebenfalls zu einer Verminderung der TNF α Expression, jedoch wurden insgesamt deutlich höhere TNF α Konzentrationen gemessen als bei den mit IL-10-Fc oder mit IL-10-M-Fc vorinkubierten Makrophagen. Dies zeigt, daß IL-10 und nicht der Fc-Teil oder Medienbestandteile an der TNF α Suppression beteiligt sind.

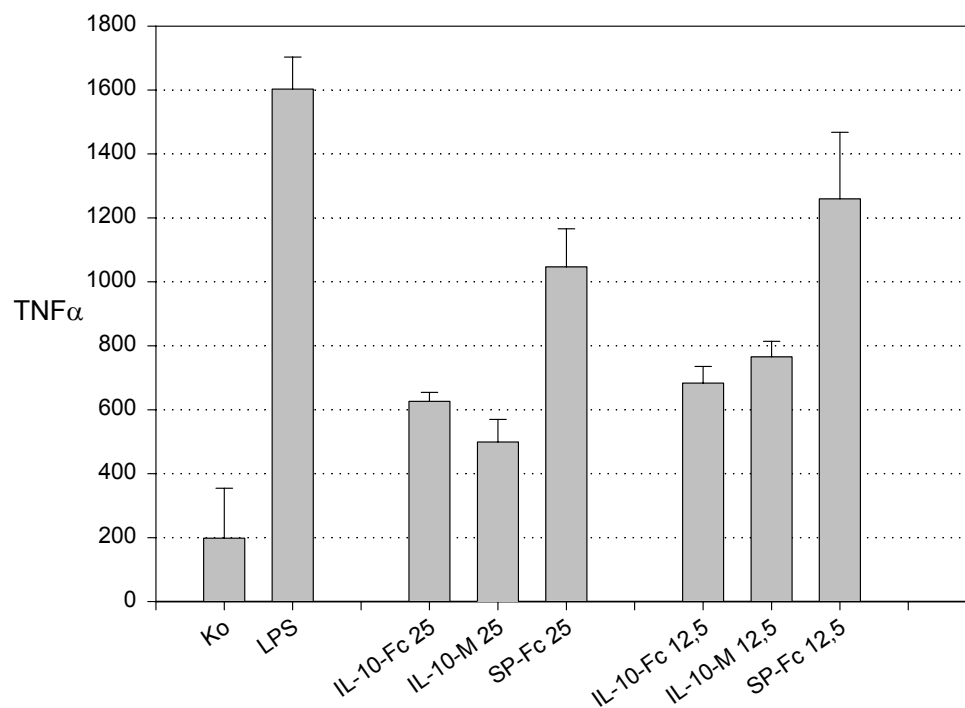


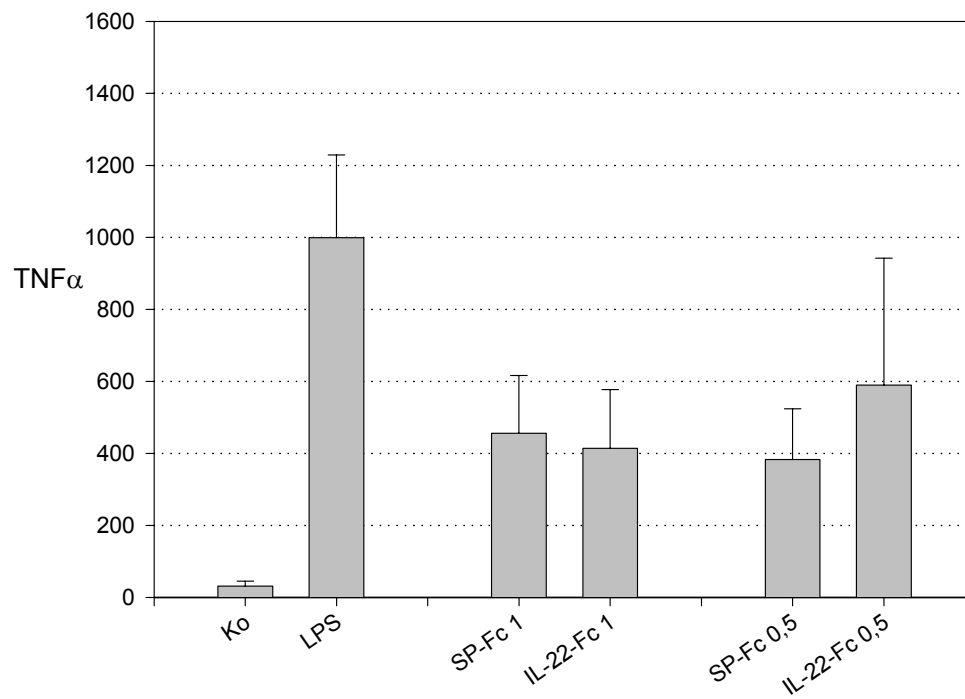
Abb. 19:

TNF α ELISA LPS stimulierter Makrophagen nach 2h Vorinkubation mit Transfektionsüberständen von IL-10-Fc, IL-10-M-Fc und SP-Fc und in den Konzentrationen 25% und 12,5 %. Sowohl IL-10-Fc als auch IL-10-M-Fc supprimieren die TNF α Produktion. SP-Fc führt allerdings auch zu einer leichten TNF α Suppression, die vermutlich auf andere Mediumbestandteile zurückzuführen ist.

Generell erwies sich die Vorinkubation der Makrophagen 2h vor Stimulation als reproduzierbarer als die Vorinkubation über 16h. Bei der Wiederholung der Versuche mit aufgereinigten Fusionsproteinen wurde aus diesem Grund nur noch 2h vorinkubiert.

3.5.2 TNF α Suppression durch gereinigte Fusionsproteine

Die Abb. 20 zeigt die TNF α Expression der Makrophagen nach 2h Vorinkubation mit aufgereinigten Fusionsproteinen. Es wurden jeweils ca. 0,5 bzw. 1 μ g Protein für 200 μ l eingesetzt, d.h. 2,5 bzw. 5 μ l/ml. Die Konzentration der Fusionsproteine war zuvor mittels Coomassie Gel ermittelt worden, auf dem eine BSA Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen aufgetragen worden war. SP-Fc bewirkt ungefähr eine Halbierung der TNF α Konzentration der LPS Kontrolle. Da es sich hier um aufgereinigtes Protein handelt, können hierfür nicht Bestandteile der Zellkulturüberstände verantwortlich gemacht werden. Obwohl der modifizierte Fc-Teil nicht zellaktiv sein sollte (Zheng et al., 1995), könnte die Makrophagenfunktion teilweise beeinflusst werden. Die Inkubation der Makrophagen mit IL-22-Fc vor LPS Stimulation zeigte ebenfalls eine Verminderung der TNF α Konzentration. Verglichen mit der SP-Fc Kontrolle läßt sich aber durch IL-22-Fc keine stärkere TNF α Suppression erreichen. IL-22-Fc beeinflusst folglich die TNF α Expression der Makrophagen nach LPS Stimulation nicht, was mit den Ergebnissen von Xie et al. übereinstimmt (Xie et al., 2000).

**Abb. 20:**

TNF α Suppression LPS stimulierter Makrophagen nach 2 h Vorinkubation mit jeweils ca. 0,5 μ g bzw. 1 μ g aufgereinigtem Fusionsprotein. IL-22-Fc führt zu keiner stärkeren Inhibition der TNF α Produktion als SP-Fc.

4. Diskussion

Die komplexen pathophysiologischen Prozesse der Sepsis sind trotz intensiver Forschung bis heute nicht restlos aufgeklärt. Zwei verschiedene Mechanismen werden als Ursachen für die Dysregulation des Immunsystems diskutiert. Einerseits geht man davon aus, daß mikrobielle Bestandteile eine starke Immunantwort auslösen, die zu einer Überproduktion schädlicher Immunmediatoren führt (van der Poll et al., 1999). Andererseits konnte gezeigt werden, daß eine massive Infektion auch mit einer Immunparalyse einhergeht (Volk et al., 1996). Es gilt zu klären, inwiefern diese beiden Mechanismen zusammenhängen und einander beeinflussen, um daraus therapeutische Konsequenzen ziehen zu können. Da Zytokine in der Pathophysiologie der Sepsis eine entscheidende Rolle spielen, erscheint es vielversprechend, ihre Wirkmechanismen genauer zu untersuchen. Eine Reihe von Versuchen haben die Relevanz des überwiegend antiinflammatorisch wirkenden IL-10 im Modell der Sepsis deutlich werden lassen. So konnte z.B. die Behandlung mit IL-10 Mäuse vor einem LPS-induzierten Endotoxin-Schock schützen (Howard et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß es in der septischen Peritonitis nach CLP (cecal ligation and puncture) zu einem raschen Anstieg von IL-10 mRNA in verschiedenen Organen der Versuchsmäuse kommt. Werden die Mäuse vor CLP mit einem monoklonalen anti-IL-10-Antikörper vorbehandelt, resultieren höhere $\text{TNF}\alpha$ Spiegel und geringere Überlebensraten der Tiere in der anschließenden Sepsis. Die zusätzliche Applikation eines anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpers hatte allerdings keinen Einfluß auf die durch den anti-IL-10-Antikörper erhöhte Mortalität (van der Poll et al., 1995). Diese Resultate gaben Grund zu Spekulationen, daß IL-10 in der Peritonitis eventuell immunstimulierend wirken könnte und über das Auslösen einer lokalen Abwehrreaktion dem Körper ermöglicht, die bakterielle Ausbreitung zu bekämpfen. Spätere Ergebnisse der selben Arbeitsgruppe mit IL-10 defizienten Mäusen rückten wiederum die Bedeutung der antiinflammatorischen Wirkung von IL-10 in den Vordergrund. Die höhere Mortalität der IL-10 defizienten Mäuse wird auf die Entwicklung eines inflammatorischen Syndroms zurückgeführt (Sewnath et al., 2001). Konträr zu diesem Ergebnis zeigten Arbeiten in einem Model der polymikrobiellen Sepsis an Kupferzell-depletierten Mäusen, die stark verminderte systemische IL-10 Spiegel aufwiesen, signifikant geringere Überlebensraten als

Kontrollmäuse. Der geringere IL-10 Spiegel führte allerdings nicht, wie man annehmen könnte, zu einer überschießenden proinflammatorischen Zytokin-Antwort. Vielmehr fand sich eine verminderte Produktion von IFN γ der Milzzellen, was auf eine fehlende aktivierende Funktion von IL-10 hinweist (Emmanuilidis et al., 2001). Es stellt sich die Frage, welche Aktivitätskomponente des immunmodulatorischen IL-10 für die verbesserten Überlebensraten der Versuchstiere mit hohen IL-10 Spiegeln verantwortlich ist. Ding et al. konnten zeigen, daß durch Mutation einer Aminosäure ein IL-10-Derivat ohne proinflammatorische Komponente erstellt werden kann (Ding et al., 2000). Um die Wirkungsweisen der pro- und der antiinflammatorischen Aktivitätskomponenten von IL-10 getrennt voneinander untersuchen zu können, wurde in dieser Arbeit durch Einführung der beschriebenen Mutation ein IL-10 ohne proinflammatorische Komponente erstellt.

Vor kurzem wurde IL-22 entdeckt, das auch als IL-TIF bezeichnet wird. Da gezeigt werden konnte, daß es proinflammatorisch wirkt (Xu et al., 2001) und sein Rezeptorkomplex eine gemeinsame Kette mit dem IL-10 Rezeptorkomplex aufweist (Kotenko et al., 2001), erschien es sinnvoll auch IL-22 in die Untersuchung der Wirkungsweise von IL-10 und dem mutierten, antiinflammatorisch wirkenden IL-10-M einzubeziehen. Bei hohen Konzentrationen an IL-10, wie sie in der Sepsis auftreten können, könnte IL-10 vielleicht auch den IL-22 Rezeptor aktivieren und dadurch proinflammatorische Wirkungen auslösen.

Analyse der Regulation von IL-10 während der Sepsis

Die Regulation des endogen produzierten IL-10 während der Sepsis ist von entscheidender Bedeutung um die Wirkungsweise von IL-10 in den einzelnen Stadien der Sepsis zu beleuchten. Um den Mechanismus zu verstehen, erschien es sinnvoll, die Regulation von IL-10 in den einzelnen Organen während einer Infektion zu untersuchen. Dazu wurden Versuchstiere nach dem CASP Model (siehe 2.10.1) operiert und Leber, Lunge und Milz 0h, 3h, 6h oder 12h postoperativ entnommen. Die Expression von IL-10 wurde sowohl auf Transkriptionsebene durch Bestimmung des mRNA Gehalts der Organe, als auch auf Proteinebene untersucht. Die höchste Konzentration an IL-10 mRNA wurde in der Leber 12h nach CASP, in der Lunge 6h und in der Milz 3h nach der Operation erreicht (siehe Abb.3). Dagegen wurden die

höchsten Konzentrationen an IL-10 als Protein in allen Organen erst nach 12h gemessen (siehe Abb. 4). Analog erreichte der IL-10 Spiegel im Serum nach 12h sein Maximum. Die zeitliche Differenz zwischen mRNA- und Protein-Konzentrationsmaximum in den Organen läßt sich durch die Dauer der Proteinbiosynthese und Sekretion erklären. Das Erreichen der maximalen Konzentration von IL-10 als Protein erst nach 12h ist vereinbar mit der dedektären Wirkung zum späten Zeitpunkt. Untersuchungen haben gezeigt, daß im Gegensatz zur Suppression von IL-10 vor der Sepsis, die Hemmung der Expression 12h nach Induktion der Sepsis zu geringeren Mortalitätsraten führt (Kalechman et al., 2002). Man könnte annehmen, daß IL-10 in der Frühphase der Sepsis zur Wiederherstellung der Homöostase wichtig ist, die späteren hohen Konzentrationen aber eher zu eine Immunsuppression beitragen.

Klonierungsstrategien

Aus der von RAW Makrophagen gewonnenen RNS wurde cDNS synthetisiert und IL-10 dann mittels PCR amplifiziert. Wie in 3.2 beschrieben wurde über Zwischenschritte ein IL-10-Fc Fusionsprotein generiert, das durch Kopplung an den Fc γ 2a Teil eines Antikörpers eine verlängerte Serum-Halbwertszeit aufweist (Zheng et al., 1995). Durch Einführung zweier Mutationen war der Fc-Teil so modifiziert worden, daß er theoretisch weder an die Fc-Domäne des Fc γ RI Rezeptors noch an C1q des Komplementsystems bindet (Zheng et al., 1995) und damit sowohl seine Zell-vermittelte als auch seine Komplement-abhängige zytotoxische Aktivität verloren hat. Obwohl sich Zytokine, die an solch einen modifizierten Fc-Teil eines Antikörpers gekoppelt wurden, als biologisch aktiv und als länger im Serum zirkulierend erwiesen haben, konnte eine immunologische Restaktivität des Fc-Teils in vivo nie vollständig ausgeschlossen werden (Zheng et al., 1995; Zheng et al., 1997). Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Fc-spezifische Effekte in Zellen, v.a. in Makrophagen zu erkennen, wurde zur Kontrolle das SP-Fc Fusionsprotein erstellt, das den Fc-Teil allein exprimiert. Hierfür wurde das Signalpeptid von IL-10 an einen Fc-Teil gekoppelt und in den selben Vektor eingesetzt wie die übrigen Fusionsproteine (siehe 3.2.4). Da es keinen Zytokinanteil enthält, können alle Effekte von SP-Fc in den Experimenten auf den modifizierten Fc-Teil zurückgeführt werden.

Wie in 3.1.2 beschrieben, wurde durch Austausch der Aminosäure Isoleuzin durch Alanin in Position 87 des IL-10 ein IL-10 ohne proinflammatorische Komponente erstellt (Ding et al., 2000) und an den modifizierten Fc-Teil gekoppelt (IL-10-M-Fc). Analog dazu wurde ein IL-22-Fc-Fusionsprotein hergestellt (siehe 3.2.3). Um eine vergleichbare Expression zu erreichen, benutzen alle Konstrukte den selben Vektorhintergrund (pEF-SEM). Aus diesem Grund wurde auch das endogene Signalpeptid von IL-10 für IL-10-Fc, IL-10-M-Fc und SP-Fc gewählt. IL-22-Fc enthält das endogene Signalpeptid, unterscheidet sich aber sonst nicht von den anderen Konstrukten. Um auch die transienten Transfektionen möglichst standardisiert durchzuführen, wurden 293T Zellen verwendet, die gut transfizierbar sind. Als Kontrolle wurden jeweils Transfektionen mit GFP (grün fluoreszierendes Protein) mitgeführt.

Expressionsanalysen

Durch die Wahl des selben Signalpeptids und des selben Vektorhintergrunds sollte man annehmen, daß die Fusionsproteine nach transienter Transfektion annähernd gleich stark exprimiert werden. Um die Expression zu überprüfen wurden die Transfektionsüberstände zunächst mittels IL-10-ELISA vermessen. Die Abb. 13 zeigt, daß IL-10-M-Fc, wenn auch deutlich schwächer als IL-10-Fc, im Vergleich zur Kontrolle pEF eindeutig detekierbar war. Die Einführung der Mutation hat folglich nicht dazu geführt, daß IL-10-M-Fc nicht mehr von anti-IL-10-Antikörpern gebunden werden kann. In den Überständen der mit SP-Fc transfizierten Zellen konnte allerdings auch eine höhere Aktivität detektiert werden, als in denen der pEF Kontrolle. Dieses Ergebnis ist vermutlich nicht auf die exprimierten Konstrukte direkt, sondern auf eine Kreuzreaktion mit Mediumbestandteilen zurückzuführen. In der Western Blot Analyse wurden das ausgefällte Protein aus den Transfektionsüberständen in einer PAG-Elektrophorese aufgetrennt und mit einem Fc-spezifischem Antikörper inkubiert. Die Abb. 14 zeigt, das erwartungsgemäß alle 4 Konstrukte nachweisbar sind, jedoch in unterschiedlicher Stärke. SP-Fc wird sehr stark exprimiert, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß es das kürzeste Protein ist. Je kürzer der Fusionsanteil ist, der an den Fc-Teil angefügt ist, desto stärker ist in der Regel die Expression des Konstrukts. IL-22-Fc wird ebenfalls

stärker exprimiert als IL-10-Fc oder IL-10-M-Fc. Der Grund dafür könnte sein, daß IL-22-Fc ein anderes Signalpeptid benutzt als die anderen drei Konstrukte. Wie auch im ELISA schon festgestellt, wird IL-10-M-Fc deutlich schwächer exprimiert als IL-10-Fc. Dieser Befund ist nicht leicht zu erklären, da sich die beiden Konstrukte nur in einer einzigen Aminosäure unterscheiden. Unerwünschte andere Mutationen konnten durch Sequenzanalysen ausgeschlossen werden. Der Austausch der Basenpaare um die Mutation der Aminosäure in Position 87 einzuführen, erfolgte so, daß die neu eingeführten (GCC) Basenpaare von den 293T Zellen nach aktuellem Kenntnisstand über die Codon-Nutzung von Säugerzellen nicht schwächer exprimiert werden sollten, als die ursprünglichen (ATC) (gene bank, codon usage data base). Die Frage warum IL-10-M-Fc schwächer exprimiert wird als IL-10-Fc konnte nicht geklärt werden. Die Arbeitsgruppe Ding konnte zwar in Western Blot Analysen zeigen, daß das mutierte IL-10-M genauso stark exprimiert wird wie das Wildtyp IL-10, allerdings war IL-10-M in diesen Experimenten nicht an den modifizierten Fc-Teil eines Antikörpers gebunden (Ding et al., 2000). Strukturanalysen haben gezeigt, daß die Einführung der Mutation in IL-10 zu keiner Veränderung der dreidimensionalen Struktur von IL-10-M-Fc führt, so daß eine Strukturänderung des Proteins als Grund für die verminderte Expression, bzw. Detektion entfällt (nnpredict, genebank).

Immunpräzipitation und Aufreinigung der Fusionsproteine

Die von 293T Zellen exprimierten Fusionsproteine wurden unter Zuhilfenahme ihres Fc-Teils in dieser Arbeit aufgereinigt, um ihre biologische Aktivität unbeeinflusst von anderen Bestandteilen der Überstände transfizierter Zellen untersuchen zu können. Zudem war es nötig, größere Mengen an Protein für die im weiteren geplanten Tierexperimente zu gewinnen. Die Bindung von Protein A Sepharose an den modifizierten Fc-Teil der Fusionsproteine ermöglicht die Präzipitation des Proteins aus den Überständen transfizierter Zellen. Im Medium für die Zellkultur wurde nur Serum eingesetzt, das zuvor zweimal mit Protein A Sepharose Ig-depletiert worden war, um ein Verunreinigung durch Präzipitation von Immunglobulinen aus dem Serum zu verhindern. Die Coomassie Blau Färbung einer Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, die in Abb. 16 dargestellt ist, zeigt allerdings, daß auch diese Maßnahme nicht ausreicht, um die Immunglobuline aus dem Serum restlos zu

eliminieren. Wie unter 2.8.2 beschrieben, wurden die an Protein A Sepharose gebundenen Fusionsproteine anschließend durch Absenken des pHs wieder aus ihrer Bindung gelöst und schrittweise eluiert. In Abb. 15 a-d ist die Western Blot Analyse der Aufreinigungsschritte dargestellt. Es ist klar ersichtlich, daß die Aufreinigung erfolgreich durchgeführt wurde, da sich mittels eines Peroxidase gekoppeltem Fc-spezifischem Antikörper im Nativ-Pellet (Sepharose im 1. Wachpuffer) am meisten Protein nachweisen läßt, das Protein sich auch in den Elutionspuffern wiederfinden läßt und im Rest-Pellet schließlich kaum noch Protein zu sehen ist. Durch Sammeln der drei Eluate sollte man also die Fusionsproteine in gereinigter Form erhalten. Allein bei IL-10-M-Fc scheint in den Eluat 2 und 3 und im Rest-Pellet kein Protein mehr enthalten zu sein. Der Grund dafür ist sehr wahrscheinlich die geringe Ausgangsmenge des an Protein A Sepharose gebundenen Proteins, das wiederum durch die geringe Konzentration an IL-10-M-Fc in den Transfektionsüberständen bedingt ist. Die Expression von IL-10-M-Fc muß demnach gesteigert werden, um auch IL-10-M-Fc in ausreichender Konzentration in den Transfektionsüberständen vorliegen zu haben, um es analog der anderen Fusionsproteine aufzureinigen zu können.

Testung der biologischen Funktionen der Fusionsproteine in vitro

Endotoxin (LPS) ist ein Produkt gram-negativer Bakterien und ist vermutlich an der Pathogenese des septischen Schocks beteiligt. Im Tiermodell kann durch eine einzige Injektion von LPS ein Schock ähnliches Syndrom ausgelöst werden (Glauser et al., 1991). Der toxische Effekt von LPS hängt mit der Aktivierung von Makrophagen zusammen, die zu einer Freisetzung multipler Entzündungsmediatoren führt. Unter diesen Entzündungsmediatoren scheint $\text{TNF}\alpha$ eine entscheidende Rolle zu spielen. So konnte z. B. gezeigt werden, daß Neutralisation von $\text{TNF}\alpha$ durch die Gabe eines anti- $\text{TNF}\alpha$ -Antikörpers den letalen Effekt von LPS unter bestimmten Bedingungen verhindern konnte (Beutler et al., 1985). IL-10 führt im Rahmen seiner antiinflammatorischen Wirkungskomponente zu einer Suppression der LPS induzierten $\text{TNF}\alpha$ Produktion durch Makrophagen (De Waal Malefyt et al., 1991). Der Mechanismus dieser $\text{TNF}\alpha$ Suppression wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, daß IL-10 die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- κ B

verringert. Es gilt mittlerweile allerdings als erwiesen, daß diese Minderung der NF- κ B Aktivität keinen Einfluß auf die Expression des TNF α Gens hat (Clarke et al., 1998). Andere Arbeiten postulieren eine Destabilisierung der TNF α mRNA durch IL-10 (Brown et al., 1996), oder die Hemmung der Translation durch Blockade der Aktivierung der MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) (Kontoyiannis et al., 2001). Als sicher wird angesehen, daß der Transkriptionsfaktor STAT-3 für die Vermittlung des antiinflammatorischen Effekts von IL-10 nötig ist (Riley et al., 1999). Die Suppression der TNF α Produktion LPS stimulierter Makrophagen erschien in jedem Fall geeignet um ein funktionelles Testsystem für die in dieser Arbeit erstellten Fusionsproteine zu etablieren. IL-10-Fc sollte durch seinen modifizierten Fc-Teil nicht beeinflußt werden und die TNF α Produktion LPS stimulierter Makrophagen im Gegensatz zur Kontrolle (pEF-SEM) signifikant supprimieren. Das SP-Fc Fusionsprotein, das erstellt wurde um die eventuelle Wirkung des Fc-Teils zu analysieren, sollte die TNF α Produktion unbeeinflußt lassen. Das mutierte IL-10, das durch Austausch einer Aminosäure keine proinflammatorische Komponente mehr aufweist, sollte dennoch eine unveränderte antiinflammatorische Wirkung besitzen und die TNF α Produktion in gleicher Weise wie IL-10-Fc supprimieren. Strukturanalysen von IL-10 haben gezeigt, daß die antiinflammatorische Aktivität von einer C-terminalen Domäne des Zytokins abhängt, die durch Einführung der Mutation in IL-10-M-Fc unverändert bleibt. Mit einem Nonapeptid mit vollständiger Homologie zur C-terminalen Region von IL-10 konnten zahlreiche antiinflammatorische Funktionen, wie z.B. die Suppression der spontanen IL-8 Produktion von Monozyten aus peripherem Blut, die Induktion der IL-4 Produktion durch humane CD4+ T-Zellen und auch die Hemmung der TNF α Produktion durch CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden (Gesser et al., 1997). Die Einführung der Mutation in Position 87 von IL-10 liegt weit von der C-terminalen antiinflammatorischen Domäne entfernt und sollte folglich die immunsuppressive Wirkung von IL-10 nicht beeinträchtigen. In Abb. 17 ist die TNF α Produktion LPS stimulierter Makrophagen nach 2h Vorinkubation mit Überständen IL-10-Fc und pEF-SEM transfizierter Zellen dargestellt. Es zeigt sich eine Suppression der TNF α Produktion durch die Überstände, die mit Verringerung der Konzentration der Transfektionsüberstände abnimmt. Insgesamt hemmen die IL-10-Fc Überstände die TNF α Spiegel deutlich stärker als die pEF Überstände, die als Kontrolle dienen. Die Hemmung, die durch die Überstände der pEF transfizierten Zellen bewirkt wird ist vermutlich auf andere Bestandteile der Überstände

zurückzuführen. Die Vermutung, daß es sich dabei um IL-10 der 293T Zellen handeln könnte, wurde mit einem hIL-10 ELISA ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt). Vorinkubation der Makrophagen mit IL-10-Fc Überständen führte in jedem Ansatz zu einer Verminderung der TNF α Produktion. Am deutlichsten war der Effekt bei Stimulation mit LPS zu beobachten, das als starker TLR-Ligand gilt. SACS bewirkte generell eine schwächere TNF α Induktion. Bei der Wiederholung des Experiments mit allen Konstrukten, wurde deshalb nur noch mit LPS stimuliert. Wie erwartet führte auch IL-10-M-Fc zu einer Suppression der LPS induzierten TNF α Produktion der Makrophagen (Abb. 19). Die generell geringere Expression von IL-10-M-Fc und die dadurch bedingte niedrigere Konzentration in den Transfektionsüberständen reichte aus um die gleiche Aktivität hinsichtlich der TNF α Suppression zu erreichen, wie IL-10-Fc.

Der selbe Versuchsansatz wurde verwendet, um IL-22-Fc und SP-Fc in gereinigter Proteinform miteinander zu vergleichen (Abb. 20). Wie zu erwarten war, führte IL-22-Fc zu keiner stärkeren Suppression der TNF α Synthese nach Stimulation mit LPS, als das Kontrollprotein SP-Fc. Dieses Ergebnis stimmt mit der Arbeit von Xie überein (Xie et al., 2000). Da sowohl SP-Fc als auch IL-22-Fc gegenüber der allein mit LPS stimulierten Kontrolle zu einer TNF α Hemmung führen, stellt sich die Frage, ob der modifizierte Fc-Teil der Fusionsproteine eventuell doch eine immunologische Restaktivität aufweist. In der vorliegenden Literatur ist nie eindeutig das Gegenteil bewiesen worden (Zheng et al., 1995; Zheng et al., 1997). IL-10-M-Fc konnte in diesem Versuch nicht mitgeführt werden, da es zu diesem Zeitpunkt noch nicht möglich war, IL-10-M-Fc in ausreichender Menge aufzureinigen. Durch die in vitro Experimente konnte gezeigt werden, daß die Fusionsproteine auch nach der Aufreinigung in ihrer Zytokin-Funktion wirksam sind. Mit dem TNF α Suppressionstest an LPS stimulierten Makrophagen konnte ein reproduzierbares Testsystem für die Funktionalität der erstellten Fusionsproteine etabliert werden, das auch in Zukunft für die Aufreinigung der Fusionsproteine im größeren Stil für deren Einsatz im Tiermodell der polymikrobiellen Sepsis genutzt werden kann.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Sepsis als systemische Reaktion auf eine Infektion ist eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen, v.a. nach größeren chirurgischen Eingriffen und ist auch heute noch mit einer Mortalitätsrate von 30 – 40% behaftet (van der Poll et al., 2001). Der Theorie, daß der Sepsis eine überschießende und uneingeschränkte Immunantwort des Körpers zugrunde liegt, ist durch neuere Ergebnisse zunehmend die Bedeutung einer Immunparalyse als Ursache der Sepsis gegenübergestellt worden. So konnte in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis gezeigt werden, daß die protektive Funktion von IL-10 in der Sepsis nicht auf seine antiinflammatorische Wirkung beschränkt ist (Emmanuilidis et al., 2001). Zur genaueren Analyse der Rolle von IL-10 in der Sepsis wurde in dieser Arbeit zunächst die Expression von IL-10 in verschiedenen Organen in Abhängigkeit von der Zeit nach Induktion einer Sepsis nach dem CASP (Colon ascendens stent peritonitis) Model gemessen. Um die pro- und die antiinflammatorische Wirkungsweise von IL-10 getrennt von einander untersuchen zu können, wurde im Weiteren unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Ding durch Mutation einer Aminosäure IL-10 ohne proinflammatorische Komponente hergestellt (Ding et al., 2000). Durch Kopplung an den modifizierten Fc γ 2a Teils eines Antikörpers wurden jeweils nicht-lysierende Fusionsproteine erstellt, die eine verlängerte Serumhalbwertszeit aufweisen. So wurde das mutierte IL-10 (IL-10-M), wie auch Wildtyp IL-10 mit dem modifizierten Fc-Teil versehen (IL-10-Fc) und ein Kontrollprotein, bestehend nur aus dem Fc-Teil (SP-Fc) erstellt. Da der IL-22-Rezeptor eine gemeinsame Rezeptorkette mit dem IL-10-Rezeptorkomplex aufweist, und IL-22 proinflammatorisch wirkt, wurde auch ein IL-22-Fc Konstrukt erstellt und in die Untersuchungen mit einbezogen. Bei hohen Konzentrationen an IL-10, wie sie in der Sepsis auftreten können, könnte IL-10 eventuell an den IL-22-Rezeptor binden und dadurch proinflammatorisch wirken. Die Expression aller vier Fusionsproteine wurde sowohl mit einem IL-10 ELISA, als auch mit einem Peroxidase gekoppltem Fc-spezifischem Antikörper in der Western Blot Analyse überprüft. Um die biologische Funktion der Fusionsproteine zu untersuchen, wurden Mäuse mit Thioglykolat vorbehandelt und nach 4 Tagen die eingewanderten Makrophagen aus der

Bauchhöhle isoliert. Durch Inkubation der Makrophagen mit den Fusionsproteinen vor LPS Stimulation, konnte die $TNF\alpha$ Produktion sowohl durch IL-10-Fc als auch durch IL-10-M-Fc supprimiert werden. Durch die Mutation zur Elimination der proinflammatorischen Komponente ist die antiinflammatorische Funktion von IL-10-M-Fc folglich nicht verloren gegangen. IL-22-Fc führte auch als gereinigtes Protein nicht zu einer stärkeren Suppression der $TNF\alpha$ Produktion als das Kontrollprotein Sp-Fc, was mit Literaturbefunden vereinbar ist. Es wurden Fusionsproteine von IL-10 und IL-10 Homologen erstellt und ein Testsystem etabliert um diese in vitro auf ihre Funktionalität hin zu prüfen. In Zukunft wird es interessant sein, die pro- und die antiinflammatorische Aktivitätskomponente von IL-10 mit Hilfe der generierten Fusionsproteine in einem Mausmodell der polymikrobiellen Sepsis getrennt von einander zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

- Angle, M. K., Faist, E. Clinical review: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Critical Care* 6 (2002) 293-305
- Abraham, E., Anzueto, A., Gutierrez, G., Tessler, S., San Pedro, G., Wunderink, R., Dal Nogare, A., Nasraway, S., Berman, S., Cooney, R., Levy, H., Baughman, R., Rumbak, M., Light, R. B., Poole, L., Allred, R., Constant, J., Pennington, J., Porter, S. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 351 (1998) 929-933.
- Adib-Conquy, M., Petit, A. F., Marie, C., Fitting, C., Cavaillon, J.M. Paradoxical priming effects of IL-10 on cytokine production. *Int.Immunol.* 11 (1999) 689-698.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L., Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 190 (1999) 995-1004.
- Beutler, B., Milsark, I. W., Cerami, A. C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229 (1985) 869-871.
- Bone, R. C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 24 (1996) 1125-1128.
- Brown, C. Y., Lagnado, C. A., Vadas, M. A., Goodall, G. J. Differential regulation of the stability of cytokine mRNAs in lipopolysaccharide-activated blood monocytes in response to interleukin- 10. *J.Biol.Chem.* 271 (1996) 20108-20112.
- Cai, G., Kastelein, R. A., Hunter, C. A. IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18. *Eur.J.Immunol.* 29 (1999) 2658-2665.
- Clarke, C. J., Hales, A., Hunt, A., Foxwell, B. M. IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *Eur.J.Immunol.* 28 (1998) 1719-1726.
- Davidson, N. J., Fort, M. M, Muller, W., Leach, M. W., Rennick, D. M. Chronic colitis in IL-10-/- mice: insufficient counter regulation of a Th1 response. *Int.Rev.Immunol.* 19 (2000) 91-121.
- de Waal, M. R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., de Vries, J. E. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* 174 (1991) 1209-1220.
- Ding, Y., Qin, L., Kotenko, S. V., Pestka, S., Bromberg, J. S. A single amino acid determines the immunostimulatory activity of interleukin 10. *J.Exp.Med.* 191 (2000) 213-224.

- Dumoutier, L., Louahed, J., Renauld, J. C. Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J.Immunol.* 164 (2000) 1814-1819.
- Emmanuilidis, K., Weighardt, H., Maier, S., Gerauer, K., Fleischmann, T., Zheng, X. X., Hancock, W. W., Holzmann, B., Heidecke, C. D. Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis. *J.Immunol.* 167 (2001) 3919-3927.
- Feterowski, C., Weighardt, H., Emmanuilidis, K., Hartung, T., Holzmann, B. Immune protection against septic peritonitis in endotoxin-primed mice is related to reduced neutrophil apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 31 (2001) 1268-1277.
- Fickenscher, H., Hor, S., Kupers, H., Knappe, A., Wittmann, S., Sticht, H. The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol.* 23 (2002) 89-96.
- Gerad, G. F., D'Alessio, J. M. Kotewicz M. L., Noon M. C. Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA* 4 (1986) 271-279.
- Gerard, C., Bruyns, C., Marchant, A., Abramowicz, D., Vandenabeele, P., Delvaux, A., Fiers, W., Goldman, M., Velu, T. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J.Exp.Med.* 177 (1993) 547-550.
- Gesser, B., Leffers, H., Jinqun, T., Vestergaard, C., Kirstein, N., Sindet-Pedersen, S., Jensen, S. L., Thestrup-Pedersen, K., Larsen, C. G. Identification of functional domains on human interleukin 10. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94 (1997) 14620-14625.
- Glauser, M. P., Zanetti, G., Baumgartner, J. D., Cohen, J. Septic shock: pathogenesis. *Lancet* 338 (1991) 732-736.
- Go, N. F., Castle, B. E., Barrett, R., Kastelein, R., Dang, W., Mosmann, T. R., Moore, K. W., Howard, M. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J.Exp.Med.* 172 (1990) 1625-1631.
- Heidecke, C. D., Weighardt, H., Hensler, T., Bartels, H., Holzmann, B. Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival. *Chirurg* 71 (2000) 159-165.
- Houts, G. E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., Beard, J. W. Reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *J.Virol.* 29 (1979) 517-522.
- Howard, M., Muchamuel, T., Andrade, S., Menon, S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J.Exp.Med.* 177 (1993) 1205-1208.
- Kalechman, Y., Gafter, U., Gal, R., Rushkin, G., Yan, D., Albeck, M., Sredni, B. Anti-IL-10 therapeutic strategy using the immunomodulator AS101 in protecting mice from sepsis-induced death: dependence on timing of immunomodulating intervention. *J.Immunol.* 169 (2002) 384-392.

- Kasama, T., Strieter, R. M., Lukacs, N. W., Lincoln, P. M., Burdick, M. D., Kunkel, S. L. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J.Clin.Invest* 95 (1995) 2868-2876.
- Katsikis, P. D., Chu, C. Q., Brennan, F. M., Maini, R. N., Feldmann, M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J.Exp.Med.* 179 (1994) 1517-1527.
- Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Carballo, E., Alexopoulou, L., Blakeshear, P. J., Gaestel, M., Davis, R., Flavell, R., Kollias, G. Interleukin-10 targets p38 MAPK to modulate ARE-dependent TNF mRNA translation and limit intestinal pathology. *EMBO J.* 20 (2001) 3760-3770.
- Kotenko, S. V., Krause, C. D., Izotova, L. S., Pollack, B. P., Wu, W., Pestka, S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. *EMBO J.* 16 (1997) 5894-5903.
- Kotenko, S. V., Izotova, L. S., Mirochnitchenko, O. V., Esterova, E., Dickensheets, H., Donnelly, R. P., Pestka, S. Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J.Biol.Chem.* 276 (2001) 2725-2732.
- Kotewicz, M. L., D'Alessio, J. M., Driftmier, K. M., Blodgett, K. P., Gerard, G. F. Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli. *Gene* 35 (1985) 249-258.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685.
- Mignon-Godefroy, Rott, K. O., Brazillet, M. P., Charreire, J. Curative and protective effects of IL-10 in experimental autoimmune thyroiditis (EAT). Evidence for IL-10-enhanced cell death in EAT. *J.Immunol.* 154 (1995) 6634-6643.
- Mullis, K. B., Faloona, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 (1987) 335-350.
- Rennick, D. M., Fort, M. M., Davidson, N. J. Studies with IL-10^{-/-} mice: an overview. *J.Leukoc.Biol.* 61 (1997) 389-396.
- Riley, J. K., Takeda, K., Akira, S., Schreiber, R. D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J.Biol.Chem.* 274 (1999) 16513-16521.
- Rongione, A. J., Kusske, A. M., Ashley, S. W., Reber, H. A., Mcfadden, D. W. Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J.Surg.Res.* 70 (1997) 107-112.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (1988) 487-491.

- Sewnath, M. E., Olszyna, D. P., Birjmohun, R., ten Kate, F. J., Gouma, D. J., van Der, P. T. IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during *Escherichia coli* peritonitis despite an accelerated bacterial clearance. *J.Immunol.* 166 (2001) 6323-6331.
- Spencer, S. D., Di Marco, F., Hooley, J., Pitts-Meek, S., Bauer, M., Ryan, A. M., Sordat, B., Gibbs, V. C., Aguet, M. The orphan receptor CRF2-4 is an essential subunit of the interleukin 10 receptor. *J.Exp.Med.* 187 (1998) 571-578.
- Thorpe, G. H., Kricka, L. J., Moseley, S. B., Whitehead, T. P. Phenols as enhancers of the chemiluminescent horseradish peroxidase- luminol-hydrogen peroxide reaction: application in luminescence- monitored enzyme immunoassays. *Clin.Chem.* 31 (1985) 1335-1341.
- van der Poll, T. Immunotherapy of sepsis. *The Lancet* 1 (2001) 165-174.
- van Der, P., Marchant, T. A., Buurman, W. A., Berman, L., Keogh, C. V., Lazarus, D. D., Nguyen, L., Goldman, M., Moldawer, L. L., Lowry, S. F. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. *J.Immunol.* 155 (1995) 5397-5401.
- van Der, P. T., van Deventer, S. J. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 13 (1999) 413-426.
- Volk, H. D., Reinke, P., Krausch, D., Zuckermann, H., Asadullah, K., Muller, J. M., Docke, W. D., Kox, W. J. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med.* 22 Suppl 4 (1996) S474-S481.
- Walley, K. R., Lukacs, N. W., Standiford, T. J., Strieter, R. M., Kunkel, S. L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect.Immun.* 64 (1996) 4733-4738.
- Weighardt, H., Heidecke, C. D., Emmanuilidis, K., Maier, S., Bartels, H., Siewert, J. R., Holzmann, B. Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. *Surgery* 127 (2000) 309-315.
- Weighardt, H., Heidecke, C. D., Westerholt, A., Emmanuilidis, K., Maier, S., Veit, M., Gerauer, K., Matevossian, E., Ulm, K., Siewert, J. R., Holzmann, B. Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann.Surg.* 235 (2002) 560-567.
- Xie, M. H., Aggarwal, S., Ho, W. H., Foster, J., Zhang, Z., Stinson, J., Wood, W. I., Goddard, A. D., Gurney A. L. Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R. *J.Biol.Chem.* 275 (2000) 31335-31339.
- Xu, W., Presnell, S. R., Parrish-Novak, J., Kindsvogel, W., Jaspers, S., Chen, Z., Dillon, S.R., Gao, Z., Gilbert, T., Madden, K., Schlutsmeyer, S., Yao, L., Whitmore, T. E., Chandrasekher, Y., Grant, F. J., Maurer, M., Jelinek, L., Storey, H., Brender, T., Hammond, S., Topouzis, S., Clegg, C. H., Foster, D. C. A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (2001) 9511-9516.

- Zantl, N., Uebe, A., Neumann, B., Wagner, H., Siewert, J. R., Holzmann, B., Heidecke, C. D., Pfeffer, K. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect.Immun.* 66 (1998) 2300-2309.
- Zheng, X. X., Steele, A. W., Nickerson, P. W., Steurer, W., Steiger, J., Strom, T.B. Administration of noncytolytic IL-10/Fc in murine models of lipopolysaccharide-induced septic shock and allogeneic islet transplantation. *J.Immunol.* 154 (1995) 5590-5600.
- Zheng, X. X., Steele, A. W., Hancock, W. W., Stevens, A. C., Nickerson, P. W., Roy-Chaudhury, P., Tian, Y., Strom, T. B. A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice. *J.Immunol.* 158 (1997) 4507-4513.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. B. Holzmann, der mich als Doktorvater betreut hat und in dessen Gruppe ich diese Arbeit durchführen konnte.

Seine Anregungen und v.a. sein Optimismus halfen mir so manche experimentelle Durststrecke zu überwinden.

Frau Dr. Heike Weighardt möchte ich für die intensive „rund-um-die-Uhr“ Betreuung danken, von der die meisten Medizin Doktoranden nur träumen können. Ihr Ideenreichtum, ihre Geduld und ihre extreme Hilfsbereitschaft haben mir sehr geholfen und diese Arbeit überhaupt ermöglicht. Abgesehen davon waren häufige private Unterhaltungen und Diskussionen über den aktuellen Inhalt der „Zeit“ eine nette Bereicherung des Laboralltags.

Bedanken möchte ich mich auch bei Sylvia Schlautkötter, die mir häufig bei Experimenten geholfen hat und die für mich sehr versiert etlichen Mäusen ein kurzes Ende bereitet hat.

Meinem Nachfolger Georg Weber möchte ich für die Bereitstellung des Coomassie Gels danken.

Martina Rump, Gabriela Jusek, Simone Kaiser-Moore und Felicitas Altmayr, von denen mir jede die eine oder andere Labor- oder Computertechnik beigebracht hat, möchte ich für ihre Geduld und Hilfsbereitschaft danken und v.a. aber auch für die ausgesprochen nette Atmosphäre im Labor.

Gabriela Jusek danke ich insbesondere für die großzügige Hilfe in Sachen IL-22 und Tanja Walsh für die RPAs.

Für die Durchführung der CASP Operationen danke ich Herrn Dr. Klaus Emmanuilidis.

Ein herzliches Dankeschön geht auch an Carolin Feterowski, die als promovierte Biologin mir häufig nach Seminaren durch Klärung von Verständnisfragen meine kleine Medizinerwelt erweitert hat. Dasselbe gilt natürlich auch für Heike Weighardt und Anne Brill.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Monika Ries bedanken, die mit einer Selbstverständlichkeit etliche Graphiken für meine Arbeit erstellt hat, obwohl sie eigentlich schon mehr als genug mit der Koordination von Patienten und eigenwilligen Chirurgen zu tun hat.

Aus der Arbeitsgruppe meiner Mutter danke ich herzlich Herrn Wildgruber für das Einscannen meiner Blots und Herrn Dr. Weiß für die Idee des „Dot Blots“.

Abschließend möchte ich auch allen „Holzmännern“ aus der 4a danken, die gegen Schluß meiner Arbeit zu uns übergesiedelt sind, v.a. Frau Dr. Sandra Beer für Tips zur Aufreinigung und für das Angebot des Korrekturlesens.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Kristina Görg
Anschrift: Prößlstr. 2
 81545 München
 Tel: 089-2780097
Kristina.goerg@stud.tu-muenchen.de
Geburtsdatum: 27.10.1977
Geburtsort: München
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 – 1988 Grundschule in Müchen
 1988 – 1997 Landheim Schondorf, Gymnasium und Internat
 Abiturnote 1,2

Studium

1997 – 1999 Vorklinik an der TU München
 1999 – 2000 1. Abschnitt der klinischen Ausbildung an der TU München
 1. Staatsexamen 2,0
 2000 – 2003 2. Abschnitt der klinischen Ausbildung an der TU München
 2. Staatsexamen 2,0
 2003 – 2004 3. Abschnitt der klinischen Ausbildung an der TU München
 04/03 – 08/03 Chirurgie
 Klinikum München Bogenhausen
 08/03 – 11/03 Gynäkologie und Frauenheilkunde
 Klinikum Rechts der Isar München
 12/03 – 03/04 Innere Medizin
 Klinikum Barmherzige Brüder Mü.
 3. Staatsexamen

Praktika

Famulaturen in den Bereichen:

Pädiatrie	Praxis in München Stadt
Chirurgie	Krankenhaus München Schwabing
Pathologie	Klinikum Rechts der Isar München
Gynäkologie	Frauenklinik vom Roten Kreuz München

Auslandsaufenthalte:

Kardiologie	National Heart and Lung Institute Harefield, U.K.
Gynäkologie	Kantonspital Aarau Schweiz

Dissertation

„Klonierung und Funktionsanalyse von Interleukin-10 und Interleukin-10 Homologen und ihrer Rolle in der polymikrobiellen Sepsis“

Doktorvater: Univ.- Prof. Dr. med. B. Holzmann, Klinische Forschergruppe Chirurgie, Klinikum Rechts der Isar

Sprachen

Deutsch, Englisch, Französisch

München, 02.04.04