

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität
München

**Regulation angeborener und erworbener Immunität durch Makrophagen und
dendritische Zellen**

Matthias Lochner

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen
Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Wurst
2. Univ.-Prof. Dr. Irmgard A. Förster

Die Dissertation wurde am 17.05.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und
Umwelt am 09.08.2004 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	3
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	9
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	11
1. EINLEITUNG.....	13
1.1 Dendritische Zellen und Makrophagen	14
1.1.1 Die Ontogenese von dendritischen Zellen	14
1.1.2 Die Rolle der dendritischen Zellen in der Immunantwort.....	16
1.1.3 Die Unterklassen dendritischer Zellen und ihre Funktion bei der T-Zell Aktivierung.....	19
1.1.4 Differenzierung, Verteilung und Aktivierung von Makrophagen	21
1.2 Differentiell ausgeprägte Gene zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen in der Maus	24
1.2.1 Identifizierung differentiell ausgeprägter Gene zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen in der Maus durch 'Differential Display'	24
1.2.2 Identifizierung von A21/D2 und Klonierung der A21/D2 cDNS.....	26
1.3 Interleukin-18.....	27
1.3.1 Struktur und Funktion von IL-18	27
1.3.2 Die Rolle von IL-18 bei der Regulation der Immunantwort in vivo	29
1.3.3 Die Rolle von IL-18 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Infektionen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	30
1.4 Zielsetzung.....	33
2. MATERIAL UND METHODEN	35
2.1 Bezugsquellennachweis	35
2.1.1 Chemikalien.....	35
2.1.2 Enzyme.....	37
2.1.3 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien.....	37
2.1.4 Geräte	38
2.2 Medien und Puffer	39

2.2.1	Stammlösungen und Puffer	39
2.2.2	Medien für die Bakterienkultur	44
2.2.2	Medien für die Zellkultur	46
2.3	Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere.....	46
2.3.1	Bakterienstämme.....	46
2.3.2	Zelllinien	47
2.3.3	Versuchstiere	47
2.4	Primer und Antikörper	48
2.4.1	Primer	48
2.4.2	Antikörper	51
2.5	Plasmidvektoren.....	53
2.5.1	Ausgangsvektoren.....	53
2.5.2	Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren.....	54
2.6	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	54
2.6.1	Isolierung von Plasmid DNS.....	54
2.6.2	Isolierung chromosomaler DNS	56
2.6.3	Agarosegelelektrophorese.....	57
2.6.4	Enzymatische Behandlung von DNS	59
2.6.5	Transformation von E.coli mit Plasmid-Vektoren.....	61
2.6.6	Southernblot Analyse.....	61
2.6.7	Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR.....	65
2.6.8	Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe und Zellen	66
2.6.9	cDNS Synthese.....	68
2.6.10	Northernblot Analyse.....	69
2.6.11	Bestimmung der DNS Konzentration	71
2.7	Zellkultur	72
2.7.1	Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES) und embryonaler Fibroblasten (EF)	72
2.7.2	Kultivierung von T 293 Zellen.....	75
2.7.3	Kultivierung von DC aus dem Knochenmark.....	76
2.8	Tierversuche.....	78
2.8.1	Superovulation.....	78
2.8.2	Gewinnung embryonaler Fibroblasten	78
2.8.3	Generierung chimärer Mäuse	79
2.8.4	Organentnahme	79
2.8.5	Injektion von Mäusen mit Thioglykolat.....	79
2.8.6	Induktion einer experimentellen Kolitis.....	80
2.8.7	Listerieninfektion.....	80

2.9	Immunologische und Zellbiologische Methoden.....	81
2.9.1	Immunhistologie/Immunohistochemie	81
2.9.2	Durchflußzytometrie (FACS-Analyse).....	84
2.9.3	Isolierung von Zellen aus Organen.....	86
2.9.4	Organkulturen	87
2.9.5	Bestimmung des histologischen Scores bei Kolitsi-Experimenten	87
2.9.6	Zellsortierung mittels MACS Technologie.....	88
2.9.7	ELISA	89
2.9.8	Messung der NO-Konzentration	89
2.9.9	Hitze-inaktivierung von Listerien	90
2.9.10	Bestimmung des Listerientiters in Milz und Leber infizierter Mäuse	90
3.	ERGEBNISSE.....	91
3.1	Teil 1: Charakterisierung des murinen Gens A21/D2	91
3.1.1	Charakterisierung der murinen A21/D2 cDNS.....	91
3.1.2	Analyse der subzellulären Lokalisation des A21/D2 Proteins.....	96
3.1.3	Charakterisierung des genomischen Lokus für murines A21/D2.....	100
3.1.4	Generierung einer A21/D2 defizienten Mausmutante durch 'Knock-in' des EGFP-Reporter Gens	103
3.1.5	Analyse von A21/D2-EGFP Mausmutanten.....	115
3.2	Teil 2: Regulation der Immunantwort durch Interleukin-18.....	122
3.2.1	Generierung monoklonaler neutralisierender Maus-anti-Maus-Interleukin-18 Antikörper.....	122
3.2.2	Untersuchungen zur Rolle von Interleukin-18 bei entzündlichen Darmerkrankungen im Mausmodell	123
3.2.3	Die Rolle von Interleukin-18 bei der Immunantwort gegen <i>Listeria monocytogenes</i>	131
4.	DISKUSSION.....	141
4.1	Charakterisierung der murinen A21/D2 Sequenz	141
4.1.1	Genomische Lokalisation von A21/D2.....	141
4.1.2	Homologien von A21/D2 zu anderen DNS- und Proteinsequenzen	142
4.2	Generierung von A21/D2-EGFP 'Knock-in' Mäusen	145
4.3	Analyse der A21/D2 Expression.....	147
4.3.1	Intrazelluläre Lokalisation von A21/D2	147
4.3.2	Expression von A21/D2 in murinen Geweben und Zellen.....	148
4.4	Die Auswirkung der IL-18-Blockade in Mausmodellen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)	149

Inhaltsverzeichnis

4.5	Der Effekt der IL-18-Blockade auf die Immunantwort gegen <i>Listeria monocytogenes</i>	153
4.6	Ausblick.....	157
5.	ZUSAMMENFASSUNG	159
6.	REFERENZEN	163
7.	DANKSAGUNG.....	181
8.	ANHANG	183

Abbildungsverzeichnis

- 1.1: Theoretisches Modell für die Entwicklung von dendritischen Zellen in der Maus.
- 1.2: Reifungsprogramm in dendritischen Zellen.
- 1.3: Modell der CD8 α^+ und CD8 α^- DC Differenzierung, Aktivierung und Funktion.
- 1.4: Differenzierung und Verteilung von Makrophagen.
- 1.5: Verschiedene Möglichkeiten der Makrophagen-Aktivierung.
- 1.6: A21/D2 spezifischer RNase Protektions-Assay zwischen DC und Makrophagen.
- 1.7: IL-18 Signaltransduktion.
- 3.1: cDNS und Aminosäuresequenz von A21/D2.
- 3.2: A21/D2-spezifischer Northernblot.
- 3.3: A21/D2 RT-PCR.
- 3.4: Konstruktion des A21/D2-pEGFP-N1 Fusionskonstrukts.
- 3.5: Analyse der intrazellulären Lokalisation von A21/D2.
- 3.6: Southernblot der BAC-Klone 26134, 26135 und 26136.
- 3.7: Schematische Darstellung der A21/D2 cDNS.
- 3.8: Southernblot von BAC-Klon 26135 mit der A21/D2-spezifischen Sonde P1-P6.
- 3.9: Schematische Darstellung des genomischen A21/D2 Locus sowie der beiden möglichen Transkripte.
- 3.10: Klonierung des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors.
- 3.11: Inaktivierung des A21/D2 Gens in embryonalen Stammzellen.
- 3.12: Southernblot Analyse der in der Screening-PCR positiven ES-Zell-Klone.
- 3.13: Schematische Darstellung der Generierung von Mäusen aus homolog rekombinierten ES-Zellen durch Blastozysteninjektion.
- 3.14: Southernblot-Analyse der Schwanz-DNS von 12 Nachkommen aus der Verpaarung der Chimären mit C57BL/6 Mäusen.
- 3.15: EGFP-Expression in Knochenmark DC nach *in vitro* Deletion der Neomycin-Resistenzkassette.
- 3.16: Southernblot Genotypisierung von Nachkommen aus der A21/D2-EGFP^{ko/+} x Deleter Zucht.
- 3.17: Southernblot Genotypisierung von Nachkommen aus der homozygoten A21/D2-EGFP^{ko/+} Zucht.
- 3.18: A21/D2 spezifische RT-PCR zum Nachweis der erfolgreichen A21/D2 Inaktivierung.
- 3.19: Analyse der A21/D2-EGFP-Reporterermäuse am Konfokalen Lasermikroskop.

- 3.20: Analyse von GM-CSF generierten BM-DC aus A21/D2-EGFP-Reportermäusen.
- 3.21: Analyse von FLT3L generierten BM-DC aus A21/D2-EGFP-Reportermäusen.
- 3.22: *Ex vivo* Analyse von Zellen aus A21/D2-EGFP-Reportermäusen.
- 3.23: Primaranalyse von A21/D2-defizienten Mäusen.
- 3.24 *In vivo* Neutralisierung von IL-18 durch anti-IL-18 Mab SK113AE-4.
- 3.25: DSS-Kolitis bei BALB/c Mäusen.
- 3.26: DSS-Kolitis bei C57BL/6 Mäusen.
- 3.27: Histologie bei einer DSS-Kolitis an Tag 7 nach 3,5% DSS.
- 3.29: *In vitro* Stimulation von Makrophagen mit HKL.
- 3.30: Versuchsdurchführung bei der Infektion mit *L. monocytogenes*.
- 3.31: Listerientiter in Milz und Leber.
- 3.32: Infektiöse Foci in der Leber.
- 3.33: Restimulation der Milzzellen mit HKL.
- 3.34: spezifische T-Zell Antwort an Tag 7 nach Primärinfektion mit L.m.ova.
- 3.35: Spezifische T-Zell Antwort an Tag 5 nach Sekundärinfektion (recall) mit L.m.ova.
- 4.1: Sequenzhomologien von A21/D2 zu anderen Proteinen.

Tabellenverzeichnis

- 1.1: Gene, die präferentiell in dendritischen Zellen ausgeprägt werden.
- 2.1: Verwendete Antibiotika.
- 2.2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien.
- 2.3: Bakterienstämme.
- 2.4: Zellen und Zelllinien.
- 2.5: Primer zur Generierung des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors.
- 2.6: Primer zur Charakterisierung des A21/D2 Gen-Lokus.
- 2.7: Primer für Sonden zur Charakterisierung der BAC-Klone.
- 2.8: Primer für die "Screening-PCR".
- 2.9: Primer für die A21/D2-EGFP Typisierungs-Sonde.
- 2.10: Primer für die PCR-Typisierung der A21/D2-EGFP Mäuse.
- 2.11: Primer zur Durchführung der A21/D2 RT-PCR.
- 2.12: Mutagenese-Primer für die Herstellung des A21/D2-pEGFP-N1 Klons.
- 2.13: Sequenzierprimer.
- 2.14: Typisierungsprimer für IL-18- und RAG1-defiziente Mäuse.
- 2.15: Verwendete Antikörper.
- 2.16: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren.
- 2.17: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren.
- 2.18: Allgemeiner Ansatz von Restriktionsverdau.
- 2.19: TOPO TA Cloning.
- 2.20: Standard PCR-Bedingungen.

Abkürzungsverzeichnis

α -	anti-
APC	Antigenpräsentierende Zellen
BAC	bacterial artificial chromosome
BM-DC	Knochenmark-DC
bp(s)	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CRD	consensus repeat Domäne
Cre	causes recombination
DC	dendritische Zelle
DD	Differential Display
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Natrium-Dextran-Sulfat
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES-Zelle(n)	Embryonale Stammzelle(n)
EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCS	Fötales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
hCG	human chorionic gonadotropin
HKL	Hitze-inaktivierte Listerien
HSV-TK	Herpes simplex Virus Thymidinkinase
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IL-	Interleukin-
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
L.m.	<i>Listeria monocytogenes</i>
loxP	locus X-ing over P1 phage

Abkürzungsverzeichnis

LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
Mab	Monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic activated cell sorting
MCS	Multiple cloning site
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
Neo	Neomycin Phosphotransferase
Nm	Nanometer
ORF	open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
PMSG	pregnant mare serum gonadotropin
RAG	recombinase activating gene
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium dodecylsulfat
TLR	Toll like receptor
TNBS	Trinitrobenzen-Sulfonsäure
TNF	Tumor Nekrosefaktor
ÜN	über Nacht
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Infektionen mit Pathogenen (Parasiten, Bakterien, Viren und Pilze). Dieser Schutz wird vor allem durch das Zusammenspiel zweier grundlegender Komponenten des Immunsystems, der angeborenen (innaten), sowie der erworbenen (adaptiven), antigenspezifischen Immunantwort gewährleistet (Fearon and Locksley, 1996). Das angeborene Immunsystem besteht aus zellulären Komponenten zu denen z.B. NK-Zellen, NKT-Zellen, Neutrophile und Epithelzellen gehören sowie lösliche Faktoren wie Lysozym, Defensine und das Komplementsystem (Ganz, 2002; Janeway and Medzhitov, 2002). Die Zellen des angeborenen Immunsystems besitzen Rezeptoren, mit denen evolutionär hochkonservierte Strukturen von Pathogenen erkannt werden können. Zu diesen als 'pattern recognition receptors' bezeichneten Rezeptoren gehören unter anderem CD14, der Mannose Rezeptor, DEC205 sowie die Rezeptoren der 'toll like receptor' (TLR) Familie (Medzhitov and Janeway, 1997). Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, Infektionen durch Pathogene frühzeitig zu erkennen und erste wirksame, jedoch relativ unspezifische Abwehrmechanismen in Gang zu setzen. Eine weitere wichtige Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist es, die Infektion den Zellen des adaptiven Immunsystems (T- und B-Zellen, sog. Lymphozyten) zu signalisieren (Matzinger, 1994). Diese reagieren mit der vermehrten Produktion von antigenspezifischen Antikörpern, der Ausbildung zellulärer Immunität sowie der Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses, welches bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen eine schnelle und wirksamere Abwehrreaktion erlaubt.

Zwei Zelltypen, Makrophagen und dendritische Zellen spielen dabei eine besonders wichtige Rolle an der Schnittstelle zwischen angeborenen und adaptiven Immunantworten. So können Makrophagen und dendritische Zellen bereits in der Frühphase von Infektionen durch die Freisetzung von löslichen Faktoren wie Interleukinen, Interferonen oder Chemokinen die angeborene Immunantwort wesentlich beeinflussen und verstärken. Durch ihre grundlegende Fähigkeit, Pathogene wie z.B. Bakterien aufzunehmen und deren Antigene den Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren, spielen Makrophagen und dendritische Zellen zudem eine wichtige Rollen bei der Auslösung und Regulation der adaptiven Immunantwort. Dabei werden phagozytierte Bakterien in einem wohlgeordneten proteolytischen Prozess degradiert und die dabei entstehenden Peptide auf den klassischen MHC-I und MHC-II Molekülen präsentiert. Dieser MHC-Peptid Komplex kann dann von antigenspezifischen CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen

erkannt werden (Watts, 1997). Obwohl Makrophagen traditionell als die wichtigsten APC v.a. bei bakteriellen Infektionen angesehen wurden, scheint ihre Rolle bei der Stimulation naiver T-Zellen *in vivo* eher gering zu sein. Das könnte an einer ungenügenden Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen bzw. ihrer wenig ausgeprägten Fähigkeit von peripheren Geweben in sekundäre lymphoide Organe zu wandern liegen (Unanue, 1993). Im Gegensatz dazu können reife dendritische Zellen effizient naive T-Zellen stimulieren und sind damit wichtig für das Auslösen einer primären Immunantwort (Banchereau and Steinman, 1998).

Ein Ansatz um unser Wissen über die Rolle und Funktion von Antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen und dendritische Zellen zu erweitern ist es, Gene zu identifizieren, die für den jeweiligen Zelltyp spezifisch sind. Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des DC-spezifischen Gens A21/D2.

Eine wichtige Rolle bei der Regulation von Immunantworten durch Makrophagen und DC spielen Interleukine. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb die Funktion von Interleukin-18, ein Zytokin das hauptsächlich von Makrophagen und dendritischen Zellen produziert wird, bei unterschiedlichen Immunantworten untersucht.

1.1 Dendritische Zellen und Makrophagen

1.1.1 Die Ontogenese von dendritischen Zellen

Alle Zellen des Blutes und des Immunsystems stammen von den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Diese Zellen besitzen anfangs ein uneingeschränktes Entwicklungspotential, das sie aber mit zunehmender Differenzierung entlang der verschiedenen Entwicklungslinien des hämatopoetischen Systems wieder verlieren.

Der Ausgangspunkt für die Entwicklung von DC liegt ebenfalls im Knochenmark. Es konnte in sog. 'colony forming assays' zunächst gezeigt werden, dass dendritische Zellen, Makrophagen und Granulozyten einer gemeinsamen Vorläuferzelle entstammen. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) konnte dabei als das wichtigste stimulierende Zytokin identifiziert werden (Inaba et al., 1993). Das DC von myeloiden Vorläuferzellen abstammen, konnte im Folgenden von Sallusto und Lanzavecchia bestätigt werden (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Allerdings zeigte sich im Laufe der Zeit, dass die Entwicklung von DC viel komplexer ist als zunächst angenommen wurde. Heute wird angenommen, dass sich dendritische Zellen nicht nur aus myeloiden, sondern auch aus lymphoiden Vorläuferzellen entwickeln können. Das aktuelle Modell zur Herkunft und Entwicklung von DC in der Maus ist in Figur 1.1 schematisch

dargestellt. Nach diesem Modell wird davon ausgegangen, dass die Differenzierung der DC – einschließlich $CD8^-$, $CD8^+$, plasmacytoider $B220^+$ DC und Langerhanszellen- über Vorläuferzellen sowohl myeloider als auch lymphoider Herkunft geschieht (Traver et al., 2000), sowie zirkulierenden gemeinsamen DC Vorläuferzellen (common DC precursors; pre-DC, del Hoyo et al., 2002). Auf Grundlage des relativen Differenzierungspotentials sowie der absoluten Anzahl von myeloiden Vorläuferzellen (common myeloid precursors; CMP) und lymphoiden Vorläuferzellen (common lymphoid precursors; CLP) konnte gezeigt werden, dass DC im Thymus zu gleichen Teilen von beiden Vorläuferzellen abstammen, während sich periphere DC hauptsächlich aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln (Manz et al., 2001; Wu et al., 2001). Myeloide Vorläuferzellen, die sich zu DC differenzieren, prägen den Marker fms-related tyrosin kinase 3 (FLT3) aus (D'Amico and Wu, 2003). Dem Modell nach stammen 'Lymphoide' DC entweder von lymphoiden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark oder dem Thymus ab. Pre-DC und Monozyten können sich in peripheren Geweben, z.B. bei Vorliegen einer Entzündung ebenfalls zu DC differenzieren (del Hoyo et al., 2002).

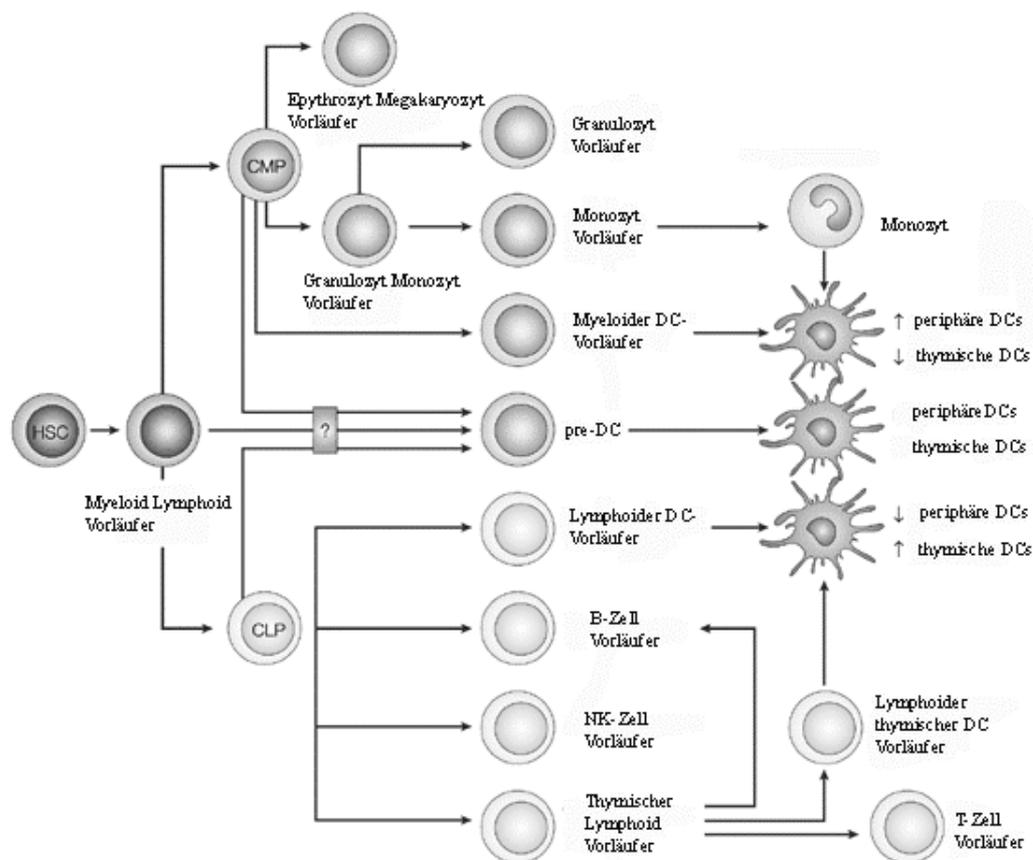


Abbildung 1.1: Theoretisches Modell für die Entwicklung von dendritischen Zellen in der Maus (Ardavin, 2003). HSC: Hämatopoetische Stammzelle; CMP: Myeloide Vorläuferzelle; CLP: Lymphoide Vorläuferzelle.

1.1.2 Die Rolle der dendritischen Zellen in der Immunantwort

Dendritische Zellen sind APC, die auf die Aufnahme, den Transport, die Prozessierung und die Präsentation von Antigenen spezialisiert sind. Die Aufgabe der DC besteht darin, Antigene aus dem peripheren nicht-lymphatischen Gewebe aufzunehmen, zu prozessieren und zu den lymphatischen Organen zu wandern, um den T-Zellen die Fremdpeptide zu präsentieren.

Aufnahme und Prozessierung von Antigenen

Unreife dendritische Zellen können mit Hilfe verschiedener Mechanismen Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen: die Makropinozytose erlaubt den Zellen eine kontinuierliche, nicht-selektive Aufnahme großer Mengen an Flüssigkeit, wohingegen mit Hilfe der Phagozytose oder der Rezeptor-vermittelten Endozytose apoptotische und nekrotische Zellfragmente, Viren und Bakterien bzw. Immunkomplexe oder opsonierte Partikel internalisiert werden können (Albert et al., 1998; Sallusto et al., 1995). Neben den Zellen des Innaten Immunsystems erkennen auch DC pathogene Organismen durch 'pattern recognition receptors', die konservierte chemische Strukturen dieser Organismen erkennen (Medzhitov and Janeway, 1998).

Nach der Internalisierung der Antigene in Endosomen erfolgt deren Prozessierung mit Hilfe von Proteasen zu Peptiden mit einer Länge zwischen 15 und 24 Aminosäuren. Diese werden dann in den reifen DC in sog. MHC-II-reiche Kompartimente transportiert, auf naszierende MHC-II Moleküle geladen und unter Beteiligung des Membran-Glykoproteins DC-LAMP (de Saint-Vis et al., 1998) an die Zelloberfläche transportiert. Dieser Peptid-MHC-II-Komplex bleibt über Tage hinweg stabil und das Peptid kann somit effektiv den CD4⁺ T-Zellen präsentiert werden. Intrazelluläre Antigene werden von zytosolischen Proteasomen zu Peptiden mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren degradiert, im Endoplasmatischen Retikulum auf neu synthetisierte MHC-I Moleküle geladen und CD8⁺ T-Zellen präsentiert.

Dendritische Zellen können phagozytierte Antigene in bestimmten Fällen auch über MHC-I-Moleküle CD8⁺ T-Zellen präsentieren, ein Vorgang, der als 'cross-presentation' bezeichnet wird (Albert et al., 1998; Rodriguez et al., 1999).

Migration und Reifung von dendritischen Zellen

Die Migration von DC in die Bereiche, in denen sie ihre speziellen Funktionen wie Antigenaufnahme (Peripherie) oder T-Zell Aktivierung (T-Zell Bereiche der sekundären

Lymphatischen Organe) ausüben wird zumindest teilweise von Chemokinen bzw. deren Rezeptoren auf DC reguliert. Dabei spielt es eine große Rolle welche Chemokinrezeptoren zu einem bestimmten Zeitpunkt im Lebenszyklus einer DC ausgeprägt werden.

Unreife DC exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR5 und CCR6 und binden die in der Peripherie besonders in Entzündungsreaktionen ausgeprägten Chemokine MIP-1 α und MIP-3 α (Dieu et al., 1998; Sallusto et al., 1998). Im Zuge der Reifung von DC (siehe unten) verlieren die DC die Fähigkeit, auf MIP-1 α und MIP-3 α zu reagieren. Stattdessen prägen sie nun den Rezeptor CCR7 aus, der die Liganden ELC und SLC bindet (Dieu et al., 1998). Der Wechsel der Chemokin-Spezifität korreliert vermutlich mit dem Migrationsverhalten der DC: Unreife DC wandern entlang des Chemokin-Konzentrationsgradienten in nicht-lymphatische Gewebe ein. Nach der Aktivierung steuern sie mit Hilfe der in den sekundären Lymphatischen Organen gebildeten Chemokinen wie ELC und SLC diese an und verteilen sich in den T-Zell Bereichen (Dieu-Nosjean et al., 1999).

Ein wichtiger Vorgang im Lebenszyklus einer dendritischen Zelle ist die sog. Reifung. Unreife DC sind besonders gut in der Lage, Antigene aufzunehmen, insbesondere über Rezeptor-vermittelte Antigenaufnahme. Der Ausdruck 'unreif' beschreibt dabei verschiedene DC in unterschiedlichen Situationen wie z.B. Langerhanszellen in der Epidermis, DC die aus Monozyten mittels GM-CSF und IL-4 differenziert wurden oder viele der DC in lymphoiden Organen die sich im 'steady state', also in nicht-aktiviertem Zustand befinden. Obwohl diese DC z.T. sehr unterschiedlich sind, z.B. in ihrer Fähigkeit MHC-Peptid Komplexe auszubilden, können sie als 'unreife' DC sehr gut Antigene aufnehmen und -nach Erhalt von 'Reifungssignalen'- zu potenten immunstimulatorischen DC ausreifen.

Während der Reifung wird die Expression von Endozytose-Rezeptoren herunterreguliert und die Fähigkeit zur Aufnahme von Antigenen nimmt insgesamt stark ab (Garrett et al., 2000). Dagegen nimmt die Expression von Molekülen, die für die Interaktion mit T-Zellen benötigt werden, wie z.B. den Molekülen der B7 Familie (CD80, CD86, PD-L2/B/-DC, ICOS-L) oder Molekülen der TNF Familie (CD137/4-1BBL, CD134/OX40L, CD70) oder auch des schon beschriebenen Chemokinrezeptors CCR7 stark zu (Garrett et al., 2000). Neben diesen Genen ändert sich auch die Expression von vielen anderen Genen während der Reifung von DC (Granucci et al., 2001a; Granucci et al., 2001b; Huang et al., 2001).

Es gibt viele verschiedene Stimuli, die die Reifung von dendritischen Zellen auslösen können. Viele mikrobiologische Liganden und synthetische Stoffe binden an TLR und kontrollieren bzw. stimulieren so die DC Reifung, z.B. bindet virale RNS und poly I:C an TLR3 (Alexopoulou et al., 2001), mycobakterielle Extrakte an TLR2 und TLR4 (Tsuji et al., 2000), LPS an TLR4,

Imidazolquinoline an TLR7 (Fogel et al., 2002; Hemmi et al., 2002) und bakterielle DNS und CpG Oligonukleotide an TLR9 (Bauer et al., 2001; Hemmi et al., 2000). Neben den Reifungssignalen, die über TLRs aufgenommen werden, gibt es auch nicht-TLR abhängige Reifungsstimuli. Dazu zählen Fcγ Rezeptoren für Immunkomplexe (Kalergis and Ravetch, 2002; Regnault et al., 1999), PIR-B (Ujike et al., 2002) und TREM-2 (Bouchon et al., 2001), deren Liganden noch unbekannt sind, CD100 (Kumanogoh et al., 2002) und einige Mitglieder der TNF Familie wie TNFα, FasL (Rescigno et al., 2000) und insbesondere CD40L (Caux et al., 1994; Cella et al., 1996; Koch et al., 1996). Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen NKT-Zellen aber auch bestimmte nekrotische Zellen können über noch unbekannte Mechanismen die Reifung von DC stimulieren (Gerosa et al., 2002; Vincent et al., 2002). Typ I Interferone scheinen ebenfalls die Reifung von DC auslösen zu können (Luft et al., 1998; Santini et al., 2000). Es sollte aber auch erwähnt werden, dass es auch 'Stimuli' gibt, die die Reifung von DC blockieren. Dazu gehören vor allem einige Pathogene (Rescigno and Borrow, 2001), aber auch synthetische Reagenzien wie 1α,25-Dihydroxyvitamin D3 (Penna and Adorini, 2000).

Am Ende des Reifungsprozesses stehen reife, aktivierte DC die eine wichtige Rolle bei der Induktion von T-Zell Antworten, der T-Zell abhängigen Antikörperproduktion (Inaba et al., 1983) und der T-Zell Proliferation (Klinkert et al., 1982; Steinman and Witmer, 1978) spielen und im hohen Maße dazu befähigt sind, eine Immunantwort auszulösen (Inaba and Steinman, 1984; Inaba and Steinman, 1985). Eine Übersicht über die Prozesse bei der Reifung von dendritischen Zellen zeigt Abbildung 1.2.

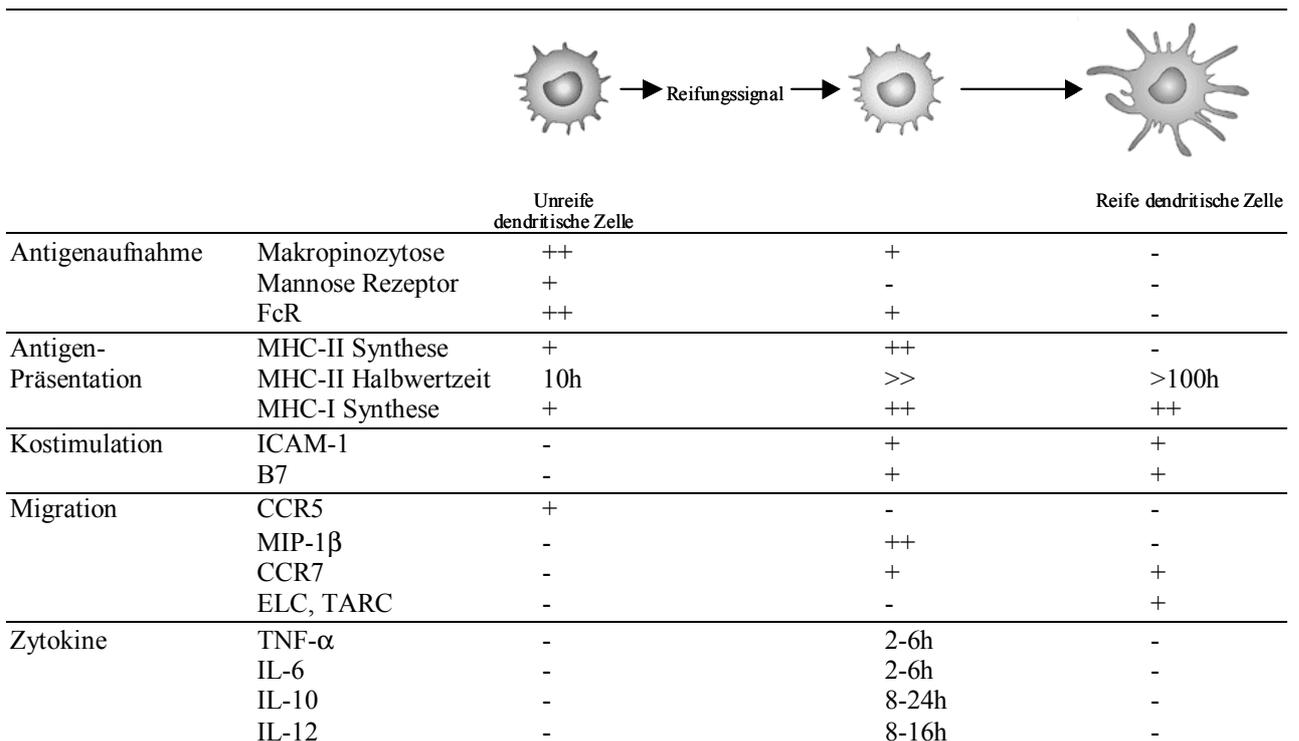


Abbildung 1.2: Reifungsprogramm in dendritischen Zellen (nach Sallusto and Lanzavecchia, 2002).

1.1.3 Die Unterklassen dendritischer Zellen und ihre Funktion bei der T-Zell Aktivierung

In den lymphoiden Organen der Maus können mittlerweile eine ganze Reihe von DC Subtypen aufgrund der Expression der Oberflächenmarker CD8 α , CD4, CD205, CD11c und CD11b unterschieden werden.

Während sich im Thymus zwei Subtypen von DC hinsichtlich der Stärke der CD8 α Expression unterscheiden lassen, konnten in Milz und Lymphknoten drei Subtypen von reifen, CD11c⁺ MHC-II⁺ dendritischen Zellen identifiziert werden: CD4⁺CD8 α ⁻CD205⁻CD11b⁺ DC, CD4⁻CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻ DC und CD4⁻CD8 α ⁻CD205⁻CD11b⁺ DC (Vremec et al., 2000). Diese drei Subklassen gelangen über das Blut in Milz und Lymphknoten, wobei noch nicht geklärt ist, ob sie erst in der Milz reifen oder bereits in reifem Zustand in der Milz ankommen. In den Lymphknoten findet man zusätzlich noch zwei, aus dem Gewebe stammende Subtypen von DC. In verschiedenen Geweben wurden auch B220 und Gr-1 positive plasmacytoide DC nachgewiesen (Martin et al., 2002; Nakano et al., 2001; Nikolic et al., 2002).

CD4⁺CD8 α ⁻CD205⁻CD11b⁺ DC und CD4⁻CD8 α ⁻CD205⁻CD11b⁺ DC werden allgemein als CD8 α ⁻ DC bezeichnet und man findet sie in Milz und Lymphknoten. Sie sind Zellen myeloiden Ursprungs sehr ähnlich, da sie Myeloide Marker wie CD11b, 33D1, F4/80 jedoch nicht CD8 α ausprägen (Pulendran et al., 1997; Vremec et al., 2000). In der Milz findet man sie in der Marginalzone zwischen weißer und roter Pulpa (Crowley et al., 1989; Leenen et al., 1998; Pulendran et al., 1997; Vremec and Shortman, 1997), wobei sie nach Stimulation in die T-Zell Zonen migrieren können (De Smedt et al., 1996; Ingulli et al., 2002). Die CD4⁺CD8 α ⁻ DC unterscheiden sich von den CD4⁻CD8 α ⁻ DC durch ihre höhere Adhäsionsfähigkeit, höhere F4/80 Expression und geringere Zytokinproduktion nach Stimulation (Hochrein et al., 2001). Beide Subtypen besitzen die Fähigkeit, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen effizient zu stimulieren. Es gibt Hinweise, dass CD8 α ⁻ DC die Immunantwort in Richtung Th2 dirigieren, da sie T-Zellen stimulieren, die IL-4, aber wenig IFN- γ produzieren (Kronin et al., 1996; Maldonado-Lopez et al., 1999b; Pooley et al., 2001; Suss and Shortman, 1996).

CD4⁻CD8 α ⁺CD205⁺CD11b⁻ DC werden allgemein als CD8 α ⁺ DC bezeichnet. Sie finden sich hauptsächlich in den T-Zell Bereichen der Milz (Leenen et al., 1998). Neben den phänotypischen Unterschieden, zeigen diese Zellen auch einige funktionelle Unterschiede zu den CD8 α ⁻ DC. Es gibt Hinweise, dass CD8 α ⁺ DC *in vivo* die Immunantwort in Th1 Richtung dirigieren, ein Umstand, der sich mit der Beobachtung deckt, dass aktivierte CD8 α ⁺ DC die Hauptproduzenten

von IL-12 sind (Hochrein et al., 2001; Maldonado-Lopez et al., 1999a; Pulendran et al., 1999). Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Rollen von $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha^-$ DC ist in Figur 1.4 gezeigt.

Die Lymphknoten enthalten insgesamt 5 unterschiedliche DC Subtypen. Zusätzlich zu den drei oben beschriebenen Subtypen findet man in den Lymphknoten noch zwei weitere Subtypen. Der erste Subtyp repräsentiert die reife Form von interstitiellen Gewebs-DC und lässt sich phänotypisch als $CD4^-CD8\alpha^-CD11b^+$ und einer mittleren Expression von CD205 beschreiben. Bei dem zweiten Subtyp handelt es sich um Langerhanszellen ($CD4^-CD8\alpha^{lo}CD205^+CD11b^+$; Henri et al., 2001). Während man die reifen interstitiellen Gewebs-DC in allen Lymphknoten finden kann, sind Langerhanszellen auf die Haut-drainierenden Lymphknoten beschränkt. Reife Langerhanszellen, die sich durch ihre unterschiedliche Ausprägung von Langerin und die sehr starke Expression von MHC-II Molekülen charakterisieren lassen, wirken als ausgezeichnete Stimulatoren für naive T-Zellen.

Plasmacytoide DC in der Maus repräsentieren eine Subklasse von DC, die erst kürzlich in Knochenmark, Thymus, Milz und Lymphknoten identifiziert wurden und B220 sowie Gr-1 ausprägen. Vermutlich gelangen plasmacytoide DC über das Blut in die Lymphknoten. Sie zeigen keine Expression von kostimulatorischen Molekülen und nur eine geringe Ausprägung von MHC-II auf ihrer Oberfläche. Es konnte auch gezeigt werden, dass plasmacytoide DC nach Virus-Infektionen große Mengen an $IFN-\alpha$ produzieren können und somit eine wichtige Rolle bei Antiviralen Immunantworten spielen könnten (Martin et al., 2002; Nakano et al., 2001; Nikolic et al., 2002).

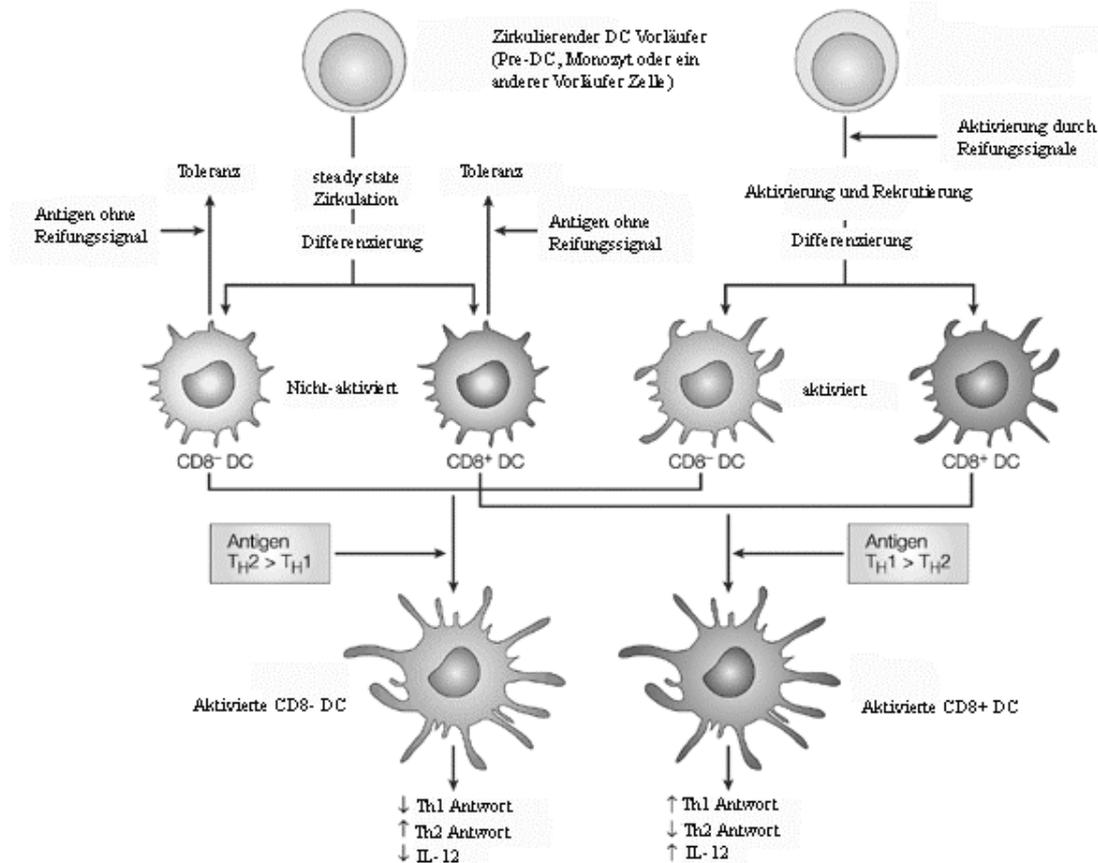


Abbildung 1.3: Modell der CD8 α^+ und CD8 α^- DC Differenzierung, Aktivierung und Funktion (nach Ardavin, 2003). Die Induktion einer T-Zell Antwort könnte von CD8⁺ und CD8⁻ DC abhängen, die sich zum Zeitpunkt des Antigen-Eintritts bereits in lymphoiden Organen befinden (links) und/oder von neu generierten DC, die sich induziert durch Antigen aus zirkulierenden DC Vorläuferzellen differenzieren (rechts). Bei Abwesenheit von Reifungssignalen (danger signals) könnten nicht-aktivierte DC an der Ausbildung von peripherer Toleranz beteiligt sein. Differenzierung von DC aus Vorläuferzellen, die durch Antigen zusammen mit einem Reifungssignal aktiviert und rekrutiert wurden, entwickeln sich zu voraktivierten CD8⁺ und CD8⁻ DC. Nach Aufnahme von Antigen zusammen mit einem Reifungssignal durchlaufen CD8⁺ und CD8⁻ DC ein Aktivierungsprogramm, das letztendlich zur Aktivierung von Antigen-spezifischen T-Zellen führt. CD8⁻ DC antworten hauptsächlich auf Th2-Antigene und induzieren daher eher Th2 gerichtete Immunantworten. Im Gegensatz dazu werden CD8⁺ DC eher durch Th1-Antigene aktiviert und induzieren folglich, v.a. durch hohe IL-12 Produktion, Th1 gerichtete Immunantworten und die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen.

1.1.4 Differenzierung, Verteilung und Aktivierung von Makrophagen

Wie die dendritischen Zellen stammen auch Makrophagen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Bei der Differenzierung von Myeloiden Vorläuferzellen zu Makrophagen spielen Zytokine wie M-CSF (macrophage colony stimulating factor) und GM-CSF, sowie die Interaktion mit Stromazellen der hämatopoetischen Organe eine wesentliche Rolle. Weitere wichtige Faktoren bei der Ausdifferenzierung sind IL-3, KIT, Proteine der TNF-Familie und TNF-Rezeptor verwandte Proteine. Transkriptionsfaktoren wie PU.1 und andere ETS-Familien

Mitglieder tragen ebenso zur Entwicklung von Makrophagen bei. Die Vorläuferzellen entwickeln sich zunächst zu Monozyten, die im Blut zirkulieren und schließlich in die verschiedenen Gewebe des Körpers einwandern. Dort entwickeln sich die Monozyten zu Gewebs-Makrophagen. Die Makrophagen Populationen in den verschiedenen Organen wie z.B. Kupffer-Zellen (Leber), Alveolar Makrophagen (Lunge) oder Osteoklasten (Knochen) können dabei einen sehr unterschiedlichen Phänotyp aufweisen. Für die Entwicklung dieses Gewebs-spezifischen Phänotyps sind Signale von Oberflächen- sowie sekretorischen Proteinen, Nachbarzellen und der extrazellulären Matrix verantwortlich. Adhäsionsmoleküle kontrollieren die Zellmigration aus dem Blut und über das Endothel. Dazu gehören β_1 und β_2 Integrine, Immunglobulin-Superfamilie Moleküle wie CD31, Selektine und EGF-TM7- (epidermal growth factor seven-transmembrane spanning) Rezeptoren. Zytokine wie TGF- β , verschiedene Chemokine und Gewebs-spezifische Wachstumsfaktoren beeinflussen ebenfalls die Entwicklung von Gewebs-spezifischen Makrophagen. Abbildung 1.4 fasst die Differenzierung von Monozyten/Makrophagen zusammen.

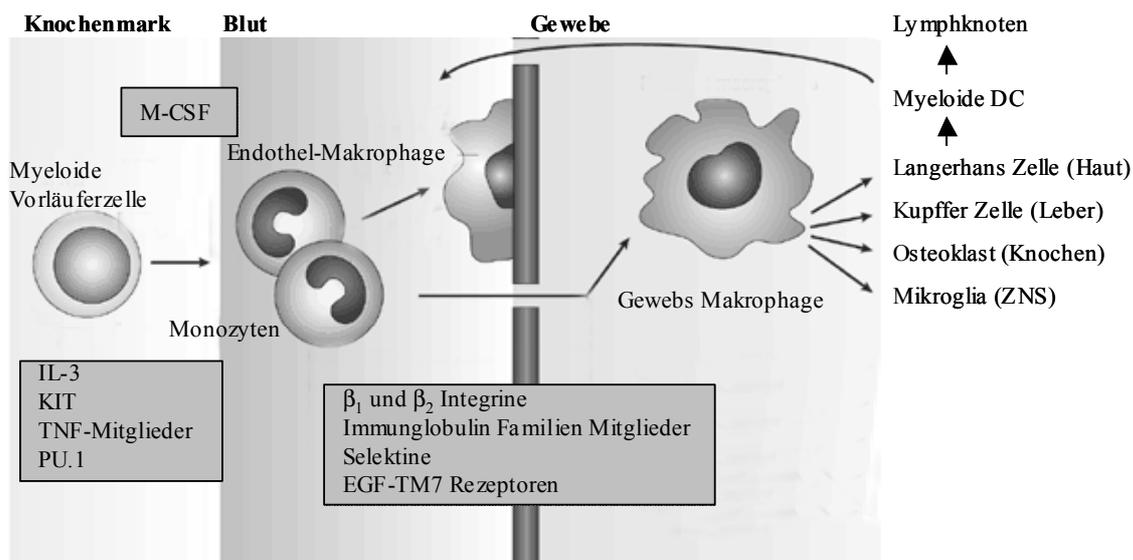


Abbildung 1.4: Differenzierung und Verteilung von Makrophagen (nach Gordon, 2003).

Makrophagen sind in der Lage, mit einer großen Anzahl von endogenen sowie exogenen Molekülen zu interagieren. Das Erkennen dieser Liganden von membranständigen Rezeptoren auf den Makrophagen führt zu intrazellulären Signalprozessen und komplexen Änderungen in der Expression bzw. Repression einer Vielzahl von Genen. Die Folgen sind Veränderungen in der phagozytotischen/endozytotischen Aktivität, der Adhäsion und Migration sowie der Sekretion verschiedener Faktoren und eine erhöhte Prozessierung und Präsentation von Antigenen. In Abbildung 1.5 werden die verschiedenen Möglichkeiten der Makrophagen-Aktivierung und die Art der resultierenden Immunantwort zusammengefasst.

Bei der *innaten Aktivierung* (Abb. 1.5a) werden mikrobielle Stimuli von 'pattern recognition' Rezeptoren wie den TLR, CD14/LPS-Bindendes Protein und einer Reihe von nicht-opsonierenden Rezeptoren erkannt. Diese Stimuli induzieren die Produktion von Proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. IFN α/β , reaktiven Sauerstoff Derivaten und Stickstoff-Oxid (NO). Die *humorale Aktivierung* und Phagozytose (Abb. 1.5b) wird von Fc- und Komplement Rezeptoren vermittelt.

Bei der *klassischen Aktivierung* (Abb. 1.5c) werden die Makrophagen zunächst durch IFN- γ voraktiviert und durch einen nachfolgenden mikrobiellen Stimulus (z.B. LPS) in einen vollständig aktivierten Zustand überführt (Dalton et al., 1993).

Die *alternative Aktivierung* (Abb. 1.5d) wird von IL-4 und IL-13 vermittelt und spielt vor allem bei der Induktion der Immunantwort gegen Parasiten eine wichtige Rolle (Stein et al., 1992).

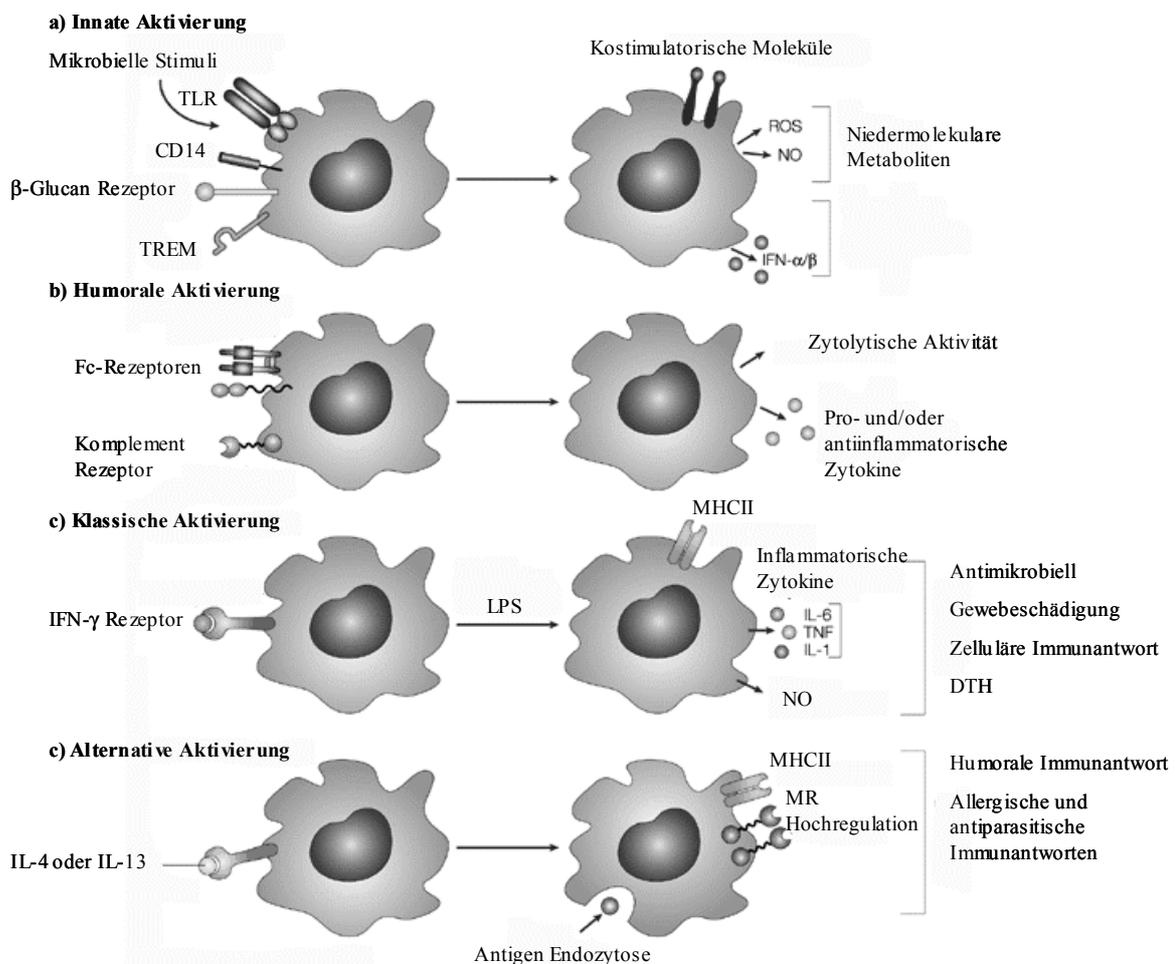


Abbildung 1.5: Verschiedene Möglichkeiten der Makrophagen Aktivierung (nach Gordon, 2003).

DTH, delayed-type hypersensitivity; TREM, triggering receptor expressed on myeloid cells; ROS, reaktive Sauerstoff Derivate.

1.2 Differentiell ausgeprägte Gene zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen in der Maus

1.2.1 Identifizierung differentiell ausgeprägter Gene zwischen dendritischen Zellen und Makrophagen in der Maus durch 'Differential Display'

Die vorliegende Arbeit basiert auf einer 'Differential mRNA Display' (DD)-Analyse zwischen DC und Makrophagen mit deren Hilfe neue, DC-spezifische Gene identifiziert wurden (Lieberam, 1999). Makrophagen wurden als Substraktionspartner ausgewählt, weil diese bezüglich ihrer Ontogenese den DC am nächsten stehen, sich in der Antigenpräsentierenden Funktion jedoch signifikant von diesen unterscheiden. Die DC und Makrophagen wurden *in vitro* aus Maus-Knochenmark 6 Tage lang in der Anwesenheit der Zytokine GM-CSF bzw. M-CSF differenziert. Die beiden Zellpopulationen wurden anschließend mittels FACS isoliert. Die dendritischen Zellen wurden als Gr1⁻ B220⁻ I-E⁺ CD11c⁺ Zellen sortiert, Makrophagen als F4/80⁺ CD11b⁺ Zellen. Dendritische Zellen besaßen die charakteristische Morphologie, die durch lange Filopodien und einen nierenförmigen Nukleus gekennzeichnet war. Makrophagen dagegen waren deutlich größer, wiesen zahlreiche Endosomen auf und zeigten einen runden bis ovalen Nukleus. Um die erfolgreiche Isolierung der beiden Zellpopulationen zu bestätigen, wurden zusätzlich *in vitro* Proliferationsassays durchgeführt. Während die dendritischen Zellen sowohl Antigen-spezifische TCR-transgene CD4⁺ T-Zellen als auch alloreaktive T-Zellen in einer 'mixed lymphocyte reaction' stimulieren konnten, waren die Makrophagen dazu nicht in der Lage (Lieberam, 1999).

Das Genexpressionsmuster der beiden isolierten Zellpopulationen wurde dann mit der Technik 'Differential mRNA Display' verglichen. Zu dem für die Analyse gewählten frühen Zeitpunkt der Zellkultur sind die Mehrzahl der DC noch in einem unreifen Entwicklungsstadium und zeigen, wie Makrophagen, phagozytische Aktivität (Scheicher et al., 1995). Die beiden Zelltypen sollten also die Ausprägung von an Antigen-Aufnahme und -Prozessierung beteiligten Genen gemeinsam haben. Unterschiede wurden in der Expression von Genen, die mit der funktionellen Spezialisierung von DC, etwa der Migration oder Interaktion mit T-Zellen zusammenhängen erwartet.

Bei der DD-Analyse (eine genaue Beschreibung der Methode findet sich bei Liang et al., 1994; und Lieberam and Forster, 1999) wurden die DD-PCR Reaktionen auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt und die Banden mit Autoradiographie sichtbar gemacht. Von insgesamt ca. 10.000 Banden, die mit 192 Primer-Kombinationen (GeneHunter RNAimage Kits 1-

8, Nashville, USA) erzeugt wurden, konnten 40 nicht-redundante, DC-spezifische Fragmente isoliert, reamplifiziert und kloniert werden. Das entspricht ca. 0,5% aller durch die DD-Reaktionen erzeugten PCR Produkte. Ein so geringer Anteil von differentiell zwischen zwei verwandten Zelltypen ausgeprägten cDNS Fragmenten und die hohe Reproduzierbarkeit der in Duplikaten durchgeführten DD-Reaktionen sprach dafür, dass die gewählte Subtraktions-Technik spezifisch war. Zudem fanden sich unter den identifizierten Genen einige, deren Expression bereits in der Literatur als differentiell zwischen DC und Makrophagen beschrieben wurde (z.B. das Membranprotein CD24 (Falkenberg et al., 1989), die Integrin- α_x -Kette CD11c (Metlay et al., 1990) oder das Maus Chemokin C10 (Orlofsky et al., 1991; Orlofsky et al., 1994).

Von 22 der isolierten Gene wurde die Expression mit einem 'RNAse Protection assay' überprüft. Dabei konnten 12 der 22 getesteten Gene als präferentiell in dendritischen Zellen ausgeprägt bestätigt werden (Tabelle 1.1). Ein Teil dieser Gene war in der NCBI-Genbank als bereits charakterisierte mRNA oder als 'Expressed Sequence Tag' (EST) zu finden, andere Gene waren zu diesem Zeitpunkt unbekannt.

Klon	Gen	Typ	mRNS (DC)	mRNS (MΦ)
A34/D1	unbekannt	EST	1,2	<0,1
G40/D1	CD11c	Integrin α -Kette	21,2	0,9
A39/D2	C10	β -Chemokin	>40	2,2
G35/D1	TARC	β -Chemokin	11,2	<0,1
C3/D1	unbekannt	EST	7,0	0,9
G17/D1	unbekannt	EST	1,8	<0,1
C1/D1	A1	bcl2-Homolog	17,5	3,0
G10/D1	ECP	RNAse	1,5	<0,1
G13/D1	unbekannt	?	0,4	<0,1
G20/D1	unbekannt	EST	0,5	<0,1
G41/D2	CD24 (HSA)	kostimulatorischer Rezeptor	17,5	0,5

Tabelle 1.1: Gene, die präferentiell in dendritischen Zellen ausgeprägt werden. Die mRNA-Ausprägung ist relativ zur internen Kontrolle mit 'TATA box binding protein' (TBP) dargestellt. Nach (Lieberam, 1999).

Von den in diesem Differential Display identifizierten, unbekannt Genen wurde das Chemokin TARC genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass murines TARC von aktivierten Langerhanszellen sowie reifen CD11b⁺CD8⁻ myeloiden DC produziert wird. TARC positive DC befinden sich in peripheren lymphoiden und nicht-lymphoiden Organen. In der Milz lässt sich, selbst nach systemischer mikrobieller Infektion, keine TARC Expression nachweisen. TARC-defiziente Mäuse zeigen zudem eine reduzierte Kontakt-Hypersensitivität und eine verzögerte Transplantat-Abstoßung (Alferink et al., 2003; Lieberam and Forster, 1999).

1.2.2 Identifizierung von A21/D2 und Klonierung der A21/D2 cDNS

Neben den in Tabelle 1.1 aufgeführten Genen konnte ein weiteres, DC spezifisches Gen identifiziert werden. Das als A21/D2 bezeichnete Fragment konnte als EST in der NCBI-Datenbank gefunden werden. Zu diesem Zeitpunkt lagen keine Informationen über Expression und Funktion dieses Gens vor. Abbildung 1.6 zeigt einen A21/D2 spezifischen mRNA Protektions-Assay für DC und Makrophagen.

Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurde die volle Länge cDNS von A21/D2 kloniert und sequenziert (Judith Alferink). Die Isolierung erfolgte aus einer λ -Phagen cDNS-Bibliothek aus magnetisch sortierten, mit GM-CSF differenzierten dendritischen Zellen aus dem Knochenmark. Die positiven Klone wurden isoliert, die cDNS-Fragmente in den pCRII-TOPO-Vektor kloniert, sequenziert und zu einer zusammenhängenden vollen Länge von 3776 bp zusammengesetzt.

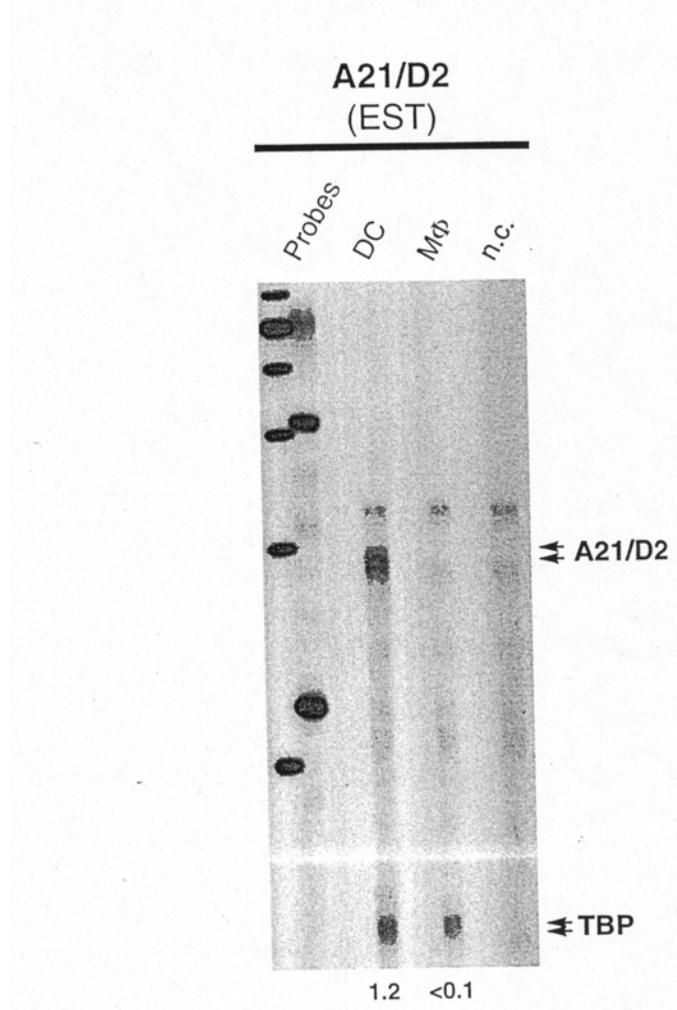


Abbildung 1.6: A21/D2 spezifischer RNase Protektions-Assay zwischen DC und Makrophagen. Die Werte zeigen die A21/D2 Expression relativ zur internen Kontrolle mit TBP an. n.c.: Kontrolle; TBP: TATA box binding protein.

1.3 Interleukin-18

1.3.1 Struktur und Funktion von IL-18

Das Zytokin Interleukin (IL)-18 wurde erstmals 1989 als IFN- γ induzierender Faktor (IGIF) beschrieben (Nakamura et al., 1989). Es wurde aus der Leber von Mäusen isoliert, die mit *Propionibacterium acnes* infiziert und anschließend zur Induktion eines toxischen Schock-Syndoms mit LPS behandelt wurden (Okamura et al., 1995). IL-18 wird als inaktives 24kDa Vorläuferprotein gebildet und wird erst nach der Spaltung durch das IL-1 β converting Enzym (ICE) in seine bioaktive 18kDa Form überführt.

IL-18 mRNA und aktives IL-18 Protein wird von den Kupffer-Zellen der Leber, vor allem aber auch von anderen Makrophagen und dendritischen Zellen produziert. Neben diesen Zellen konnte auch in geringem Maße IL-18 Produktion von T- und B-Zellen, Osteoblasten, Keratinozyten, Astrozyten, Mikrogliazellen sowie den Epithelzellen des Darmes und der Lunge nachgewiesen werden (Cameron et al., 1999; Nakanishi et al., 2001a; Stoll et al., 1998; Takeuchi et al., 1997).

Die wichtigste beschriebene Funktion von IL-18 ist die Induktion von IFN- γ in T- B- und NK-Zellen. Diese IFN- γ Induktion durch IL-18 erfolgt v.a. in Anwesenheit von IL-12 (Okamura et al., 1995; Yoshimoto et al., 1998). In vitro Behandlung von T-Zellen mit IL-18 und IL-12 führt zu einer starken IFN- γ Produktion, ohne gleichzeitige Stimulierung des T-Zell Rezeptors entwickeln sich die T-Zellen aber nicht zu Th1-Zellen (Yoshimoto et al., 1998). Stimulation von T-Zellen mit anti-CD3 und IL-18 führt zu einer starken IFN- γ Produktion, die allerdings durch die Zugabe von anti-IL-12 oder die Verwendung von IL-12 defizienten T-Zellen verhindert werden kann (Chang et al., 2000). IL-18 alleine scheint also nicht die Entwicklung von Th1 T-Zellen induzieren zu können.

Neben T-Zellen können vermutlich auch Makrophagen und DC nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 große Mengen an IFN- γ produzieren und reagieren damit autokrin auf das von ihnen selbst produzierte IL-18 (Fukao et al., 2000; Munder et al., 1998; Munder et al., 2001).

Neben IFN- γ stimuliert IL-18 auch die Synthese von TNF- α , IL-1 α , IL-1 β und IL-6 von Maus-Makrophagen (Netea et al., 2000). Rekombinantes humanes IL-18 stimuliert die TNF- α , IL- β , IL-8, IL-6 und GM-CSF Produktion von humanen T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen und Chondrozyten (Horwood et al., 1998; Olee et al., 1999; Puren et al., 1998). Obwohl IL-18 demzufolge als entzündungsförderndes (proinflammatorisches) Zytokin eingeordnet wurde, zeigen

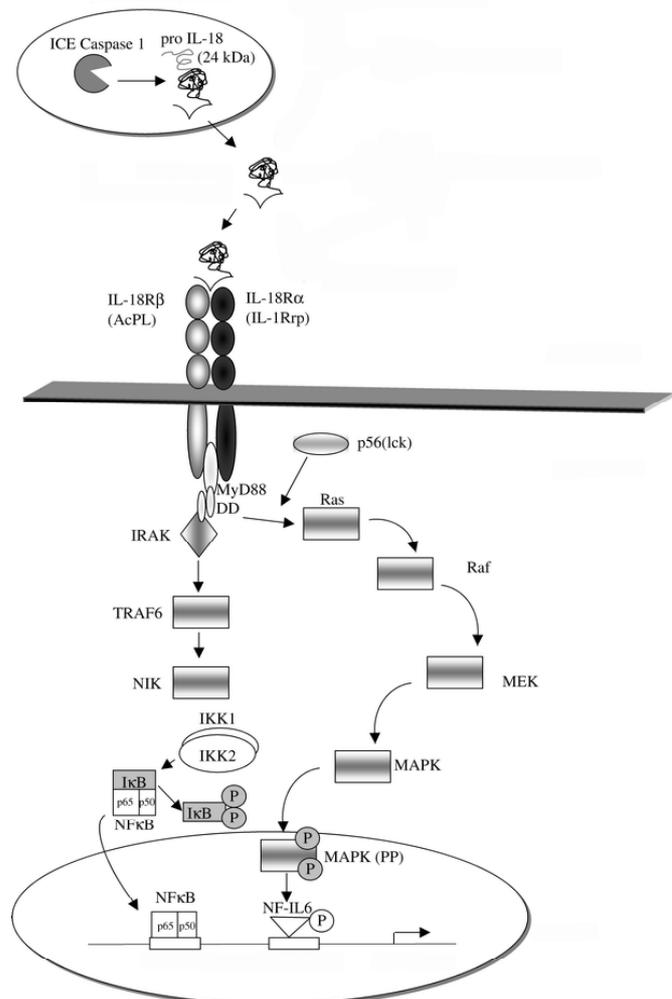
neuere Daten, dass IL-18 bei Abwesenheit von IL-12 das Potential besitzt, die Entwicklung von Th0 und Th2 Zellen zu induzieren und die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 zu stimulieren (Nakanishi et al., 2001b; Xu et al., 2000).

IL-18 bindet an den IL-18 Rezeptorkomplex, der eine große Ähnlichkeit mit dem IL-1 Rezeptor aufweist. Tatsächlich wurde die IL-18-bindende Untereinheit (IL-18R α) zunächst als IL-1 Rezeptor-verwandtes Protein (IL-1R related protein) beschrieben (Parnet et al., 1996). Wie der IL-1 Rezeptor benötigt IL-18 zwei Rezeptor-Untereinheiten (IL-18R α und IL-18R β), um ein Signal auszulösen (Born et al., 1998; Debets et al., 2000). Die Signaltransduktion erfolgt dann ähnlich wie bei IL-1. Der heterodimere Rezeptorkomplex rekrutiert MyD88 und IRAK (IL-1-receptor-activating-kinase). Phosphoryliertes IRAK aktiviert TRAF-6 (TNFR-associated Factor-6) welches seinerseits NIK phosphoryliert (NF κ B-inducing-kinase). Das führt zu einer Aktivierung von IKK (Inhibitory- κ B-kinase) und Phosphorylierung von I κ B. Phosphoryliertes I κ B katalysiert daraufhin die Freisetzung der p50 und p65 Komponenten von NF κ B. Freies NF κ B wandert schließlich in den Kern und führt dort zur DNS-Transkription (Biet et al., 2002).

Abbildung 1.7 fasst den Signaltransduktionsweg von IL-18 zusammen.

Abbildung 1.7: IL-18 Signaltransduktion:

Aktivierung von pro-IL-18 durch das IL-1 β converting enzyme (ICE) führt zur Freisetzung von bioaktivem IL-18. Die Bindung von IL-18 an den heterodimeren IL-18 Rezeptor Komplex führt zur Signaltransduktion über MyD88 bis zur Aktivierung von NF κ B oder alternativ zur Aktivierung des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges.



Während frisch isolierte T- und B-Zellen den IL-18 Rezeptor nicht exprimieren, führt die Kultivierung dieser Zellen in Anwesenheit von IL-12 zur Produktion von IL-18 mRNA und zur Hochregulierung des IL-18 Rezeptors auf der Oberfläche der Zellen. Als Konsequenz exprimieren nur Th1 Zellen, nicht aber Th2 Zellen den IL-18 Rezeptor. Da IL-18 die Expression der IL-12R β 2 Untereinheit auf T-Zellen induziert, kann der Synergismus von IL-18 und IL-12 für die Produktion von IFN- γ zumindest zum Teil durch die gegenseitige Hochregulierung der Rezeptoren erklärt werden (Chang et al., 2000; Yoshimoto et al., 1998).

Nachdem IL-18 selbst kein Th1 induzierendes Potential besitzt, liegt der Effekt von IL-18 bei der Entwicklung von Th1 Zellen hauptsächlich an der Fähigkeit von IL-18, die Hochregulierung des IL-12 Rezeptors zu induzieren und damit die IL-12 vermittelte Th1 Differenzierung anzutreiben (Chang et al., 2000).

1.3.2 Die Rolle von IL-18 bei der Regulation der Immunantwort in vivo

Durch die verminderte IFN- γ Produktion sind IL-18-defiziente Mäuse nur noch eingeschränkt in der Lage, eine Th1 gerichtete Immunantwort zu entwickeln. IL-18-defiziente Mäuse zeigen deshalb auch eine stark veränderte Immunantwort gegen mikrobielle Infektionen (Hochholzer et al., 2000; Takeda et al., 1998; Wei et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass IL-18 eine wichtige Rolle bei der Abwehr von intrazellulären Bakterien und Parasiten spielt, hauptsächlich durch eine Induktion der IFN- γ -, NO- und TNF- α -Produktion von Makrophagen (Nakanishi et al., 2001a; Swain, 2001). IL-12 und IL-18 werden benötigt für eine optimale zytolytische Funktion von NK-Zellen. Mäuse, denen beide Zytokine fehlen, zeigen kaum nachweisbare NK-Zell Aktivität. Dagegen führte eine Injektion von IL-18 zu verstärkter NK-Zell Aktivierung und einer verstärkten Resistenz gegenüber *Toxoplasma gondii* Infektionen (Cai et al., 2000).

Hinsichtlich der Pathogenese von autoimmun – und chronisch-entzündlichen Krankheiten wurde eine erhöhte IL-18 Produktion in Zusammenhang mit der Entwicklung von 'endotoxin-induced liver injury' (Sakao et al., 1999), Septischer Schock (Hochholzer et al., 2000), allergischem Asthma (Wild et al., 2000), experimenteller allergischer Encephalomyelitis (Shi et al., 2000) und auch Rheumatoider Arthritis gebracht. In der Synovial-Flüssigkeit von Patienten mit Rheumatoider Arthritis konnte eine erhöhte IL-18 Konzentration nachgewiesen und in Zusammenhang mit der Produktion von TNF- α , IFN- γ und NO durch Synovial-Zellen dieser Patienten gebracht werden (Gracie et al., 1999). Die Neutralisation von IL-18 mit polyklonalen anti-IL-18 Antikörpern in einem Mausmodell für Arthritis, der Streptokokken-Zellwand-Arthritis,

fürte zu einer signifikanten Reduktion der Krankheitssymptome und der lokalen Produktion von TNF- α und IL-1 β (Joosten et al., 2000; Plater-Zyberk et al., 2001).

1.3.3 Die Rolle von IL-18 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Infektionen mit *Listeria monocytogenes*

Wie beschrieben, spielt IL-18 eine wichtige Rolle bei der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ , TNF- α , IL-1 und IL-6. Diese Zytokine werden in der Frühphase bakterieller Infektionen freigesetzt und tragen wesentlich sowohl zur Kontrolle der Infektion durch die angeborene Immunantwort, als auch zur Entwicklung einer effektiven adaptiven Immunantwort bei. Eine erhöhte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wird, wie oben beschrieben, auch mit den pathologischen Veränderungen bei chronisch-entzündlichen- und Autoimmunerkrankungen in Zusammenhang gebracht.

Die therapeutische Blockade von wichtigen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α kann bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen sowohl im Tiermodell, als auch in der klinischen Anwendung (M. Crohn, rheumatoide Arthritis (Nahar et al., 2003; Suryaprasad and Prindiville, 2003)) zu einer deutlichen Verbesserung des Krankheitsverlaufs führen. Dem positiven Effekt der TNF- α Blockade steht allerdings die Gefahr einer erhöhten Anfälligkeit gegen mikrobielle Erreger gegenüber (Keane et al., 2001).

In dem zweiten Teil dieser Arbeit wurde deshalb der Frage nachgegangen, inwieweit sich mit der Blockade von IL-18 positive Effekte bei entzündlichen Erkrankungen erzielen lassen und ob im Gegenzug eine erhöhte Anfälligkeit gegen bakterielle Erreger besteht.

Die Rolle von IL-18 bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen

Als ein Modell für chronisch-entzündliche Erkrankungen wurde in dieser Arbeit die Auswirkungen der IL-18-Blockade auf die Induzierbarkeit und den Verlauf von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Mausmodell untersucht.

Die Hinweise verstärken sich, dass bei der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED), v.a. bei Morbus Crohn, eine Fehlregulierung der Zytokinproduktion in Richtung einer Th1 gerichteten Immunantwort vorliegt (Parronchi et al., 1997; Powrie et al., 1994; Targan and Murphy, 1995). Den ersten Hinweis für eine Beteiligung von IL-18 bei der Pathogenese von CED lieferten zwei Studien, die eine erhöhte IL-18 Produktion sowohl auf Ebene der mRNA als auch des bioaktiven Proteins in entzündetem Darmgewebe von Patienten mit M.

Crohn nachweisen konnten (Monteleone et al., 1999; Pizarro et al., 1999). Im Vergleich zu Darmgewebe von Patienten mit Ulcerativer Kolitis (UC) oder gesunden Kontroll-Personen konnte im Darm von Patienten mit M. Crohn mittels RT-PCR eine erhöhte Anzahl an IL-18mRNS-Transkripten in mononukleären Zellen der Lamina Propria festgestellt werden. Während das inaktive 24kDa IL-18 Vorläuferprotein sowohl im Darmgewebe von Patienten mit UC, M. Crohn und gesunden Kontrollen nachgewiesen werden konnte, war das bioaktive 18kDa IL-18 Protein vor allem in entzündeten Darmbereichen von Patienten mit M. Crohn, weniger bei Patienten mit UC und gar nicht bei den gesunden Kontrollen zu finden. Die histochemische Untersuchung von Kolon-Mukosa von Crohn-Patienten zeigte ein starke IL-18-spezifische Färbung des Darmepithels und Zellen der Lamina Propria. IL-18-positive Zellen konnten als intestinale Epithelzellen, Makrophagen und DC identifiziert werden. In einer weiteren Studie konnten Kanai et al. zeigen, dass im Serum von Patienten mit M. Crohn eine erhöhte IL-18 Konzentration vorliegt (Kanai et al., 2000). Auch in dieser Studie konnte eine große Anzahl an IL-18-positiven mononukleären Zellen in der Lamina Propria von Patienten mit M. Crohn nachgewiesen werden, nicht aber bei gesunden Kontroll-Patienten. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von BALB/c Mäusen mit IL-12 und IL-18 Gewichtsverlust, Diarrhöe und eine Entzündung des Dün- und Dickdarmes auslöst (Chikano et al., 2000).

Die Rolle von IL-18 bei einer Infektion mit Listeria monocytogenes im Mausmodell

Listeria monocytogenes ist ein Gram positives, fakultativ intrazelluläres Bakterium das lebensbedrohliche Infektionen in immunsupprimierten Individuen, Neugeborenen oder alten Menschen verursachen kann (Schlech, 1996).

Die Immunität gegen Listerien wird hauptsächlich von proinflammatorischen Zytokinen reguliert, die von aktivierten Makrophagen, DC und Lymphozyten sekretiert werden (Mocci et al., 1997; Unanue, 1996; Unanue, 1997a). In der Frühphase der Infektion spielen IFN- γ assoziierte Mechanismen der innaten Immunantwort eine zentrale Rolle bei der Abwehr der Listerieninfektion. IFN- γ induziert in Makrophagen die Produktion von antibakteriellen Faktoren wie NO und TNF- α . Dies führt zur Rekrutierung von Neutrophilen, die dann die Listerien töten können (Beckerman et al., 1993; Buchmeier and Schreiber, 1985; Dunn and North, 1991; Tripp et al., 1994). Neuere Studien belegen, dass Listerienbestandteile direkt Makrophagen und dendritische Zellen über Toll-like-Rezeptoren zur Produktion von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN- γ -induzierenden Zytokinen wie IL-18 und IL-12 stimulieren können (Edelson and Unanue, 2002; Flo et al., 2000; Seki et al., 2002). Es gibt bislang nur wenige Studien, die sich direkt mit der Rolle

von IL-18 bei einer Infektion mit *L. monocytogenes* beschäftigten. In diesen Studien konnte unter anderem gezeigt werden, dass von Listerien infizierten Makrophagen freigesetztes IL-12 und IL-18 synergistisch die IFN- γ Produktion von NK-Zellen und DC induziert (Nakanishi et al., 2001b). Eine wichtige Rolle für IL-18 bei der Kontrolle der Infektion mit *L. monocytogenes* wurde auch in einer Studie von Neighbors et al. beschrieben (Neighbors et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der IL-18-Blockade auf den Verlauf einer Infektion mit *L. monocytogenes* untersucht.

1.4 Zielsetzung

Bei der Regulation der Immunantwort spielen Antigenpräsentierende Zellen (APC) eine entscheidende Rolle. Vor allem dendritische Zellen und Makrophagen stehen dabei an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunantwort und beeinflussen durch die Produktion von löslichen Faktoren wie z.B. Zytokine die Immunantwort in der Frühphase einer Infektion. Durch ihre besondere Befähigung Antigen aufzunehmen, zu prozessieren und den Zellen des erworbenen Immunsystems zu präsentieren, sind sie zudem maßgeblich an der Etablierung der zellulären Immunantwort beteiligt.

Um Gene zu identifizieren, die spezifisch für diese beiden Zelltypen sind, wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein Differential Display zwischen aus Maus-Knochenmark generierten DC und Makrophagen durchgeführt. Dabei wurden mehrere Gene gefunden, die spezifisch in DC ausgeprägt wurden. Ziel des ersten Abschnitts dieser Arbeit war es, eines dieser Gene –A21/D2– in seiner Struktur, genomischen Lokalisation und Expression in murinen Organen und Geweben charakterisieren. Dazu sollte eine A21/D2 spezifische EGFP-Reporter 'Knock-in' Mausmutante generiert und das Expressionsmuster von A21/D2-EGFP in den Geweben und Zellen dieser Mauslinie analysiert werden.

Bei Interleukin-18 handelt es sich um ein hauptsächlich von Makrophagen und dendritischen Zellen produziertes Zytokin. Durch sein IFN- γ -induzierendes Potential wurde IL-18 eine proinflammatorische Rolle zugesprochen. Ziel des zweiten Abschnitts dieser Arbeit war die Untersuchung der Rolle von IL-18 bei chronischen Entzündungsreaktionen sowie bei der Immunantwort gegen bakterielle Erreger. Dazu sollte die Auswirkung der IL-18-Blockade an verschiedenen Mausmodellen für entzündliche Darmerkrankungen und bei der Infektion mit *Listeria monocytogenes* untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
λ /Hind-DNS Längenstandard	Invitrogen, Taufkirchen
γ - ³² P-dATP	Amersham, Braunschweig
α - ³² P-dCTP	Amersham, Braunschweig
β -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
1 kb-DNS Längenstandard	Invitrogen, Karlsruhe
10X PBS	Biochrom, Berlin
20X SSC	Invitrogen, Karlsruhe
20X SSPE	Invitrogen, Karlsruhe
2-Methylbutan	Sigma, Taufkirchen
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
Chloramphenicol	Sigma, Taufkirchen
ConcanavalinA	Sigma, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Taufkirchen
Desoxynukleotide (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe
Dextransulfat	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dithiothreoxat (DTT)	Sigma, Taufkirchen
DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ficoll Typ 400	Amersham, Braunschweig
Formaldehyd	Sigma, Taufkirchen

Formamid	Sigma, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Gancyclovir (Cymeven)	Syntex
Geneticin (G418)	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol	Apotheke, Klinikum rechts der Isar
Kanamycin	Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Lidocain	Curasan, Kleinostheim
Methylenblau	Merck, Darmstadt
Mitomycin C	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-[N-Morpholino] Propansulfonsäure)	Sigma, Taufkirchen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdextransulfat (DSS)	Pierce, USA
Natriumdodecylsulphat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nilrot	Sigma, Taufkirchen
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
salmon sperm DNS (ssDNS)	Invitrogen, Karlsruhe
Saponin	Sigma, Taufkirchen
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma, Taufkirchen
Thioglykolat	Sigma, Taufkirchen
Topro-3	Molecular Probes, USA
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
TRIZOL	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
Tween20	Sigma, Taufkirchen
Xylencyanol	Sigma, Taufkirchen
Hämatoxilin	Sigma, Taufkirchen
Eosin	Sigma, Taufkirchen

2.1.2 Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe
T4-Polynukleotidkinase	Invitrogen, Karlsruhe
Bakterielle Alkalische Phosphatase	Invitrogen, Karlsruhe
Herculase	Stratagene, Amsterdam
Kollagenase D	Sigma, Taufkirchen
DNase I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.1.3 Reagenzien, Kits und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien	Bezugsquelle
Ligationskit	TaKaRa Bio Inc., Japan
TOPO-TA-Cloning-kit	Invitrogen, Karlsruhe
Whatman Papier	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonmembran Gene-screen-plus	Perkin Elmer, Zaventem
DNA-Quantification kit	BioRad, München
Zellsieb (70 und 100µm)	Falcon, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector/Linearis, Wertheim
Vectashield mounting medium	Vector/Linearis, Wertheim
Rediprime	Amersham, Braunschweig
DAKO-Pen	DAKO, Glostrup
Quiagen-Maxi-Filterprep	Quiagen, Hilden
Quiagen Gelextraction-kit	Quiagen, Hilden
Cryomold Gewebeschälchen	Miles Inc., USA
Jung Einbettmedium	Leica, Nussloch
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Microspin Säulchen	Amersham, Braunschweig
Plastikwaren	NUNC, Wiesbaden

	Falcon, USA
	Corning, USA
Kryoröhrchen	Peske oHG, Aindling-Pichl
Rotilabo [®] Kassetten für Biopsien	Roth, Karlsruhe
Elektroporations-Küvetten	BioRad, München
Entellan	Merck, Darmstadt
MACS-Säulen	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Nova-Red	Vector/Linearis, Wertheim
ELISA-Kits	Pharmingen, Heidelberg
Peptide (SIINFEKL, LLO ₁₉₀₋₂₀₁)	Affina GmbH, Berlin
GolgiPlug	Pharmingen, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm	Pharmingen, Heidelberg
PermWash	Pharmingen, Heidelberg
EMA	Moleclar Probes, Kalifornien

2.1.4 Geräte

Gerät	Hersteller
Ultra-Turrax	Ultra-Turrax T25, IKA Labortechnik, Staufen
UV-Crosslinker	UV Stratalinker [®] 2400, Stratagene, Heidelberg
Phosphoimager	Storm 840, Molecular dynamics, USA
UV-Photometer	Ultraspec 3000pro, Amersham, Hanau
Geldokumentation	Eagle EYE II, Stratagene, Heidelberg
Durchflußzytometer	FACScalibur, Becton Dickinson, USA
Mikroskope	Zeiss Axiovert 25, Zeiss, Jena Zeiss AxioLab, Zeiss, Jena LSM 510, Zeiss, Jena
PCR-Maschinen	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, Biozym, Oldendorf TrioThermoblock, Biometra, Göttingen
Elektroporations Gerät	Gene Pulser, BioRad, München
Fluorometer	VersaFluor [™] , BioRad, München
MACS	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Brutschrank	Cytoperm 2, Heraeus, Hanau
Elektrophorese von DNS und RNS	BioRad, München

Kryotom	Jung CM 3000, Leica, Nussloch
Kühlzentrifugen (Heraeus, Sorvall)	Sorvall® RC 26 Plus, Heraeus, Hanau Variofuge 3.0RS, Heraeus, Hanau Biofuge Stratos, Heraeus, Hanau
Spannungsquelle	BioRad, München
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Tischzentrifugen	Biofuge pico/fresco, Heraeus, Hanau
ELISA-Reader	Tecan Sunrise

2.2 Medien und Puffer

2.2.1 Stammlösungen und Puffer

Stammlösung oder Puffer	Zusammensetzung	
PBS	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	80,9 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
		pH: 7,4
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	50% (v/v)	Phenol pH: 8,0
	48% (v/v)	Chloroform
	2% (v/v)	Isoamylalkohol
TE-Puffer	10 mM	Tris pH: 8,0
	1 mM	EDTA pH: 8,0
TNE-Puffer	10 mM	Tris pH: 8,0
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA pH: 8,0

Material und Methoden

Transferpuffer (Southern)	0,4 N	NaOH
	0,6 M	NaCl
Neutralisationslösung (Southern)	0,5 M	Tris pH: 7
	1 M	NaCl
Hybridisierungslösung (Southern)	1 M	NaCl
	50 mM	Tris pH: 7,5
	10% (w/v)	Dextransulfat
	1% (w/v)	SDS
	0,5 mg	ssDNS/ml
Proteinase K	10 mg/ml	in H ₂ O _{bidest} gelöst
Verdauung (für die Isolierung chromosomaler DNS)		
I. SNET-Puffer für Southern	20 mM	Tris pH: 8,0
	5 mM	EDTA pH: 8,0
	400 mM	NaCl
	1% (w/v)	SDS
	400 µg/ml	Proteinase K
II. für PCR-Typisierung	100 mM	Tris pH: 8,5
	5 mM	EDTA pH: 8,5
	200 mM	NaCl
	0,2% (w/v)	SDS
	100 µg/ml	Proteinase K
III. Lysis-Puffer für ES-Zellen	500 µl	TNE
	50 µl	10% SDS
	7,5 µl	Proteinase K

Material und Methoden

10x TAE-Puffer	0,4 M	Tris pH: 8,0
	0,01 M	EDTA
	0,2 M	Eisessig
6x DNS Auftragspuffer	15 %	Ficoll Typ 400
	0,05 %	Bromphenolblau
	0,05%	Xylencyanol
10x MOPS-Puffer	200 mM	MOPS
	50 mM	Natriumacetat
	10 mM	EDTA pH:7,2
20x SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Trinatriumcitrat
20x SSPE	3 M	NaCl
	0,2 M	NaH ₂ PO ₄
	0,02 M	EDTA pH: 7,4
Waschpuffer (Southern)		
I.	2x	SSC
	0,1% (w/v)	SDS
II.	0,5x	SSC
	0,1% (w/v)	SDS
FACS-Puffer	1x	PBS
	0,5% (w/v)	BSA
	0,01% (w/v)	Natriumazid
10x PCR-Puffer	500 mM	Tris pH: 8,3
	33 mM	MgCl ₂
	200 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
	75 mM	β-Mercaptoethanol

Erythrozyten Lysepuffer	1,55 M	NH ₄ Cl
	100 mM	KHCO ₃
	10 mM	EDTA
		pH: 7,2
Methylenblau Färbelösung	0,5 M	Natriumacetat pH: 4,8
	0,04% (w/v)	Methylenblau
50 x Denhardts	1% (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
	1% (w/v)	Ficoll Typ 400
	1% (w/v)	BSA
Kollagenase-Lösung	1 mg/ml	Kollagenase Typ VIII
	200 U/ml	DNase I
	1x	PBS
Hybridisierungslösung (Northern)	5x	SSPE
	5x	Denhardts
	1% (w/v)	SDS
	10% (w/v)	Dextransulfat
	50% (v/v)	Formamid
Waschlösung (Northern)		
I.	2x	SSPE
II.	2x	SSPE
	2% (w/v)	SDS
III.	0,1x	SSPE
Transferpuffer (northern)	10x	SSC

Material und Methoden

dNTP-Mix	1 mM	dATP
	1 mM	dCTP
	1 mM	dTTP
	1 mM	dGTP
RNS-Elektrophoresepuffer	1x	MOPS
MACS-Puffer	1x	PBS
	2 mM	EDTA
	0,5% (w/v)	BSA
Puffer-P1	50 mM	Tris pH: 8,0
	10 mM	EDTA
	100 µg/ml	RNase A
Puffer-P2	200 mM	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Puffer-P3	3,0 M	Kaliumacetat pH: 5,5
Puffer-QBT	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS pH: 7,0
	15% (v/v)	Isopropanol
	0,15% (v/v)	Triton X-100
Puffer-QC	1,0 M	NaCl
	50 mM	MOPS pH: 7,0
	15% (v/v)	Isopropanol
Puffer-QF	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris pH: 8,5
	15% (v/v)	Isopropanol

Material und Methoden

4% Paraformaldehyd-Lösung	4% (w/v) 1 x	Paraformaldehyd PBS
bis ca. 65°C erhitzen, 1 N NaOH zutropfen bis sich das Paraformaldehyd gelöst hat		
5% Sucrose-Lösung	5 % (w/v) 1 x	Sucrose PBS
10% Sucrose-Lösung	10 % (w/v) 1 x	Sucrose PBS
20% Sucrose-Lösung	20 % (w/v) 1 x	Sucrose PBS
TRIS/TWEEN	0,01 M 0,05% (v/v)	Tris pH: 7,6 Tween 20
TRIS/TWEEN/1% BSA	1 x 1 % (w/v)	TRIS/TWEEN BSA
Einbettmedium	33% 66%.	Tissue Tek 20% Sucrose-Lösung
EMA-Mischung	2 ml 2 µl 20 µl	FACS Puffer EMA Fc-Block

2.2.2 Medien für die Bakterienkultur

Zur Anzucht der Bakterien (E.coli) für die Klonierungen wurde ausschließlich Luria-Bertani (LB) Medium verwendet

Material und Methoden

LB-Medium	10g	Trypton
	5g	Hefeextrakt
	10g	NaCl
	ad 1 l	H ₂ O _{bidest}
LB-Festmedium	15g	Bactoagar
Brain-heart infusion agar (BHI-Agar)	37g/l	Brain-heart Infusion

Das Medium wurde durch autoklavieren (121°C/1 bar/20 min) sterilisiert. Für die Herstellung von LB-Festmedium für Agarplatten wurde der Bactoagar vor dem Autoklavieren zugegeben.

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurden dem Medium folgende Antibiotika beigefügt

Tabelle 2.1: verwendete Antibiotika

	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	100 µg/ml
Chloramphenicol	25 mg/ml in Ethanol	12,5µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H ₂ O _{bidest}	100µg/ml

Um positive Klone langfristig zu konservieren, wurden Glycerin-Stocks von Übernacht-Kulturen angelegt:

20%	steriles Glyzerin
30%	LB-Medium
50%	LB-Medium aus Übernacht-Kultur

Die Glycerin-Stocks wurden bei -80°C aufbewahrt

2.2.2 Medien für die Zellkultur

Zur Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden folgende Medien und Zusätze verwendet:

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien

	<u>Zelltypen</u>				
	ES	EF	DC	T 293	Milzzellsuspensionen
Basismedium	DMEM	DMEM	DMEM	DMEM	RPMI1640
Zusätze					
FCS	15%	5%	10%	10%	10%
L-Glutamin	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Penicillin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
Streptomycin	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml	100 U/ml
β-ME	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM	0,05 mM
GM-CSF*			10%		
LIF**	1%				

* GM-CSF wurde als Kulturüberstand des GM-CSF produzierenden Klons X63Ag8-653 zugesetzt.

** LIF wurde als Kulturüberstand des LIF produzierenden Klons CHO-LIF-D zugesetzt.

2.3 Bakterienstämme, Zelllinien und Versuchstiere

2.3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind unter Angabe des Genotyps in Tabelle 2.3. aufgelistet.

Tabelle 2.3: Bakterienstämme	
Bakterienstamm	Genotyp
E. coli TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mmr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> <i>araD139</i> Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>
E. coli DH5α	F ⁻ Φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ ,m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>
E. coli DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>endA1 recA1</i> <i>deoR</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>araD139 galU galK nupG rpsL</i>
Für die Listerieninfektionen wurde der Ovalbumin sekretierende Listerienstam L.m.ova verwendet	
<i>Listeria monocytogenes</i> -ova	Ref.: Pope et al., 2001

2.3.2 Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen und Zelllinien sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Zellen und Zelllinien	
Zelllinie	Herkunft
T 293	humane embryonale Nierenzelllinie
DC	Kultivierung aus Knochenmarksvorläuferzellen mit GM-CSF
EF-Zellen	embryonale Fibroblasten am Tag 14.5 Postcoitus aus CD1 Embryonen
ES-Zellen E14.1	embryonale Stammzellen aus dem Mausstamm 129/Ola gewonnen

2.3.3 Versuchstiere

Alle Mäuse wurden im spezifisch pathogenfreien (SPF) Bereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gezüchtet und gehalten.

Als Blastozystenspender dienten C57BL/6 Mäuse, als Ammenmütter (C57BL/6 x BALB/c)F1 Tiere. Die A21/D2-EGFP Mutation wurde auf den C57BL/6 Stamm rückgekreuzt ausgehend von (C57BL/6 x 129/Ola) F1 A21/D2-EGFP Mäusen.

Zur Elimination der Neomycin-Resistenzkassette wurden A21/D2-EGFP (C57BL/6 x 129Ola)F1 Tiere mit Deleter Mäusen (Rajewsky et al., 1996; Sternberg, 1981; Sternberg and Hamilton, 1981; Sternberg et al., 1981) oder CD11c cre3 Mäusen (Förster, I. unveröffentlicht) gekreuzt. Daraus resultierende Tiere wurden mittels Southernblot Analyse oder PCR-Typisierung auf eine erfolgreiche Deletion der Neomycin-Resistenzkassette untersucht.

Für die Kolitis-Experimente wurden C57BL/6 und BALB/c Wildtypmäuse, sowie IL-18^{ko/ko} (Hochholzer et al., 2000) Mäuse auf C57BL/6 bzw. BALB/c Hintergrund verwendet. Für die Transferkolitis wurden RAG1^{ko/ko} (Mombaerts et al., 1992), sowie RAG1^{ko/ko}IL-18^{ko/ko} Mäuse verwendet.

Für die Listerienexperimente wurden C57BL/6 sowie IL-18^{ko/ko} Mäuse auf dem C57BL/6 Hintergrund verwendet und im S2 Bereich des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München gehalten.

2.4 Primer und Antikörper

2.4.1 Primer

Alle in diesem Kapitel aufgeführten Primer wurden von der Firma TIB Molbiol (Berlin) oder MWG (Ebersberg) hergestellt.

Die Primer wurden nach Erhalt in H₂O_{bidest} in einer Konzentration von 100 pmol/μl gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

Die in Tabelle 2.5 aufgelisteten Primer wurden für die Generierung des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors benutzt. Wurden durch die Primer zusätzliche Schnittstellen eingeführt, sind diese grau unterlegt.

Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
PMLCla2	NNN NAT CGA TGT TAT GTA TTT TGA GTA CC	Klonierung kurzer Arm (ClaI)
PMBam2	NNN NGG ATC CGT AAG TAA CCT GTT TGG	Klonierung kurzer Arm (BamHI)
PMHyb1	AAT AGA TGC ATA CTG TCT CG	Hybridisierungs-PCR
PMHyb2	CTC ACC ATG GTG GCG GGA GAT GCT TGC AGA	Hybridisierungs-PCR

Material und Methoden

PMHyb3	TCT GCA AGC ATC TCC CGC CAC CAT GGT GAG	Hybridisierungs-PCR
PMHyb4	NNN NAC TAG TGC AGT GAA AAA AAT GCT TTA	Hybridisierungs-PCR (SpeI)
Abkürzung für degenerierte Basen: N: A/T/G/C		

Tabelle 2.6: Primer zur Charakterisierung des A21/D2 Gen-Lokus		
Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
PM10F	TGA CTG GGA CTC CAT TGA TAC CT	Charakterisierung A21/D2 Gen-Lokus
PM11R	AAC TTC CTA TCC AGG TTC CGA TG	Charakterisierung A21/D2 Gen-Lokus
PM12F	CTC CTA ATG ATG AAG ACT GGG CC	Charakterisierung A21/D2 Gen-Lokus
PM13F	TTC GGA GAC AGG AAA TGG CC	Charakterisierung A21/D2 Gen-Lokus
PM14F	AGT CAC GAC AGC CAC TCG GGC	Charakterisierung A21/D2 Gen-Lokus
PM15R	GGT ATA GTT GCT CTG AGA CGG AGG	Charakterisierung A21/D2 Gen-Lokus

Die in Tabelle 2.7 aufgeführten Primer wurden zur Klonierung von Southernblot-Sonden zur Charakterisierung der BAC-Klone verwendet.

Tabelle 2.7: Primer für Sonden zur Charakterisierung der BAC-Klone		
Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
A21P1	CTC CGT CTC AGA GCA ACT ATA CC	PCR-Primer für Southernblot-Sonde
A21P6	AAC AGG TCG GCC ACT GAC TT	PCR-Primer für Southernblot-Sonde
PH1	ATG ATG TGG AAA ATG GGA CC	Primer für Oligo-Southernblot
PH2	TCA TCC TGG TAG CCA TCC TGG	Primer für Oligo-Southernblot

Die in Tabelle 2.8 aufgeführten Primer wurden in der sogenannten "Screening-PCR" zum Nachweis der homologen Rekombination des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors in ES-Zellen eingesetzt.

Tabelle 2.8: Primer für die "Screening-PCR"		
Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
NEO	GCA TGC TCC AGA CTG CCT TG	Primer für homologe Rekombination
WT-A21	TTC AGA AGA ATG GGT GTG GTC C	Primer für homologe Rekombination
WT-TestA21	GCA GGA TGA CAA TCA GAA GCC C	Kontroll-Primer
TV-TestML	GGG AAC AAA AGC TGG TCG AG	Kontroll-Primer

In Tabelle 2.9 sind die Primer aufgelistet, die für die Klonierung der Southernblot-Sonde für den Nachweis der homologen Rekombination in A21/D2-EGFP Mäusen verwendet wurden

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
A21-SonFor	AAG TTC ATA TTG GGT GAG ACT TT	PCR-Primer für Typisierungs-Sonde
A21-SonRev	TCT AGG ACA TGT TCC ACC CAG	PCR-Primer für Typisierungs-Sonde

Die in Tabelle 2.10 aufgelisteten Primer wurden zur PCR-Typisierung zum Nachweis der homologen Rekombination in A21/D2-EGFP Mäusen verwendet. Zu diesem Zweck wurden drei Primerpaare benutzt, die für das Wildtyp-Allel (WT), das rekombinierte Allel mit Neomycin-Resistenzkassette (+NEO) und das rekombinierte Allel, bei dem die Neomycin-Resistenzkassette deletiert wurde (-NEO), spezifisch sind.

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
A21WTF1	GCA GGA TGA CAA TCA GAA GCC C	PCR-Typisierung (<u>WT</u>)
A21WTB1	TTC AGA AGA ATG GGT GTG GTC C	PCR-Typisierung (<u>WT</u>)
A21KO4F1	TCC AGA CTG CCT TGG GAA AAG C	PCR-Typisierung (<u>+NEO</u>)
A21KO4B1	TTC AGA AGA ATG GGT GTG GTC C	PCR-Typisierung (<u>+NEO</u>)
A21KO5F4	AAA AAA CCT CCC ACA CCT CCC C	PCR-Typisierung (<u>-NEO</u>)
A21KO5B17	CCA GAG CCA GTA ACT CAA TCC AAT G	PCR-Typisierung (<u>-NEO</u>)

Primername	Sequenz (5'→3')	Verwendung
A21RTforw	GAC CAA ACA GGA GAA AGA C	Primer für A21/D2 RT-PCR
A21RTrev	AGC TTT AGC AGA TGA AGG GG	Primer für A21/D2 RT-PCR
bACTINforw	GTG ACG AGG CCC AGA GCA AGA G	Primer für β -Actin RT-PCR
bACTINrev	AGG GGC CGG ACT CAT CGT ACT C	Primer für β -Actin RT-PCR

In Tabelle 2.12 sind die Mutagenese-Primer für die Herstellung des A21/D2-pEGFP-N1 Klons aufgelistet.

Tabelle 2.12: Mutagenese-Primer für die Herstellung des A21/D2-pEGFP-N1 Klons		
Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
A21(F)N1	AAA ACG GTA CCG ATG ATG TGG AAA ATG GGA CCC CAC	A21-eGFP-N1 (KpnI)
A21(R)N1	AAA TGG ATC CCC TCC GTA AGG GTA TCC ATG GTG GTA	A21-eGFP-N1 (BamHI)

Tabelle 2.13: Sequenzierprimer		
Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
T3	ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA	Sequenzierung
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	Sequenzierung
M13-FP	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	Sequenzierung
M13-RP	CAG GAA ACA GCT ATG ACC	Sequenzierung

Tabelle 2.14: Typisierungsprimer für IL-18 und RAG1 Mäuse		
Primernamen	Sequenz (5'→3')	Verwendung
IGIF-WT-R	TGG TGA GGT TCT TCC TCA GAG	IL-18 WT-Primer
NEO-1500	TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG	IL-18 KO-Primer
K.O.F	AGA CAT ATC CGC TGT CAG CTG	IL-18 WT-Primer
RAG1	AGA CAC AAC GGC TTG CAA CAC AG	RAG-Typisierung
RAG2	TGC CGA GAA AGT CCT TCT GCC AG	RAG-Typisierung
RAG3	GTG GAA TGA GTG CGA GGC CAG A	RAG-Typisierung

2.4.2 Antikörper

Tabelle 2.15: Verwendete Antikörper			
Antikörper	Konjugat	Klon/Spezies	Quelle
Streptavidin	FITC/PE/APC	-	Molecular Probes
Streptavidin	ALEXA647	-	Molecular Probes
Streptavidin	Microbeads	-	Miltenyi
CD4	Microbeads	-	Miltenyi
Anti-Maus-IgG	ALEXA546	Ziege polyklonal	Molecular Probes
Anti-Maus Pan NK cells	FITC	DX5/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus MHC-II(I-A ^b)	Biotin	25-9-17/ Maus	Pharmingen
Anti-Maus GrI	Biotin	RB6-8C5/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus F4/80	Biotin	CI:A3-1(F4/80)/ Ratte	Serotec
Anti-Maus CD86	FITC/PE	GL1/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD80	PE	16-10A1/ Hamster	Pharmingen
Anti-Maus CD8α	APC	53-6.7/ Ratte	Pharmingen/Caltag

Material und Methoden

Anti-Maus CD69	PE	H1.2F3/ Hamster	Pharmingen
Anti-Maus CD45RA	PE	14.8/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD45R/B220	Biotin/PE	RA3-6B2/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD45	Biotin	30-F11/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD40	Biotin	3/23/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD4	FITC/PE/APC	GK1.5/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD4	Cy5.5-PE	RM4-5/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD19	PE	1D3/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD16/32	unkonjugiert	2.4G2/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD135	PE	A2F10.1/ Ratte	Pharmingen
Anti-Maus CD11c	FITC/PE/APC	HL3/ Hamster	Pharmingen
Anti-Maus CD117	Biotin	2B8/ Ratte	Pharmingen
Anti-Kaninchen-IgG	Biotin	Ziege polyklonal	Jackson Laboratories
Anti-Kaninchen-IgG	ALEXA546	Ziege polyklonal	Molecular Probes
Anti-Human Golgin 97	unkonjugiert	CDF4/ Maus	Molecular Probes
Anti-Human calreticulin	unkonjugiert	Clone 16/ Maus	Pharmingen
Anti-GFP	unkonjugiert	Kaninchen polyklonal	Abcam
Anti-Maus Neutrophile	Biotin	7/4 Ratte	Linearis
MHC-I-Tetramer	PE	Inst. f. Med. Mikrob (Dr. D.H. Busch)	
Anti-Maus-IL-18	-	SK113AE-4; eigene Herstellung	

2.5 Plasmidvektoren

2.5.1 Ausgangsvektoren

Tabelle 2.16: Verwendete Plasmid Ausgangsvektoren		
Name	Eigenschaften	Referenz
pCR [®] 2.1-TOPO	Vektor zur direkten Klonierung von PCR Produkten. AmpR, KanR, LacZ α , fl ori, pUC ori, 3,9 kb	Invitrogen
pBluescriptIIKS -	Vektor zur Klonierung von DNS-Fragmenten. AmpR, lacZ α -Fragment, fl-ori, pUC ori, lac Promotor, 3.0 kb	Stratagene
pEGFP-N1	KanR, NeoR, HSV-TK, pUC ori, CMV _{IE} -Promotor, EGFP, SV 40 Poly-A, fl ori, SV 40 ori, 4,7 kb	Clontech
pEasyflox	Basisvektor für die Konstruktion des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors. AmpR, loxP flankierte NeoR, HSV-TK, 6,8 kb	Institut für Genetik, Universität Köln
pBeloBACII # 26134 # 26135 # 26136	BAC mit F-factor origin, chloramphenicolR, 7,5 kb pBeloBACII aus der Caltech CitbCJ7 (ES-Zellen/129Sv) Maus BAC-Bibliothek, Insertgröße ca. 130 kb	Caltech
Clone 13	Plasmid-Klon aus λ -Phagen cDNS Bibliothek, enthält A21/D2 cDNS Sequenz	-

2.5.2 Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren

Tabelle 2.17: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Vektoren	
Name	Beschreibung
A21/D2-EGFP Rekombinations- vektor	pEasyflox+langer Arm+EGFP+loxP-NEO-loxP+kurzer Arm, 12,5 kb
A21/D2-pEGFP- N1	pEGFP-N1 mit der A21/D2 cDNS (ORF). 5' im Leseraster vor EGFP kloniert, 7,6 kb
A21/D2 PCR- screening sonde	PCR2.1-TOPO; Insert: kurzer Arm, 4,8 kb
A21/D2 Northern- sonde	pBS; Insert: 0,3 kb Sequenz aus dem 3' Bereich der A21/D2 cDNS-Sequenz

2.6 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.6.1 Isolierung von Plasmid DNS

Plasmid DNS

Um Plasmid DNS für Klonierungen und Sequenzierungen zu isolieren, wurden, je nach Menge der benötigten DNS, Mini- oder Maxi-Plasmidisolierungs Kits der Firma Quiagen verwendet. Die DNS Isolierung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer und Lösungen.

BAC-Isolierung

Bei dem hier beschriebenen Protokoll zur Isolierung von BAC-Plasmiden handelt es sich um ein abgewandeltes Protokoll zur Isolierung von Low-Copy Plasmiden der Firma Quiagen. Nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979) werden die Bakterien unter denaturierenden Bedingungen für RNS, DNS und Proteine durch SDS in Gegenwart von NaOH in

der Kälte lysiert. Die anschließende Neutralisation führt zur Kopräzipitation von SDS, chromosomaler DNS und Proteinen. Die Plasmid DNS verbleibt in Lösung und wird anschließend unter Niedrigsalz-Bedingungen an einer Anion-Austausch Matrix gebunden und nach einem Waschschrift unter Hochsalz-Bedingungen wieder von der Matrix eluiert. Die Plasmid DNS wird daraufhin mit Isopropanol präzipitiert und kann in einem geeigneten Puffer gelöst werden. Alle in diesem Protokoll beschriebenen Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 aufgeführt.

- Vorkultur:
Eine Einzelkolonie wird von einer Bakterienplatte in eine 5 ml Flüssigkultur überführt (LB+Chloramphenicol) und für ca. 8h bei 37°C wachsen gelassen.
- Von der Vorkultur wird 1 ml zu 500 ml LB-Medium (+Chloramphenicol) gegeben und für ca. 16h bei 37°C wachsen gelassen.
- Die Bakterien werden durch zentrifugieren (20 min, 4°C, 6000 x g) geerntet.
- Das Bakterien-Pellet wird in 30 ml Puffer *P1* resuspendiert.
- Es werden 30 ml Puffer *P2* zugegeben, geschwenkt, und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- 30 ml kalten Puffer *P3* zugeben und für 45 min auf Eis inkubieren, anschließend abzentrifugieren (30 min, 4°C, 10 000 x g).
- Das Pellet verwerfen und Überstand nochmals abzentrifugieren (15 min, 4°C, 10 000 UpM).
- 0,7 x Vol. Isopropanol zum Überstand zugeben, mischen, und abzentrifugieren (45 min, 4°C, 10 000 UpM).
- Pellet in 500 µl TE-Puffer lösen und 10 ml *QBT*-Puffer zugeben.
- Quiagen Maxi-Säule mit 10 ml *QBT*-Puffer equilibrieren und danach die Probe auf die Säule aufbringen.
- Säule mit 2 x 30 ml Puffer *QC* waschen und Plasmid-DNS mit 15 ml vorgewärmten (65°C) Puffer *QF* von der Säule eluieren.
- 0,7 x Vol. Isopropanol zum Eluat zugeben, mischen, und abzentrifugieren (45 min, 4°C, 10 000 UpM).
- Überstand vorsichtig dekantieren und 10 ml 70% EtOH zum Pellet geben. Zentrifugieren (15 min, 4°C, 10 000 UpM).
- Überstand dekantieren und Pellet ca. 10 min lufttrocknen lassen.
- Pellet anschließend in ca. 200 µl TE-Puffer lösen. Lagerung bei -20°C.

2.6.2 Isolierung chromosomaler DNS

Isolierung von chromosomaler DNS aus Mausschwanz-Biopsien

Um besonders reine DNS für Southernblot Analysen zu gewinnen wurde folgende Methode angewendet (Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.1.1 aufgeführt):

- Mausschwanz-Biopsie in 3 ml SNET-Puffer über Nacht bei 55°C inkubieren.
- 3 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol zugeben und 30 min bei RT schütteln.
- zentrifugieren (7 min, RT, 660 x g).
- obere, wässrige Phase in neues Gefäß überführen und 1 x Vol. Isopropanol zugeben.
- zentrifugieren (25 min, 4°C, 10 000 UpM).
- Überstand dekantieren und mit 1 ml 70% EtOH waschen (5 min, 4°C, 10 000 UpM).
- Überstand dekantieren und Pellet lufttrocknen lassen.
- Pellet in ca. 500 µl TE-Puffer lösen.

Für den Einsatz in der Typisierungs-PCR wurde folgend Methode als einfache und schnelle Möglichkeit verwendet, eine ausreichende Menge genomischer DNS aus einem mit Proteinase K verdautem Stück Mausschwanz zu präparieren (Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.1.1 aufgeführt):

- Mausschwanz-Biopsie mit 500µl Lysis-Puffer über Nacht bei 55°C inkubieren.
- Zentrifugieren (10 min, 4°C, 13 000 UpM) und dekantieren des Überstandes in ein mit 500µl Isopropanol gefülltes Eppendorf-Röhrchen (DNS fällt aus).
- Die ausgefällte DNS wird mit einer Plastik-Pipettenspitze gefischt und in 250µl TE-Puffer überführt. Das Lösen der DNS erfolgt entweder für 5 min bei 55°C oder bei 4°C über Nacht.

Isolierung von chromosomaler DNS aus ES-Zellen

- ES-Zellen (von einer dicht bewachsenen 10 cm Zellkulturschale) in 1,5 ml Lysis-Puffer (Kapitel 2.1.1) resuspendieren und über Nacht bei 55°C inkubieren.
- zentrifugieren (5 min, 13 000 UpM) und gleiches Vol. Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol zugeben und kurz vortexen.
- zentrifugieren (10 min, 13 000 UpM) und obere, wässrige Phase mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze vorsichtig abnehmen.
- 2 x Vol. kalten EtOH_{absolt} zugeben, schütteln, und DNS mit einer Pipettenspitze herausfischen.
- DNS in 70% EtOH waschen und in ca. 200 µl TE-Puffer lösen.

2.6.3 Agarosegelelektrophorese

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese ist die wichtigste Methode zur Analyse von Nukleinsäuren. Da Nukleinsäuren in Folge der negativ geladenen Phosphatgruppen ihres Zucker-Phosphat-Rückrats in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode wandern, können sie in einem festen Trägermaterial aufgrund von Siebeffekten ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Bei dem Trägermaterial handelt es sich meistens um Agarose, ein Polymer, das aus verschiedenen verknüpften Galaktoseeinheiten besteht. Bei der Auftrennung besteht über einen weiten Größenbereich der DNS eine (empirisch beobachtete) lineare Abhängigkeit zwischen dem Logarithmus (Log_{10}) der Länge des Fragments (in Bp) und der relativen Wanderungsstrecke im Agarosegel. Um die DNS sichtbar zu machen, mischt man Ethidiumbromid in das Gel. Dabei handelt es sich um einen Farbstoff, der aufgrund seiner planaren Struktur zwischen die Basen der DNS interkalieren kann. Der interkalierte Farbstoff kann durch UV-Licht (245-366 nm) angeregt werden und emittiert Licht im orange roten Bereich (590 nm). Das Auftrennungsmuster kann dadurch auch photographisch festgehalten werden.

- 0,8-2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer aufkochen bis eine klare homogene Lösung entsteht
- nach Abkühlen auf Handwärme Ethidiumbromid (4 µg/ml) zugeben, dann in eine Gelwanne mit den gewünschten Kämmen gießen und verfestigen lassen

- die Gelwanne mit dem erstarrten Gel in eine Elektrophorese Apparatur einsetzen und mit TAE-Puffer überschichten.
- DNS-Proben 1:6 mit Auftragspuffer mischen und in die Geltaschen pipettieren.
- die Elektrophorese wird je nach Kammergröße bei 80-150 Volt durchgeführt.
- das in die doppelsträngige DNS eingelagerte Ethidiumbromid fluoresziert bei UV-Bestrahlung (Transilluminator, 280 nm) und das Bandenmuster kann photographisch dokumentiert werden.
- für eine Auswertung der Bandenmuster mittels Computerprogrammen (z.B. Adobe PhotoshopTM) wurden die Daten zusätzlich auf Diskette gespeichert.

Präparative Agarosegelelektrophorese

Zu präparativen Zwecken wurden mehrere Taschen der Kämmen abgeklebt, um größere Mengen an DNS auftragen zu können. Anschließend wurde die Gelelektrophorese (s.o.) durchgeführt. Die gewünschten Banden im Gel wurden unter langwelliger UV-Beleuchtung (325 nm) ausgeschnitten. Aus dem isolierten Gelstück wurde die DNS mittels eines QIAquick Gelextraction Kits (Quiagen) gewonnen. Die Vorgehensweise entsprach der dem Kit beiliegenden Anleitung des Herstellers.

Bestimmung der Fragmentgrößen

Durch einen internen Standard im Gel kann die Größe der DNS-Moleküle und gegebenenfalls auch deren Konzentration bestimmt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 1 kb-Leiter und λ -Hind-Marker (Invitrogen) verwendet.

Fragmentgrößen der 1 kb-Leiter (bp):

12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3053, 2036, 1636, 1018, 517/506, 396, 344, 298, 220/201, 154/134, 75

Fragmentgrößen des λ -Hind Markers (bp):

23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564

2.6.4 Enzymatische Behandlung von DNS

Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden ursprünglich in Bakterien identifiziert. Sie binden zumeist als Homodimere spezifisch an vier bis acht Basenpaar lange palindromische Sequenzen doppelsträngiger DNS. Sie hydrolysieren die Phosphodiesterbindung beider Stränge, wobei DNS Moleküle mit definierten, meistens überhängenden Enden entstehen, die sich zu Klonierungszwecken eignen.

In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich Restriktionsendonukleasen von der Firma Invitrogen verwendet, die mit dem entsprechenden Reaktionspuffer geliefert wurden. Für den Totalverdau von gereinigter DNS wurden 2-5 Einheiten (units) Enzym pro μg Plasmid DNS und bis zu 10 Einheiten Enzym pro μg genomischer DNS eingesetzt.

Tabelle 2.18: Allgemeiner Ansatz von Restriktionsverdaus		
	Verdau von Plasmid DNS	Verdau von genomischer DNS
DNS	1-5 μg	10-20 μg
10 x Reaktionspuffer	2 μl	10 μl
Enzym	2-5 Einheiten/ μg DNS	bis 10 Einheiten/ μg DNS
H ₂ O _{bidest}	ad 20 μl	ad 100 μl

Die Ansätze wurden für den Verdau von Plasmid DNS ca. 1-2 Stunden, für den Verdau von genomischer DNS 6-12 Stunden bei geeigneter Temperatur (in den meisten Fällen 37°C) inkubiert.

Dephosphorylierung von DNS

Um eine Selbstligation des Vektors mit kompatiblen Enden zu vermeiden und eine intermolekulare Ligation zwischen Vektor und DNS-Fragment zu begünstigen, wurden in einigen Fällen die 5'-Enden des Vektors dephosphoryliert. Nach dem Restriktionsverdau, bzw. der Linearisierung des Vektors, wurde dem Ansatz eine Einheit Bakterielle Alkalische Phosphatase (BAP) zugegeben und der Ansatz für mindestens eine Stunde bei 65°C inkubiert. Zur Entfernung

der Enzyme wurde der Ansatz anschließend über eine präparative Agarosegelelektrophorese (2.6.3) aufgereinigt.

Ligation von DNS-Molekülen

DNS Ligations Kit (TaKaRa Biomedicals)

In diesem Kit wird die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 (T4 DNS-Ligase) zusammen mit einem optimierten Puffersystem benutzt.

Durchführung:

- Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:3 bis 1:10 in einem Gesamtvolumen zwischen 5-10 µl mischen.
- gleiches Volumen Solution I (TaKaRa) zugeben und vermischen.
- Inkubation bei 16°C für 30 min, evtl. auch länger (ÜN).

Der Ligationsansatz kann direkt zur Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt werden (Kapitel 2.6.5).

TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen)

Bei Klonierungen von PCR Produkten in den Vektor pCR 2.1-TOPO (Kapitel 2.5.1) wird die Eigenschaft der *Taq* Polymerase, an jedes 3' Ende eines PCR Produkts ein einzelnes Desoxyadenosin (A) anzuhängen, ausgenutzt. Der Vektor pCR 2.1-TOPO ist linearisiert und besitzt überhängende 3' Desoxythymidin-Nukleotide. Außerdem ist der Vektor durch kovalent gebundene Topoisomerase aus *Vaccina* virus "aktiviert". Die Energie dieser kovalenten Bindung kann zu Ligation des PCR-Fragmentes in den Vektor genutzt werden (Shuman, 1991; Shuman, 1994).

PCR Produkt	0,5 bis 4 µl
Salzlösung	1 µl
H ₂ O _{bidest}	ad 5 µl
pCR 2.1-TOPO	1 µl

Den Reaktionsansatz vermischen und für 5-30 min bei Raumtemperatur inkubieren. Der Reaktionsansatz kann direkt zur Transformation in kompetente Bakterien eingesetzt werden (Kapitel 2.6.5).

2.6.5 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-Vektoren

Es wurden durch CaCl₂ Behandlung kompetent gemachte *E. coli* Zellen benutzt, die durch einen kurzen Hitzeschock mit Plasmid DNS transformiert werden können (Cohen et al., 1972; Hanahan, 1983).

Durchführung:

- 50-100 µl kompetente Bakterien (Lagerung bei -80°C) auf Eis auftauen lassen.
- Ligationsansatz (1-10 ng DNS) bzw. 2 µl aus TOPO-TA Klonierung (s.o.) zu den Bakterien pipettieren und mischen.
- Inkubation für 30 min auf Eis.
- Hitzeschock: für 30-45 sec. bei 42°C.
- 2 min auf Eis inkubieren.
- 0,9 ml S.O.C. Medium zugeben und für 1 Stunde bei 37°C schütteln lassen.
- 100 µl und 200 µl ausplattieren und ÜN unter Selektionsdruck wachsen lassen.

2.6.6 Southernblot Analyse

Southern Transfer und Hybridisierung (Southern, 1975) kann zum Nachweis von spezifischen DNS-Sequenzen innerhalb größerer DNS-Fragmente, wie z.B. genomischer DNS dienen. Dazu

benötigt man spezifische DNS-Sonden, die durch DNS/DNS-Hybridisierung an die zuvor auf einer Nylonmembran immobilisierten komplementären DNS-Fragmente binden. Die Detektion wird durch den Gebrauch radioaktiv markierter Sonden möglich.

Die bei der hier beschriebenen Methode benötigten Puffer und Lösungen sind unter 2.2.1 beschrieben.

Restriktionsverdau und Agarosegelelektrophorese

Zunächst werden 10-20 µg DNS mit einem oder mehreren Restriktionsendonukleasen wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben verdaut. Danach wird die DNS präzipitiert:

- 0,1 x Vol. 3M NaAcetat (pH: 5,2) und 2,5 x Vol. Isopropanol zugeben.
- vortexen und 30 min bei -70°C inkubieren.
- abzentrifugieren (45 min, 4°C, 13 000 UpM).
- Pellet mit 500 µl 70% EtOH waschen und lufttrocknen lassen.
- Pellet in 20-30 µl TE-Puffer aufnehmen.

Danach wird die DNS über eine Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.6.3) aufgetrennt.

Alkalischer DNS-Transfer auf Nylonmembranen

Durch die folgende Säure- und Alkalibehandlung des Gels werden die DNS Fragmente in kleine Stücke zerlegt und denaturiert. Durch einen Kapillarblot werden sie auf eine Nylonmembran transferiert, so dass eine Replika des Fragmentmusters des Agarosegels auf dem Filter entsteht (Meinkoth and Wahl, 1984; Wahl et al., 1979).

Durchführung:

- das Gel zur partiellen Depurinierung etwa 10 min in 0,25 N HCl schwenken.
- das Gel zur Denaturierung und Spaltung an den depurinierten Stellen etwa 10 min in Transferpuffer schwenken.
- Nylonmembran auf die gleiche Größe des Gels zurechtschneiden und ca. 5 min in Transferpuffer äquilibrieren.

Aufbau des (downward) Kapillarblots (Koetsier et al., 1993):

- folgende Schichten werden luftblasenfrei aufgeschichtet:
 - ca. 10 cm Zellstoffpapier
 - 5 Lagen trockenes Whatman Papier
 - 2 Lagen befeuchtetes (Transferpuffer) Whatman Papier
 - Nylonmembran
 - Gel (Oberseite zeigt nach oben)
 - 2 Lagen befeuchtetes Whatman Papier
 - ein mit Transferpuffer befeuchtetes Whatman Papier, dessen eines Ende in einen Wanne mit Transferpuffer getaucht ist
 - Glasplatte
- Der Kapillarblot wird mit ca. 0,2 kg beschwert und ÜN bei RT inkubiert. Durch die Kapillarkräfte wird die Blotlösung durch die verschiedenen Schichten gesaugt und dabei die DNS Fragmente vom Gel auf die Nylonmembran transferiert.
- die Membran kurz in Neutralisationslösung schwenken.
- DNS durch UV-Kreuzvernetzung auf der Nylonmembran fixieren.

Radioaktive Markierung der Sonden

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Methoden verwendet DNS-Sonden radioaktiv zu markieren:

I. Radioaktive Markierung von synthetischen Oligonukleotiden (bis ca. 30 Basenpaare)

Für die Charakterisierung der BAC-Klone wurden kurze synthetische Oligonukleotide als Sonden verwendet. Da diesen Nukleotiden die Phosphatgruppe am 5' Ende fehlt, können sie durch die Übertragung des γ - ^{32}P von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ radioaktiv markiert werden. Die Übertragungsreaktion wird durch die T4 Polynukleotidkinase katalysiert.

Ansatz:

Oligonukleotid	10 μ l (ca. 10 pmol)
5 x T4 Polynukleotidkinase-Puffer	5 μ l
T4 Polynukleotidkinase	2 μ l (entspricht 20 Einheiten)
H ₂ O _{bide} st	23 μ l
[γ - ³² P]ATP (~ 5000 Ci/mmol)	5 μ l (10 pmol)

- 30 min bei 37°C inkubieren.
- für 20 min bei 65°C inkubieren um Enzym zu deaktivieren.
- Die Aufreinigung der Oligonukleotid Sonden erfolgt mittels MicroSpin™ G-25 Säulchen (Amersham) nach Angaben des Herstellers.

II. Radioaktive Markierung von Sonden (> 100 Basenpaare)

Zur Herstellung und Markierung dieser Sonden wird das Klenow-Fragment benutzt, welches an einzelsträngiger DNS den Komplementärstrang synthetisiert. Durch die Zugabe von radioaktiv markierten Nukleotiden zu unmarkierten Nukleotiden, wird die neu synthetisierte DNS radioaktiv markiert (Feinberg and Vogelstein, 1984). Bei dem hier verwendeten 'rediprime™ II random prime labelling system' – Kit von Amersham werden bis ca. 25 ng DNS unter Verwendung von [α -³²P]dCTP radioaktiv markiert. Es wurde dabei nach dem mitgelieferten Protokoll des Herstellers vorgegangen. Nicht eingebaute radioaktive Nukleotide wurden mit MicroSpin™ S-200 HR Säulchen nach Angaben des Herstellers (Amersham) vom Reaktionsansatz abgetrennt.

DNS/DNS-Hybridisierung

Die DNS/DNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen Sonde und der dazu komplementären, auf der Nylonmembran gebundenen DNS-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen, doppelsträngigen DNS/DNS-Hybrids. Die Stärke dieser DNS/DNS-Bindung und damit auch die Sensitivität der Methode ist neben anderen Faktoren auch direkt proportional zur Länge der verwendeten Sonde. Aus diesem Grund eignen sich kurze Oligonukleotid-Sonden nur zum Nachweis von Sequenzen, die in großer Anzahl in der zu Untersuchenden DNS-Probe vorkommen. Mit längeren Sonden können dagegen auch Einzelkopie-Gene in weniger als 15 μ g chromosomaler Säuger-DNS nachgewiesen werden.

Die Oligonukleotid-Blots wurden bei 50°C hybridisiert und bei 42°C gewaschen.

Alle anderen Southernblots wurden bei 65°C hybridisiert und gewaschen.

Durchführung:

- Membran für mehrere Stunden bei 65°C bzw. 50°C in Hybridisierungslösung prähybridisieren (neben der in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Lösung wurde später PerfectHybTM Plus Lösung von Sigma verwendet).
- markierte, hitzedenaturierte Sonde zugeben.
- ÜN bei 65°C bzw. 50°C hybridisieren.
- stringentes Waschen des Blots mit Waschpuffer I: 5 min bei 65°C bzw. 42°C
- stringentes Waschen des Blots mit Waschpuffer II: 15-30 min bei 65°C bzw. 42°C
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics) oder eines Röntgenfilmes detektieren.

2.6.7 Amplifikation von DNS-Molekülen durch PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR; Mullis and Faloona, 1987; Saiki et al., 1988) beruht auf der Eigenschaft von DNS-Polymerasen einzelsträngige DNS als Matrize für die Synthese eines Komplementärstranges zu benutzen, um so sehr viele Kopien einer spezifischen DNS-Sequenz zu produzieren. Meist wird als Ausgangsmaterial doppelsträngige DNS benützt. Nach Hitzedenaturierung hybridisieren spezifische kurze Oligonukleotide (Primer), die jeweils das 5'-Ende und das 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz flankieren, an die einzelsträngige DNS (annealing). Die Primerverlängerung erfolgt durch eine thermostabile DNS-Polymerase (extension). Nach der Synthese des Komplementärstranges führt eine Wiederholung von Hitzedenaturierung, Primerhybridisierung und Primerverlängerung über mehrere Zyklen zur Anreicherung der gewünschten DNS-Sequenz. Im Idealfall ist diese Sequenz nach n Runden 2ⁿ-Fach vermehrt. In dieser Arbeit wurden eine herkömmliche *Taq*-Polymerase oder, für einige Klonierungszwecke eine DNS-Polymerase mit 'Proof-reading' Aktivität (HerculaseTM von Stratagene) verwendet.

Verwendete Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 aufgeführt.

Reaktionsansatz:

DNS	1,5 µl	(ca. 100 ng)
Primer 1 und 2	je 1 µl	(10 pmol/µl)
dNTP-Mix	1 µl	
BSA	2 µl	(4 mg/ml)
10 x PCR-Puffer	5 µl	
Taq-Polymerase	0,5 µl	
H ₂ O _{bidest}	ad 50 µl	

Durchführung:

- Reaktionsansatz auf Eis zusammenpipetieren, kurz vortexen und abzentrifugieren.
- vorsichtig mit ca. 50µl Mineralöl (Sigma) überschichten, um Verdampfen des Ansatzes während der Reaktion zu verhindern (nicht notwendig bei Benutzung eines Thermocyclers mit beheizbarem Deckel).
- Durchführung der Reaktionszyklen unter den in Tabelle 2.20 angegebenen Bedingungen.

Tabelle 2.20: Standard PCR-Bedingungen

Funktion	Dauer	Temperatur
DNS Denaturierung	5 min	95°C
DNS Denaturierung	1 min	95°C
Primerhybridisierung	1 min	55-65°C
Primerverlängerung	1-2 min	72°C

} 30 Zyklen

2.6.8 Isolierung gesamtzellulärer RNS aus Gewebe und Zellen

Für die Isolation von Gesamt-RNS aus Zellen und Gewebe wurde TRIzol[®]-Reagenz (Invitrogen) benutzt. Bei TRIzol handelt sich um eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat mit der RNS aus Geweben und Zellen nach der von Chomczynski und Sacchi beschriebenen Methode isoliert werden kann (Chomczynski and Sacchi, 1987). Durch Detergenzien wie Phenol werden Zellen lysiert und Proteine denaturiert. Die durch die Zell-Lyse

freigesetzten RNasen werden durch Guanidin-Isothiocyanat inhibiert. Die Zugabe von Chloroform führt zu einer Phasentrennung, wobei die RNS in der wässrigen Phase verbleibt. Die RNS kann dann mit Isopropanol präzipitiert werden.

Beim Arbeiten mit RNS kann es sehr leicht zu Kontaminationen durch RNasen kommen. Da diese nur schwer zu inhibieren sind, sollten einige allgemeine Regeln beim Arbeiten mit RNS beachtet werden.

- Benutzen von RNase freier Plastikware.
- Alle benötigten Reagenzien sollten nur für das Arbeiten mit RNS benutzt werden. Entnahme durch Schütten; keine Spatel, Löffel, Glasspipetten o.ä. verwenden.
- Einmalhandschuhe tragen.
- benutzen von 2 x autoklavierten oder bei 180°C sterilisierten Schraubdeckelflaschen.

Eine Möglichkeit zur Inaktivierung von RNasen ist die Behandlung von Lösungen mit DEPC, einem RNase Inhibitor. Die anschließende Inaktivierung von DEPC ist unbedingt notwendig, da es sonst durch Carboxymethylierungsreaktionen zur Modifikation von Purinbasen der RNS kommt.

DEPC-H₂O:

0,1% DEPC in H₂O_{bidest}

Lösung ÜN rühren

DEPC durch autoklavieren inaktivieren.

Isolierung von gesamtzellulärer RNS aus Gewebe

Das zu untersuchende Gewebe bzw. Organ wird unter sterilen Bedingungen entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Isolierung der RNS wird das Gewebe bzw. Organ noch im gefrorenen Zustand in ca. 1 ml TRIzol-Reagenz pro 100 mg Gewebe überführt und mit dem 'Ultra Turrax' homogenisiert. Danach wurde wie folgt vorgegangen:

- Proben für 5 min bei RT inkubieren.
- 0,2 ml Chloroform pro 1 ml TRIzol-Reagenz zugeben.
- 15 sec. schütteln und für 2-3 min bei RT inkubieren.

- Proben zentrifugieren (15 min, 4°C , 12 000 x g). Nach dem zentrifugieren findet man eine untere rote (Phenol/Chloroform) Phase, und eine obere farblose (wässrige) Phase.
- Die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführen und 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml TRIzol-Reagenz zugeben.
- 10 min bei RT inkubieren.
- Proben zentrifugieren (10 min, 4°C , 12 000 x g).
- Überstand verwerfen und Pellet mit 70% EtOH waschen.
- RNS-Pellet kurz lufttrocknen lassen und dann in ca. 100-200 µl H₂O lösen.

Isolierung von gesamtzellulärer RNS aus Zellen

Hierfür werden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 4°C, 300 x g), in PBS gewaschen und dann in 1 ml TRIzol-Reagenz pro 5-10 x 10⁶ Zellen resuspendiert. Die weitere RNS Isolierung erfolgte analog der Isolierung von RNS aus Geweben.

2.6.9 cDNS Synthese

Bei der cDNS oder der komplementären DNS handelt es sich um eine Kopie der mRNA, die mit Hilfe eines retroviralen Enzyms, der reversen Transkriptase aus dem Moloney Mäuse-Leukämie Virus, in DNS umgeschrieben wird. Die Verwendung von Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primern erlaubt spezifisch die reverse Transkription von mRNA, da diese Oligonukleotide an das Poly-A Ende der mRNA binden. Zusätzlich wird ein Hexamer Oligonukleotidgemisch als Primer eingesetzt. Im Reaktionsansatz befinden sich neben den Primern und dNTPs auch DTT, ein Reduktionsmittel, das die reverse Transkriptase stabil hält. Für die cDNS Synthese wurde das 'First strand cDNA Synthesis Kit' der Firma Invitrogen verwendet.

Ansatz:

2 µg gesamtzelluläre RNS	x µl	
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer	1 µl	
Hexamer Primer	1 µl	(250 ng)
5 x first strand buffer	4 µl	
DTT	2 µl	
Superscript® II (reverse Transkriptase)	1 µl	

Durchführung:

- 2 µg RNS mit Primern und DEPC-H₂O (ad 12 µl) mischen.
- 10 min 70°C inkubieren.
- Puffer, DTT und dNTPs zugeben und mischen.
- 10 min bei RT inkubieren, dann 2 min bei 42°C inkubieren.
- Superscript II zugeben und mischen.
- 50 min bei 42°C inkubieren.
- 15 min bei 70°C inkubieren (Inaktivierung des Enzyms).
- Lagerung der cDNS bei -20°C.

2.6.10 Northernblot Analyse

Die Methode der Northern Hybridisierung kann verwendet werden, um die Menge einer spezifischen mRNA abzuschätzen, die in bestimmten Zellen oder Organen hergestellt wird (Alwine et al., 1979; Alwine et al., 1977). Northern Hybridisierung stellt damit eine wichtige Methode dar, um die Genexpression in eukariotischen Zellen zu untersuchen.

Elektrophoretische Auftrennung von RNS

RNS Proben werden durch Behandlung mit Formamid denaturiert und anschließend in einem Formaldehydhaltigem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Lehrach et al., 1977). Durch die Eigenschaft von Formaldehyd, Schiff'sche Basen mit der Imino-Gruppe von Guanin zu bilden, wird die RNS im Agarosegel einzelsträngig gehalten und somit die Bildung von störenden Sekundärstrukturen verhindert. Bei der hier verwendeten Methode enthält das Gel 6% Formaldehyd (Rave et al., 1979). Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

Durchführung:

- 2,5 g Agarose in gebackene Schraubdeckelflasche abwiegen und 180 ml DEPC-H₂O zugeben.

- in Mikrowelle aufkochen lassen bis eine klare Lösung entsteht.
- auf ca. 50°C abkühlen lassen.
- unter schwenken 45 ml Formaldehyd (37%) und 25 ml 10 x MOPS zugeben.
- Gel gießen und auspolymerisieren lassen.
- pro Spur ca. 20 µg RNS (in DEPC-H₂O gelöst) 1:1 mit RNS-Auftragspuffer (Ambion) mischen und 10 min bei 70°C denaturieren. Danach Probe kurz auf Eis abkühlen lassen.
- Probe auf das Gel auftragen. Auftrennung ÜN bei 20 V.

Transfer von RNS auf Nylonmembranen

Hier wurde die Methode des Transfers der RNS auf eine ungeladene Nylonmembran bei neutralem pH verwendet. Durch Methylenblaufärbung der Membran kann die RNS sichtbar gemacht werden (Herrin and Schmidt, 1988).

Durchführung:

Ab hier ist kein RNS-spezifisches Arbeiten mehr notwendig, d.h. kein DEPC-H₂O etc.

- Gel 2 x 5 min in H₂O_{dest.} waschen.
- Becken mit 10 x SSC füllen.
- 1 dickes Whatman Papier mit 10 x SSC befeuchten und über Glasscheibe mit beiden Enden in Becken hängen lassen.
- Gel mit den Taschen nach unten darauflegen und mit Glaspipette glattstreichen.
- Zurechtgeschnittene GeneScreenTM Plus Membran mit 10 x SSC anfeuchten und auf das Gel legen.
- 3 Whatman Papiere darauflegen, davon das unterste mit 10 x SSC befeuchten.
- ca. 7 cm Zellstoffpapier daraufschichten.
- Glasplatte drauflegen und mit ca. 500 g beschweren.
- ÜN bei RT inkubieren.
- Blot abbauen und Membran in 2 x SSC waschen.
- RNS durch UV-Kreuzvernetzung auf der Nylonmembran fixieren.
- Färben mit Methylenblau-Färbelösung bis 28S rRNS und 16S rRNS Banden gut zu sehen sind.
- Entfärben mit H₂O bis der Hintergrund wieder einigermaßen weiß ist.

- Membran trocknen lassen.

Radioaktive RNS/DNS-Hybridisierung

Die RNS/DNS Hybridisierung zwischen einer markierten, einzelsträngigen DNS-Sonde und der dazu komplementären, auf der Nylonmembran gebundenen RNS-Sequenz führt zur Bildung eines stabilen, doppelsträngigen RNS/DNS-Hybrids. Die Radioaktive Markierung der DNS-Sonde erfolgt wie in Kapitel 2.6.6 beschrieben.

Durchführung:

- Membran für mehrere Stunden bei 42°C in Hybridisierungslösung prähybridisieren.
- markierte, hitzedenaturierte Sonde zugeben.
- ÜN bei 42°C hybridisieren.
- Waschen des Blots mit Waschpuffer I: 15 min bei RT
- Waschen des Blots mit Waschpuffer II: 15-30 min bei 65°C
- stringentes Waschen des Blots mit Waschpuffer III: 15 min bei RT
- spezifisch gebundene Radioaktivität mit Hilfe eines Phosphoimagers (Molecular Dynamics) oder eines Röntgenfilmes detektieren.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Image Quant von Molecular Dynamics.

2.6.11 Bestimmung der DNS Konzentration

Photometrisch

Die Konzentration von gelöster DNS wurde photometrisch durch Extinktionsmessung bei $\lambda=260$ nm bestimmt. Der Berechnung wurde zugrunde gelegt, dass die Absorption $A=1$ bei einer Wellenlänge von 260 nm einer DNS-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ entspricht. Die Reinheit der gewonnenen DNS wurde durch einen Vergleich der Absorption bei $\lambda=260$ nm mit der Absorption bei $\lambda=280$ nm bestimmt. Der Quotient $A_{260/280}$ ist 2,0 bei einer reinen DNS-Lösung und kleiner als 2,0 bei einer Protein-Kontamination

Fluorometrisch

Da die photometrische DNS-Konzentrationsmessung (s.o.) durch Kontaminationen mit RNS oder Proteinen oft zu ungenauen Ergebnissen führt, wurde in einigen Fällen (z.B. für Southernblot Analysen) die genauere fluorometrische DNS-Konzentrationsmessung verwendet. Zu diesem Zweck wurde der Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 (Bisbenzimid) verwendet. Mit Bindung von Hoechst 33258 an die kleine Furche der DNS ändert sich die Intensität und Wellenlänge der Fluoreszenz von Hoechst 33258. Die Fluoreszenz kann mit einem Fluorometer bei einer Excitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen werden. Mit Hilfe einer Standardkurve kann die Konzentration von DNS Proben sehr genau ermittelt werden (Labarca and Paigen, 1980).

In dieser Arbeit wurde das 'Fluorescent DNA quantitation kit' der Firma Biorad verwendet. Die Konzentrationsmessung wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.7 Zellkultur

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden ausschließlich unter einer Heraeus Umluft-Sterilbank durchgeführt. Zellkulturen wurden in einem Heraeus Zell-Inkubations-Schrank bei 37°C, 7,5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchte von 95% kultiviert. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sterile Plastikpipettenspitzen und Glaspipetten verwendet.

2.7.1 Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES) und embryonaler Fibroblasten (EF)

Auftauen und Einfrieren von ES-Zellen

Das Auftauen sollte möglichst schnell durch Eintauchen des Kryoröhrchens in ein 37°C Wasserbad erfolgen. Die Zellen werden in 9 ml ES-Medium überführt, suspendiert, und 7 min bei 300 x g abzentrifugiert. Das Pellet wird anschließend in 5 ml ES-Medium resuspendiert und die ES-Zellen auf eine mit EF-Zellen bewachsene 5 cm Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel und am zweiten Tag werden die ES-Zellen auf zwei 10 cm Zellkulturschalen verteilt. Am vierten Tag werden die ES-Zellen auf zwei bis drei 15 cm Zellkulturschalen verteilt.

Das Einfrieren erfolgt entweder direkt in 48-well Platten oder von 5 bzw. 10 cm Zellkulturschalen. Dazu werden die Zellen zunächst durch Trypsin/EDTA Behandlung vereinzelt (s.u.).

- 48-well Platte: die Zellsuspension 1:1 mit dem Einfriermedium (80% FCS, 20% DMSO) vermischen
- Klone auf 5 oder 10 cm Zellkulturschalen: Zellsuspension abzentrifugieren und Klone in Einfriermedium (50% ES-Medium, 40% FCS, 10% DMSO) aufnehmen und auf 1 ml Kryoröhrchen verteilen.

Zellen 30 min bei -20°C inkubieren, dann ÜN bei -80°C lagern und anschließend in flüssigem Stickstoff lagern.

Zellkultur von EF-Zellen

EF-Zellen werden nach dem Auftauen auf 15 cm Zellkulturschalen ausgesät und konfluent wachsen gelassen. Bevor die EF-Zellen mit den ES-Zellen kokultiviert werden, müssen sie mit Mitomycin C behandelt werden:

- EF-Medium absaugen und Zellen mit EF-Medium+Mitomycin C für 2,5 Stunden im Brutschrank inkubieren.
- Medium absaugen und Zellen 3 x mit 20 ml PBS waschen.
- danach Zellen entweder vereinzeln (analog ES-Zellen) und auf neue Platten verteilen oder in der in der gleichen Schale mit den ES-Zellen kokultivieren.

Mit Mitomycin C behandelte EF-Zellen können noch maximal 3 Tage benutzt werden.

Zellkultur von ES-Zellen

Embryonale Stammzellen werden grundsätzlich auf mit Mitomycin C vorbehandelten EF-Zellen kokultiviert (s.o.), um die notwendigen Wachstumsfaktoren zur Verfügung zu stellen. Zusätzlich wurde den ES-Zellkulturen LIF Überstand zugegeben, um das Ausdifferenzieren zu verhindern. Undifferenzierte ES-Zellen erscheinen im Lichtmikroskop als spindelförmige Kolonien mit einem

glatten, hellscheinenden Rand. Die ausdifferenzierten Kolonien dagegen erscheinen grau-granuliert, werden matt und bilden Pseudopodien aus.

Normalerweise erfolgt bei ES-Zellen der Mediumwechsel jeden Tag.

Um die ES-Zellen auf neue Schalen verteilen zu können, müssen die Zellen zuerst vereinzelt werden:

- Medium absaugen und Zellen mit 3 x 20 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) waschen.
- Trypsin/EDTA zugeben (10 min, im Brutschrank).
- mit mindestens 3 x Vol. ES-Medium abstoppen und Zellen gut resuspendieren.
- Zellen auf neue Zellkulturschalen verteilen.

Elektroporation von ES-Zellen

Die ES-Zellen wurden durch Elektroporation mit dem A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor transfiziert.

Durchführung:

- die ES-Zellen auf zwei 15 cm Zellkulturschalen expandieren.
- ES-Zellen resuspendieren (s.o.) und zählen. Es werden $2,5 \times 10^7$ Zellen benötigt.
- die Zellen in 3,5 ml ES-Medium resuspendieren und mit 100 μg linearisiertem Rekombinationsvektor (in 500 μl sterilem PBS) vermischen.
- je 800 μl in eine Elektroporationsküvette (insgesamt 5) überführen.
- Elektroporation: 340 V/250 μF
- Küvetten 5 min auf Eis inkubieren.
- ES-Zellen auf zehn 10 cm Zellkulturschalen verteilen (ca. 350-400 μl pro Platte, mit ES-Medium auf 10 ml auffüllen).

Selektion rekombinanter ES-Zellklone

Nach der Elektroporation wurden die ES-Zellen einem zweifachen Selektionsdruck unterworfen. Zur positiven Selektion von Klonen mit integrierter Neo-Kassette wurden die ES-Zellen mit G418 und zur negativen Selektion von Klonen bei denen die HSV-TK-Kassette mitintegriert wurde mit

Gancyclovir behandelt. Der Selektionsdruck führt zur Anreicherung homolog rekombinierter ES-Zellklone

Durchführung:

- nach der Elektroporation werden die Zellen noch zwei Tage ohne Selektionsdruck wachsen gelassen.
- am Tag zwei beginnt die Selektion durch Zugabe von Geneticin (G418) ins Medium (200 µg/ml).
- ab Tag vier beginnt die zusätzliche Selektion durch Zugabe von 2 mg/ml Gancyclovir ins ES-Medium.
- Mediumwechsel jeden zweiten Tag.
- wenn sich überlebende ES-Zellklone etabliert haben (normalerweise Tag 12-16), wird das Medium abgesaugt und die Schalen mit 10 ml PBS gefüllt.
- Unter einer Stereolupe die Einzelkolonien mit einer sterilen Pipette in 20 µl aufnehmen und in eine Vertiefung einer 96-well Platte überführen.
- die Kolonien durch Trypsin/EDTA Behandlung vereinzeln.
- für zwei Tage in der 96-well Platte mit EF-Zellen kokultivieren.
- nach den zwei Tagen die Zellen auf drei 96-well Platten verteilen.
- zwei der drei 96-well Platten sehr dicht wachsen lassen.
- Die Zellen in den zwei Platten mit PBS waschen, Platten zentrifugieren, Überstand absaugen und Platten komplett bei -20°C einfrieren.
- die Zellen in der dritten 96-well Platte auf drei 48-well Platten verteilen und diese in Einfriermedium (s.o.) bei -80°C einfrieren, wenn sie dicht gewachsen sind.

2.7.2 Kultivierung von T 293 Zellen

Zellkultur von T 293 Zellen

Die T 293 Zellen wurden in 15 cm Zellkulturschalen kultiviert und alle 2-3 Tage im Verhältnis 1:3 auf neue 15 cm Zellkulturschalen verteilt. Das Auftauen, Einfrieren und Vereinzeln der Zellen mit Trypsin/EDTA erfolgte wie bei den ES-Zellen (Kapitel 2.7.1).

Elektroporation von T 293 Zellen

Für diese Arbeit wurden T 293 Zellen durch Elektroporation mit den Vektoren A21/D2-pEGFP-N1 und pEGFP-N1 transfiziert.

Durchführung:

- Zellen vereinzeln und zählen. Es werden 5×10^6 Zellen pro Elektroporationsansatz benötigt.
- 5×10^6 Zellen in 410 μ l Elektroporationsmedium resuspendieren.
- 20 μ g Vektor-DNS (in ca. 10-20 μ l H₂O_{bidest}) zu den Ansätzen pipettieren, vermischen und den Ansatz in Elektroporations-Küvetten überführen.
- die Elektroporation erfolgt bei 960 μ F und 240 V.
- nach der Elektroporation werden die Zellen in 10 ml Medium überführt und 10 min bei RT inkubiert.
- Zellen abzentrifugieren und in 10 ml Medium resuspendieren.
- ÜN im Brutschrank inkubieren.

Ein Teil der elektroporierten Zellen wird am nächsten Tag mit Hilfe des Durchflußzytometers (FACS) auf die Transfektions-Effizienz hin untersucht, der andere Teil der Zellen wird für die Analyse mit dem Konfokalen Lasermikroskop präpariert (Kapitel 2.9.1).

2.7.3 Kultivierung von DC aus dem Knochenmark

Für die Gewinnung von dendritischen Zellen aus dem Knochenmark werden Femur und Tibia von Spendermäusen präpariert und das Knochenmark ausgespült. Anschließend werden die so gewonnenen Zellen für mindestens sechs Tage in Medium mit 10% GM-CSF kultiviert (Inaba et al., 1992).

Durchführung:

- Hinterbein (Femur+Tibia) abtrennen und von Geweberesten freipräparieren.

- Knochen an den Gelenken aufschneiden und mit einer Spritze das Knochenmark mit kaltem PBS ausspülen.
- Zellen resuspendieren und durch einen Zellsieb filtrieren.
- Zellen zählen und abzentrifugieren.
- Zellen in DMEM + 10% GM-CSF (Kapitel 2.2.2) aufnehmen (5×10^6 Zellen pro 10 cm Zellkulturschale).
- an Tag drei erfolgt Mediumwechsel.

An Tag sechs erfolgt entweder eine direkte Analyse der Zellen (z.B. am Durchflußzytometer) oder eine Stimulation der Zellen.

Um die Zellen aus den Kulturschalen zu lösen wurde ein Zellschaber benutzt.

In vitro Deletion von loxP flankierten Sequenzen durch das TAT-NLS-Cre Fusionsprotein

Für die *in vitro* Deletion der loxP- flankierten Neomycin-Genkassete in homolog rekombinierten Knochenmark-DC wurde in dieser Arbeit das TAT-NLS-Cre Fusionsprotein verwendet (das uns freundlicherweise von Frank Edenhofer zur Verfügung gestellt wurde).

Ein wichtiger Bestandteil des TAT-NLS-Cre Fusionsproteins ist ein vom HIV-TAT Protein abstammendes 11 Aminosäuren langes basisches Peptid. Proteine, die mit diesem Peptid fusioniert werden, können über die Zellmembran transportiert und damit in die Zelle eingeschleust werden (Schwarze et al., 1999). Zusätzlich enthält das TAT-NLS-Cre Protein eine Kernlokalisationssequenz (Nuclear localisation sequence: NLS) sowie die Cre-Rekombinase.

Durchführung:

- In GM-CSF-Medium gereifte Knochenmark-DC wurden am Tag 6 der GM-CSF Kultur geerntet, und in einer 12-well Zellkulturplatte überführt (3×10^7 Zellen/well).
- Die Zellen wurden mit dem TAT-NLS-Cre Protein in einer Konzentration von $0,5\mu\text{M}$ bzw. $1,0\mu\text{M}$ für 4 Stunden in FCS-freiem DMEM-Medium kultiviert; danach 1x in FCS-freiem Medium gewaschen und anschließend auf 10cm Zellkulturplatten in DMEM-Medium (10% FCS, 10% GM-CSF) für weitere 3 Tage kultiviert.

Zur Analyse wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und ein Teil der Zellen zur Isolierung von genomischer DNS verwendet. Der andere Teil der Zellen wurde am FACS analysiert.

2.8 Tierversuche

2.8.1 *Superovulation*

Um Embryonen im Blastozystenstadium entnehmen zu können und um die Anzahl der gebildeten Embryonen zu erhöhen, wurden weibliche Mäuse superovuliert. Dazu wurde den Mäusen zwischen 14-17 Uhr 10 Einheiten PMSG und 44-48 Stunden später 10 Einheiten hCG intraperitoneal injiziert. Danach wurden die Mäuse mit männlichen Mäusen verpaart. Der Zeitplan war so organisiert, dass die Ovulation, die etwa 12 Stunden nach hCG Gabe erfolgt, auf die Mitte der Dunkelphase fiel. Innerhalb von weiteren 12 Stunden erfolgte die Untersuchung auf einen Vaginalpfropf (plug), der auf eine Begattung hinweist. Der Tag, an dem ein Vaginalpfropf entdeckt wird, gilt gemäß der üblichen Konvention als Tag 0,5 der Embryonalentwicklung. Für die Blastozysteninjektion wurden die Embryonen am Tag 3,5 entnommen.

2.8.2 *Gewinnung embryonaler Fibroblasten*

Die embryonalen Fibroblasten für die Kokultivierung mit ES-Zellen (Kapitel 2.7.1) wurden aus CD1 Mäusen (Harlan) am Tag 14 *post coitum* gewonnen.

Durchführung:

- beide Uterushörner freipräparieren.
- 10 cm Kulturschale mit ca. 10 ml EF-Medium (Kapitel 2.2.2) füllen.
- Uterus entfernen und in Kulturschale mit EF-Medium geben.
- Embryonen freipräparieren und in neue Kulturschale mit EF-Medium geben.
- Dottersack entfernen.
- Vorgang wiederholen bis alle Embryonen in neuer Kulturschale sind.
- Eine weitere Kulturschale mit 100 µm Zellsieb bereitstellen.
- Leber und Kopf entfernen und restlichen Körper in das Zellsieb legen (2-4 Embryonen pro Sieb).

- mit 5-8 ml EF-Medium spülen und Embryonen mit sterilem Spitzenstempel durch das Zellsieb drücken.
- mit weiteren 5-8 ml EF-Medium nachspülen.
- Zellen zählen und in einer Dichte von ca. 5×10^6 Zellen pro 10 cm Kulturschale kultivieren.
- Bei konfluentem Wachstum (nach ca. 4-5 Tagen) jede Schale auf vier 15 cm Kulturschalen verteilen.
- Bei konfluentem Wachstum jede 15 cm Kulturschale in 2-3 1 ml Kryoröhrchen einfrieren (Lagerung in flüssigem Stickstoff).

2.8.3 Generierung chimärer Mäuse

Für die Generierung chimärer Mäuse aus rekombinierten ES-Zellen kam die Blastozysteninjektion zur Anwendung. Die Embryonen wurden dazu im Blastozystenstadium am Tag 3,5 der Embryonalentwicklung aus dem Uterus superovulierter C57BL/6 Weibchen retrograd ausgespült und in M2 Medium aufgenommen. Etwa 15-20 der rekombinierten ES-Zellen wurde unter einem Lichtmikroskop mit Hilfe von Mikromanipulatoren in das Blastocoel injiziert. Anschließend erfolgte der Uterustransfer der manipulierten Blastozysten in pseudoschwangere Ammenmütter. Bis zu 20 Blastozysten wurden pro Uterushorn transferiert. Die Mikroinjektionen wurden von Frau Susanne Weiss durchgeführt.

2.8.4 Organentnahme

Zur Entnahme von Organen oder Zellen aus Mäusen wurden diese durch Cervikale Dislokation (Genickbruch) schmerzfrei getötet und die jeweiligen Organe nach Desinfektion des Operationsgebietes mit 70% EtOH steril entnommen.

2.8.5 Injektion von Mäusen mit Thioglykolat

Zur Gewinnung von peritonealen Makrophagen wurden Mäuse mit 5 ml Thioglykolat-Lösung intraperitoneal injiziert. Nach 4-5 Tagen wurden die Mäuse getötet und der Bauchraum der Mäuse mit 10 ml kaltem PBS gespült.

2.8.6 Induktion einer experimentellen Kolitis

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Kolitis-Experimente wurden im Rahmen des Tierversuchsvorhaben 'Mukosale Immunität' (Aktenzeichen: 211-2531-104/99) durchgeführt.

DSS-Kolitis (Okayasu et al., 1990)

Durchführung:

DSS wird je nach verwendeter Mauslinie in einer Endkonzentration zwischen 3,5 % und 5% w/v im Trinkwasser der Versuchstiere gelöst. Die Lösung wird alle zwei Tage ausgetauscht. Die Tiere werden jeden Tag gewogen. Nach 7- 9 Tagen werden die Tiere getötet, der Dickdarm entnommen auf Blut untersucht und seine Länge gemessen. Anschließend wird er für die Weiterverwendung in der Histologie präpariert.

Transferkolitis (ConA-Methode nach Bregenholt et al., 1998)

Durchführung:

- einer C57BL/6 Maus werden Milz und mesenteriale Lymphknoten entnommen und eine Zellsuspension hergestellt (Kapitel 2.9.3).
- Die Zellen werden in 15 ml RPMI-Medium (10% FCS+ 4µg/ml ConA) resuspendiert und für 3 Tage inkubiert.
- Anschließend werden CD4-positive Zellen mittels MACS-Aufreinigung (Kapitel 2.9.6) selektioniert.
- Die CD4-positiven Zellen werden in PBS aufgenommen und je 3×10^5 Zellen/Maus in RAG^{ko/ko} bzw. RAG^{ko/ko}IL-18^{ko/ko} Mäuse i.p. injiziert.

2.8.7 Listerieninfektion

Für die Infektion mit *L.m.ova* wurden 20µl Bakterien aus dem Glycerolstock in 6 ml BHI-Medium überführt und bei 37°C für 5 Stunden unter Schütteln inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von

0,05-0,1 wurden die Listerien entsprechen der benötigten Menge mit PBS verdünnt. Die Mäuse wurden mit je 200µl Listerien in PBS i.v. infiziert. Alle Listerieninfektionen sowie die Haltung der infizierten Mäuse fanden im S2 Bereich des Tierstalls der Med. Mikrobiologie am Klinikum r.d. Isar statt.

2.9 Immunologische und Zellbiologische Methoden

2.9.1 Immunhistologie/Immunhistochemie

Präparation von Organen für die Immunhistologische Analyse

Für die histologische Untersuchung von Organen müssen diese nach der Entnahme zunächst fixiert werden. Eine übliche Methode ist das Schockgefrieren von Organen in flüssigem Stickstoff, mit nachfolgender 10 minütiger Aceton-Fixierung.

Da bei dieser Methode das im Zytosol der Zelle befindliche EGFP nicht mitfixiert wird und verloren geht, wurde für den Nachweis von EGFP in Zellen bzw. Organen in dieser Arbeit eine modifizierte Formaldehyd-Fixierung angewendet. Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.2.1 beschrieben.

Durchführung:

- Organe in Biopsie-Kassetten überführen.
- Die Organe je nach Größe 2-5 Stunden in 4% Paraformaldehyd-Lösung einlegen.
- Organe in 5% Sucrose-Lösung für 1 Stunde bei RT einlegen.
- Organe in 10% Sucrose-Lösung für 1 Stunde bei RT einlegen.
- Organe in 20% Sucrose-Lösung ÜN bei 4°C einlegen.
- Organe von Biopsie-Kassetten in Cryomold-Gewebeschalchen überführen und mit Einbettmedium auffüllen.
- Die Organe werden in N₂-gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert.

Gefrierschnitte wurden am Kryotom in einer Dicke von 8 μm angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und ca. 15 min an der Luft getrocknet. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

Für die Analyse am Konfokalen Lasermikroskop wurden die gefrorenen Gewebeschnitte aufgetaut und dann für die direkte Analyse der EGFP-Expression am Konfokalen Lasermikroskop mit einem Tropfen VectaMount Medium eingedeckt.

Für die immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten wurde die folgende Methode durchgeführt. Die verwendeten Puffer, Lösungen und Reagenzien sind in den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.3 beschrieben.

Durchführung:

- Objektträger auftauen lassen und mit DAKO-Pen umranden.
- Schnitte mit TRIS/TWEEN für 5 min rehydrieren.
- Biotin-blocking Kit: 1000 μl TRIS/TWEEN/1% BSA
+ 4 Tropfen Avidin Lösung
ca. 200 μl pro Schnitt
15 min in feuchter Kammer inkubieren
2 x 2 min mit TRIS/TWEEN waschen
1000 μl TRIS/TWEEN/1% BSA
+ 4 Tropfen Biotin Lösung
ca. 200 μl pro Schnitt
15 min in feuchter Kammer inkubieren
2 x 2 min mit TRIS/TWEEN waschen
- Primärantikörper in Antibody Diluent (DAKO) verdünnen und für 1 Stunde auf dem Schnitt in feuchter Kammer inkubieren.
- 3 x 2 min mit TRIS/TWEEN waschen.
- Sekundärantikörper in Antibody Diluent verdünnen und 45 min auf dem Schnitt in feuchter Kammer inkubieren.
- 3 x 2 min mit TRIS/TWEEN waschen.
- Streptavidin-Fluoreszenz Konjugat in Antibody Diluent verdünnen und 45 min auf dem Schnitt in feuchter Kammer im Dunkeln inkubieren.
- 3 x 2 min mit TRIS/TWEEN waschen.
- Schnitte trocknen lassen und mit Vectashield Medium eindecken.
- Bis zur Analyse am Konfokalen Lasermikroskop im Dunkeln bei 4°C lagern.

Für die immunhistochemische Färbung mit dem Nova Red Kit der Firma Vector wurde statt des Streptavidin-Fluoreszenz Konjugates ein Streptavidin-HRP Konjugat verwendet und wie folgt weiter vorgegangen:

- Streptavidin-Fluoreszenz Konjugat in Antibody Diluent verdünnen und 20 min auf dem Schnitt in feuchter Kammer im Dunkeln inkubieren
- 3 x 2 min mit TRIS/TWEEN waschen
- Färben des Schnittes mit Nova Red (nach Angaben des Herstellers)
- Abstoppen der Färbereaktion durch spülen mit Leitungswasser
- Gegenfärben mit Hämatoxilin (ca. 30 Sekunden), dann für ca. 2 min mit Leitungswasser bläuen
- trocknen lassen und mit VectaMount Medium eindecken

Präparation von Zellen für die immunhistologische Analyse am konfokalen Lasermikroskop

Für die Analyse von Zellen unter dem konfokalen Lasermikroskop wurden die Zellen ÜN auf einem Glasplättchen wachsen gelassen (siehe auch Kapitel 2.7.1).

Durchführung:

- Glasplättchen in 100% EtOH waschen und an der Luft trocknen lassen.
- mit steriler Pinzette in 12-well Platte überführen.
- ca. 5×10^6 Zellen in 1 ml Medium unter leichtem Druck auf Glasplättchen pipettieren.
- ÜN im Brutschrank inkubieren.
- Überstand absaugen und mit 1 ml kaltem PBS waschen.
- fixieren in 1 ml 2% PFA in PBS (10 min bei RT).
- Überstand absaugen und mit 1 ml kaltem PBS waschen.
- Glasplättchen trocknen lassen und auf einen Objektträger mit einem Tropfen Entellan fixieren.

An dieser Stelle wurden die Proben entweder direkt am konfokalen Lasermikroskop auf ihre EGFP Expression hin analysiert oder zusätzlich mit Antikörpern, die spezifisch bestimmte zelluläre Strukturen erkennen bzw. dem DNS-Farbstoff TOPROTM-3 iodid gefärbt.

Durchführung:

- Glasplättchen mit Permeabilisierungslösung + Erstantikörper und/oder TOPROTM-3 iodid (Endkonzentration: 10 nmol) für 30-60 min lichtgeschützt inkubieren.
- 2 x mit PBS waschen.
- Glasplättchen mit fluoreszenzmarkiertem Zweitantikörper oder Streptavidin-Fluoreszenz-Konjugat in Permeabilisierungslösung für 30-60 min lichtgeschützt inkubieren.
- 2 x mit PBS waschen.
- Glasplättchen trocknen lassen.
- Bis zur Analyse am Konfokalen Lasermikroskop im Dunkeln bei 4°C lagern.

Nile Red (Nilrot) Färbung

Bei Nilrot handelt es sich um einen Fluoreszenz-Farbstoff der hydrophile Lipide, Phospholipide sowie hydrophile Domänen einiger Proteine anfärbt. Die Anregung erfolgt z.B. mit einem Argon-Laser bei 488nm, zur Detektion kann können die Filter für FITC oder Rhodamin benutzt werden. In dieser Arbeit wurde Nilrot zur Färbung von Geweben und Zellen zur Analyse am Konfokalen Lasermikroskop verwendet.

Durchführung:

- Nilrot Stocklösung (0,5 mg/ml in Aceton) 1/1000 in einer 75:25 Glycerol-Wasser Mischung verdünnen.
- 1 Tropfen auf das Objekt geben und Deckgläschen auflegen (Wenn die Fluoreszenz zu stark ist, evtl. noch einmal 1: 5 weiterverdünnen).

2.9.2 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Ein Durchflußzytometer ist ein sehr effizientes Instrument zur qualitativen und quantitativen Untersuchung verschiedener Zellpopulationen. Da es in einigen Fällen mit einem zusätzlichen Zellseparator ausgestattet ist, wird das Durchflußzytometer im allgemeinen Sprachgebrauch als FACS (Fluorescence-activated cell sorter) bezeichnet. Das Durchflußzytometer ermöglicht die

Detektion, Messung und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen (oder anderen Partikeln) erhalten werden, wenn sie in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl treten. In dem FACS-Gerät befindet sich ein ständiger Fluss einer Trägerflüssigkeit (sheath fluid). In diese Trägerflüssigkeit wird die Probe in Form einer Zellsuspension eingebracht. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden die Zellen vereinzelt und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt. Das Laserlicht führt zu einer Excitation der Fluoreszenzfarbstoffe, die wiederum Fluoreszenzlicht emittieren. Die emittierten Fluoreszenzen können durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Die Kombination von geeigneten Antikörpern und Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Oberflächenantigene einer Zelle. Voraussetzung sind Fluoreszenzfarbstoffe, die sich in ihren Emissionsspektren unterscheiden und deshalb getrennt voneinander detektiert werden können. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden FITC (Emissionsmaximum 525 nm), PE (575 nm), Cy5.5-PE (694 nm) und APC (660 nm) verwendet. Je nach untersuchtem Antigen wurden entweder direkt-konjugierte Antikörper verwendet, oder biotinylierte Antikörper mit Streptavidin-APC als Zweitreagenz benutzt. Die Analysen der Immunfluoreszenz erfolgten am FACS-Calibur Durchflußzytometer mit Cellquest-Software.

FACS-Analyse von Oberflächenantigenen

Durchführung

- Zellen (mindestens 5×10^4) in 200 μ l FACS-Puffer aufnehmen und zentrifugieren.
- Fc-Block: Zellen in 30 μ l Fc-Block (anti-CD32/16; 1:100 in FACS-Puffer) für 20 min auf Eis inkubieren.
- 2 x mit 200 μ l FACS-Puffer waschen.
- Primäantikörper: Zellen mit 30 μ l Primäantikörper in FACS-Puffer für 30 min auf Eis inkubieren.
- 2 x mit 200 μ l FACS-Puffer waschen.
- Sekundärreagenz: Zellen mit 30 μ l Sekundärreagenz (z.B. Streptavidin-APC) in FACS-Puffer für 30 min auf Eis inkubieren.
- 2 x mit 200 μ l FACS-Puffer waschen.
- Zellen in 300 μ l FACS-Puffer resuspendieren.

Intrazelluläre Zytokinfärbung

Durchführung:

- Zellen in FACS-Puffer resuspendieren (ca. 6×10^6 Zellen) und abzentrifugieren.
- Erythrozyten-Lyse: mit Ammoniumchlorid (0,15M pH: 7,4) für 4-5 min inkubieren, zum abstoppen 5 x Volumen FACS-Puffer zugeben und abzentrifugieren.
- Für die intrazelluläre Zytokinfärbung bei den Listerieninfektionen erfolgt an dieser Stelle die Restimulation:
 - Die Zellen in RPMI-Medium resuspendieren und mit je 2 μ g SIINFEKL-(für CD8⁺ Zellen) oder LLO₁₉₀₋₂₀₁-(für CD4⁺ Zellen) Peptid für 2 Stunden bei 37°C inkubieren.
 - Zugabe von 1 μ l/ml GolgiPlug und für weitere 3 Stunden bei 37°C inkubieren, dann zentrifugieren.
- Zellen in 100 μ l EMA-Mischung (Kapitel 2.2.1) resuspendieren und 20 min im Dunkeln und anschließend 10 min unter Lichtquelle auf Eis inkubieren.
- 2 x mit 200 μ l FACS-Puffer waschen.
- Danach erfolgt die Färbung für Oberflächenantigene wie oben beschrieben.
- Zellen in 100 μ l Cytofix/Cytoperm resuspendieren und 20 min im Dunkeln auf Eis inkubieren.
- Zellen 3 x mit PermWash waschen.
- Zytokinantikörper (z.B. anti-TNF- α und anti-IFN- γ und die jeweiligen Isotyp-Antikörper) in FACS-Puffer ansetzen und Zellen resuspendieren.
- für 30 min im Dunkeln auf Eis inkubieren.
- Zellen 3 x mit PermWash waschen.
- Zellen evtl. mit 2% PFA in PBS fixieren oder direkt in 100-300 μ l FACS-Puffer resuspendieren und am FACS analysieren.

2.9.3 Isolierung von Zellen aus Organen

Um Einzelzellen aus Organen zu isolieren wurden die Organe mit Kollagenase verdaut.

Durchführung:

- Organe steril entnehmen und in 5 cm Kulturschalen überführen.
- 5 ml Kollagenase-Lösung (siehe 2.2.1) zugeben.
- Organe mit Skalpell in kleine Stücke zerschneiden.
- Organe für 1-2 Stunden bei 37°C inkubieren.
- Verdaute Organe in ein 100 µm Zellsieb überführen und mit sterilem Spritzenstempel durch das Sieb drücken.
- Zellen resuspendieren, abzentrifugieren und in gewünschtem Puffer aufnehmen

2.9.4 Organkulturen

Für die Durchführung von Organkulturen wurden die Organe entnommen (Kapitel 2.8.4), in kleine Teile zerschnitten und in RPMI-Medium kultiviert. Nach 6-48 Stunden wurden mittels ELISA die Zytokinkonzentrationen bestimmt und in Relation zur eingesetzten Menge des Organs gesetzt.

2.9.5 Bestimmung des histologischen Scores bei Kolitsi-Experimenten

Für die Bestimmung des histologischen Scores wurde das gesamte Kolon entfernt. Für augenfällige Anzeichen einer Kolitis wie Verkürzung des Kolons (DSS-Kolitis), Blut im Stuhl und Verdickung der Darmwand wurden je nach Schwere 0-3 Punkte vergeben. Das Kolon wurde anschließend in Ringe geschnitten, in 10% Formalin fixiert und für die histologische Analyse in Paraffin eingebettet. Es wurden 4µm Schnitte angefertigt, HE-gefärbt und unter dem Mikroskop nach den folgenden Kriterien beurteilt:

Infiltration mit inflammatorischen Zellen

- wenig inflammatorische Zellen in der Lamina Propria:.....0
- erhöhte Infiltration der Lamina Propria mit inflammatorischen Zellen (einschließlich Neutrophiler Granulozyten).....1
- starke Infiltration mit inflammatorischen Zellen bis in die Submukosa.....2
- Transmurale Infiltration mit inflammatorischen Zellen.....3

Schädigung des Epithels:

- Keine Schädigung des Epithels.....0
- diskrete fokale lymphoepitheliale Läsionen.....1
- Mukosale Erosion/Ulzeration.....2
- Extensive mukosale Schädigung mit Ausdehnung in tiefere Strukturen der Darmwand.....3

Die einzelnen Scores wurden zusammengezählt und als histologischer Score als ein Ausmaß der Schädigung des Kolons genommen.

Die histologische Beurteilung wurde durch Prof. Hans-Anton Lehr am Universitätsklinikum Mainz durchgeführt. Eine Beschreibung der Kriterien für die histologischen Scores ist auch bei Siegmund et al., 2001c nachzulesen.

2.9.6 Zellsortierung mittels MACS Technologie

'Magnetic activated cell sorting' (MACS) ist eine der Standardmethoden zur Isolierung spezifischer Zellen aus einem komplexen Zellgemisch. Die Methode basiert auf der spezifischen Markierung von Zellen mit Antikörpern die mit supramagnetischen Partikeln konjugiert sind. Die Aufreinigung erfolgt über eine MACS-Säule die einem starken Magnetfeld ausgesetzt wird. Die markierten Zellen werden in diesem Magnetfeld zurückgehalten, während nichtmarkierte Zellen durch die Säule laufen. Nachdem die Säule aus dem magnetischen Feld genommen wurden, können auch die markieren Zellen von der Säule gewaschen werden.

Durchführung (Midi-MACS Protokoll):

- Zellen in entsprechender Menge (ca. 500 µl) MACS-Puffer resuspendieren.
- entsprechende Menge mit MACS-beads konjugierte Antikörper zugeben und mischen.
- 20 min bei 4°C inkubieren, alle 5 min schütteln.
- ca. 50 fache Menge an MACS-Puffer zugeben und zentrifugieren.
- MACS-Säulen mit 3 ml MACS-Puffer äquilibrieren, Säule in den Magneten stecken.
- Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufnehmen und auf die Säule auftragen.
- Säule mit 3 x 3 ml MACS-Puffer waschen.
- Säule aus dem Magneten nehmen, 5 ml MACS-Puffer auf die Säule geben und mit Stempel durch die Säule drücken.

- Zellen abzentrifugieren und in gewünschtem Puffer aufnehmen.

2.9.7 ELISA

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentrationen in Seren und Zellkulturüberständen wurden die ELISA Kits der Firma Pharmingen verwendet. Es wurden folgende ELISA-Kits benutzt:

OptEIA Mouse IL-18 set (Cat.No. 558853)

OptEIA Mouse IFN- γ set (Cat.No. 555138)

OptEIA Mouse IL-12 set (Cat.No. 555256)

OptEIA Mouse TNF- α set (Cat.No. 558874)

Des Weiteren wurden für die Durchführung der ELISAs das OptEIA Reagent Set A und B verwendet.

Die ELISAs wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.9.8 Messung der NO-Konzentration

Um die NO Konzentration im Überstand der Zellkulturen messen zu können, wurde das Griess-Reagenz verwendet (Green et al., 1982)

Griess-Reagenz:

A: N-(1-Naphtyl) Ethylendiamin Dihydrochlorid	0,4 g
H ₂ O _{dest}	auf 200 ml
B: Sulphanilamid	4 g
H ₃ PO ₄	10g
H ₂ O _{dest}	auf 200 ml

als Standard dient NaNO₂ (1M Stocklösung in H₂O)

Durchführung:

- Lösung A und B kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1:1 mischen.
- 100µl des Zellkulturüberstandes in eine ELISA-Platte überführen und 100µl der Griess Reagenz zugeben.
- 10 min bei RT inkubieren und am ELISA-Reader bei A_{540} messen.

2.9.9 Hitze-inaktivierung von Listerien

Für die Hitze-inaktivierung wurden die Listerien bei einer Dichte von 1×10^7 /ml für 1 Stunde bei 67°C im Wasserbad inkubiert und anschließend in Aliquots von 500µl bei -20°C gelagert.

Um die Inaktivierung zu überprüfen wurden 10µl der inaktivierten Bakterien auf BHI-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es konnte kein Wachstum festgestellt werden.

2.9.10 Bestimmung des Listerientiters in Milz und Leber infizierter Mäuse

Durchführung:

- Zur Bestimmung des Listerientiters wurden den infizierten Mäusen Milz und Leber entnommen und die Organe auf Zellsieben zerdrückt und in 5 ml PBS suspendiert.
- 100µl der Suspension wurde in 900µl H₂O+0,1% TRITON-X-100 überführt und gemischt.
- Die so erhaltene Suspension wurden noch zweimal 1:10 in H₂O+0,1% TRITON-X-100 verdünnt .
- Von den drei Verdünnungsstufen wurden in Triplikaten je 10µl auf BHI-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.
- Die Kolonien wurden am nächsten Tag ausgezählt und der Gesamtiter pro Milz bzw. Leber berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Teil 1: Charakterisierung des murinen Gens A21/D2

3.1.1 *Charakterisierung der murinen A21/D2 cDNS*

Analyse der murinen A21/D2 cDNS und Proteinsequenz

Isolierung der vollständigen cDNS des Klons A21/D2

Um die vollständige cDNS Sequenz des Klons A21/D2 zu isolieren, wurde eine λ -Phagen cDNS Bibliothek aus magnetisch sortierten, GM-CSF differenzierten dendritischen Zellen konstruiert. Diese Bibliothek wurde mir von Ivo Lieberam (Köln) zur Verfügung gestellt. Die Bibliothek wurde anschließend von Judith Alferink (München) mit der aus dem Fragment A21/D2 erzeugten Sonde (siehe Einleitung) durch Filterhybridisierung untersucht (Sambrook, 1989). Es wurden 4 unabhängige Klone isoliert, deren Konsensus-Sequenz in Abbildung 3.1 gezeigt ist.

Analyse der murinen cDNS und Proteinsequenz

Die isolierte cDNS umfasst 3776 Basenpaare. Im 5' Bereich finden sich 5 ATG Kodons (Abb. 3.1), wobei das offene Leseraster der ersten vier ATGs nur jeweils für einige Aminosäuren kodiert, bevor ein Stoppkodon folgt (4 As, 4 As, 20 As, 8 As). Während die ersten vier Startkodons nur von einer sehr schwachen Kozak-Sequenz umgeben sind, befinden sich um das fünfte Startkodon (656) typische Sequenzen für einen Translationsstart (Kozak, 1984; Kozak, 1996). Das Leseraster ausgehend vom fünften ATG Kodon kodiert für ein Protein mit einer Länge von 949 Aminosäuren (656-3503), einer berechneten Masse von 107,6 kDa und einem isoelektrischen Punkt bei pH: 9,93.

Bei der Suche nach konservierten Proteinmotiven findet sich unter Verwendung des Programms *SignalP* (Henrik Nielsen, 1997) ein die Aminosäuren 1-23 umfassendes Leaderpeptid, dessen hoher Hydrophobizitätsindex auf ein sekretorisches Protein hinweist. Die Suche nach weiteren konservierten Proteinmotiven mit Standardprogrammen wie z.B. SMART (Schultz et al., 1998) oder TMHMM (Sonnhammer et al., 1998) ergab keine weiteren signifikanten Homologien zu bekannten Proteindomänen.

Ergebnisse

Bei der Suche nach homologen Aminosäuresequenzen mit Hilfe des Blast Programms (Altschul et al., 1990) konnte eine Ähnlichkeit von drei Sequenzabschnitten (Abbildung 3.1, grau unterlegt) mit den sog. consensus repeat Domänen festgestellt werden (siehe Kapitel 4.1.2)

1	AAGCTGGAGC	TCCACC	CGCG	TGGCGGCCGC	TCTAGA	ACTA	GTGGAT	CCCC	CGGGCT	GCAG	GAATTC	CGGCA	CGAGGGA	AGG	AGGC	GTGTT
91	TGCTGATCTG	TTAAAT	TCTT	AGTGAAGTTT	TCTTGAT	TTC	CAGT	GTGTT	GGTTG	GAGC	AAAC	CTGA	AG	TAG	CCCT	GC
181	ATTTCTGGGA	TGGAAT	CCAG	ATGAGGAAAA	AATAGA	AGGA	GAAGGG	GGAG	AAAAGG	GAGA	AGAGA	AGGGA	CTCGG	CCAGA	CTGC	AGGAG
271	GGAAGGGTGA	TAAGAAG	TTC	TGGGAAAACT	CCACAGA	AAGG	GAAGAG	CGAG	ATTCAGA	AAAT	CACTAG	GACT	TCAC	TTTCAG	GAAGAT	CCCT
361	GTGGCAACCA	AGGACG	GGCA	CACACAGACC	CAGGAGA	AAAA	TGCAG	ACAAA	TGGAG	AATACA	AACGGT	CCCA	AGGAC	AGCAG	CGTTC	ACCTC
451	CTCCCACTGG	ACCAGA	AGGT	AAAAGACACA	GCCAGCA	AAAA	GGAA	TCGGCC	CAGGCT	GGGC	TCCCT	GGGGC	TGCTT	TCAG	ACAGAC	CAAGG
541	AGACAGAGAG	CAGGAAG	GAA	CCGATCTCAC	CTAGGAA	ACT	GTCTT	GGGA	CCAAC	CTTCA	CGTTT	CTCTG	GAAAG	CTCT	GCAAG	CATCT
631	CCATGAACCA	CTGTTG	GATA	ATACA	ATG	ATG	TGG	AAA	ATG	GGA	CCC	CAC	TTC	ACC	ACG	CTC
		Met	Met	Trp	Lys	Met	Gly	Pro	His	Phe	Thr	Thr	Leu	Leu	Ala	Met
710	TGT	GGC	TCA	GCA	TCT	CAT	TCT	CCT	GCC	TTG	GAT	AGC	GAC	AGC	CAC	GCT
	Cys	Gly	Ser	Ala	Ser	His	Ser	Pro	Ala	Leu	Asp	Ser	Asp	Ser	His	Ala
785	ATC	AGC	AGT	AGG	TCA	GCT	CGG	TAT	CTG	AGG	CAC	ACC	GGG	AGG	TCT	GGT
	Ile	Ser	Ser	Arg	Ser	Ala	Arg	Tyr	Leu	Arg	His	Thr	Gly	Arg	Ser	Gly
860	CCA	AAT	CCT	CAG	CCT	TTC	CAA	AGG	AGG	AAG	AGT	GTA	CCA	GTG	TTG	AGA
	Pro	Asn	Pro	Gln	Pro	Phe	Gln	Arg	Arg	Lys	Ser	Val	Pro	Val	Leu	Arg
935	CCC	TCA	GGT	ATC	AAT	GGA	GTC	CCA	GTC	AGA	CCT	GAG	GTG	AGA	CCC	ATA
	Pro	Ser	Gly	Ile	Asn	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Arg	Pro	Ile
1010	CGA	GAT	GAG	GGG	TCT	TCT	GCT	CGG	ACA	AGA	ATG	TTG	CGA	TTC	CCC	TCT
	Arg	Asp	Glu	Gly	Ser	Ser	Ala	Arg	Thr	Arg	Met	Leu	Arg	Phe	Pro	Ser
1085	AGC	TTT	GCA	GGA	AAG	AAC	AGG	GTA	TGG	GTC	ATC	TCA	GCC	CCT	CAC	GCC
	Ser	Phe	Ala	Gly	Lys	Asn	Arg	Val	Trp	Val	Ile	Ser	Ala	Pro	His	Ala
1160	AGC	CTC	CTG	AAG	GAC	GAC	GTG	TAT	TGT	GAG	CTG	GCA	GAA	AGG	CAC	ATC
	Ser	Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Val	Tyr	Cys	Glu	Leu	Ala	Glu	Arg	His	Ile
1235	GGC	GAG	GAA	GGG	GGC	AAG	GTA	CGG	AGG	ATC	ACC	AAT	GAA	GGG	CAG	ATC
	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Lys	Val	Arg	Arg	Ile	Thr	Asn	Glu	Gly	Gln	Ile
1310	ATC	CCA	AAG	CTG	ATG	AGC	TTC	TTG	AAA	CTG	GAG	AAG	GGC	AAG	TTT	AGC
	Ile	Pro	Lys	Leu	Met	Ser	Phe	Leu	Lys	Leu	Glu	Lys	Gly	Lys	Phe	Ser
1385	GTG	GAG	GAG	CGC	TAC	CCT	TAC	CCG	GTC	AGG	CTG	GAA	GCC	ATG	TAT	GAG
	Val	Glu	Glu	Arg	Tyr	Pro	Tyr	Pro	Val	Arg	Leu	Glu	Ala	Met	Tyr	Glu
1460	ATC	GAG	AAA	ATC	AGG	CAG	AAG	GGT	TTT	GTC	CAA	AAG	TGT	AAG	GCC	TCG
	Ile	Glu	Lys	Ile	Arg	Gln	Lys	Gly	Phe	Val	Gln	Lys	Cys	Lys	Ala	Ser
1535	GGA	AAC	GAC	GGC	GGT	GGA	GGA	GCA	GGA	GGT	ACA	GGC	CTG	GGC	GGT	GAT
	Gly	Asn	Asp	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Asp
1610	CAA	GTC	CAC	CCC	ACC	AGA	GAG	GCT	CCG	AGA	AAG	CAG	GCC	ACC	AGC	AAG
	Gln	Val	His	Pro	Thr	Arg	Glu	Ala	Pro	Arg	Lys	Gln	Ala	Thr	Ser	Lys
1685	CCA	AGG	GCC	ACC	ACC	CTT	CCT	CCT	GCT	CCA	GTC	ACG	ACA	GCC	ACT	CGG
	Pro	Arg	Ala	Thr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ala	Pro	Val	Thr	Thr	Ala	Thr	Arg
1760	GCA	AGA	CCT	ACA	ACC	ACC	ACT	GCC	TAT	CCA	GCT	ACC	CAG	AGG	CCC	TGG
	Ala	Arg	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr	Pro	Ala	Thr	Gln	Arg	Pro	Trp
1835	TCC	CAC	AGG	CCC	CCT	GCA	ACA	GCA	GAG	GTG	ACC	ACT	GCC	AGG	GGC	CCC
	Ser	His	Arg	Pro	Pro	Ala	Thr	Ala	Glu	Val	Thr	Thr	Ala	Arg	Gly	Pro
1910	CCT	CGG	AAG	GAG	CAG	CAG	AGA	GAG	AAG	CCA	CAG	GCC	ACC	AGG	AGG	CCC
	Pro	Arg	Lys	Glu	Gln	Gln	Arg	Glu	Lys	Pro	Gln	Ala	Thr	Arg	Arg	Pro
1985	TCA	GCC	ACC	CCA	CCT	CCC	ACC	CTC	TGG	GAG	GTC	AGC	ACA	AGA	GTT	GTG
	Ser	Ala	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Trp	Glu	Val	Ser	Thr	Arg	Val	Val
2060	ACA	GAC	AAA	CGG	GAA	CAT	GGC	CAT	CAG	GAC	CCA	AAT	GTG	GTG	CCA	GGT
	Thr	Asp	Lys	Arg	Glu	His	Gly	His	Gln	Asp	Pro	Asn	Val	Val	Pro	Gly
2135	CCC	AAA	AAG	AAG	GAC	AGA	ATT	CTC	AGC	AAC	GAA	TAT	GAA	GCC	AAG	TAT
	Pro	Lys	Lys	Lys	Asp	Arg	Ile	Leu	Ser	Asn	Glu	Tyr	Glu	Ala	Lys	Tyr
2210	GGG	GAG	GAG	GAG	CGG	CAG	GTG	GAT	AGC	GTT	CCC	TCG	CAG	AAT	GCC	AAG
	Gly	Glu	Glu	Glu	Arg	Gln	Val	Asp	Ser	Val	Pro	Ser	Gln	Asn	Ala	Lys
2285	AAA	CCT	GAG	AAG	GAG	AAG	AAG	AAA	AAA	GGG	AAG	AGT	GCA	AAA	CAA	GAC
	Lys	Pro	Glu	Lys	Glu	Lys	Lys	Lys	Lys	Gly	Lys	Ser	Ala	Lys	Gln	Asp
2360	AAG	AAA	GCT	GAG	AAA	AAG	AGC	AAA	CAG	GAG	AAA	GAC	AAG	AAT	AAG	AAG
	Lys	Lys	Ala	Glu	Lys	Lys	Ser	Lys	Gln	Glu	Lys	Asp	Lys	Asn	Lys	Lys
2435	GAC	AAT	CAG	AAG	CCC	ACC	GCA	AAA	CAT	CTC	GCT	CCA	AGT	CCC	AAG	AAG
	Asp	Asn	Gln	Lys	Pro	Thr	Ala	Lys	His	Leu	Ala	Pro	Ser	Pro	Lys	Lys

Ergebnisse

```

2510  GAA GGC AAA CGA AGA CTC CTC CTG ATC ACC ACT CCC AAG GCT GAG AAC AAT ATG TAT GTG CAG CAG CGG GAT GAA
     Glu Gly Lys Arg Arg Leu Leu Leu Ile Thr Thr Pro Lys Ala Glu Asn Asn Met Tyr Val Gln Gln Arg Asp Glu

2585  TAT CTG GAG AGC TTC TGC AAG ATG GCC ACC AGG AGA ATC TCT GTG GTC ACC ATC TTT GGT CCT GTC AAC AAC AGC
     Tyr Leu Glu Ser Phe Cys Lys Met Ala Thr Arg Arg Ile Ser Val Val Thr Ile Phe Gly Pro Val Asn Asn Ser

2660  TCC ATG AAA ATT GAT CAC TTC CAG CTA GAT AAT GAG AAA CCC ATG CGT GTG GTG GAT GAT GAT GAC TTG GTG GAT
     Ser Met Lys Ile Asp His Phe Gln Leu Asp Asn Glu Lys Pro Met Arg Val Val Asp Asp Asp Leu Val Asp

2735  CAA CAT CTC ATC AGC GAG CTG AGG AAG GAG TAT GGA ATG ACC TAC GAT GAC TTC TTC ATG GTG CTG ACA GAC GTG
     Gln His Leu Ile Ser Glu Leu Arg Lys Glu Tyr Gly Met Thr Tyr Asp Asp Phe Phe Met Val Leu Thr Asp Val

2810  GAT CTG AGA GTC AAG CAA TAC TAC GAA GTG CCA ATA GCA ATG AAG TCC GTG TTT GAT CTT ATT GAC ACT TTC CAA
     Asp Leu Arg Val Lys Gln Tyr Tyr Glu Val Pro Ile Ala Met Lys Ser Val Phe Asp Leu Ile Asp Thr Phe Gln

2885  TCC CGA ATC AAA GAT ATG GAG AAG CAG AAG AAG GAG GGC ATT GCC TGC AAG GAG GAC AAG AGG CAG TCC CTG GAG
     Ser Arg Ile Lys Asp Met Glu Lys Gln Lys Lys Glu Gly Ile Ala Cys Lys Glu Asp Lys Arg Gln Ser Leu Glu

2960  AAC TTC CTA TCC AGG TTC CGA TGG AGG AGG AGG TTG CTG GTG ATC TCT GCT CCT AAT GAT GAA GAC TGG GCC TAT
     Asn Phe Leu Ser Arg Phe Arg Trp Arg Arg Arg Leu Leu Val Ile Ser Ala Pro Asn Asp Glu Asp Trp Ala Tyr

3035  TCA CAA CAG CTC TCT GCC CTC AAC GGT CAG GCA TGC AAT TTT GGT CTG CGA CAT ATA ACC ATT CTG AAG CTT TTG
     Ser Gln Gln Leu Ser Ala Leu Asn Gly Gln Ala Cys Asn Phe Gly Leu Arg His Ile Thr Ile Leu Lys Leu Leu

3110  GGT GTT GGA GAG GAA GTT GGA GGA GTT TTA GAA CTG TTC CCA ATT AAT GGG AGC TCC ATC GTT GAG CGG GAA GAT
     Gly Val Gly Glu Glu Val Gly Gly Val Leu Glu Leu Phe Pro Ile Asn Gly Ser Ser Ile Val Glu Arg Glu Asp

3185  GTG CCA GCC CAC TTG GTC AAA GAT ATC CGC AAC TAT TTT CAA GTG AGC CCA GAG TAC TTC TCC ATG CTT CTA GTT
     Val Pro Ala His Leu Val Lys Asp Ile Arg Asn Tyr Phe Gln Val Ser Pro Glu Tyr Phe Ser Met Leu Leu Val

3260  GGA AAA GAT GGC AAT GTT AAA TCT TGG TAT CCT TCT CCT ATG TGG TCG ATG GTC ATC GTG TAT GAC TTA ATT GAT
     Gly Lys Asp Gly Asn Val Lys Ser Trp Tyr Pro Ser Pro Met Trp Ser Met Val Ile Val Tyr Asp Leu Ile Asp

3335  TCC ATG CAA CTT CGG AGA CAG GAA ATG GCC ATT CAG CAG TCT CTG GGG ATG CGC TGC CCA GAA GAT GAG TAT GCA
     Ser Met Gln Leu Arg Arg Gln Glu Met Ala Ile Gln Gln Ser Leu Gly Met Arg Cys Pro Glu Asp Glu Tyr Ala

3410  GGA TAT GGT TAC CAT AGT TAT CAC CAA GGA TAC CAG GAT GGC TAC CAG GAT GAC TAC CGT CAT CAT GAA AGT TAC
     Gly Tyr Gly Tyr His Ser Tyr His Gln Gly Tyr Gln Asp Gly Tyr Gln Asp Asp Tyr Arg His His Glu Ser Tyr

3485  CAC CAT GGA TAC CCT TAC T GAACAGAAAT ATGTAACCTT ATTCCCATCC AGTTTCCCTC TCATCTGCTA AAGCTGTGTG
     His His Gly Tyr Pro Tyr

3564  CTGGCAGCTT CATAAGGGAA TTTCTCCATA CTCTACATAC CCCGACTTTT TCTTTCAGTG TTCCTCCAAG ATTAAGAAA TAGTAACTT
3654  TCCCCTACTC ATGAAAAAAT ATTAAGACAT TTAAGAAGAAC TCGCTAACTG GAGAGAGAAA AGTGTACCGC GAATAAATT TTAAGTAAAA
3744  ACAAAAAAAA

```

Abbildung 3.1: **cdNS und Aminosäuresequenz von A21/D2.** Die 5' ATGs und das Polyadenylierungssignal sind hervorgehoben. Die Aminosäuren des Leaderpeptids sind unterstrichen. Die grau unterlegten Sequenzen zeigen die drei Sushi-Homologie (CRD) Domänen an.

Expression von A21/D2 in murinen Geweben und Zellpopulationen

Das Ausprägungsmuster eines Gens in den verschiedenen Geweben und Zellen ist charakteristisch für die meisten Gene und kann unter anderem Hinweise auf die Funktion des Gens liefern. Für die Analyse des Ausprägungsmusters von A21/D2 wurde wie in Kapitel 2.6.8 beschrieben RNS aus verschiedenen Mausgeweben sowie aus Knochenmark-DC (GM-CSF) isoliert und mittels Northernblot auf die Expression von A21/D2 mRNA analysiert. Dazu wurden die zwei radioaktiv markierten Sonden P1-P6 und Sonde2 verwendet. Abbildung 3.2a zeigt schematisch, in welchem Bereich der A21/D2 RNS die Sonden binden. In Abbildung 3.2b ist das Ergebnis eines solchen Blotes gezeigt. Als Marker für die aufgetragene Menge an RNS wurde im oberen Feld eine für das konstitutiv ausgeprägte Gen GAPDH spezifische Sonde verwendet. Im unteren Feld wurde mit der A21/D2-spezifischen Sonde2 hybridisiert. Man erkennt Banden im Längenbereich von ca. 4 kb, was in etwa der Länge der cDNS entspricht (3,8 kb). Mit Hilfe des Programms Image Quant wurde die Intensität der A21/D2 spezifischen Banden mit der Intensität der zugehörigen GAPDH-Bande in Relation gesetzt. Abbildung 3.2c zeigt die Expression von A21/D2 in Prozent der GAPDH-Expression. Die stärkste Expression findet sich erstaunlicherweise in der Blase, gefolgt

von Lunge, Uterus embryonalem Gewebe und Herz. Aber auch in lymphatischen Geweben wie Lymphknoten, Milz, Thymus, und Knochenmark DC lässt sich A21/D2 Expression feststellen. Sehr wenig bis gar keine Expression zeigt sich im Gehirn, Darm, Niere und Skelettmuskel.

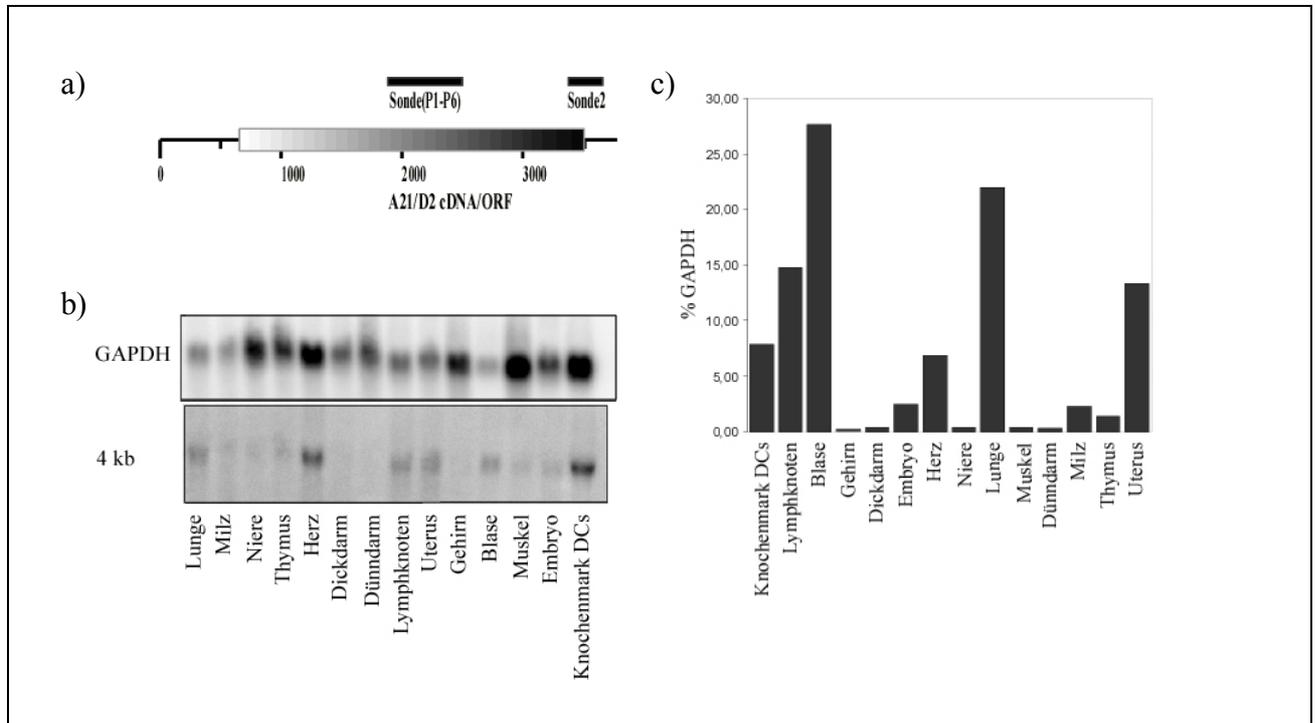


Abbildung 3.2: A21/D2-spezifischer Northernblot. a) schematische Lage der A21/D2-spezifischen Sonden P1-P6 und Sonde2. b) Northernblot mit Sonde2 und GAPDH Sonde. c) A21/D2 Expression in Relation zur jeweiligen GAPDH-Expression.

Um diese Ergebnisse zu Bestätigen und um einen genaueren Überblick über die Expression von A21/D2 in Leukozyten-Zellpopulationen zu gewinnen, wurde zusätzlich eine A21/D2-spezifische RT-PCR durchgeführt. Als Kontrolle wurde in diesem Fall das konstitutiv ausgeprägte Gen β -Actin verwendet. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse der RT-PCR für eine Reihe von Mausgeweben und sortierten Zellpopulationen.

Wie beim Northernblot, zeigt sich auch in der RT-PCR eine starke Ausprägung von A21/D2 in Blase, Lunge, Uterus und Herz. Zusätzlich wurden in der RT-PCR noch Ovarien und Hoden untersucht, wobei sich in den Ovarien eine relativ hohe und in Hoden nur sehr geringe A21/D2 Expression feststellen lässt. Sehr wenig bis gar keine Expression zeigen sich auch hier in Darm, Gehirn, Niere und Muskel. Die lymphatischen Gewebe Milz, Thymus und Lymphknoten zeigen alle eine mittelstarke Ausprägung von A21/D2.

Von den untersuchten Leukozytenpopulationen (Knochenmark DC, Peritoneal-Makrophagen, $CD4^+$ T-Zellen (Milz), $CD8^+$ T-Zellen (Milz), B-Zellen (Milz) und NK-Zellen (Milz)) zeigen nur die Knochenmark-DC eine deutliche A21/D2 Expression.

Insgesamt lässt sich also eine relativ breite Ausprägung von A21/D2 in den verschiedenen Geweben der Maus feststellen. Interessant ist der Befund, dass von den untersuchten Leukozyten-Populationen A21/D2-Expression nur in GM-CSF Knochenmark-DC zu finden ist. Das könnte ein wichtiger Hinweis darauf sein, dass A21/D2 bei den Zellen des Immunsystems spezifisch in Dendritischen Zellen ausgeprägt wird.

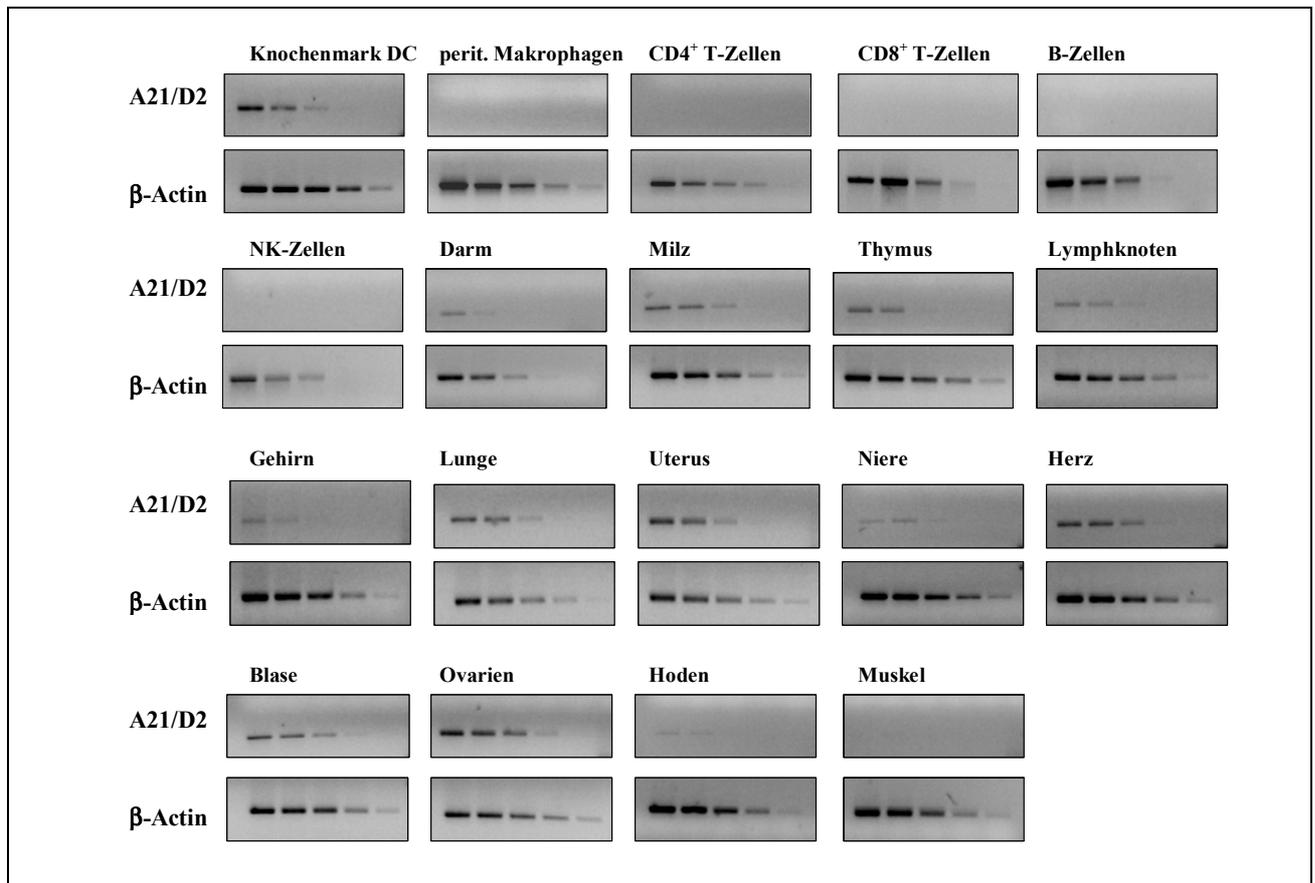


Abbildung 3.3: A21/D2 RT-PCR. Die RNS wurde entweder aus Gesamtgewebe gewonnen oder aus verschiedenen, aufgereinigten Zell-Populationen gewonnen. Die RNS wurde in cDNS umgeschrieben in 1:5 Verdünnungsschritten verdünnt und mittels PCR amplifiziert. Als Standard dient β -Actin.

3.1.2 Analyse der subzellulären Lokalisation des A21/D2 Proteins

Neben dem Ausprägungsmuster eines Gens in verschiedenen Geweben und Zellpopulationen (Kapitel 3.1.1) ist auch die intrazelluläre Lokalisation des Proteins charakteristisch und kann Auskunft über die mögliche Funktion eines Genes bzw. seines Genproduktes geben. Die Tatsache, dass viele der im Zytoplasma synthetisierten Proteine sich schließlich in nicht-zytosolischen Kompartimenten der Zelle wiederfinden oder sekretiert werden, setzt einen gerichteten und regulierten Transport dieser Proteine über (intrazelluläre) Membranen voraus. Eine wichtige Gemeinsamkeit von Proteinen die vom Zytosol in andere Zellkompartimente transportiert werden ist der Besitz eines N-terminalen Signalpeptids (Rusch and Kendall, 1995; Sakaguchi, 1997). Da auch das A21/D2-Protein ein solches N-terminales Signalpeptid enthält, ist die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um ein nicht-zytosolisches oder sekretorisches Protein handelt relativ hoch. Um das intrazelluläre Expressionsmuster von A21/D2 genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der A21/D2 ORF in den Vektor pEGFP-N1 kloniert und das so erhaltene Fusionskonstrukt in T 293 Zellen exprimiert.

Generierung des A21/D2-EGFP Fusionskonstruktes

Der Vektor pEGFP-N1 enthält das 'enhanced green fluorescent protein' (EGFP) als Reporter für die Genexpression. Die MCS (multiple cloning site) befindet sich im Vektor pEGFP-N1 vor, d.h. N-terminal der für EGFP kodierenden Sequenz. Zur Klonierung des ORF von A21/D2 in den Vektor pEGFP-N1 musste der ORF mit entsprechenden Restriktionsenzymchnittstellen versehen werden. Dazu wurden die zwei Mutageneseprimer so ausgewählt, dass sie eine Klonierung des ORF in die MCS von pEGFP-N1 im EGFP-Leseraster erlauben. Zu diesem Zweck wurde auch das Stoppkodon des A21/D2 ORF zu einem kodierenden Glycin-Kodon mutiert. Abbildung 3.4 zeigt die Klonierung des A21/D2 ORF mit den neu eingeführten Schnittstellen in den Vektor pEGFP-N1 (a) sowie eine schematische Darstellung des fertigen Vektors A21/D2-pEGFP-N1 (b). Als Matrize für die Mutagenese-PCR diente der Klon13 aus der λ -Phagen Bibliothek (Kapitel 3.1.1) dessen DNS Sequenz der ermittelten A21/D2 Konsensus cDNS Sequenz entspricht. Die verwendeten Mutagenese-Primer und Vektoren sind in den Kapiteln 2.4.1 bzw. 2.5.1 beschrieben.

seine Funktion und fluoresziert dementsprechend nicht mehr (Feilmeier et al., 2000; Heim et al., 1994; Waldo et al., 1999).

Wie in Figur 3.5a gezeigt, war die Fluoreszenz bei den mit dem Leervektor transfizierten Zellen wie zu erwarten gleichmäßig in der Zelle verteilt. Deutlich in den Zellen zu erkennen sind die mit TO-PROTM-3 Jodid angefärbten Zellkerne (blau), die oft nierenförmig, z.T. auch gelappt oder fragmentiert erscheinen können und einen großen Teil der Zelle ausfüllen (Figur 3.5 b-f). T293 Zellen wurden mit Fragmenten aus Adenovirus-Typ 5-DNS transformiert und zeigen viele Transformationsmerkmale, was das z. T. atypische Erscheinungsbild der Kerne erklärt (Djaldetti and Lewinski, 1983; Papadimitriou and Matz, 1979; Sessa et al., 1984).

In den Abbildungen 3.5 b-f wurden die Zellen mit dem A21/D2-pEGFP-N1 Fusionskonstrukt transfiziert. In Abbildung 3.5 b erkennt man deutlich, dass die EGFP-Expression (grün) meist in kondensiert-vesikelartigen Strukturen nahe dem Zellkern (perinukleär) lokalisiert ist. In einigen Zellen waren aber auch zusätzlich einzelne EGFP⁺ vesikelartige Strukturen in weiterer Entfernung des Kerns bzw. in der Nähe der Zellmembran zu sehen (Pfeile in Abbildung 3.5 d).

Da durch das Vorhandensein eines Signalpeptides der Transport des Proteins in bzw. durch zelluläre Kompartimente wie das Endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat sehr wahrscheinlich ist, wurden transfizierte Zellen zusätzlich mit Markern gegen diese zellulären Strukturen gefärbt. In Abbildungen 3.5 c und d wurden transfizierte Zellen mit einem Antikörper gegen Calreticulin gefärbt (rot). Calreticulin findet sich fast ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum wo es Aufgaben als molekulares Chaperon und im Kalzium-Signalweg übernimmt. Obwohl Calreticulin in einigen Fällen auch außerhalb des Endoplasmatischen Retikulums zu finden ist (Johnson et al., 2001) wird es allgemein als Marker für das ER verwendet. In den T 293 Zellen in Abbildungen 3.5 c lässt sich schön erkennen, wie das Zytosol der Zellen von einem dichten ER-Netzwerk durchzogen wird. Eine Kolo-kalisation mit EGFP ist allerdings nur teilweise zu erkennen (Abbildung 3.5 d, gelber Überlagerungsbereich)

Um spezifisch den Golgi-Apparat zu färben, wurde in dieser Arbeit ein Anti-Golgin-97 Antikörper benutzt. Dieser Antikörper erkennt das zur Granin-Familie gehörende Protein Golgin-97, das sich auf der zytoplasmatischen Seite des Golgi-Apparates befindet (Barr and Short, 2003; Griffith et al., 1997). In den Abbildungen 3.5 e und f erkennt man deutlich die fast vollständige Kolo-kalisation (gelb) der EGFP-Expression mit der Golgi-Färbung (rot).

Bei A21/D2 handelt es sich damit offensichtlich um ein Protein, das über das ER in den Golgi-Apparat transportiert wird. Ob es im Golgi-Apparat bleibt oder, wie zu vermuten, weitertransportiert bzw. sekretiert wird muss allerdings noch gezeigt werden.

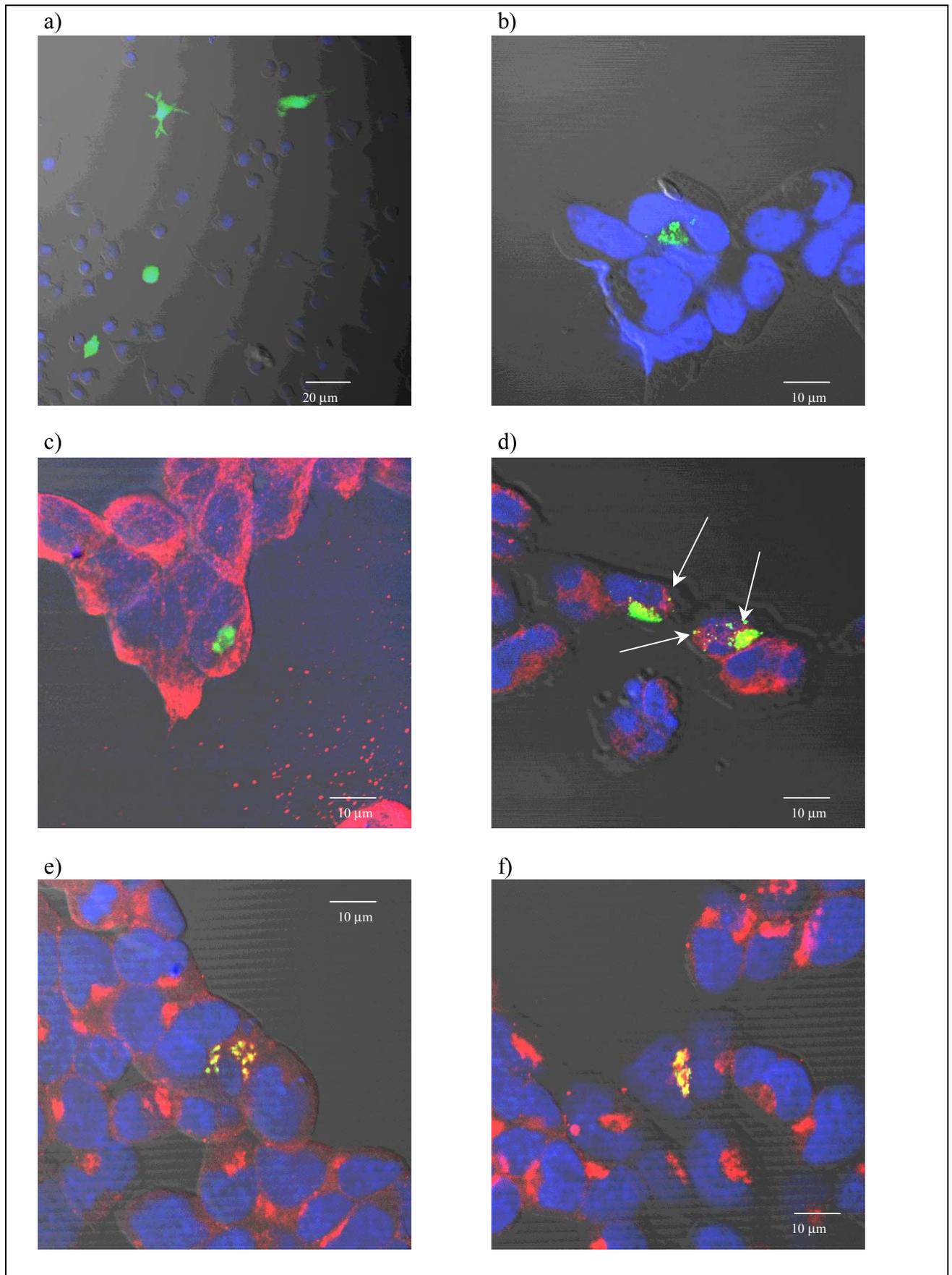


Abbildung 3.5: Analyse der intrazellulären Lokalisation von A21/D2. a) Leervektor Kontrolle. b-f) Transfektion mit A21/D2-pEGFP-N1 (grün). c-d) Färbung mit anti-Calreticulin (rot). e-f) Färbung mit anti-Golgin-97 (rot).

3.1.3 Charakterisierung des genomischen Lokus für murines A21/D2

Klonierung des genomischen Lokus für murines A21/D2

Für die Klonierung des genomischen Lokus für A21/D2 in der Maus wurde die BAC (Bacterial Artificial Chromosome) Genbank CitbCJ7 (Caltech) verwendet. Diese Genbank wurde aus ES-Zellen der Mauslinie 129/Sv generiert. Als Grundgerüst dient der Vektor pBeloBACII mit Insertgrößen um 130 kb (Kapitel 2.5.1). Die BAC-Genbank wurde mittels einer A21/D2-spezifischen PCR durchsucht (Durchgeführt von der Firma Genome systems). Ziel dieser Suche war es BAC Klone zu finden, die die genomische Sequenz oder einen Teil der genomischen Sequenz von A21/D2 enthalten. Bei dieser Suche konnten drei positive Klone identifiziert werden (#26134, #26135 und #26136).

Diese drei BAC-Klone wurden mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit den radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden PH1 und PH2 (Kapitel 2.4.1) hybridisiert (Abbildung 3.6a und b). Wie in Abbildung 3.7 schematisch dargestellt, bindet Sonde PH1 im 5' Bereich und Sonde PH2 im 3' Bereich des A21/D2 ORF. Während die Sonde PH1 an die Klone 26134 und 26135 hybridisiert (Abbildung 3.6a), bindet Sonde PH2 bei den Klonen 26135 und 26136 (Abbildung 3.6b). Da Klon 26135 für beide Sonden positiv ist, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Klon die vollständige genomische Sequenz von A21/D2 enthält. Den Klonen 26134 und 26136 dagegen fehlen Sequenzen des genomischen A21/D2 Lokus im 5' bzw. 3' Bereich. Für die weitere Arbeit wurde deshalb Klon 26135 verwendet.

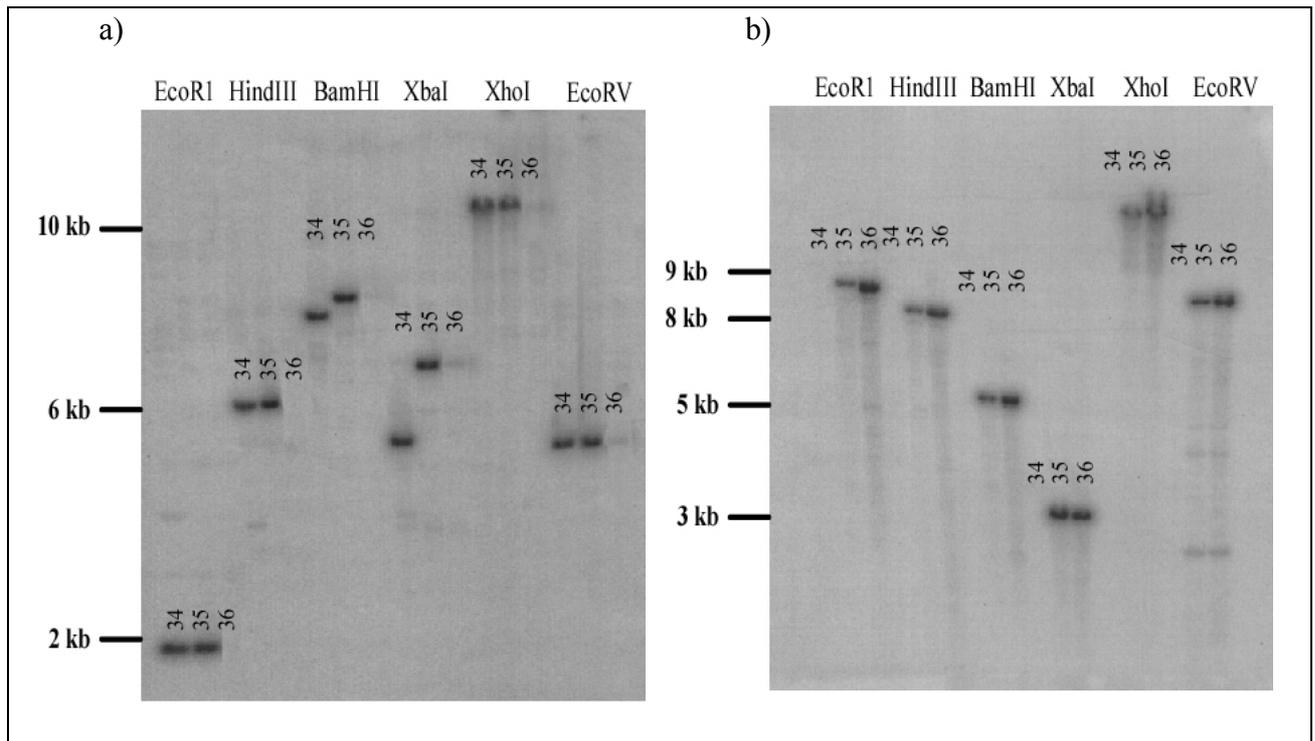


Abbildung 3.6: Southernblot der BAC-Klone 26134 (34), 26135 (35) und 26136 (36). Die BAC-Klone wurden mit den bezeichneten Restriktionsenzymen verdaut und mit den Oligonukleotid-Sonden PH1 (a) oder PH2 (b) hybridisiert.

Um kleinere und damit leichter zu handhabende Sequenzbereiche zu erhalten wurde der BAC-Klon 26135 mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und mit der A21/D2-spezifischen Sonde P1-P6 (Abbildung 3.7) hybridisiert. Da der Vergleich des resultierenden Bandenmusters (Abbildung 3.8) mit dem von muriner genomischer DNS (nicht gezeigt) eine genaue Übereinstimmung zeigte, konnte davon ausgegangen werden, dass A21/D2 nur in einfacher Kopie im Genom vorliegt und auch keine Pseudogene existieren.

Aus dem Bandenmuster (und der Restriktionskarte der cDNS) konnte geschlossen werden, dass zwei bestimmte Fragmente den 5' Bereich der genomischen A21/D2 Sequenz abdecken und sich z. T. auch überlappen. Diese in Abbildung 3.8 mit Pfeilen gekennzeichneten BAC Fragmente (Clone1 und Clone8 in Abbildung 3.7) wurden in den pBluescript Vektor kloniert und anschließend sequenziert.

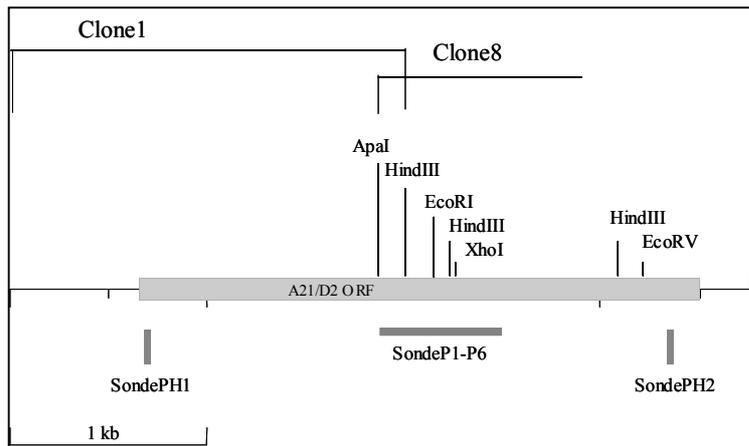


Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der A21/D2 cDNS mit der Lage der Sonden PH1, PH2 und P1-P6 sowie der Sequenzbereiche, die durch Clone1 und Clone8 auf genomischer Ebene abgedeckt werden.

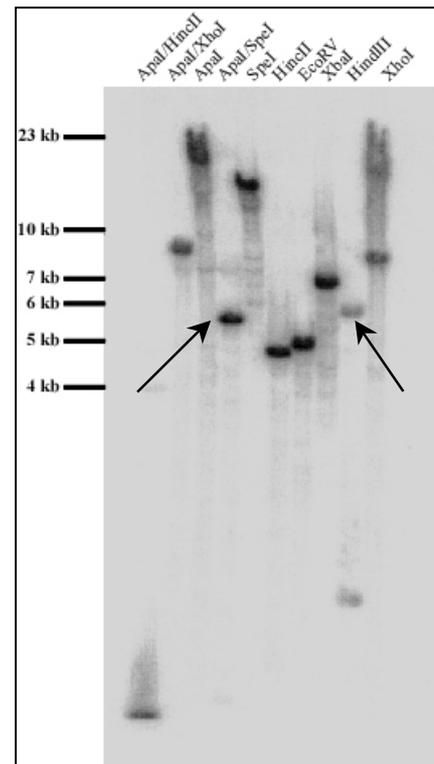


Abbildung 3.8: Southernblot von BAC-Klon 26135 mit der A21/D2-spezifischen Sonde P1-P6. Die mit Pfeilen gekennzeichneten Fragmente wurden ausgeschnitten und in den Vektor pBluescript kloniert.

Insgesamt konnte durch die Sequenzierung der beiden Klone 11 kb der genomischen A21/D2 Sequenz ermittelt werden. Diese Sequenz umfasst den 5' Bereich des A21/D2 Gens mit den ersten drei Exons sowie eine ca. 3 kb lange Sequenz im 5' Bereich des ersten Exons (Abbildung 3.9).

Einige Zeit nach Beendigung der Sequenzierungen wurde die erste Version des gesamten Mausgenoms veröffentlicht (Ensembl; Hubbard et al., 2002). Dies ermöglichte zum einen die Verifizierung der bisherigen Ergebnisse und zum anderen war es möglich durch einen Vergleich der cDNS Sequenz mit der genomischen Sequenzdatenbank die genomische Organisation des gesamten A21/D2 Gens zu bestimmen. Wie in Abbildung 3.9a dargestellt, erstreckt sich der gesamte A21/D2 Lokus über 35 kb und liegt auf Maus Chromosom 16. Das A21/D2 Gen besitzt insgesamt 10 Exons von denen Exon III mit 1,9 kb mit Abstand das größte ist.

Wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, ist das fünfte ATG das Startkodon für die Transkription des 949 Aminosäuren umfassenden A21/D2 Proteins (Abbildung 3.9a, langes Transkript). Durch differenzielles Spleißen des dritten Exons könnte ein kürzeres (ca. 1,8 kb) Transkript entstehen (Abbildung 3.9a, putatives kurzes Transkript). In diesem Fall würde bei einem Translationsstart vom vierten ATG aus ein 327 Aminosäuren langes Protein entstehen. Sieht man von den ersten vier Aminosäuren ab, wäre dieses kurze Protein identisch mit dem C-terminalen Ende des 'langen'

Proteins. Einen Hinweis darauf, dass dieses kurze Transkript tatsächlich gemacht wird liefert die Hybridisierung mit der Northern-Sonde² (Kapitel 3.1.1) auf RNS aus Knochenmark-DC. Neben der Bande bei ca. 4 kb kann man eine zusätzliche schwächere Bande bei ca. 1,8 kb erkennen (Abbildung 3.9b). Die Möglichkeit, dass durch differenzielles Spleißen zwei oder mehrere verschiedene A21/D2 Proteinvarianten entstehen könnten hatte vor allem Einfluss auf die Planung des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors (Kapitel 3.1.4).

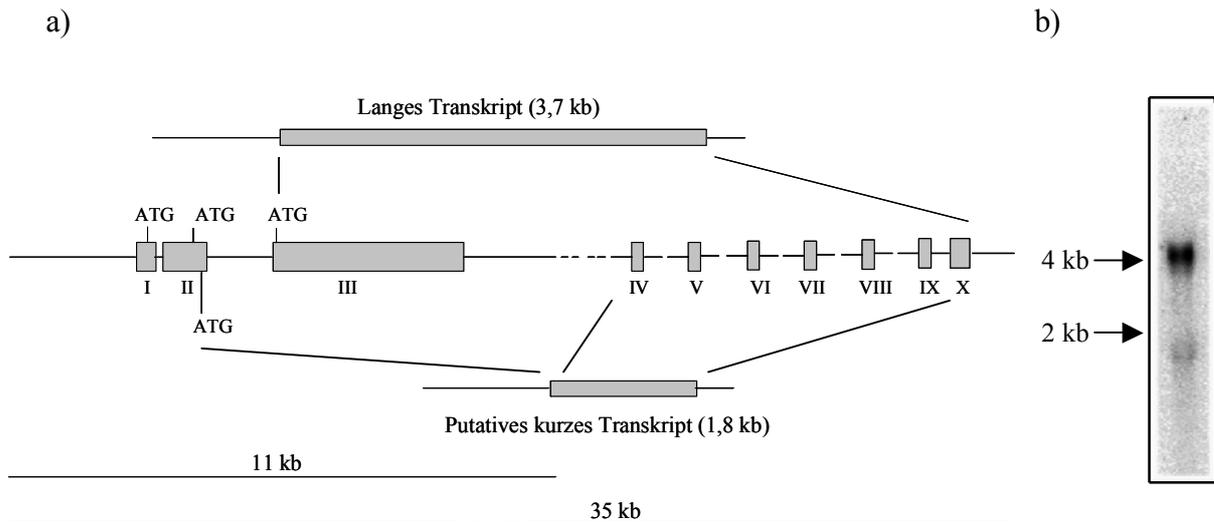


Abbildung 3.9: a) Schematische Darstellung des genomischen A21/D2 Lokus sowie der beiden möglichen Transkripte. b) Northernblot mit der Sonde² auf RNS aus GM-CSF generierten Knochenmarks DC.

3.1.4 Generierung einer A21/D2 defizienten Mausmutante durch 'Knock-in' des EGFP-Reporter Gens

In den vorhergehenden Kapiteln wurden Methoden beschrieben, mit denen Informationen über die Struktur, intrazelluläre Lokalisation und genomische Organisation von A21/D2 gewonnen werden konnten. Einen ersten Überblick über die Expression von A21/D2 in verschiedenen Geweben und Zellen lieferten Northernblot Analyse und RT-PCR.

Um einen Einblick in die Funktion von A21/D2 und seiner Rolle im Gesamtorganismus zu erlangen, wurden im Rahmen dieser Arbeit das A21/D2 Gen gezielt in der Keimbahn von Mäusen mutiert. Durch homologe Rekombination in pluripotenten embryonalen Stammzellen wurde eine A21/D2-defiziente Mausmutante generiert, indem Teile des A21/D2 Gens durch eine EGFP-Reporter cassette ersetzt wurden. Der Vorteil dieser 'Knock-in' Strategie liegt in der Möglichkeit, sowohl die Funktion von A21/D2 in der A21/D2-defizienten Maus, als auch die Expression über das eingebrachte EGFP-Reportergen zu untersuchen.

Als Grundlage zur Klonierung des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors diente der Vektor pEasyflox (Abbildung 3.10a und Kapitel 2.5.1). Dieser Vektor verfügt bereits über eine Neomycin-Resistenz Kasette (NEO) sowie eine Herpes Simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK) Kasette. Die Neomycin-Resistenz Kasette dient als Marker zur positiven Selektion, den der Rekombinationsvektor aus methodischen Gründen enthalten muss. Die Neomycin-phosphotransferase erlaubt das Wachstum von rekombinierten ES-Zell-Klonen in Gegenwart des Antibiotikums Genetecin (G418). Die Neomycin-Resistenz Kasette ist zu beiden Seiten von loxP (**locus X**-ing over **P1** phage) Erkennungssequenzen flankiert, was ihre spätere CRE (causes recombination) vermittelte Deletion in A21/D2-EGFP Mäusen erlaubt, z.B. durch Verpaarung mit der ubiquitär CRE exprimierenden Deleter Maus (Rajewsky et al., 1996; Sternberg, 1981; Sternberg and Hamilton, 1981; Sternberg et al., 1981).

Die HSV-TK Kasette erlaubt die Negativselektion aller ES-Zell-Klone, bei denen der Rekombinationsvektor ungerichtet und nicht über homologe Rekombination in das Genom inseriert wurde. Bei ungerichteter Rekombination wird mit hoher Effizienz auch heterologe DNS, wie hier die HSV-TK Kasette, ins Genom eingebaut. Solche ES-Zell-Klone sind daher sensitiv für Phosphorylierung und den nachfolgenden Einbau des Thymidinanalogs Gancyclovir in die DNS, was zur Blockade der DNS-Replikation führt. Da bei homolog rekombinierten ES-Zell-Klonen die HSV-TK Kasette nicht in das Genom integriert wird und die endogene Säuger Thymidinkinase Gancyclovir nicht aktivieren kann, sind diese gegen die Gancyclovir Behandlung resistent (Wurst and Joyner, 1993).

Das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierte GFP diente als Grundlage für die in dieser Arbeit verwendete Mutante EGFP (enhanced green fluorescent protein; Cormack et al., 1996). In dieser Mutante sorgt eine doppelte Aminosäuren-Substitution zu einer im Vergleich zum Wildtyp-GFP 35 mal höheren Fluoreszenz Intensität bei einer Anregung bei 488 nm. Da der in den meisten Durchflußzytometern und Konfokalen Lasermikroskopen verwendete Argon Laser Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert, stellt EGFP ein ideales Reporter gen dar.

Klonierung des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors

Der A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor wurde in den Vektor pEasyflox so kloniert, dass ein 2,9 kb großes, Teile des zweiten und das gesamte dritte Exon umfassendes Fragment der genomischen A21/D2 Sequenz durch die Sequenzen von EGFP und der Neomycin-Resistenz Kasette ersetzt wurde (Abbildung 3.11).

Um eine korrekte Rekombination des Vektors zu ermöglichen, ist das EGFP-Neomycin Fragment auf beiden Seiten von unterschiedlich langen homologen Bereichen des A21/D2 Locus flankiert, die als 'langer Arm' und 'kurzer Arm' bezeichnet werden. Der lange Arm wurde so konstruiert, dass das ATG Startkodon von EGFP direkt hinter dem letzten ATG in Exon II liegt (Abbildung 3.11). Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, könnte durch differenzielles Spleißen des dritten Exons die Translation des kurzen Proteins von dem letzten ATG im zweiten Exon ausgehen. Dadurch, dass nicht nur das dritte Exon, sondern auch Teile des zweiten Exons deletiert wurden, wurde die Bildung eines möglichen Spleißproduktes verhindert. Der lange Arm umfasst deshalb ein ca. 3 kb langes Fragment des genomischen 5' Bereich des A21/D2 Locus bis hin zum letzten ATG im zweiten Exon. Hinter dieses Exon wurde mittels einer Hybridisierungs-PCR die EGFP Sequenz aus dem Vektor pEGFP-N1 gesetzt und das komplette Fragment in pBluescript kloniert (Abbildung 3.10b). Das 'langer-Arm-EGFP'-Fragment wurde dann über die HindIII/ SpeI Schnittstellen aus pBluescript geschnitten und vor die Neomycin Kasette in die XbaI/ HindIII Schnittstelle von pEasyflox gesetzt (möglich durch die kompatiblen kohäsiven Enden von SpeI und XbaI). Der 800 bp umfassende kurze Arm wurde mittels PCR amplifiziert, wobei den Primern eine BamHI bzw. ClaI Schnittstelle hinzugefügt wurde (Kapitel 2.4.1). Über diese Schnittstellen wurde der kurze Arm auch in pEasyflox kloniert. Der fertige A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor ist in Abbildung 3.10c gezeigt.

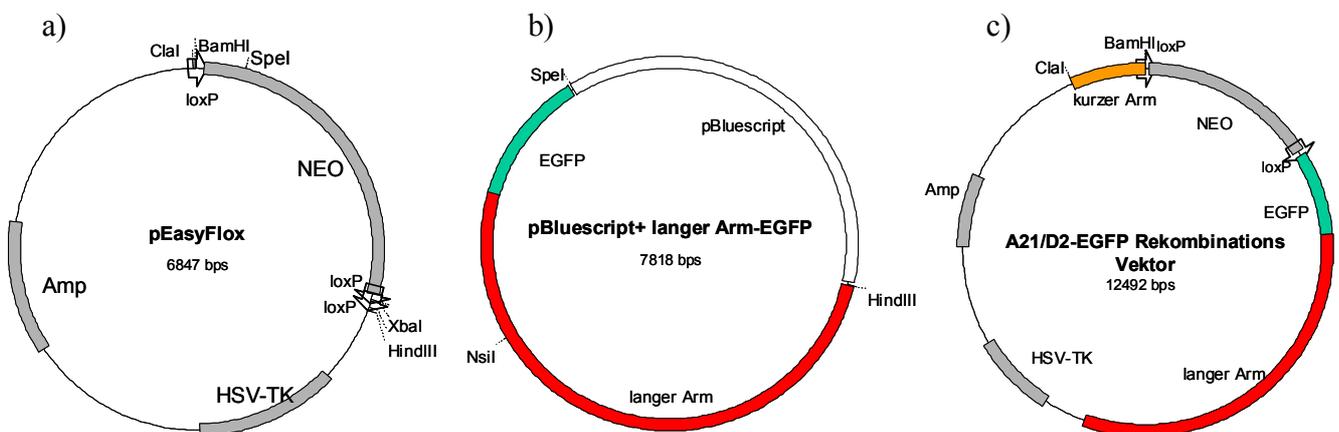


Abbildung 3.10: Klonierung des A21/D2-EGFP Rekombinationsvektors. a) zeigt den Vektor pEasyflox, der als das Grundgerüst für den A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor dient. b) Vektor pBluescript mit dem Fusionskonstrukt aus langem Arm und EGFP. c) der fertige A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor.

In Abbildung 3.11 ist schematisch die homologe Rekombination des genomischen A21/D2 Locus mit dem A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor, sowie der genomische Locus nach erfolgreicher Rekombination dargestellt. Die Abbildung zeigt auch die Lage der 3' Sonde und die Größe der von dieser Sonde detektierten Fragmente nach einem DraI bzw. StuI Verdau (nächster Abschnitt).

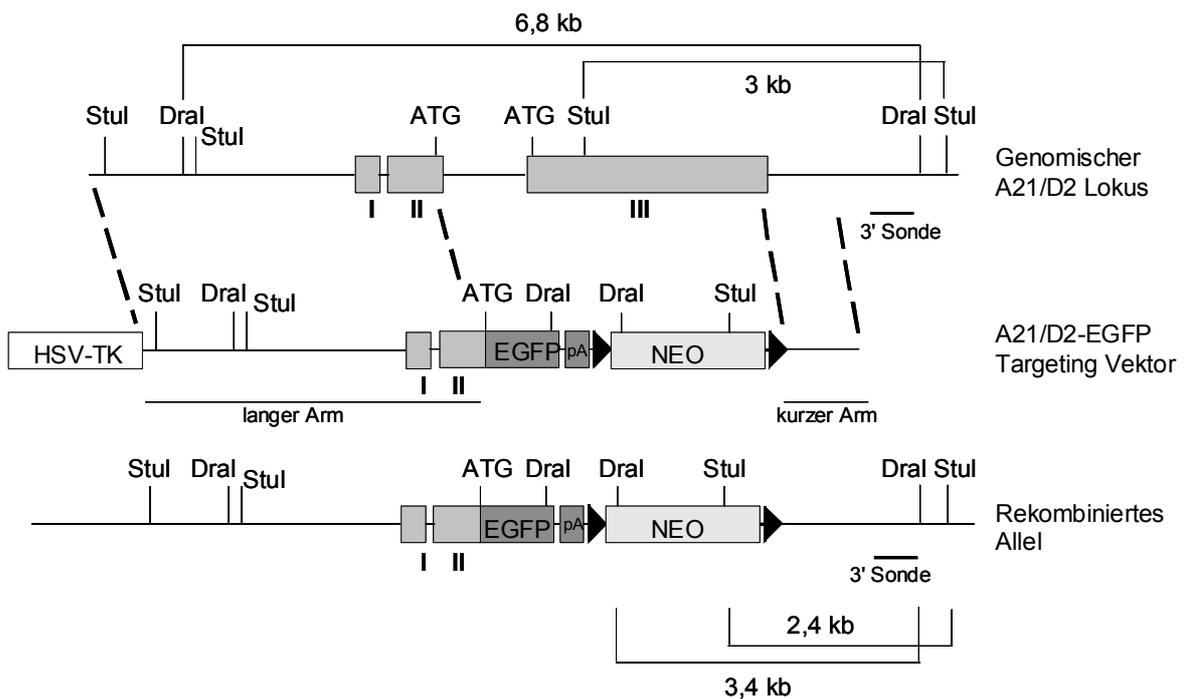


Abbildung 3.11: Inaktivierung des A21/D2 Gens in embryonalen Stammzellen. Der 3' Bereich des zweiten Exons und das gesamte dritte Exon des A21/D2 Gens werden durch den Einbau der EGFP-Neomycin Kassetten deletiert. Gezeigt sind die Restriktionskarten des genomischen Lokus, des Rekombinationsvektors und des rekombinierten Alles. Die Positionen des Translationsstarts und der 3' flankierenden Sonde sind angegeben.

Generierung rekombinanter A21/D2-EGFP embryonaler Stammzellen

Erzeugung von $A21/D2-EGFP^{ko/+}$ ES-Zellen durch homologe Rekombination

Der mit ClaI linearisierte A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor wurde in E14.1 ES-Zellen (129/Ola) elektroporiert und die so transfizierten ES-Zellen auf embryonalen Fibroblasten in Anwesenheit von G418 (ab Tag 2) und Gancyclovir (ab Tag 4) kultiviert. Am Tag 9 nach Beginn der Antibiotika-Selektion konnten 128 resistente ES-Zell-Klone in 96-well Platten gepickt und expandiert werden. Die eine Hälfte der Zellen wurde in 48-well Platten eingefroren, die zweite Hälfte in 96-well Platten zur Identifizierung korrekt rekombinierter Klone mittels 'Screening-PCR' getestet. Dazu wurden die Kolonien einer vollbewachsenen 96-well Platte auf eine 96-Thermowell PCR Platte überführt und dort lysiert. Mit dem Lysat wurde eine PCR durchgeführt, wobei ein Primer im 3' Bereich außerhalb des Konstruktes im A21/D2 Lokus (Kapitel 2.4.1 WT-A21), der andere innerhalb der Neomycin-Resistenz Kassetten bindet (Kapitel 2.4.1 NEO). Auf diese Weise erfolgt die Amplifikation des kurzen Armes des Rekombinationsvektors, allerdings nur bei korrekter homologer Rekombination. Um schwache oder nicht eindeutige Signale im Agarosegel zu überprüfen, wurden die Gele auf eine Nylonmembran geblotet und mit dem kurzen Arm als

Sonde hybridisiert. In diesem Screen konnten insgesamt 14 positive Klone identifiziert werden. Der eine Teil der positiven Klone wurde expandiert für die DNS Gewinnung zur Southernblot Analyse, der andere Teil eingefroren.

Southernblot Analyse der homolog rekombinierten ES-Zellen

Die durch die 'Screening-PCR' identifizierten Klone wurden nun mittels Southernblot überprüft. Um die Menge an Wildtyp-DNS, die das Ergebnis verfälschen würde, möglichst gering zu halten, erfolgte die Anzucht der zu testenden Klone auf Zellkulturplatten ohne embryonale Fibroblasten. Die aufgereinigte genomische DNS der ES-Zellen wurde mit *StuI* oder *DraI* verdaut und nach einem Agarosegellauf auf eine Nylonmembran gebロットet. Die Hybridisierung erfolgte mit der 3' flankierenden Sonde (Abbildung 3.11), die außerhalb der im Rekombinationsvektor vorhanden genomischen Sequenz bindet. Wie aus Abbildung 3.11 entnommen werden kann, würde bei einem *StuI* Verdau eine Bande bei 3 kb für das Wildtyp-Allel und eine Bande bei 2,4 kb für das mutierte Allel zu erwarten sein. Abbildung 3.12a zeigt, dass von den 14 im PCR-Screen positiven Klonen nur zwei die erwarteten Hybridisierungssignale aufweisen (Klon #115 und #125). Bei dem Verdau mit *DraI* würde das Signal für das Wildtyp Allel bei 6,8 kb und für das mutierte Allel bei 3,4 kb erwartet (Abbildung 3.11). Auch in diesem Fall zeigten nur die beiden Klone #115 und #125 die erwarteten Hybridisierungssignale für Wildtyp- und mutiertes Allel (Abbildung 3.12b).

Die Hybridisierung mit der 3' Sonde schließt allerdings nicht aus, dass zusätzlich zur homologen Rekombination weiter zufällige Integrationen ins Genom stattgefunden hat. Um dies auszuschließen, wurde die mit *StuI* oder *DraI* verdaute genomische DNS von Klon #115 und #125 mit einer NEO spezifischen Sonde hybridisiert. Abbildung 3.12c zeigt, dass bei beiden Klonen ein einziges Hybridisierungssignal der korrekten Größe bei 5,3 kb (*StuI*) bzw. 3,4 kb (*DraI*) detektierbar war.

Es konnte somit davon ausgegangen werden, dass bei den beiden Klonen #115 und #125 die homologe Rekombination wie geplant stattgefunden hat und damit zwei unabhängige ES-Zell-Klone mit dem korrekt mutierten Allel für die Generierung einer A21/D2-Reporter bzw. defizienten Mausmutante zur Verfügung standen.

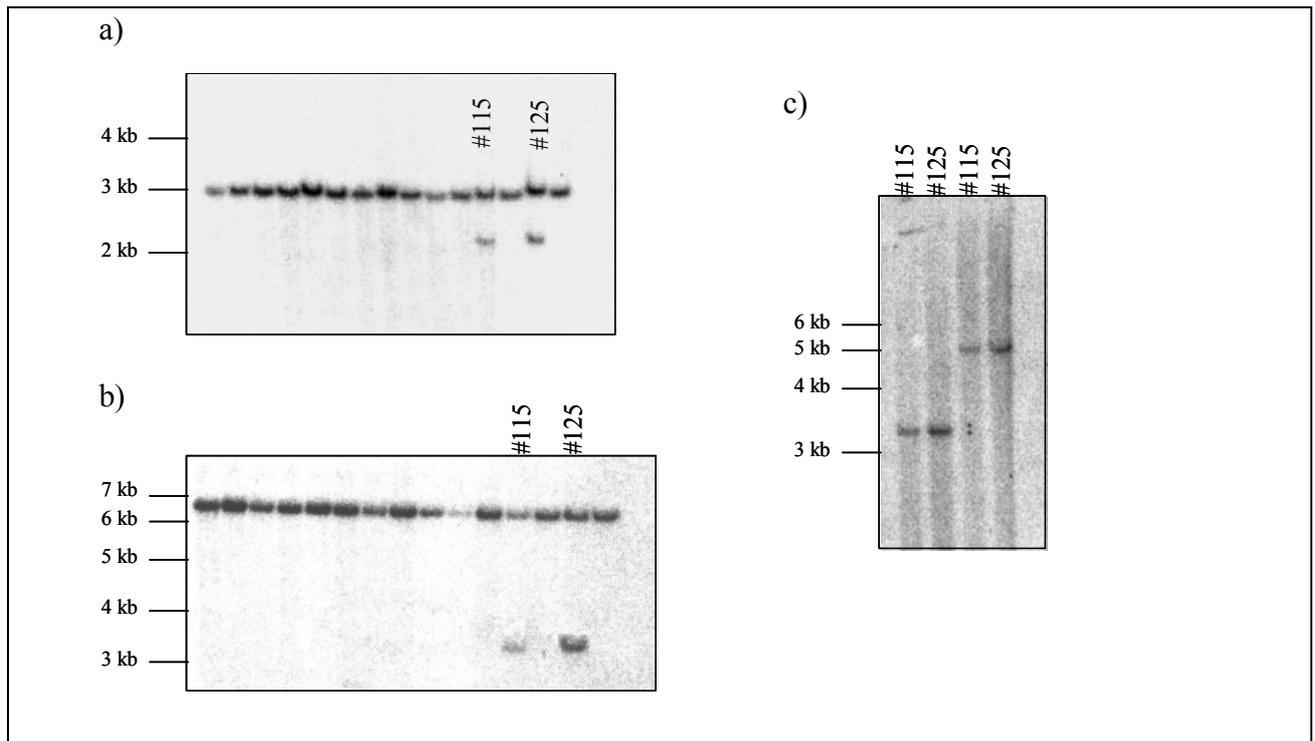


Abbildung 3.12: Southernblot Analyse der in der Screening-PCR positiven ES-Zell-Klone. a) Hybridisierung mit der 3' Sonde nach *StuI* Verdau. b) Hybridisierung mit der 3' Sonde nach *DraI* Verdau. c) Hybridisierung mit einer NEO-spezifischen Sonde nach *DraI* (die beiden linken Spuren) bzw. *StuI* (die beiden rechten Spuren) Verdau.

Generierung einer A21/D2-EGFP-Reporter Mausmutante aus rekombinierten ES-Zellen

Um A21/D2-EGFP-Reporter Mausmutanten zu generieren, wurden die beiden ES-Zell-Klone #115 und #125 mittels Mikroinjektion in Blastozysten von C57BL/6 Spendertieren injiziert (Abbildung 3.13). Die so erzeugten Blastozysten wurden anschließend in die Uteri von pseudoschwangeren F1 Weibchen aus einer C57BL/6 x BALB/c Kreuzung transferiert. Aus den transferierten Blastozysten entstehen auf diese Weise chimäre Mäuse, wobei der Grad des Chimarismus den Anteil der homolog rekombinierten ES-Zellen am Gesamtorganismus widerspiegelt. Chimäre Mäuse mit überwiegend agoutifarbenem Fell werden als hochchimär bezeichnet. Solche Mäuse wurden anschließend mit C57BL/6 Mäusen verpaart. Die Nachkommen dieser Verpaarung wurden auf Keimbahntransmission des mutierten Allels getestet. Bei den agoutifarbenen Nachkommen lag die Wahrscheinlichkeit, dass das mutierte Allel weitergegeben wurde bei 50%.

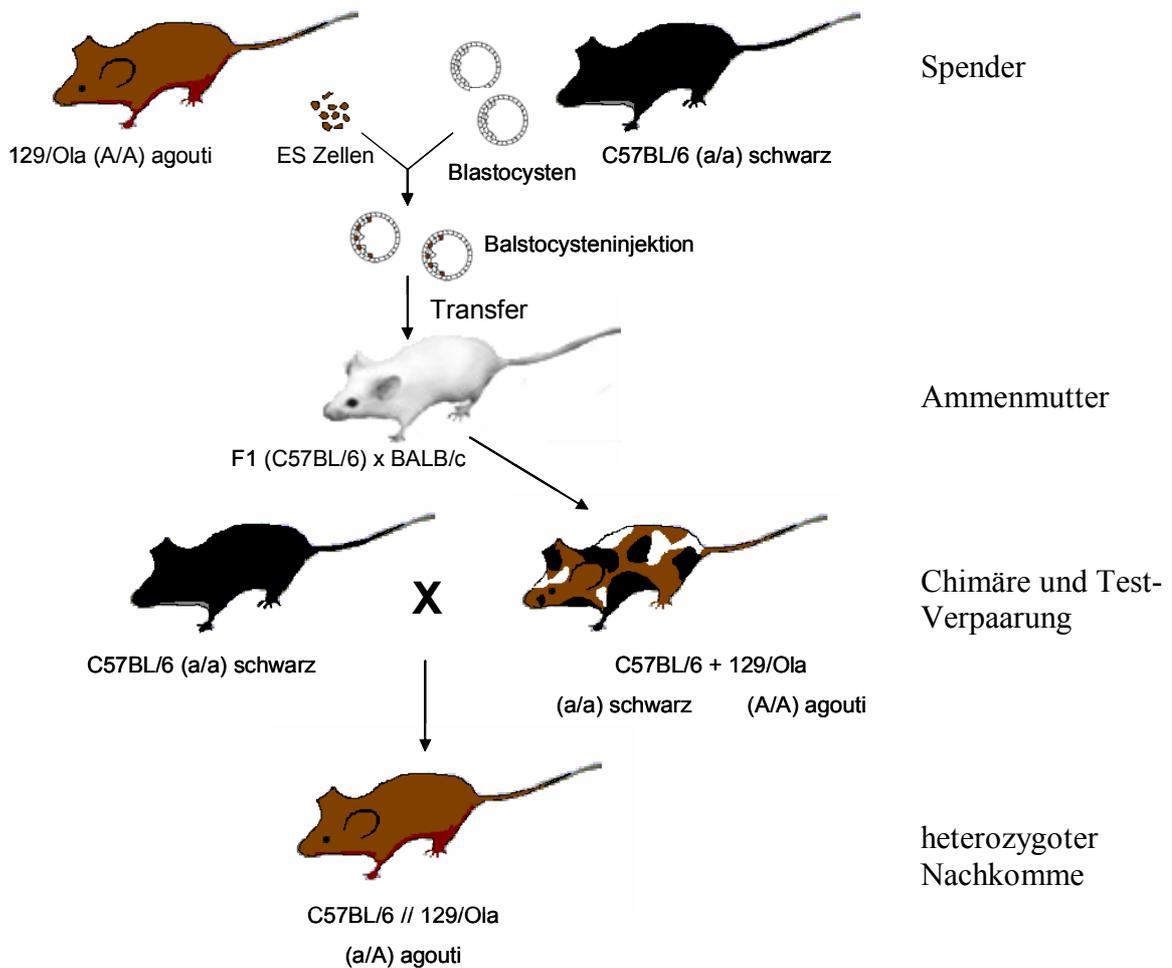


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Generierung von Mäusen aus homolog rekombinierten ES-Zellen durch Blastozysteninjektion. Der Anteil der mutierten ES-Zellen am Gesamtorganismus kann Anhand der Fellfarbe abgeschätzt werden. Die Fellfarbe der Nachkommen aus der Testverpaarung der Chimären mit C57BL/6 Mäusen gibt Aufschluss über die Keimbahntransmission eines Allels aus den mutierten ES-Zellen. Das agouti Allel der 129/Ola ES-Zellen ist dominant gegenüber dem Allel für die schwarze Fellfarbe der C57BL/6 Mäuse.

Von den agoutifarbenen Nachkommen der Testverpaarung von Chimären mit C57BL/6 Mäusen wurden Schwanzspitzen-Biopsien entnommen und die daraus gewonnene DNS mittels Southernblot-Analyse auf das Vorhandensein des mutierten A21/D2 Allels getestet. Dazu wurden, wie schon für den Test auf rekombinierte ES-Zell-Klone, die DNS entweder mit StuI oder DraI verdaut, über ein Agarosegel aufgetrennt und nach dem blotten auf eine Nylonmembran mit der radioaktiv markierten 3' Sonde hybridisiert.

Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch den Southernblot nach StuI Verdau der Schwanz-DNS einiger Nachkommen aus der Testverpaarung (Chimäre x C57BL/6). Bei allen Mäusen ist die Wildtyp-Bande bei 3 kb vorhanden und bei sechs Mäusen ist zusätzlich die Bande für das mutierte A21/D2 Allel bei 2,4 kb vorhanden. Diese Mäuse zeigten auch nach einem DraI Verdau der Schwanz-DNS

die Banden für das Wildtyp- sowie für das mutierte Allel in der richtigen Größen nach Hybridisierung mit der 3' Sonde. Die Hybridisierung mit der NEO-spezifischen Sonde zeigte eine einzelne zusätzliche Bande der richtigen Größe bei diesen Mäusen. Es konnten im Folgenden für beide Klone Mäuse mit Keimbahntransmission des mutierten A21/D2 Allels identifiziert werden. Diese heterozygote Mäuse wurden für die weitere Zucht verwendet und die Nachkommen mittels Southernblot-Analyse und später mittels Typisierungs-PCR auf die Weitergabe des mutierten Allels getestet.

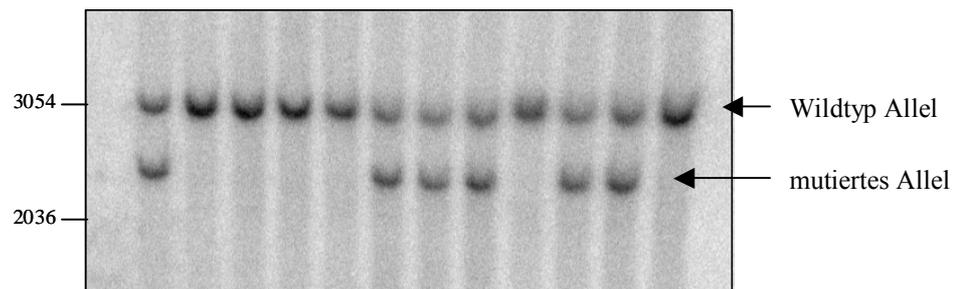


Abbildung 3.14: Southernblot-Analyse der Schwanz-DNS von 12 Nachkommen aus der Verpaarung der Chimären mit C57BL/6 Mäusen. Gezeigt ist ein exemplarischer Southernblot nach Stuhl Verdau und Hybridisierung mit der 3' Sonde (siehe auch Abbildung 3.12a).

Nachweis des funktionellen EGFP-Reporters nach in vitro Deletion der Neomycin-Genkassette

Durch den 'Knock-in' der EGFP-Reporter Genkassette sollte die Möglichkeit geschaffen werden Zellen, die ansonsten das A21/D2 Gen exprimieren würden, durch die von EGFP verliehene Grünfluoreszenz zu identifizieren. Die Analyse einiger chimärer Mäuse und heterozygoter A21/D2-EGFP^{ko/+} Nachkommen sollte zeigen, ob der EGFP-Reporter wie gewünscht funktioniert. Die FACS Analyse zeigte jedoch, dass bei keiner Zellpopulation, die aus diesen Tieren gewonnen wurde Grünfluoreszenz detektiert werden konnte.

Wie in Abbildung 3.15a gezeigt, sind die EGFP-Genkassette und die Neomycin-Resistenz-Kassette im mutierten A21/D2 Allel so angeordnet, dass die Transkription der Neomycinkassette in 'Antisense', also entgegengesetzt zur Richtung der EGFP-Transkription verläuft. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die starke Expression des Neomycin Gens die Expression des EGFP-Reporter Gens negativ beeinflusst bzw. sogar vollständig verhindert. Da eine Cre-vermittelte Deletion der Neomycin-Resistenzkassette durch die flankierenden loxP Sequenzen möglich war, konnte der Einfluss der Neomycin-Resistenzkassette auf die EGFP-Expression getestet werden.

Eine schnelle und effiziente *in vitro* Deletion von loxP flankierten Sequenzen kann durch die Verwendung des TAT-NLS-Cre Protein erreicht werden (Peitz et al., 2002).

Ein wichtiger Bestandteil des TAT-NLS-Cre Fusionsproteins ist ein vom HIV-TAT Protein abstammendes 11 Aminosäuren langes basisches Peptid. Proteine, die mit diesem Peptid fusioniert werden, können über die Zellmembran transportiert und damit in die Zelle eingeschleust werden (Schwarze et al., 1999). Zusätzlich enthält das TAT-NLS-Cre Protein eine Kernlokalisationssequenz (NLS) sowie die Cre-Rekombinase.

Um die Funktionalität des EGFP-Reporters nach Deletion der Neomycin-Genkassette zu testen, wurde die Neomycin-Genkassette in Knochenmark-DC aus A21/D2-EGFP^{ko/+} Mäusen *in vitro* deletiert. Dazu wurden Knochenmark-Kulturen an Tag 6 der GM-CSF Behandlung mit dem TAT-NLS-Cre Protein in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,5 μ M und 1,0 μ M) für 4 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen am FACS auf EGFP-Expression analysiert. Da sich nach erfolgreicher NEO-Deletion auch die Größe des durch die 3' Sonde detektierten Fragmentes im Southernblot ändert (Abbildung 3.15a), wurde aus einem Teil der Zellen DNS isoliert und die NEO-Deletion mittels Southernblot auf genomischer Ebene überprüft.

In Abbildung 3.15b wird gezeigt, dass sich nach 4-stündiger Behandlung der Zellen mit dem TAT-NLS-Cre Protein EGFP⁺ Zellen am FACS nachweisen lassen. Die EGFP⁺ Zellen sind gleichzeitig positiv für CD11c und machen ca. 0,7% (0,5 μ M TAT-NLS-Cre) bzw. ca. 2% (1,0 μ M TAT-NLS-Cre) der Gesamtzellen aus. Dieses Ergebnis korreliert mit dem Ergebnis des Southernblot (Abbildung 3.15c) bei dem nach 4-stündiger Behandlung der Zellen mit TAT-NLS-Cre Protein eine schwache (0,5 μ M TAT-NLS-Cre) bzw. eine etwas stärkere Bande (1,0 μ M TAT-NLS-Cre) für die Deletion der Neomycin-Genkassette sichtbar ist.

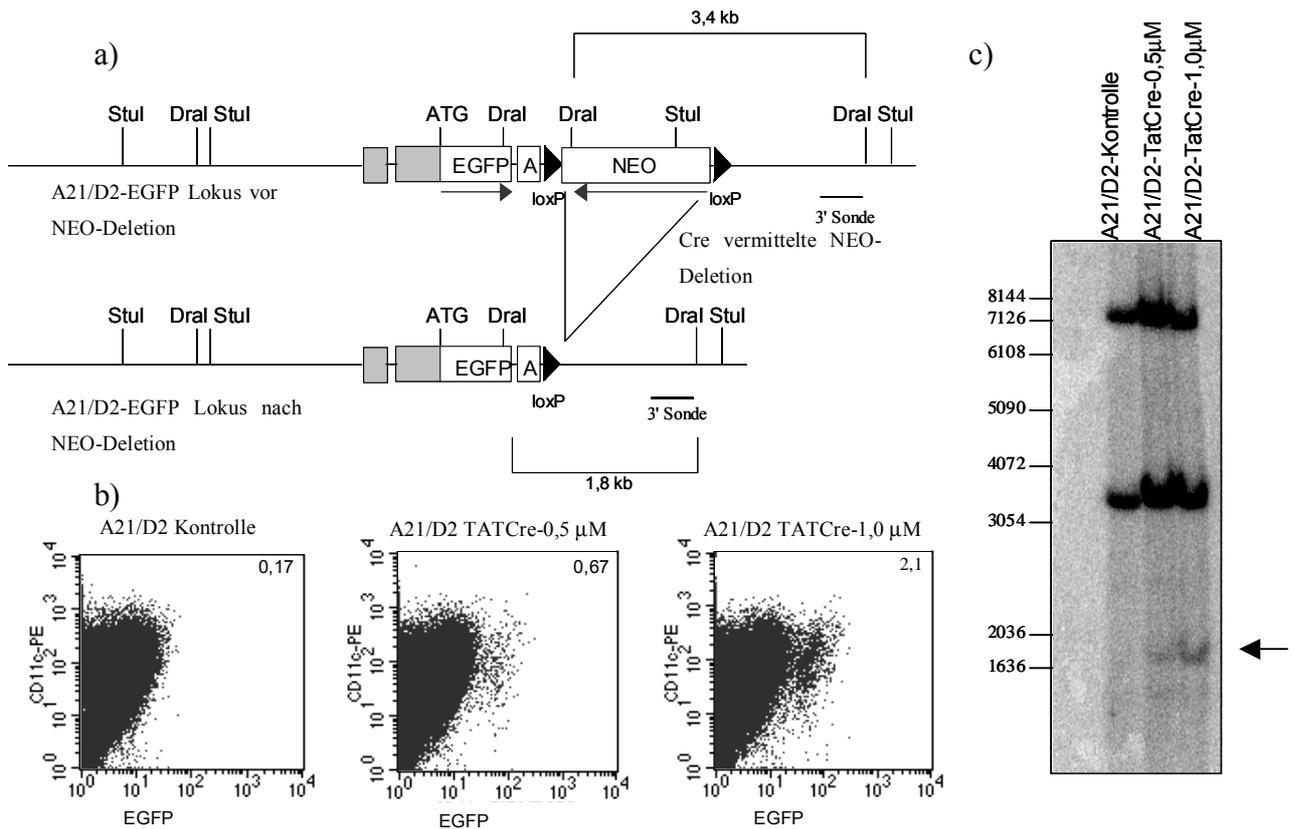


Abbildung 3.15: EGFP-Expression in Knochenmark DC nach *in vitro* Deletion der Neomycin-Resistenzkassette. a) Schematische Darstellung des mutierten A21/D2 Lokus vor und nach Cre-vermittelter Deletion der Neomycin-Genkassette. b) FACS Analyse der Knochenmark DC. Gezeigt sind unbehandelte Kontrollen und Zellen die 4 Stunden mit 0,5 µM bzw. 1,0 µM TAT-NLS-Cre (TATCre) Protein behandelt wurden. c) Southernblot der DNS aus Kontrollen und mit TAT-NLS-Cre behandelten Zellen. Die DNS wurde mit DraI verdaut und mit der 3' Sonde hybridisiert. Der Pfeil deutet auf die Banden nach Deletion der Neomycin-Resistenzkassette.

Aus diesem Ergebnis konnte der Schluss gezogen werden, dass der EGFP-Reporter tatsächlich nur dann funktioniert, wenn die Neomycin-Resistenzkassette deletiert wurde. Um A21/D2-EGFP Mäuse zu erhalten, in denen die Neomycin-Resistenzkassette deletiert ist, wurden die Mäuse mit Cre-Deleter Mäusen verpaart (Einleitung Kapitel 3.1.4) und die Nachkommen auf den Besitz des mutierten A21/D2 Allels ohne Neomycin-Genkassette untersucht (Abbildung 3.16a). Diese Mäuse wurden dann für die weiteren Reporteranalysen bzw. für die Rückkreuzung auf den C57BL/6 Mausstamm verwendet.

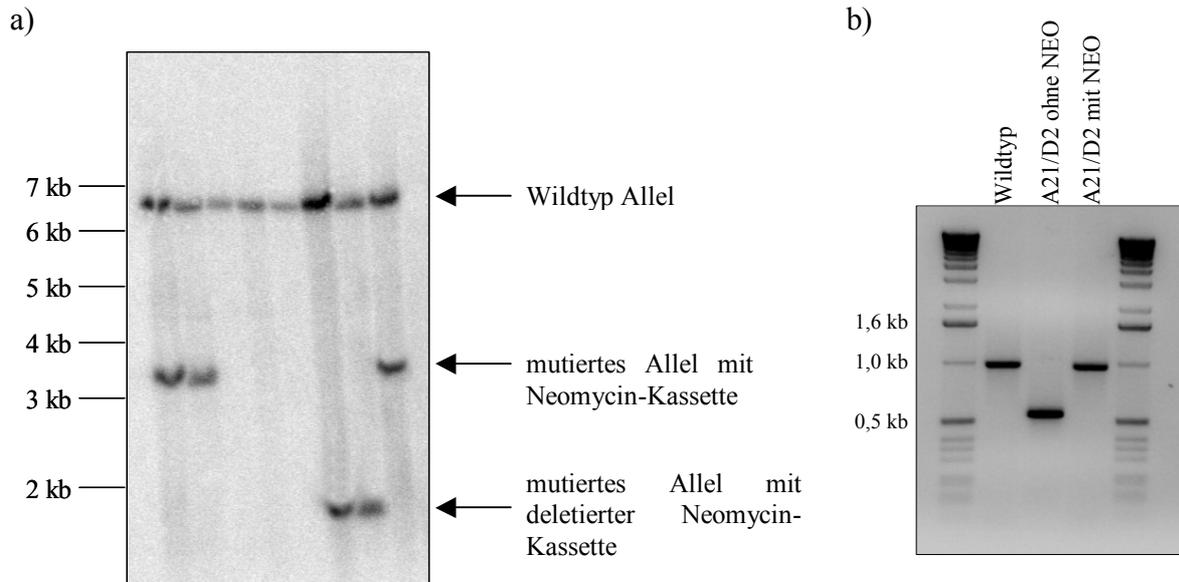


Abbildung 3.16: a) Southernblot Genotypisierung (DraI) von Nachkommen aus der A21/D2-EGFP^{ko/+} x Deleter Zucht mit der 3' Sonde. Es sind drei Mäuse mit homozygotem Wildtyp Allel, drei heterozygote Mäuse die noch die Neomycin-Resistenzkassette besitzen und zwei heterozygote Mäuse die die Neomycin-Resistenzkassette deletiert haben zu erkennen. b) A21/D2 Typisierungs-PCR: Mit den in Tabelle 2.10 aufgeführten Primern wurden Mäuse auf das Vorhandensein des Wildtyp Allels (1005pb), des mutierten Allels mit Neomycin Resistenzkassette (987bp) oder des mutierten Allels ohne Neomycin-Resistenzkassette (554pb) überprüft. Die PCR wurde unter Standardbedingungen bei einer Annealingtemperatur von 60°C durchgeführt.

Generierung einer A21/D2- defizienten Mausmutante und Nachweis der Inaktivierung von A21/D2

Generierung einer A21/D2-defizienten Mausmutante

Um Mäuse zu erhalten, bei denen auf beiden Allelen das A21/D2 mutiert und somit funktionslos ist, wurden heterozygote A21/D2-EGFP^{ko/+} Mäuse untereinander verpaart. Die Nachkommen wurden dann zunächst mittels Southernblot und später mit PCR genotypisiert (Abbildung 3.16b). Wie in Abbildung 3.17 gezeigt wird, konnten Mäuse identifiziert werden die homozygot für das mutierte A21/D2 Allel waren. A21/D2-EGFP^{ko/ko} Mäuse wurden mit der erwarteten Mendelschen Frequenz geboren, erschienen gesund und waren fertil.

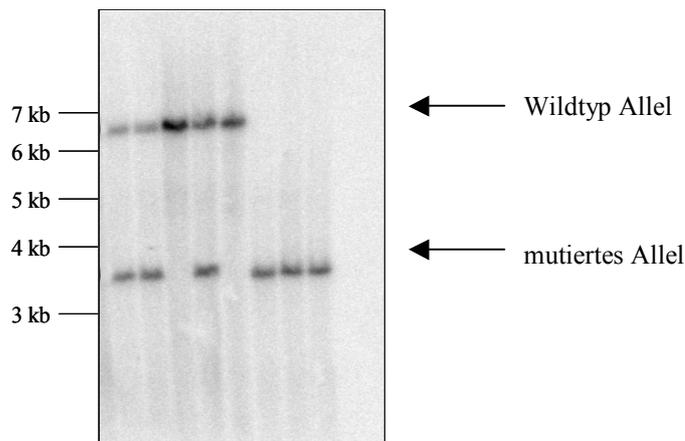


Abbildung 3.17: Southernblot Genotypisierung (DraI) von Nachkommen aus der homozygoten A21/D2-EGFP^{ko/+} Zucht mit der 3' Sonde. Neben Mäusen mit homozygoten Wildtyp Allel und heterozygoten Mäusen sind auch drei 'Knock-out' Mäuse, die homozygot für das mutierte A21/D2 Allel sind zu sehen.

Nachweis der Inaktivierung des A21/D2 Gens

Für den Nachweis der erfolgreichen Inaktivierung des A21/D2 Gens wurde die RNS von GM-CSF generierten Knochmark DC mittels A21/D2 spezifischer RT-PCR auf die Anwesenheit von A21/D2 mRNA untersucht. Dazu wurden die DC aus Knochenmark einer A21/D2-EGFP^{ko/ko} sowie einer A21/D2-EGFP^{+/+} Maus des gleichen Wurfs generiert und die RNS isoliert. Die RT-PCR wurde wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben durchgeführt. Wie in Abbildung 3.18 zu sehen ist, kann in den DC aus der A21/D2-EGFP^{+/+} Maus A21/D2 mRNA nachgewiesen werden, jedoch nicht in den DC der A21/D2-EGFP^{ko/ko} Maus. Als Beladungskontrolle diente auch hier wieder β -Actin. Dieses Ergebnis lässt den Schluss zu, dass das A21/D2 Gen erfolgreich inaktiviert wurde.

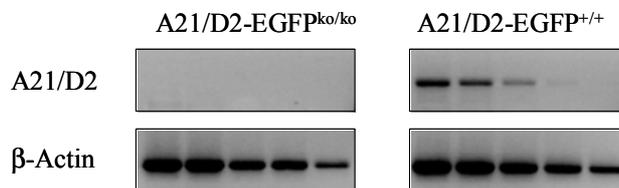


Abbildung 3.18: A21/D2-spezifische RT-PCR zum Nachweis der erfolgreichen A21/D2-Inaktivierung. Die RNS wurde dazu aus GM-CSF generierten Knochenmark DC aus einer A21/D2-EGFP^{ko/ko} und einer A21/D2-EGFP^{+/+} Maus gewonnen. Die RNS wurde in cDNS umgeschrieben in 1:5 Verdünnungsschritten verdünnt und mittels PCR amplifiziert. Als Standard dient β -Actin.

3.1.5 Analyse von A21/D2-EGFP Mausmutanten

Analyse der EGFP-Expression in A21/D2-EGFP-Reportermäusen

Analyse der EGFP-Expression in den Geweben von A21/D2-EGFP-Reportermäusen mit dem Konfokalen Lasermikroskop

Einen ersten Überblick über die Expression von A21/D2 in den verschiedenen Geweben und Zellen der Maus lieferte bereits die RT-PCR Analyse wie in Abbildung 3.3 gezeigt (Kapitel 3.1.1). Wie dort schon beschrieben, zeigte sich eine relative breite Expression in vielen Geweben der Maus. Mit der Generierung der A21/D2-Reporter Maus konnte nun die Ausprägung von A21/D2 in den Geweben dieser Mäuse genauer untersucht werden. Dazu wurde von heterozygoten A21/D2-EGFP Mäusen verschieden Organe entnommen und für die Analyse am Konfokalen Lasermikroskop präpariert.

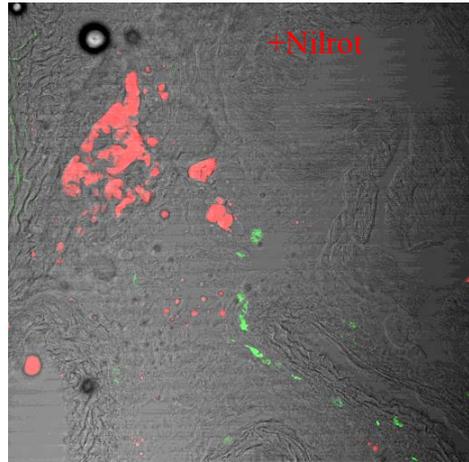
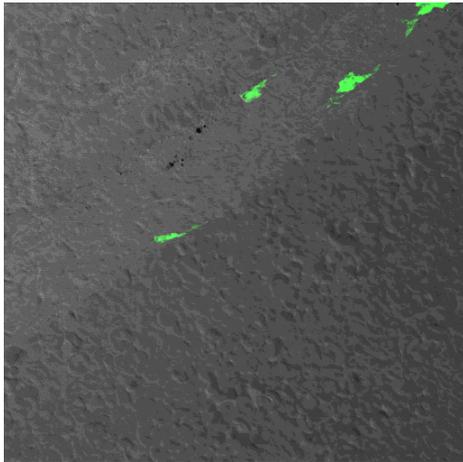
Zunächst viel auf, dass in den meisten untersuchten Organen nur relativ wenige, vereinzelte EGFP⁺ Zellen zu finden waren. Die Organe mit der vergleichsweise höchsten Anzahl an EGFP⁺ Zellen waren Herz, Uterus, Blase, Ovar und Lunge. Diese Zellen waren von durchschnittlicher Größe und zeigten eine flache bis spindelförmige Form. Zudem konnten auch EGFP⁺ Zellen gefunden werden, die eine große, runde Form und einen kreisförmigen Einschluss in der Mitte aufwiesen (siehe Abbildung 3.19 Thymus und Lunge). Da die Vermutung nahe lag, dass es sich dabei um Fettzellen handeln könnte, wurden einige Präparate mit Nilrot gefärbt. Bei Nilrot handelt es sich um einen fluoreszierenden Farbstoff, der hydrophobe Lipide sowie Phospholipide der Zellmembran anfärbt (allerdings lässt sich die so gefärbte Zellmembran erst bei höherer Verstärkung erkennen; zu sehen bei den Abbildungen von Uterus und Ovar (Abb. 3.19)). Bei der Untersuchung der mit Nilrot gefärbten Präparate bestätigte sich die Vermutung, dass es sich bei den großen runden, EGFP⁺ Zellen um Fettzellen handelt (gut zu erkennen beim Thymus, Abbildung 3.19), nicht aber bei den kleineren, spindelförmigen Zellen (siehe Abbildung 3.19 Herz). Es zeigte sich im Folgenden, dass bei den meisten untersuchten Organen in der Fettschicht, von der viele der inneren Organe umgeben sind, EGFP⁺ Zellen zu finden waren. Im weißen Fett ließen sich allerdings keine EGFP⁺ Zellen finden. Bei manchen Organen, wie z.B. dem Thymus konnten neben den EGFP⁺ Fettzellen keine anderen EGFP⁺ Zellen gefunden werden.

Die spindelförmigen EGFP⁺ Zellen waren im Herz, Uterus und Ovar vereinzelt und zumeist über das ganze Organ verteilt zu finden. Bei Herz und mehr noch in der Lunge konnten diese Zellen oft

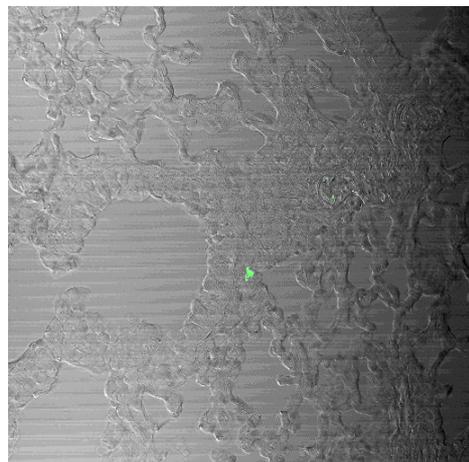
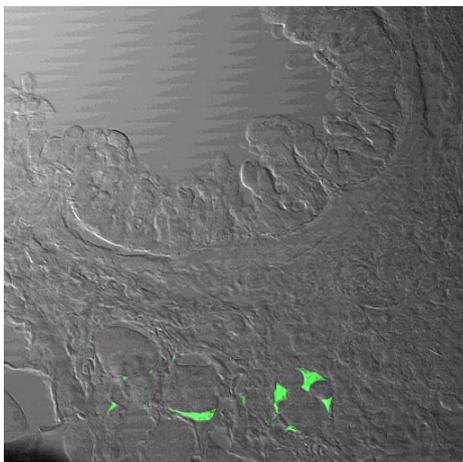
in der Nähe kleinerer Blutgefäße gefunden werden. Im Darm konnten insgesamt nur sehr wenige EGFP⁺ Zellen, meist im basalen Bereich der Krypten und Lamina Propria identifiziert werden. In der Milz waren ebenfalls nur sehr wenige, einzelne EGFP⁺ Zellen zu sehen.

Mit der Analyse am Konfokalen Lasermikroskop konnte damit ein Teil der EGFP⁺ Zellen als Fettzellen identifiziert werden, es konnte bislang jedoch keine Schlussfolgerung hinsichtlich der Zuordnung oder Funktion der anderen EGFP⁺ Zellen gezogen werden.

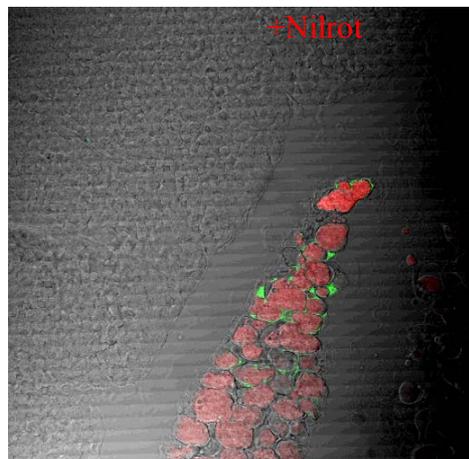
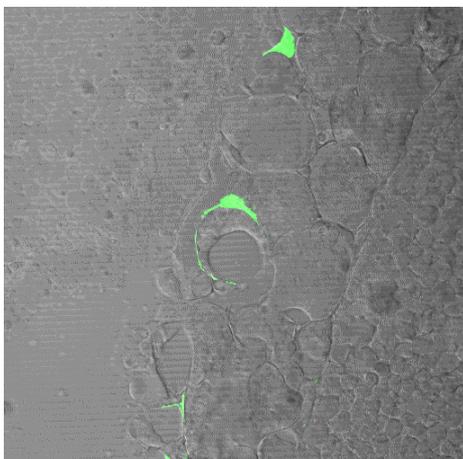
Herz



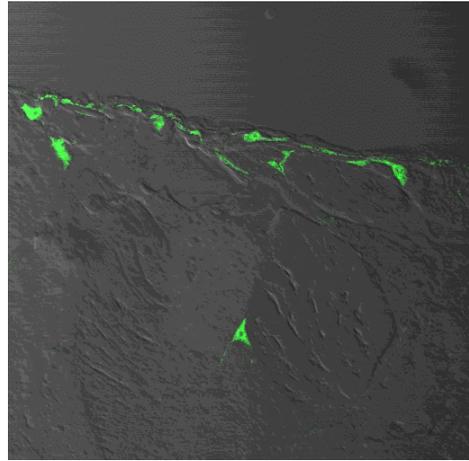
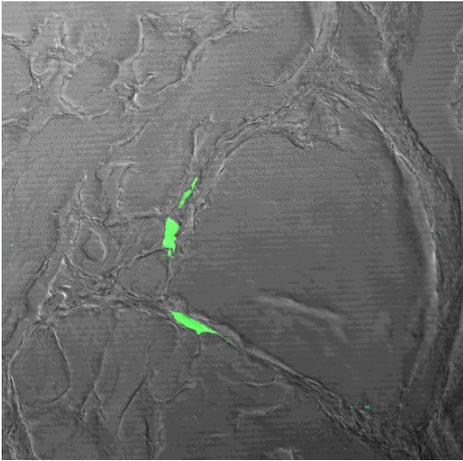
Lunge



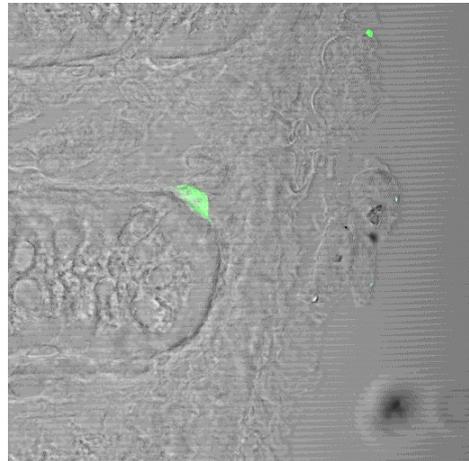
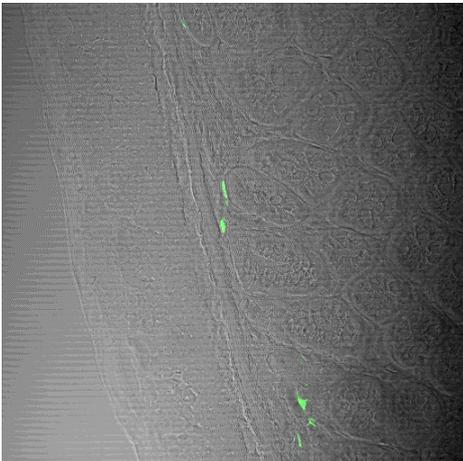
Thymus



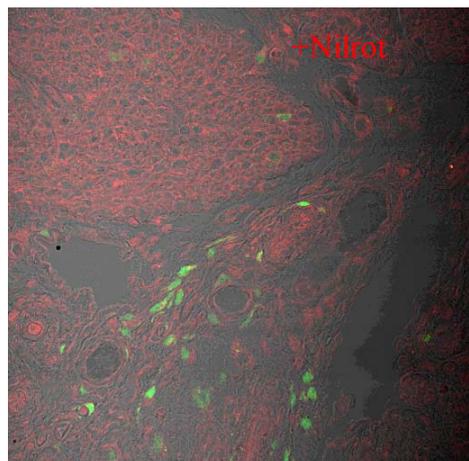
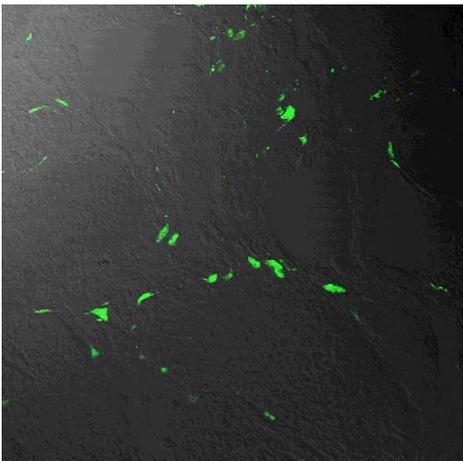
Blase



Darm



Uterus



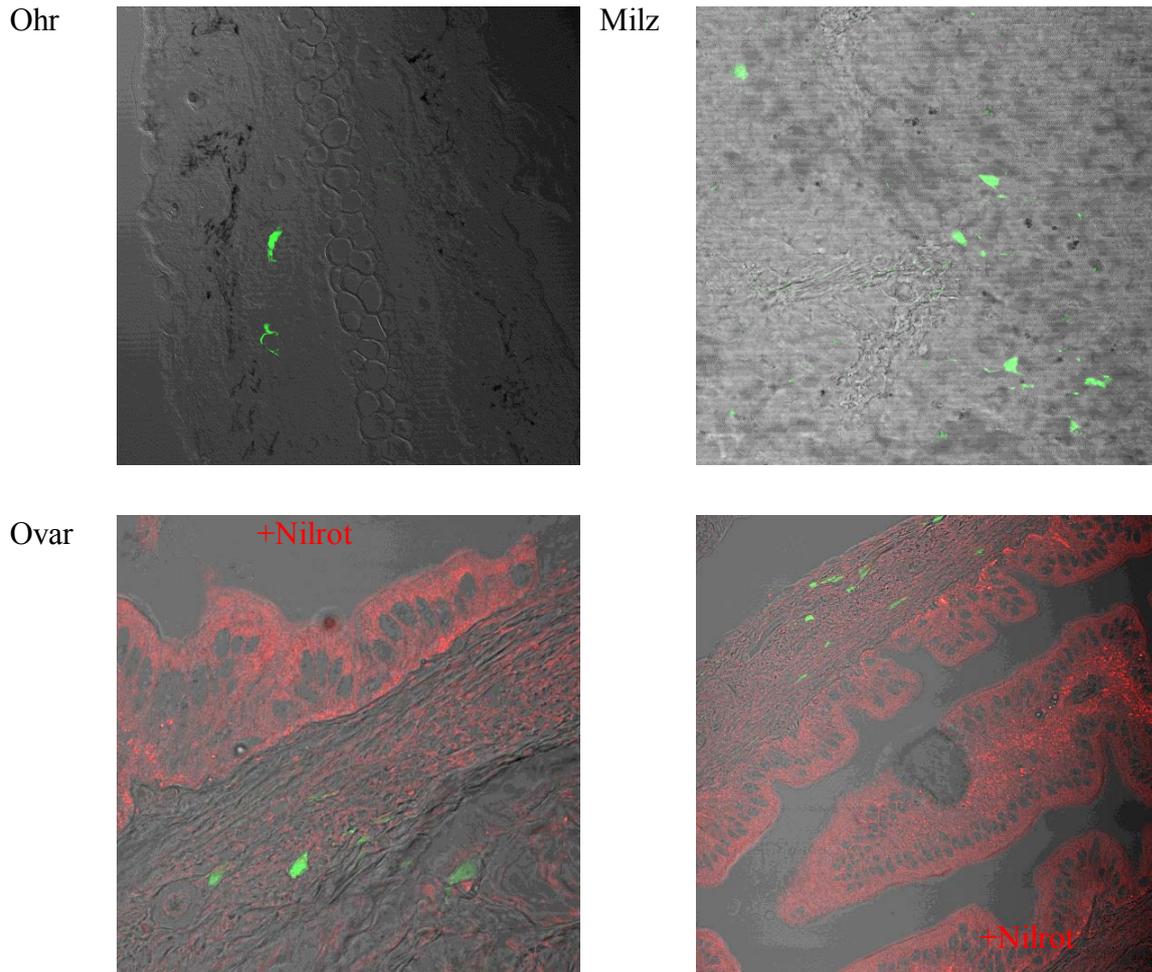


Abbildung 3.19: Analyse der A21/D2-EGFP-Reportermäuse am Konfokalen Lasermikroskop. Heterozygoten A21/D2-EGFP-Reportermäusen wurden verschiedene Organe entnommen und wie in Kapitel 2.9.1 beschrieben präpariert und am Konfokalen Lasermikroskop analysiert (EGFP⁺ Zellen in grün). Einige Präparate wurden zusätzlich mit dem Fettmarker Nilrot gefärbt.

Analyse der EGFP-Expression bei A21/D2-EGFP-Reportermäusen am FACS

Da A21/D2 in dem dieser Arbeit zugrunde liegendem Differential Display (Einleitung) als DC-spezifisch identifiziert wurde und auch die RT-PCR Analyse eine Expression in DC, nicht aber den meisten anderen lymphatischen Zellen zeigte (Kapitel 3.1.1), wurde zunächst die EGFP-Expression in DC von A21/D2-EGFP Reportermäusen untersucht. Zu diesem Zweck wurden GM-CSF DC aus dem Knochenmark von heterozygoten A21/D2-EGFP-Reportermäusen generiert und auf ihre EGFP-Expression untersucht. Während man an Tag drei der GM-CSF Kultur noch keine EGFP⁺ Zellen nachweisen kann, findet man an Tag sieben ca. 0,5 bis 1,5 % CD11c⁺EGFP⁺ Zellen in den Kulturen (Abbildung 3.20a). Lässt man DC aus diesen Kulturen an Tag sieben für 24

Stunden auf Glasplättchen wachsen, kann man unter dem Konfokalen Lasermikroskop EGFP⁺ Zellen mit einer typischen DC Morphologie erkennen (Abbildung 3.20b).

Die EGFP⁺ BM-DC (Tag 7) sind zudem CD45⁺ und B220⁻. Sie zeigen keine Expression für den frühen hämatopoetischen Marker c-Kit, sind aber positiv für den frühen DC-Marker FLT-3. Ein Teil der EGFP⁺ DC exprimiert auch den kostimulatorischen Marker CD80 (Abbildung 3.20c).

Neben GM-CSF können aus dem Knochenmark *in vitro* auch mit dem Zytokin FLT3L DC generiert werden. Da die GM-CSF DC positiv für den FLT3L Rezeptor FLT3 waren, wurde die EGFP-Expression von FLT3L generierten DC aus dem Knochenmark von A21/D2-EGFP Reporter-mäusen untersucht. Wie in Abbildung 3.21 zu sehen, konnte in DC aus dieser Kultur keine EGFP-Expression nachgewiesen werden, auch nicht nach Stimulation dieser Zellen mit TNF- α , LPS, IL-3, IFN- γ , RANTES, α -CD-40, CpG2216, SLC und IL-10 (nicht gezeigt). Im Übrigen konnte auch bei den GM-CSF generierten DC keine veränderte EGFP-Expression nach Stimulation mit TNF- α , LPS oder CpG-DNS festgestellt werden.

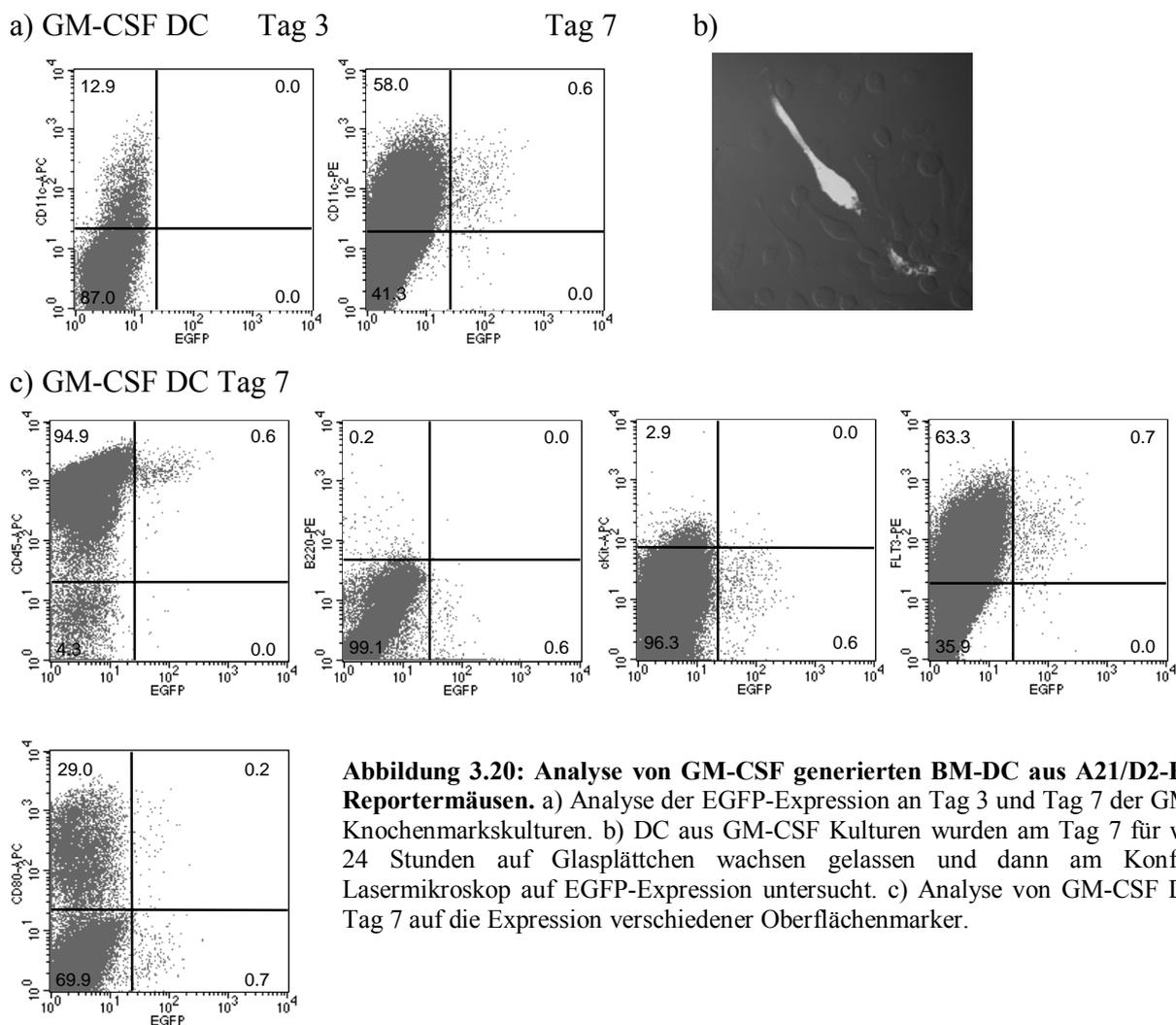


Abbildung 3.20: Analyse von GM-CSF generierten BM-DC aus A21/D2-EGFP-Reporter-mäusen. a) Analyse der EGFP-Expression an Tag 3 und Tag 7 der GM-CSF Knochenmarkskulturen. b) DC aus GM-CSF Kulturen wurden am Tag 7 für weitere 24 Stunden auf Glasplättchen wachsen gelassen und dann am Konfokalen Lasermikroskop auf EGFP-Expression untersucht. c) Analyse von GM-CSF DC am Tag 7 auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker.

FLT3L-Stimulierung Tag 8

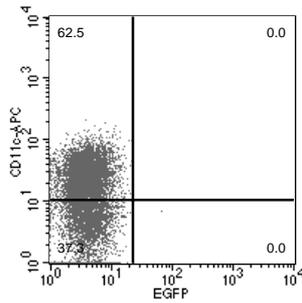
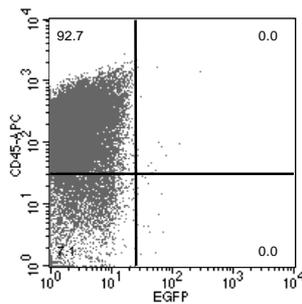


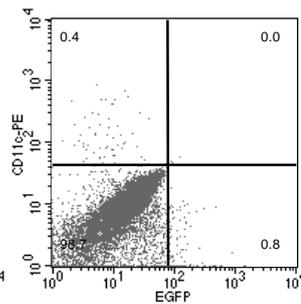
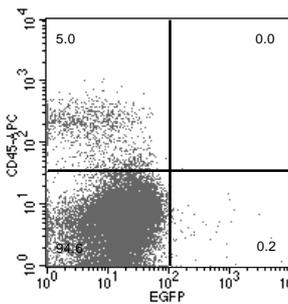
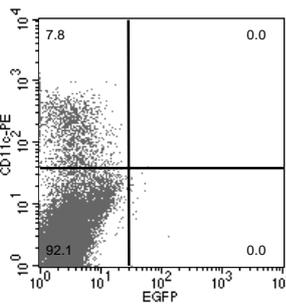
Abbildung 3.21: Analyse von FLT3L generierten BM-DC aus A21/D2-EGFP-Reportermausen. Knochenmark aus den A21/D2-EGFP Mäusen wurde für 8 Tage mit FLT3L behandelt. Die Zellen wurden am Tag 8 der Kultur auf die Expression von CD11c und EGFP am FACS untersucht.

Um die EGFP-Expression ex vivo in Zellen von Organen der A21/D2-EGFP-Reportermausen am FACS zu untersuchen, wurden die Organe nach einem Kollagenase-Verdau mit verschiedenen hämatopoetischen Markern gefärbt und am FACS analysiert (Abbildung 3.22). Während in der Milz (und Lymphknoten) praktisch keine EGFP⁺ Zellen zu finden waren, konnten in Herz und Lunge relativ kleine Populationen von EGFP⁺ Zellen nachgewiesen werden (zwischen 0,2 und 1%). Es handelte sich dabei ausschließlich um nicht-hämatopoetische (CD45 negative) Zellen. Größere EGFP⁺ Populationen fanden sich in der Blase (ca. 5-8%) und Uterus (ca. 15-25%). Auch in diesen Organen konnte keine Expression des hämatopoetischen Markers CD45 auf den EGFP⁺ Zellen nachgewiesen werden.

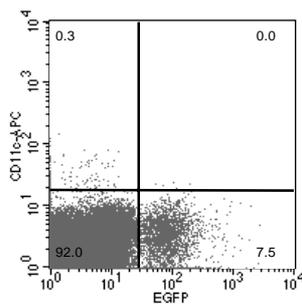
Milz



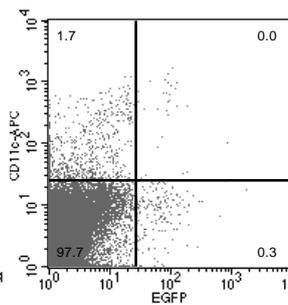
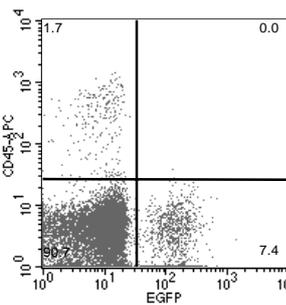
Herz



Blase



Lunge



Uterus

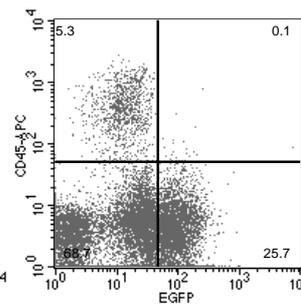
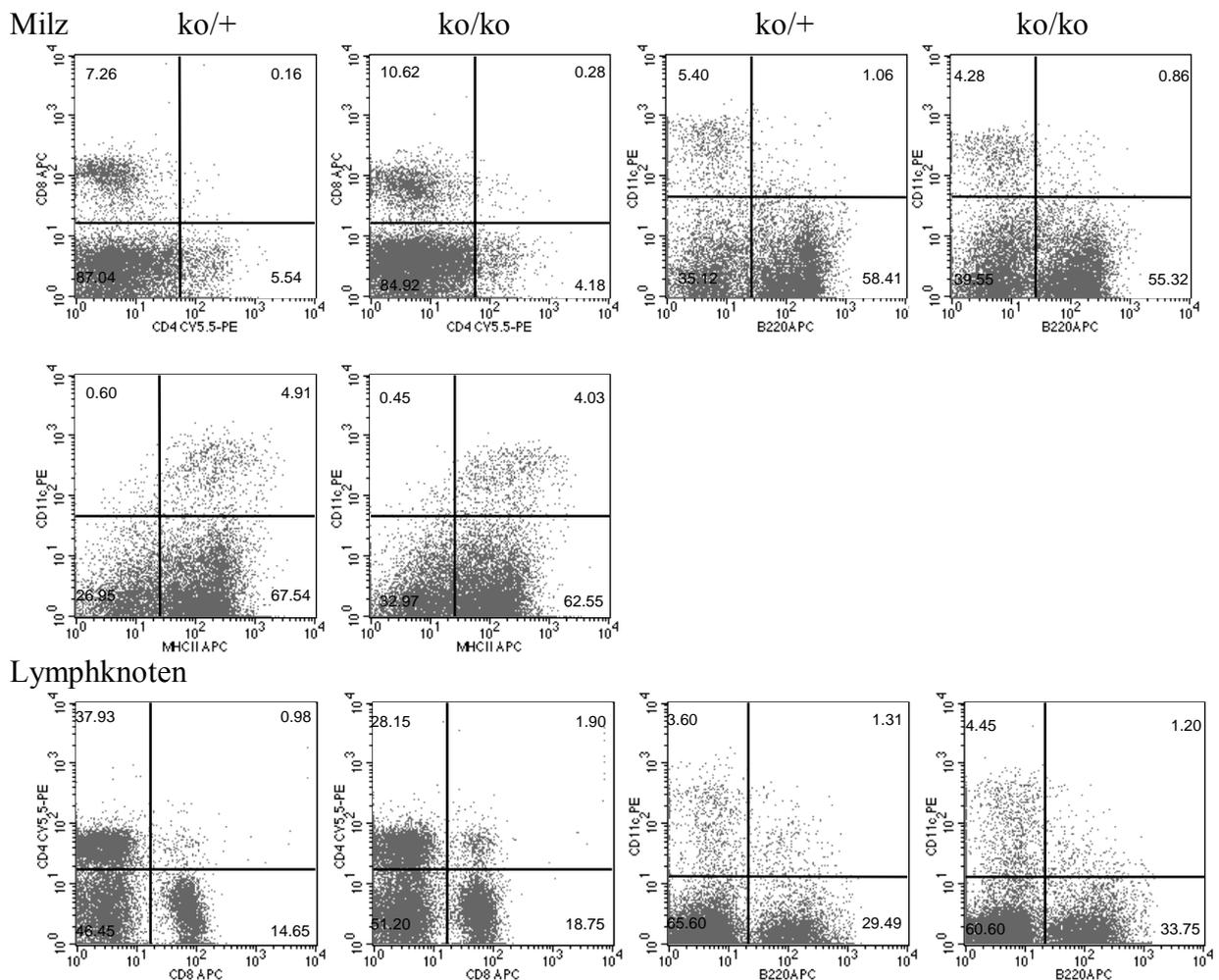


Abbildung 3.22: Ex vivo Analyse von Zellen aus A21/D2-EGFP-Reportermausen.

Primäranalyse A21/D2-defizienter Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine erste Analyse der A21/D2-defizienten Mäuse durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob sich durch die Defizienz von A21/D2 Veränderungen in der zellulären Zusammensetzung von lymphatischen Organen ergeben. Weder bei Milz noch bei Lymphknoten ließ sich ein signifikanter Unterschied bei den T-Zellen (CD4 und CD8), B-Zellen (B220) oder der dendritischen Zellen (CD11c) feststellen. Im Thymus war die Verteilung der CD4 und CD8 positiven Thymozyten normal und es konnte kein Unterschied zu den WT-Mäusen festgestellt werden. Bei einem ersten Blick auf die Verteilung von dendritischen Zellen und Makrophagen in der Lunge war ebenfalls kein Unterschied zu erkennen (Abbildung 3.23).



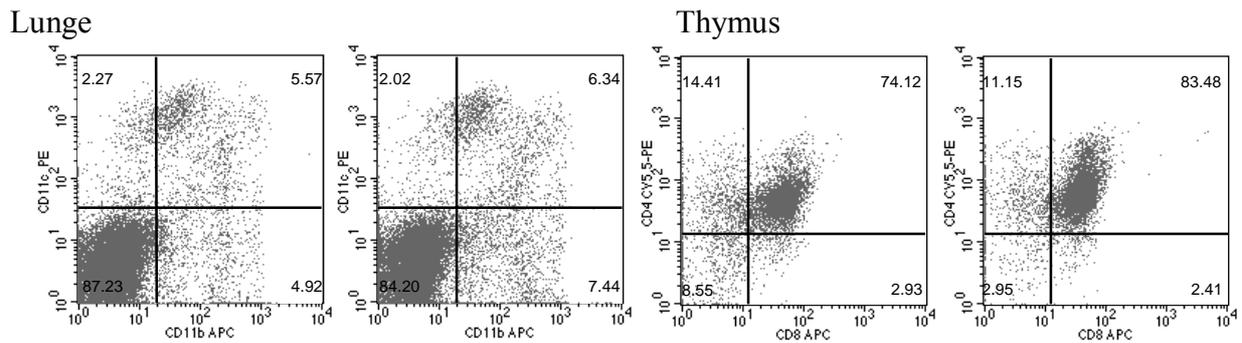


Abbildung 3.23: Primaranalyse von A21/D2-defizienten Mäusen. Zellen aus Milz, Lymphknoten, Thymus und Lunge von homozygoten A21/D2^{ko/ko} oder heterozygoten A21/D2^{ko/+} Mäusen wurden mit verschiedenen Oberflächenmarkern gefärbt und am FACS analysiert.

3.2 Teil 2: Regulation der Immunantwort durch Interleukin-18

3.2.1 Generierung monoklonaler neutralisierender Maus-anti-Maus-Interleukin-18 Antikörper

Ein Ansatz zur Untersuchung der Rolle von IL-18 bei Immunantworten ist die Verwendung von IL-18-defizienten Mäusen. Ein mögliches Problem bei der Analyse von IL-18-defizienten Mäusen könnte eine Adaptation des Immunsystems dieser Mäuse, hervorgerufen durch die vollständige Abwesenheit von IL-18 während ihrer Entwicklung sein. Ein weiteres Problem stellt sich im Hinblick auf die klinisch relevante, therapeutische Inhibierung der IL-18 Funktion. Da eine komplette genetische IL-18-Defizienz in der klinischen Anwendung nicht zu erreichen ist, ist es wünschenswert, neben den IL-18-defizienten Mäusen weitere Ansätze zur IL-18-Inhibierung zu untersuchen. Aus diesem Grund habe ich während meiner Diplomarbeit monoklonale neutralisierende Maus-anti-Maus-IL-18 Antikörper generiert (Diplomarbeit M. Lochner). Da diese Antikörper murinen Ursprungs sind, wird eine immunologische Abstoßung auch bei einer Langzeit-Anwendung in Mäusen verhindert. Zudem wurden die Hybridome auf Ihre Fähigkeit selektioniert, die Hauptfunktion von IL-18 (die Induktion von IFN- γ) zu neutralisieren. Abbildung 3.24 zeigt den Vergleich einiger Serum-Zytokinkonzentrationen von LPS-injizierten Wildtyp-Mäusen (WT), IL-18-defizienten Mäusen (IL-18ko) und WT-Mäusen, die mit dem anti-IL-18 Antikörper SK113AE-4 behandelt wurden (WT+ α -IL-18).

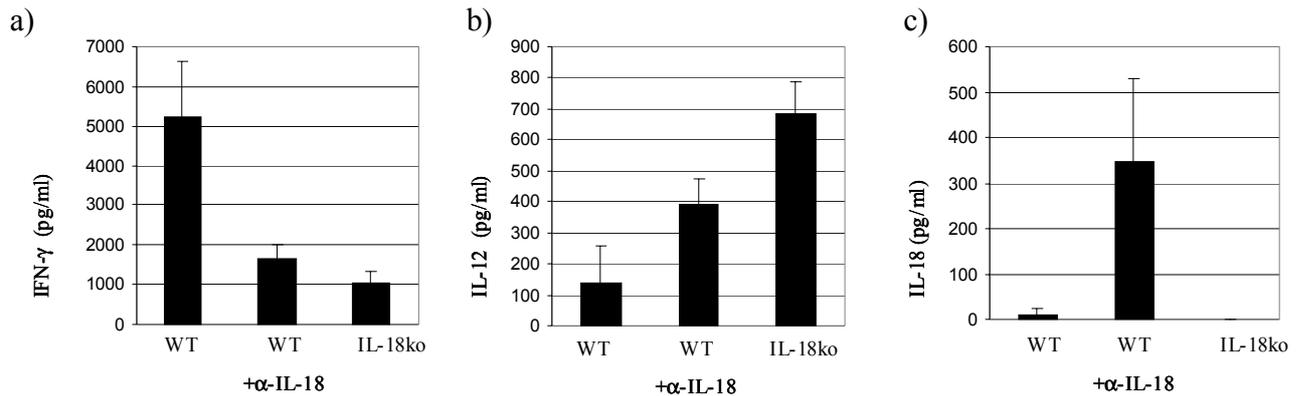


Abbildung 3.24 *In vivo* Neutralisierung von IL-18 durch anti-IL-18 Mab SK113AE-4. Wildtypmäuse (N=3) wurden intraperitoneal (i.p.) mit 500 μ g SK113AE-4 injiziert. 12 Stunden später wurden diese Mäuse, unbehandelte Wildtypmäuse (N=3) sowie IL-18^{ko/ko} Mäuse (N=3) i.p. mit 500 μ g LPS behandelt. Nach weiteren 6 Stunden wurden alle Mäuse geblutet und die Konzentrationen von IFN- γ , IL-12 und IL-18 im Serum mittels ELISA gemessen.

Wie in Abbildung 3.24a zu ersehen, weisen sowohl die antikörperbehandelten, als auch die IL-18-defizienten Mäuse eine deutlich geringere IFN- γ Konzentration im Serum auf. Dabei lässt sich mit Antikörperbehandlung eine vergleichbare Verringerung der IFN- γ Produktion erreichen wie bei den IL-18ko Mäusen. Interessanterweise scheint es einen kompensatorischen Mechanismus zu geben, da sich bei den IL-18ko - und antikörperbehandelten Mäusen eine signifikant höhere IL-12 Konzentration im Serum nachweisen lässt (Abbildung 3.24b).

Während sich bei den IL-18ko Mäusen wie zu erwarten kein IL-18 im Serum nachweisen lässt und bei den WT-Mäusen nach 6 Stunden nur geringe Mengen detektierbar sind, konnten im Serum der antikörperbehandelten Mäuse eine relativ hohe Menge IL-18 gemessen werden (Abbildung 3.24c). Wahrscheinlich handelt es sich dabei um IL-18, das an den Antikörper SK113AE-4 gebunden im Blut zirkuliert.

Insgesamt lassen die Daten die Schlussfolgerung zu, dass mit dem Antikörper SK113AE-4 eine effiziente *in vivo* Neutralisation von IL-18 erreicht werden kann.

3.2.2 Untersuchungen zur Rolle von Interleukin-18 bei entzündlichen Darmerkrankungen im Mausmodell

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des Zytokins IL-18 auf die Entwicklung von entzündlichen Darmerkrankungen im Mausmodell zu untersuchen. Die Verwendung von IL-18-defizienten Mäusen (Hochholzer et al., 2000) erlaubte es, einen möglichen positiven Effekt auf die Entwicklung einer Kolitis bei IL-18-Defizienz zu untersuchen. In einem zweiten Ansatz sollte zudem untersucht werden, welche Auswirkungen eine therapeutische Blockade von IL-18 mit

einem neutralisierenden anti-IL-18 Antikörper auf die Entwicklung bzw. Ausprägung einer Kolitis hat.

Um den Beitrag unterschiedlicher Faktoren wie z.B. von Zytokinen auf die Entwicklung und Ausprägung von entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen, wurden in den letzten Jahrzehnten eine ganze Reihe von Mausmodellen entwickelt. Diese Modelle unterscheiden sich zum Teil erheblich, nicht nur in der Art und Weise wie die Kolitis induziert wird, sondern auch in den für das jeweilige Modell charakteristischen pathologischen Veränderungen im Darm sowie den daran beteiligten immunologischen Vorgängen. Aus diesem Grund lassen sich mit den einzelnen Modellen jeweils nur bestimmte Aspekte der komplexen Immunpathologie bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen untersuchen. Um einen möglichst umfassenden Eindruck über die Auswirkung der IL-18-Defizienz bzw. der IL-18-Blockade im Kolitismodell zu gewinnen, wurden deshalb in dieser Arbeit drei verschiedene Maus-Kolitismodelle verwendet.

Der Einfluss von IL-18 auf die Entwicklung einer DSS-Kolitis

Die Dextrane-sodium-sulfate (DSS)-Kolitis ist eine schnelle und wirksame Methode, eine akute Kolitis zu induzieren. Die kontinuierliche Gabe von 3-5% DSS gelöst im Trinkwasser induziert eine Kolitis in Mäusen, Ratten und Hamstern. Die DSS-induzierte Kolitis ist gekennzeichnet durch eine blutige Diarrhöe, Gewichtsverlust, Verkürzung des Kolons, mukosale Ulzerationen und Infiltration des Kolons hauptsächlich durch Neutrophile und Makrophagen. Die Mäuse entwickelten diese Symptome nach Zugabe von 3%-5% DSS innerhalb von 8-9 Tagen (Okayasu et al., 1990). Der genaue Wirkmechanismus von DSS im Zusammenhang mit dem Kolitis-induzierenden Potential ist nicht bekannt. Es ist wahrscheinlich, dass DSS zunächst auf die Darmepithelzellen wirkt und eine Veränderung der epithelialen Barrierefunktion auslöst (Kitajima et al., 1999). Der erste sichtbare Effekt ist ein fortschreitender Verlust der Darmkrypten (Cooper et al., 1993). Die Rolle von aktivierten Immunzellen und Entzündungsmediatoren wird durch eine erhöhte mukosale Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen sowie der heilsamen Wirkung von TGF- β und IL-1R Antagonist dokumentiert (Elson et al., 1995). Das adaptive Immunsystem scheint allerdings keine entscheidende Rolle bei der Manifestierung der DSS-Kolitis zu spielen, da auch Scid-Mäuse anfällig für die DSS-Kolitis sind (Dieleman et al., 1994). Die DSS-Kolitis ist deshalb vor allem dazu geeignet, den Beitrag von Mechanismen des angeborenen Immunsystems und unspezifischen Entzündungsreaktionen bei entzündlichen Darmerkrankungen zu untersuchen (Elson et al., 1995).

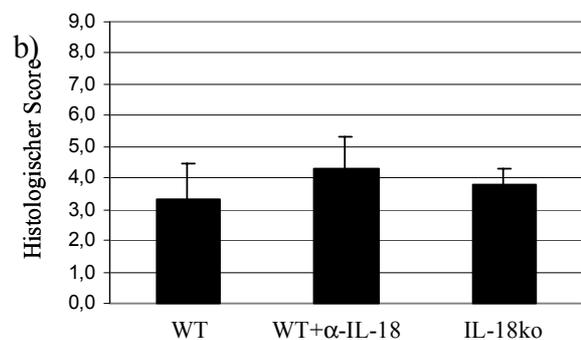
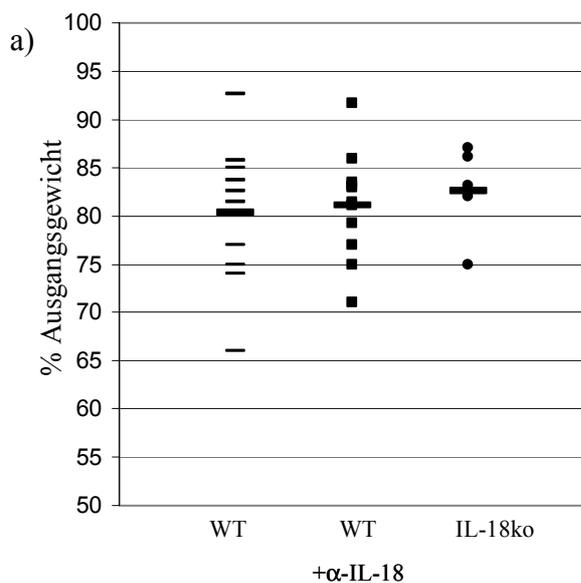
Da verschiedene Inzucht-Mausstämme eine z.T. sehr unterschiedlich ausgeprägte Anfälligkeit für eine DSS-induzierte Kolitis zeigen (Mahler et al., 1998), wurden zwei verschiedene Mausstämme verwendet.

DSS-Kolitis in BALB/c Mäusen

In diesem Experiment wurden BALB/c Wildtypmäuse und IL-18-defiziente Mäuse auf BALB/c Hintergrund für 9 Tage mit 5% DSS im Trinkwasser behandelt. Eine Gruppe von BALB/c Wildtypmäusen wurde zusätzlich an Tag 0, 3 und 7 mit je 0,5 mg anti-IL-18 Mab i.p. behandelt. Ab Tag 3 nach Start der Behandlung mit DSS begannen die Mäuse gleichmäßig an Gewicht zu verlieren. Abbildung 3.25a zeigt das Gewicht der Mäuse an Tag 9 in Prozent Ausgangsgewicht. Obwohl die Mäuse im Vergleich sehr unterschiedlich an Gewicht verloren (zwischen 5 und 30%), ist zwischen den drei Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Um das Ausmaß der pathologischen Veränderungen im Darm der Mäuse zu bestimmen, wurden allen Mäusen an Tag 9 der Darm entnommen und Dünnschnitte des Kolons angefertigt. Diese wurden mikroskopisch beurteilt und die Schwere der pathologischen Veränderungen in einem 'Histologischen Score' eingeordnet. Dieser Histologische Score beinhaltet zudem die Parameter 'Kolonverkürzung' sowie die Anwesenheit von Blut im Kolon und die Dicke des Kolons. Eine genaue Beschreibung der Zusammensetzung des Histologischen Scores findet sich unter 2.9.5.

Wie in Abbildung 3.25b ersichtlich, entwickelten alle Mäuse eine milde bis mittelschwere Kolitis. Allerdings konnte auch hier kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden.



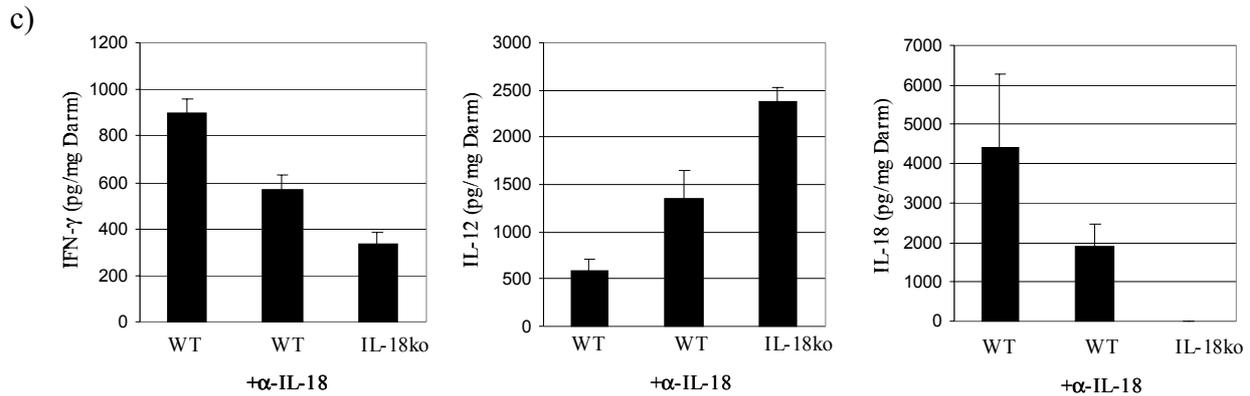


Abbildung 3.25: DSS-Kolitis bei BALB/c Mäusen: BALB/c Wildtyp (WT; N=9) IL-18-defiziente (IL-18ko; N=6) sowie Wildtypmäuse, die zusätzlich mit dem anti-IL-18 Mab SK113AE-4 behandelt wurden (WT+α-IL-18; N=9), erhielten für 9 Tage 5% DSS ins Trinkwasser. a) Endgewicht der Mäuse in % Ausgangsgewicht b) Histologischer Score der Mäusedärme c) Kolon Organ-Kultur. Ein Teil der Därme wurde für 6-24h in Medium kultiviert und die Zytokinkonzentrationen im Überstand mittels ELISA bestimmt

Um eine Aussage über den Zytokinstatus im Kolon der Mäuse treffen zu können, wurde ein kleiner Teil des Kolons für eine 'Kolon Organ-Kultur' (siehe Abschnitt 2.9.4) verwendet. Dazu wurden die Darmstücke für 6-24 Stunden in Medium kultiviert und anschließend mittels ELISA die Zytokinkonzentrationen im Überstand ermittelt. Um die einzelnen Werte vergleichen zu können, wurde für die Auswertung die Zytokinkonzentration auf Zytokinkonzentration pro Milligramm Darm umgerechnet. In Abbildung 3.25.c sind die Ergebnisse der Organ-Kultur für IFN- γ , IL-12 und IL-18 gezeigt. Es zeigt sich, dass sowohl im Darm der IL-18-defizienten, als auch –nicht ganz so deutlich- bei den anti-IL-18 behandelten Mäusen signifikant weniger IFN- γ produziert wurde. Genau anders herum sieht es bei der IL-12 Produktion aus. Während bei den Wildtypmäusen nur geringe Mengen nachzuweisen sind, produzieren die IL-18-defizienten Mäuse große Mengen an IL-12. Die anti-IL-18 behandelten Mäuse liegen ungefähr in der Mitte. Dieses Ergebnis widerspricht der gängigen Vorstellung einer gegenseitigen Verstärkung von IL-12 und IL-18, nach der eine geringere IL-12 Produktion in den IL-18-defizienten Mäusen zu erwarten gewesen wäre. Möglicherweise wird hier die IL-18-Defizienz bzw. Blockade durch erhöhte IL-12 Produktion kompensiert. Die TNF- α Konzentration nach 6 und 24 Stunden Kultur lag bei allen drei Gruppen unterhalb der Nachweisgrenze.

Wie zu erwarten, lässt sich bei den IL-18-defizienten Mäusen kein IL-18 nachweisen, während bei den Wildtypmäusen große Mengen an IL-18 produziert wird. Bei den anti-IL-18 behandelten Mäusen war die IL-18 Menge im Vergleich mit den Wildtypmäusen um ca. 50-60% reduziert.

Insgesamt lässt sich also bei der DSS-Kolitis bei BALB/c Mäusen, trotz deutlichen Unterschieden in den Kolon-Kulturen, kein Unterschied im Verlauf und der Schwere der Kolitis bei IL-18-Defizienz bzw. der IL-18-Blockade durch den anti-IL-18 Antikörper feststellen.

DSS-Kolitis in C57BL/6 (BL/6) Mäusen

Für die DSS-Kolitis mit BL/6 Mäusen wurden, wie zuvor beschrieben, sowohl Wildtypmäuse, IL-18-defiziente Mäuse auf BL/6 Hintergrund und mit anti-IL-18 Mab behandelte Wildtypmäuse mit DSS im Trinkwasser behandelt. Da Mäuse auf dem BL/6 Hintergrund im Allgemeinen stärker auf die DSS-Behandlung ansprechen, wurden die Mäuse nur für 7 Tage mit 3,5% DSS behandelt.

Die Mäuse verloren auch hier deutlich an Gewicht, wobei die antikörperbehandelten und die IL-18-defizienten Mäuse an Tag 7 einen leicht geringeren Gewichtsverlust zeigten (Abbildung 3.26a). Insgesamt entwickelten die Mäuse eine deutlich schwerere Kolitis als die BALB/c Mäuse. Betrachtet man den histologischen Score (Abbildung 3.26b), zeigen die IL-18-defizienten Mäuse eine leichte Verbesserung gegenüber den Wildtypmäusen. Allerdings entwickeln sowohl die IL-18-defizienten als auch die antikörperbehandelten Mäuse eine ausgeprägte Kolitis. Sowohl bei den Wildtypmäusen, als auch den IL-18-defizienten Mäusen lassen sich die für die DSS-Kolitis typischen histologischen Veränderungen, wie z.B. der Verlust der Dickdarm-Krypten (Abbildung 3.27) oder die Einwanderung von inflammatorischen Makrophagen in die Lamina Propria (Abbildung 3.27) in gleichem Maße beobachten.

Zur Ermittlung des Zytokinstatus wurde auch bei diesem Versuch wieder ein Teilstück des Darmes für eine Kolon Organ-Kultur verwendet. Zunächst fällt auf, dass im Vergleich zur Organ-Kultur bei den BALB/c Mäusen, für alle untersuchten Zytokine deutlich höhere Konzentrationen gemessen wurden. Im Vergleich zu den Wildtypmäusen zeigen die IL-18-defizienten Mäuse eine stark verminderte IFN- γ Produktion (Abbildung 3.26c). Diese Reduktion in der IFN- γ Produktion lässt sich bei den anti-IL-18 Mab behandelten Mäusen nicht beobachten. Die hier eingesetzte Antikörpermenge (3 x 0,5 mg) reichte offensichtlich nicht aus, die große Menge an IL-18 (Abbildung 3.26c) effektiv zu neutralisieren.

Im Vergleich zu den Wildtypmäusen zeigen die IL-18-defizienten- und die antikörperbehandelten Mäuse sowohl eine geringere IL-12-, sowie eine deutlich verminderte TNF- α Produktion im Darm.

Insgesamt lässt sich also auch bei der DSS-Kolitis in den BL/6 Mäusen zwar eine deutliche Reduktion der Proinflammatorischen Zytokine im Darm feststellen, eine signifikante Verbesserung der Pathologie (Histologischer Score, Gewichtsabnahme) ist jedoch nicht zu erkennen.

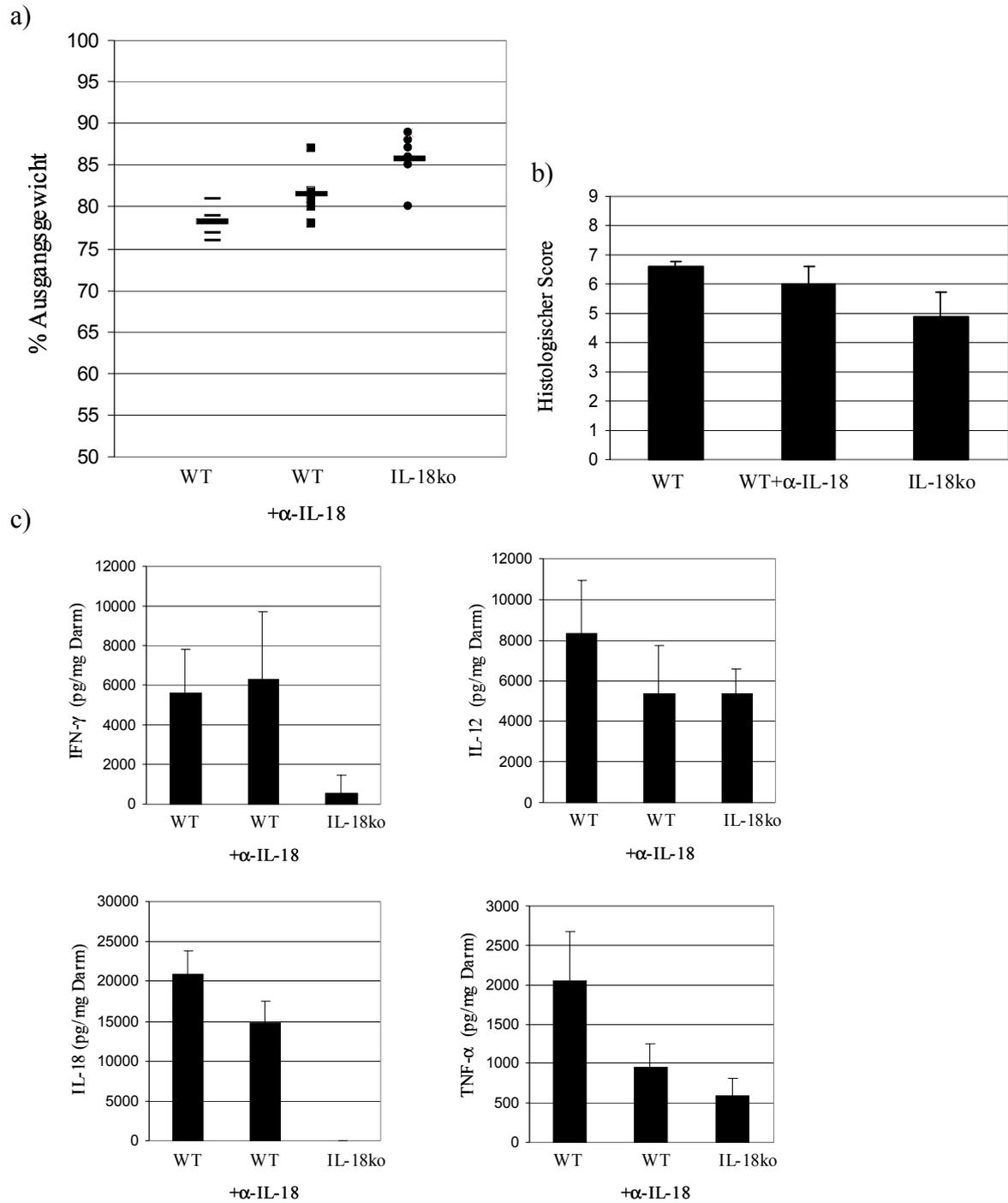


Abbildung 3.26: DSS-Kolitis bei BL/6 Mäusen: C57BL/6 Wildtyp (WT; N=6) IL-18-defiziente (IL-18ko; N=6) sowie Wildtypmäuse, die zusätzlich mit dem anti-IL-18 Mab SK113AE-4 behandelt wurden (WT+α-IL-18; N=6), erhielten für 7 Tage 3,5% DSS ins Trinkwasser. a) Endgewicht der Mäuse in % Ausgangsgewicht b) histologischer Score der Mäusedärme c) Kolon Organ-Kultur. Ein Teil der Därme wurde für 6-24h in Medium kultiviert und die Zytokinkonzentrationen im Überstand mittels ELISA bestimmt.

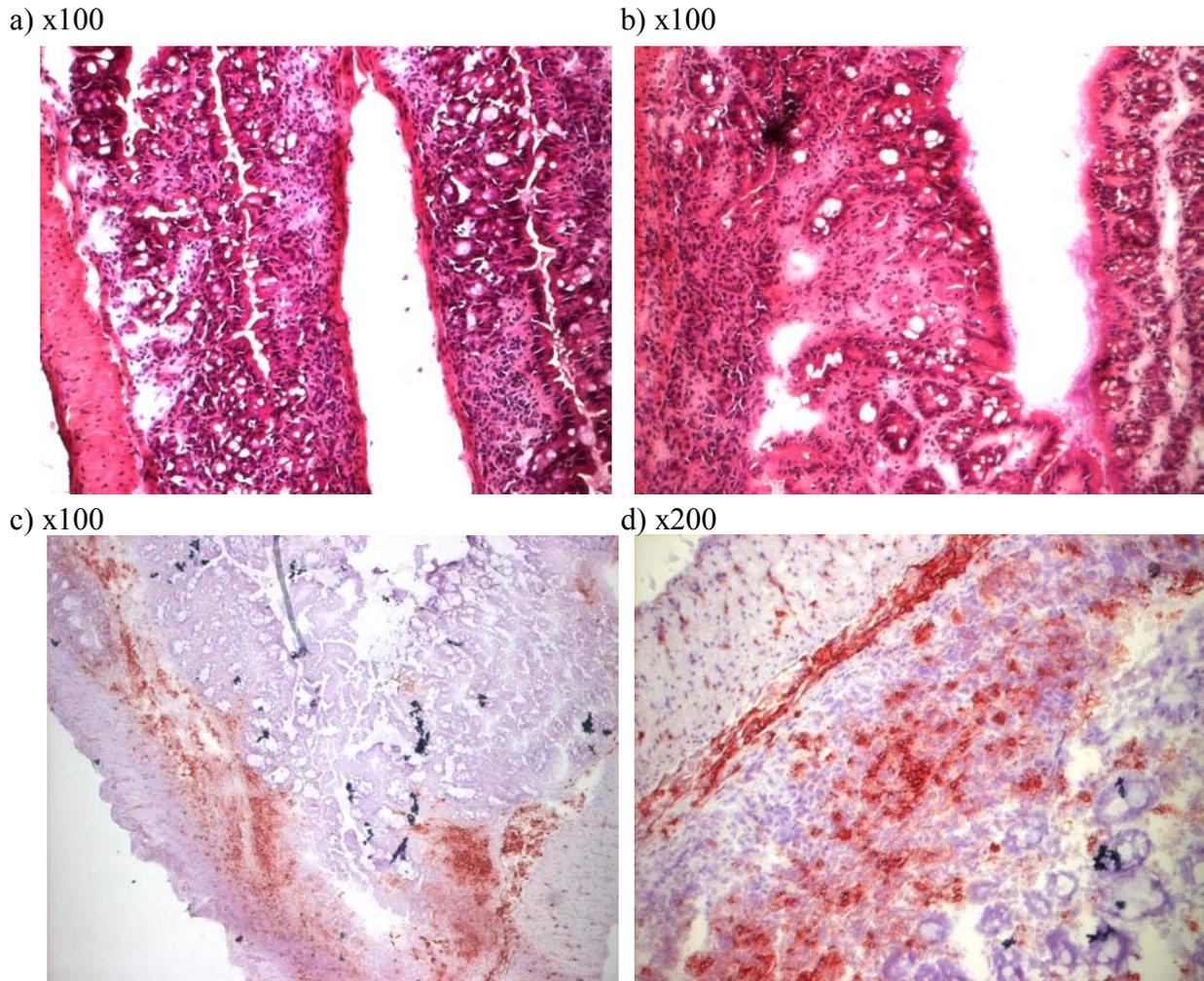


Abbildung 3.27: Histologie bei einer DSS-Kolitis an TAG 7 nach 3,5% DSS: a) HE-Färbung des Kolons einer BL/6 Wildtypmaus b) HE-Färbung des Kolons einer IL-18-defizienten Maus. c und d) Immunhistochemische Färbung für Mac-1⁺ Makrophagen im Kolon einer BL/6 Wildtypmaus (c) und im Kolon eine IL-18-defizienten Maus (d). Die jeweilige Vergrößerung ist angegeben

Transferkolitis

Das Modell der Transferkolitis wurde für Mäuse 1993 von Powrie et al. etabliert (Powrie et al., 1993). Die Autoren konnten zeigen, dass der Transfer von CD4⁺CD45BR^{high} Zellen (naive CD4⁺ Zellen) aus der Milz und den Lymphknoten von Wildtypmäusen in SCID-Mäuse zur Ausprägung einer chronischen Kolitis in einem Zeitraum zwischen 6-10 Wochen führt. Die Kolitis ist typischerweise begleitet von einer starken Verdickung der Darmwand, Hyperplasie der Epithelzellen und einer Infiltration von Lymphozyten in die Lamina Propria (Hibi et al., 2002). Es wird angenommen, dass der Transfer der CD4⁺CD45RB^{high} Zellen eine unregulierte, Th1-dominierte T-Zell Immunantwort im Darm auslöst, die schließlich zur Entwicklung der Kolitis führt. Die Transferkolitis eignet sich besonders um immunregulatorische Mechanismen der adaptiven Immunantwort in einem chronischen Kolitisverlauf zu untersuchen. Bei der hier

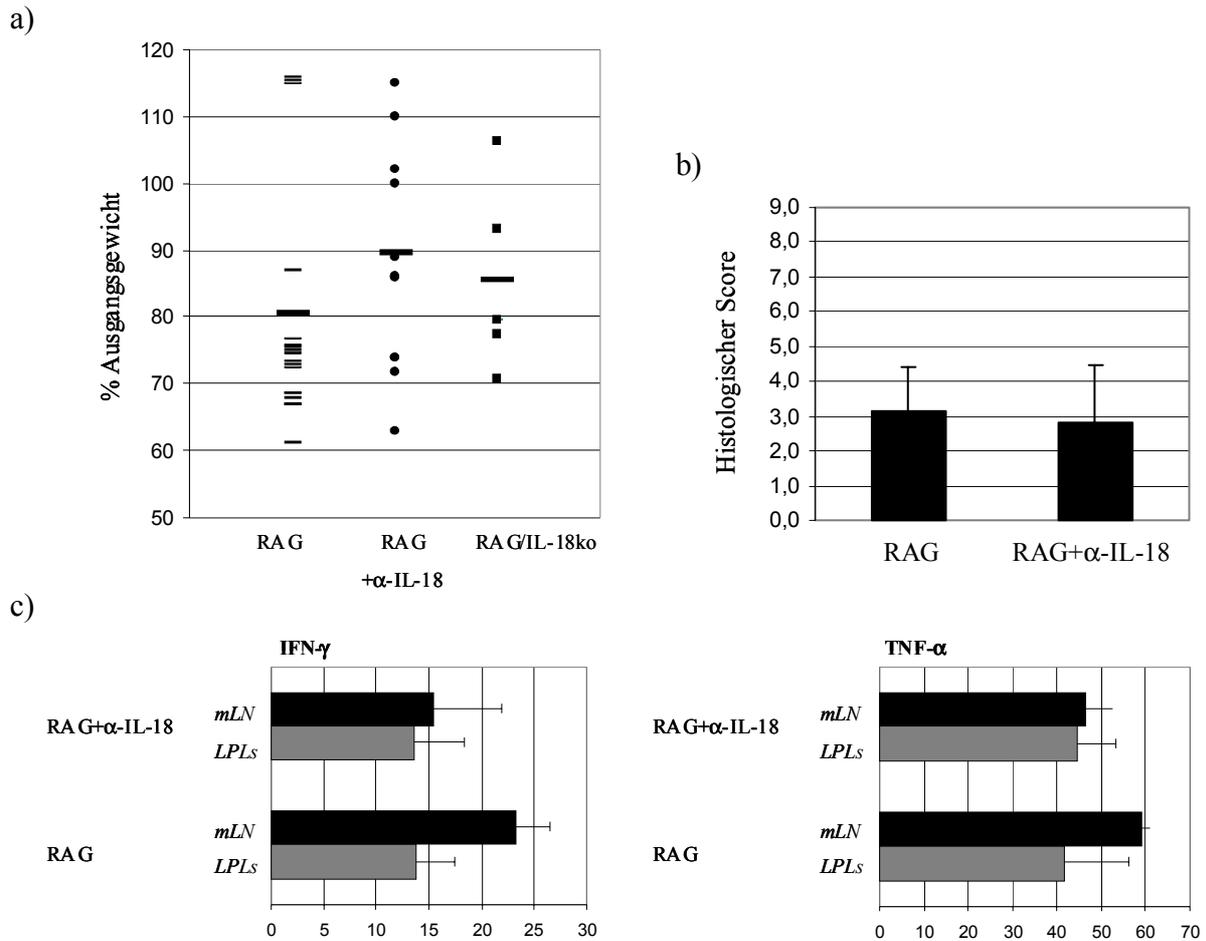
verwendeten Methode handelt es sich um eine leicht adaptierte Methode, bei der mit ConcanavalinA (ConA) aktivierte CD4⁺ T-Zellen aus der Milz einer Wildtypmaus in RAG^{ko/ko} Mäuse transferiert werden (Bregenholt et al., 1998).

Für die in Abbildung 3.28 zusammengefassten Transferkolitis Experimente wurden RAG^{ko/ko}, RAG^{ko/ko}IL-18^{ko/ko} sowie RAG^{ko/ko} Mäuse, die wöchentlich mit 0,5 mg anti-IL-18 Mab behandelt wurden, mit ConA-aktivierten T-Zellen transferiert. Die Mäuse entwickelten in Zeitraum zwischen 6 bis 8 Wochen eine mittelschwere bis schwere Kolitis. Abbildung 3.28 fasst die Gewichtsabnahme der Mäuse am Ende der jeweiligen Experimente zusammen. Obwohl die RAG^{ko/ko}IL-18^{ko/ko} und die antikörperbehandelten RAG^{ko/ko} Mäuse im Schnitt weniger Gewicht verloren, zeigt der Vergleich des histologischen Scores keinen Unterschied in der Schwere der Kolitis (Abbildung 3.28a, b).

Um den Zytokinstatus im Darm der Mäuse zu bestimmen, wurden Lymphozyten aus der Lamina Propria (LPLs) und den mesenterialen Lymphknoten (mLN) der Mäuse isoliert und eine intrazelluläre FACS-Färbung für IFN- γ und TNF- α durchgeführt. In Abbildung 3.28c ist der Anteil der CD4⁺ IFN- γ ⁺ bzw. der CD4⁺ TNF- α ⁺ Zellen in Prozent der Gesamt-CD4⁺ Zellen gezeigt.

Es zeigte sich, dass im Schnitt ca. 10-25% der CD4⁺ Zellen IFN- γ -positiv und ca. 40-60% der CD4⁺ Zellen TNF- α -positiv waren. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte lediglich bei den CD4⁺ Zellen in mLN festgestellt werden. Hier war der Anteil der IFN- γ ⁺ und TNF- α ⁺ CD4⁺ Zellen bei den antikörperbehandelten RAG^{ko/ko} Mäusen leicht reduziert im Vergleich zu den RAG^{ko/ko} Mäusen.

Insgesamt lässt sich also für die Transferkolitis wie schon bei der DSS-Kolitis mit BL/6 Mäusen eine Verbesserung bei der Gewichtsabnahme und beim Zytokinstatus feststellen. Allerdings führt die Antikörperbehandlung zu keinem signifikanten Unterschied in dem wichtigsten Parameter für das Ausmaß der Kolitis, der histologischen Analyse.



Figur 3.28: Transferkolitis in RAG^{ko/ko} bzw. RAG^{ko/ko}IL-18^{ko/ko} Mäusen. RAG^{ko/ko} (RAG; N=15), RAG^{ko/ko}IL-18^{ko/ko} (RAG/IL18ko; N=6) sowie RAG^{ko/ko}, die zusätzlich mit dem anti-IL-18 Mab SK113AE-4 behandelt wurden (RAG+ α -IL-18; N=10) wurden mit 3×10^5 ConA aktivierten T-Zellen transfertiert. a) Endgewicht der Mäuse in % Ausgangsgewicht b) histologischer Score der Mäusedärme c) Intrazelluläre Färbung der CD4⁺ mLN und der LPLs für IFN- γ und TNF- α .

3.2.3 Die Rolle von Interleukin-18 bei der Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes*

Neben ihrer Bedeutung als humanpathogenes Bakterium zählen Listerien auch zu den klassischen Modellorganismen, um grundlegende Aspekte der angeborenen und erworbenen Immunantwort im Mausmodell zu studieren (Finelli and Pamer, 2000; Harty et al., 2000; North et al., 1997; Pfeffer et al., 1993; Unanue, 1997b; Unanue, 1997c). Nach der Infektion, die bei der experimentellen Listeriose im Normalfall über die Schwanzvene der Maus erfolgt, werden die Listerien von Makrophagen in der Leber (Kupffer Zellen) und Milz aufgenommen. In der Leber wird zwar der Großteil der Bakterien von den Makrophagen getötet, einige können jedoch überleben, in den Makrophagen weiter wachsen und schließlich auch Hepatozyten infizieren. Die Aktivierung von Mechanismen der angeborenen Immunantwort spielt in der Frühphase der Infektion eine entscheidende Rolle bei der Abwehr der Listerien.

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, wie sich der Verlust von IL-18, auch hier wieder durch die Verwendung von IL-18-defizienten Mäusen sowie des IL-18-neutralisierenden Antikörpers SK113AE-4, auf eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* auswirkt.

In vitro Stimulation mit Hitze-inaktivierten *Listeria monocytogenes* (HKL)

Um eine erste Aussage über eine Auswirkung der IL-18-Blockade im Listerienmodell treffen zu können, wurden Makrophagen mit Hitze-inaktivierten Listerien *in vitro* stimuliert und die Produktion von IFN- γ , NO und IL-12 gemessen (Abbildung 3.29). Dazu wurden Makrophagen aus Wildtyp BL/6 Mäusen oder IL-18^{ko/ko} Mäusen verwendet, sowie Wildtyp Makrophagen zusätzlich mit anti-IL-18 oder anti-IL-12 Antikörpern inkubiert.

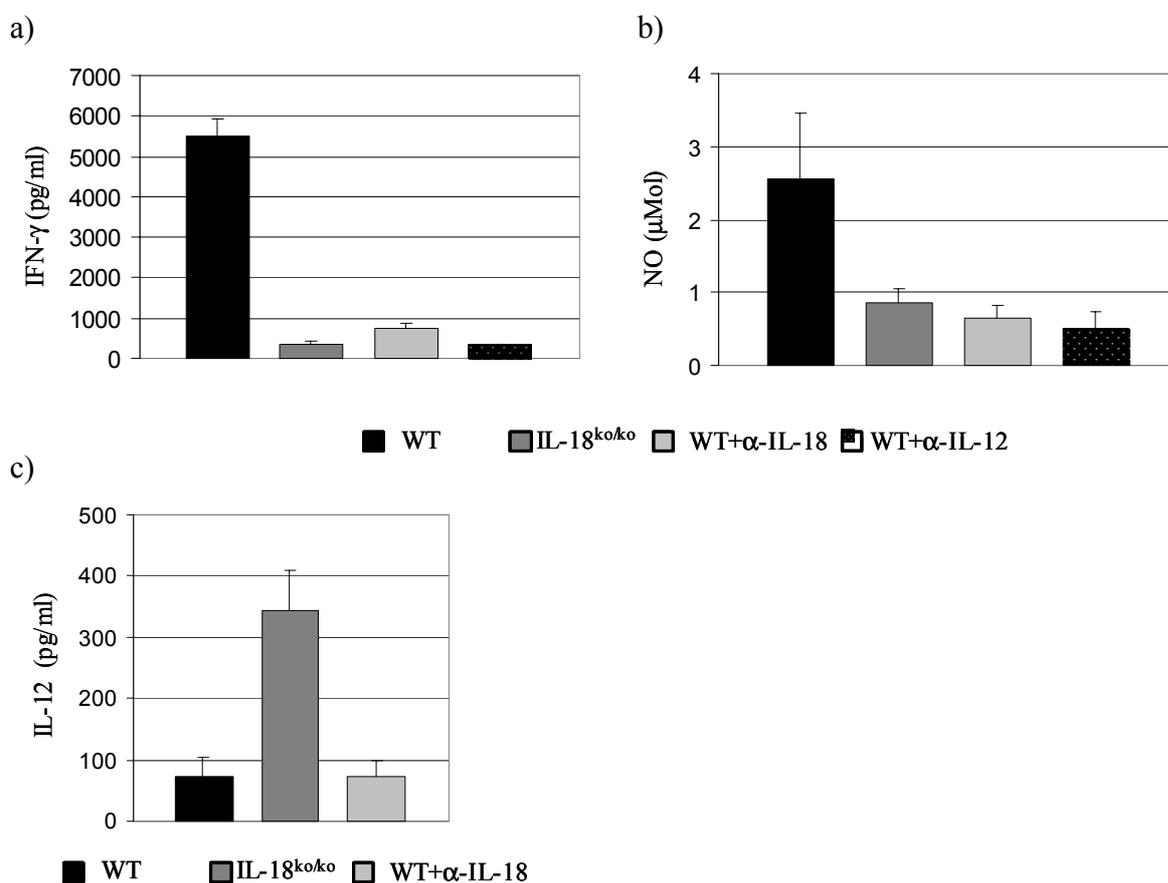


Abbildung 3.29: *In vitro* Stimulation von Makrophagen mit HKL. 3×10^5 WT oder IL-18ko/ko Makrophagen wurden mit 1×10^7 HKL für 24 Stunden *in vitro* stimuliert. Anti-IL-18- oder anti-IL-12 Antikörper wurden in einer Konzentration von 25μ g/ml zugegeben. Die Konzentrationen für IFN- γ , IL-12 und NO wurden im Überstand gemessen.

Während WT-Makrophagen nach Stimulation mit HKL große Mengen IFN- γ freisetzen, produzieren IL-18-defiziente Makrophagen nur geringe Mengen. Eine vergleichbare Inhibierung der IFN- γ Produktion lässt sich auch durch die Zugabe von anti-IL-18 oder anti-IL-12 Antikörpern

erreichen (Abbildung 3.29a). Eine Inhibierung lässt sich auch bei der Produktion von NO beobachten. Zwar produzieren WT-Makrophagen nach in vitro Stimulation mit HKL nur relativ kleine Mengen an NO (2-3 μ M). Durch Zugabe von anti-IL-18 oder anti-IL-12 Antikörpern und auch bei den IL-18^{ko/ko} Makrophagen ist der gemessene NO-Wert aber noch einmal deutlich geringer (Abbildung 3.29b).

Die IL-12 Produktion fällt bei den WT-Makrophagen eher gering aus. Dafür setzen die IL-18^{ko/ko} Makrophagen große Mengen an IL-12 frei, allerdings nicht die anti-IL-18 behandelten WT-Makrophagen (Abbildung 3.29c). Möglicherweise war die in diesem Experiment verwendete Antikörperkonzentration zu gering, um einen Effekt auf die IL-12 Produktion zu zeigen.

Während sich wie erwartet die Produktion von IFN- γ und auch NO durch die Inhibierung von IL-18 verringern lässt, scheint es aber auch in diesem System einen kompensatorischen Mechanismus zu geben, der zu einer erhöhten IL-12 Produktion bei Inhibierung von IL-18 führt.

Infektion mit L. monocytogenes im Mausmodell

Um die Auswirkungen der Blockade von IL-18 im Infektionsmodell mit *L. monocytogenes* möglichst umfassend zu untersuchen, wurde wie in Abbildung 3.30 gezeigt vorgegangen.

Es wurden zunächst Mäuse mit unterschiedlichen infektiösen Einheiten an *L. monocytogenes* i.v. infiziert. Nach der Infektion werden die Listerien als erstes von Makrophagen in Leber und Milz aufgenommen. An Tag 3 nach der Infektion lassen sich im Allgemeinen die höchsten Bakterientiter in diesen Organen nachweisen. Der Bakterientiter kann zu diesem Zeitpunkt als ein guter Parameter für die Effektivität der angeborenen Immunantwort genommen werden. Neben den Makrophagen werden in der Leber auch Hepatozyten von den Listerien infiziert, was zu Ausbildung von sog. infektiösen Foci in der Leber führt. Es kommt daraufhin zur Einwanderung von Neutrophilen und weiterer Makrophagen und schließlich zur Granulom-Bildung. Diese lassen sich histologisch nachweisen und ihre Anzahl kann als weiterer Parameter für die Effektivität der frühen Immunantwort gesehen werden (Portnoy et al., 2002).

Bei der T-Zell vermittelten Immunantwort gegen Listerien spielen zytotoxische CD8⁺ T-Zellen die wichtigste Rolle. Diese T-Zell Antwort entwickelt sich zwischen Tag 4 und 6 nach Infektion und sorgt für die vollkommene Überwindung der Listerieninfektion bei sublethalen Dosen. Da für IL-18 auch ein wichtiger Einfluss auf die Ausbildung der T-Zell vermittelten Immunantwort bei Listerieninfektionen vorgeschlagen wurde (Neighbors et al., 2001), wurde in dieser Arbeit auch die Auswirkung der IL-18-Blockade auf die Entwicklung der antigenspezifischen T-Zell Antwort untersucht.

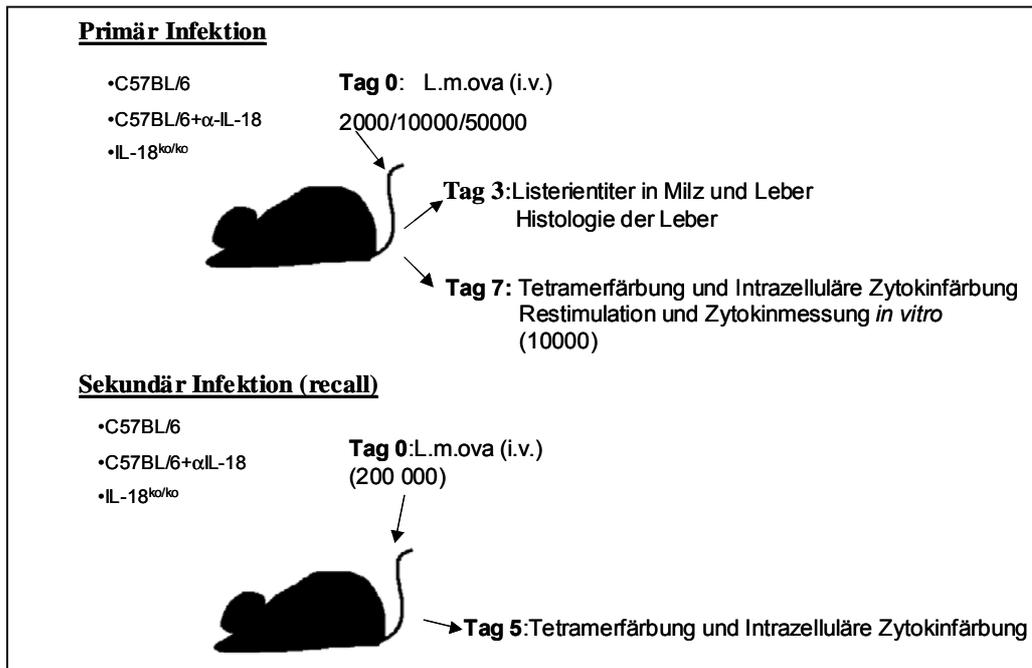


Abbildung 3.30: Versuchsdurchführung bei der Infektion mit *L. monocytogenes*

Listerientiter in Milz und Leber

Wie in Abbildung 3.30 gezeigt, wurden BL/6 Wildtypmäuse, IL-18^{ko/ko} Mäuse und mit anti-IL-18 Antikörper behandelte WT-Mäuse mit drei verschiedenen, sublethalen Dosen Listerien infiziert (2000/10000/50000). Um später die Anzahl der spezifischen CD8⁺ T-Zellen bestimmen zu können (siehe unten), wurde von Anfang an mit dem Ovalbumin sekretierenden, rekombinanten Listerien-Stamm *L. monocytogenes*-ova (L.m.ova) gearbeitet (Pope et al., 2001).

Am Tag 3 nach Infektion wurden den Mäusen Milz und Leber entnommen und die Anzahl der lebenden Listerien bestimmt. Während bei der Infektion mit 2000 Listerien keine großen Unterschiede im Listerientiter zu erkennen sind, zeigt sich bei den höheren Dosen (10000 und 50000) ein deutlich geringerer bakterieller Titer bei den IL-18^{ko/ko} Mäusen in Milz und Leber (Abbildung 3.31a). Da sich dieser Effekt bei den antikörperbehandelten Mäusen nicht zeigte, wurde der Versuch wiederholt, diesmal mit einer höheren anti-IL-18 Dosis (2 x 1mg statt 2 x 0,5mg) und einer Infektion mit 50000 Listerien. Wie in Abbildung 3.31b gezeigt, konnte der in Abbildung 3.31a für die IL-18^{ko/ko} Mäuse beobachtete Effekt diesmal auch bei den antikörperbehandelten Mäusen nachgewiesen werden. Die Blockade von IL-18 führt also nicht zu einer höheren Anfälligkeit gegenüber einer Infektion mit Listerien, sondern -zumindest bei höheren Listerien-Dosen- zu einer verstärkten Resistenz.

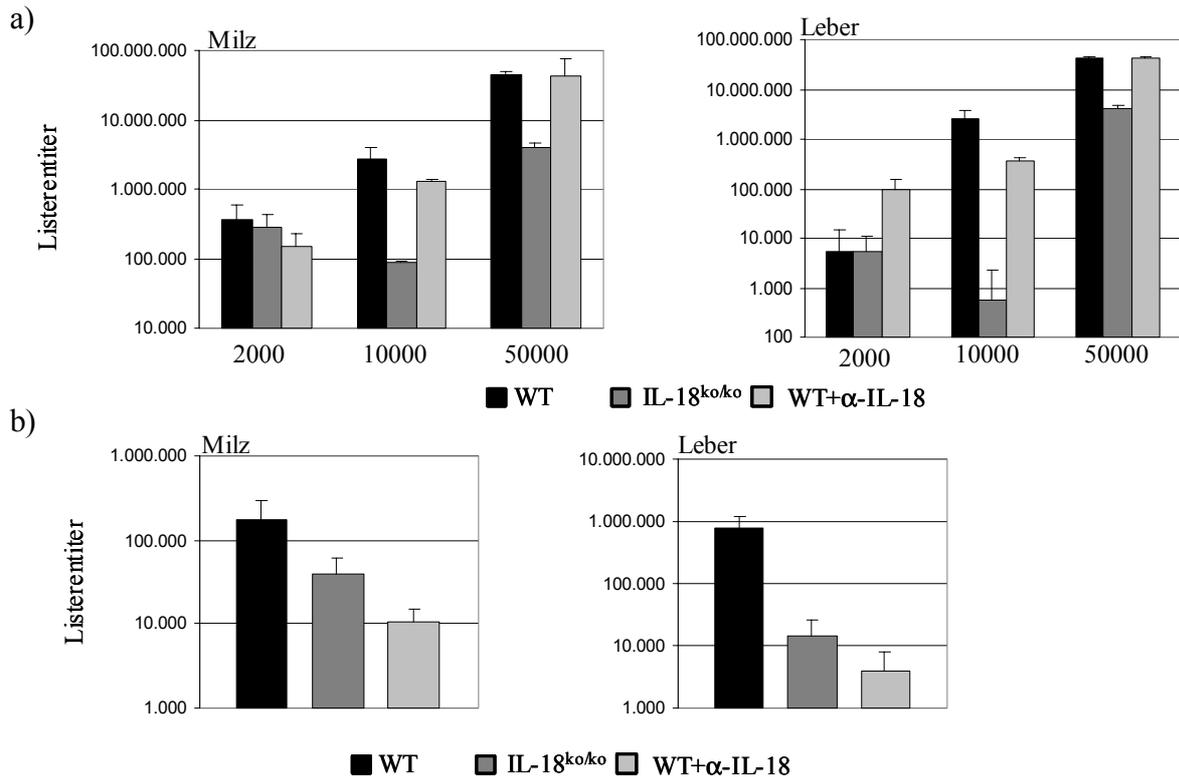


Abbildung 3.31: Listerientiter in Milz und Leber: WT-, IL-18^{ko/ko}- und antikörperbehandelte Mäuse (jeweils 3 Tiere) wurden mit verschiedenen Listeriendosen infiziert und der bakterielle Titer in Milz und Leber an Tag 3 nach der Infektion ermittelt a) Infektion mit 2000, 10000 und 50000 Listerien i.v. Antikörperbehandlung an Tag -1 und 2 (je 0,5mg SK113AE-4 i.p.) b). Infektion mit 50000 Listerien i.v. Antikörperbehandlung an Tag -1 und 2 (je 1mg SK113AE-4 i.p.).

Infektiöse Foci in der Leber

Um die Anzahl der Granulome/Infektiösen Focis in der Leber zu bestimmen, wurden mit 50000 Listerien infizierte WT- und IL-18^{ko/ko} Mäusen an Tag 3 die Leber entnommen, Gefrierschnitte angefertigt und diese immunhistochemisch mit einem Marker für Neutrophile Granulozyten gefärbt. Wie in Abbildung 3.32 zu sehen, weisen die WT-Mäuse eine deutlich höhere Anzahl an Infektiösen Foci (rote Färbung) auf als die IL-18^{ko/ko} Mäuse. Zusammen mit den Ergebnissen bei den Listerientitern wird der Eindruck hier noch einmal verstärkt, dass die IL-18-Defizienz zu einer erhöhten Resistenz gegenüber einer Infektion mit *L. monocytogenes* führt.

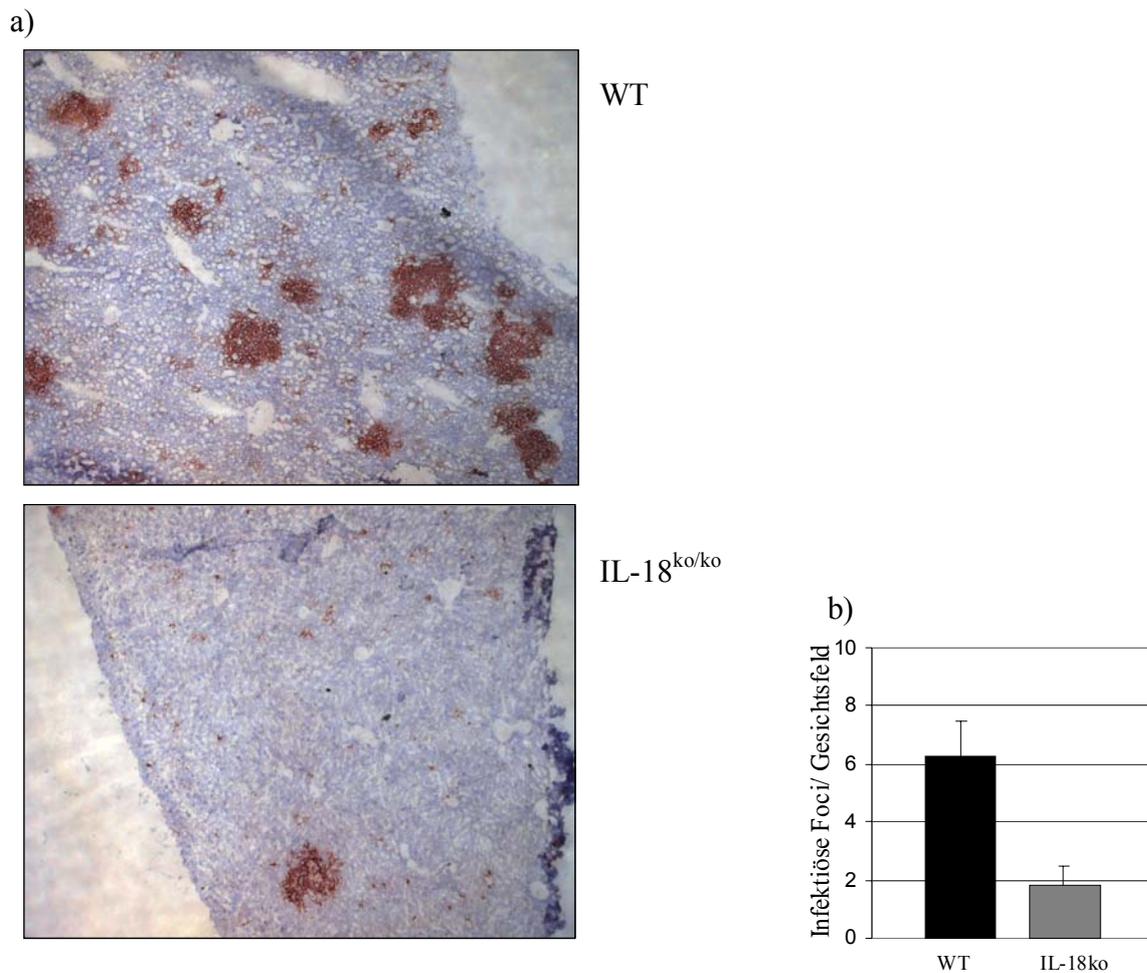


Abbildung 3.32: Infektiöse Foci in der Leber. WT- und IL-18^{ko/ko} Mäuse wurden mit 50000 Listerien i.v. infiziert. Am Tag 3 nach der Infektion wurde die Leber entnommen und Gefrierschnitte angefertigt. a) Immunhistochemische Färbung mit einem Marker für Neutrophile. b) Anzahl der Infektiösen Foci pro Gesichtsfeld (Mittelwert aus 5 Gesichtsfeldern pro Maus).

Zytokinproduktion nach Restimulation der Milzzellen mit HKL

Am Tag 7 nach der Listerieninfektion wurde den Mäusen, die mit 10000 Listerien infiziert wurden, die Milz entnommen. Um einen Überblick über die Zytokinproduktion in der Milz der Tiere zu gewinnen, wurde ein Teil der Milzzellen *in vitro* mit HKL restimuliert und die Zytokin-Konzentrationen nach 30 Stunden im Überstand gemessen.

Die aus den infizierten WT-Mäusen gewonnenen Milzzellen produzieren nach Restimulation mit HKL große Mengen an IFN- γ , IL-12 und TNF- α . Dagegen fällt die Produktion aller drei Zytokine bei den Milzzellen, die aus den infizierten IL-18^{ko/ko} und den antikörperbehandelten Mäusen gewonnen wurden vor allem bei den antikörperbehandelten Mäusen (TNF- α und IL-12) deutlich geringer aus (Abbildung 3.32).

Wie erwartet äußert sich hier die IL-18-Blockade in einer verringerten IFN- γ Produktion. Die verminderte IL-12 und TNF- α Konzentration können durch die verminderte Stimulation von Makrophagen und DC durch IFN- γ erklärt werden. Der bei der LPS- und HKL-Stimulation beobachtete Effekt der erhöhten IL-12 Produktion bei IL-18-Blockade zeigt sich bei diesem Experiment nicht. Obwohl sich die Zytokinkonzentrationen der drei proinflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-12 und TNF- α in dieser Restimulation durch IL-18-Blockade verringern lassen und so die beschriebenen Effekte von IL-18 bestätigen, lässt sich damit die verstärkte Resistenz gegen die Listerieninfektion (Listerientiter und infektiöse Foci an Tag 3) nicht erklären.

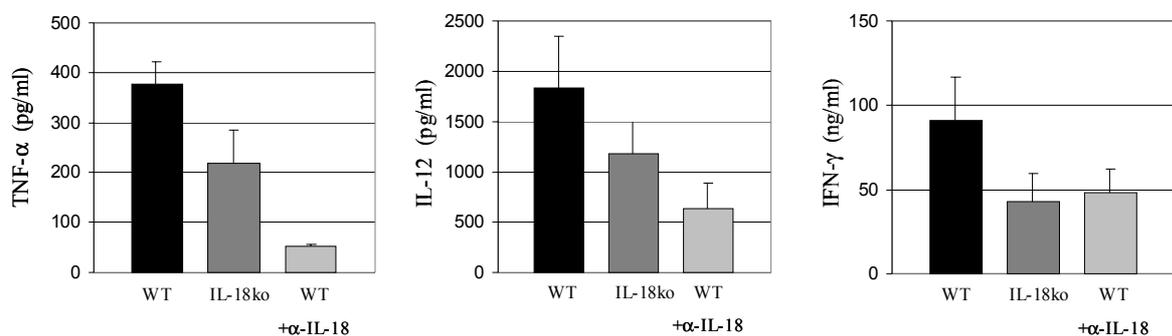


Abbildung 3.33: Restimulation der Milzzellen mit HKL: 5×10^6 Milzzellen aus mit 10000 Listerien infizierten WT-, IL-18^{ko/ko}- und antikörperbehandelten Mäusen (2x 1mg SK113AE-4) wurden mit 5×10^7 HKL *in vitro* für 30 Stunden inkubiert. Die Zytokinkonzentrationen für IFN- γ , IL-12 und TNF- α wurden im Überstand mittels ELISA gemessen.

Spezifische T-Zell Antwort an Tag 7 nach der Primärinfektion mit *L.m.ova*

Wie oben bereits beschrieben, war es ein Ziel dieser Arbeit den Einfluss der IL-18-Blockade auf die Entwicklung der spezifischen T-Zell Antwort nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* zu untersuchen. Um spezifische CD8⁺ T-Zellen detektieren zu können, wurde hier die Tetramertechnik benutzt (Busch et al., 1998). Dazu verwendet man das MHC-I-Molekül, den natürlichen Liganden des T-Zell Rezeptors auf CD8⁺ T-Zellen. β_2 -Mikroglobulin und die schwere Kette des MHC-I-Moleküls werden rekombinant in Bakterien exprimiert und anschließend *in vitro* in Anwesenheit großer Mengen eines spezifischen Peptides (Epitop) in ihre native Form zurückgefaltet. Nach Biotinylierung des C-Terminus der schweren Kette können über (PE)-konjugiertes Streptavidin vier der MHC-I-Moleküle zu MHC-Tetrameren zusammengefügt werden. Da bis jetzt noch keine immundominanten natürlichen Listerien-Epitope für Mäuse mit dem MHC-I Allotyp H-2K^b identifiziert werden konnten, wurde hier der Ovalbumin sekretierende Listerien Stamm *L.m.ova* benutzt. Damit war es möglich, die systemische CD8⁺ T-Zell Antwort mit Hilfe von H-2K^b-Ova-Peptid (SIINFEKL) Tetrameren zu untersuchen.

Dazu wurde Mäusen am Tag 7 nach der Infektion mit 10000 L.m.ova die Milz entnommen, die Milzzellen mit Tetramer gefärbt und am FACS analysiert. Zur Auswertung wurde der Anteil der spezifischen, Tetramer-positiven CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 3.34a links) gemessen und daraufhin die Gesamtzahl der Tetramer-positiven CD8⁺ T-Zellen in der Milz der Mäuse berechnet (Abbildung 3.34a rechts). Es zeigt sich, dass ca. 1% aller Lymphozyten in der Milz der infizierten Mäuse antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen sind. Bei den Wildtypmäusen lassen sich insgesamt etwas mehr spezifische CD8⁺ T-Zellen nachweisen als bei den IL-18^{ko/ko} und antikörperbehandelten Mäusen.

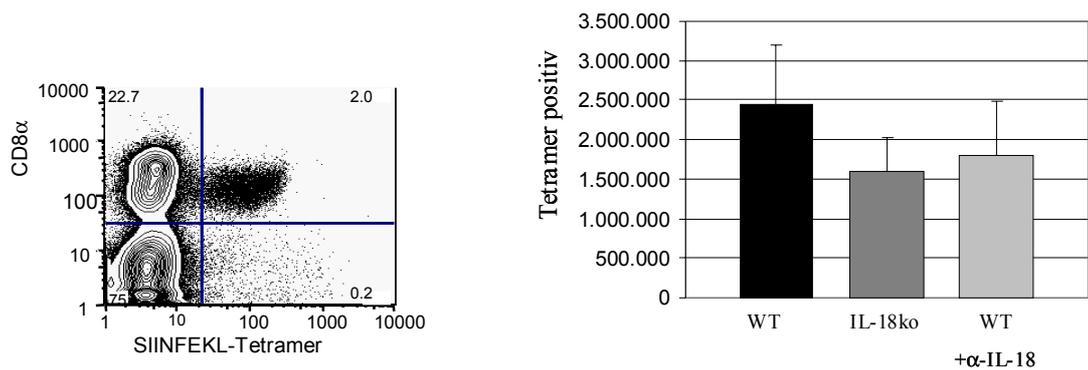
Zusätzlich zur Anzahl der spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde auch die Anzahl der IFN- γ und TNF- α sekretierenden T-Zellen bestimmt. Dazu wurde ein Teil der Milzzellen *in vitro* mit dem SIINFEKL-Peptid (für die CD8⁺ T-Zellen) oder dem MHC-II restringierten Listerien-Peptid LLO₁₉₀₋₂₀₁ (für die CD4⁺ T-Zellen) restimuliert. Anschließend wurden die Zellen intrazellulär für IFN- γ und TNF- α gefärbt und am FACS analysiert. Der Anteil der IFN- γ bzw. TNF- α -positiven CD8⁺ (SIINFEKL Restimulation) und CD4⁺ (LLO₁₉₀₋₂₀₁ Restimulation) T-Zellen wurde bestimmt (Abbildung 3.34b unten) und die Gesamtzahl der positiven Zellen in der Milz der Mäuse berechnet (Abbildung 3.34b oben).

Allgemein lässt sich zunächst feststellen, dass es deutlich mehr IFN- γ /TNF- α -positive CD8⁺ T-Zellen als IFN- γ /TNF- α -positive CD4⁺ T-Zellen gibt. Außerdem ist die Anzahl der IFN- γ -positiven CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen etwas höher als die der TNF- α -positiven.

Ähnlich wie bei den spezifischen, Tetramer-positiven CD8⁺ T-Zellen lässt sich auch bei der Anzahl der IFN- γ /TNF- α produzierenden T-Zellen eine leichte Reduktion bei den IL-18^{ko/ko} und den antikörperbehandelten Mäusen feststellen.

In der Tendenz lässt sich also durchaus eine leichte Reduktion sowohl der antigenspezifischen, Tetramer-positiven CD8⁺ T-Zellen als auch der IFN- γ - und TNF- α -positiven CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen bei einer Blockade von IL-18 feststellen. Allerdings ist es fraglich, ob diese leichte Reduktion eine Auswirkung auf Effektivität der Immunantwort gegen die Listerien hat. An Tag 7 ließen sich jedenfalls bei den Tieren aller drei Gruppen keine Listerien mehr in Milz oder Leber nachweisen.

a)



b)

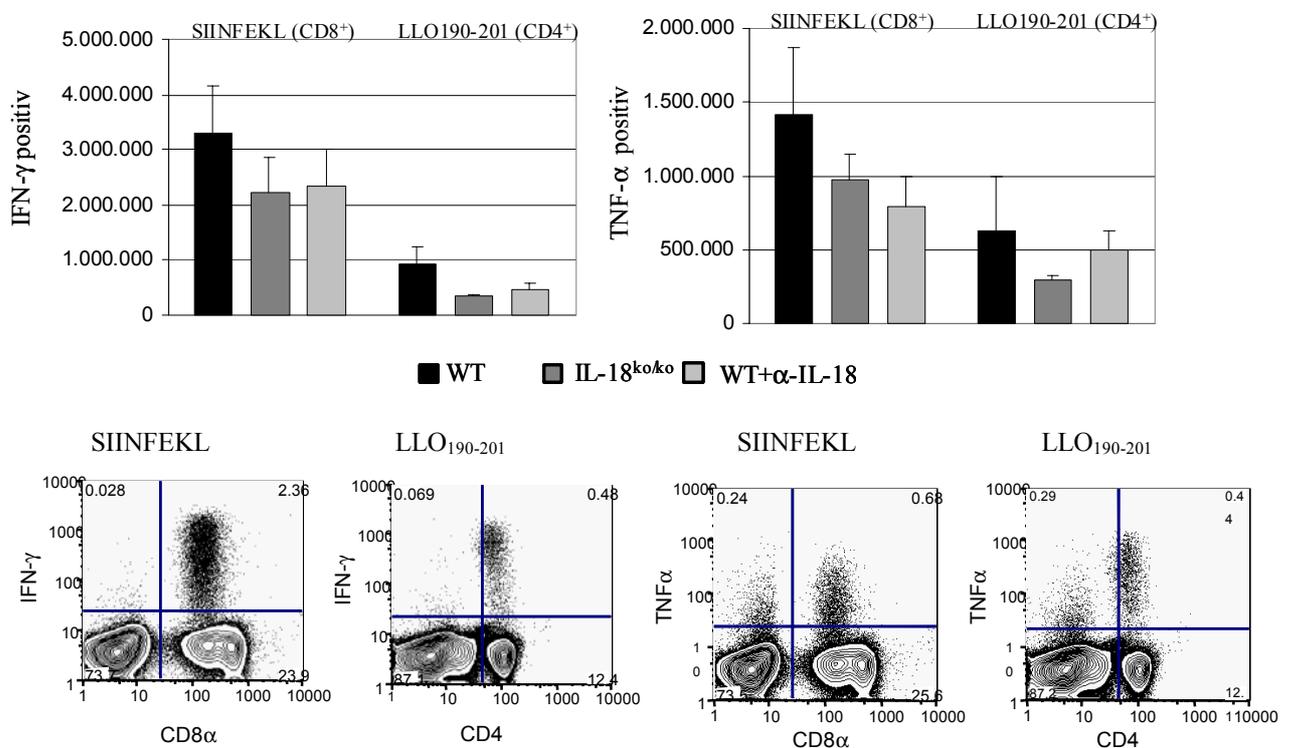


Abbildung 3.34: spezifische T-Zell Antwort an Tag 7 nach Primärinfektion mit *L.m.ova*. WT- und IL-18^{ko/ko} und antikörperbehandelte Mäuse (3x 1mg SK113AE-4) wurden mit 10000 Listerien i.v. infiziert (je 2 Tiere pro Gruppe). Am Tag 7 nach der Infektion wurde die Milz entnommen. a) Färbung der Milzzellen mit SIINFEKL-Tetramer und Gesamtzahl der antigenspezifischen, Tetramer-positiven T-Zellen in der Milz. b) Intrazelluläre IFN- γ und TNF- α Färbung nach Restimulation der Milzzellen mit SIINFEKL Peptid oder LLO₁₉₀₋₂₀₁; Gesamtzahl der IFN- γ bzw. TNF- α positiven T-Zellen in der Milz.

Spezifische T-Zell Antwort an Tag 5 nach Sekundärinfektion mit *L.m.ova*

Um den Einfluss von IL-18 auf die Gedächtnis-Antwort (memory response; recall) zu testen, wurden Mäuse, die primär mit 2000 Listerien infiziert wurden 3 Wochen nach der Primärinfektion mit 200000 Listerien reinfiziert. 5 Tage nach der Sekundärinfektion wurde die spezifische T-Zell Antwort untersucht (siehe auch Abbildung 3.30).

Insgesamt lassen sich nach der Sekundärinfektion ca. 10-mal mehr spezifische, Tetramer-positive $CD8^+$ T-Zellen detektieren als nach der Primärinfektion (Abbildung 3.35a). Während deutlich mehr $IFN-\gamma^+CD8^+$ T-Zellen als bei der Primärinfektion zu finden sind, sind die Unterschiede bei den $IFN-\gamma^+CD4^+$ und den $TNF-\alpha^+ CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im Vergleich zur Primärinfektion eher gering. Es lassen sich hier auch keine Unterschiede zwischen den Mausgruppen erkennen. Die Anzahl an spezifischen T-Zellen und $IFN-\gamma$ - oder $TNF-\alpha$ -positiven T-Zellen ist bei allen drei Gruppen ungefähr gleich (Abbildung 3.35b). Alle drei Gruppen haben auch keine Probleme die Infektion zu überwinden, an Tag 5 nach der Reinfektion lassen sich bei keiner Maus mehr lebende Listerien in Milz oder Leber nachweisen.

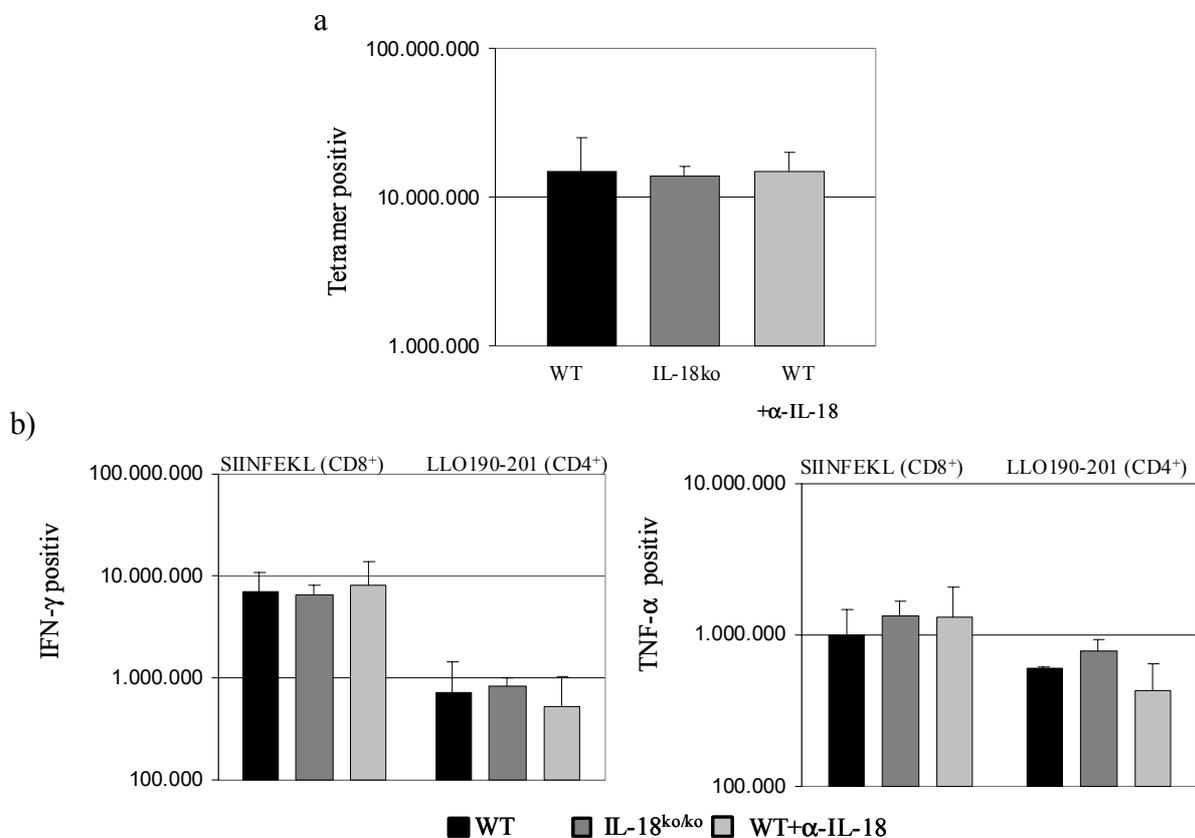


Abbildung 3.35: Spezifische T-Zell Antwort an Tag 5 nach Sekundärinfektion (recall) mit *L.m.ova*. WT- und IL-18^{ko/ko} und antikörperbehandelte Mäuse (insgesamt 4x 1mg SK113AE-4) wurden primär mit 2000 Listerien i.v. infiziert. 3 Wochen später wurden dieselben Mäuse mit 2000000 Listerien i.v. reinfiziert. Am Tag 5 nach der Infektion wurde die Milz entnommen. a) Färbung der Milzzellen mit SIINFEKL-Tetramer und Gesamtzahl der antigenspezifischen, Tetramer-positiven T-Zellen in der Milz. b) Intrazelluläre IFN- γ und TNF- α Färbung nach Restimulation der Milzzellen mit SIINFEKL Peptid oder LLO₁₉₀₋₂₀₁; Gesamtzahl der IFN- γ bzw. TNF- α -positiven T-Zellen in der Milz.

4. Diskussion

4.1 Charakterisierung der murinen A21/D2 Sequenz

4.1.1 Genomische Lokalisation von A21/D2

Ausgehend von der A21/D2 cDNS wurde in dieser Arbeit zunächst die genomische Sequenz der ersten drei Exons des A21/D2-Gens ermittelt. Dazu wurden drei unterschiedliche BAC-Klone mittels Southernblot Analyse untersucht und teilweise sequenziert (Kapitel 3.1.3). Der Vergleich der cDNS und der ermittelten genomischen DNS-Sequenz mit der NCBI Maus-Sequenz Datenbank (NCBI 32 assembl) ergab eine 99%ige Übereinstimmung mit einem Sequenzbereich auf dem Chromosom 16 (Bande 16B4). Durch den Vergleich der cDNS mit der genomischen Datenbank war es weiterhin möglich, die genomische Organisation des gesamten A21/D2 Gens zu bestimmen. Wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, besteht das A21/D2 Gen aus 10 Exons und erstreckt sich über einen Bereich von ca. 35 kb.

In dieser genomischen Region von Chromosom 16 lassen sich in unmittelbarer Nachbarschaft von A21/D2 einige immunologisch relevante Gene finden. Ungefähr 65kb stromaufwärts bzw. ca. 45kb stromabwärts des A21/D2 Genlokus befinden sich die Gene für den Ox2 Rezeptor bzw. des Ox2 Gens (CD200). Bei Ox2 und seinem Rezeptor Ox2R handelt es sich um Glykoproteine der Immunglobulin-Superfamilie. Während Ox2 ein relativ breites Expressionsmuster aufweist (T- und B-Zellen, Thymozyten, Neuronen und Endothelzellen), ist die Expression des Ox2 Rezeptors auf Makrophagen und dendritische Zellen beschränkt. Die Interaktion zwischen Ox2 und seinem Rezeptor auf myeloiden Zellen führt zur Weiterleitung von inhibitorischen Signalen und ist somit Teil des immunregulatorischen Netzwerkes (Barclay et al., 2002).

Ein weiteres Gen in genomischer Nachbarschaft von A21/D2 ist BTLA (B and T lymphocyte Attenuator). BTLA gehört ebenfalls zur Immunglobulin-Superfamilie und wird auf der Oberfläche von T- und B-Zellen ausgeprägt. Aktivierung von BTLA durch seinen Liganden B7x (B7-Familie) führt zur einer verminderten T-Zell Aktivierung (Carreno and Collins, 2003).

Die Nähe dieser immunologisch relevanten Gene zu A21/D2 könnte ein Hinweis auf eine immunologische Funktion oder eine gemeinsame Regulation dieser Gene sein (wie z.B. für die IL-4 Familie beschrieben (Lavender et al., 2000; Lee et al., 2001)). Allerdings finden sich in der gleichen genomischen Region (1 Mb) noch ca. 10 weitere, bislang unbeschriebene Gene. Zusammen mit der Tatsache, dass sich die Ox2 und BTLA Genen in ihrem Expressionsmuster

stark unterscheiden, erscheint eine funktionelle oder regulatorische Beziehung zu A21/D2 zu diesem Zeitpunkt damit eher unwahrscheinlich.

4.1.2 Homologien von A21/D2 zu anderen DNS- und Proteinsequenzen

Bei der Suche nach homologen Sequenzen mit Hilfe des BLAST Programms (Altschul et al., 1990) konnte zunächst eine Ähnlichkeit zwischen der Nukleotidsequenz von A21/D2 und der des Gens SRPX (sushi-repeat-containing protein, X chromosome (Meindl et al., 1995)) festgestellt werden. Das SRPX Gen wird vor allem in der humanen Retina ausgeprägt und fehlt in Patienten mit Retinis Pigmentosa. Dabei zeigten drei Proteindomänen von A21/D2 eine auffällige Homologie (ca. 30% Übereinstimmung) zur sogenannten 'consensus repeat domain' (CRD) von SRPX (Abbildung 4.1). In den Sequenzdatenbanken lassen sich eine ganze Reihe weiterer Proteine mit consensus repeat Domänen finden, die meisten gehören zu Superfamilie der Sushi-Domänen Proteine. Bei den Sushi-Domänen (Ichinose et al., 1990) handelt es sich um homologe Sequenzen, deren Kern ca. 60 Aminosäuren umfasst. Sushi-Domänen wurden zunächst als GP-I Strukturen (Davie et al., 1986) bezeichnet, da sie zuerst in β_2 Mikroglobulin identifiziert wurden (Lozier et al., 1984). Inzwischen werden sie zumeist als 'short consensus repeats' (SCR) oder, wegen ihrer Form, als Sushi-Domänen bezeichnet. Obwohl A21/D2 selbst keine Sushi-Domäne besitzt, ist aufgrund der homologen consensus repeat Domäne eine funktionelle Verwandtschaft zur Sushi-Proteinfamilie denkbar.

Während der Arbeit an diesem Projekt fand sich zu einem späteren Zeitpunkt eine 99%ige Sequenz-Übereinstimmung zu dem neu klonierten Gen Urb (Aoki et al., 2002). Der genaue cDNS- und Proteinsequenzvergleich von A21/D2 und Urb ergaben, das die beiden Gene/Proteine identisch sind. Identifiziert wurde Urb durch seine erhöhte Expression in braunem Fettgewebe von Bombesin Rezeptor Subtyp-3 (BRS-3) defizienten Mausmutanten (Ohki-Hamazaki et al., 1997). BRS-3-defiziente Mäuse entwickeln eine leichte Form des Übergewichts verbunden mit Bluthochdruck und einem beeinträchtigtem Glukose-Stoffwechsel. Aufgrund der erhöhten Expression von Urb/A21/D2 in braunem Fett dieser Mäuse vermuten die Autoren eine Funktion für Urb/A21/D2 bei der Regulation des Körpergewichts und des Energiestoffwechsels. Eine genaue Beschreibung von Urb oder eine funktionelle Analyse wurden bislang nicht publiziert.

Anfang 2004 lassen sich in der Gen-Datenbank (GenBank CDS translations +PDB +SwissProt +PIR +PRF) mittlerweile mehrere zu A21/D2 homologe Sequenzen finden. Unter anderem das humane Urb Protein, das Hühner Equarin-L Protein (Mu et al., 2003) und das 'steroid sensitive gene-1' aus der Ratte (Marcantonio et al., 2001).

Die Hühner Equarin-L cDNS wurde aus einer Hühner-E6 Augenlinsen cDNS-Bibliothek isoliert. *In vivo* konnte die Expression von Equarin-L in der Linse von Hühnerembryos nachgewiesen werden. Da die Mikroinjektion von Equarin mRNA in *Xenopus* Embryos zu einer anormalen Augenentwicklung führte, vermuten Mu et al. eine Rolle für Equarin-L in der Entwicklung der Auges. Die hohe Homologie zwischen Urb/A21/D2 und Equarin-L zeigt sich vor allen in den CRD Bereichen und weniger in den restlichen Domänen. Es ist daher wahrscheinlich, dass Urb/A21/D2 und Equarin-L zur selben Genfamilie gehören, aber funktionell nicht homolog sind.

Das Gen SSG1 (steroid sensitiv gene 1) wurde aus Uterus- und Brustdrüsengewebe von weiblichen Ratten isoliert. Die Nukleotidsequenz von SSG1 zeigt ein ca. 90%ige Übereinstimmung mit der Urb/A21/D2 Sequenz was zu dem Schluss führen könnte, dass es sich bei SSG1 um das Rattenhomolog von Urb/A21/D2 handelt. Allerdings gibt es einige Unterschiede zwischen den Sequenzen von Urb/A21/D2 und SSG1 die zu einem frühen Translationsstopp bei SSG1 führen (Frameshift). Das vorgeschlagene SSG1 Protein hat demnach nur eine Länge von 385 Aminosäuren während Urb/A21/D2 eine Länge von 949 AS aufweist.

Während eine funktionelle Beziehung zwischen Urb/A21/D2 zu Equarin-L unwahrscheinlich und zu SSG1 zu diesem Zeitpunkt zumindest fraglich ist, lassen sich diese Proteine aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit in eine neue Proteinfamilie einordnen. Abbildung 4.1a zeigt einen schematischen Vergleich zwischen A21/D2 und den homologen Proteinen. Abbildung 4.1b zeigt die Sequenzhomologien zwischen den consensus repeat Domänen von A21/D2 und den entsprechenden Domänen von Equarin-L, SRPX (Ratte/Human) und Sushi-repeat Protein (Strausberg et al., 2002)

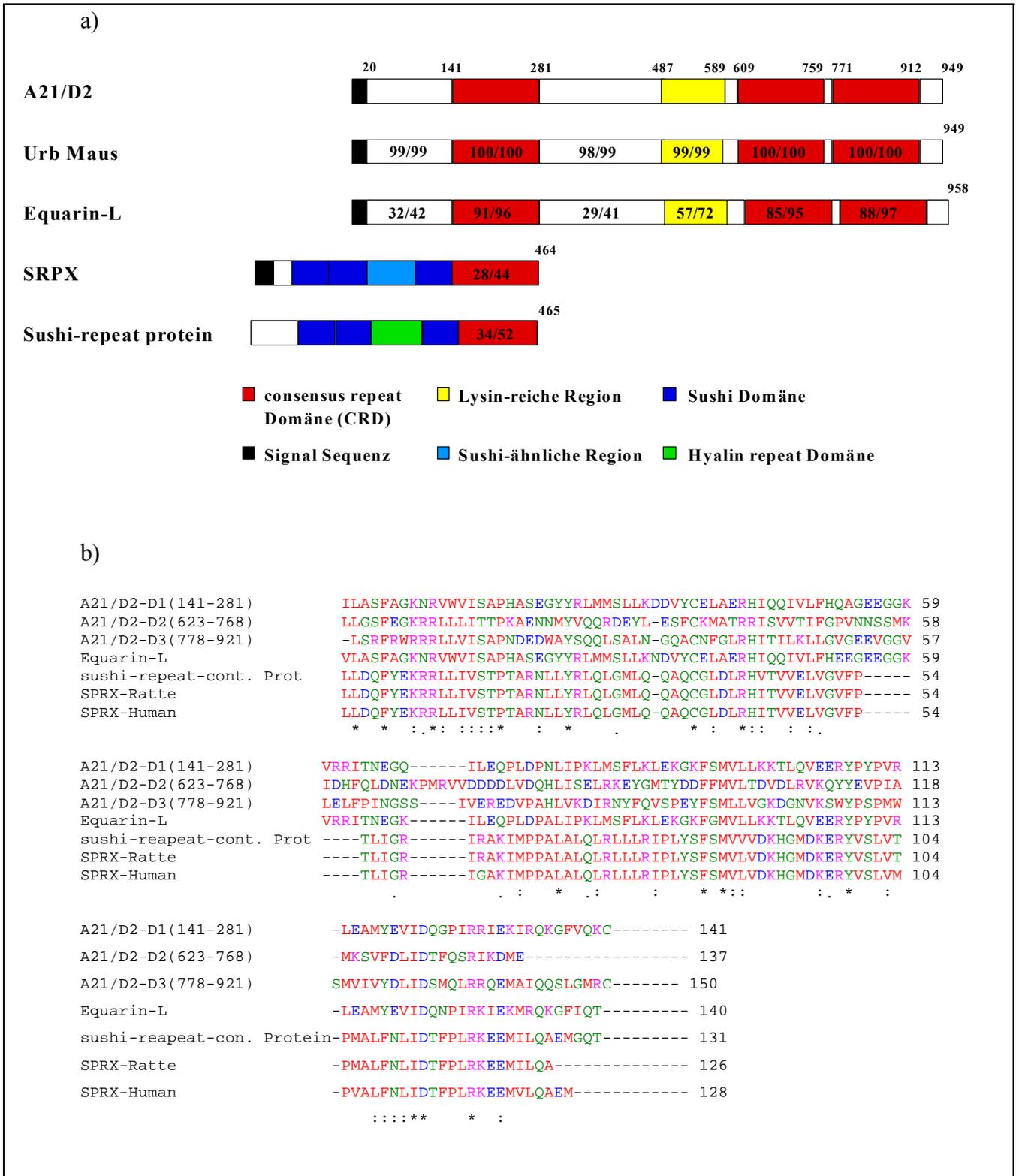


Abbildung 4.1: Sequenzhomologien von A21/D2 zu anderen Proteinen.

a) Schematische Anordnung der Proteindomänen von A21/D2, Maus Urb, Equarin-L, humanem SRPX und humanem Sushi-repeat Protein. Die Werte in den Domänen geben den Prozentsatz der identischen/positiven Aminosäuren im Vergleich zur entsprechenden Domäne von A21/D2 an.

b) Sequenz der drei consensus repeat Domänen von A21/D2 im Vergleich mit den entsprechenden Sequenzen von Equarin-L, Sushi-repeat Protein und SPRX (Ratte/Human). rot= kleine und hydrophobe Reste. blau= saure Reste. violett= basische Reste. grün= hydroxy+amine+basische Reste. grau= alle anderen Reste. '*'= identische Aminosäuren. ':'= konservierte Substitutionen. '.'= semikonservative Substitutionen.

4.2 Generierung von A21/D2-EGFP 'Knock-in' Mäusen

Durch die gezielte Mutagenese von Genen in der Keimbahn können Mäuse mit spezifischen Gendefekten generiert werden. Dies eröffnet die Möglichkeit, wertvolle Einblicke in die *in vivo* Funktion dieser Gene zu erlangen und ermöglicht dadurch ein besseres Verständnis komplexer biologischer Mechanismen (Pfeffer and Mak, 1994). Die Generierung der A21/D2-EGFP Reporter/defizienten Mauslinie erfolgte mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus. Dabei wurden der letzte Abschnitt von Exon2 und das gesamte dritte Exon durch eine EGFP/Neomycin-Genkassette ersetzt und damit über 50% der kodierenden Sequenz deletiert.

Ein besonderes Problem bei der Planung der Knock-in Strategie ergab sich aus der Möglichkeit des differentiellen Spleißens des A21/D2 Transkripts. Wie in Kapitel 3.1.3 dargelegt, beginnt die Translation des 949 Aminosäuren langen Proteins von dem ersten ATG im dritten Exon aus. Die Translation dieses langen Proteins würde ein komplettes, alle 10 Exons enthaltendes mRNA Transkript voraussetzen. Die Ergebnisse des Northernblots legen nahe, dass in den untersuchten Organen vor allem dieses komplette mRNA Transkript gebildet wird. Damit ist es wahrscheinlich, dass hauptsächlich die 949 Aminosäuren lange Proteinvariante generiert wird. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass nach herauspleißen des dritten Exons und Translationsstart vom letzten ATG in Exon2 ein verkürztes, 327 Aminosäuren langes Proteins gebildet wird. Der Nachweis eines entsprechenden 1,8 kb langen Transkripts bei der Northernblot Analyse von mRNA aus GM-CSF DCs könnte darauf hinweisen, dass diese kurze Proteinvariante tatsächlich gebildet wird.

Um die Expression des A21/D2 Gens mit dem EGFP-Reporter möglichst genau untersuchen zu können ist es sinnvoll, die EGFP-Genkassette so in den A21/D2 Genloкус zu legen, dass die EGFP-Expression komplett vom endogenen A21/D2 Promotor reguliert wird. Zunächst erschien es sinnvoll, die EGFP-Genkassette direkt hinter das erste ATG im dritten Exon zu legen und damit die Expression des 949 AS langen A21/D2 Proteins durch die EGFP Expression auszutauschen. Allerdings könnte das dritte Exon, wie bereits dargelegt, herausgespleißt werden. In einem solchen Ansatz wären die Mäuse also immer noch in der Lage, die kurze Proteinvariante zu bilden. In diesem Fall wäre eine komplette Deletion des A21/D2 Gens nicht gegeben und damit die homozygoten A21/D2-EGFP Mäuse nicht komplett defizient für A21/D2.

Um dieses Problem zu umgehen wurde die EGFP-Genkassette direkt hinter das letzte ATG des zweiten Exon gelegt (Abbildung 3.11). Damit konnte ein differentielles herauspleißen des dritten

Exons (das nicht mehr vorhanden ist) und die Bildung sowohl der langen, als auch der kurzen A21/D2 Proteinvariante ausgeschlossen werden.

Bei diesem Ansatz kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Deletion des Introns zwischen zweiten und dritten Exon auch Promotor- oder Enhancer-Regionen, die für die Translation der langen A21/D2 Proteinvariante wichtig sind mit deletiert wurden. Wäre dies der Fall, könnte mit dem EGFP-Reporter vermutlich nur ein Teil des endogenen A21/D2 Expressionsmuster wiedergegeben werden.

Nach der homologen Rekombination der embryonalen Stammzellen mit dem A21/D2-EGFP Rekombinationsvektor konnten zwei unabhängige ES-Zell-Klone mit korrekt rekombiniertem A21/D2 Locus identifiziert werden (Kapitel 3.1.4). Mit Hilfe dieser beiden ES-Zell-Klone konnten mittels Blastozysteninjektion und Transfer in Ammenmütter zwei Mauslinien mit der gewünschten A21/D2-EGFP Mutation generiert werden (Kapitel 3.1.4).

Zunächst konnte bei der ersten Analyse von A21/D2-EGFP Mäusen keine grün-fluoreszierenden Zellen detektiert werden. Mit der Cre vermittelten *in vitro* Deletion der loxP flankierten Neomycin-Genkassette konnte ein möglicher negativer Einfluss der Neomycinkassette auf die EGFP Expression untersucht werden. Möglich wurde diese *in vitro* Deletion der Neomycin Genkassette in GM-CSF DCs durch Protein Transduktion mit dem TAT-NLS-Cre Protein. Bei der Protein-Transduktion handelt es sich um eine kürzlich entwickelte Methode zur direkten Transduktion von Säugerzellen mit biologisch aktiven Proteinen mit hoher Effizienz (Hawiger, 1999). Mit rekombinanter Proteintechnik konnten durch die Einführung von sogenannten Protein Transduktions Domänen (PTDs) die biophysikalischen Eigenschaften von Proteinen hinsichtlich ihrer Zellpermeabilität verändert werden (Nagahara et al., 1998). So konnte gezeigt werden, dass ein basisches, 11 AS langes Peptid des HIV-TAT Proteins β -Galactosidase in eine zellpermeable Form bringen kann (Schwarze et al., 1999). Peitz et al. konnten zeigen, dass ein Fusionsprotein aus dem TAT Peptid, der Kernlokalisationssequenz (NLS) und der Cre Rekombinase Zellpermeabilität besitzt und *in vitro* die Rekombination von genomischen loxP flankierten Sequenzen auslösen kann (Peitz et al., 2002). Dabei lag die Rekombinationseffizienz bei mehr als 95% in Fibroblasten und ES-Zellen nach Transduktion mit TAT-NLS-Cre.

Die Transduktion von GM-CSF generierten DC aus A21/D2-EGFP Mäusen mit dem TAT-NLS-Cre Protein führte zu einer mit Southernblot bestätigten Deletion der Neomycinkassette. Obwohl die Deletionseffizienz nicht sehr hoch war, konnte in ca. 1,5% der Zellen Grünfluoreszenz detektiert und damit auch die Funktionalität des EGFP-Reporters nach NEO-Deletion bestätigt werden (Kapitel 3.1.4).

Für die Analyse des EGFP-Reporters wurden deshalb die A21/D2-EGFP Mäuse mit Cre Deletermäusen verpaart. Damit wurde erfolgreich eine A21/D2-EGFP Mauslinie mit deletierter Neomycin-Genkassette generiert (Kapitel 3.1.4).

Um eine A21/D2-defiziente Mauslinie zu generieren wurden A21/D2-EGFP heterozygote Mäuse verpaart. In homozygoten A21/D2-EGFP Nachkommen konnte im Gegensatz zu heterozygoten Mäusen keine A21/D2 mRNA nachgewiesen mehr werden, was die erfolgreiche Inaktivierung von A21/D2 bestätigt (Kapitel 3.1.4).

4.3 Analyse der A21/D2 Expression

4.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von A21/D2

Bei der Analyse der N-Terminalen Region der A21/D2 Proteinsequenz fiel auf, dass das A21/D2 Protein eine Signal-Sequenz am N-Terminalen Ende besitzt. Die kurze Peptid-Sequenz weist die typischen Merkmale eines 'Leaderpeptid' auf: Eine mehrere Peptide lange, N-Terminale polare Region, gefolgt von einer 11 AS langen hydrophoben Region und einer Schnittstelle (cleavage site) zwischen AS 22 und 23 (siehe auch Sakaguchi, 1997).

Nachdem diese Leadersequenz an den Ribosomen im Zytosol translatiert wurde, erkennt das Signalerkennungspartikel (SRP) das Leaderpeptid und bindet an den Translationskomplex. Der gesamte Komplex aus Ribosom, mRNA, naszierender Peptidkette und SRP wandert zum Endoplasmatischen Retikulum und lagert sich durch Wechselwirkung zwischen SRP und SRP-Rezeptor an die ER-Membran an. Das Protein wird schließlich über ein Translokationssystem in das Lumen des ER synthetisiert bzw. in der ER-Membran verankert.

Der normale Weg für ein korrekt gefaltetes Protein im ER ist der Transport in Richtung Golgi-Apparat. Proteine, die im ER verbleiben sollen, besitzen spezielle Aminosäuresequenzen die höchstwahrscheinlich mit einem Rezeptor im Cis-Golgi-Netzwerk interagieren und durch den sie zum ER zurückgeführt werden. Wird ein Protein im ER synthetisiert und über den Golgi-Apparat weitergeleitet handelt es sich in den meisten Fällen um ein sekretorisches Protein, da die Sekretion als Massentransport vom ER über den Golgi zur Zelloberfläche als der Normalfall (default pathway) gesehen wird und jede Abweichung davon durch besondere Signale geregelt wird (Michal, 1999).

Das Vorhandensein eines Leaderpeptids bei dem A21/D2 Protein ist demnach ein guter Hinweis, dass es sich um ein sekretorisches Protein handeln könnte.

Um diese Annahme zu überprüfen wurde ein A21/D2-EGFP Fusionsprotein rekombinant in T 293 Zellen exprimiert und die intrazelluläre Lokalisation analysiert (Kapitel 3.1.2).

Wie beschrieben, lässt sich eine Kolo-kalisation des A21/D2-EGFP Fusionsproteins zum Teil mit dem ER-Marker Calreticulin, vor allem aber mit dem Golgi-Marker Anti-Golgin 97 feststellen. Es kann also davon ausgegangen werden, dass A21/D2 den oben beschriebenen sekretorischen 'default pathway' über das ER und den Golgi-Apparat einschlägt und sekretiert wird. Für das strukturell homologe Protein L-Equarin (Abbildung 4.1) konnte bereits gezeigt werden, dass es sich um ein sekretorisches Protein handelt (Mu et al., 2003). Diese Tatsache ist ein weiterer guter Hinweis auf eine Funktion von A21/D2 als sekretorisches Protein.

4.3.2 Expression von A21/D2 in murinen Geweben und Zellen

Zu Beginn der Arbeit an diesem Projekt war über die Expression des A21/D2 Gens nur sehr wenig bekannt. Da A21/D2 in dem Differential Display spezifisch für GM-CSF generierte DCs gefunden wurde war nur klar, dass es wohl von DC, nicht aber von Makrophagen exprimiert werden kann.

Durch die in Kapitel 3.1.1 beschriebene A21/D2-spezifische Northernblot und RT-PCR Analyse von RNS aus verschiedenen Geweben und Zellen der Maus sollte ein besserer Überblick über das Expressionsmuster von A21/D2 geschaffen werden (Kapitel 3.1.1).

Dabei zeigte sich ein relativ breites Expressionsmuster. Starke A21/D2-Expression war vor allem in nicht-lymphoiden Geweben wie Uterus, Blase, Ovarien, Herz und Lunge zu sehen. Aber auch in den lymphatischen Geweben wie Milz, Thymus und Lymphknoten war eine etwas geringere, aber dennoch deutlich vorhandene A21/D2-Expression nachzuweisen. Schwache bis gar keine A21/D2-Expression zeigte sich im Darm, Skelettmuskel und Gehirn.

Wie zu erwarten zeigten GM-CSF generierte DC eine relativ starke Expression von A21/D2 mRNS.

Insgesamt lässt sich also eine breite Ausprägung von A21/D2 in den verschiedenen Geweben der Maus feststellen, was sich auch mit den Beobachtungen von Aoki et al. (Aoki et al., 2002) deckt, die eine Expression von Urb in den meisten untersuchten Geweben feststellen (Magen, Leber, Lunge, Niere (schwach), Testis (schwach), Darm und vor allem in Fettgewebe). In der RIKEN Maus cDNS Bibliothek (<http://genome.gsc.riken.jp/index.html>) lässt sich eine zu Urb/A21/D2 identische cDNS finden. Diese cDNS wurde aus Gewebe von Embryo, Uterus, Herz und Brustdrüse gewonnen. Insgesamt bestätigt sich damit der Eindruck, dass A21/D2 hauptsächlich in nicht-lymphatischen Geweben wie Uterus, Blase, Herz, Fettgewebe und Lunge ausgeprägt wird.

Auch bei der Analyse von Organen aus A21/D2-EGFP-Reporter-mäusen zeigte sich die höchste Anzahl an EGFP-positiven Zellen in Uterus, Ovar, Herz und Blase. Wobei selbst in diesen Organen nur relativ wenige, vereinzelte EGFP-positive Zellen zu finden waren. Viele EGFP-positive Zellen konnten aufgrund ihrer Form und der gleichzeitigen Färbung mit Nilrot als Fettzellen identifiziert werden. Diese Tatsache würde mit der von Aoki et al. vorgeschlagenen Rolle von Urb/A21/D2 beim Fettstoffwechsel übereinstimmen.

Über die Identität der EGFP-positiven Zellen, bei denen es sich nicht um Fettzellen handelt, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sehr viel sagen. Wirft man einen Blick auf die FACS-Analysen von Zellen aus verschiedenen Organen von A21/D2-EGFP-Reporter-mäusen, findet man eine geringe Anzahl von EGFP-positiven Zellen in Herz und Lunge sowie eine relativ große Menge in Blase und Uterus. Allerdings sind alle EGFP-positiven Zellen negativ für den hämatopoetischen Marker CD45. Die einzigen EGFP-positiven hämatopoetischen Zellen findet man in GM-CSF Knochenmarks-Kulturen von A21/D2-EGFP Mäusen. Dort lässt sich eine relativ kleine Population an EGFP-positiven DC (ca. 0,5-1%) finden, während man weder bei einer ex vivo Analyse des Knochenmarks, noch bei einer FLT3L Kultur von Knochenmark-DC EGFP-positive Zellen finden kann. Möglicherweise handelt es sich bei der Expression von A21/D2-EGFP um einen direkten Effekt von GM-CSF und diese findet in DC nur unter den Bedingungen der Kultur mit GM-CSF statt. Nicht ausschließen lässt sich allerdings, dass der EGFP-Reporter wie unter 4.2 diskutiert nicht voll funktionstüchtig ist und die endogene Expression von A21/D2 nicht exakt widerspiegelt. In diesem Fall wäre die Generierung eines A21/D2-spezifischen Antikörpers eine Möglichkeit, die mit dem EGFP-Reporter erhaltenen Daten zu Verifizieren.

Bei der Analyse der A21/D2-defizienten Mäuse konnte bislang noch kein offensichtlicher Phänotyp festgestellt werden. Die Mäuse erscheinen äußerlich gesund, sind fertil und werden in der erwarteten Mendel'schen Frequenz geboren. Eine erste Analyse der zellulären Zusammensetzung der lymphatischen Organe ergab keinen Unterschied zwischen A21/D2-defizienten und Wildtypmäusen.

4.4 Die Auswirkung der IL-18-Blockade in Mausmodellen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen (CED)

Die Auswirkung einer IL-18-Blockade wurde in verschiedenen Studien durch die therapeutische Gabe von IL-18-Bindeprotein (Ten Hove et al., 2001), xenogenen neutralisierenden anti-IL-18

Antikörpern (Kanai et al., 2001; Siegmund et al., 2001a) und IL-18 Antisense-mRNS (Wirtz et al., 2002) in chemisch-induzierten Kollitismodellen und der Transferkollitis untersucht. Von einigen Gruppen wurde auch die Anfälligkeit von IL-18^{ko/ko} und Caspase-1^{ko/ko} Mäusen gegenüber einer Kollitisinduktion getestet.

Die in diesen Studien benutzten anti-IL-18 oder anti-IL-18-Rezeptor Antikörper wurden durch Immunisierung über Speziesgrenzen, zumeist in Kaninchen oder Ratten generiert. Um eine Abstoßung eines injizierten Proteins/Antikörpers auch bei einer Anwendung über einen längeren Zeitraum zu verhindern werden jedoch isogene Antikörper benötigt. Aus diesem Grund wurden isogene, neutralisierende monoklonale anti-IL-18 Antikörper durch Immunisierung von IL-18-defizienten Mäusen generiert. Wie gezeigt (Kapitel 3.2.1), wird durch die Verabreichung des anti-IL18 Mab SK113AE-4 die IFN- γ Produktion nach der Injektion von Wildtypmäusen mit 500 μ g LPS um ca. 80-90% inhibiert. Mit diesem anti-IL-18 Antikörper konnte die Auswirkung der IL-18-Blockade, immer im Vergleich mit IL-18-defizienten und Wildtypmäusen, auf die Anfälligkeit gegenüber einer Induktion sowie den Verlauf einer entzündlichen Darmerkrankung im Mausmodell getestet werden.

Die IL-18-Blockade im DSS-Kollitismodell führte bei BALB/c Mäusen zu keiner und bei C57Bl/6 Mäusen zu einer allenfalls leichten Reduktion des Gewichtsverlustes. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen von Siegmund et al. überein (Siegmund et al., 2001a), die bei der Behandlung im DSS-Kollitismodell mit anti-IL-18 Kaninchenserum ebenfalls keine signifikanten Verbesserungen beim Gewichtsverlust feststellen konnten. Während Siegmund et al. in ihrer Studie bei der Behandlung der DSS-Kollitis mit dem anti-IL-18 Antiserum eine Dosis-abhängige Verbesserung im histologischen Score des Darmes feststellen konnten, entwickelten die hier untersuchten Mäuse ähnlich starke pathologische Veränderungen im Darm und ein Unterschied zwischen den WT-, IL-18^{ko/ko}-, und anti-IL-18 Mab behandelten Mäusen war beim histologischen Score nicht festzustellen (Kapitel 3.2.2).

Wirft man einen Blick auf die Zytokinproduktion im Darm der mit DSS behandelten Mäuse, zeigt sich bei IL-18-Blockade v.a. bei den BALB/c Mäusen eine deutliche Reduktion der IFN- γ Konzentration. Aber auch die IL-18 sowie die TNF- α Konzentrationen lassen sich durch die IL-18-Blockade deutlich verringern. Dies deckt sich auch mit den Daten von Siegmund et al., die ebenfalls eine Reduktion von IFN- γ , TNF- α und IL-18 im Darm ihrer mit anti-IL-18 Antiserum behandelten Mäuse sehen. Von Siegmund et al. wurden auch Caspase-1 (ICE)^{ko/ko} Mäuse im DSS-Kollitismodell untersucht (Siegmund et al., 2001b). Dabei konnten sie zeigen, dass ICE-Defizienz Mäuse stärker vor der Induktion einer DSS-Kollitis schützt als die Verabreichung des anti-IL-18 Antiserums oder eines anti-IL-1-Rezeptor Antikörpers alleine. Während der Verlust von Caspase-

In den Mäusen eine relativ starke Resistenz gegenüber der Induktion einer DSS-Kolitis verleiht, führt die Blockade von IL-18 oder IL-1 alleine nur zu einer teilweisen Verbesserung.

Diese von Siegmund et al. berichtete Verbesserung lässt sich insgesamt in den hier durchgeführten DSS-Kolitis Experimenten nur in Bezug auf die Zytokinproduktion bestätigen. Bei dem für die Beurteilung der Kolitisschwere wichtigen histologischen Score konnte hier im Gegensatz zu Siegmund et al. keine Verbesserung durch die IL-18-Blockade festgestellt werden.

Interessant ist die Beobachtung, dass die IL-18-Blockade sowohl im Serum der Mäuse nach LPS Stimulation als auch bei der Darm Organkultur bei der DSS Kolitis in BALB/c Mäusen zu einer erhöhten IL-12 Produktion führt. Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen kompensatorischen Mechanismus der unter bestimmten Bedingungen den Effekt, den der Verlust von IL-18 verursacht, zumindest teilweise durch eine erhöhte IL-12 Produktion ausgleicht.

Während die DSS-Kolitis über den relativ kurzen Zeitraum von 7-9 Tagen abläuft und damit eher ein Modell für einen akuten Krankheitsverlauf darstellt, ist die Transferkolitis ein gutes Modell für eine chronische Darmentzündung. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden mit ConcanavalinA stimulierte CD4⁺ T-Zellen in T- und B-Zell defiziente RAG1^{ko/ko} bzw. RAG1^{ko/ko}IL-18^{ko/ko} Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund transferiert. Die RAG1^{ko/ko} Mäuse entwickelten wie bei Bregenholt beschrieben innerhalb eines Zeitraumes von 3-8 Wochen eine Kolitis (Bregenholt et al., 1998). Obwohl die IL-18-Blockade in diesem Modell zu einer leichten Reduktion beim Gewichtsverlust führt, lässt sich auch hier keinerlei Unterschied im histologische Score –und damit bei den pathologischen Veränderungen- erkennen. Mit einem ähnlichen Ansatz untersuchten Wirtz et al. die Blockade von IL-18 in einem Transferkolitis-Modell, bei dem die Kolitis durch Transfer von CD62L⁺CD4⁺ T-Zellen in BALB/c/SCID Mäuse induziert wurde (Wirtz et al., 2002). Die IL-18-Blockade wurde in dieser Studie durch die direkte rektale Verabreichung eines IL-18 antisense-RNS enthaltenden Adenovirus (Ad-asIL-18) erreicht. Ad-asIL-18 wurde den rekonstituierten SCID-Mäusen nach Einsetzen der ersten Kolitis-Symptome (5-10% Gewichtsverlust) für 6 Tage verabreicht. Diese Behandlung führte zu einer Verringerung der mukosalen IL-18 Konzentration sowie zu einer Verbesserung des histologischen Scores. Der relativ große Unterschied der beiden Ansätze sowohl in der Art der Kolitis-Induktion, als auch in der Methode der IL-18-Blockade könnte schon zu einem Teil die unterschiedlichen Ergebnisse erklären. In dieser Arbeit wurden zum einen voraktivierte T-Zellen transferiert, während Wirtz et al. naive T-Zellen benutzten. Der verschiedene Hintergrund der verwendeten Mäuse mag auch eine gewisse Rolle spielen und zu den unterschiedlichen Ergebnissen beitragen. Während C57BL/6 Mäuse generell zu Th1-gerichteten Immunantworten neigen, zeigen Mäuse auf BALB/c Hintergrund einen gewissen Hang zu Th2-gerichteten Immunantworten. Bei der DSS-Kolitis wird

dieser Unterschied besonders deutlich. Während BALB/c Mäuse eine vergleichsweise milde Kolitis trotz hoher DSS Konzentration im Trinkwasser entwickeln, ist der Krankheitsverlauf bei C57BL/6 Mäusen selbst bei niedrigerer DSS Konzentration deutlich schwerer (Kapitel 3.2.2).

Neben der DSS-Kolitis und der Transferkolitis ist die TNBS-Kolitis ein weiteres klassisches Kolitismodell in Mäusen (Elsen et al., 1995). Bei dieser Kolitis handelt es sich wie bei der DSS-Kolitis um eine chemisch induzierte Kolitis ausgelöst durch die rektale Verabreichung von Trinitrobenzen-Sulfonsäure (TNBS) über einen Zeitraum von 6-9 Tagen. Der Effekt der IL-18-Blockade wurde in zwei unabhängigen Studien von Ten Hove et al. (Ten Hove et al., 2001) und Kanai et al. (Kanai et al., 2001) untersucht. Ten Hove et al. behandelten BALB/c Mäuse mit TNBS in An- oder Abwesenheit von rekombinantem humanem IL-18-Bindeprotein (rhIL-18BP). Nur bei der höchsten Dosierung von 200µg rhIL-18BP pro Tag ließ sich eine teilweise Verbesserung bei der Kolitisentwicklung feststellen. Histologisch zeigte sich eine verringerte Anzahl an infiltrierenden Zellen in der Lamina Propria und insgesamt weniger Ulzerationen bei den rhIL-18BP behandelten Mäusen. Die IL-18-Blockade führte zu einer Reduktion an TNF- α , IL-1 β und IL-6, nicht jedoch von IFN- γ in Kolon-Kulturen. Die Autoren glauben deshalb, dass ein positiver Effekt der IL-18-Blockade weniger durch die IFN- γ inhibierende Wirkung, sondern hauptsächlich durch die Reduktion von anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α hervorgerufen wird.

Kanai et al. (Kanai et al., 2001) untersuchten die Rolle von mukosalen Makrophagen und IL-18 in der TNBS-Kolitis. Depletion der mukosalen Makrophagen mit Saporin konjugierten anti-Mac-1 Antikörpern führte zu einer Milderung der intestinalen Entzündung und einer geringeren Gewichtsabnahme. In dieser Studie führte die IL-18-Blockade ebenfalls zu einer leichten Verbesserung des histologischen Scores und einer Reduktion der IFN- γ Produktion von Lamina Propria mononukleären Zellen (LPMZ).

Erste Versuche zur Behandlung der TNBS-Kolitis mit dem Mab SK113AE-4 ergaben bisher keine Verbesserung bei der Gewichtsabnahme und dem histologischen Score. Obwohl diese Ergebnisse die zur TNBS-Kolitis bisher publizierten Daten nicht bestätigen, passen sie zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen der IL-18-Blockade bei der DSS- und Transferkolitis.

Der Haupteffekt der IL-18-Blockade auf die Entwicklung einer Kolitis im Mausmodell ist die Reduktion der lokalen Zytokin-Konzentrationen, hauptsächlich IFN- γ und z.T. auch TNF- α . Eine Verbesserung bei der Gewichtsabnahme ist kaum zu erkennen und, am wichtigsten, keine Auswirkung der IL-18-Blockade auf die pathologischen Veränderungen im Darm. Da in dieser Arbeit kein signifikanter therapeutischer Effekt für die Blockade von IL-18 gezeigt werden konnte und bei den meisten anderen Studien nur ein leichter oder teilweiser therapeutischer Effekt erzielt

wurde, ist der Erfolg einer anti-IL-18 Therapie in der klinischen Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankung eher fraglich.

4.5 Der Effekt der IL-18-Blockade auf die Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes*

Wie erwartet, ließ sich durch die Blockade von IL-18 die IFN- γ Produktion nach Stimulation von Makrophagen mit Hitze-inaktivierten *L. monocytogenes* (HKL) *in vitro* annähernd komplett inhibieren. Der gleiche inhibierende Effekt konnte hier auch für die Produktion von NO festgestellt werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen von Neighbors et al. (Neighbors et al., 2001), die in ihrer Studie BALB/c Mäuse mit *L. monocytogenes* infizierten und IL-18 mit einem anti-IL-18-Rezeptorantikörper blockierten. Es wird zwar allgemein angenommen, dass reaktive Stickstoffverbindungen wie NO (RN) sowie reaktiver Sauerstoff (RO) eine wichtige Rolle bei der Eliminierung von Bakterien durch Makrophagen spielen (oxidative Burst). Allerdings wird der Beitrag dieser reaktiven Verbindungen bei der Immunantwort gegen *L. monocytogenes in vivo* nach wie vor kontrovers diskutiert. So konnten Endres et al. zeigen, dass der oxidative Burst eine eher geringe Rolle bei der Eliminierung von *L. monocytogenes* Infektionen spielt (Endres et al., 1997).

Auch bei der Aktivierung von Makrophagen mit HKL konnte –zumindest bei den IL-18^{ko/ko} Makrophagen- eine deutlich höhere IL-12 Produktion als bei den Wildtypmakrophagen gemessen werden. Dieser Effekt war auch schon nach LPS-Stimulation oder teilweise auch bei den Kolitisexperimenten aufgefallen. Es scheint also in der Tat so, dass unter bestimmten Bedingungen die Blockade von IL-18 kompensatorisch zu einer erhöhten IL-12 Produktion führt. Den gleichen Effekt konnten im Übrigen auch Tsuji et al. bei der Infektion von Caspase-1 defizienten Knochenmark DC aus Mäusen mit HKL beobachten (Tsuji et al., 2004).

Interessanterweise zeigte sich bei der Analyse der Listerientiter an Tag drei nach Infektion mit *L.m.ova* eine signifikante Reduktion der Listerientiter in Milz und Leber von IL-18^{ko/ko} und antikörperbehandelten Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen (Abbildung 3.30). Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu den bisher publizierten Daten. Neighbors et al. zeigen eine extrem erhöhte Anfälligkeit gegenüber Listerien bei Blockade von IL-18 mit einem anti-IL-18-Rezeptorantikörper (bis zu drei Logstufen höhere Bakterientiter in der Milz). Der Effekt der IL-18-Blockade übertrifft in dieser Studie sogar den Effekt der IL-12 Blockade und zeigt sich teilweise unabhängig von der Reduktion in der IFN- γ Produktion. Einen weit weniger starken Effekt der IL-18-Blockade beobachteten Seki et al. bei der Untersuchung von IL-18-defizienten

Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes* (Seki et al., 2002). IL-18-defiziente Mäuse zeigen einen leicht erhöhten Listerientiter in der Leber (ca. eine halbe Logstufe) und weisen nur bei der höchsten infektiösen Dosis (5×10^5 L.m.) eine leicht erhöhte Letalität gegenüber den Wildtypmäusen auf. Den Beobachtungen von Seki et al. zufolge hat der Effekt der IL-12- oder IFN- γ -Blockade zudem eine deutlich stärkere negative Auswirkung als die IL-18-Blockade. Einen erhöhten Listerientiter konnten auch Tsuji et al. in Leber und Milz von Listerien-infizierten Caspase-1^{ko/ko} Mäusen feststellen. In den beiden letzten Studien wird der Effekt der IL-18-Blockade hauptsächlich auf eine verringerte IFN- γ und TNF- α Produktion zurückgeführt, während Neighbors et al. den IL-18 Effekt auch unabhängig von IFN- γ beobachteten. Insgesamt zeigen die bisher publizierten Daten also einen erhöhten Listerientiter bei Blockade von IL-18 (wobei der Effekt zwischen kaum signifikant (Seki et al.) und sehr stark (Neighbors et al.) schwankt). Es stellt sich also die Frage, warum in dieser Studie ein gegenteiliger Effekt zu sehen ist. Möglich wäre ein Unterschied bei den verwendeten Listerienstämmen, wozu es allerdings bislang keine stichhaltigen Untersuchungen gibt. Eine gute Erklärung für die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte Resistenz bei IL-18-Blockade wäre eine erhöhte IL-12 Produktion. Bei Restimulation der Milzzellen von Listerien infizierten Mäusen an Tag 7 nach Infektion lässt sich zwar keine erhöhte IL-12 Produktion bei IL-18-Blockade feststellen (Abbildung 3.31). Da der vermutete Effekt einer erhöhten IL-12 Produktion aber in der Frühphase der Infektion liegt (12-48 Stunden), wird es ein weiteres Ziel dieser Studie sein, die IL-12 Konzentration in den ersten drei Tagen nach der Infektion mit *L. monocytogenes* zu untersuchen.

Eine weitere Frage, die in dieser Arbeit bearbeitet wurde, war die Auswirkung der IL-18-Blockade auf die Entwicklung der Listerien-spezifischen T-Zell Antwort. Vor allem die Studie von Neighbors et al. hatte einen dramatischen inhibitorischen Effekt der IL-18-Blockade nicht nur auf die Entwicklung von Th1 T-Zellen bei der Primärantwort gezeigt, sondern auch eine deutlich beeinträchtigte Sekundärantwort nach Restimulation mit *L. monocytogenes*. Wobei auch hier der Effekt der IL-18-Blockade den der Blockade von IL-12 oder IFN- γ weit überstieg. Mit der in dieser Arbeit verwendeten Tetramertechnik war es im Gegensatz zu der Studie von Neighbors et al. möglich, die Expansion der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zell Population nach Infektion mit L.m.ova zu verfolgen. Normalerweise sind am Tag 7 nach Infektion mit *L. monocytogenes* ca. 1-2% der Milz-CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch (Busch et al., 1998; Pope et al., 2001). Dieser Wert ließ sich auch in dieser Arbeit bestätigen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- IL-18^{ko/ko} und anti-IL-18-behandelten Mäusen festzustellen war. Es konnte zwar eine leichte Reduktion der Gesamtzahl der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen und der IFN- γ und TNF- α produzierenden Th1 T-Zellen nachgewiesen werden, jedoch war der Effekt bei weitem

nicht so deutlich wie der von Neighbors et al. beschriebene. War dieser leichte Effekt bei der Primärantwort noch zu sehen, konnte bei der Sekundärantwort nach Reinfektion der Mäuse 3 Wochen nach der Primärinfektion kein Unterschied zwischen den Gruppen gesehen werden. Trotz IL-18-Blockade waren die Mäuse in der Lage, eine starke Sekundärantwort zu entwickeln mit ca. 30% Tetramer positiven CD8⁺ T-Zellen in der Milz 5 Tage nach der Sekundärinfektion. Die IL-18-Blockade führte auch zu keinem Unterschied bei der Entwicklung von IFN- γ und TNF- α produzierenden Th1 T-Zellen. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung von Tsuji et al., die keine Beeinträchtigung der sekundären Immunantwort bei der Sekundärinfektion von Caspase-1 defizienten Mäusen mit *L. monocytogenes* feststellen konnten.

Insgesamt konnte also bei der Primärinfektion eine leichte Beeinträchtigung der spezifischen T-Zell Antwort durch die Blockade von IL-18, bei der Sekundärantwort jedoch kein Unterschied festgestellt werden.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse von Neighbors et al. könnte zum einen die Verwendung von Mäusen eines anderen genetischen Hintergrundes sein (BALB/c statt der hier verwendeten BL/6 Mäuse). Zum anderen wurde von Neighbors et al. zur Blockade von IL-18 ein anti-IL-18-Rezeptor Antikörper verwendet. Es ist gezeigt worden, dass die Fähigkeit mancher gegen Zytokine gerichteter Antikörper, Apoptose zu induzieren, einen Großteil der Effektorfunktion des Antikörpers ausmachen (z.B. gezeigt für den anti-TNF- α Antikörper Infliximab (Van den Brande et al., 2003)). Nicht auszuschließen ist, dass der anti-IL-18-Rezeptor Antikörper Apoptose in den Zellen induziert die den IL-18 Rezeptor ausprägen. Dies könnte auch den drastischen, die Blockade von IL-12 und IFN- γ übertreffenden Effekt erklären. Interessant wäre in diesem Zusammenhang auch die Klärung der Frage, ob der in dieser Arbeit verwendete anti-IL-18 Antikörper SK113AE-4 Apoptose induziert. Diese Frage wird derzeit experimentell geklärt.

4.6 Ausblick

Die zukünftigen Arbeiten werden sich vor allem mit der Analyse der A21/D2-defizienten Mäuse beschäftigen. In dieser Arbeit wurde in Übereinstimmung mit den Daten von Aoki et al. (Aoki et al., 2002) die Expression von A21/D2 in Fettzellen gezeigt. Da Aoki et al. eine Rolle für A21/D2 im Energiestoffwechsel des Gehirns und in Fettzellen vermuten, sollen die A21/D2-defizienten Mäuse in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Etsuko Wada vom National Center of Neurology and Psychiatry in Tokyo hinsichtlich dieser möglichen Funktion untersucht werden. Die A21/D2-defizienten Mäuse sollen aber auch weiterhin auf einen möglichen Immun-Defekt untersucht werden. Obwohl die erste Analyse der zellulären Zusammensetzung von lymphoiden Organen keine Unterschiede zwischen A21/D2-defizienten und Wildtypmäusen erkennen ließ, wird nur eine genauere Analyse der unterschiedlichen Kompartimente und Bestandteile des Immunsystems eine mögliche, immunologisch relevante Funktion für A21/D2 aufdecken können. Eine interessante aber auch anspruchsvolle zukünftige Aufgabe wird es sein, die Funktion von A21/D2 im Herz, vor allem aber im Uterus (bis zu 25% EGFP-positive Zellen) zu analysieren.

Hinsichtlich der Rolle von IL-18 bei entzündlichen Darmerkrankungen konnte in dieser Arbeit klar gezeigt werden, dass eine positive Auswirkung auf die pathologischen Veränderungen im Darm durch die Blockade von IL-18 nicht zu erreichen ist. Möglicherweise lassen sich die von anderen Gruppen beobachteten Verbesserungen durch die anti-IL-18 Therapie mit der Verwendung von Apoptose-induzierenden anti-IL-18 Antisera erklären. Interessant wäre es in diesem Zusammenhang zu wissen, ob der hier verwendete Antikörper SK113AE-4 Apoptose induziert. Diese Frage wird zurzeit in Zusammenarbeit mit Bianca Wittig vom Universitätsklinikum Benjamin Franklin in Berlin geklärt.

Im Zusammenhang mit den Listerieninfektionen war vor allem die erhöhte Resistenz der Mäuse bei der Blockade von IL-18 überraschend. Die weitere Arbeit wird sich deshalb mit der Frage beschäftigen, welche Faktoren (evtl. IL-12) für diesen Effekt verantwortlich sind.

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen und Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Immunantworten. Um unbekannte Gene zu identifizieren, die spezifisch von diesen Zellen ausgeprägt werden, wurde im Vorfeld dieser Arbeit ein Differential Display zwischen murinen Knochenmark-DC und Makrophagen durchgeführt. Dabei wurde unter anderem das DC-spezifische Gen A21/D2 identifiziert. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Struktur, Expressionsmuster, subzelluläre Lokalisation sowie die biologische Funktion dieses Gens untersucht. Unsere Daten zeigen, dass es sich bei A21/D2 um ein Mitglied einer neuen Genfamilie mit Homologie zu Sushi-repeat Proteinen handelt. Die Analyse der subzellulären Lokalisation von A21/D2 weist auf eine Funktion als sekretorisches Protein hin. Die Analyse der in dieser Arbeit generierten A21/D2-EGFP Reporter 'Knock-in' Mäuse zeigen eine Expression von A21/D2 in ca. 1-2% von GM-CSF-generierten Knochenmark-DC sowie in einzelnen, nicht-hämatopoetischen (CD45-negativen) Zellen in verschiedenen Organen. Dabei wurden die meisten A21/D2(EGFP)-positiven Zellen in Uterus, Blase, Ovarien, Blase, Herz und Lunge nachgewiesen. Der Nachweis der A21/D2-Expression in Fettzellen des Thymus, Darm, Herz und Lunge weist auf eine mögliche Funktion von A21/D2 in Energiestoffwechsel hin. Die homozygote Verpaarung der A21/D2-EGFP-Reportermäuse ermöglicht zudem die funktionelle Analyse von A21/D2 in A21/D2-defizienten Mäusen.

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde die Rolle von Interleukin (IL)-18, ein von DC und Makrophagen produziertes Zytokin, bei der Regulation von chronischen Entzündungsreaktionen im Darm sowie der Immunantwort gegen das pathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* im Mausmodell untersucht. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, führt die Blockade von IL-18 in verschiedenen Mausmodellen für chronisch-entzündliche Darmerkrankungen zwar zu einer Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen im Darm, nicht aber zu einer Verbesserung der pathologischen, entzündlichen Veränderungen im Darm der Mäuse. Während IL-18 nur eine untergeordnete Rolle bei den entzündlichen Darmerkrankungen spielt, weisen mit *L. monocytogenes* infizierte Mäuse bei IL-18-Blockade einen signifikant geringeren Listerientiter in Milz und Leber an Tag 3 nach Infektion auf. Allerdings konnte in dieser Arbeit der postulierte Effekt einer IL-18-Blockade auf die Entwicklung der Listerien-spezifischen T-Zell Antwort nicht bestätigt werden. Die Frequenz der Listerien-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sowie der IFN- γ - und TNF- α -positiven Th1 Zellen war bei der Primärantwort bei IL-18-Blockade zwar leicht reduziert,

bei der Sekundärantwort nach Reinfektion konnten jedoch keinerlei Auswirkung der IL-18-Blockade nachgewiesen werden.

Summary

Dendritic cells (DC) and macrophages play a crucial role in the regulation of immune responses. In order to detect novel genes, which play a specific role in the biology of these cells, a differential gene expression analysis between mouse bone marrow (BM) derived DC and mouse BM derived macrophages was performed. We were able to identify a set of so far unknown genes that were exclusively expressed in BM-DC. In the first part of this study, the structure, expression pattern, subcellular localisation and biological functions of one of these genes, termed A21/D2, was analysed. I could identify A21/D2 as a member of a new family of molecules with homology to the superfamily of sushi-repeat-containing proteins. The data further suggest that A21/D2 is a secreted molecule. Additionally, EGFP-reporter mice were generated using a Knock-in approach into the endogenous A21/D2 locus to explore the cellular distribution of A21/D2(EGFP) expression in mouse organs. A21/D2 reporter mice show expression of A21/D2(EGFP) in about 1-2% of GM-CSF differentiated BM-DC and in individual, non-hematopoietic (CD45 negative) cells of various organs. Most A21/D2(EGFP)-positive cells could be detected in uterus, ovary, bladder, heart and lung. Staining with the fat cell marker Nile red revealed A21/D2(EGFP)-expression in a fraction of fat cells in the thymus, gut, heart and lung. Co-localisation of A21/D2(EGFP) with a fat cell marker indicates a role for A21/D2 in fat cell biology or fatty acid metabolism. With the generation of A21/D2-deficient mice it is now possible to study the function of A21/D2 in vivo.

In the second part of this study, I analysed the role of the DC and macrophage produced cytokine Interleukin (IL)-18 in the regulation of immune responses. For this purpose, the effect of IL-18-Blockade was studied in various models of murine inflammatory bowel disease (IBD) and a murine infection model with *Listeria monocytogenes*. I could show, that blocking IL-18 in IBD models leads to a reduction in the local proinflammatory cytokine levels, but not to an improvement in colitis pathology. Whereas IL-18-Blockade had no beneficial effect in IBD, blocking of IL-18 lead to significant lower *Listeria* titers in spleen and liver of mice upon infection with *Listeria monocytogenes*. However, I could not confirm the proposed effect of IL-18 on the establishment of *Listeria* specific T-cell response. After blocking IL-18, specific CD8⁺ T-cell and IFN- γ /TNF- α positive Th1 T-cell frequencies were slightly reduced in the primary response against *L. monocytogenes*, but no differences could be observed in the recall response after reinfection with *Listeria monocytogenes*.

6. Referenzen

Albert, M. L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., and Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732-738.

Alferink, J., Lieberam, I., Reindl, W., Behrens, A., Weiss, S., Huser, N., Gerauer, K., Ross, R., Reske-Kunz, A. B., Ahmad-Nejad, P., *et al.* (2003). Compartmentalized production of CCL17 in vivo: strong inducibility in peripheral dendritic cells contrasts selective absence from the spleen. *J Exp Med* 197, 585-599.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., Parker, B. A., Reiser, J., Renart, J., Stark, G. R., and Wahl, G. M. (1979). Detection of specific RNAs or specific fragments of DNA by fractionation in gels and transfer to diazobenzyloxymethyl paper. *Methods Enzymol* 68, 220-242.

Alwine, J. C., Kemp, D. J., and Stark, G. R. (1977). Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5350-5354.

Aoki, K., Sun, Y. J., Aoki, S., Wada, K., and Wada, E. (2002). Cloning, expression, and mapping of a gene that is upregulated in adipose tissue of mice deficient in bombesin receptor subtype-3. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 1282-1288.

Ardavin, C. (2003). Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3, 582-590.

Banchereau, J., and Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.

Barclay, A. N., Wright, G. J., Brooke, G., and Brown, M. H. (2002). CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol* 23, 285-290.

Barr, F. A., and Short, B. (2003). Golgins in the structure and dynamics of the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol* 15, 405-413.

Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H., and Lipford, G. B. (2001). Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9237-9242.

Beckerman, K. P., Rogers, H. W., Corbett, J. A., Schreiber, R. D., McDaniel, M. L., and Unanue, E. R. (1993). Release of nitric oxide during the T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 150, 888-895.

- Biet, F., Locht, C., and Kremer, L. (2002). Immunoregulatory functions of interleukin 18 and its role in defense against bacterial pathogens. *J Mol Med* 80, 147-162.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523.
- Born, T. L., Thomassen, E., Bird, T. A., and Sims, J. E. (1998). Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* 273, 29445-29450.
- Bouchon, A., Hernandez-Munain, C., Cella, M., and Colonna, M. (2001). A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1111-1122.
- Bregenholt, S., Reimann, J., and Claesson, M. H. (1998). Proliferation and apoptosis of lamina propria CD4⁺ T cells from scid mice with inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* 28, 3655-3663.
- Buchmeier, N. A., and Schreiber, R. D. (1985). Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7404-7408.
- Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijh, S., and Pamer, E. G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8, 353-362.
- Cai, G., Kastelein, R., and Hunter, C. A. (2000). Interleukin-18 (IL-18) enhances innate IL-12-mediated resistance to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 68, 6932-6938.
- Cameron, L. A., Taha, R. A., Tsiopoulos, A., Kurimoto, M., Olivenstein, R., Wallaert, B., Minshall, E. M., and Hamid, Q. A. (1999). Airway epithelium expresses interleukin-18. *Eur Respir J* 14, 553-559.
- Carreno, B. M., and Collins, M. (2003). BTLA: a new inhibitory receptor with a B7-like ligand. *Trends Immunol* 24, 524-527.
- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180, 1263-1272.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 184, 747-752.
- Chang, J. T., Segal, B. M., Nakanishi, K., Okamura, H., and Shevach, E. (2000). The costimulatory effect of IL-18 on the induction of antigen-specific IFN-gamma production by resting T cells is IL-12 dependent and is mediated by up-regulation of the IL-12 receptor beta2 subunit. *Eur J Immunol* 4, 1113-1119.
- Chikano, S., Sawada, K., Shimoyama, T., Kashiwamura, S. I., Sugihara, A., Sekikawa, K., Terada, N., Nakanishi, K., and Okamura, H. (2000). IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. *Gut* 47, 779-786.

- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*, 156-159.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *69*, 2110-2114.
- Cooper, H. S., Murthy, S. N., Shah, R. S., and Sedergran, D. J. (1993). Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Lab Invest* *69*(2), 238-249.
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., and Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* *173*, 33-38.
- Crowley, M., Inaba, K., Witmer-Pack, M., and Steinman, R. M. (1989). The cell surface of mouse dendritic cells: FACS analyses of dendritic cells from different tissues including thymus. *Cell Immunol* *118*, 108-125.
- Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A., and Stewart, T. A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* *259*, 1739-1742.
- D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J Exp Med* *198*, 293-303.
- Davie, E. W., Ichinose, A., and Leytus, S. P. (1986). Structural features of the proteins participating in blood coagulation and fibrinolysis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *51 Pt 1*, 509-514.
- de Saint-Vis, B., Vincent, J., Vandenabeele, S., Vanbervliet, B., Pin, J. J., Ait-Yahia, S., Patel, S., Mattei, M. G., Banchereau, J., Zurawski, S., *et al.* (1998). A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* *9*, 325-336.
- De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996). Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* *184*, 1413-1424.
- Debets, R., Timans, J. C., Churakowa, T., Zurawski, S., de Waal Malefyt, R., Moore, K. W., Abrams, J. S., O'Garra, A., Bazan, J. F., and Kastelein, R. A. (2000). IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL-1RAcPL antibody, a potent antagonist of IL-18. *J Immunol* *165*(9), 4950-4956.
- del Hoyo, G. M., Martin, P., Vargas, H. H., Ruiz, S., Arias, C. F., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* *415*, 1043-1047.
- Dieleman, L. A., Ridwan, B. U., Tennyson, G. S., Beagley, K. W., Bucy, R. P., and Elson, C. O. (1994). Dextran sulfate sodium-induced colitis occurs in severe combined immunodeficient mice. *Gastroenterology* *107*(6), 1643-1652.

- Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998). Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* *188*, 373-386.
- Dieu-Nosjean, M. C., Vicari, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1999). Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *J Leukoc Biol* *66*, 252-262.
- Djaldetti, M., and Lewinski, U. H. (1983). Nuclear hypersegmentation in the myeloma cells of a patient with multiple myeloma. *Scand J Haematol* *31*, 144-148.
- Dunn, P. L., and North, R. J. (1991). Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun* *59*, 2892-2900.
- Edelson, B. T., and Unanue, E. R. (2002). MyD88-dependent but Toll-like receptor 2-independent innate immunity to *Listeria*: no role for either in macrophage listericidal activity. *J Immunol* *169*, 3869-3875.
- Elson, C. O., Sartor, R. B., Tennyson, G. S., and Riddel, R. H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *109*, 1344-1367.
- Endres, R., Luz, A., Schulze, H., Neubauer, H., Futterer, A., Holland, S. M., Wagner, H., and Pfeffer, K. (1997). Listeriosis in p47(phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. *Immunity* *7*, 419-432.
- Falkenberg, U., Leenen, P. J., and Falkenberg, F. W. (1989). Characterization of mouse macrophage differentiation antigens by monoclonal antibodies. *Cell Immunol* *124*, 77-94.
- Fearon, D. T., and Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* *272*, 50-53.
- Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., and Phillips, G. J. (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* *182*, 4068-4076.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* *137*, 266-267.
- Finelli, A., and Pamer, E. G. (2000). Immune and inflammatory responses to *Listeria monocytogenes* infection. In *Gram-Positive Pathogens*, V. A. Fischetti, ed. (Washington, American Society for Microbiology Press), pp. 480-487.
- Flo, T. H., Halaas, O., Lien, E., Ryan, L., Teti, G., Golenbock, D. T., Sundan, A., and Espevik, T. (2000). Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide. *J Immunol* *164*, 2064-2069.
- Fogel, M., Long, J. A., Thompson, P. J., and Upham, J. W. (2002). Dendritic cell maturation and IL-12 synthesis induced by the synthetic immune-response modifier S-28463. *J Leukoc Biol* *72*, 932-938.

- Fukao, T., Matsuda, S., and Koyasu, S. (2000). Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J Immunol* *164*, 64-71.
- Ganz, T. (2002). Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* *109*, 693-697.
- Garrett, W. S., Chen, L. M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J. E., and Mellman, I. (2000). Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* *102*, 325-334.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 327-333.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* *3*, 23-35.
- Gracie, J. A., Forsey, R. J., Chan, W. L., Gilmour, A., Leung, B. P., Greer, M. R., Kennedy, K., Carter, R., Wei, X. Q., Xu, D., *et al.* (1999). A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* *104*, 1393-1401.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Pavelka, N., Feau, S., Persico, M., Virzi, E., Rescigno, M., Moro, G., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001a). Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* *2*, 882-888.
- Granucci, F., Vizzardelli, C., Virzi, E., Rescigno, M., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2001b). Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur J Immunol* *31*, 2539-2546.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skepper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrite, nitrate and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 131.
- Griffith, K. J., Chan, E. K., Lung, C. C., Hamel, J. C., Guo, X., Miyachi, K., and Fritzler, M. J. (1997). Molecular cloning of a novel 97-kd Golgi complex autoantigen associated with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* *40*, 1693-1702.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* *166*, 557-580.
- Harty, J. T., Tvinnereim, A. R., and White, D. W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol* *18*, 275-308.
- Hawiger, J. (1999). Noninvasive intracellular delivery of functional peptides and proteins. *Curr Opin Chem Biol* *3*, 89-94.
- Heim, R., Prasher, D. C., and Tsien, R. Y. (1994). Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 12501-12504.
- Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K., and Akira, S. (2002). Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* *3*, 196-200.

- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
- Henri, S., Vremec, D., Kamath, A., Waithman, J., Williams, S., Benoist, C., Burnham, K., Saeland, S., Handman, E., and Shortman, K. (2001). The dendritic cell populations of mouse lymph nodes. *J Immunol* *167*, 741-748.
- Henrik Nielsen, J. E., Søren Brunak and Gunnar von Heijne (1997). Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* *10*, 1-6.
- Herrin, D. L., and Schmidt, G. W. (1988). Rapid, reversible staining of northern blots prior to hybridization. *Biotechniques* *6*, 196-197, 199-200.
- Hibi, T., Ogata, H., and Sakuraba, A. (2002). Animal models of inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* *37*, 409-417.
- Hochholzer, P., Lipford, G. B., Wagner, H., Pfeffer, K., and Heeg, K. (2000). Role of interleukin-18 (IL-18) during lethal shock: decreased lipopolysaccharide sensitivity but normal superantigen reaction in IL-18-deficient mice. *Infect Immun* *68*(6), 3502-3508.
- Hochrein, H., Shortman, K., Vremec, D., Scott, B., Hertzog, P., and O'Keeffe, M. (2001). Differential production of IL-12, IFN-alpha, and IFN-gamma by mouse dendritic cell subsets. *J Immunol* *166*, 5448-5455.
- Horwood, N. J., Udagawa, N., Elliott, J., Grail, D., Okamura, H., Kurimoto, M., Dunn, A. R., Martin, T., and Gillespie, M. T. (1998). Interleukin 18 inhibits osteoclast formation via T cell production of granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Invest* *101*, 595-603.
- Huang, Q., Liu, D., Majewski, P., Schulte, L. C., Korn, J. M., Young, R. A., Lander, E. S., and Hacohen, N. (2001). The plasticity of dendritic cell responses to pathogens and their components. *Science* *294*, 870-875.
- Hubbard, T., Barker, D., Birney, E., Cameron, G., Chen, Y., Clark, L., Cox, T., Cuff, J., Curwen, V., Down, T., *et al.* (2002). The Ensembl genome database project. *Nucleic Acids Res* *30*, 38-41.
- Ichinose, A., Bottenus, R. E., and Davie, E. W. (1990). Structure of transglutaminases. *J Biol Chem* *265*, 13411-13414.
- Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1993). Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 3038-3042.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* *176*, 1693-1702.

- Inaba, K., and Steinman, R. M. (1984). Resting and sensitized T lymphocytes exhibit distinct stimulatory (antigen-presenting cell) requirements for growth and lymphokine release. *J Exp Med* *160*, 1717-1735.
- Inaba, K., and Steinman, R. M. (1985). Protein-specific helper T-lymphocyte formation initiated by dendritic cells. *Science* *229*, 475-479.
- Inaba, K., Steinman, R. M., Van Voorhis, W. C., and Muramatsu, S. (1983). Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* *80*, 6041-6045.
- Ingulli, E., Ulman, D. R., Lucido, M. M., and Jenkins, M. K. (2002). In situ analysis reveals physical interactions between CD11b⁺ dendritic cells and antigen-specific CD4 T cells after subcutaneous injection of antigen. *J Immunol* *169*, 2247-2252.
- Janeway, C. A., Jr., and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* *20*, 197-216.
- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M., and Eggleton, P. (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol* *11*, 122-129.
- Joosten, L. A., van De Loo, F. A., Lubberts, E., Helsen, M. M., Netea, M. G., van Der Meer, J. W., Dinarello, C. A., and van Den Berg, W. B. (2000). An IFN-gamma-independent proinflammatory role of IL-18 in murine streptococcal cell wall arthritis. *J Immunol Methods* *165(11)*, 6553-6558.
- Kalergis, A. M., and Ravetch, J. V. (2002). Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells. *J Exp Med* *195*, 1653-1659.
- Kanai, T., Watanabe, M., Okazawa, A., Nakamaru, K., Okamoto, M., Naganuma, M., Ishii, H., Ikeda, M., Kurimoto, M., and Hibi, T. (2000). Interleukin 18 is a potent proliferative factor for intestinal mucosal lymphocytes in Crohn's disease. *Gastroenterology* *119*, 1514-1523.
- Kanai, T., Watanabe, M., Okazawa, A., Sato, T., Yamazaki, M., Okamoto, S., Ishii, H., Totsuka, T., Iiyama, R., Okamoto, R., *et al.* (2001). Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology* *121*, 875-888.
- Keane, J., Gershon, S., Wise, R. P., Mirabile-Levens, E., Kasznica, J., Schwiertman, W. D., Siegel, J. N., and Braun, M. M. (2001). Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha- neutralizing agent. *N Engl J Med* *345*, 1098-1104.
- Kitajima, S., Takuma, S., and Morimoto, M. (1999). Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* *48*, 137-143.
- Klinkert, W. E., LaBadie, J. H., and Bowers, W. E. (1982). Accessory and stimulating properties of dendritic cells and macrophages isolated from various rat tissues. *J Exp Med* *156*, 1-19.
- Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kampgen, E., Romani, N., and Schuler, G. (1996). High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* *184*, 741-746.

- Koetsier, P. A., Schorr, J., and Doerfler, W. (1993). A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. *Biotechniques* *15*, 260-262.
- Kozak, M. (1984). Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res* *12*, 857-872.
- Kozak, M. (1996). Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mamm Genome* *7*, 563-574.
- Kronin, V., Winkel, K., Suss, G., Kelso, A., Heath, W., Kirberg, J., von Boehmer, H., and Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells regulates the response of naive CD8 T cells by limiting their IL-2 production. *J Immunol* *157*, 3819-3827.
- Kumanogoh, A., Suzuki, K., Ch'ng, E., Watanabe, C., Marukawa, S., Takegahara, N., Ishida, I., Sato, T., Habu, S., Yoshida, K., *et al.* (2002). Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells. *J Immunol* *169*, 1175-1181.
- Labarca, C., and Paigen, K. (1980). A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem* *102*, 344-352.
- Lavender, P., Cousins, D., and Lee, T. (2000). Regulation of Th2 cytokine gene transcription. *Chem Immunol* *78*, 16-29.
- Lee, G. R., Fields, P. E., and Flavell, R. A. (2001). Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. *Immunity* *14*, 447-459.
- Leenen, P. J., Radosevic, K., Voerman, J. S., Salomon, B., van Rooijen, N., Klatzmann, D., and van Ewijk, W. (1998). Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover. *J Immunol* *160*, 2166-2173.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M., and Boedtker, H. (1977). RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry* *16*, 4743-4751.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. P., Averboukh, L., Wang, F., and Pardee, A. B. (1994). Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res* *22*, 5763-5764.
- Lieberam, I. (1999) Analyse Zelltyp-spezifischer Genexpression in dendritischen Zellen, Universität zu Köln, Köln.
- Lieberam, I., and Forster, I. (1999). The murine beta-chemokine TARC is expressed by subsets of dendritic cells and attracts primed CD4+ T cells. *Eur J Immunol* *29*, 2684-2694.
- Lozier, J., Takahashi, N., and Putnam, F. W. (1984). Complete amino acid sequence of human plasma beta 2-glycoprotein I. *Proc Natl Acad Sci U S A* *81*, 3640-3644.
- Luft, T., Pang, K. C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D. N., Trapani, J., and Cebon, J. (1998). Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* *161*, 1947-1953.

- Mahler, M., Bristol, I. J., Leiter, E. H., Workman, A. E., Birkenmeier, E. H., Elson, C. O., and Sundberg, J. P. (1998). Differential susceptibility of inbred mouse strains to dextran sulfate sodium-induced colitis. *Am J Physiol* 274, G544-551.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Michel, P., Godfroid, J., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., and Moser, M. (1999a). CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J Exp Med* 189, 587-592.
- Maldonado-Lopez, R., De Smedt, T., Pajak, B., Heirman, C., Thielemans, K., Leo, O., Urbain, J., Maliszewski, C. R., and Moser, M. (1999b). Role of CD8alpha+ and CD8alpha- dendritic cells in the induction of primary immune responses in vivo. *J Leukoc Biol* 66, 242-246.
- Manz, M. G., Traver, D., Miyamoto, T., Weissman, I. L., and Akashi, K. (2001). Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97, 3333-3341.
- Marcantonio, D., Chalifour, L. E., Alaoui, J., MA, H. T. H., Alaoui-Jamali, M. A., and Huynh, H. T. (2001). Steroid-sensitive gene-1 is an androgen-regulated gene expressed in prostatic smooth muscle cells in vivo. *J Mol Endocrinol* 26, 175-184.
- Martin, P., Del Hoyo, G. M., Anjuere, F., Arias, C. F., Vargas, H. H., Fernandez, L. A., Parrillas, V., and Ardavin, C. (2002). Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha+ B220+ dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100, 383-390.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.
- Medzhitov, R., and Janeway, C. A., Jr. (1998). An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* 10, 12-15.
- Meindl, A., Carvalho, M. R., Herrmann, K., Lorenz, B., Achatz, H., Apfelstedt-Sylla, E., Wittwer, B., Ross, M., and Meitinger, T. (1995). A gene (SRPX) encoding a sushi-repeat-containing protein is deleted in patients with X-linked retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 4, 2339-2346.
- Meinkoth, J., and Wahl, G. (1984). Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal Biochem* 138, 267-284.
- Metlay, J. P., Witmer-Pack, M. D., Agger, R., Crowley, M. T., Lawless, D., and Steinman, R. M. (1990). The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J Exp Med* 171, 1753-1771.
- Michal, G. (1999). *Biochemical pathways* (Heidelberg, Spektrum, Akademischer Verlag).
- Mocci, S., Dalrymple, S. A., Nishinakamura, R., and Murray, R. (1997). The cytokine stew and innate resistance to *L. monocytogenes*. *Immunol Rev* 158, 107-114.
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68, 869-877.

- Monteleone, G., Trapasso, F., Parrello, T., Biancone, L., Stella, A., Iuliano, R., Lizza, F., Fusco, A., and Pallone, F. (1999). Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* *163*(1), 143-147.
- Mu, H., Ohta, K., Kuriyama, S., Shimada, N., Tanihara, H., Yasuda, K., and Tanaka, H. (2003). Equarin, a novel soluble molecule expressed with polarity at chick embryonic lens equator, is involved in eye formation. *Mech Dev* *120*, 143-155.
- Mullis, K. B., and Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* *155*, 335-350.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (1998). Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med* *187*, 2103-2108.
- Munder, M., Mallo, M., Eichmann, K., and Modolell, M. (2001). Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground. *Immunol Lett* *75*, 159-160.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* *4*, 1449-1452.
- Nahar, I. K., Shojania, K., Marra, C. A., Alamgir, A. H., and Anis, A. H. (2003). Infliximab treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. *Ann Pharmacother* *37*, 1256-1265.
- Nakamura, K., Okamura, H., Wada, M., Nagata, K., and Tamura, T. (1989). Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun* *57*(2), 590-595.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. (2001a). Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* *12*, 53-72.
- Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Tsutsui, H., and Okamura, H. (2001b). Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* *19*, 423-474.
- Nakano, H., Yanagita, M., and Gunn, M. D. (2001). CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* *194*, 1171-1178.
- Neighbors, M., Xu, X., Barrat, F. J., Ruuls, S. R., Churakova, T., Debets, R., Bazan, J. F., Kastelein, R. A., Abrams, J. S., and O'Garra, A. (2001). A critical role for interleukin 18 in primary and memory effector responses to *Listeria monocytogenes* that extends beyond its effects on Interferon gamma production. *J Exp Med* *194*, 343-354.
- Netea, M. G., Kullberg, B. J., Verschueren, I., and Van Der Meer, J. W. (2000). Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol* *30*, 3057-3060.

- Nikolic, T., Dingjan, G. M., Leenen, P. J., and Hendriks, R. W. (2002). A subfraction of B220(+) cells in murine bone marrow and spleen does not belong to the B cell lineage but has dendritic cell characteristics. *Eur J Immunol* 32, 686-692.
- North, R. J., Dunn, P. L., and Conlan, J. W. (1997). Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. *Immunol Rev* 158, 27-36.
- Ohki-Hamazaki, H., Watase, K., Yamamoto, K., Ogura, H., Yamano, M., Yamada, K., Maeno, H., Imaki, J., Kikuyama, S., Wada, E., and Wada, K. (1997). Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature* 390, 165-169.
- Okamura, H., Tsutsi, H., Komatsu, T., Yutsudo, M., Hakura, A., Tanimoto, T., Torigoe, K., Okura, T., Nukada, Y., and Hattori, K. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378, 88-91.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., and Nakaya, R. (1990). A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 98(3), 694-702.
- Olee, T., Hashimoto, S., Quach, J., and Lotz, M. (1999). IL-18 is produced by articular chondrocytes and induces proinflammatory and catabolic responses. *J Immunol* 162, 1096-1100.
- Orlofsky, A., Berger, M. S., and Prystowsky, M. B. (1991). Novel expression pattern of a new member of the MIP-1 family of cytokine-like genes. *Cell Regul* 2, 403-412.
- Orlofsky, A., Lin, E. Y., and Prystowsky, M. B. (1994). Selective induction of the beta chemokine C10 by IL-4 in mouse macrophages. *J Immunol* 152, 5084-5091.
- Papadimitriou, J. M., and Matz, L. R. (1979). The origin of multinucleate giant cells in myeloma kidney from mononuclear phagocytes: an ultrastructural study. *Pathology* 11, 583-593.
- Parnet, P., Garka, K. E., Bonnert, T. P., Dower, S. K., and Sims, J. E. (1996). IL-1Rrp is a novel receptor-like molecule similar to the type I interleukin-1 receptor and its homologues T1/ST2 and IL-1R AcP. *J Biol Chem* 271, 3967-3970.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., and Romagnani, S. (1997). Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol* 150, 823-832.
- Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K., and Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4489-4494.
- Penna, G., and Adorini, L. (2000). 1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol* 164, 2405-2411.
- Pfeffer, K., and Mak, T. W. (1994). Lymphocyte ontogeny and activation in gene targeted mutant mice. *Annu Rev Immunol* 12, 367-411.

- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Kronke, M., and Mak, T. W. (1993). Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* 73, 457-467.
- Pizarro, T. T., Michie, M. H., Bentz, M., Woraratanadharm, J., Smith, M. F. J., Foley, E., Moskaluk, C. A., Bickston, S. J., and Cominelli, F. (1999). IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 162(11), 6829-6835.
- Plater-Zyberk, C., Joosten, L. A., Helsen, M. M., Sattouet-Roche, P., Siegfried, C., Alouani, S., van De Loo, F. A., Graber, P., Aloni, S., Cirillo, R., *et al.* (2001). Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced model of arthritis. *J Clin Invest* 108, 1825-1832.
- Pooley, J. L., Heath, W. R., and Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* 166, 5327-5330.
- Pope, C., Kim, S. K., Marzo, A., Masopust, D., Williams, K., Jiang, J., Shen, H., and Lefrancois, L. (2001). Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 166, 3402-3409.
- Portnoy, D. A., Auerbuch, V., and Glomski, I. J. (2002). The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: the intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. *J Cell Biol* 158, 409-414.
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1993). Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice. *Int Immunol* 5(11), 1461-1471.
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L. B., and Coffman, R. L. (1994). Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1, 553-562.
- Pulendran, B., Lingappa, J., Kennedy, M. K., Smith, J., Teepe, M., Rudensky, A., Maliszewski, C. R., and Maraskovsky, E. (1997). Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J Immunol* 159, 2222-2231.
- Pulendran, B., Smith, J. L., Caspary, G., Brasel, K., Pettit, D., Maraskovsky, E., and Maliszewski, C. R. (1999). Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1036-1041.
- Puren, A. J., Fantuzzi, G., Gu, Y., Su, M. S., and Dinarello, C. A. (1998). Interleukin-18 (IFN γ -inducing factor) induces IL-8 and IL-1 β via TNF α production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 101, 711-721.
- Rajewsky, K., Gu, H., Kuhn, R., Betz, U. A., Muller, W., Roes, J., and Schwenk, F. (1996). Conditional gene targeting. *J Clin Invest* 98, 600-603.

- Rave, N., Crkvenjakov, R., and Boedtker, H. (1979). Identification of procollagen mRNAs transferred to diazobenzyloxymethyl paper from formaldehyde agarose gels. *Nucleic Acids Res* 6, 3559-3567.
- Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., They, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189, 371-380.
- Rescigno, M., and Borrow, P. (2001). The host-pathogen interaction: new themes from dendritic cell biology. *Cell* 106, 267-270.
- Rescigno, M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2000). Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1β, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med* 192, 1661-1668.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1, 362-368.
- Rusch, S. L., and Kendall, D. A. (1995). Protein transport via amino-terminal targeting sequences: common themes in diverse systems. *Mol Membr Biol* 12, 295-307.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Sakaguchi, M. (1997). Eukaryotic protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* 8, 595-601.
- Sakao, Y., Takeda, K., Tsutsui, H., Kaisho, T., Nomura, F., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S. (1999). IL-18-deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock. *Int Immunol* 11(3), 471-480.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182, 389-400.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.
- Sallusto, F., and Lanzavecchia, A. (2002). The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Res* 4 Suppl 3, S127-132.

- Sallusto, F., Lenig, D., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. (1998). Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* *187*, 875-883.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, Plainview, NY.
- Santini, S. M., Lapenta, C., Logozzi, M., Parlato, S., Spada, M., Di Pucchio, T., and Belardelli, F. (2000). Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *J Exp Med* *191*, 1777-1788.
- Scheicher, C., Mehlig, M., Dienes, H. P., and Reske, K. (1995). Uptake of microparticle-adsorbed protein antigen by bone marrow-derived dendritic cells results in up-regulation of interleukin-1 alpha and interleukin-12 p40/p35 and triggers prolonged, efficient antigen presentation. *Eur J Immunol* *25*, 1566-1572.
- Schlech, W. F. (1996). Pathogenesis and immunology of *Listeria monocytogenes*. *Pathol Biol (Paris)* *44*, 775-782.
- Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5857-5864.
- Schwarze, S. R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S. F. (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* *285*, 1569-1572.
- Seki, E., Tsutsui, H., Tsuji, N. M., Hayashi, N., Adachi, K., Nakano, H., Futatsugi-Yumikura, S., Takeuchi, O., Hoshino, K., Akira, S., *et al.* (2002). Critical roles of myeloid differentiation factor 88-dependent proinflammatory cytokine release in early phase clearance of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Immunol* *169*, 3863-3868.
- Sessa, A., Torri Tarelli, L., Meroni, M., Ferrario, G., Giordano, F., and Volpi, A. (1984). Multinucleated giant cells in myeloma kidney: an ultrastructural study. *Appl Pathol* *2*, 185-194.
- Shi, F. D., Takeda, K., Akira, S., Sarvetnick, N., and Ljunggren, H. G. (2000). IL-18 directs autoreactive T cells and promotes autodestruction in the central nervous system via induction of IFN-gamma by NK cells. *J Immunol* *165*(6), 3099-3104.
- Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 10104-10108.
- Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem* *269*, 32678-32684.
- Siegmund, B., Fantuzzi, G., Rieder, F., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H. A., Hartmann, G., Dinarello, C. A., Endres, S., and Eigler, A. (2001a). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *281*, R1264-1273.
- Siegmund, B., Lehr, H. A., Fantuzzi, G., and Dinarello, C. A. (2001b). IL-1 beta -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 13249-13254.

- Siegmund, B., Rieder, F., Albrich, S., Wolf, K., Bidlingmaier, C., Firestein, G. S., Boyle, D., Lehr, H. A., Loher, F., Hartmann, G., *et al.* (2001c). Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 296, 99-105.
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 6, 175-182.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98, 503-517.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287-292.
- Steinman, R. M., and Witmer, M. D. (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 5132-5136.
- Sternberg, N. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. *J Mol Biol* 150, 603-608.
- Sternberg, N., and Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-486.
- Sternberg, N., Hamilton, D., and Hoess, R. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* 150, 487-507.
- Stoll, S., Jonuleit, H., Schmitt, E., Muller, G., Yamauchi, H., Kurimoto, M., Knop, J., and Enk, A. H. (1998). Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* 28, 3231-3239.
- Strausberg, R. L., Feingold, E. A., Grouse, L. H., Derge, J. G., Klausner, R. D., Collins, F. S., Wagner, L., Shenmen, C. M., Schuler, G. D., Altschul, S. F., *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 16899-16903.
- Suryaprasad, A. G., and Prindiville, T. (2003). The biology of TNF blockade. *Autoimmun Rev* 2, 346-357.
- Suss, G., and Shortman, K. (1996). A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med* 183, 1789-1796.
- Swain, S. L. (2001). Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. *J Exp Med* 194, F11-14.
- Takeda, K., Tsutsui, H., Yoshimoto, T., Adachi, O., Yoshida, N., Kishimoto, T., Okamura, H., Nakanishi, K., and Akira, S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity* 8(1), 383-390.

- Takeuchi, M., Nishizaki, Y., Sano, O., Ohta, T., Ikeda, M., and Kurimoto, M. (1997). Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor ("interleukin-18") in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res* 289, 499-503.
- Targan, S. R., and Murphy, L. K. (1995). Clarifying the causes of Crohn's. *Nat Med* 1, 1241-1243.
- Ten Hove, T., Corbaz, A., Amitai, H., Aloni, S., Belzer, I., Graber, P., Drillenburger, P., van Deventer, S. J., Chvatchko, Y., and Te Velde, A. A. (2001). Blockade of endogenous IL-18 ameliorates TNBS-induced colitis by decreasing local TNF-alpha production in mice. *Gastroenterology* 121, 1372-1379.
- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G., and Weissman, I. L. (2000). Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 290, 2152-2154.
- Tripp, C. S., Gately, M. K., Hakimi, J., Ling, P., and Unanue, E. R. (1994). Neutralization of IL-12 decreases resistance to *Listeria* in SCID and C.B-17 mice. Reversal by IFN-gamma. *J Immunol* 152, 1883-1887.
- Tsuji, N. M., Tsutsui, H., Seki, E., Kuida, K., Okamura, H., Nakanishi, K., and Flavell, R. A. (2004). Roles of caspase-1 in *Listeria* infection in mice. *Int Immunol* 16, 335-343.
- Tsuji, S., Matsumoto, M., Takeuchi, O., Akira, S., Azuma, I., Hayashi, A., Toyoshima, K., and Seya, T. (2000). Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun* 68, 6883-6890.
- Ujike, A., Takeda, K., Nakamura, A., Ebihara, S., Akiyama, K., and Takai, T. (2002). Impaired dendritic cell maturation and increased T(H)2 responses in PIR-B(-/-) mice. *Nat Immunol* 3, 542-548.
- Unanue, E. R. (1993). *Fundamental Immunology*, Third Edition edn (New York, Raven Press Ltd.).
- Unanue, E. R. (1996). Macrophages, NK cells and neutrophils in the cytokine loop of *Listeria* resistance. *Res Immunol* 147, 499-505.
- Unanue, E. R. (1997a). Inter-relationship among macrophages, natural killer cells and neutrophils in early stages of *Listeria* resistance. *Curr Opin Immunol* 9, 35-43.
- Unanue, E. R. (1997b). Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev* 158, 11-25.
- Unanue, E. R. (1997c). Why listeriosis? A perspective on cellular immunity to infection. *Immunol Rev* 158, 5-9.
- Van den Brande, J. M., Braat, H., van den Brink, G. R., Versteeg, H. H., Bauer, C. A., Hoedemaeker, I., van Montfrans, C., Hommes, D. W., Peppelenbosch, M. P., and van Deventer, S. J. (2003). Infliximab but not etanercept induces apoptosis in lamina propria T-lymphocytes from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 124, 1774-1785.

- Vincent, M. S., Leslie, D. S., Gumperz, J. E., Xiong, X., Grant, E. P., and Brenner, M. B. (2002). CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* *3*, 1163-1168.
- Vremec, D., Pooley, J., Hochrein, H., Wu, L., and Shortman, K. (2000). CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen. *J Immunol* *164*, 2978-2986.
- Vremec, D., and Shortman, K. (1997). Dendritic cell subtypes in mouse lymphoid organs: cross-correlation of surface markers, changes with incubation, and differences among thymus, spleen, and lymph nodes. *J Immunol* *159*, 565-573.
- Wahl, G. M., Stern, M., and Stark, G. R. (1979). Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 3683-3687.
- Waldo, G. S., Standish, B. M., Berendzen, J., and Terwilliger, T. C. (1999). Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* *17*, 691-695.
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* *15*, 821-850.
- Wei, X. Q., Leung, B. P., Niedbala, W., Piedrafita, D., Feng, G. J., Sweet, M., Dobbie, L., Smith, A. J., and Liew, F. Y. (1999). Altered immune responses and susceptibility to *Leishmania major* and *Staphylococcus aureus* infection in IL-18-deficient mice. *J Immunol* *163*(5), 2821-2828.
- Wild, J. S., Sigounas, A., Sur, N., Siddiqui, M. S., Alam, R., Kurimoto, M., and Sur, S. (2000). IFN-gamma-inducing factor (IL-18) increases allergic sensitization, serum IgE, Th2 cytokines, and airway eosinophilia in a mouse model of allergic asthma. *J Immunol* *164*(5), 2701-2710.
- Wirtz, S., Becker, C., Blumberg, R., Galle, P. R., and Neurath, M. F. (2002). Treatment of T cell-dependent experimental colitis in SCID mice by local administration of an adenovirus expressing IL-18 antisense mRNA. *J Immunol* *168*, 411-420.
- Wu, L., D'Amico, A., Hochrein, H., O'Keeffe, M., Shortman, K., and Lucas, K. (2001). Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors. *Blood* *98*, 3376-3382.
- Wurst, W., and Joyner, A. L. (1993). Production of targeted embryonic stem cell clones. In *Gene targeting: A practical approach* (Oxford, Oxford University press).
- Xu, D., Trajkovic, V., Hunter, D., Leung, B. P., Schulz, K., Gracie, J. A., McInnes, I. B., and Liew, F. Y. (2000). IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur J Immunol* *30*, 3147-3156.
- Yoshimoto, T., Takeda, K., Tanaka, T., Ohkusu, K., Kashiwamura, S., Okamura, H., Akira, S., and Nakanishi, K. (1998). IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* *161*(7), 3400-3407.

7. Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei all denen bedanken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Irmgard Förster für die Möglichkeit, diese Arbeit in ihrem Labor anzufertigen sowie für die exzellente Betreuung und die kontinuierliche Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Dr. h.c. Hermann Wagner möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit, am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München diese Arbeit anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wurst möchte ich danken für die freundliche Betreuung meiner Arbeit von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

Bedanken möchte ich mich auch bei Kathrin Linkemann für die Durchführung der Listerieninfektionen.

Allen Kollegen, besonders dem Labor Förster möchte ich für ihre stetige Hilfsbereitschaft danken.

Insbesondere gilt mein Dank Sabine Paul für die ausgezeichnete technische Unterstützung und Susie Weiss für Ihre Hilfe v.a. bei der Generierung der chimären Mäuse. Meinen (Ex-) Kollegen: Dr. Judith Alferink (für die großartigen Vorarbeiten beim Thema A21/D2), Andrea Behrens, Sabine Brauer, Inge Brosch, Claudia Buffleben, Steffi Förster, Dr. Sonja Seewald und Susi Sonnenhauser.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Wolfgang Reindl für die großartige Unterstützung bei zahlreichen Fragen und Problemen der Immunologie, Medizin, Computertechnik usw.

Last but not least möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre Unterstützung und das in mich gesetzte Vertrauen bedanken.

8. Anhang

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind zum Teil veröffentlicht:

Lochner, M., and Forster, I. (2002). Anti-interleukin-18 therapy in murine models of inflammatory bowel disease. *Pathobiology* 70, 164-169.

Lochner, M., Wagner, H., Classen, M., and Forster, I. (2002). Generation of neutralizing mouse anti-mouse IL-18 antibodies for inhibition of inflammatory responses in vivo. *J Immunol Methods* 259, 149-157.