

**Hepatische Überexpression des Interleukin-18  
in transgenen Mäusen und dessen  
biologische und immunologische Funktion**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität  
in Mainz

Tatiana Yakovleva  
geb. in Moskau

Mainz, 2005

Mündliche Prüfung: Mainz, den 10. Februar 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Biologische Eigenschaften von IL-18 . . . . .	1
1.1.1	Die Rolle von IL-18 in der Th1-Differenzierung und IFN- $\gamma$ -Produktion	2
1.1.2	Proinflammatorische Eigenschaften von IL-18 . . . . .	3
1.1.3	Einfluß von IL-18 auf die zytotoxische Aktivität von Immunzellen .	4
1.1.4	IL-18 und die Th2-Immunantwort . . . . .	4
1.2	Die Expression von IL-18 . . . . .	5
1.3	Posttranslationale Modifikation von IL-18 . . . . .	6
1.3.1	Caspase-1-abhängige Prozessierung von IL-18 . . . . .	7
1.3.2	Prozessierung und Inaktivierung von IL-18 durch andere Proteinasen	7
1.4	IL-18 Rezeptor und Signaltransduktion . . . . .	8
1.5	Die Rolle von IL-18 bei Leberschädigung . . . . .	10
1.5.1	Endotoxin-induzierter Leberschaden . . . . .	10
1.5.2	Fas/FasL-abhängiger Leberschaden . . . . .	11
1.5.3	Virale Hepatitis . . . . .	12
1.5.4	Autoimmunerkrankungen der Leber . . . . .	12
<b>2</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Materialien</b>	<b>15</b>
3.1	Anorganika und Organika . . . . .	15
3.2	Reagenzien für Molekularbiologie . . . . .	17
3.3	Oligonukleotide (Metabion, Heidelberg) . . . . .	18
3.4	Antikörper . . . . .	19
3.5	Zytokine . . . . .	19
3.6	Verbrauchsmaterial . . . . .	20
3.7	Geräte . . . . .	21
3.8	Puffer und Lösungen . . . . .	22
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>28</b>
4.1	Generierung transgener Mäuse . . . . .	28
4.1.1	Klonierung der Konstrukte . . . . .	28

4.1.2	Präparation von Injektions-DNS . . . . .	30
4.1.3	Mikroinjektion . . . . .	31
4.1.4	Zucht und Selektion der Tiere . . . . .	31
4.2	Herstellung von rekombinantem IL-18 . . . . .	32
4.2.1	Expressionssystem . . . . .	32
4.2.2	Klonierung von proIL-18 in den pET-30a(+)-Vektor . . . . .	32
4.2.3	Expression von rekombinantem proIL-18 . . . . .	33
4.2.4	Aufreinigung des rekombinanten Proteins . . . . .	34
4.3	Molekularbiologische Methoden . . . . .	35
4.3.1	DNS-Präparation . . . . .	35
4.3.2	DNS-Restriktion und Gelelektrophorese . . . . .	35
4.3.3	Ligation und Transformation . . . . .	35
4.3.4	Konservieren der Bakterienklone . . . . .	35
4.3.5	Polymerasekettenreaktion . . . . .	36
4.4	Proteinchemische Methoden . . . . .	36
4.4.1	Isolierung der Proteine und Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	36
4.4.2	Western-Blot . . . . .	36
4.4.3	Sandwich Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) . . . . .	37
4.4.4	Herstellung von monoklonalen anti-IL-18 Antikörpern . . . . .	38
4.5	Zellkulturtechniken . . . . .	39
4.5.1	Isolierung primärer Hepatozyten . . . . .	39
4.6	Histologische Arbeiten . . . . .	40
4.6.1	Hematoxylin-Eosin Färbung . . . . .	40
4.6.2	Pikro-Siriusrot-Färbung nach Puchtler . . . . .	40
4.6.3	Immunhistochemische Färbung . . . . .	41
4.7	Tierversuche . . . . .	42
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
5.1	Herstellung von rekombinantem inaktivem IL-18 . . . . .	43
5.2	Nachweis der IL-18 Expression in parenchymatösen und nichtparenchymatösen Leberzellen . . . . .	46
5.2.1	Western-Blot-Analyse von Zellysaten . . . . .	46
5.2.2	Immunhistochemische Färbung von IL-18 in der Leber . . . . .	47

5.3	Generierung transgener Mäuse . . . . .	48
5.3.1	Klonierung von IL-18 in die Expressionskassette . . . . .	48
5.3.2	Detektion von IL-18-transgenen Founder-Tieren . . . . .	48
5.3.3	Transgen-Expression von IL-18 auf Proteinebene . . . . .	50
5.4	Phänotyp transgener Mäuse . . . . .	56
5.4.1	Leberhistologie . . . . .	56
5.5	LPS-abhängiger Leberschaden mit und ohne Präkonditionierung mit CpG .	64
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>72</b>
6.1	Physiologische Expression von IL-18 in Hepatozyten . . . . .	73
6.2	Hepatozytenspezifische Überexpression der inaktiven Form von IL-18 im proIL-18-transgenen Mausmodell . . . . .	74
6.3	Hepatozytenspezifische Überexpression der aktiven Form von IL-18 in trans- genen Mäusen . . . . .	76
6.4	LPS-abhängiger Leberschaden mit und ohne Präkonditionierung mit CpG- Oligonukleotiden . . . . .	79
6.5	Bedeutung des IL-18-transgenen Mausmodells für das Verständnis der Rolle von IL-18 in der Leber. Ausblick. . . . .	83
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
	<b>Literatur</b>	<b>85</b>

# Abbildungsverzeichnis

1	Biologische Eigenschaften von IL-18. . . . .	2
2	Die Prozessierung von IL-18. . . . .	6
3	Caspase-1-unabhängige Sekretion von reifem IL-18 nach Fas-Ligation. . . . .	8
4	Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion von IL-18. . . . .	9
5	Darstellung der cDNS-Sequenz von murinem IL-18. . . . .	28
6	Fusionsgen der aktiven Form von IL-18 mit <i>IgG-kappa leader sequence</i> (SP-IL-18). . . . .	29
7	Darstellung der Injektions-DNS im Agarosegel. . . . .	30
8	Die PCR-Bedingungen. . . . .	36
9	Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET-30a(+) mit inaktivem IL-18 (proIL-18). . . . .	43
10	Darstellung von rekombinantem proIL-18 aus <i>inclusion bodies</i> im Western Blot. . . . .	44
11	Darstellung von rekombinantem proIL-18 im Western Blot nach der Aufreinigung durch die Ni-NTA-Säule. . . . .	44
12	Erkennung von rekombinantem proIL-18 im Western Blot durch IL-18-spezifischen Antikörper. . . . .	45
13	Western-Blot-Analyse der Expression von IL-18 in parenchymatösen und nichtparenchymatösen Zellen. . . . .	46
14	Immunhistochemische Färbung des IL-18 von Paraffinschnitten aus muriner Wildtyp-Leber. . . . .	47
15	Schematische Darstellung der hepatozytenspezifischen Transgenkonstrukte der inaktiven bzw. aktiven Form von IL-18. . . . .	49
16	Polymerase Kettenreaktion mit genomischer DNS aus Ohrbiopsien von Foundertieren. . . . .	50
17	Western Blot-Analyse der Expression von IL-18 in Hepatozyten von proIL-18-transgenen (A) und FLAG-IL-18-transgenen Mäusen (B). . . . .	51
18	Immunhistochemische Färbung des IL-18 von Paraffinschnitten aus muriner Leber. . . . .	52
19	IL-18-ELISA von Seren der SP-IL-18-transgenen Mäuse. . . . .	54
20	<i>In vivo</i> -Neutralisation der aktiven Form von IL-18. . . . .	54

21	Nachweis von IL-18 im Serum von SP-IL-18-transgenen Mäusen. . . . .	55
22	Gegenüberstellung der Transaminasenwerte von Wildtyptieren und transgenen Tieren. . . . .	56
23	Leberhistologie von proIL-18-transgenen Mäusen. . . . .	58
24	Immunhistochemische Färbung von Kupffer-Zellen. . . . .	59
25	Pikro-Siriusrot-Färbung nach Puchtler von der Leber proIL-18-transgener Mäuse. . . . .	60
26	Leberhistologie von FLAG-IL-18-transgenen Mäusen. . . . .	62
27	Pikro-Siriusrot-Färbung nach Puchtler von der Leber FLAG-IL-18-transgener Mäuse. . . . .	63
28	Leberhistologie von SP-IL-18-transgenen Mäusen im Alter von 10 Lebenswochen. . . . .	63
29	Schematische Darstellung einer LPS-abhängigen Leberschädigung. . . . .	65
30	Serumwerte von IL-18 nach Behandlung von proIL-18-transgenen und SP-IL-18-transgenen Mäusen mit LPS mit und ohne Präkonditionierungsphase. . . . .	66
31	Darstellung von IFN- $\gamma$ -Werten im Serum der Mäuse bei LPS-abhängigem Leberschaden. . . . .	67
32	Darstellung der Serumwerte von TNF- $\alpha$ . . . . .	67
33	Leberschädigung, verursacht durch LPS mit und ohne Präkonditionierung mit CpG. . . . .	68
34	Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht. . . . .	69
35	Leberhistologie . . . . .	71

# Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AIH	Autoimmune Hepatitis
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	Copy Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Schwefeloxid
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fötale Kälberserum
FLAG-IL-18	Fusionsprotein der aktiven Form des IL-18 mit FLAG
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
h	Stunde
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
ICAM	<i>Intracellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGIF	<i>IFN-<math>\gamma</math> inducing factor</i>
IL	Interleukin
IL-18BP	IL-18 Binding Protein
IL-18R	IL-18-Rezeptor
i.p.	Intraperitoneal
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
IRAK	<i>IL-1 receptor associated kinase</i>
kDa	Kilodalton

LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
ME	Mercaptoethanol
mRNS	Messenger Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
NIK	<i>NF<math>\kappa</math>B-inducing kinase</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
N-Terminal	Aminoterminal
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pg	Pikogramm
proIL-18	inaktive Form des IL-18
PSC	Primär sklerosierende Cholangitis
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SP	Signalpeptid
SP-IL-18	Fusionsprotein der aktiven Form von IL-18 mit Signalpeptid
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tg	transgene Maus
Th0	naive T-Zellen
Th1/Th2	T-Helfer-Zellen vom Typ 1 bzw. 2
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	<i>Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

Das Immunsystem dient der Abwehr von Krankheitserregern wie Viren, Bakterien und Parasiten. Gleichwohl gibt es Hinweise, daß auch körpereigene Zellen z.B. bei der Tumorentwicklung durch das Immunsystem kontrolliert werden. Eine wichtige Rolle spielen dabei sowohl zelluläre (z.B. T-Zellen) als auch humorale Faktoren (wie Interleukine), die sich wechselseitig regulieren können.

Man unterscheidet bei den Interleukinen wie auch bei anderen Zytokinen proinflammatorische (Th1) von antiinflammatorischen (Th2) Interleukinen, von denen erstere eine Entzündung auslösen oder verstärken und letztere eine Entzündungsreaktion abschwächen oder beenden können. Einige Zytokine haben in Abhängigkeit des jeweiligen Zytokinenmilieus entweder eine proinflammatorische oder eine antiinflammatorische Wirkung. Eine Verschiebung des Th1-/Th2-Gleichgewichts ist bei Allergien, Autoimmun- und Infektionskrankungen zu beobachten.

In der Leber kommt es vorzugsweise zu einer antiinflammatorischen Th2-Immunantwort, was z.B. die Persistenz von Viren bei chronischen Viruskrankheiten der Leber begünstigen könnte. Es wird angenommen, daß hierfür das Zytokinenmilieu in der Leber verantwortlich ist. Interleukin-18 (IL-18) könnte ein wesentlicher Faktor bei der Regulierung des Th1/Th2-Gleichgewichts in der Leber sein. IL-18 wurde eine Bedeutung bei verschiedenen Lebererkrankungen zugeschrieben, die genauen Mechanismen sind jedoch nicht geklärt.

## 1.1 Biologische Eigenschaften von IL-18

IL-18 wurde zum ersten Mal 1995 als *IFN- $\gamma$  inducing factor* (IGIF) in Kupffer-Zellen von Mäusen beschrieben, die sequentiell mit *Propionibacterium acnes* und LPS behandelt wurden. Diese Mäuse zeigten einen ausgeprägten Phänotyp mit schwerer Leberschädigung als Ergebnis einer IL-18 abhängigen Entzündungsreaktion (Okamura H. et al., 1995). Später wurde gezeigt, daß IL-18 sowohl die Th-1 als auch die Th-2 Differenzierung in Abhängigkeit vom jeweiligen Zytokinenmilieu beeinflussen kann (Nakanishi K. et al., 2001) (Abb. 1).

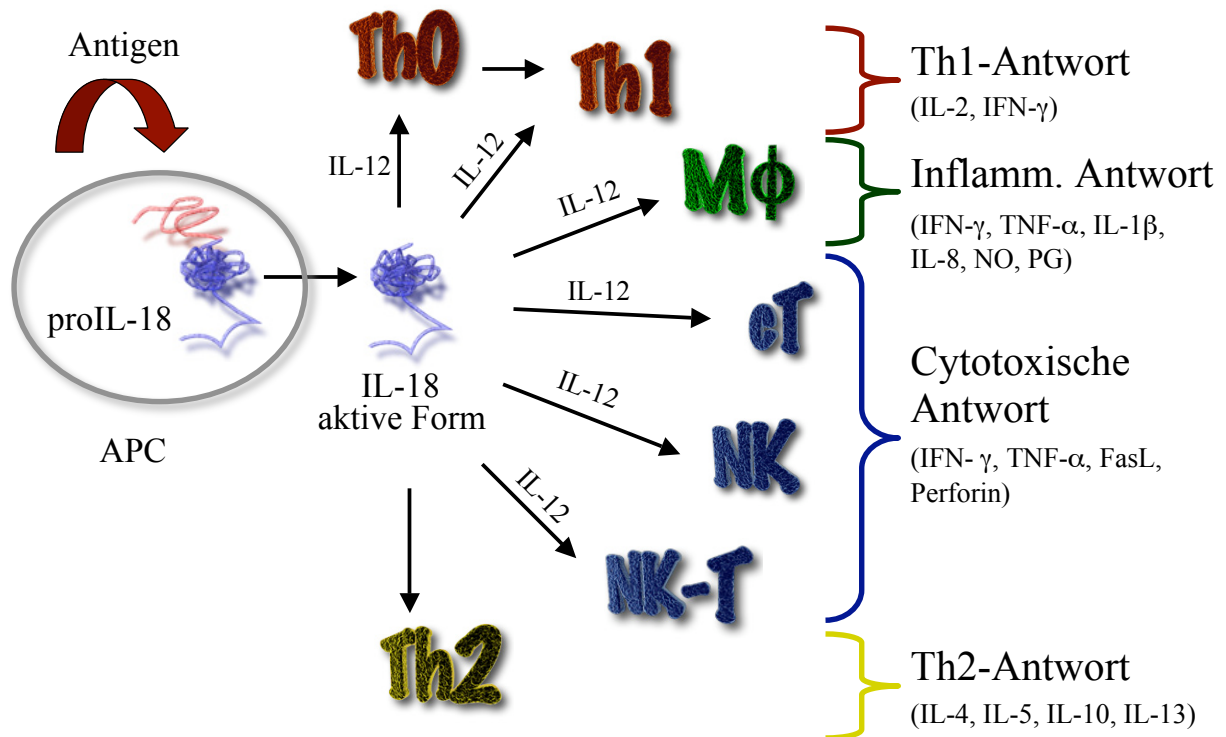


Abbildung 1: Biologische Eigenschaften von IL-18.

### 1.1.1 Die Rolle von IL-18 in der Th1-Differenzierung und IFN- $\gamma$ -Produktion

Die Differenzierung von naiven CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten (Th0) in Th-1- oder Th-2-Effektorzellen wird u.a. durch das lokale Zytokinmilieu beeinflusst. So führt IL-12 zur Th-1-Differenzierung und IFN- $\gamma$ -Produktion in T-Zellen (Trinchieri G., 1998), die durch Anwesenheit von IL-18 noch deutlich gesteigert werden kann (Kohno K. et al., 1997; Robinson D. et al., 1997; Micallef M.J. et al., 1996). IL-12-defiziente Mäuse sowie IL-18-defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Produktion von IFN- $\gamma$  und eine defekte Th1-Antwort *in vivo* nach Stimulation mit Endotoxin (Magram J. et al., 1996; Takeda K. et al., 1998). Dieser Synergismus von IL-12 und IL-18 beruht auf einer gegenseitigen Rezeptorinduktion. IL-18 führt zur Expression des IL-12-Rezeptors (Xu D. et al., 1998), und IL-12 induziert die Expression beider Ketten des IL-18-Rezeptors auf der Oberfläche von T-Zellen (Yoshimoto T. et al., 1998; Ahn H. et al., 1997; Kim S.H. et al., 2001). NK-Zellen, die im Gegensatz zu T-Zellen den IL-18-Rezeptor konstitutiv exprimieren, können IFN- $\gamma$  auch ohne IL-12 produzieren (Hyodo Y. et al., 1999; Walker W. et al., 1999).

Zudem induzieren IL-12 und IL-18 auch auf transkriptioneller Ebene synergistisch die Promoter-Aktivität von IFN- $\gamma$ . Dabei benutzen IL-12 und IL-18 zwei verschiedene

Signalwege (Barbulescu K. et al., 1998), die zur Bindung zweier verschiedener Transkriptionsfaktoren an die Promoter-Regionen führen. An humanen CD4<sup>+</sup>T-Zellen wurde gezeigt, daß IL-18 die Aktivität des IFN- $\gamma$ -Promoters über die AP-1-Region und IL-12 über den *Transducer and Activator of Transcription Binding Site 4* (STAT4) induzieren können (Robinson D. et al., 1997; Yang J. et al., 1999).

IFN- $\gamma$  wird nicht nur von Th-1-Zellen nach Stimulation mit IL-12 und IL-18 produziert, sondern auch von CD8<sup>+</sup>T-Zellen (Okamoto I. et al., 1999; Tomura M. et al., 1998), NK-Zellen (Hunter C. et al., 1997), aktivierten B-Zellen (Yoshimoto T. et al., 1997) und von Makrophagen (Munder M. et al., 1998).

### 1.1.2 Proinflammatorische Eigenschaften von IL-18

IL-18 wird in antigenpräsentierenden Zellen konstitutiv produziert und bei einer Entzündung in die aktive Form prozessiert. Biologisch aktives IL-18 induziert aber nicht nur die Produktion von IFN- $\gamma$ , sondern auch von anderen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-8 und IL-1 $\beta$  (Puren A.J. et al., 1998).

Darüberhinaus führt IL-18 zur Produktion von Chemokinen, Chemoattraktor-Proteinen, die besonders die Wanderung und Aktivierung von Phagozyten und Lymphozyten bei Entzündungsreaktionen stimulieren. Zu den von IL-18 induzierbaren Chemokinen gehören IL-8 (ein Chemoattraktor für Neutrophile), MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$* ) und MCP-1 (*Monocyte Chemoattractant Protein 1*) (Puren A.J. et al., 1998; Fehniger T.A. et al., 1999).

IL-18 führt zur Produktion von Prostaglandinen (PG), Entzündungsmediatoren, die Membranphospholipide abbauen und Stickstoffoxid (NO), das eine breite antimikrobielle Aktivität besitzt.

Es wurde gezeigt, daß IL-18 die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1) erhöht, die die Bindung von Leukozyten an die Endothelzellen bei einer Entzündung ermöglichen (Kohka H. et al., 1998). Dies weist auf eine potentielle Rolle von IL-18 bei der Infiltration von immunen Zellen in das Gewebe hin.

### 1.1.3 Einfluß von IL-18 auf die zytotoxische Aktivität von Immunzellen

Die zytotoxische Aktivität von Effektor-Zellen (NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen) beruht auf einer Freisetzung bereits fertig vorliegender Proteine, wie dem porenbildenden Protein Perforin und Granzymen, die einen programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen können. Auch Fas-Ligand (FasL), der auf Effektor-Zellen (Th1- und NK-Zellen) exprimiert wird, kann nach Bindung an den Fas-Rezeptor auf Zielzellen die Apoptose auslösen. IL-18 erhöht die Perforinabhängige Zytotoxizität von NK-Zellen (Hyodo Y. et al., 1999), CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Okamoto I. et al., 1999) und NK-T-Zellen der Leber (Dao T. et al., 1998). Außerdem erhöht IL-18 die Expression von FasL auf NK-Zellen (Tsutsui H. et al., 1996) und Th1-Zellen (Dao T. et al., 1996). Der Einfluß von IL-18 auf die zytotoxische Aktivität von NK- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen könnte auf eine antitumoröse Wirkung von IL-18 hinweisen (Hashimoto W. et al., 1999).

### 1.1.4 IL-18 und die Th2-Immunantwort

IL-18 wurde in den meisten Studien als proinflammatorisches Zytokin beschrieben, das auf die Th-2 Differenzierung keinen Einfluß hat (Dinarello C.A., 1999; O'Garra A., 1998). Als eine der Begründungen dafür gilt, daß der IL-18-Rezeptor nur auf der Oberfläche von Th1-, nicht aber auf Th2-Zellen exprimiert wird (Xu D. et al., 1998). Es gibt aber Hinweise, daß IL-18 eventuell zur Expression von Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 *in vitro* und *in vivo* führen sowie die Produktion von IgE und IgG1 steigern kann (Hoshino T., et al., 1999 und 2000; Yoshimoto T. et al., 1999 und 2000; Wild J.S. et al., 2000; Xu D. et al., 2000; Leite-de-Moraes M.C. et al., 2001). Dies kann auf eine Rolle von IL-18 bei allergischen Erkrankungen hinweisen. Darüberhinaus gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von IL-18 bei der atopischen Dermatitis des Menschen (Tsutsui H. et al., 2003).

## 1.2 Die Expression von IL-18

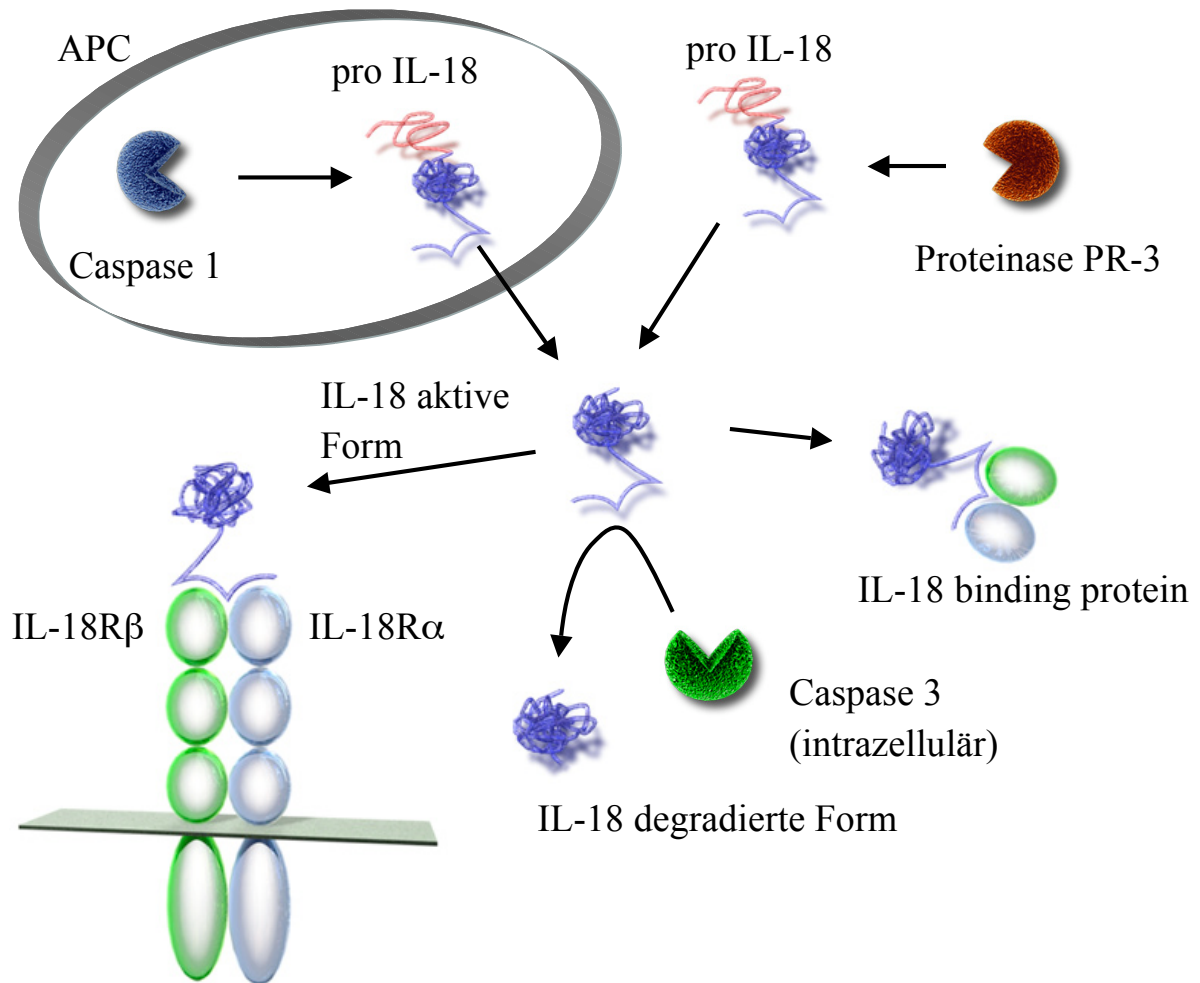
IL-18 wird nicht nur von immunkompetenten Zellen wie z.B. Makrophagen (Okamura H. et al., 1995), dendritischen Zellen (Brossart P. et al., 1998) und B-Zellen (Airoldi I. et al., 2004) exprimiert, sondern auch von einigen nichthämatopoetischen Zellen wie Keratinozyten (Stoll S. et al., 1997), Astrozyten (Conti B. et al., 1999), Osteoblasten (Udagawa N. et al., 1997) und Zellen des Zentralnervensystems (Prinz M. et al., 1999; Conti B. et al., 1997).

Die Expression der mRNA von IL-18 erfolgt konstitutiv (Okamura H. et al., 1998; Okamura H. et al., 1998; Tone M. et al., 1997), dagegen wird die mRNA von den meisten Zytokinen erst nach der Stimulation exprimiert, wie z.B. die Untereinheit p40 von IL-12 (Marshall J.D. et al., 1999; Tsutsui H. et al., 1997) oder IL-1- $\beta$  (Fantuzzi G. und Dinarello C.A., 1999; Ghayur T. et al., 1997). Diese konstitutive Expression von IL-18 in solch unterschiedlich differenzierten Zellen liegt an der Kontrolle der Gen-Expression durch zwei unterschiedliche Promotoren vom *TATA-less*-Typ, der von verschiedenen Zellen benutzt wird. Die Aktivität des einen Promoters ist konstitutiv, der andere Promoter ist induzierbar (Tone M. et al., 1997). Die Transkriptionsfaktoren für die Promotoren sind das *IFN Consensus Sequence-Binding Protein* (ICSBP) und PU.1 (Kim Y.M. et al., 1999). ICSBP wird in immunkompetenten Zellen konstitutiv exprimiert und ist auch ein Transkriptionsfaktor für die IL-12-Produktion (Giese N.A. et al., 1997; Wu C.Y. et al., 1999; Scharton-Kersten T. et al., 1997). Die Expression von ICSBP und von PU.1 wird durch IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  oder IFN- $\gamma$  hochreguliert (Sharf R. et al., 1995 und 1997; Shackelford R. et al., 1995).

Darüberhinaus besitzt IL-18 eine längere Halbwertszeit als andere Zytokine, da IL-18 nur ein mRNA-destabilisierendes Element enthält (Cosman D., 1987).

### 1.3 Posttranslationale Modifikation von IL-18

IL-18 wird in der Zelle als biologisch inaktiver Vorläufer von 24kDa produziert (proIL-18) und besitzt eine unbekannte Leadersequenz, die für den intrazellulären Transport und die Sekretion aus der Zelle notwendig ist (Okamura H. et al., 1995; Gu Y. et al., 1997). Die Aktivierung und Sekretion des reifen IL-18 aus der Zelle ist nur nach einer Spaltung des IL-18-Vorläufers durch Caspasen möglich (Abb. 2).



**Abbildung 2: Die Prozessierung von IL-18.**

Die Aktivierung von proIL-18 schließt Caspase-1 und extrazelluläre 29-kDa Serinesterase PR-3 ein. Biologisch aktives IL-18 bindet sich an den IL-18-Rezeptor, und der IL-18/IL-18R-Komplex führt zur Signaltransduktion. Bei der Inaktivierung des IL-18 sind das Binding Protein (IL-18BP), das das aktive IL-18 deaktiviert, und Caspase-3, die zur Degradierung beider Formen des IL-18 führt, beteiligt.

### 1.3.1 Caspase-1-abhängige Prozessierung von IL-18

ProIL-18 (24kDa) wird nach intrazellulärer Spaltung durch Caspase-1 (ICE) in die aktive Form von 18kDa überführt (Gu Y. et al., 1997). Caspase-1 wird wie andere Caspasen in einer biologisch inaktiven Vorläuferform produziert. Die Aktivierung des Caspase-1-Vorläufers z.B. nach der Stimulation mit LPS (Schumann R.R. et al., 1998) erfolgt autoproteolytisch (Ramage P. et al., 1995) oder durch Caspase-11 (Wang S. et al., 1998). Caspase-1-defiziente Mäuse zeigen nach sequentieller Behandlung mit *P.acnes* und LPS keine messbaren IL-18-Serumspiegel, und isolierte Kupffer-Zellen dieser Mäuse sezernieren kein reifes IL-18 in den Überstand nach der Stimulation mit *P.acnes* und LPS (Gu Y. et al., 1997).

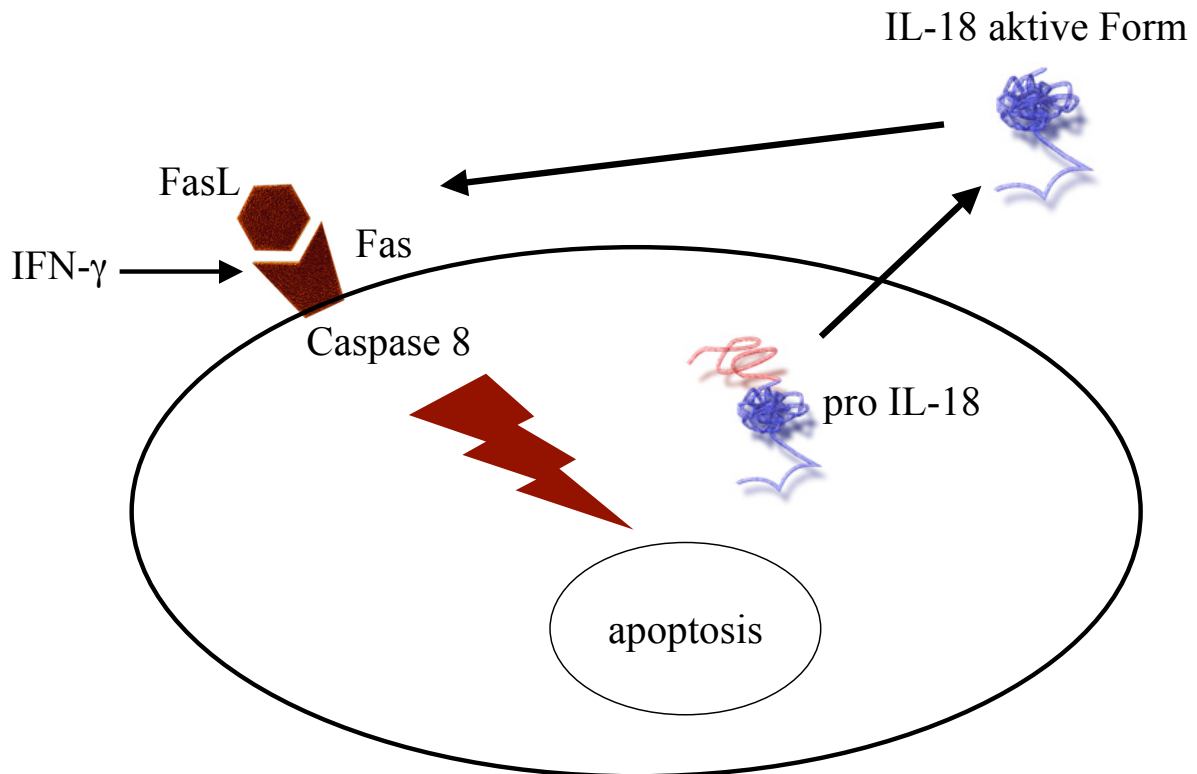
### 1.3.2 Prozessierung und Inaktivierung von IL-18 durch andere Proteinasen

Eine weitere Möglichkeit der Prozessierung von proIL-18 verläuft Caspase1-unabhängig. Nach Bindung von Fas-Ligand an den Fas-Rezeptor kommt es zur Aktivierung einer Kaskade von Caspasen (Enari M. et al., 1996; Hirata H. et al., 1998; Krammer P.H., 1999) und zu einer Sezernierung von reifem IL-18. Fas-exprimierende Kupffer-Zellen von *P.acnes*-präkonditionierten Caspase-1-defizienten Mäusen sezernieren reifes IL-18 nach Stimulation mit Fas-Ligand (Tsutsui H. et al, 1999) (Abb. 3).

Caspase-4 spaltet IL-18 intrazellulär an der gleichen Stelle wie Caspase-1, aber die Effizienz der IL-18-Aktivierung ist hundert bis tausend mal geringer als bei Caspase-1 (Gu Y. et al., 1997). Auch Proteinase-3 (PR-3), die von aktivierten Neutrophilen, Monozyten, Endothelial- und Mastzellen produziert wird, kann zur Aktivierung von proIL-18 führen.

Neben der Aktivierung von IL-18 sind Caspasen auch an der Inaktivierung von IL-18 beteiligt. Caspase-3 kann sowohl die aktive als auch die inaktive Form des IL-18 intrazellulär spalten, so daß ein degradiertes Produkt entsteht (Akita K. et al., 1997).

Bei der extrazellulären Inaktivierung von IL-18 spielt das *IL-18 binding protein* (IL-18BP) eine wichtige Rolle (Novick D. et al., 1999; Kim S.H. et al., 2000). IL-18BP wird hauptsächlich in der Milz und im Darm als Heterodimer exprimiert (Kim S.H. et al., 2000). Die  $\alpha$ -Kette bindet die aktive Form von IL-18 (Novick D. et al., 2001), die Rolle der  $\beta$ -Kette ist unklar. IL-18BP hemmt die Bindung von IL-18 an seinen Rezeptor (IL-18R) kompetitiv, was die Th1-Antwort vermindert (Novick D. et al., 1999) bzw. LPS- und Fas-vermittelten Leberschaden reduziert (Faggioni R. et al., 2001).



**Abbildung 3: Caspase-1-unabhängige Sekretion von reifem IL-18 nach Fas-Ligation.**

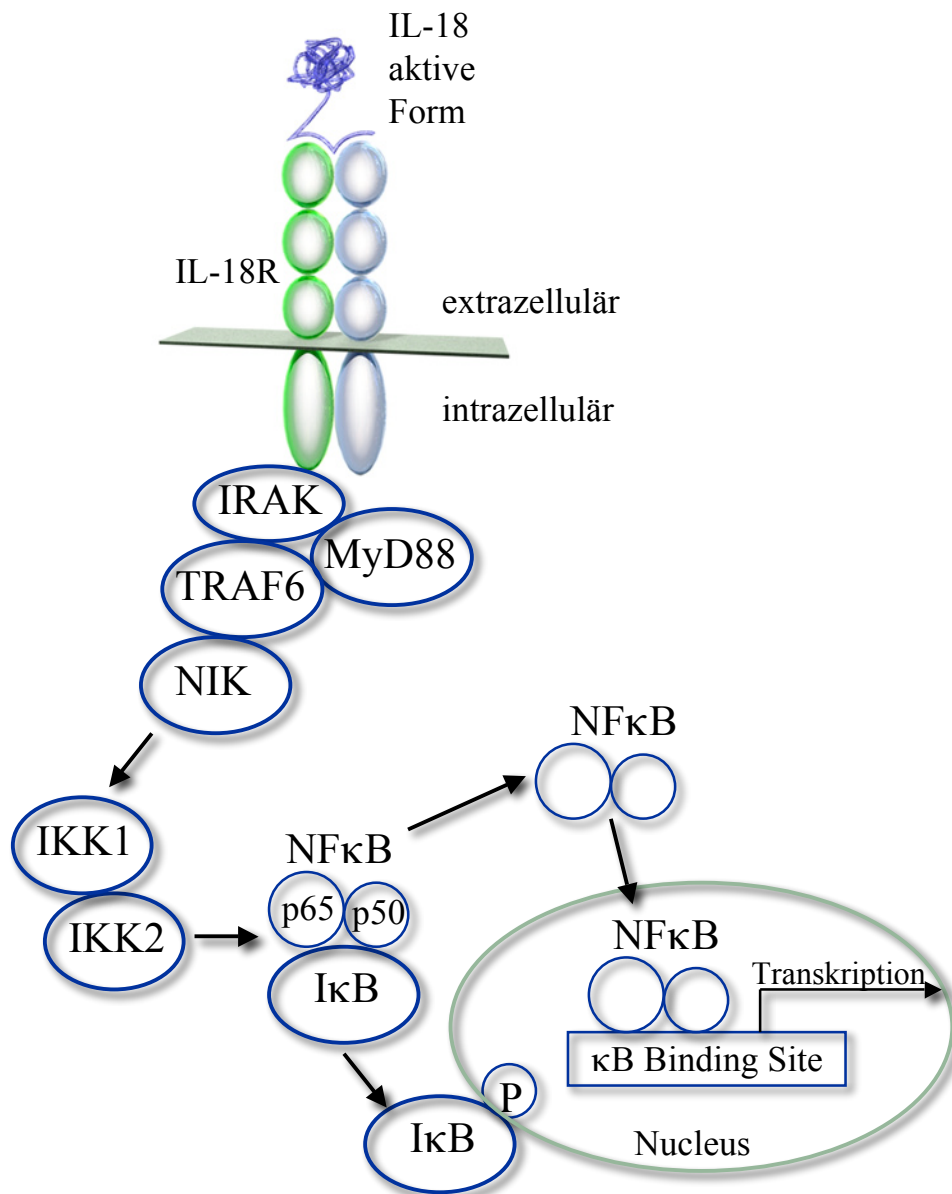
Reifes IL-18 wird aus Fas-exprimierenden Makrophagen nach der Stimulation mit FasL auf eine Caspase-1-unabhängige Weise sezerniert. Die Fas-Expression wird durch reifes IL-18 und IFN- $\gamma$  erhöht, was zu positiver Rückkopplung führen kann.

#### 1.4 IL-18 Rezeptor und Signaltransduktion

Die biologische Wirksamkeit erreicht IL-18 nach Bildung eines Komplexes mit seinem Rezeptor. Der IL-18-Rezeptor ist ein Heterodimer, dessen beide Ketten ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette) sich strukturell ähneln, die aber durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Die  $\alpha$ -Kette, die zur IL-1R-Familie gehört (Parnet P. et al., 1996), bindet IL-18 (Torigoe K. et al., 1997). Die  $\beta$ -Kette erhöht die Affinität des Rezeptors (Yoshimoto T., 1998).

Der IL-18-Rezeptor wird z.B. an der Oberfläche von Th1 T-Zellen und NK-Zellen exprimiert (Torigoe S. et al., 1997; Thomassen E. et al., 1998; Born T.L. et al., 1998), aber nicht auf Th-2-Zellen (Xu D. et al., 1998).

Die Bindung von IL-18 an IL-18R sendet ein Signal an den Zellkern, das den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B aktiviert und somit zur Transkription von verschiedenen Genen führt (z.B. IFN- $\gamma$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) (Abb. 4).



**Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion von IL-18.**

*IL-1 receptor associated kinase* (IRAK), eine Serin/Threonin-Kinase, bindet an den aktiven IL-18/IL-18R-Komplex und benötigt MyD88, ein lösliches Adaptermolekül (Adachi O. et al., 1998). MyD88 aktiviert IRAK durch Transphosphorylierung. IRAK verläßt den Rezeptor und bindet sich im Zytoplasma an das Adaptermolekül TRAF (*Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor*). Durch Bindung von TRAF zu *NFκB-inducing kinase* (NIK) wird das Signal über die Aktivierung von verschiedenen Kinasen, wie z.B. zwei IκB-Kinasen IKK1 und IKK2, weitergeleitet. IKK1 und IKK2 führen zur Phosphorylierung von IκB, einem Inhibitor von NFκB. NFκB ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten p65 und p50. IκB wird durch Phosphorylierung proteolytisch abgebaut und bewirkt somit, daß der Transkriptionsfaktor NFκB in den Kern wandern kann (Robinson D. et al., 1997). Die Bindung von NFκB an die *NFκB binding site* induziert eine Transkription von verschiedenen Genen, wie z.B. Genen von proinflammatorischen Zytokinen IFN-γ, IL-6 und TNF-α.

## 1.5 Die Rolle von IL-18 bei Leberschädigung

Die Leber ist ein multifunktionelles Organ mit komplexer immunologischer Bedeutung. Sie enthält immunkompetente Zellen wie NK-Zellen, T-Zellen, Dendritische Zellen, NK-T-Zellen, sinusoidale Endothelzellen und gewebeassoziierte Makrophagen (Kupffer-Zellen). In der Leber scheint IL-18 unter besonderen Umständen eine hepatotoxische Wirkung zu haben, deren Bedeutung und Mechanismen weitgehend unklar sind.

### 1.5.1 Endotoxin-induzierter Leberschaden

Als Endotoxin bezeichnet man Bestandteile der Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien, die von lebenden Bakterien durch Abspaltung von Vesikeln bzw. beim Absterben der Bakterien freigesetzt werden. LPS führt zu einer inflammatorischen Immunantwort mit Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1 (Dinarello C.A. et al., 1993; Morrison D.C. et al., 1987).

IL-18 wurde zum ersten Mal in Mäusen beschrieben, die sequentiell intraperitoneal (i.p.) mit hitzeinaktiviertem *Propionibacterium acnes* (einem Stimulator des retikuloendothelialen Systems und der Kupffer-Zellen der Leber) und intravenös (i.v.) mit LPS behandelt wurden (Okamura H. et al., 1995). Dies führt bei Mäusen zu einem schweren und tödlichen Leberschaden. Die meisten so behandelten Mäuse starben nach 12 Stunden, alle Mäuse ohne Präkonditionierungsphase mit *Propionibacterium acnes* sowie IL-18-defiziente Mäuse haben jedoch überlebt.

Dieses Modell besteht aus zwei Phasen: Einer Präkonditionierungsphase mit *P. acnes* und einer Effektorphase nach LPS-Verabreichung. Nach Präkonditionierung der Mäuse mit *P. acnes* findet man histologisch in der Leber Granulomen, die hauptsächlich aus Kupffer-Zellen und Makrophagen bestehen (Sakao Y. et al., 1999). Die Population von NKT-Zellen (CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup>) wird nach der Präkonditionierung aus der Leber eliminiert. Diese immunologischen Veränderungen in der Leber sind IL-12-abhängig (Matsui K. et al., 1997). Außerdem differenzieren die naiven T-Zellen der Leber in Th1-Zellen. Die Leber-T-Zellen von präkonditionierten Mäusen produzieren im Gegensatz zu den T-Zellen der Mäuse ohne Präkonditionierung während dieser Phase große Mengen von IFN- $\gamma$ , die IL-18- und IL-12-abhängig sind. Die IFN- $\gamma$ -Produktion ist entscheidend für die Granulombildung in der Präkonditionierungsphase (Tsuji H. et al., 1999). Während der Effektorphase nach Stimulation mit LPS kommt es zu einer schnellen Sezernierung von IL-12 und IL-18, die

zur weiteren Produktion von IFN- $\gamma$  hauptsächlich von hepatischen Lymphozyten führt. IFN- $\gamma$  induziert die TNF- $\alpha$ -Sekretion (Tsutsui H. et al., 1997). IL-18 kann auch die Fas-Expression induzieren, und Fas führt wiederum zu einer Induktion von IL-18-Sekretion aus Kupffer-Zellen (Tsutsui H. et al., 1997 und 1999). Diese positive Rückkopplung könnte einen möglichen Mechanismus des tödlichen Leberversagens der Mäuse zeigen.

Im Gegensatz hierzu wird die durch D-Galaktosamin- und LPS-induzierte akute Hepatitis ausschließlich durch TNF- $\alpha$  vermittelt (Car B.D. et al., 1994; Rothe J. et al., 1993; Morikawa A. et al., 1996), und sie ist IL-18-unabhängig. IL-18-defiziente Mäuse zeigen nach Gabe von D-Galaktosamin und LPS einen TNF- $\alpha$ -Serumspiegel und eine Letalität, die mit denen von Wildtypkontrollen identisch sind (Hochholzer P. et al., 2000).

Endotoxin spielt möglicherweise auch in humanen Lebererkrankungen wie z.B. bei alkoholischer Hepatitis (McClain C.J. et al., 1999; Thurman R.G., 1998) eine wichtige Rolle. Es wurde beschrieben, daß die Aufnahme von kleinen Mengen des Endotoxins einen toxischen Leberschaden erhöht, der z.B. durch Ethanol verursacht wird (Roth R.A. et al., 1997), die Bedeutung von IL-18 ist aber unklar.

### 1.5.2 Fas/FasL-abhängiger Leberschaden

Fas-Ligand (FasL) zählt zur TNF- $\alpha$ -Familie und wird von zytotoxischen T-Zellen exprimiert. FasL kann in Zellen, die den Rezeptor Fas besitzen, den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen (Ogasawara J. et al., 1993). Die Verabreichung von FasL an Mäuse führt zu einer akuten Leberschädigung. Der Effekt wird durch Präkonditionierung mit *Propionibacterium acnes* verstärkt und verläuft bei präkonditionierten Mäusen nach FasL-Verabreichung letal (Tanaka M. et al., 1997). Diese Leberschädigung ist IL-18-abhängig (Tsutsui H. et al., 1999). Eine Verabreichung mit exogenem IL-18 anstatt FasL führt auch zur Leberschädigung in *P.-acnes*-präkonditionierten IL-18-defizienten Mäusen. IL-18 führt über die Produktion von IFN- $\gamma$  zur Aktivierung von Makrophagen und damit zur Produktion von TNF- $\alpha$  und/oder FasL, was zum Zelltod (Apoptose) von Fas-exprimierenden Zellen einschließlich Hepatozyten führt (Tsutsui H., 1999). Die Bindung von Fas an den Fas-Rezeptor steigert wiederum die Produktion von IL-18 (Abb. 3).

Das Fas/FasL-System hat ebenfalls eine Bedeutung bei humanen Lebererkrankungen. Eine erhöhte Expression von Fas und FasL wird bei Patienten mit verschiedenen Krankheiten der Leber beobachtet wie bei akuten und chronischen Virushepatitiden oder Morbus Wilson (Galle P.R. et al., 1995; Tanaka M. et al., 1996; Kondo T. et al., 1997;

Strand S. et al., 1998). Löslicher FasL ist auch im Serum von Patienten mit einer akuten alkoholischen Hepatitis erhöht (Taieb J. et al., 1998).

### 1.5.3 Virale Hepatitis

Das Hepatitis B Virus (HBV) und das Hepatitis C Virus (HCV) zählen zu den häufigsten Virusinfektionen der Leber (Rosenberg W., 1999). Eine chronische Hepatitis führt unbehandelt häufig zur Leberzirrhose und steigert das Risiko eines Leberzellkarzinoms.

Für die Untersuchung von HBV- und HCV-induzierten akuten Leberschäden stehen HBV- und HCV-transgene Mausmodelle zur Verfügung (Chisari F.V. et al., 1995; Guidotti L.G. et al., 1995; Kawamura T. et al., 1997; Pasquinelli C. et al., 1997; Wakita T. et al., 1998).

IL-18 hemmt die Replikation von HBV in der Leber der HBV-transgenen Mäuse (Kimura K. et al., 2002). Der antivirale Effekt von IL-18 beruht auf einer Aktivierung von NK-Zellen und NKT-Zellen der Leber und ist IFN- $\gamma$ -abhängig (Paschetto V. et al., 2002). Es gibt auch Hinweise, daß für die antivirale Wirkung von IL-18 auch IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  von Bedeutung sind (Wieland S.F. et al., 2000; Kimura K. et al., 2002).

IL-12 verstärkt die antivirale Wirkung von IL-18. Für die Hemmung der HBV-Replikation in HBV-transgenen Mäusen sind wesentlich kleinere Mengen von beiden Zytokinen notwendig als bei Verabreichung nur eines dieser Zytokine. Der Synergismus von IL-18 und IL-12 zeigt sich in einer verstärkten IFN- $\gamma$ -, IFN- $\alpha$ - und IFN- $\beta$ -Produktion sowie einer vermehrten Anzahl an hepatischen NK-Zellen, T-Zellen und Makrophagen im Gegensatz zu dem Effekt von den einzelnen Zytokinen (Kimura K. et al., 2002).

### 1.5.4 Autoimmunerkrankungen der Leber

Zu den menschlichen Autoimmunerkrankungen der Leber zählen in erster Linie die autoimmune Hepatitis (AIH), die primär sklerosierende Cholangitis (PSC) und die primär biliäre Zirrhose (PBC). Einige Studien an Patienten deuten auf eine Beteiligung von IL-18 bei autoimmunen Lebererkrankungen hin. Ein erhöhter IL-18-Serumspiegel von Patienten mit PBC und AIH korreliert mit der Krankheitsprogression. In Leberbiopsien von AIH-Patienten kann man eine erhöhte mRNA-Expression von IL-18 beobachten (Chernavsky A.C. et al., 2004). Nach der Lebertransplantation haben PBC-Patienten keine erhöhten IL-18-Werte im Serum mehr (Yamano T. et al., 2000). Beim Still-Syndrom, einer rheu-

matischen Erkrankung, die auch zum Leberschaden führen kann, ist IL-18 entsprechend dem Ausmaß der Leberdysfunktion im Serum erhöht (Ogata A. et al., 2003; Chen D.Y. et al., 2004).

Diese Ergebnisse zeigen, daß erhöhte IL-18-Werte im Serum bei unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen der Leber und Autoimmunkrankheiten mit Leberbeteiligung die Aktivität der Krankheit widerspiegeln können.

## 2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Bedeutung von IL-18 in der Leber *in vivo* zu untersuchen. Es sollen hierfür transgene Mäuse mit hepatozytenspezifischer Expression von IL-18 generiert werden, die den Leserahmen der inaktiven bzw. aktiven Form von IL-18 unter der transkriptionellen Kontrolle des murinen Albumin-Promoters exprimieren.

IL-18 wurde ursprünglich in Kupffer-Zellen der Leber entdeckt (Okamura H. et al., 1995). In eigenen Vorarbeiten wurde die Expression der inaktiven Form von IL-18 (proIL-18) in Wildtyp-Hepatozyten auf Proteinebene gezeigt. Die physiologische Expression von IL-18 in Hepatozyten kann auf eine wichtige Rolle der Hepatozyten bei der Immunantwort in der Leber hinweisen. Um die Rolle der Expression von proIL-18 und die Mechanismen der Aktivierung und Sezernierung von IL-18 aus Hepatozyten zu klären, soll die Etablierung eines transgenen Mausmodells mit konstitutiver Überexpression von proIL-18 in Hepatozyten Thema dieser Arbeit sein.

IL-18 wurde eine Bedeutung bei verschiedenen Lebererkrankungen zugeschrieben, die genauen Mechanismen sind jedoch nicht geklärt. Dabei könnte IL-18 ein wesentlicher Faktor bei der Regulierung des Th1/Th2-Gleichgewichts in der Leber sein. Zur Klärung der Rolle von IL-18 als Immunmodulator in der Leber sollen transgene Mäuse mit hepatozytenspezifischer Expression der aktiven Form von IL-18 generiert werden.

Daneben soll die Rolle von IL-18 bei einer LPS-abhängigen Schädigung der Leber untersucht werden. Die Behandlung mit Lipopolysacchariden (LPS) führt bei Mäusen nach Präkonditionierung durch die Verabreichung von apathogenem *Propionibacterium acnes* zu einem schweren IL-18-abhängigen Leberschaden (Okamura H. et al., 1995). Die Präkonditionierung der Mäuse mit CpG-Oligodesoxynukleotiden (CpG) statt *Propionibacterium acnes* erhöht die Immunantwort auf LPS, die IL-18-abhängig zu sein scheint (Gould M. P. et al., 2004) und zur Leberschädigung *in vivo* führt (Schuchmann M. et al., 2004). In diesem Zusammenhang soll die immunologische Rolle von IL-18 bei diesem Leberschädigungsmodell in transgenen Mäusen mit leberspezifischer Überexpression der inaktiven bzw. aktiven Form von IL-18 geklärt werden.

## 3 Materialien

### 3.1 Anorganika und Organika

Aceton	#32201, Riedel-de-Haen, Seelze
Agarose	#15510-027, Invitrogen, Paisley, UK
Ammoniumsulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_3$	#1211, Merck, Darmstadt
Ampicillin	#01503 Biomol, Hamburg
APS $((\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8)$	#1201, Merck, Darmstadt
Aqua dest.	#82479E, B.Braun, Melsungen
Avidin/Biotin Blocking Kit	#SP-2001, Vector, Burlingame, USA
Avertin (2,2,2-Tribromethanol)	#90710, Fluka, Schweiz
Avidin-Peroxidase	#P0347, DAKO, Dänemark
Bacto-Agar Difco	#0140-01, Detroit, USA
BSA (Albumin Bovine Fraction V)	#11930, SERVA, Heidelberg
Bromphenolblau	#8122, Merck, Darmstadt
BugBuster Protein Extraction Reagent	#70584, Novagen, Darmstadt
Coomassie Stain Solution	#1610436, BioRad, München
CpG Oligonukleotide	#3198M, Roth, Karlsruhe
DAB (3,3'-Diaminobenzidine)	#1718096, Roche, Mannheim
DAB Substrate Kit	#SK-4100, Vector, Burlingame, USA
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)	#31966-021, GIBCO, Karlsruhe
DNA Längenstandard	#1209264, Roche, Mannheim
EDTA (Ethylendiaminoacetat)	#8040.1, Roth, Karlsruhe
Entellan	#1.07961.0100, Merck, Darmstadt
Essigsäure min. 99,8%	#33209, Riedel-de-Haen, Seelze
Ethanol 99,6%	#5054.2, Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	#2218, Roth, Karlsruhe
FCS (fetal bovine serum)	#S0115, Biochrom, Berlin
Formaldehydlösung min. 37%	#1.04003, Merck, Darmstadt
Gelatine	#4274.1, Roth, Karlsruhe
Glycerol	#G-7893, Sigma, Deisenhofen

Glycin	#3908.3, Roth, Karlsruhe
Glucose	#G-7021, Sigma, Deisenhofen
HEPES	#H-7006, Sigma, Deisenhofen
Insulin	#40L050, Aventis, Frankfurt am Main
Isopropanol	#9634.1000, Merck, Darmstadt
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	#4251B15, B.Braun, Melsungen
Kollagenase	#17456, SERVA, Heidelberg
Kollagen R	#47254, SERVA, Heidelberg
L-Glutamine	#25030-024, GIBCO, Karlsruhe
Lipopolysaccharide	#L-8274, Sigma, Deisenhofen
L-Leucin Methyl Ester	#L-9000, Sigma, Deisenhofen
Mayers Hämalanlösung	#1.09249.0500, Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	#805740, Merck, Darmstadt
Methanol	#6007, Merck, Darmstadt
Milchpulver	#2720796, Novartis, München
Natriumacetat	#6268, Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	#3957.1, Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	#3580.1, Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	#6329, Life Technologies, Eggenstein
Paraffin	#1.07150, Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin	#DE17-602E, Combrix, Verviers, Belgium
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	#500-0006, Bio Rad, München
Proteinase Inhibitor Cocktail	#1836153, Boehringer, Mannheim
Proteinase K	#1.24568, Merck, Darmstadt
REDTaq ReadyMix	#R-2523, Sigma, Deisenhofen
PCR REACTION MIX	
Rotiphorese Gel 30	#3029, Roth, Karlsruhe
(Acrylamidstammlösung 30%)	
RPMI 1640	#51800-035, Life Technologies, Eggenstein
SDS ultra pure	#2326, Roth, Karlsruhe
SDS-PAGE Standards	#031-0625, Bio Rad, München
Siriusrot F3B (Direktrot 80)	#36.554-8, Sigma, Deisenhofen

t-Amyl Alkohol	#A-1685, Sigma, Deisenhofen
TEMED (N, N, N', N' Tetramethylethylenediamine)	#T-9281, Sigma, Deisenhofen
TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenziodine)	#49176/123999, Fluka, Schweiz
Triton x-100	#T-8787, Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA Lösung	#L2143, Biochrom, Berlin
Tween20	#8.22184, Merck, Darmstadt
Vectastain Elite ABC-Kit	#PK-6105, Vector, Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid 30%	Apotheke der Universitätskliniken Mainz
Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus	#NEL104 PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA
Xylol	#1.08685, Merck, Darmstadt

### 3.2 Reagenzien für Molekularbiologie

Restriktionsenzyme/Puffer	New England BioLabs, USA
DNA Ligation Kit	#6022, Takara
NucleoSpin Plasmid	#740588.50, Macherey-Nagel, Düren
MaxiPräp Plasmid	QIAGEN, Hilden
pET-30a(+) Vektor	#69909-3, Novagen, Darmstadt
pGEM-Teasy Vektor	#A1360, Promega, Madison, USA
BL21(DE3) Competent Cells	#C6010-03, Invitrogen
XL2-Blue Ultracompetent Cells	#200150, Stratagene

### 3.3 Oligonukleotide (Metabion, Heidelberg)

#### Primer zur Klonierung des rekombinanten IL-18

inakt11 (sense)            5'-tt ata gaa ttc gcc atg gct gcc atg tca-3'  
inakt12 (antisense)      5'-ac gaa aag ctt tta tca act ttg atg taa gtt-3'

#### Primer zur Generierung des SP-IL-18-Transgenkonstrukts

k-seq1 (sense)            5'-ctc tgg gtt cca ggt tcc act ggt gac aac ttt ggc cga ctt-3'  
k-seq2 (sense)            5'-aca ctc ctg cta tgg gta ctg ctc tgg gtt cca ggt-3'  
k-seq3 (sense)            5'-tt ata ccc ggg cc gcc acc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg-3'  
akt-end (antisense)      5'- ac gaa ccc ggg tta cta act ttg atg taa gtt-3'

#### Primer zur Bestimmung proIL-18- und FLAG-IL-18-transgener Tiere

U3-vorn (sense)           5'-gcc ttc ttc ttt ttc cta cag ctc ctg g-3'  
Alb2-vorn (sense)         5'-ttt ctg cac aca cga tca cc-3'  
otto-hinten (antisense) 5'-ccc tcc cca cct aac ttt gat gta-3'

#### Primer zur Bestimmung SP-IL-18-transgener Tiere

k-seq3 (sense)            5'-tt ata ccc ggg cc gcc acc atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg-3'  
akt-end (antisense)      5'- ac gaa ccc ggg tta cta act ttg atg taa gtt-3'

### 3.4 Antikörper

Anti-B-Zellen B220	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz
Anti-CD8+ 3.155	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz
Anti-Mac1	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz
Anti-Makrophagen Ratte	#MCAP497, Serotec, Düsseldorf
anti-Maus F4/80	
Elite Vectastain ABC KIT	#PK-6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Anti-Mastzellen B17	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz
Anti-Maus-IFN- $\gamma$ R46A2	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz
Anti-Maus-IFN- $\gamma$ AN18.17.2466	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz
MAR 18.5 Maus anti-Ratte	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz
MBL Mouse IL-18 ELISA Kit	#7625, MBL, Nagoya, Japan
Penta-His Maus IgG1	#34660, QIAGEN, Hilden
Ratte anti-Maus IL-4 Klon 11B11	#559062, BD Biosciences Pharmingen
Ratte anti-Maus IL-4 Klon BVD6-24G2	#554390, BD Biosciences Pharmingen
TNF- $\alpha$ ELISA Kit	#555268, BD Biosciences Pharmingen
Ziege-Anti-Kaninchen Immunglobulin	#P0448, DAKO, Dänemark
Kaninchen anti-Maus-IL-18	#TP-217, Torrey Pines Biolabs, Houston, USA
Ziege-anti-Maus-IL-18 IgG (M-19)	#sc-6179, Santa Cruz, Heidelberg

### 3.5 Zytokine

Rekombinantes IL-18	#RM-IL-18-25, Endogen, Woburn, USA
Rekombinantes IFN- $\gamma$	Institut für Immunologie, Uni-Klinik Mainz

### 3.6 Verbrauchsmaterial

#### Plastikwaren

Bottletop-Filter (0,2mkm)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Branüle Vasafix 22G, 0,9x25mm	B.Braun, Melsungen
Einmal-Plastikküvetten	Ratiolab, Dreieich
Gewebekulturflaschen (mit Kulturfläche 25/75/175 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Nürtingen
Kanülen Sterican	B. Braun, Melsungen
Kryo-Rundbodenröhrchen, 1,8ml	Nunc, Wiesbaden
Nickel-Säule Poly Prep	BioRad, München
Petrischalen	Greiner, Nürtingen
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Platten für ELISA	Nunc, Wiesbaden
Probenröhrchen 15, 50ml	Greiner, Nürtingen
Reaktiongefäße 0,5ml, 1,5ml, 2ml	Eppendorf, Hamburg
Sterilpipettenspitzen 2, 5, 10, 25, 50ml	Greiner, Nürtingen

#### Glaswaren

Bechergläser	Schott Glaswerke, Mainz
Deckgläser (24x50mm, No.1)	Superior, Marienfeld
Erlenmeyerkolben	Schott Glaswerke, Mainz
Glasplatten für Western Blot	Bio Rad, München
Glasspirale	Schott Glaswerke, Mainz
Meßkolben	Schott Glaswerke, Mainz
Meßzylinder	Schott Glaswerke, Mainz
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Germersheim
Objektträger	IDL, Nidderau
Trichter	Schott Glaswerke, Mainz

**Membranen und Folien**

Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe
Nitrozellulosemembran 0,45mkm	Bio Rad, München
Polyvinilidene Fluoride Transfer Membrane 0,45mkm, P/N66543	Pall Corporation, Pensacola
Whatman 3MM Papier	Whatman Maidstone, England

**3.7 Geräte**

Analysenwaage B6	Mettler, Gießen
Begasungsbrutschrank B5061 EK/CO <sub>2</sub>	Heraeus, Hanau
Eagle-Eye Kamerasystem	Stratagene, Amsterdam
Elektrophoreseapparaturen	Labotec, Wiesbaden
ELISA-Reader MRX II	Dynex
Fluoreszenzmikroskop Cover-018	Olympus, Hamburg
Lichtmikroskop Axioskop	Zeiss, Obercochem
Magnetrührer RTC B	IKA Labortechnik, Staufen
Megafuge 1.0R (Rotor 7570)	Heraeus, Osterode
Mikrotube-Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
PH-Meter CG 837	Schott, Hofheim
Photometer Ultraspec II	LKB Biochrom, England
Röntgenfilm-Kassette	AGS, Heidelberg
Schüttelgerät VIBRAX VXR1	IKA Labortechnik, Staufen
SDS-PAGE Gelkammer Mini Protean II TMCCell	Bio Rad, München
Sterilbank Clean Air, Type DLF BSS6	Woerden
Tischwaage 2116	Sartorius, Göttingen
Tischzentrifuge Pico Fuge	Stratagene, Heidelberg
Überkopf-Schüttelgerät REAX 2	Heidolph, K&B, Nidderau
Wasserbad 5BU Thermomix	B.Braun, Melsungen

### 3.8 Puffer und Lösungen

PBS (pH 7,2):	8,0g NaCl 1,3g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,2g KCl 0,2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 1L H <sub>2</sub> O
10x DNA-Loading Puffer:	30% Ficoll 100 mM Ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA) 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol in H <sub>2</sub> O
TBE-Puffer:	90mM Tris 90mM Borsäure 20mM EDTA
TE-Puffer:	10mM Tris/HCl, pH 8 1mM EDTA
Proteinase K Puffer:	100mM Tris, pH 8,5 5mM EDTA 200mM NaCl 0,2% SDS
Injektionspuffer:	10mM Tris 0,1mM EDTA pH 7,5

**Western Blot:**

Protein Lysis Puffer:	20mM Tris 50mM EDTA 0,5% Triton x-100 2% Protease Inhibitor auf 50ml, pH 8
2x ME Probenpuffer:	20% Glycerol 8% SDS 0,2M Tris-Hcl (pH 6,8) 10% 2-Mercaptoethanol (v/v) Spatelspitze Bromphenol Blau
10% Polyacrylamid Gel:	3,3ml Acrylamid 30% 2,5ml Tris 1,5M pH 8,8 100 $\mu$ l 10% SDS 100 $\mu$ l 10% Amonium Persulfate (APS) 4 $\mu$ l TEMED auf 10ml H <sub>2</sub> O
Stacking Gel:	830 $\mu$ l Acrylamid 30% 630 $\mu$ l Tris 1M pH 6,8 50 $\mu$ l 10% SDS 50 $\mu$ l 10% APS 5 $\mu$ l TEMED 3,4ml H <sub>2</sub> O
Laufpuffer:	3g Tris 14,4g Glycin 5ml 20% SDS auf 100ml H <sub>2</sub> O

Blotpuffer:	3g Tris 14,4g Glycin 100ml Methanol auf 1L H <sub>2</sub> O
<b>ELISA:</b>	
IFN- $\gamma$ Coatingpuffer:	0,1M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O, pH 9,2
IL-4 Coatingpuffer:	8,4g NaHCO <sub>3</sub> 3,56g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> auf 1L H <sub>2</sub> O, pH 9,6
IFN- $\gamma$ Blockpuffer:	1% PBS 1% Gelatine
IL-4 Blockpuffer:	1% BSA in ELISA Waschpuffer
Waschpuffer:	1% PBS and 0,05% Tween 20
Substratpuffer:	6,3g Zitronensäuremonohydrat auf 1L H <sub>2</sub> O pH 4,1 mit KOH einstellen
Substratlösung:	20ml Substratpuffer 1ml TMB-Lösung 25 $\mu$ l H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
TMB-Lösung:	120mg TMB (Tetramethylbenzidin) 2,5ml Aceton 22,5ml Ethanol 100%

Abstopplösung: 28ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (97%)  
auf 500ml H<sub>2</sub>O

**Aufreinigung des rekombinanten Proteins:**

Lysispuffer: 6M Guanidin HCL  
0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01M Tris-HCL  
0,5% Triton x-100  
100mM Imidazol  
0,1mM PMSF, pH 8,0

Puffer B: 8M Urea  
0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
0,01M Tris-HCL  
10mM Imidazol  
10% Glycerol, pH8,0

Puffer C: Puffer B, pH 6,3

Puffer D: Puffer B, pH 5,9

Puffer E: Puffer B, pH 4,5

**Hepatozytenisolierung:**

- Narkose: 10% Tribromethanol in  
t-Amyl Alkohol  
bis auf 2,5% mit PBS verdünnen
- Puffer I (Ca-frei): 8,3g NaCl  
0,5g KCl  
2,4g Hepes  
auf 1L, pH 7,4
- Puffer II (Kollagenasepuffer): 3,9g NaCl  
0,5g KCl  
0,7g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O  
auf 1L, pH 7,6  
0,05% Kollagenase kurz vor Gebrauch
- Puffer III (Waschpuffer): 8,3g NaCl  
0,5g KCl  
0,18g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O  
2,4g Hepes  
auf 1L, pH 7,4

**Medien:**

LB-Medium:	10g Tryptone 5g Hefeextrakt 10g NaCl auf 1L H <sub>2</sub> O, pH 7,5
LB-Agar-Medium:	20g Agar 1L LB Medium
Zellkultur-Medium:	DMEM 1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS
Hepatozyten-Medium:	DMEM 1% Penicillin/Streptomycin 20mM Hepes 0,05% Insulin 10 <sup>-6</sup> Lithocolsäure 10% FCS
Hybridom-Medium:	RPMI 1640 mit Glutamax 1% Penicillin/Streptomycin 1% L-Glutamin (2mM) 0,4% 2-Mercaptoethanol 10% FCS
Einfriermedium:	10% DMSO in FCS

## 4 Methoden

### 4.1 Generierung transgener Mäuse

#### 4.1.1 Klonierung der Konstrukte

Die cDNS der inaktiven Form von IL-18 wurde von Prof. Dr. Neurath zur Verfügung gestellt. Die Expressionskassette pBR322/pBSK (trägt den Namen U3) wurde von Dr. Jürgen Henninger generiert. Die cDNS von proIL-18 und der aktiven FLAG-markierten Form von IL-18 (Abb. 5) wurde in die Expressionskassette U3 von Dr. S. Lüth kloniert. Zur Generierung des SP-IL-18-Transgenkonstrukts wurde die cDNS der aktiven Form von IL-18 mittels PCR von der cDNS der inaktiven Form von IL-18 amplifiziert und anschließend sequentiell mittels Primern für *IgG-kappa-leader sequence* durch PCR fusioniert (Abb. 6). Das PCR-Produkt wurde nach jeder PCR-Reaktion durch Agarosegel und Dialyse aufgereinigt.

```
atggctgcatgtcagaagactcttgcgcaactcaaggaaatgatgtttattgacaacacgctttactttatactgaagaaaatggagacctggaatcagac
*accttggccgacttcactgtacaaccgcagtaatacggaaataaatgaccaagtctctctgtgacaaaagacagcctgtgttcgaggatgactgatat
tgataaagtccagtgaaacccagaccagactgataatatacatgtacaagacagtgaagtaaggactggctgtgacctctctgtgaaggatagtaa
aatgtctacctctctgtaagaacaagatcattcctttgaggaatggatccacctgaaaatattgatgatatacaagtgatcattcttccagaacgtgt
tcaggacacaagaatggagttgaaatctcactgtatgaaggacattctgttgcctgcaaaaggaagatgatgcttcaaacctattctgaaaaaaagga
tgaatggggataaatctgtaatgtcacttcactacactacatcaagttag
```

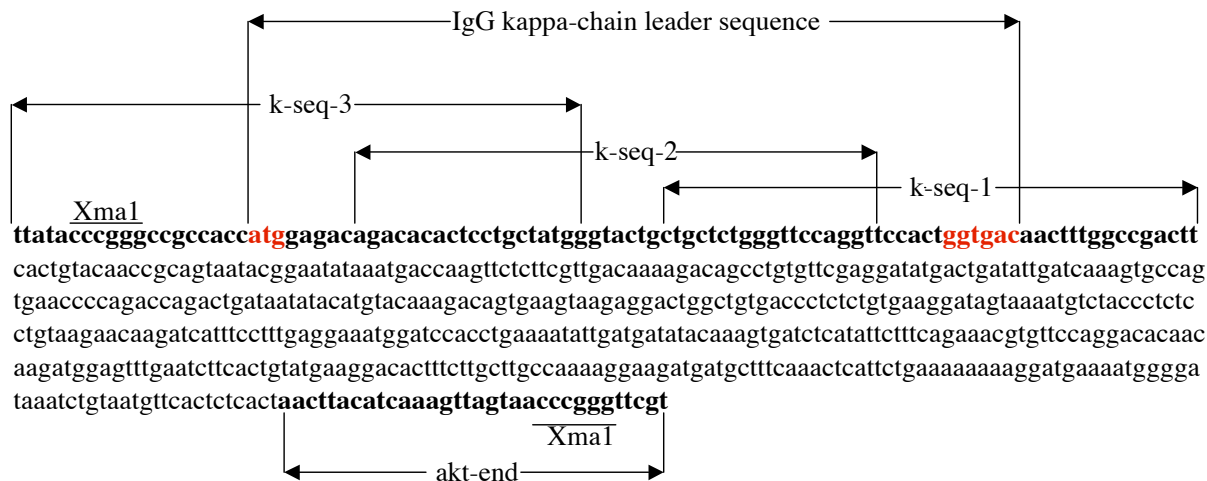
```
*atggactacaaggacgacgatgacaag
```

#### Abbildung 5: Darstellung der cDNS-Sequenz von murinem IL-18.

Das Startkodon (atg) und Stopkodon (tag) sind fett, der Anfang des aktiven Teils von IL-18 ist rot dargestellt. Die FLAG-Sequenz (\*) wurde durch PCR-Reaktion mit dem aktiven Teil des IL-18 fusioniert.

#### Klonierung der SP-IL-18-DNS in den pGEM-Taesy-Vektor

Da bei einer PCR-Reaktion die Polymerasen oft zusätzliche einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR-Produkts anreihen, die die Ligation des PCR-Produkts mit einem Vektor vermindern, wurde das PCR-Produkt SP-IL-18 vor dem Klonieren in den U3-Vektor zuerst in den pGEM-Taesy-Vektor kloniert. Der mit EcoRV verdaute Taesy-Vektor enthält an beiden Schnittenden 3'-endständige Thymidine, die die Effizienz der Ligation mit dem PCR-Produkt erhöhen. Das ligierte Plasmid wurde in den *E. coli* - Stamm XL2-Blue transformiert und über Nacht auf einer Ampicillin-selektiven Agarplatte bei 37°C inkubiert. Die ampicillinresistenten Klone wurden nach Insertpräsenz durch



**Abbildung 6: Fusionsgen der aktiven Form von IL-18 mit *IgG-kappa leader sequence* (SP-IL-18).**

Für die Konstruktion des Fusionsgens mittels einer sequentiellen Reihe von PCR-Reaktionen wurden drei Paar Primer benötigt. Der Primer k-seq1 und akt-end haben zur Amplifikation des aktiven Teils von IL-18 aus proIL-18 cDNS gedient. Die Primer k-seq1, k-seq2 und k-seq3 bilden die *IgG-kappa leader sequence*. Alle Primer sind fett dargestellt. Das Startkodon (atg) und die *signal cleavage site* sind rot hervorgehoben.

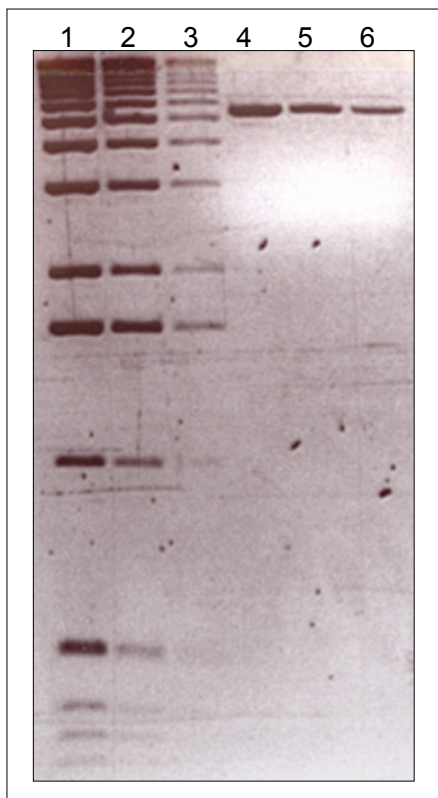
PCR mit Insert-spezifischen Primern k-seq3 und akt-end überprüft. Das Plasmid wurde aus positiven Klonen isoliert und sequenziert. Zusätzlich wurde das Insert durch Restriktionsverdau überprüft.

### Klonierung der SP-IL-18-DNS in den U3-Expressionsvektor

Das SP-IL-18-Fusionsgen wurde aus dem Taesy-Vektor durch das XmaI-Restriktionsenzym ausgeschnitten und über Gelelektrophorese und Dialyse aufgereinigt. Der mit XmaI verdaute U3-Vektor wurde vor der Ligation mit dem Insert mit einem CIP behandelt und anschließend aufgereinigt. Die Ligation erfolgte mittels DNA Ligation Kit von Takara. Die ligierte DNS wurde in XL2-Blue-Zellen transformiert. Die Selektion von Transformanten wurde auf Agar-Platten mit Ampicillin durchgeführt. Die Insertpräsenz und korrekte Orientierung der DNS wurden durch Restriktionsverdau von isoliertem Plasmid mit Hind III-Restriktionsenzym und PCR von Klonen mit vektor- und insert-spezifischen Primern U3 und otto-hinten kontrolliert. Anschließend wurde die cDNS beider Konstrukte sequenziert.

### 4.1.2 Präparation von Injektions-DNS

Der U3-Vektor mit der einklonierten SP-IL-18-cDNS wurde zur Trennung der Expressionskassette mit dem Insert vom bakteriellen Teil des Vektors durch das KpnI-Restriktionsenzym 2 h lang bei 37°C verdaut. Die restringierte Vektor-DNS wurde auf 1% Agarosegel per Elektrophorese aufgetrennt. Das Injektions-Fragment wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des GeneClean II-Kits nach Protokoll aufgereinigt. Zur Injektion wurde die cDNS mit Injektionspuffer auf 3ng/ $\mu$ l verdünnt und 30 min bei 14.000 $\times$ g zentrifugiert, um eventuell vorhandene Schmutzpartikel zu entfernen. Die Konzentration der Injektions-DNS wurde in 1% Agarosegel mit Ethidiumbromid durch Vergleich in UV-Licht mit einer Reihe von Standards verschiedener Konzentration überprüft (Abb. 7).



**Abbildung 7: Darstellung der Injektions-DNS im Agarosegel.**

Auf der Abbildung ist die SP-IL-18 Injektions-DNS dargestellt. Auf das Gel wurden 30ng (Spur 1), 10ng (Spur 2) und 3ng (Spur 3) vom DNS-Standard und 30ng (Spur 4), 15ng (Spur 5) und 9ng (Spur 6) von der Injektions-DNS aufgetragen. Die Stärke der Banden wurde im UV-Licht verglichen. Die Banden zeigen, daß die Konzentration der DNS 3ng/ $\mu$ l beträgt.

Anschließend wurden die oberen zwei Drittel in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und zur Mikroinjektion eingesetzt. Bis zur Mikroinjektion wurde die DNS im Injektionspuffer bei -20°C aufbewahrt. Zum Ansetzen aller Lösungen wurden Endotoxinfreie Einweg-Kunststoff-Materialien verwendet.

### 4.1.3 Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde von Dr. K. Reifenberg durchgeführt. Für die Mikroinjektion wurden befruchtete Eizellen von FVB/NHSD-Weibchen verwendet, bei denen eine Superovulation induziert wurde, um die Anzahl von injizierbaren Eizellen zu erhöhen. Dafür wurden FVB/NHSD-Weibchen im Alter von 4 bis 6 Wochen vier Tage vor Eizellentnahme mit 7,5U Pregnant Mare Serum i.p. injiziert, welches die Funktion des follikelstimulierenden Hormons (FSH) übernimmt. 48 Stunden danach wurden 7,5U humanes Chorion-Gonadotropin i.p. injiziert, welches das luteinisierende Hormon (LH) ersetzt. Die Weibchen wurden am gleichen Tag mit fertilen Männchen verpaart. Am nächsten Tag wurden die Eizellen entnommen und durch Aufziehen in die Transferkapillare mit Hyaluronidase (10mg/ml) von den Kumuluszellen befreit. Außerhalb des Brutschranks wurden die Zellen in M2-Medium und innerhalb des Brutschranks (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) in M16-Medium gelagert. Nach Mikroinjektion der Vektor-DNS in den Pronukleus der befruchteten Eizellen wurden diese in das Ovidukt von scheinträchtigen Leihmüttern transferiert. Die Reproduktionsorgane der Leihmütter wurden am Tag vor der Mikroinjektion durch Verpaarung mit Männchen, die durch Vasektomie sterilisiert wurden, auf die transferierten Eizellen vorbereitet.

### 4.1.4 Zucht und Selektion der Tiere

Der verwendete FVB-Mausstamm entstammt der Zucht des Tierstalls der klinisch-theoretischen Institute des Hochhauses am Augustusplatz, Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Die Zucht und Haltung der Mäuse erfolgte unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen. Die Nachkommen wurden routinemäßig mittels PCR mit transgenspezifischen Primern untersucht. Es wurden folgende Paar-Primer verwendet: Sense: Alb2, antisense: otto-hinten oder sense: U3, antisense: otto-hinten zur Selektion der proIL-18- und FLAG-transgenen Tiere; sense: k-seq-3, antisense: akt-end zur Selektion der SP-IL-18-transgenen Mäuse. Die Zucht transgener Tiere wurde generell nur heterozygot fortgeführt. Die transgenen Tiere wurden immer mit Wildtyptieren verpaart, um eventuelle Effekte auszuschließen, die durch Integration des Transgens erfolgen könnten.

## 4.2 Herstellung von rekombinantem IL-18

### 4.2.1 Expressionssystem

Die Herstellung von rekombinantem proIL-18 erfolgte durch Klonierung von cDNS der inaktiven Form von IL-18 in den bakteriellen Expressionsvektor pET-30a(+). Der Vektor kodiert eine Kanamycinresistenz (kan), einen *origin of replication* (ori) und das lac-Repressor Gen (lacI). Die Transkription von proIL-18 beginnt durch die Aktivierung des T7 Promoters und endet am T7 Terminator. Der lac-Repressor wird durch die Induktion mit IPTG kompetitiv verdrängt, es kann die T7 Polymerase exprimiert werden, die den T7 Promoter und anschließend proIL-18-Transkription aktiviert. Von beiden Seiten der *multiple cloning site* ist ein His-Tag kodiert, der aus sechs Histidinmolekülen besteht und im rekombinanten Protein sowohl am C- als auch am N-Terminus gelegen ist. Er dient zum einen der Detektion im Western Blot mittels anti-His spezifischen Antikörpern und zum anderen der Proteinaufreinigung. Am N-Terminus sind auch der S-Tag, die Enterokinase- und die Thrombin-Schnittstelle kodiert.

### 4.2.2 Klonierung von proIL-18 in den pET-30a(+)-Vektor

#### PCR-Amplifikation von Insert-DNS

Die cDNS von proIL-18 wurde von der Injektions-DNS mit Primer sense: inakt11 und antisense: inakt12 amplifiziert. Die Primer enthalten Restriktionsschnittstellen, die später die Ligation mit dem Vektor ermöglichen. Der Primer inakt11 enthält die EcoRI-Schnittstelle, der Primer inakt12 die Hind III-Schnittstelle. Das amplifizierte PCR-Produkt wurde durch Gelelektrophorese und Dialyse aufgereinigt.

#### Restriktionsverdau

Zum Restriktionsverdau wurden EcoRI- und Hind III-Enzyme benutzt. Die Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt, daß sie sowohl das Insert als auch den Vektor schnitten. Da EcoRI und Hind III beide im EcoRI-Puffer aktiv sind, wurde ein Doppelverdau angewendet. Zum Restriktionsverdau wurden DNS mit EcoRI- und Hind III-Enzymen 2 h bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle auf Größe, Reinheit und Qualität der geschnittenen Insert- und Expressionsvektor-DNS folgte nach Visualisierung in 1% Agarosegel.

### Ligation und Transformation

Die Ligation beider DNS wurde mittels DNA-Ligation Kit von Takara durchgeführt. Ligierte DNS wurde danach in den *E. coli*-Stamm XL2-Blue transformiert. Es folgte die Inkubation auf LB-Agar mit Kanamycin bei 37°C über Nacht. Die Transformationskontrolle wurde auf zwei verschiedene LB-Agarplatten plattiert (mit und ohne Kanamycin).

### Insertkontrolle

Die über Nacht gewachsenen Klone wurden direkt von der Agar-Platte mittels PCR mit insert-spezifischen Primern (inakt11 und inakt12) auf Insertpräsenz kontrolliert. Dafür wurde die Hälfte der Bakterienkolonie in 150  $\mu$ l Wasser resuspendiert und davon 1  $\mu$ l für die PCR-Reaktion genommen. Die positiven Klone wurden in 5ml LB-Medium mit Antibiotikum bei 37°C über Nacht vermehrt. Die in der Bakterienkultur vermehrten Plasmide wurden mittels *Plasmid Purification Mini Kit von QIAGEN* nach Anleitung des Herstellers gewonnen und überprüft. Die Kontrolle bestand aus Restriktionsverdau der Vektor-DNS mit den spezifischen Enzymen und der anschließenden Visualisierung im Agarosegel. Zur Überprüfung der Insertrichtung und der Leserahmen wurden die positiven Klone sequenziert.

#### 4.2.3 Expression von rekombinantem proIL-18

##### Transformation in den Expressionsstamm

Das inserttragende Plasmid wurde in den *E. coli* Expressionsstamm BL21(DE3) transformiert. Die daraus resultierenden Klone wurden nochmals mittels insert-spezifischer PCR kontrolliert.

##### Induktion der Expression von proIL-18

2,5ml einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur wurden 1:10 mit Kanamycinhaltigem LB-Medium verdünnt und 1 h bei 37°C auf dem Schüttler bei 250 rpm inkubiert. Es folgte die Induktion mit IPTG mit einer Endkonzentration von 1mM. Es wurden vor der Induktion 5ml Bakterienkultur entnommen und separat inkubiert, die nicht zur Induktion vorgesehen waren. Die Induktion erfolgte auf dem Schüttler 16 h lang bei 30°C mit Zusatz von 1ml 20% Laktose. Als Positivkontrolle der Expression wurde ein Klon mit Expressionsvektor pET-30a(+) verwendet, der rekombinantes SLA-Protein enthielt und in unserer Arbeitsgruppe hergestellt wurde. Als Negativ-Kontrolle wurde der Expressions-

vektor pET-30a(+) ohne Insertpräparation in den Expressionsstamm transformiert und in den Expressionsversuch mitinduziert. Nach der Inkubation wurden die Bakterienkulturen bei  $5000 \times g$  5 min lang bei  $4^\circ\text{C}$  abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Das Zellpellet wurde mit kaltem PBS gewaschen und unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Es folgte die Proteinanalyse von Überstand und Bakterienpellet.

#### 4.2.4 Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Für die Aufreinigung von bakteriell exprimiertem rekombinantem proIL-18 über den His-Tag wurden *BugBuster Protein Extraction Reagent* und Ni-NTA-Säulen verwendet. Mittels *BugBuster*-Reagent wurde eine lösliche Fraktion der Proteine aus Periplasma sowie Zytoplasma von den *inclusion bodies* getrennt und gereinigt. Die Proben wurden nach den Angaben des Herstellers entsprechend aufgearbeitet. Für die Aufreinigung des rekombinanten proIL-18 aus diesen Fraktionen wurde zuerst das Ni-NTA Säulenmaterial bei 400rpm 2 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, zweimal mit Extraktionspuffer B gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand der Proteinlösung wurde mit der pellettierten Agarose vermischt. Nach dem Absetzen der Agarose wurde die Agarose-Protein-Mischung auf eine Säule aufgetragen. Rekombinantes proIL-18 wurde durch Bindung der Seitengruppen der Histidine mit zweifach geladenen Nickel-Kationen der Agarose auf der Matrix gebunden. Die meisten bakteriellen Proteine wurden eluiert. Die Eluierung von rekombinantem proIL-18 von der Matrix erfolgte durch mehrere Waschschriffe: Zweimal je 4ml Extraktionspuffer C; viermal je  $500\mu\text{l}$  Puffer B und Puffer E. Die Fraktionen wurden einzeln im Western Blot analysiert. Im Western Blot sollten ein anti-His-Tag Antikörper und anti-IL-18 Antikörper das Protein detektieren.

## 4.3 Molekularbiologische Methoden

### 4.3.1 DNS-Präparation

Für die Isolierung genomischer DNS wurden Schwanz- oder Ohrbiopsien von Mäusen mit Proteinase K über Nacht bei 56°C verdaut. Die Proteinase K Stocklösung (10mg/ml) wurde dazu 1:10 mit Proteinase K-Puffer verdünnt. Der Ansatz wurde nach der Reaktion mit 500 $\mu$ l H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Für die PCR wurde 1 $\mu$ l der verdauten Biopsie verwendet.

### 4.3.2 DNS-Restriktion und Gelelektrophorese

Die Restriktion wurde mit Hilfe von 5-10 U Endonukleasen pro  $\mu$ g DNS im zum Enzym gehörigen 1 $\times$  Restriktionspuffer 2 h lang bei 37°C durchgeführt. Die Elektrophoretische Auftrennung von DNS-Fragmenten erfolgte bei 150V in 1% horizontalen Agarosegelen, die mit etwa 0,1 $\mu$ g/ml Ethidiumbromid versetzt wurden. Als Elektrophoresepuffer diente 0,5 $\times$  TBE-Puffer.

### 4.3.3 Ligation und Transformation

Die Insert-DNS und der Vektor wurden mit T4 DNS-Ligase aus dem DNA Ligation Kit von Takara bei 16°C 30 min oder über Nacht ligiert. Nach der Inkubation wurde ligierte DNS in *E. coli*-kompetente Zellen transformiert. Die kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und nach der Zugabe von  $\beta$ -Mercaptoethanol 30 min mit dem Ligationsprodukt auf Eis inkubiert. Als Kontrolle des Transformationsprozesses diente ein mit PBS behandeltes Aliquot der kompetenten Zellen und Transformation mit einem Vektor ohne Insert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min und ein direkt anschließender Kälteschock auf Eis für 5 min. Die Bakteriensuspension wurde mit 900 $\mu$ l SOC-Medium substituiert und 1 h lang bei 37°C auf dem Schüttler bei 250rpm vorangereichert. Es folgte die Inkubation auf LB-Agar mit einem entsprechenden Antibiotikum bei 37°C über Nacht. Die Transformationskontrolle wurde auf zwei verschiedene LB-Agarplatten, mit und ohne Antibiotikum, plattiert.

### 4.3.4 Konservieren der Bakterienklone

Von allen transformierten und geprüften Bakterienklonen wurden Stock-Kulturen angelegt. Hierfür wurden 1,2ml einer der bei 37°C und über Nacht gewachsenen Kultur in 300 $\mu$ l Glycerol resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

### 4.3.5 Polymerasekettenreaktion

Die PCR-Reaktion wurde mit *ReadyMix REDtag* durchgeführt. Als Positivkontrolle der Reaktion dienten zwischen 10fg und 1ng Konstrukt-DNA, als Negativkontrolle diente Wasser oder die DNS nichttransgener Tiere. Das Gesamtvolumen war 15 $\mu$ l, davon 6,5 $\mu$ l Wasser, 7,5 $\mu$ l RedTag-Mix und je 1 $\mu$ l von Primern (1pM) und Probe. Nach 5-minütiger Denaturierung bei 95°C wurde die PCR unter den in Abbildung 8 gezeigten Bedingungen durchgeführt.

Primer		Denaturierung		Annealing		Elongation		Produkt bp
sense	antisense	Sek.	T°C	Sek.	T°C	Sek.	T°C	
inakt11	inakt12	50	95	50	65	60	72	580
U3-vorn	otto-hinten	45	95	90	58	90	72	550 / 650
Alb2-vorn	otto-hinten	45	95	90	58	90	72	1187 / 1078
k-seq1,2,3	akt-end	50	95	50	65	60	72	540

#### Abbildung 8: Die PCR-Bedingungen.

Es wurden 28 Zyklen gefahren und anschließend die DNA-Enden für 5 min bei 72°C vervollständigt. Die Paar-Primer U3-vorn/otto-hinten und Alb2-vorn/otto-hinten wurden zum Testen sowohl proIL-18-DNS als auch FLAG-IL-18-DNS verwendet. Die mit diesen Primern durgeführte PCR-Reaktion zeigte für proIL-18-DNS ein positives Signal mit einer Größe von 650bp und 1187bp, und für FLAF-IL-18-DNS von 550bp und 1078bp.

## 4.4 Proteinchemische Methoden

### 4.4.1 Isolierung der Proteine und Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der Gesamtproteine wurde photometrisch bei 595nm bestimmt. Dafür wurden die Zellen pellettiert und in den Lysispuffer mit Proteinaseinhibitor aufgenommen. Nach der 30 min Lysis bei 4°C und dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert und tiefgefroren. 1 $\mu$ l der Probe wurde zu einem 1:5 mit Wasser verdünnten *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* dazugegeben. Für den Standard wurden 1, 5, 10, 15 und 20 $\mu$ g/ml BSA verwendet. Als Null-Wert diente 1:5 mit Wasser verdünntes *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* ohne Probe. Die Proteinkonzentration wurde nach der Standardkurve bestimmt.

### 4.4.2 Western-Blot

Eine Western Blot-Analyse diente zur Detektion der Expression des rekombinanten proIL-18, zur Expression der aktiven sowie inaktiven Form des IL-18 in verschiedenen Zellen

und zur Etablierung der IL-18-exprimierenden transgenen Mauslinien. Die Proben wurden 1:1 mit Lämmli+Mercaptoethanol-Loading Puffer angesetzt und 10 min bei 95°C denaturiert. Pro Spur wurden 15-25µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Elektrophorese in 10 bis 15% SDS-Polyacrylamid-Gel erfolgte 1-2 h bei 150 V. Die Proteine wurden vom Gel auf Polyvinylidene fluoride Membrane (PVDF) transferiert. Vorher wurde die Membran zuerst 2 min in 100% Methanol, und dann 15 min im Blotpuffer equilibriert. Der Transfer erfolgte 1 h lang bei 150mA. Nach dem Blot-Vorgang wurde die Membran zum Blocken unspezifischer Proteine 1 h lang in 2% Milchpulver-1% PBS-0,05% Tween-Lösung bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte die Inkubation der Membran mit Primär-Antikörper in 2% Milchpulver-1% PBS-0,05% Tween-Lösung auf dem Schüttler über Nacht bei 4°C oder alternativ 3 h lang bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen von überschüssigen Primärantikörpern wurde die Membran mit Peroxidase-markierten Sekundär-Antikörpern 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Das Signal wurde mittels DAB-Substrat oder Chemilumineszenz ECL Plus Kit und Autoradiographie detektiert.

#### **4.4.3 Sandwich Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA)**

##### **IL-18 und TNF- $\alpha$ ELISAs**

Der IL-18 Sandwich ELISA (Mouse IL-18 ELISA Kit von MBL) wurde nach den Angaben des Standardprotokolls durchgeführt. Zur Bestimmung von TNF- $\alpha$  wurde das Mouse TNF- $\alpha$  ELISA Kit von BD Biosciences Pharmingen verwendet.

##### **IFN- $\gamma$ ELISA**

Der IFN- $\gamma$  ELISA wurde nach dem folgenden Protokoll durchgeführt: Die Platten wurden mit 1:500 in Coatingpuffer verdünntem anti-Maus-IFN- $\gamma$  Antikörper R46A2 (wurde im Institut für Immunologie der Uni-Klinik Mainz hergestellt) über Nacht bei 4°C beschichtet. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Oberfläche der Platte mit 1% Gelatine in PBS 30 min bei 37°C inkubiert, bevor die in 1% Gelatine verdünnten Proben gegen einen Standard aufgetragen und 1 h bei 37°C inkubiert wurden. Zwischen den einzelnen Reaktionsschritten wurde die Platte je dreimal mit PBS-0,1% Tween gewaschen. Es folgte 1 h Inkubation bei 37°C mit 1:1000 in 1% Gelatine angesetzten biotinylierten anti-Maus-IFN- $\gamma$  Antikörpern AN18.17.2466 (wurde vom Institut für Immunologie der Uni-Klinik Mainz zur Verfügung gestellt). Die Menge an gebundenem Biotin wurde nach 30 min Inkubation bei 37°C mit Avidin-Peroxidase detektiert (1:10000). Durch

Zugabe von TMB mit einem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-enthaltenden Substratpuffer wurde eine Oxidation initialisiert. Der so hervorgerufene Farbwechsel machte die detektierte Menge an gebundenen Zweitantikörpern sichtbar. Die Intensität der Farbentwicklung wurde im ELISA-Reader bei 450nm gemessen. Die Konzentration des Zytokins wurde nach der Standardkurve bestimmt.

#### **IL-4 ELISA**

Die Platten wurden mit 1:500 in Coatingpuffer verdünnten Ratte anti-Maus IL-4 Antikörpern (Klon 11B11) über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag nach dem Waschen 2 h bei 37°C mit 1% BSA geblockt. Die verdünnten Proben und der Standard (rekombinantes IL-4) wurden zusammen mit biotinylierten monoklonalen Ratte anti-Maus IL-4 Antikörpern (Klon BVD6-24G2 1:500 verdünnt) aufgetragen. Es folgte 2 h Inkubation bei 37°C. Die Detektion erfolgte wie bei IFN- $\gamma$  ELISA.

#### **4.4.4 Herstellung von monoklonalen anti-IL-18 Antikörpern**

Der monoklonale anti-IL-18-Antikörper (SK113AE-4) zur Neutralisierung des IL-18 *in vivo* wurde aus dem Überstand einer Hybridom-Zelllinie gewonnen. Das Hybridom wurde von Prof. Dr. rer. nat. Irmgard Förster aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene in München zur Verfügung gestellt (Lochner M. et al., 2002). Die semi-adherent wachsenden Hybridome wurden in dem Hybridom-Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und etwa alle 2-4 Tage 1 zu 4 gesplittet. Der Überstand wurde gesammelt und bei -20°C bis zur Aufreinigung der Antikörper gelagert.

Die Aufreinigung der Antikörper erfolgte durch Ammoniumsulfat-Fällung. Das Salz wurde bis zu 50% Sättigung im Hybridomüberstand gelöst und zum Ausfällen der Proteine über Nacht bei 4°C stehengelassen. Die über Nacht ausgefallenen Proteine wurden bei 4000rpm 10 min pellettiert und in kleinen Volumen der 0,1M NaHCO<sub>3</sub> und 50% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> resuspendiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Proteine in wenig Volumen PBS resuspendiert und über Nacht in Dialyseschläuchen gegen PBS dialysiert. Nach der Dialyse und Filtrieren durch 0,45 $\mu$ m-Filter wurden die Proteine mittels IgG-Säule aufgereinigt. Aus 1 Liter Hybridomaüberstand wurden 20mg Antikörper aufgereinigt. Als Isotypkontrolle dienten monoklonale IgG1 Antikörper, die aus dem Überstand des Hybridoms OX-8 gewonnen wurden.

## 4.5 Zellkulturtechniken

### 4.5.1 Isolierung primärer Hepatozyten

Unter sterilen Bedingungen wurden Mäuse mit Avertin narkotisiert und ihnen danach der Bauchraum geöffnet und die Pfortader freigelegt. Diese wurde mit einer Branüle kanüliert. Die Leber wurde durch die Branüle mit 100ml Puffer I bei einer Pumpengeschwindigkeit von 18ml/min gespült. Anschließend wurde die Leber mit 50ml Kollagenasehaltigem Puffer II durchgespült. Alle Puffer wurden auf 37°C temperiert. Dann wurde die Leber vorsichtig herausgetrennt und in eine Petrischale mit Puffer III überführt, mit zwei Pinzetten zerkleinert und über zwei Mullkompressen auf einem silikonisierten Glastrichter in 50ml Zentrifugationsröhrchen filtriert. Die Zellsuspension wurde 5 min lang bei 400×g bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgezogen, die Zellen in DMEM resuspendiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Hepatozyten in etwas Kulturmedium resuspendiert und auf Vitalität überprüft. Es folgte Lysis von nichtparenchymalen Zellen mit einem Meerschweinchen-Komplement und einem Cocktail von monoklonalen Ratte anti-Maus Antikörpern. Der Antikörpercocktail bestand aus in 1ml DMEM+2% FCS-Medium verdünnten Antikörpern:

anti-CD8 3.155	1:100
anti-Makrophagen F4/80	1:200
anti-Mastzellen B17	1:100
anti-B-Zellen B220	1:50
anti-Mac1	1:50

Nach Zugabe des Antikörper-Cocktails folgten 15 min Inkubation bei 4°C. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 20ml kaltes Medium dazugegeben. Danach wurden die abzentrifugierten Zellen mit MAR 18.5 Maus anti-Ratte (1:100 in 1ml Medium) für die Immunkomplexbildung 15 min bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 20ml kaltem Medium abgestoppt und die Zellen wurden abzentrifugiert. Es folgte eine Komplement-Lyse von Zellen mit Immunkomplex. Die Zellen wurden in 1ml Medium aufgenommen und mit Meerschweinchen-Komplement (1:40), DNase (500 U/ml) und Leucin-Methylester (3mg/ml) 7-10 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit dem Medium wurden die Zellen auf Vitalität überprüft.

## 4.6 Histologische Arbeiten

Die histologischen Arbeiten wurden mit Paraffinschnitten und Gefrierschnitten durchgeführt.

Die Gefrierschnitte wurden von in flüssigem Stickstoff schockgefrorenem Gewebe gefertigt. Das Gewebe wurde im Kryostat bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit einer Schichtdicke von  $5\mu\text{m}$  geschnitten, luftgetrocknet und bis zum Färben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

Zum Anfertigen von Paraffinschnitten wurde die 1-3 Tage in 4% Formaldehyd fixierte Leber in Paraffin eingebettet. Das Einbetten wurde im Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Mainz nach Standardmethoden durchgeführt. Mit einem Schlittenmikrotom wurden  $5\mu\text{m}$  dicke Schnitte angefertigt. Im Wasserbad bei  $42^{\circ}\text{C}$  wurden die Schnitte gestreckt und anschließend auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgebracht und getrocknet. Vor der Durchführung einer Färbung wurde das Gewebe entparaffiniert durch 2 h Inkubation bei  $56^{\circ}\text{C}$ , 3 Mal 15 min in Xylol, danach je 15 min in 100%, 96% und 70% Ethanol, 2 min in Wasser und anschließend in PBS.

### 4.6.1 Hematoxylin-Eosin Färbung

Die Hematoxylin-Eosin Färbung wurde sowohl auf Gefrierschnitten als auch auf Paraffinschnitten durchgeführt. Für die Färbung der Zellkerne wurden die Schnitte mit 1 zu 4 in Wasser verdünntem Hematoxylin 1-2 min und mit Leitungswasser 10 min behandelt. Dabei wurden die Kerne blau gefärbt. Für die Färbung des Zytoplasmas wurde eine Gegenfärbung mit 0,1% Eosin in Essigsäure durchgeführt. Nach dem Waschen der Schnitte in Wasser wurden die Präparate durch eine aufsteigende Ethanolreihe und Xylol entwässert und mit Entellan eingedeckt.

### 4.6.2 Piko-Siriusrot-Färbung nach Puchtler

Piko-Siriusrot-Färbung wurde als Nachweismethode für kollagene Fasern in der Leber verwendet. Die entparaffinierten Gewebeproben wurden 1 h lang mit Piko-Siriusrot-Lösung inkubiert und zweimal in verdünnter Essigsäure kurz gewaschen. Nach dem Entwässern und Eindecken wurden die Schnitte auf Kollagen untersucht. Bei dieser Methode färben sich das Kollagen rot und das Zytoplasma gelb.

### 4.6.3 Immunhistochemische Färbung

#### **Immunhistochemische Färbung von IL-18 in der Leber**

Die immunhistochemische Färbung von IL-18 in der Leber wurde mit polyklonalem Ziege-anti-Maus-IL-18 IgG (M-19) als Primärantikörper und biotinyliertem Kaninchen-anti-Ziege IgG als Sekundärantikörper durchgeführt. Als Isotypkontrolle wurde Ziege Kontrolle-IgG verwendet und als Negativkontrolle PBS statt eines Primärantikörpers. Die Endogene Peroxidase wurde mit 3% Wasserstoffperoxid in Methanol 5 min blockiert. Nach dem Waschen der Schnitte wurde das Antigen mittels 10mM Natriumzitat-Puffer ausmaskiert. Die Schnitte wurden 3 Mal je 10 min in diesem Puffer in der Mikrowelle gekocht. Um unspezifische Immunglobulinbindungsstellen im Gewebe abzusättigen, wurden die Proben 30 min in einer feuchten Kammer mit 1,5% Kaninchen-Normalserum (ABC-Kit) in Blockpuffer (Bisgarard H. et al., 1998) inkubiert. Zum Blocken von Biotin im Gewebe wurde das Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector nach Anleitung des Herstellers verwendet. Danach wurde das Normalserum dekantiert und der 1:100 im Blockpuffer verdünnte anti-IL-18 Antikörper aufgetragen. Die Objektträger wurden über Nacht in eine Feuchtkammer bei 4°C gestellt. Nach dem folgenden Waschen in PBS wurden die Proben mit dem biotinylierten Sekundärantikörper aus dem ABC-Kit 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung erfolgte nach der Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Nach der Entwicklung der Färbung mit DAB-Substrat (4 min bei Raumtemperatur) wurden die Zellkerne mit 1:4 verdünntem Hematoxylin 8-10 min bei Raumtemperatur gefärbt.

#### **Immunhistochemische Färbung von Makrophagen in der Leber**

Für die immunhistochemische Färbung der Makrophagen in der Leber wurden monoklonale Ratte anti-Maus IgG2b Antikörper F4/80 verwendet. Als Negativkontrolle diente statt eines Primärantikörpers eine Gewebeprobe nach Inkubation mit PBS. Die entparaffinierten Schnitte wurden zum Ausmaskieren des Antigens 10 min bei 37°C mit Trypsin behandelt und je 2 min in Wasser und PBS gewaschen. Die endogene Peroxidase wurde mit 0,9% Wasserstoffperoxid in PBS 30 min blockiert. Nach dem Waschen wurden die Gewebeschnitte mit 1:100 in PBS angesetzten Primärantikörpern in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C oder alternativ 2 h bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff je zweimal 3 min in Wasser und PBS. Der Sekundär-POX-markierte Antikörper wurde 1:200 in PBS verdünnt und mit Gewebe 45 min lang in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbung wurde durch DAB-Substrat 5-15 min entwickelt.

Nach dem folgenden Waschen und Entwässern wurden die Proben mit Entellan eingedeckt.

## 4.7 Tierversuche

### Neutralisation von IL-18 *in vivo*

Zur Neutralisation von IL-18 *in vivo* wurde der aus der Hybridom-Zelllinie isolierte monoklonale Antikörper SK113AE-4 verwendet. SP-IL-18-transgene Tiere (je drei Mäuse der Linien A und E), die im Vergleich zu anderen Linien höhere basale IL-18-Serumwerte zeigten, wurden i.p. mit 500 $\mu$ g AK in 500 $\mu$ l PBS behandelt. Das Blut wurde vor der Behandlung und nach 4 und 24 Stunden abgenommen, daraus Serum gewonnen und der IL-18-Serumspiegel mittels IL-18-ELISA bestimmt.

### LPS-abhängiger Leberschaden mit und ohne Präkonditionierung mit CpG-Oligonukleotiden

Für die *in vivo*-Versuche wurden Gruppen von sieben bis zehn Tieren im Alter von 8 bis 16 Lebenswochen verwendet. Transgene sowie nichttransgene Mäuse mit Überexpression der inaktiven Form von IL-18 (proIL-18) und mit Überexpression der aktiven Form des IL-18 (SP-IL-18) wurden mit 100 $\mu$ g *E. coli* Lipopolysacchariden (LPS) i.p. behandelt.

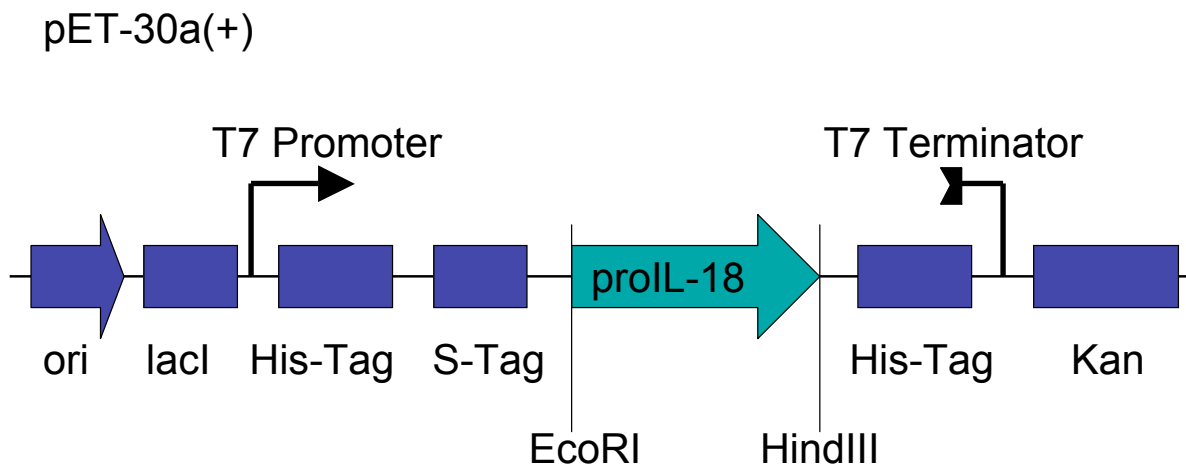
Die andere Gruppe von Mäusen wurde zwei Tage lang mit Oligonukleotiden (CpG) i.p. präkonditioniert: Am ersten Tag mit 40 $\mu$ g, am zweiten Tag mit 25 $\mu$ g. Acht Stunden nach der zweiten Präkonditionierung wurde das Blut aus der Schwanzvene entnommen. Am dritten Tag wurden die Mäuse i.p. mit 100 $\mu$ g *E. coli* LPS behandelt.

Acht Stunden nach der Stimulation (LPS und CpG+LPS) wurden der Körper und die Leber der Mäuse abgewogen und das Verhältnis Lebergewicht zu Körpergewicht bestimmt. Die Leber wurde schockgefroren oder in Formalin fixiert. Das Blut wurde mittels Herzpunktion entnommen und Serum durch Zentrifugieren 10 min 3500 $\times$ g bei 4°C gewonnen. Im Serum wurden danach die Transaminasen, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4 bestimmt. Die Bestimmung der Transaminasen (GOT und GPT) wurde im Zentrallabor des Klinikums Mainz durchgeführt. Die Serumspiegel der Zytokine wurde mittels entsprechenden ELISAs bestimmt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Herstellung von rekombinantem inaktivem IL-18

Um den IL-18-spezifischen Antikörper (anti-Maus-IL-18 Kaninchen IgG) auf die Erkennung der inaktiven Form von IL-18 (proIL-18) im Western-Blot zu testen, wurde rekombinantes proIL-18 hergestellt, welches kommerziell noch nicht zur Verfügung steht. Die Herstellung erfolgte durch Klonierung der cDNS von proIL-18 in den bakteriellen Expressionsvektor (pET-30a(+)) (Abb. 9).

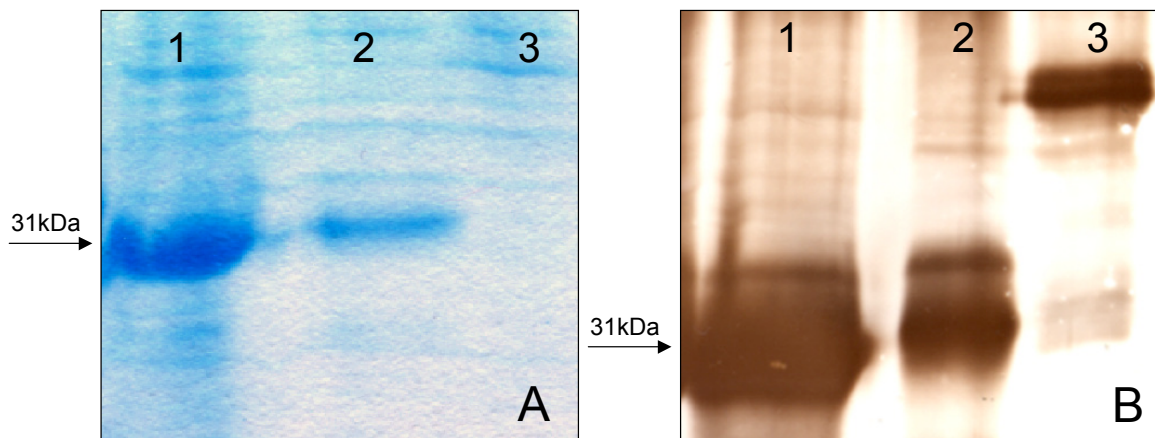


**Abbildung 9: Schematische Darstellung des Expressionsvektors pET-30a(+) mit inaktivem IL-18 (proIL-18).**

Zur prokaryotischen Expression von proIL-18 wurde der Expressionsvektor pET-30a(+) verwendet. Der Vektor trägt zur Vermehrung im Prokaryonten den *origin of replication* (Ori) und das lac-Repressor Gen. Als Selektionsmarker trägt der Vektor das Kanamycin Resistenzgen (kan). Als Transkriptionsinitiator enthält der Vektor den T7 Promoter. Die Translation wird durch den T7 Terminator beendet. Die inklonierte IL-18-DNS ist mit der Kodierung für His-Tag und S-Tag umgeben.

Für die Induktion der proIL-18-Expression wurde IPTG verwendet, ein Enzym, das zur Hemmung des lac-Repressors und somit zur T7 Promoter-Aktivierung und Transkription des proIL-18-Gens führt. Bei der Expression gebildetes proIL-18 wird wie auch andere für *E. coli* fremde Proteine in Einschlußkörpern der bakteriellen Zelle (*inclusion bodies*) akkumuliert. Nach der Induktion der Proteinexpression mit IPTG wurde das rekombinante Protein durch Lyse der Bakterien gewonnen und im Western-Blot getestet. Eine Expression von proIL-18 ist bereits basal vorhanden und nach IPTG-Gabe deutlich induzierbar. Rekombinantes proIL-18 zeigt im Western-Blot eine Bande in der Größe von 31kDa, obwohl die inaktive Form von IL-18 ein Molekulargewicht von 24kDa hat. Das erklärt sich dadurch, daß rekombinantes proIL-18 zusätzlich einen His-Tag, einen S-

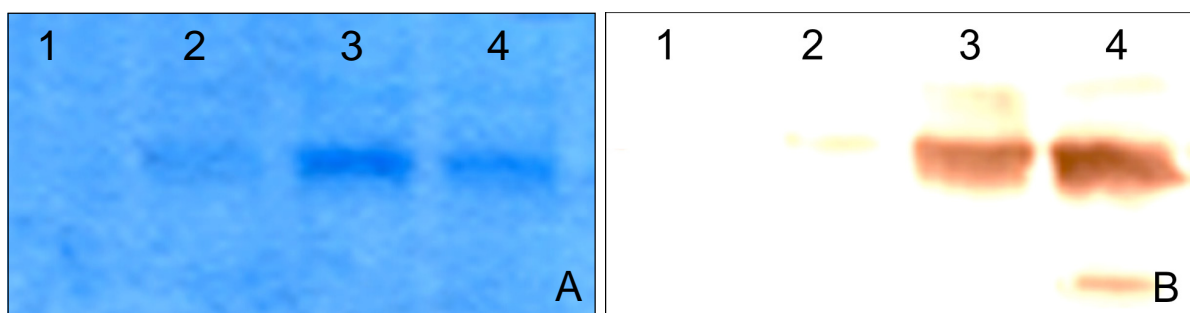
Tag, eine Enterokinase- und Thrombin-Schnittstelle zur Aufreinigung des Proteins enthält (Abb. 10).



**Abbildung 10: Darstellung von rekombinantem proIL-18 aus *inclusion bodies* im Western Blot.**

Die Proteine von bakteriellen *inclusion bodies* nach (Spur 1) und vor (Spur 2) IPTG-Induktion wurden in einem 10% Gel getestet. Als Negativkontrolle wurde rekombinantes SLA-Protein (Spur 3) verwendet. A: Coomassie Blue Färbung des Gesamtproteins; B: DAB-Färbung des Blots von rekombinantem proIL-18-Protein mit anti-His-spezifischen Antikörpern. Die Abbildung zeigt deutliche Banden des rekombinanten Proteins bei einer Größe von 31kDa.

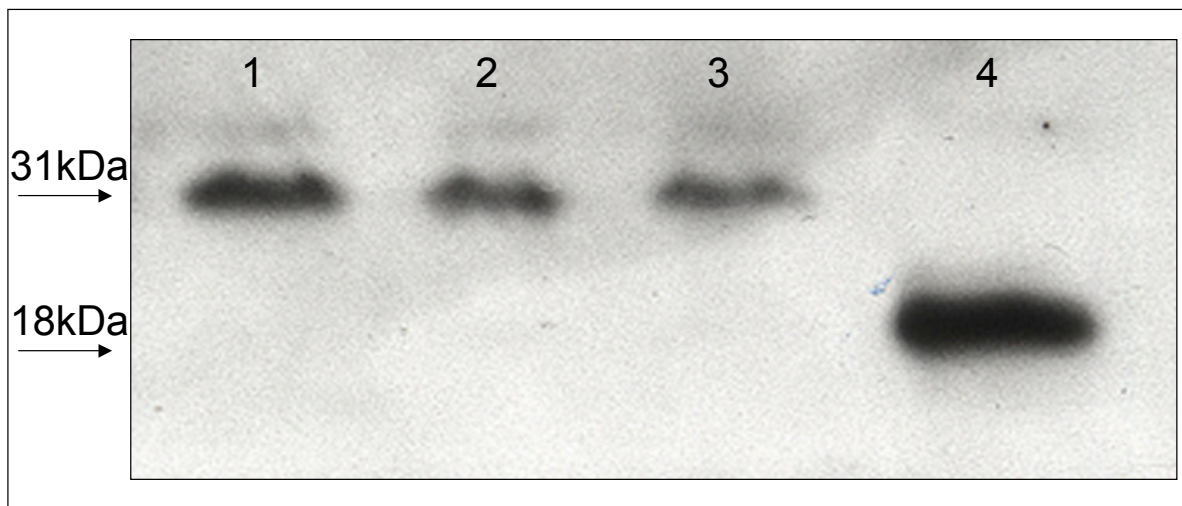
Rekombinantes proIL-18 wurde von bakteriellen Proteinen über eine Nickel-Säule (Ni-NTA-Säule) getrennt, und die Eluate wurden im Western-Blot getestet. Die Western-Blot-Analyse zeigte, daß aufgereinigtes rekombinantes proIL-18 in den Eluaten vorhanden ist (Abb. 11).



**Abbildung 11: Darstellung von rekombinantem proIL-18 im Western Blot nach der Aufreinigung durch die Ni-NTA-Säule.**

Die Eluate (Spur 1-4), die bei der Aufreinigung von rekombinantem proIL-18 durch die Ni-NTA-Säule gesammelt wurden, wurden in einem 10% Gel getestet. A: Coomassie Blue Färbung des Gesamtproteins; B: DAB-Färbung des Blots von rekombinantem proIL-18-Protein mit anti-His-spezifischen Antikörpern. Das Protein ist in den Eluaten 3 und 4 vorhanden.

Der Antikörper (anti-Maus-IL-18 Kaninchen IgG), der später für den Nachweis der IL-18-Expression in transgenen Tieren verwendet werden soll, wurde auf die Erkennung von rekombinantischem proIL-18 im Western-Blot überprüft. Es zeigte sich, daß der Antikörper für den Nachweis sowohl der aktiven als auch der inaktiven Form von IL-18 geeignet ist und zur Expressionsanalyse transgener Mäuse eingesetzt werden kann (Abb. 12).



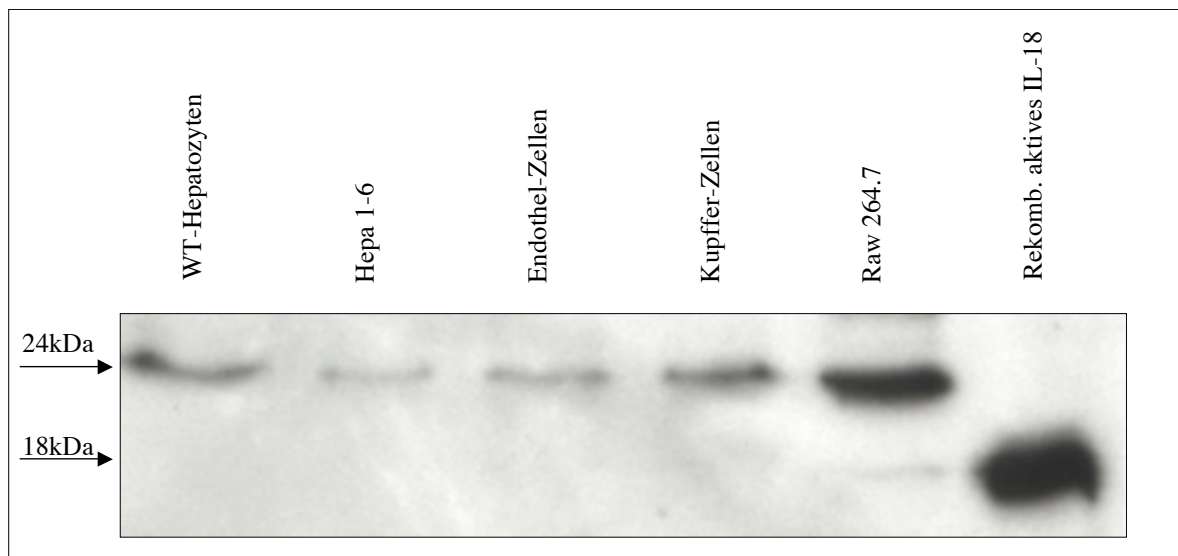
**Abbildung 12: Erkennung von rekombinantischem proIL-18 im Western Blot durch IL-18-spezifischen Antikörper.**

Der IL-18-spezifische Antikörper (anti-Maus-IL-18 Kaninchen IgG, 1:2000 eingesetzt) wurde auf die Erkennung der inaktiven und aktiven Form von IL-18 in einem 10% Gel getestet. Das rekombinante proIL-18 wurde in drei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen. Das gereinigte Protein wurde 1:10 (Spur 1), 1:20 (Spur 2) und 1:40 (Spur 3) mit Loading Puffer verdünnt. Als Positivkontrolle wurden 10ng rekombinantes aktives IL-18 verwendet (Spur 4). Die Abbildung zeigt deutliche Banden in einer Größe von 31kDa bei rekombinantischem proIL-18 und von 18kDa bei rekombinantischem aktivem IL-18.

## 5.2 Nachweis der IL-18 Expression in parenchymatösen und nicht-parenchymatösen Leberzellen

### 5.2.1 Western-Blot-Analyse von Zellysaten

Nachdem gezeigt wurde, daß der IL-18-spezifische Antikörper neben der aktiven Form von IL-18 auch rekombinantes proIL-18 im Western-Blot erkennt, wurde die Expression von IL-18 in parenchymatösen und nichtparenchymatösen Zellen der Leber auf Proteinebene untersucht. Dafür wurden Proteine aus isolierten Hepatozyten, Endothelzellen, Kupffer-Zellen und Proteine einer Hepatom-Zelllinie (Hepa 1-6) mittels Western-Blot-Analyse getestet. Die aus der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 isolierten Proteine und rekombinantes aktives IL-18 wurden als Positivkontrolle für die inaktive bzw. aktive Form von IL-18 benutzt. Es zeigte sich in allen getesteten Zellysaten die inaktive Form von IL-18. Auch Hepatozyten scheinen eine geringe Menge von proIL-18 zu exprimieren. Eine Verunreinigung der Hepatozyten durch andere IL-18-exprimierende Zellen war unwahrscheinlich, da auch Hepa 1-6-Zellen eine deutliche Bande zeigten (Abb. 13).

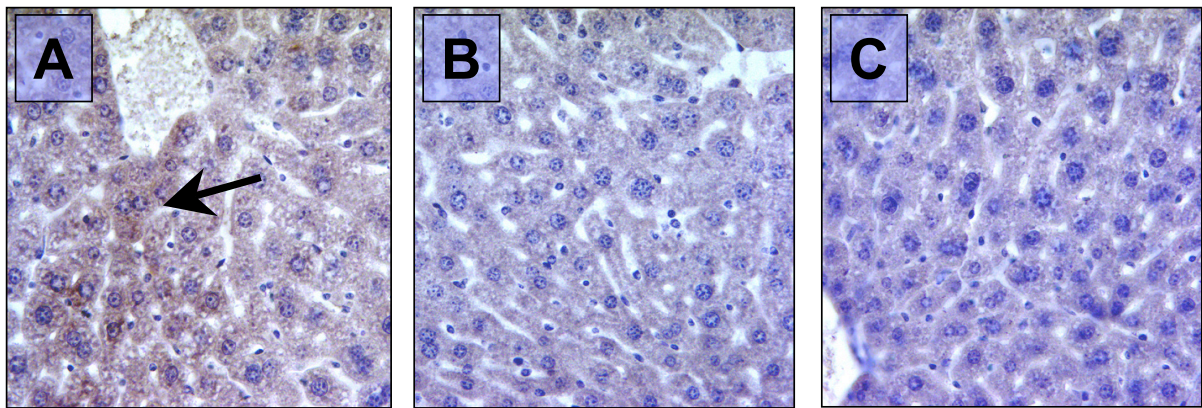


**Abbildung 13: Western-Blot-Analyse der Expression von IL-18 in parenchymatösen und nichtparenchymatösen Zellen.**

Die isolierten Proteine aus Hepatozyten, Hepa 1-6, Endothel-Zellen, Kupffer-Zellen und RAW 264.7-Zellen wurden auf die Expression von IL-18 in einem 15% Gel getestet. Es wurden pro Spur  $15\mu\text{g}$  von aus den Zellen gewonnenem Gesamtprotein aufgetragen. Als Positivkontrolle für die inaktive Form von IL-18 wurden  $15\mu\text{g}$  des Zellysats der Makrophagen-Zelllinie RAW 264.7 verwendet, für die aktive Form von IL-18  $10\text{ng}$  rekombinantes aktives IL-18. Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran übertragen. Der Primärantikörper anti-Maus-IL-18 Kaninchen IgG, der beide Formen von IL-18 erkennt, wurde 1:2000 eingesetzt. Der Western Blot zeigte 24kDa Banden der inaktiven Form von IL-18 in allen Zellysaten.

### 5.2.2 Immunhistochemische Färbung von IL-18 in der Leber

Um die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zu ergänzen, wurde die IL-18-Expression in der Leber der Wildtypiere auch mittels immunhistochemischer Färbung von IL-18 in Paraffinschnitten untersucht. Es wurde der Primärantikörper (Ziege anti-Maus-IL-18 IgG) verwendet, der sowohl die inaktive als auch die aktive Form von IL-18 erkennt. Die immunhistochemischen Ergebnisse zeigten eine schwache basale Expression von IL-18 in Wildtyp-Hepatozyten (Abb. 14).



**Abbildung 14: Immunhistochemische Färbung des IL-18 von Paraffinschnitten aus muriner Wildtyp-Leber.**

Auf der Abbildung sieht man die immunhistochemische Färbung von IL-18 im Lebergewebe einer Wildtyp-Maus mit Primärantikörper Ziege anti-Maus-IL-18 (1:100 eingesetzt) (A), mit Primärantikörper Ziege IgG als Isotypkontrolle (B) und ohne Primärantikörper als Negativkontrolle (C). Das Bild A zeigt eine diffuse bräunliche Färbung von IL-18 in Hepatozyten (Pfeil), die bei der Isotypkontrolle und der Negativkontrolle fehlt. Vergrößerung 20 $\times$ .

## 5.3 Generierung transgener Mäuse

### 5.3.1 Klonierung von IL-18 in die Expressionskassette

Es wurden drei unterschiedliche transgene Mäuse mit Überexpression von IL-18 in der Leber generiert:

A) Transgene Mäuse mit hepatozytenspezifischer Überexpression der inaktiven Form von IL-18 (proIL-18-transgene Mäuse).

B) Transgene Mäuse mit hepatozytenspezifischer Expression der FLAG-markierten aktiven Form von IL-18 (FLAG-IL-18-transgene Mäuse). Das Transgen stellt ein Fusionsprotein von IL-18 mit dem FLAG-Epitop dar, welches die Detektion des transgenen Proteins mittels eines anti-FLAG-spezifischen Antikörpers ermöglichen soll.

C) Da die Sezernierung des Fusionsproteins von aktivem IL-18 mit dem FLAG-Epitop unsicher ist, wurden auch transgene Mäuse mit hepatozytenspezifischer Expression des Fusionsproteins der aktiven Form von IL-18 mit der murinen *IgG-kappa chain leader sequence* (SP-IL-18-transgene Mäuse) generiert. Die *IgG-kappa chain leader sequence* ist ein Signalpeptid, das die Sezernierung von IL-18 aus der Zelle ermöglicht.

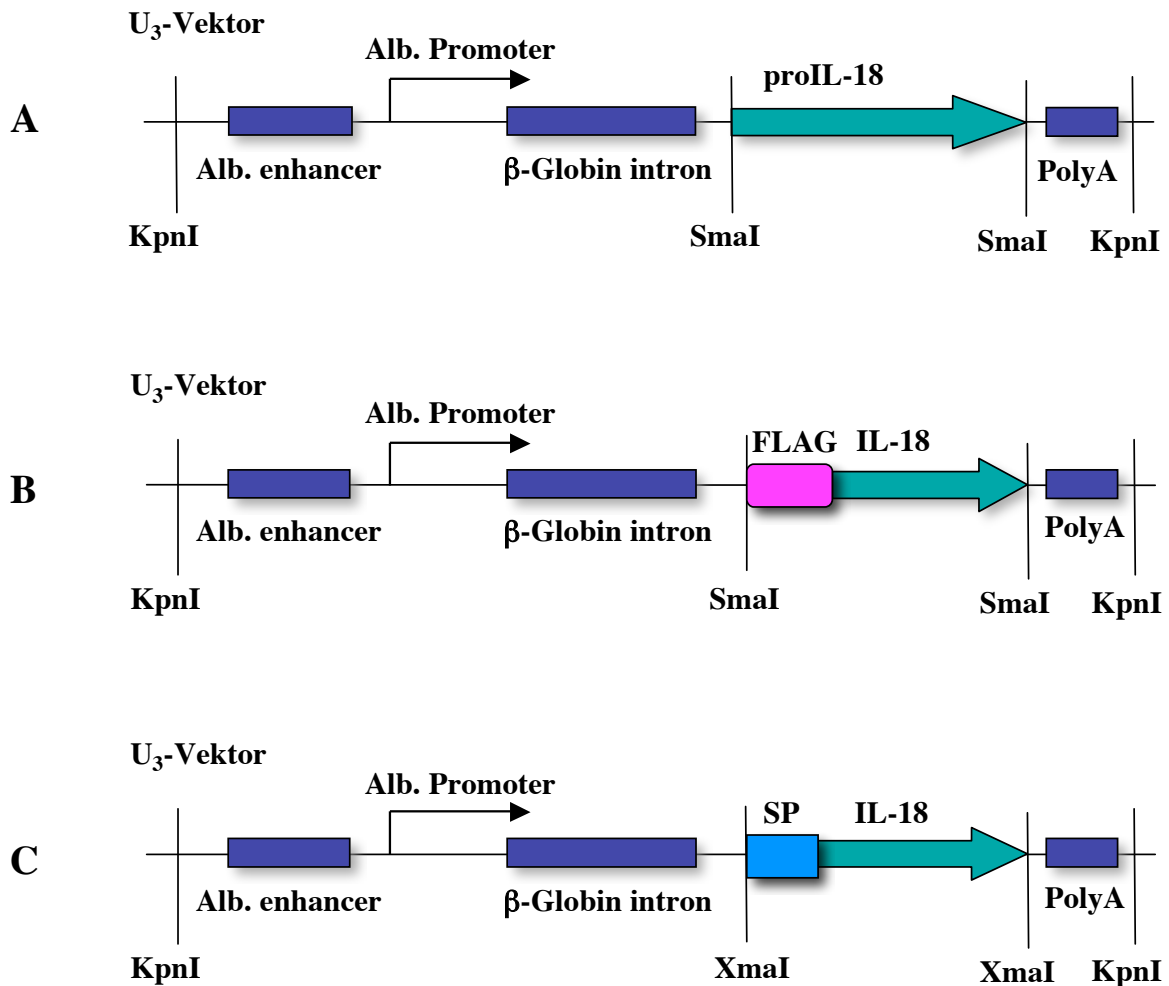
Die cDNS der inaktiven Form, der aktiven FLAG-markierten und der aktiven mit Signalpeptid fusionierten Form von IL-18 wurden nach PCR-Amplifikation mit entsprechenden Primern in die leberspezifische Expressionskassette pBR322/pBSK (U3) in die *Sma*I oder *Xma*I-Restriktionsschnittstelle kloniert. Die cDNS stehen dabei unter der transkriptionellen Kontrolle des leberspezifischen murinen Albumin-Promoters (Abb. 15).

Nach *Kpn*I-Verdau des Vektors erhält man die jeweiligen Injektions-Konstrukte. Die Transgenherstellung erfolgte nach Standardprotokoll durch Mikroinjektion in befruchtete Mauseizellen und anschließenden Transfer in scheinträchtige Leihmütter (Hogan B. et al., 1986).

### 5.3.2 Detektion von IL-18-transgenen Founder-Tieren

Die Detektion von transgenen Founder-Tieren erfolgte mittels PCR-Screening.

In der PCR konnte die Integration des proIL-18-Transgens mit den transgenspezifischen Primern (sense: Alb2; antisense: otto-hinten; PCR-Produkt von 1187 bp) überprüft werden. Es konnten nach der Injektion des pro-IL-18-Konstrukts sechs transgene Foundertiere generiert werden.

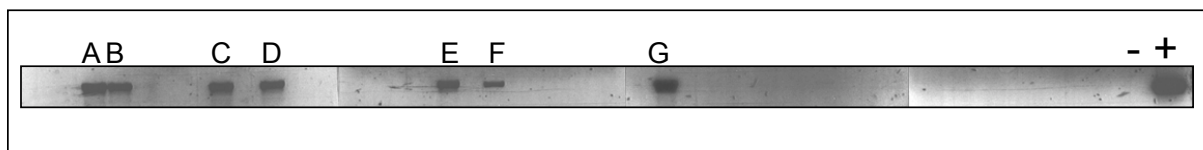


**Abbildung 15: Schematische Darstellung der hepatozytenspezifischen Transgenkonstrukte der inaktiven bzw. aktiven Form von IL-18.**

Die cDNS stehen unter der transkriptionellen Kontrolle des murinen Albumin-Promoters/Enhancers, der die konstitutive Expression des klonierten Gens in Hepatozyten ermöglicht. Die Expressionsvektoren enthielten das Kaninchen- $\beta$ -Globin-Intron-2 und das Polyadenylierungssignal (PolyA) aus dem Gen für das humane Wachstumshormon. A zeigt die Expressionskassette U3 mit proIL-18. Das Konstrukt trägt einen vollständigen Leserahmen von murinem IL-18. B zeigt die Expressionskassette U3 mit der FLAG-markierten cDNS der aktiven Form von IL-18 (FLAG-IL-18). Das FLAG-Epitop dient zur Detektion des Proteins im Western Blot mit einem FLAG-spezifischen Antikörper. C zeigt die Expressionskassette U3 mit dem Fusionsgen der cDNS der aktiven Form von IL-18 und *IgG-kappa leader sequence* (SP-IL-18). Bei der Expression des Fusionsproteins ermöglicht die *IgG-kappa leader sequence* die Sezernierung von IL-18 aus der Zelle. Die cDNS der aktiven Form von IL-18 mit *IgG-kappa-leader sequence* wurde mittels einer Reihe von sequentiellen PCR-Reaktionen mit einander überlappenden Primern fusioniert.

Nach der Injektion des FLAG-IL-18-Konstrukts entstandene Nachkommen wurden mit den transgenspezifischen Primern (sense: U3 vorn und antisense: otto-hinten; PCR-Produkt von 550 bp) getestet. Elf FLAG-IL-18-Foundertiere zeigten ein positives Signal in der PCR-Reaktion.

Zur Detektion von SP-IL-18-Foundern wurden die transgenspezifischen Primer sense: kseq3 und antisense: akt-end verwendet (PCR-Produkt von 540 bp Länge). Sieben SP-IL-18-transgene Foundertiere konnten generiert werden. Die in der Abbildung 16 dargestellte PCR zeigt beispielhaft die Detektion SP-IL-18-transgener Foundertiere.



**Abbildung 16: Polymerase Kettenreaktion mit genomischer DNS aus Ohrbiopsien von Foundertieren.**

Die Abbildung zeigt beispielhaft die PCR-Amplifikationsprodukte aus genomischer DNS verschiedener Foundertiere nach der Injektion des SP-IL-18 Transgen-Konstrukts. Eine positive Kontrollreaktion (+) erfolgte durch die Amplifikation der für die Injektion verwendeten Konstrukt-DNS. Als Negativkontrolle (-) diente genomische DNS einer Wildtyp-Maus. Aus nach der Injektion entstandenen 43 Tieren zeigen 7 Founder (Linien A, B, C, D, E, F, G) ein positives Signal von 540bp.

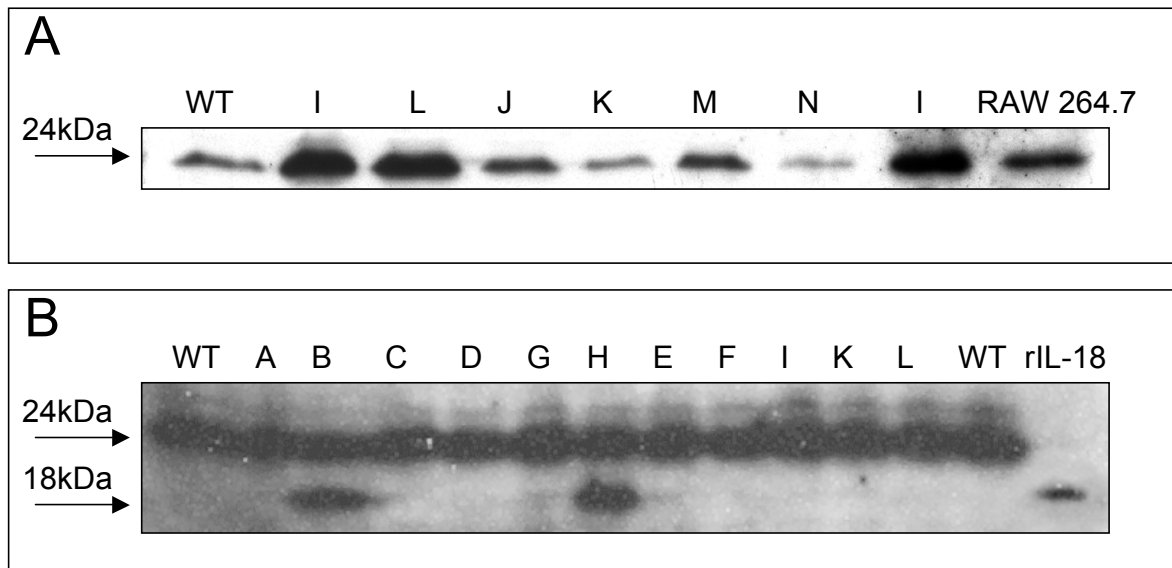
Da die Zucht der transgenen Linien heterozygot angelegt wurde, mußte die Weitergabe des Transgens standardmäßig mittels PCR überprüft werden. Alle generierten Foundertiere waren in der Lage, das Transgen unabhängig vom Geschlecht weiterzuerben.

### 5.3.3 Transgen-Expression von IL-18 auf Proteinebene

#### Nachweis der Expression der inaktiven Form von IL-18 in der Leber proIL-18-transgener Mäuse

Die Expression der inaktiven Form von IL-18 in der Leber des Foundernachwuchses wurde mittels Western-Blot-Analyse und Immunhistochemie getestet. Für die Western-Blot-Analyse wurden Proteine aus isolierten Hepatozyten verwendet. Um die isolierten Hepatozyten von nichtparenchymatösen Zellen zu reinigen und somit die Kontamination des transgenen IL-18 mit in anderen Zellen der Leber exprimierendem IL-18 zu verhindern, wurden die nichtparenchymatösen Zellen durch eine Behandlung mit depletierenden Antikörpern gegen Monozyten, Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen, sowie Komplement lysiert. Zwei Linien I und L proIL-18-transgener Mäuse mit deutlich erhöhter

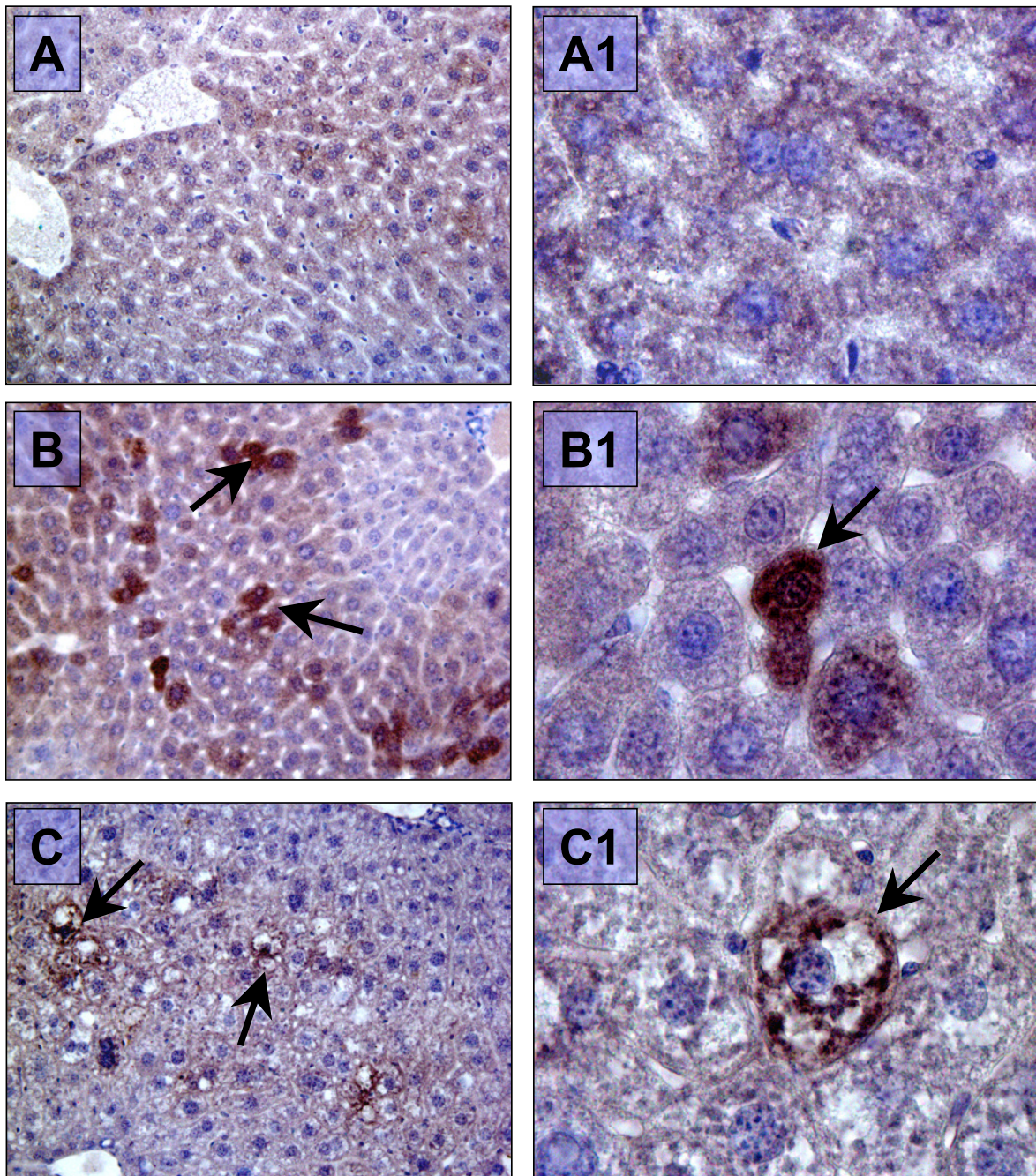
Expression der inaktiven Form von IL-18 in Hepatozyten wurden etabliert (Abb. 17 A).



**Abbildung 17: Western Blot-Analyse der Expression von IL-18 in Hepatozyten von proIL-18-transgenen (A) und FLAG-IL-18-transgenen Mäusen (B).**

Die Expression von IL-18 in Hepatozyten transgener Mauslinien wurde in einem 15% Acrylamid-Gel getestet. Pro Spur wurden  $25\mu\text{g}$  Gesamtprotein aus aufgereinigten Hepatozyten aufgetragen. Der primäre anti-Maus-IL-18 Kaninchen IgG wurde 1:2000, der sekundäre POX-markierte anti-Kaninchen-Antikörper wurde 1:1000 eingesetzt. Als Positivkontrolle für aktives IL-18 wurden 10ng rekombinantes aktives IL-18 und für proIL-18 wurden  $25\mu\text{g}$  Gesamtprotein des Zellysates von RAW 264.7 -Zellen verwendet. In der Abbildung A ist ein Western Blot von Hepatozyten proIL-18-transgener Mäuse dargestellt. Die Banden auf der Höhe von 24kDa zeigen die Expression von proIL-18 in Hepatozyten. Die transgenen Mauslinien I und L exprimieren stärker proIL-18 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle und anderen transgenen Linien. In der Abbildung B ist der Western Blot von Hepatozyten FLAG-IL-18-transgener Mäuse dargestellt. Transgene Tiere der Linien B und H zeigen im Blot deutliche Banden in Höhe von 18kDa.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse wurden durch eine immunhistochemische Färbung von IL-18 in der Leber bestätigt. Die transgenen Linien I und L zeigten eine deutliche Überexpression von proIL-18 in der Leber im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abb. 18 A, A1, B und B1). Die immunhistochemische Färbung der inaktiven Form von IL-18 in der Leber wurde auf Paraffinschnitten mit Ziege anti-Maus-IL-18 IgG als Primärantikörper und Ziege IgG als Isotypkontrolle durchgeführt. Die Färbung von IL-18 in einzelnen Hepatozyten weist darauf hin, daß der Albuminpromoter nicht in allen Hepatozyten gleichzeitig aktiv ist (Abb. 18 B1).



**Abbildung 18: Immunhistochemische Färbung des IL-18 von Paraffinschnitten aus muriner Leber.**

Auf der Abbildung sind immunhistochemische Färbungen von IL-18 in der Leber einer Wildtyp-Maus (A und A1), im Lebergewebe einer proIL-18-transgenen Maus (Linie L) (B und B1) und einer FLAG-IL-18-transgenen Maus (Linie H) (C und C1) dargestellt. Die Hepatozyten der transgenen Mäuse mit Überexpression von IL-18 sind braun gefärbt (Pfeil). Vergrößerung: A, B, C - 10×; A1, B1 und C1 - 40×.

### **Nachweis der Expression der aktiven Form von IL-18 in FLAG-IL-18-transgenen Tieren**

Die Transkription der FLAG-markierten aktiven Form von IL-18 in der Leber der FLAG-IL-18-transgenen Mäuse wurde ebenfalls mittels Western Blot-Analyse und immunhistochemischer Färbung wie oben beschrieben (siehe 5.3.3) überprüft. Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigten, daß von elf transgenen Linien nur zwei (Linie B und H) das FLAG-IL-18-Fusionsprotein in Hepatozyten exprimieren (Abb. 17 B).

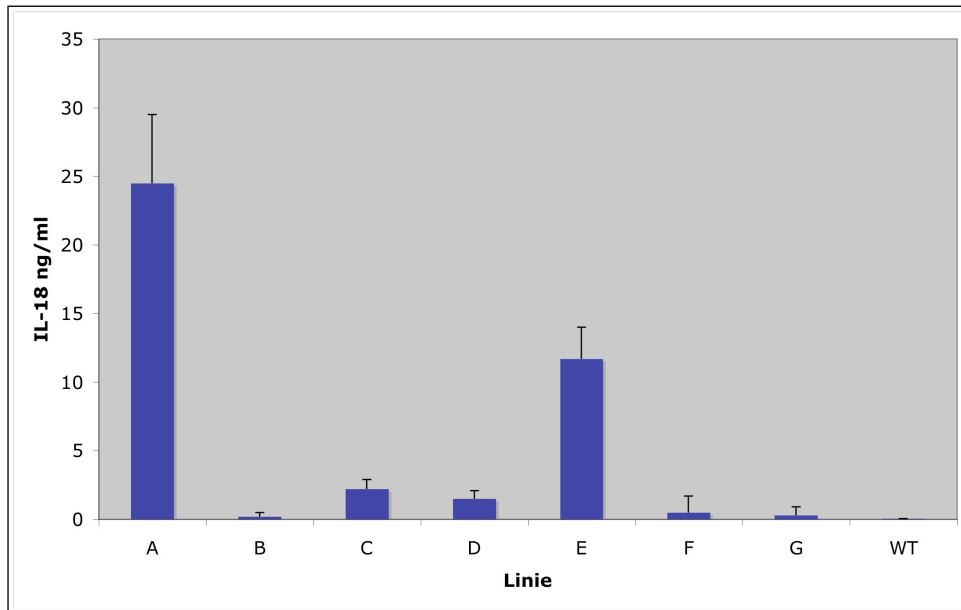
Die immunhistochemische Färbung der Leber der transgenen Mäuse zeigte die Expression der aktiven Form von IL-18 in einzelnen Hepatozyten (Abb. 18 A, A1, C und C1).

### **Nachweis der Expression der aktiven Form von IL-18 in SP-IL-18-transgenen Tieren**

Zur Etablierung von SP-IL-18-transgenen Mäusen wurde die aktive Form von IL-18 im Serum von transgenen Nachkommen getestet. Die *IgG-kappa leader sequence*, mit der das IL-18-Gen fusioniert wurde, sollte die Sezernierung von biologisch aktivem IL-18 aus Hepatozyten ermöglichen. Dafür wurde die aktive Form von IL-18 im Serum der transgenen Mäuse mittels eines kommerziell verfügbaren IL-18-ELISA-Kits bestimmt. Die transgenen Linien A und E, die IL-18 am stärksten exprimieren (Abb. 19), wurden für die weitere Zucht verwendet.

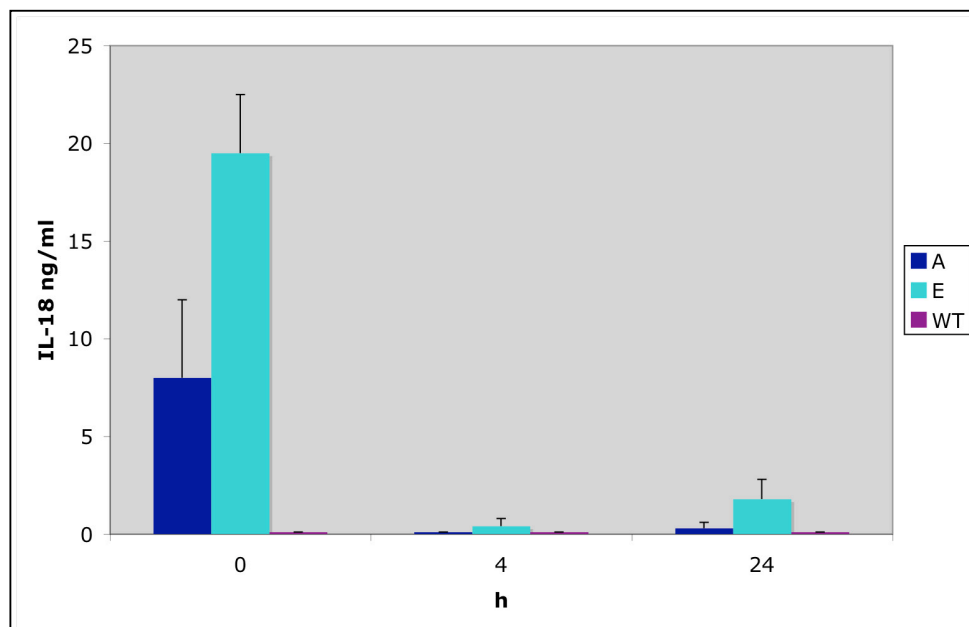
IL-18 im Serum der SP-IL-18-transgenen Tiere konnte durch Behandlung mit 500 $\mu$ g neutralisierenden monoklonalen anti-IL-18-spezifischen Antikörpern SK113AE-4 blockiert werden (Abb. 20), welche aus dem Überstand einer Hybridom-Zelllinie gewonnen und durch eine IgG-Säule aufgereinigt wurden.

Zur Bestimmung, ob die Expression des SP-IL-18-Transgens mit steigendem Alter der SP-IL-18-transgenen Mäuse sich verändert, wurden die Seren von F1-Nachkommen der transgenen Linien A und E im Alter von 5, 10 und 20 Lebenswochen getestet (Abb. 21). Die Transgenen Mäuse im Alter von 5 Lebenswochen zeigten eine stärkere Transgen-Expression als ältere transgene Mäuse.



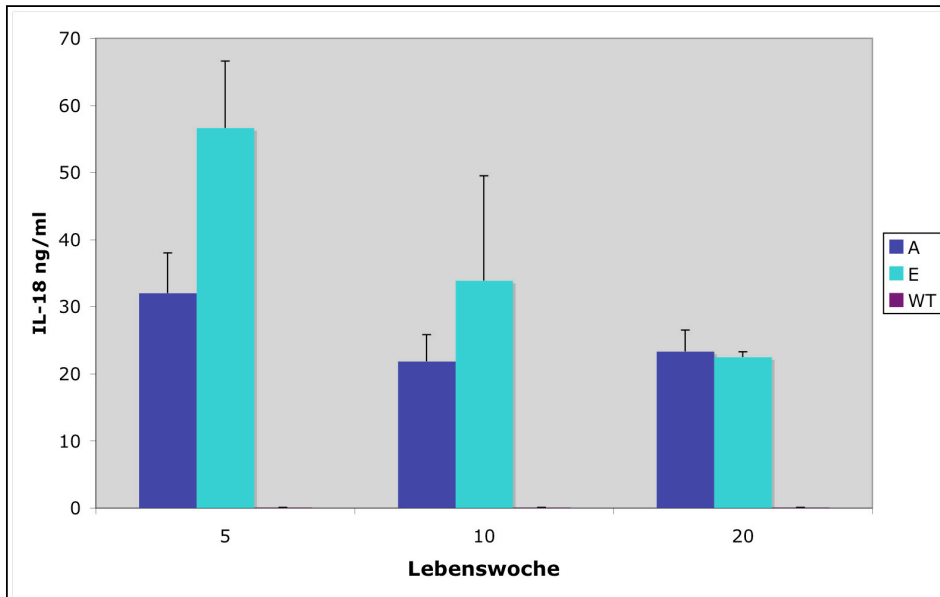
**Abbildung 19: IL-18-ELISA von Seren der SP-IL-18-transgenen Mäuse.**

Zum Nachweis der aktiven Form von IL-18 im Blut wurden die Seren der SP-IL-18-transgenen Mäuse mittels IL-18-ELISA getestet. Die Darstellung enthält Mittelwerte der Serumspiegel von IL-18 bei verschiedenen transgenen Linien (je drei Mäuse im Alter von 2 Monaten). Alle Linien zeigen eine erhöhte Expression der aktiven Form von IL-18 im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Die transgenen Mäuse der Linien A und E exprimieren die aktive Form von IL-18 am stärksten.



**Abbildung 20: *In vivo*-Neutralisation der aktiven Form von IL-18.**

Die Abbildung zeigt die neutralisierende Fähigkeit der SK113AE-4 AK von IL-18 bei SP-IL-18-transgenen Tieren. Jeweils drei transgene Mäuse der Linien A und E im Alter von 5 Monaten wurden i.p. mit 500 µg AK behandelt. IL-18-Serumwerte wurden mittels ELISA vor der Behandlung sowie 4 und 24 Stunden nach der Behandlung mit neutralisierenden AK gemessen.



**Abbildung 21: Nachweis von IL-18 im Serum von SP-IL-18-transgenen Mäusen.**

Auf der Abbildung sind die Serumspiegel der aktiven Form von IL-18 in ng/ml bei den transgenen F1-Nachkommen der Linien A und E dargestellt. Zur Bestimmung der Expression von IL-18 in SP-IL-18-transgenen Mäusen wurden Seren von jeweils drei F1-Nachkommen im Alter von 5, 10 und 20 Lebenswochen untersucht. Die ELISA-Ergebnisse zeigen eine höhere IL-18 Expression bei den 5 Wochen alten transgenen Tieren.

## 5.4 Phänotyp transgener Mäuse

Die Größe und das Zuchtverhalten der proIL-18-, FLAG-IL-18- und SP-IL-18-transgenen Tiere wiesen keine Abnormalitäten auf. Die unterschiedlichen Transgene haben auf die Entstehung und Entwicklung der Mäuse keine erkennbare Auswirkung. Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht war unverändert.

Um das Ausmaß eines eventuellen Leberschadens zu quantifizieren, wurden die Leberenzyme Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) im Serum bestimmt. Die Tabelle (Abb. 22) zeigt keine Unterschiede in der Transaminasenkonzentration transgener Tiere im Vergleich zu Wildtyptieren. Die gering erhöhte GOT-Konzentration im Serum transgener Tiere war nicht signifikant.

	WT	ProIL-18		FLAG-IL-18-aktiv		SP-IL-18-aktiv	
Linie		I	L	B	H	A	E
GOT(U/L)	118±80	148±70	131±70	94±31	112±70	122±115	137±138
GPT(U/l)	51±19	61±19	51±9	61±13	46±10	52±23	54±19

### Abbildung 22: Gegenüberstellung der Transaminasenwerte von Wildtyptieren und transgenen Tieren.

Das Blut wurde den Tieren (n=12, im Alter von 13 bis 16 Lebenswochen) durch Herzpunktion oder aus der Schwanzvene entnommen und daraus Serum gewonnen. Das gewonnene Serum wurde 1:5 mit 0,9% NaCl verdünnt und im Zentrallabor des Klinikums Mainz auf Transaminasen bestimmt. Im Vergleich zwischen Wildtyptieren und transgenen Tieren zeigten sich keine Auffälligkeiten.

Im Serum der proIL-18- und FLAG-IL-18-transgenen Mäuse zeigte sich im Gegensatz zu den SP-IL-18-transgenen Mäusen kein erhöhter IL-18-Spiegel. Zur Prüfung, ob IL-18 als Immunmodulator bei transgenen Mäusen einen Einfluß auf die Produktion von Th1- oder Th2-Zytokinen hat, wurden im Serum transgener Tiere unterschiedlichen Alters (von 5 Wochen bis 6 Monaten) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4 mittels ELISA bestimmt. Bei allen drei Mausmodellen war kein erhöhter Serumspiegel dieser Zytokine nachweisbar.

#### 5.4.1 Leberhistologie

##### Leberhistologie der proIL-18-transgenen Mäuse

Zur Untersuchung des Phänotyps von transgenen Mäusen mit hepatischer Überexpression der inaktiven Form von IL-18 wurde die Leber von Mäusen der Linien I und L in unterschiedlichem Alter histologisch untersucht. Beide Linien zeigten den gleichen Phänotyp. Schon im Alter von zwei Monaten fanden sich bei den transgenen Mäusen einzelne ent-

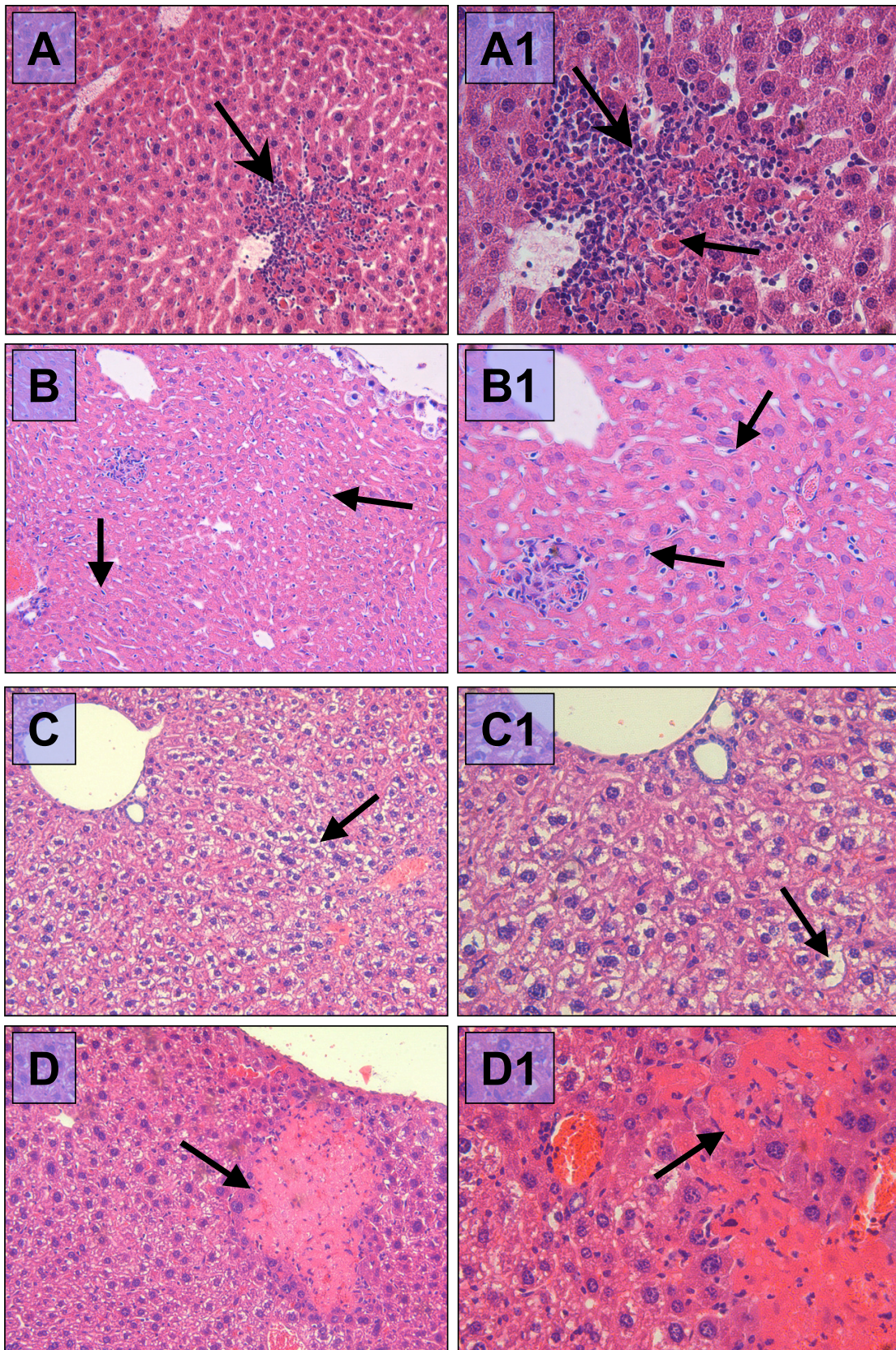
zündliche Infiltrate mit Gruppenzellnekrose der Hepatozyten bei erhaltener Leberarchitektur (Abb. 23 A und A1).

In der HE-Färbung der Leber von drei bis sechs Monate alten transgenen Mäusen zeigte sich eine vermehrte Anzahl an Kupffer-Zellen im Vergleich zu Wildtyptieren (Abb. 23 B und B1).

Ab dem siebten Lebensmonat kam es bei proIL-18-transgenen Mäusen zu einer Störung der Leberarchitektur und einer mit dem Alter zunehmenden Degeneration der Hepatozyten. Die Hepatozyten waren geschwollen und hatten ein blasses und schaumiges Zytoplasma (Abb. 23 C und C1). Bei zwölf Monate alten proIL-18-transgenen Mäusen traten zudem vereinzelte Nekroseareale auf (Abb. 23 D und D1).

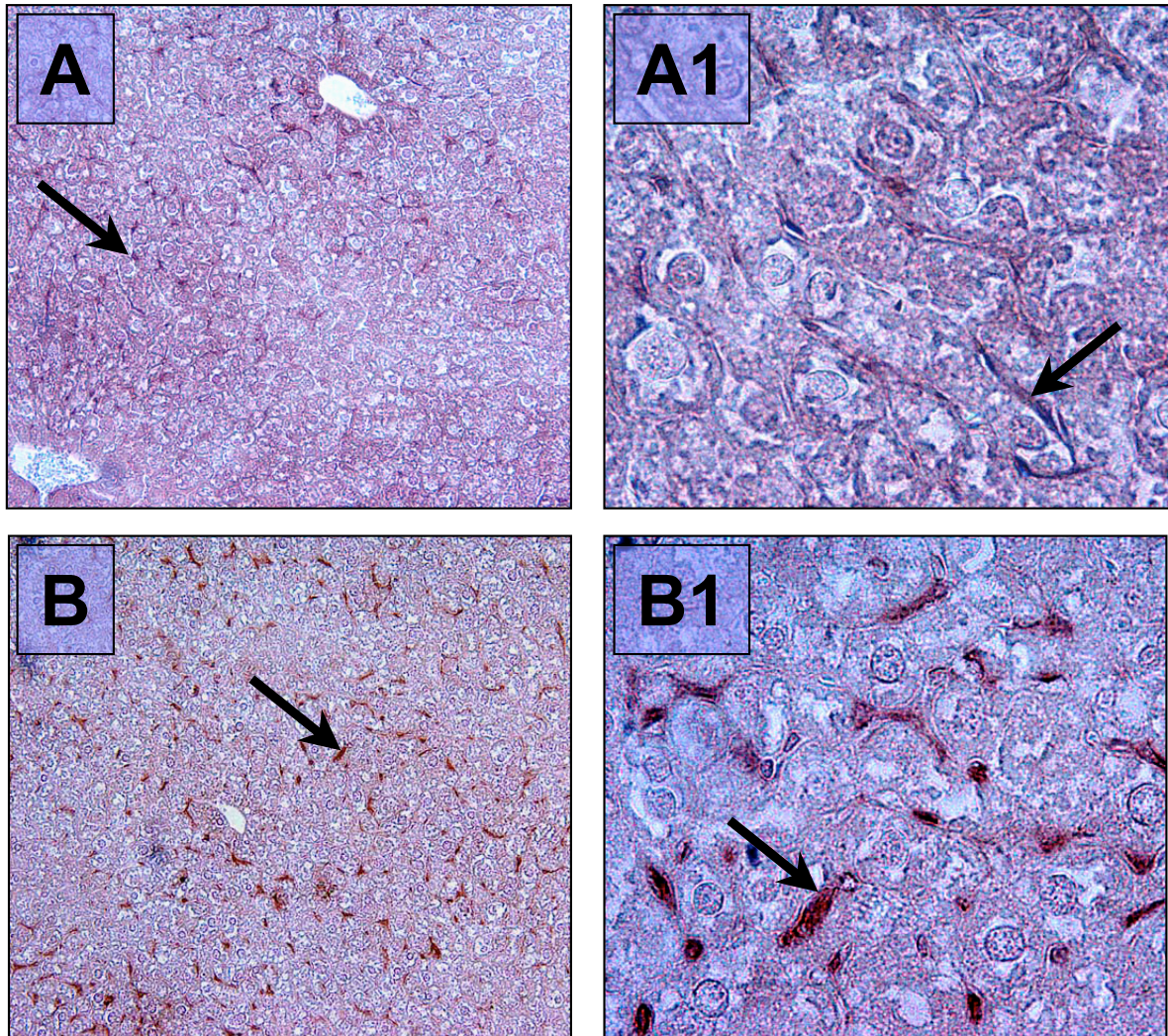
Um den Befund einer vermehrten Anzahl an Kupffer-Zellen bei proIL-18-transgenen Mäusen zu überprüfen, wurde eine immunhistochemische Färbung der Kupffer-Zellen mit einem monoklonalen Ratte anti-Maus Antikörper F4/80 durchgeführt. Hierfür wurde Lebergewebe von proIL-18-transgenen Mäusen sowie Wildtyptieren im Alter von fünf bis acht Monaten verwendet. Die immunhistochemische Untersuchung zeigte eine vermehrte Anzahl von aktivierten Kupffer-Zellen bei transgenen Mäusen im Alter von fünf bis acht Monaten, was auf eine langzeitige entzündliche Reaktion hindeutet (Abb. 24).

Eine chronische Entzündung führt häufig zu einer gesteigerten Fibrogenese in der Leber. Daher wurde eine Picro-Siriusrot-Färbung von der Leber transgener Mäuse verschiedenen Alters durchgeführt. Durch diese Färbung werden Kollagenfasern sichtbar, die im Schnitt in rot erscheinen. ProIL-18-transgene Mäuse zeigten mit steigendem Alter vermehrte Kollagenablagerungen in der Leber im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen (Abb. 25). Die fibrotische Reaktion erfaßte den periportalen Bereich der Leber ab einem Alter von sechs Lebensmonaten. In einzelnen Bereichen im Disse-Raum traten leichte perisinusoidale Faserbündel auf.



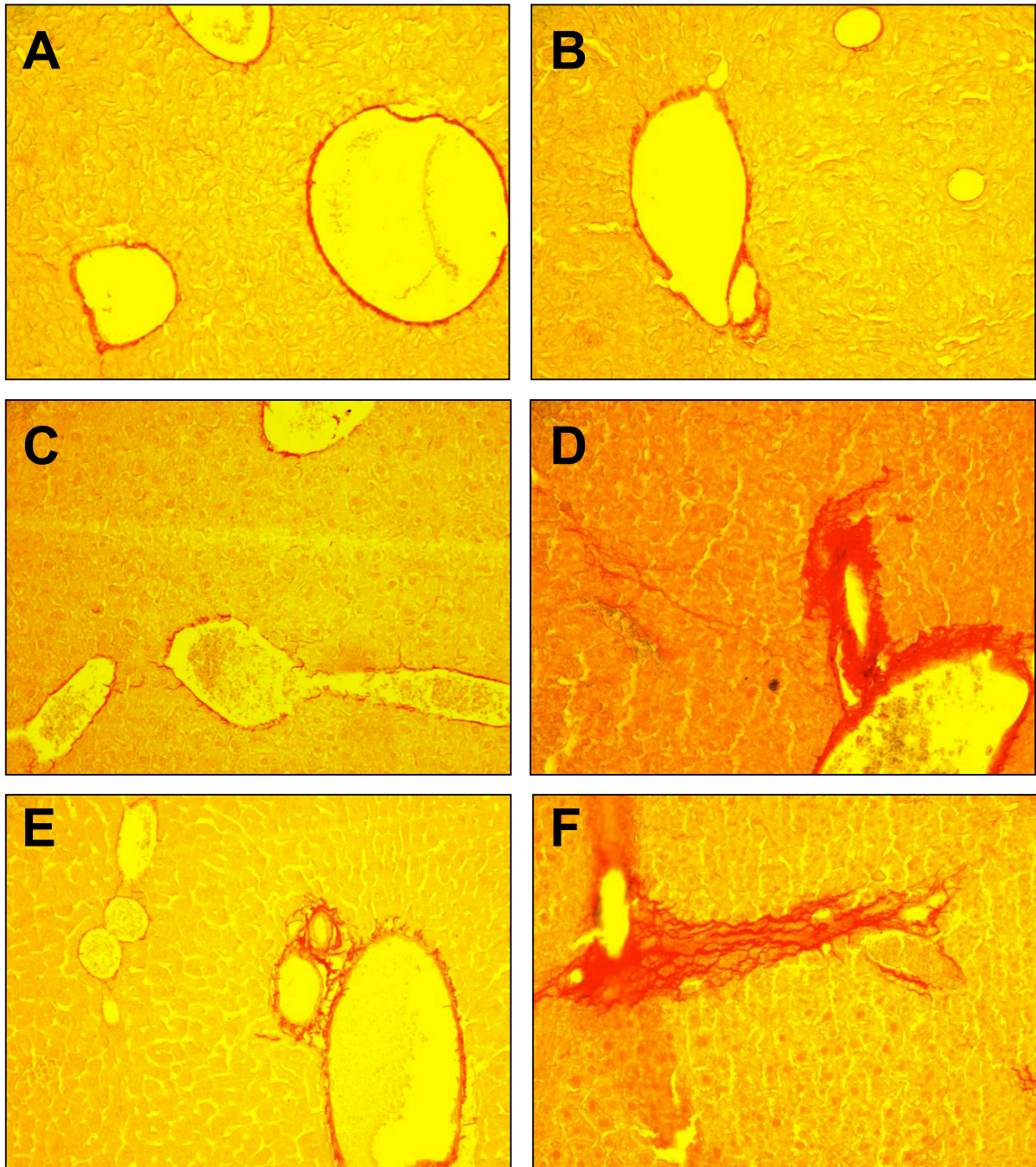
**Abbildung 23: Leberhistologie von proIL-18-transgenen Mäusen.**

Die Abbildung zeigt die Lebern von proIL-18-transgenen Mäusen unterschiedlichen Alters: Lymphozytäre Infiltrate (großer Pfeil) und nekrotische Hepatozyten (kleiner Pfeil) einer 2 Monate alten transgenen Maus (A und A1), die vermehrte Anzahl an Kupfer-Zellen einer 5 Monate alten Maus (B und B1), die zunehmende Degeneration von Hepatozyten im Alter von 7 Monaten (C und C1) und Nekrose-Bildung im Alter von 12 Monaten (D und D1). Vergrößerung: A, B, C und D - 10×; A1, B1, C1 und D1 - 20×.



**Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von Kupfer-Zellen.**

In der Abbildung ist Lebergewebe von Wildtyptieren (A und A1) und von proIL-18-transgenen Mäusen (B und B1) im Alter von 6 Monaten dargestellt. Die Lebermakrophagen sind braun eingefärbt (Pfeil). Bei transgenen Mäusen ist die Zahl der Kupfer-Zellen erhöht und die Zellen sind deutlich vergrößert im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle. Vergrößerung: A und B - 10 $\times$ , A1 und B1 - 40 $\times$ .



**Abbildung 25: Piko-Siriusrot-Färbung nach Puchtler von der Leber proIL-18-transgener Mäuse.**

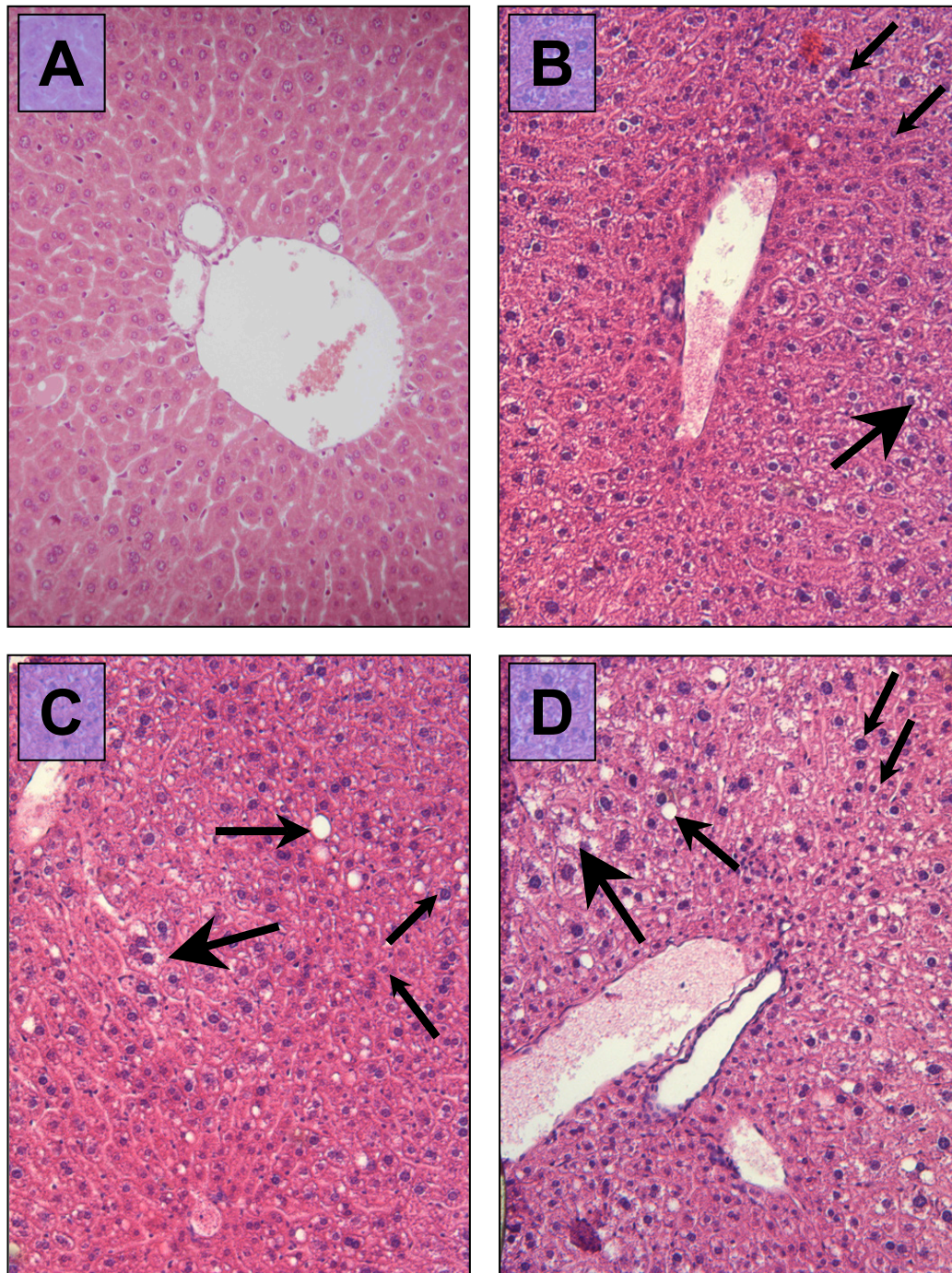
Es wurden drei Altersgruppen von proIL-18-transgenen Mäusen (B, D, F) und Wildtypmäusen (A, C, E) getestet: 3 Monate alte (A und B), 6 Monate alte (C und D) und 12 Monate alte (E und F) Tiere. Im Alter von 3 Monaten konnte kein Unterschied zwischen einer transgenen Maus (B) und der Wildtypkontrolle (A) festgestellt werden. Ab 6 bis 12 Lebensmonaten nahmen die Kollagenablagerungen bei transgenen Mäusen (D und F) im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen zu (C und E). Vergrößerung 10 $\times$ .

**Histologie von FLAG-IL-18-transgenen Mäusen**

Die Leber von FLAG-IL-18-transgenen Mäusen beider exprimierender Linien B und H wurde den Tieren im Alter von 3 bis 8 Lebensmonaten entnommen (Abb. 26). Sowohl die jüngeren als auch die älteren transgenen Mäuse zeigten eine gestörte Architektur der Leber und eine deutliche Kernunruhe der Hepatozyten. Im Alter von 6 bis 8 Lebensmonaten zeigten FLAG-IL-18-transgene Mäuse beider Linien zunehmend feintropfige Verfettung und Auflockerungen des Zytoplasmas der Hepatozyten. Bei FLAG-IL-18-transgenen Mäusen wurde im Gegensatz zu proIL-18-transgenen Mäusen keine Fibrogenese beobachtet (Abb. 27), was durch eine unsichere Sekretion von IL-18 aus Hepatozyten erklärt werden kann.

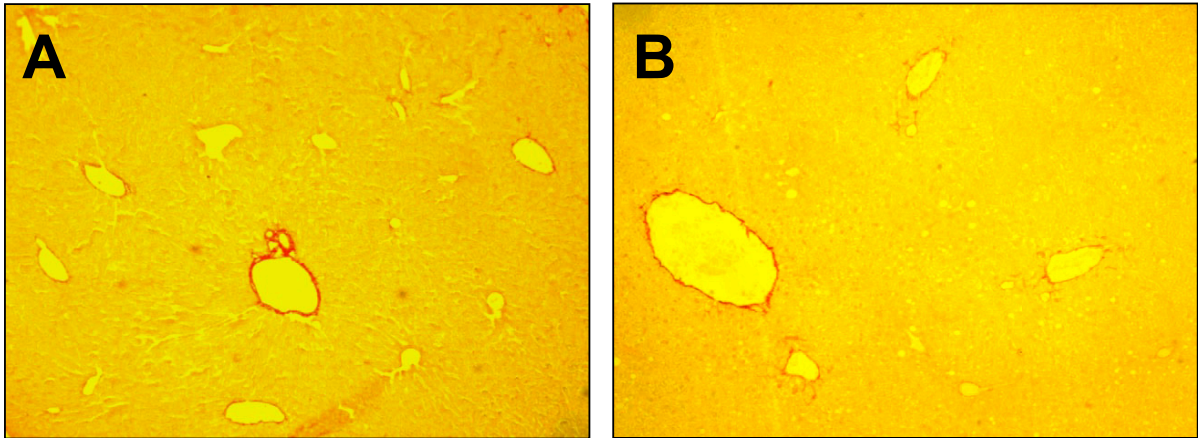
**Leberhistologie von SP-IL-18-transgenen Mäusen**

Bisher wurden nur junge SP-IL-18-transgene Mäuse im Alter von fünf bis zwölf Lebenswochen histologisch untersucht. In der Leber transgener Mäuse wurde eine vermehrte Anzahl aktivierter Kupffer-Zellen festgestellt. Die Leberarchitektur und die Hepatozyten der transgenen Mäuse zeigten in diesem Alter keine Abnormalitäten (Abb. 28).



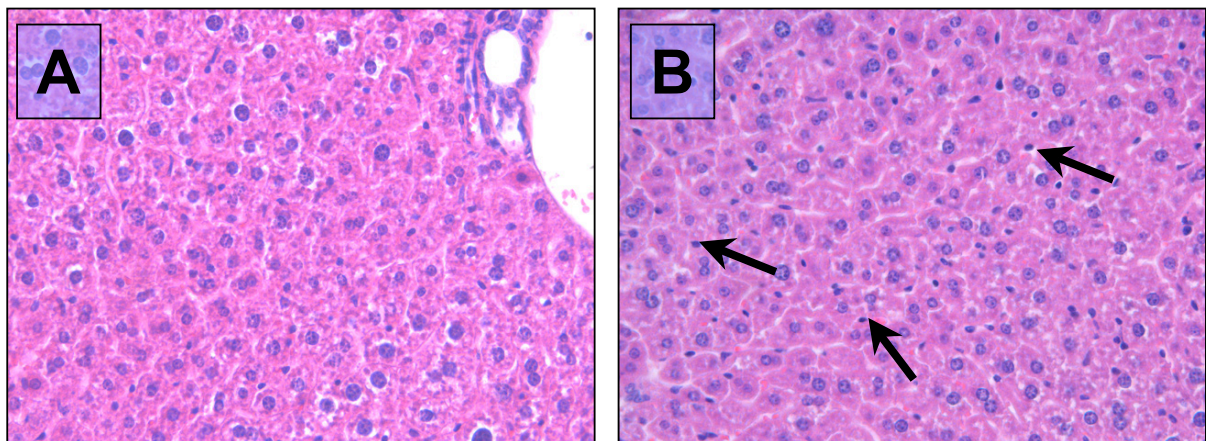
**Abbildung 26: Leberhistologie von FLAG-IL-18-transgenen Mäusen.**

Die Abbildung zeigt die Leberhistologie einer Wildtyp-Maus (A) und von FLAG-IL-18-transgenen Mäusen im Alter von 3 Lebensmonaten (B), 6 Lebensmonaten (C) und 8 Lebensmonaten (D). Die Leberarchitektur von transgenen Mäusen ist im Vergleich zu der von Wildtyp-Tieren verändert. Die Zellkerne der Hepatozyten sind von verschiedener Größe (kleiner Pfeil), ab dem 6. Lebensmonat zeigen die transgenen Mäuse eine feintropfige Verfettung der Leber (mittelgroßer Pfeil) und teilweise Aufhellung des Zytoplasmas von Hepatozyten (großer Pfeil). Vergrößerung 10 $\times$ .



**Abbildung 27: Picro-Siriusrot-Färbung nach Puchtler von der Leber FLAG-IL-18-transgener Mäuse.**

Die Abbildung zeigt eine Kollagen-Färbung von einer Wildtyp-Maus (A) und einer FLAG-IL-18-transgenen Maus (B) im Alter von 8 Lebensmonaten. Es konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Vergrößerung 4 $\times$ .



**Abbildung 28: Leberhistologie von SP-IL-18-transgenen Mäusen im Alter von 10 Lebenswochen.**

Die Leberhistologie von transgenen Mäusen zeigt eine vermehrte Zahl an aktivierten Kupffer-Zellen (B) im Vergleich zur Wildtypkontrolle (A). Vergrößerung 20 $\times$ .

## 5.5 LPS-abhängiger Leberschaden mit und ohne Präkonditionierung mit CpG

Zur Klärung der Rolle von IL-18 bei der LPS-abhängigen Leberschädigung wurden in den folgenden Versuchen je sieben bis zehn männliche Tiere im Alter von 8 bis 16 Wochen der proIL-18-transgenen Mäuse und der SP-IL-18-transgenen Mäuse sowie der entsprechenden Wildtyp-Kontrollen eingesetzt (Abb. 29).

Eine Gruppe der proIL-18-transgenen Mäuse, SP-IL-18-transgenen Mäuse und Wildtyp-tiere wurde i.p. mit einer subletalen Dosis 100 $\mu$ g *E. coli* LPS behandelt.

Einer zweiten Gruppe wurden i.p. sequentiell CpG-Oligonukleotide und LPS nach einem etablierten IL-18-abhängigen Schädigungsmodell verabreicht (Gould M.P. et al., 2004). Dabei erfolgte eine Präkonditionierung mit 65 $\mu$ g CpG (40 $\mu$ g am ersten Tag und 25 $\mu$ g am zweiten Tag). Am dritten Tag wurden die Mäuse wie die erste Gruppe mit 100 $\mu$ g *E. coli* LPS behandelt.

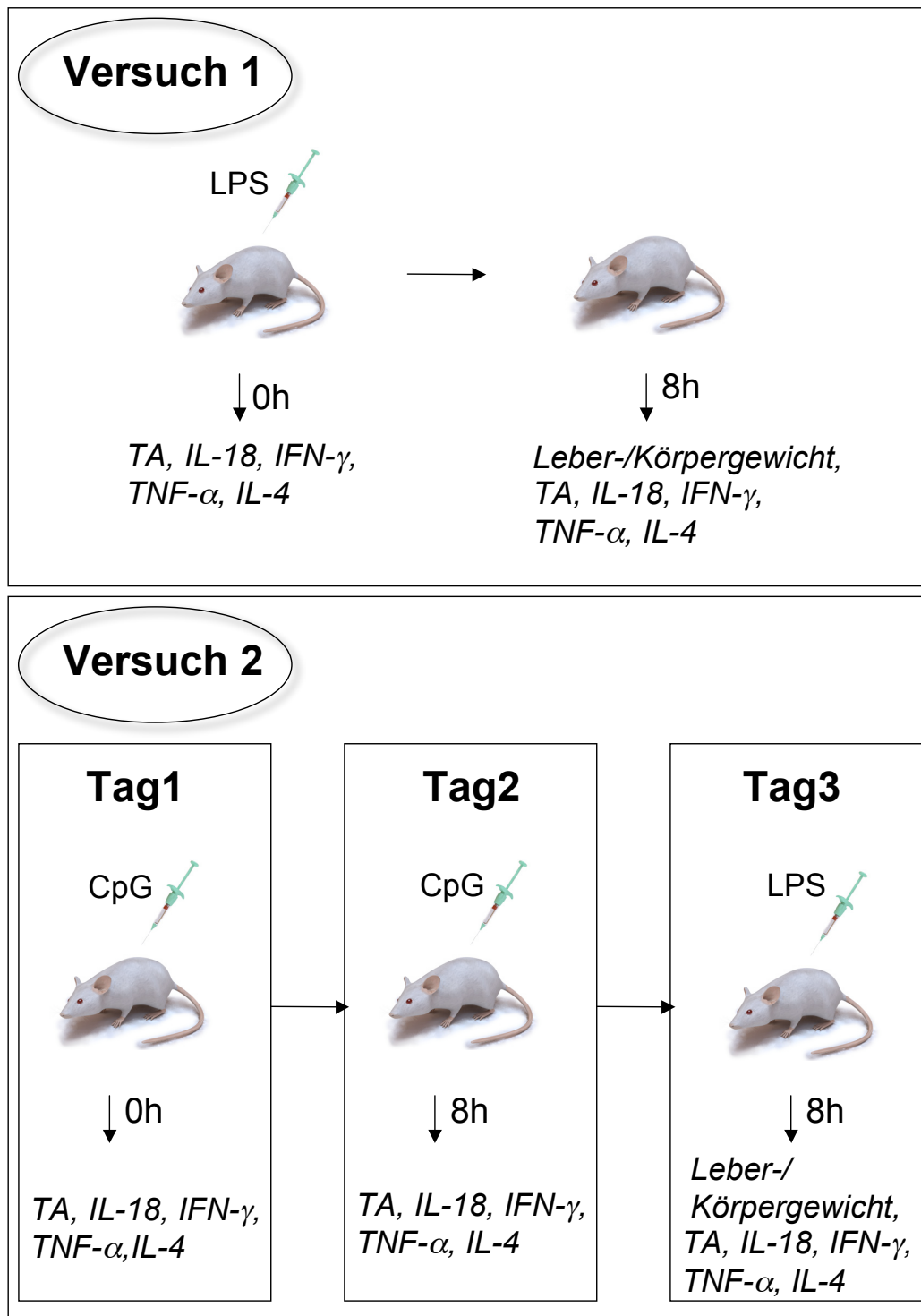
Die Serumwerte von Transaminasen, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4 wurden basal, acht Stunden nach der letzten CpG-Gabe und acht Stunden nach LPS-Verabreichung gemessen. Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht der Mäuse wurde auch nach LPS-Stimulation bestimmt.

### Behandlung der Mäuse mit LPS ohne Präkonditionierungsphase mit CpG (Versuch 1)

Nach der Stimulation der Mäuse mit 100 $\mu$ g LPS stiegen die Werte von IL-18 im Serum sowohl bei proIL-18-transgenen und SP-IL-18-transgenen als auch bei nichttransgenen Mäusen (Abb. 30). Bei proIL-18-transgenen Mäusen und SP-IL-18-transgenen Tieren lag der IL-18-Serumspiegel signifikant höher als bei Wildtyp-Kontrollen ( $p < 0,05$ ).

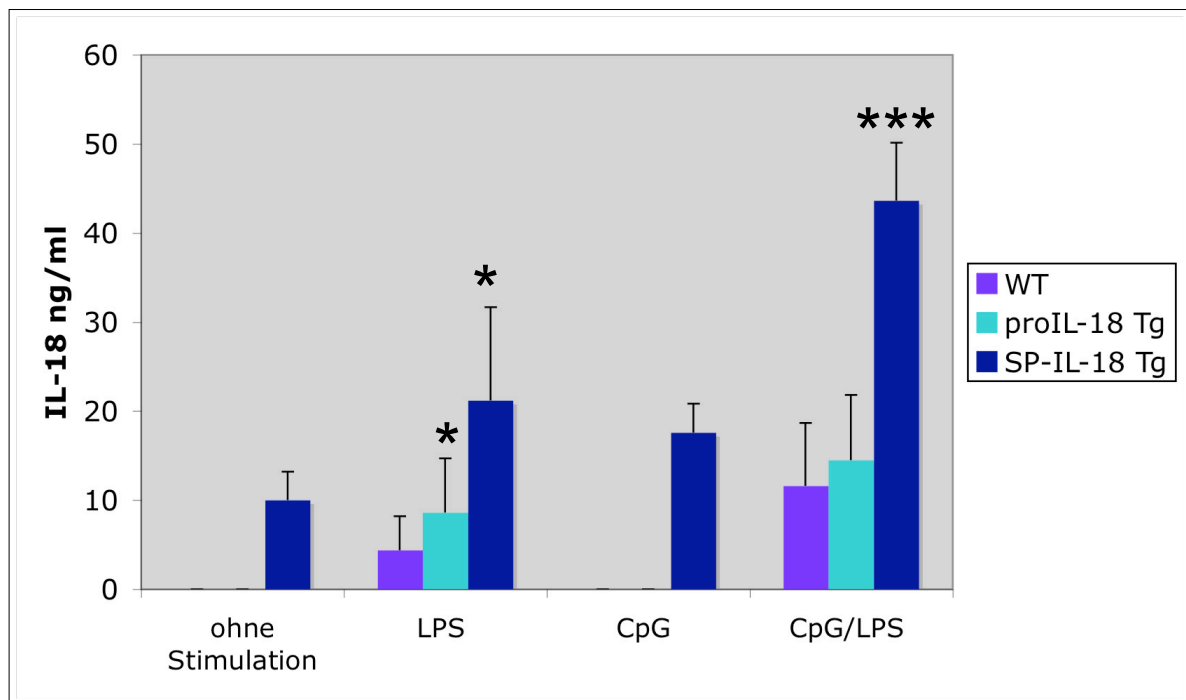
Erhöhtes IL-18 im Serum der transgenen Mäuse hatte nach der Stimulation mit LPS keinen Einfluß auf die IFN- $\gamma$ -, TNF- $\alpha$  oder IL-4-Produktion im Vergleich zur Produktion bei Wildtyp-Tieren: Es kam zu keinem signifikanten Unterschied in der IFN- $\gamma$ -Produktion zwischen transgenen und nichttransgenen Tieren (Abb. 31); die Stimulation der Mäuse mit 100 $\mu$ g LPS führte zu keiner TNF- $\alpha$ - und IL-4-Produktion (Abb. 32).

Um das Ausmaß des Leberschadens zu quantifizieren, wurden die Serumwerte von GOT und GPT bestimmt. Die Stimulation der Mäuse mit LPS führte sowohl bei transgenen als auch bei nichttransgenen Tieren zu einem leichten Leberschaden. Die Serumwerte



**Abbildung 29: Schematische Darstellung einer LPS-abhängigen Leberschädigung.**

Versuch 1: Behandlung der Mäuse mit LPS ohne Präkonditionierungsphase mit CpG. Die Mäuse wurden mit  $100\mu\text{g}$  *E. coli* LPS behandelt. Versuch 2: Behandlung der Mäuse mit LPS nach Präkonditionierung mit CpG. Die Mäuse wurden am Tag 1 mit  $40\mu\text{g}$  CpG, am Tag 2 mit  $25\mu\text{g}$  CpG und am Tag 3 mit  $100\mu\text{g}$  *E. coli* LPS behandelt. Vor der LPS- bzw. CpG-Gabe und acht Stunden danach wurden Transaminasen, IL-18, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4 im Serum sowie das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht der Mäuse beider Gruppen bestimmt.

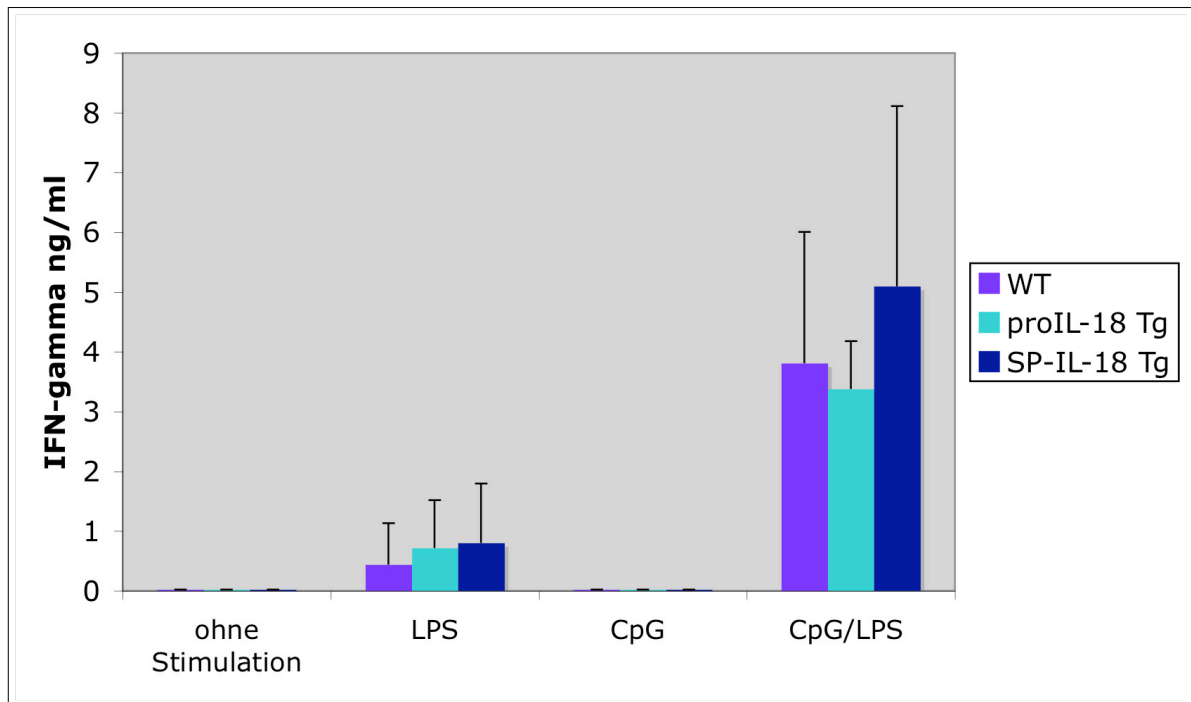


**Abbildung 30: Serumwerte von IL-18 nach Behandlung von proIL-18-transgenen und SP-IL-18-transgenen Mäusen mit LPS mit und ohne Präkonditionierungsphase.**

Graphische Darstellung der Serumwerte von IL-18 ohne Stimulation und acht Stunden nach der Stimulation mit  $100\mu\text{g}$  LPS, Behandlung mit  $65\mu\text{g}$  CpG und sequentieller Verabreichung mit  $65\mu\text{g}$  CpG und  $100\mu\text{g}$  LPS. (WT: n=10, proIL-18 Tg: n=9, SP-IL-18 Tg: n=7; \*-p<0,05, \*\*\*-p<0,001)

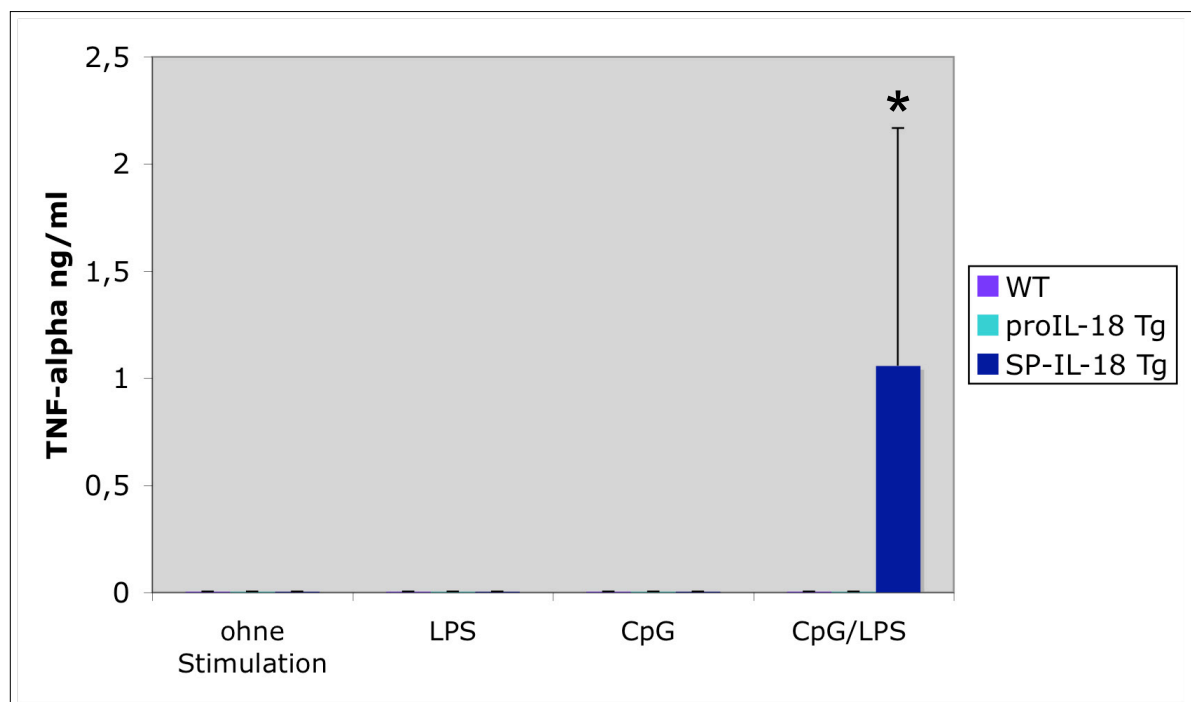
von GOT waren bei proIL-18-transgenen Mäusen höher als bei der Wildtypkontrolle und SP-IL-18-transgenen Mäusen (p<0,01), die GPT-Werte zeigten aber keinen signifikanten Unterschied. Die SP-IL-18-transgenen Mäuse zeigten in den Transaminasen-Werten keine Unterschiede zu Wildtyptieren (Abb. 33).

Auf das Gewichtsverhältnis zwischen Leber und Körper der Mäuse hatte die Stimulation mit  $100\mu\text{g}$  LPS keinen Einfluß (Abb. 34).



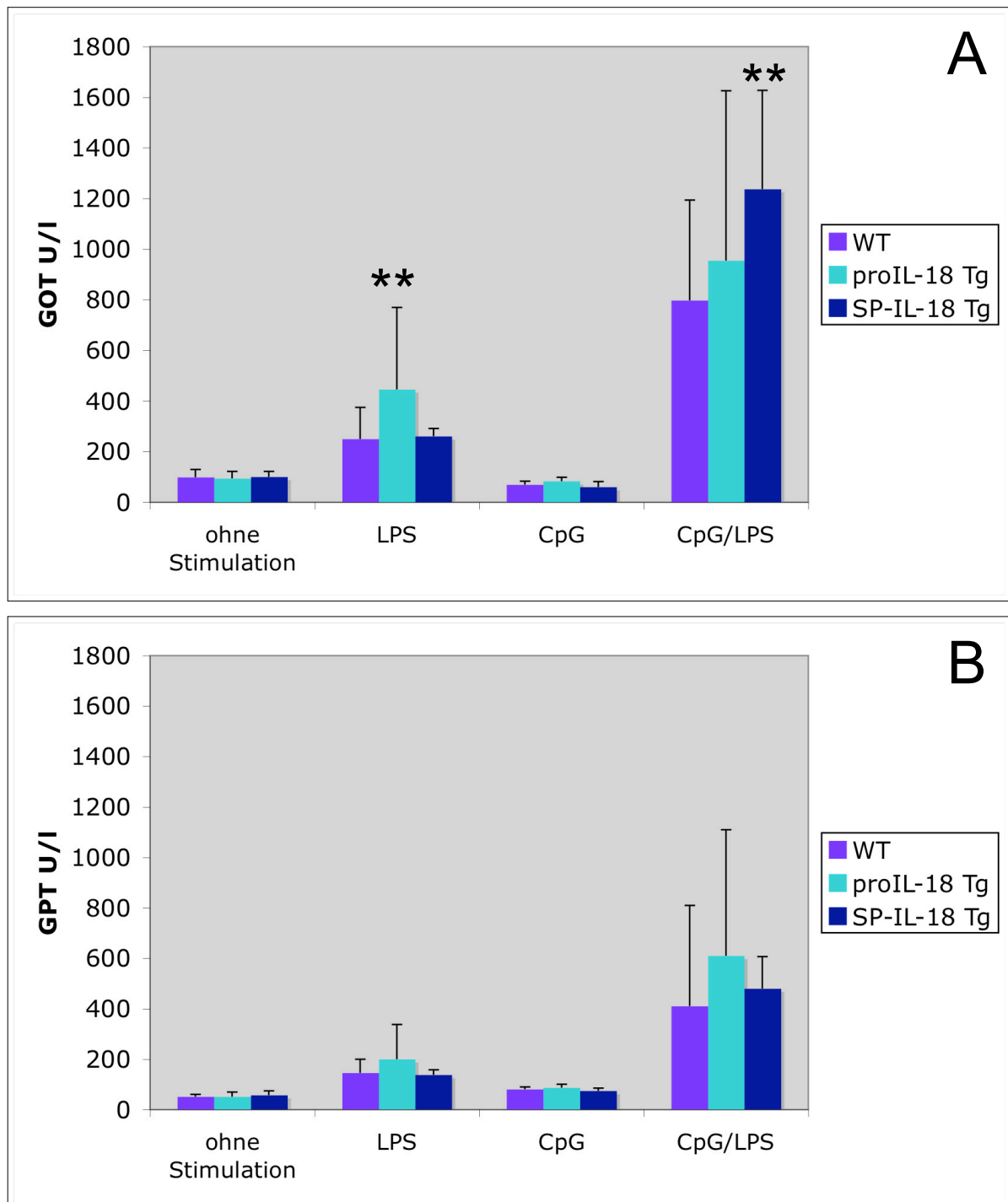
**Abbildung 31: Darstellung von IFN- $\gamma$ -Werten im Serum der Mäuse bei LPS-abhängigem Leberschaden.**

Die Serumwerte von IFN- $\gamma$  ohne Stimulation und acht Stunden nach der Stimulation mit 100 $\mu$ g LPS, Behandlung von 65 $\mu$ g CpG und sequentieller Verabreichung mit 65 $\mu$ g CpG und 100 $\mu$ g LPS. (WT: n=10, proIL-18 Tg: n=9, SP-IL-18 Tg: n=7).



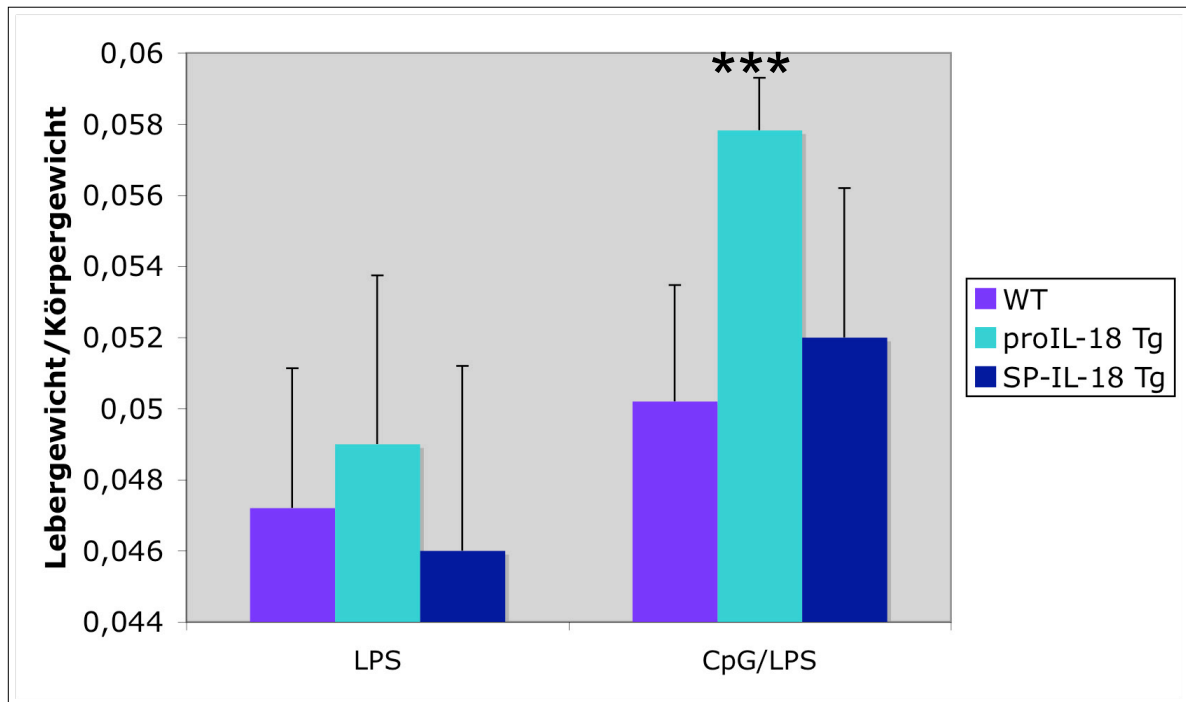
**Abbildung 32: Darstellung der Serumwerte von TNF- $\alpha$ .**

Die Serumwerte von TNF- $\alpha$  vor und acht Stunden nach der Stimulation mit 100 $\mu$ g LPS mit und ohne Präkonditionierung mit 65 $\mu$ g CpG und Behandlung mit 65 $\mu$ g CpG. (WT: n=10, proIL-18 Tg: n=9, SP-IL-18 Tg: n=7; \*-p<0,05).



**Abbildung 33: Leberschädigung, verursacht durch LPS mit und ohne Präkonditionierung mit CpG.**

Darstellung der Serumwerte von GOT (A) und GPT (B) ohne und acht Stunden nach der Stimulation mit  $100\mu\text{g}$  LPS, Behandlung mit  $65\mu\text{g}$  CpG und sequentieller Verabreichung von  $65\mu\text{g}$  CpG und  $100\mu\text{g}$  LPS. (WT: n=10, proIL-18 Tg: n=9, SP-IL-18 Tg: n=7; \*\*-p<0,01).



**Abbildung 34: Das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht.**

Graphische Darstellung des Verhältnisses von Lebergewicht zu Körpergewicht vor und nach der Behandlung mit  $100\mu\text{g}$  LPS mit und ohne Präkonditionierungsphase mit  $65\mu\text{g}$  CpG. (WT:  $n=10$ , proIL-18 Tg:  $n=9$ , SP-IL-18 Tg:  $n=7$ ; \*\*\*- $p<0,001$ ).

### Behandlung der Mäuse mit LPS nach Präkonditionierung mit CpG (Versuch 2)

Bei der Verabreichung von  $65\mu\text{g}$  CpG ohne folgende LPS-Verabreichung kam es bei proIL-18-transgenen Mäusen sowie bei SP-IL-18-transgenen Mäusen zu keinen erhöhten Serumkonzentrationen von IL-18 (Abb. 30), IFN- $\gamma$  (Abb. 31), TNF- $\alpha$  (Abb. 32), IL-4 und Transaminasen (Abb. 33).

Bei CpG-präkonditionierten Mäusen führte die Stimulation mit  $100\mu\text{g}$  LPS zu einer stärkeren Leberschädigung als die Stimulation mit LPS ohne Präkonditionierungsphase. Es kam nicht nur zu einer stärkeren Produktion von IL-18, sondern auch von IFN- $\gamma$ . Zwischen proIL-18-transgenen Mäusen und Wildtypieren konnten keine Unterschiede in der Zytokinproduktion (Abb. 30 und Abb. 31) und dem Transaminasenserumspiegel (Abb. 33) festgestellt werden.

Die SP-IL-18-transgenen Mäuse produzierten IL-18 dabei signifikant mehr ( $p<0,001$ ). Es kam auch zu einer stärkeren Produktion von IFN- $\gamma$ , bei den IFN- $\gamma$ -Werten herrschte aber eine große Streuung ( $p<0,1$ ) (Abb. 31).

Im Gegensatz zu Wildtypieren und proIL-18-transgenen Mäusen konnte im Serum

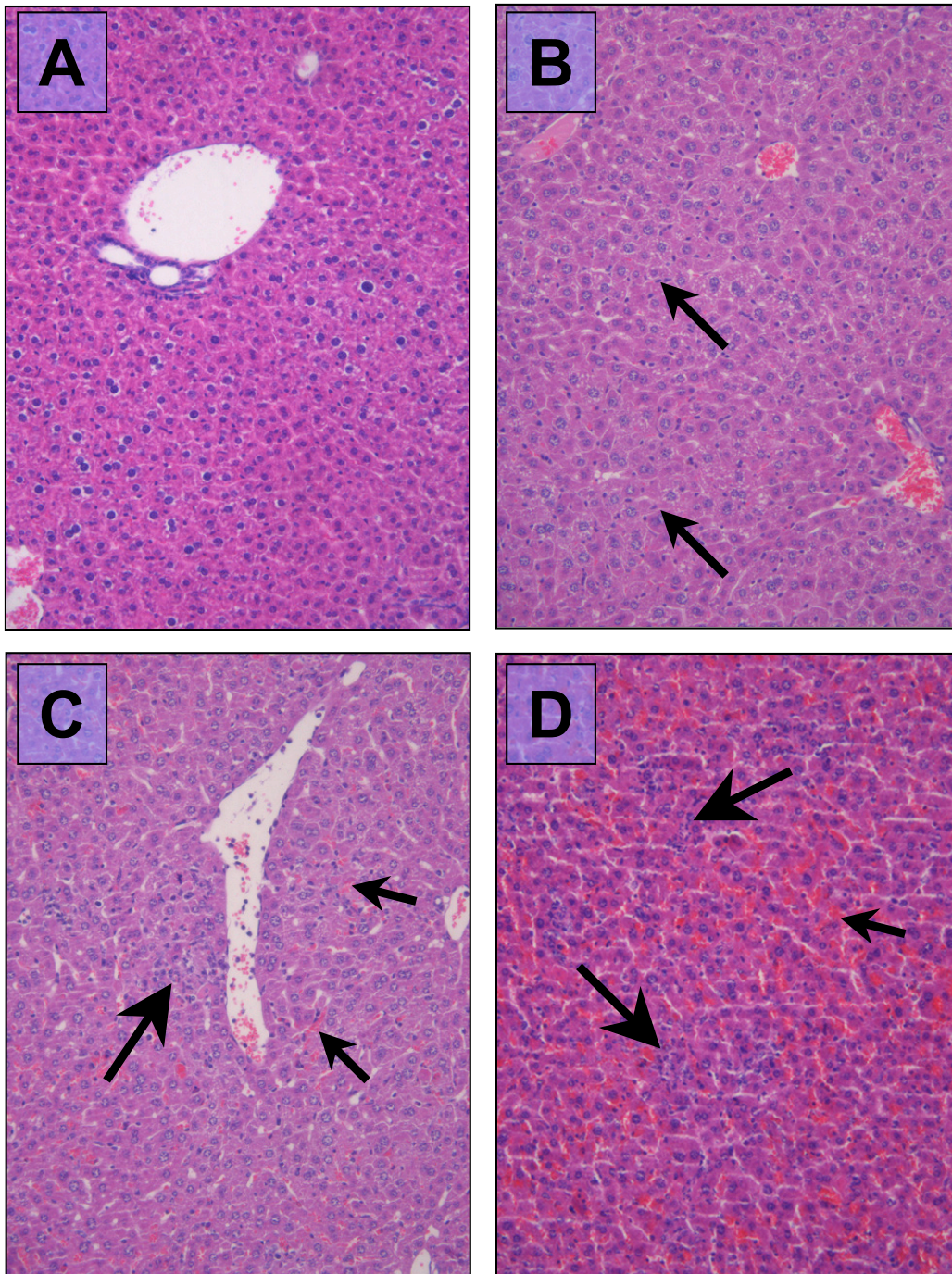
der SP-IL-18 transgenen Mäuse nach der Stimulation auch TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden (Abb. 32). IL-4 war im Serum der präkonditionierten Mäuse nach der Stimulation mit LPS nicht nachweisbar.

Die LPS-Stimulation nach Präkonditionierung mit CpG führte zu einem stärkeren Leberschaden als ohne Präkonditionierung. Die GOT-Werte waren bei SP-IL-18-transgenen Mäusen höher als bei Wildtyptieren ( $p < 0,01$ ), bei proIL-18-transgenen Tieren zeigte sich dagegen kein Unterschied. Die gering erhöhte Menge an GPT bei proIL-18- und SP-IL-18-transgenen Mäusen war im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle nicht signifikant (Abb. 22).

Es wurde beobachtet, daß nach der LPS-Behandlung der mit CPG-präkonditionierten proIL-18-transgenen Mäuse beider Linien das Verhältnis Lebergewicht zu Körpergewicht um etwa 16% höher war als bei der Wildtyp-Kontrolle ( $p < 0,001$ ). Bei dem Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht von SP-IL-18-transgenen Mäusen konnte nach der Behandlung kein Unterschied zu Wildtyptieren festgestellt werden (Abb. 34).

### **Leberhistologie**

Die Leber der Mäuse, die mit LPS bzw. sequentiell mit CpG und LPS behandelt waren, wurde nach acht Stunden in Formalin fixiert und später histologisch untersucht. Die Behandlung der Mäuse mit LPS führte zu einer Vergrößerung der Anzahl und Aktivierung der Kupffer-Zellen ohne einen sichtbaren Unterschied zwischen transgenen und nichttransgenen Mäusen (Abb. 35 A und B). Nach der Präkonditionierungsphase mit CpG und Behandlung mit LPS konnte man eine Granulombildung bestehend aus Kupffer-Zellen beobachten. Außerdem wurde die Blutzellenmenge in Sinusoiden erhöht, hierbei gab es einen Zusammenhang mit dem Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht (Abb. 35 C und D).



### Abbildung 35: Leberhistologie

Hämatoxylin-Eosin Färbung der Leber un behandelter proIL-18-transgener Mäuse (A) und von Mäusen nach der Behandlung mit  $100\mu\text{g}$  LPS (B) und sequentieller Verabreichung mit  $65\mu\text{g}$  CpG und  $100\mu\text{g}$  LPS (C und D). Die Behandlung mit LPS führte zu einer vermehrten Zahl an aktivierten Kupfer-Zellen (mittelgroßer Pfeil, B). Bei Verabreichung von LPS nach der Präkonditionierungsphase mit CpG kam es zu Granulombildung (großer Pfeil, C und D) und Erhöhung der Blutzellenmenge in Sinusoiden (kleiner Pfeil, C und D), die mit dem Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht (L/K) korrelierte (C -  $L/K=0,058$ ; D -  $L/K=0,08$ ). Vergrößerung  $10\times$ .

## 6 Diskussion

In der Literatur sind zur Zeit nur drei transgene Mausmodelle zur Untersuchung der biologischen und immunologischen Rolle von IL-18 *in vivo* beschrieben. Nachdem zunächst transgene Mausmodelle mit Überexpression der aktiven Form von IL-18 in B- und T-Zellen (Hoshino T. et al., 2001) und in Keratinozyten (Konishi H. et al., 2002) generiert wurden, wurde ein transgenes Mausmodell mit Überexpression der biologisch inaktiven Vorläuferform von IL-18 (proIL-18) in T-Zellen (Finotto S. et al., 2004) etabliert.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle der inaktiven bzw. aktiven Form von IL-18 in der Leber studiert werden. Hierzu wurden drei verschiedene transgene Mausmodelle mit leberspezifischer Überexpression von IL-18 etabliert. In einem Modell wird proIL-18 in Hepatozyten exprimiert, in zwei anderen der aktive Teil von IL-18 (als FLAG-markiertes aktives IL-18 und als Fusionsprotein des aktiven IL-18 mit *IgG-kappa chain leader sequence*). Um eine leberspezifische Expression des Transgens zu erzielen, wurde der Albuminpromoter der Maus zusammen mit dem zugehörigen Albuminhancer verwendet, diese ermöglichen eine konstitutive Expression des Transgens in Hepatozyten (Gorski K. et al., 1986). Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Leber transgener Mäuse zeigte sich aber, daß die Expression des Transgens nicht in allen transgenen Hepatozyten stattfindet. Zwei Linien mit Transgenexpression von jedem Konstrukt wurden auf Proteinebene etabliert. Die hepatozytenspezifische Überexpression von IL-18 hatte keine erkennbaren Folgen auf die Entwicklung, das Zuchtverhalten, die Leberwerte und das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht der transgenen Mäuse aller drei Mausmodelle.

Anhand dieser transgenen Mausmodelle sollte zum einen die Rolle von biologisch aktivem IL-18 in der Leber als Immunmodulator untersucht werden, zum anderen sollte die Bedeutung von inaktivem proIL-18 in Hepatozyten und dessen Aktivierung und Sezernierung aus der Zelle geklärt werden. Darüberhinaus sollte die Rolle von IL-18 beim IL-18-abhängigen Leberschaden genauer untersucht werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind als Grundlage für weitere Untersuchungen der biologischen und immunologischen Rolle der Überexpression der biologisch inaktiven bzw. aktiven Form des IL-18 in der Leber zu betrachten.

## 6.1 Physiologische Expression von IL-18 in Hepatozyten

IL-18 wurde ursprünglich in Kupffer-Zellen der Leber entdeckt (Okamura H. et al., 1995). Später wurde die mRNA von IL-18 auch in weiteren immunkompetenten Zellen (z.B. in B-Zellen) und in Zellen nicht hämatopoetischen Ursprungs nachgewiesen. Die epidermalen Keratinozyten können z.B. biologisch aktives IL-18 sezernieren und an der atopischen Dermatitis beteiligt sein (Stoll S. et al., 1997; Konishi H. et al., 2002). Die Beteiligung der Hepatozyten an immunregulatorischen Prozessen steht seit langem im Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Es wurde gezeigt, daß Hepatozyten eine wichtige Rolle bei Entzündungen in der Leber spielen (Vodovotz Y., 2001). Die Expression von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und IL-6) in Hepatozyten findet sich bei Lebererkrankungen wie z.B. bei chronischer Hepatitis C (Kasprzak A. et al., 2004). Eine mögliche Expression weiterer Zytokine, wie IL-18 in Hepatozyten, war nicht bekannt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigten eine basale Expression der inaktiven Form von IL-18 in Wildtyp-Hepatozyten. Durch vorangegangene Aufreinigung isolierter Hepatozyten mittels Lyse von nichtparenchymatösen Zellen vor der Western Blot-Analyse war die Kontamination mit in anderen Leberzellen exprimierendem IL-18 unwahrscheinlich. Zudem wurde auch eine schwache Expression der inaktiven Form von IL-18 in einer murinen Hepatom-Zelllinie Hepa 1-6 im Western Blot gezeigt. Die immunhistochemische Untersuchung der Leber von Wildtyp-Mäusen konnte die Expression von IL-18 in Hepatozyten bestätigen.

Hepatozyten besitzen die ganze molekulare Maschinerie zur Aktivierung von IL-18 durch Lipopolysaccharide (LPS) (Liu S. et al., 2002), somit scheint eine biologische Relevanz von IL-18 in Hepatozyten wahrscheinlich. So wurde die Expression von Caspase-1, die für die IL-18-Prozessierung notwendig ist, in Hepatozyten beschrieben (Jiang Y. et al., 2001), und die Expression des *LPS binding proteins* (Wan Y. et al., 1995), CD14 und TLR4 (Fearn C. et al., 1995; Liu S. et al., 2000; Matsumura T. et al., 2000) wird in Hepatozyten durch LPS induziert. Diese direkte Antwort von Hepatozyten auf mikrobielle Produkte kann ein wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunreaktion sein.

## 6.2 Hepatozytenspezifische Überexpression der inaktiven Form von IL-18 im proIL-18-transgenen Mausmodell

Zur Untersuchung der Bedeutung der inaktiven Form von IL-18 in Hepatozyten wurde das proIL-18-transgene Mausmodell etabliert. Das Transgen-Konstrukt trägt einen vollständigen Leserahmen von murinem IL-18. Dabei wird proIL-18 in Hepatozyten konstitutiv überexprimiert und in der Zelle akkumuliert. Erst nach der Spaltung durch Caspase-1 oder andere Proteinasen sollte es zu einer Aktivierung und Sezernierung von IL-18 aus der Zelle kommen. Es fanden sich allerdings in transgenen Mäusen keine erhöhten Serumspiegel von IL-18 im Gegensatz zu dem in der Literatur beschriebenen Mausmodell, in dem die Mäuse proIL-18 unter der transkriptionellen Kontrolle des T-Zell-spezifischen CD2-Promoters exprimieren (CD2/IL-18-transgene Mäuse) (Finotto S. et al., 2004) und gering erhöhte IL-18-Serumwerte im Vergleich zu Wildtyptieren (12ng/ml vs. 5ng/ml) zeigten. Ein adaptiver Transfer von T-Zellen der CD2/IL-18-transgenen Mäuse in T- und B-Zellen-defiziente SCID-Mäuse führte sowohl zur erhöhten Produktion von IL-18 und IFN- $\gamma$  als auch zur Leberschädigung durch Apoptose, Nekrose, massive periportale Fibrose und Entzündung.

Das in dieser Arbeit vorgestellte proIL-18-transgene Mausmodell zeigte auch eine spontane entzündliche Reaktion in der Leber. Ab einem Alter von 2 Lebensmonaten fanden sich in der Leber der proIL-18-transgenen Mäuse entzündliche Infiltrate und vereinzelte Gruppenzellnekrosen. Die immunhistochemischen Untersuchungen haben gezeigt, daß es ab dem 5. Lebensmonat zu einer erhöhten Zahl an aktivierten Kupffer-Zellen in der Leber kommt. Darüberhinaus traten Zeichen einer Störung der Leberarchitektur und Degeneration der Hepatozyten auf. Die histologischen Veränderungen der Leber bei den transgenen Mäusen führten nicht zu einer Erhöhung der Leberwerte (GOT und GPT). Ab dem 6. Lebensmonat kam es zu verstärkter Fibrogenese. Die Kollagenablagerungen nahmen vorzugsweise im periportalen Bereich zu. Teilweise traten auch perisinusoidale Faserbündel im Disse-Raum in der Leber der proIL-18-transgenen Mäuse auf.

Es kann angenommen werden, daß in diesem Mausmodell die Akkumulierung von proIL-18 in Hepatozyten zur Störung der Leberarchitektur führte. Die lokale Freisetzung von biologisch aktivem IL-18 aus Hepatozyten beim Untergang der Zelle durch physiologische Erneuerung konnte die Infiltration von Lymphozyten und die Proliferation von Kupffer-Zellen induzieren. Die aktivierten Kupffer-Zellen könnten letztendlich zur

Fibrogenese führen (Gressner A. M. et al., 1994). In dem von Gressner et al. beschriebenen Kaskadenmodell der Fibrogenese werden eine präinflammatorische Initialphase von einer inflammatorischen und einer postinflammatorischen Phase unterschieden. In der präinflammatorischen Initialphase folgt die Aktivierung der hepatischen Sternzellen unmittelbar auf die Parenchymzellschädigung durch Freisetzung z.B. von TGF- $\beta$ . In der anschließenden inflammatorischen Phase kommt es zu phagozytischer Aktivierung der Kupffer-Zellen und zu einer Invasion von Blut-Monozyten, die parakrin über TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  und weitere Zytokine die Proliferation und Transdifferenzierung ruhender hepatischer Sternzellen in Myofibroblasten stimulieren. In der postinflammatorischen Phase aktivieren die Zytokine der Myofibroblasten noch nicht transdifferenzierte hepatische Sternzellen. Myofibroblasten synthetisieren für die Fibrogenese ein breites Spektrum von Matrixproteinen wie z.B. Kollagen vom Typ I und Typ III. Dabei wird die Fibrogenese von einer Hemmung der Fibrolyse begleitet. Es kommt zur Fibrose mit übermäßiger Ablagerung der extrazellulären Matrix in der chronisch geschädigten Leber. In der vorliegenden Arbeit wurden die Aktivierung von hepatischen Sternzellen sowie der Nachweis von Zytokinen, die zu der Aktivierung von Kupffer-Zellen und Fibrogenese beitragen können, nicht analysiert und sollten in weiteren Untersuchungen erforscht werden.

Im CD2/IL-18-Mausmodell wurde IL-18 als Zytokin beschrieben, das eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Fas-abhängigen Hepatozyten-Apoptose *in vivo* spielt (Finotto S. et al., 2004). Die Rolle von IL-18 bei der Induktion von FasL-Expression auf NK und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist lange bekannt (Dao T. et al., 1996). Die CD2/IL-18-transgenen Mäuse zeigten ein makroskopisch reduziertes relatives Lebergewicht (450 vs. 300) und spontane Hepatozyten-Apoptose sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Die Überexpression von IL-18 führte zu erhöhter Fas- und Caspase-8-Expression in der Leber CD2/IL-18-transgener Mäuse. Im Gegensatz zum CD2/IL-18-Mausmodell kam es bei proIL-18-transgenen Mäusen zu keiner spontanen Apoptose in der Leber. Im proIL-18-transgenen Mausmodell war das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht unauffällig. Die Expression von FAS soll aber weiter bei diesen Mäusen untersucht werden.

Die Unterschiede zwischen CD2/IL-18- und proIL-18-transgenen Mäusen in Apoptose und relativem Lebergewicht können dadurch bedingt sein, daß es bei CD2-transgenen Mäusen im Gegensatz zu proIL-18-transgenen Mäusen zur Aktivierung und Sezernierung von biologisch aktivem IL-18 kommt. In einem anderen IL-18-transgenen Mausmodell, bei dem das Fusionsprotein der aktiven Form von IL-18 mit der *IgG-kappa chain leader*

*sequence* in B- und T-Zellen unter der Kontrolle des IgHV-Promoters exprimiert wird (IgHV/IL-18-transgene Mäuse), fand sich im Gegensatz zu den CD2/IL-18-transgenen Mäusen kein Hinweis auf Veränderungen des relativen Lebergewichts oder auf Apoptose von Hepatozyten (Hoshino T. et al., 2001).

In IgHV/IL-18- und CD2/IL-18-transgenen Mäusen, die erhöhte IL-18-Serumspiegel zeigten, kam es auch zu stärkerer Produktion von anderen Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , IL-4 und TNF- $\alpha$ . In dem in dieser Arbeit etablierten proIL-18-Mausmodell konnten IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie IL-4 basal im Serum transgener Mäuse nicht nachgewiesen werden.

### 6.3 Hepatozytenspezifische Überexpression der aktiven Form von IL-18 in transgenen Mäusen

Um den Einfluß von IL-18 auf die Produktion verschiedener Zytokine *in vivo* zu untersuchen, wurden zwei transgene Mausmodelle mit konstitutiver hepatozytenspezifischer Expression des aktiven Teils von IL-18 etabliert.

#### FLAG-IL-18-transgenes Mausmodell

Im ersten Modell wird FLAG-markiertes IL-18 in Hepatozyten exprimiert (FLAG-IL-18). Das FLAG-IL-18-Konstrukt wurde kloniert, als noch keine anti-IL-18-spezifischen Antikörper zur Verfügung standen. Die Markierung von IL-18 mit dem FLAG-Epitop dient der Detektion des Proteins mittels eines anti-FLAG-spezifischen Antikörpers (Jarvik J.W., Telmer C.A., 1998). Es zeigte sich aber, daß das FLAG-IL-18-Fusionsprotein sich in der Zelle akkumuliert und nicht sezerniert werden kann, was zu einer Speicherkrankheit führte. Bereits im früheren Alter (ab dem 3. Lebensmonat) konnte bei histologischen Untersuchungen der Leber von FLAG-IL-18-transgenen Mäusen eine gestörte Leberarchitektur beobachtet werden. Es zeigte sich eine vermehrte Zahl an polyploiden Hepatozyten bei transgenen Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren, was auf eine starke funktionelle Beanspruchung hinweist. Eine Hyperpolyploidie der Hepatozyten ist bei chronischen metabolischen Störungen und bei Störungen durch Toxine zu beobachten (Gupta S., 2000). Die FLAG-IL-18-transgenen Mäuse zeigten ab dem 6. Lebensmonat zunehmend Zeichen einer feintropfigen Verfettung und Auflockerungen des Zytoplasmas der Hepatozyten, was auf eine Funktionsstörung der Zelle durch toxische Wirkung der Ablagerung des IL-18-Proteins in der Zelle im Rahmen einer Speicherkrankheit hindeutet.

Im Gegensatz zu proIL-18-transgenen Mäusen führte die Expression von FLAG-markiertem IL-18 weder zu entzündlichen Infiltraten noch zu einer gesteigerten Fibrogenese. Das spricht dafür, daß die entzündliche Reaktion der Leber und gesteigerte Fibrogenese in proIL-18-transgenen Mäusen die Folge der biologischen Wirkung von IL-18 in der Leber, nicht aber einer Speicherkrankheit ist.

### **SP-IL-18-transgenes Mausmodell**

Normalerweise enthalten die Proteine eine *leader sequence*, die für die Passage der Zellmembran notwendig ist. IL-18 hat keine bekannte *leader sequence* und kann aus der Zelle nur nach Spaltung des inaktiven proIL-18 sezerniert werden. Um die Freisetzung eines sekretorischen Proteins ohne bekannte *leader sequence* aus der Zelle zu ermöglichen, kann oft eine Fusion des Proteins mit einem Signalpeptid verwendet werden. In der Literatur ist das Fusionsprotein von IL-18 mit der *IgG-kappa chain leader sequence* beschrieben (Yoshimura K. et al., 2001; Kim S.H. et al., 2001). In einem weiteren Mausmodell sollte daher die aktive Form von IL-18 als ein Fusionsprotein mit der *IgG-kappa chain leader sequence* (SP-IL-18) in den Hepatozyten exprimiert werden.

Das in der vorgelegten Arbeit generierte SP-IL-18-transgene Mausmodell zeigte die Sekretion von aktivem IL-18 aus Hepatozyten im IL-18-ELISA. IL-18 konnte mit einem monoklonalen anti-IL-18-Antikörper *in vivo* neutralisiert werden. Die SP-IL-18-transgenen Mäuse zeigten hohe IL-18-Werte im Serum (10-25ng/ml) im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (unter der Nachweisgrenze von 0,025 ng/ml), was einer mehr als 10000-fachen Erhöhung des IL-18 im Serum der SP-IL-18-transgenen Mäuse entspricht. Die Stärke der Expression von IL-18 in SP-IL-18-transgenen Mäusen war vergleichbar mit der Expression von IL-18 in IgHV/IL-18-transgenen Mäusen, die aktives IL-18 in B- und T-Zellen exprimieren, und bei denen IL-18 im Serum etwa um das 6000-fache erhöht war. Dagegen zeigten die CD2-transgenen Mäuse, die proIL-18 in T-Zellen überexprimieren und aktives IL-18 ins Blut sezernieren, etwa eine 2,5-fache Erhöhung der aktiven Form von IL-18 im Serum im Vergleich zu Wildtyp-Tieren.

Wie oben erwähnt wurde, führte die IL-18-Überexpression in beiden IgHV/IL-18- und CD2/IL-18-transgenen Mausmodellen zu einer stärkeren Produktion von IFN- $\gamma$  (etwa 2000-fache Erhöhung bei IgHV/IL-18- und 2,5-fache Erhöhung bei CD2/IL-18-transgenen Mäusen). Darüberhinaus fanden sich in CD2/IL-18-transgenen Mäusen erhöhte Serumspiegel von TNF- $\alpha$  (2-fache Erhöhung), und im Serum der IgHV/IL-18-transgenen Mäuse

waren IL-4 (150-fach) sowie IgE und IgG1 erhöht (Finotto S. et al., 2004; Hoshino T. et al., 1999). Dabei fand sich bei Untersuchungen des CD2/IL-18-transgenen Mausmodells, daß selbst Wildtyp-Kontrollen (FVB-Mausstamm) basal erhöhte Serumspiegel von IL-18 (5ng/ml), IFN- $\gamma$  (80ng/ml) und TNF- $\alpha$  (200ng/ml) zeigen. Die Konzentration dieser Zytokine in Wildtyp-Kontrollen des IgHV/IL-18-Mausmodells (C57BL/6-Mausstamm) lagen aber unter der Detektionsschwelle (Hoshino T. et al., 2001). Im SP-IL-18-Mausmodell konnte keine Erhöhung von diesen Zytokinen festgestellt werden. Das kann dadurch erklärt werden, daß IL-18 alleine die IFN- $\gamma$ -Produktion nicht beeinflussen kann, für die die Hochregulation und Expression an der Zelloberfläche von beiden Ketten des IL-18-Rezeptors durch IL-12 notwendig ist (Yoshimoto T. et al., 1998; Kim S.H. et al., 2001); IL-18 alleine kann also den IFN- $\gamma$ -Promoter nicht aktivieren. In den Studien von Hoshino et al. wurde die erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  und IL-4 durch Veränderungen in der Lymphozyten-Population in der Milz der IgVH/IL-18-transgenen Mäuse erklärt. In den IgVH-IL-18-transgenen Mäusen fanden sich mehr CD8<sup>+</sup> T-Zellen und weniger B-Zellen im Vergleich zu Wildtypmäusen (Hoshino T. et al., 1999).

Es ist zu bemerken, daß in der Milz von IgVH-transgenen Mäusen außer den CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch die Anzahl an Makrophagen (Gr1<sup>+</sup> CD11b (Mac1 $\alpha$ )<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) erhöht war. Auch bei SP-IL-18-transgenen Mäusen sowie bei proIL-18-transgenen Mäusen konnte eine erhöhte Zahl an hepatischen Makrophagen festgestellt werden. In der vorgestellten Arbeit wurden nur die jungen SP-IL-18-transgenen Tiere im Alter von zwei bis drei Lebensmonaten histologisch untersucht. In der Leberhistologie von SP-IL-18-transgenen Tieren wurde eine Zunahme aktivierter Kupffer-Zellen bereits im Alter von zwei Lebensmonaten festgestellt, die bei proIL-18-transgenen Tieren erst ab dem fünften Lebensmonat auftrat. Die Mechanismen der Kupffer-Zellen-Aktivierung sowie mögliche Veränderungen von anderen Zellpopulationen sollten in SP-IL-18-Mausmodellen weiter untersucht werden.

Bisherige Daten zeigen, daß bei SP-IL-18-transgenen Mäusen keine entzündlichen Infiltrate und Gruppenzellnekrose auftreten im Gegensatz zu proIL-18-transgenen Tieren. Dies kann damit erklärt werden, daß es wegen Sezernierung des IL-18 aus Hepatozyten zu keiner Parenchymschädigung durch Akkumulierung des Proteins kommt und ein zweiter Stimulus, wie z.B. IL-12 oder bakterielle Bestandteile, fehlt.

Zusammenfassend führt die hepatozytenspezifische Expression der aktiven Form von IL-18 als ein Fusionsprotein mit der *IgG-kappa chain leader sequence* zur Sezernierung des IL-18 aus Hepatozyten, das in der Leber der SP-IL-18-transgenen Tiere die Aktivierung der Kupffer-Zellen zu induzieren scheint. IL-18 hat aber keinen Einfluß auf die Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  oder IL-4, wofür wahrscheinlich ein zusätzlicher Stimulus, wie z.B. bei LPS-Stimulation, notwendig ist.

#### 6.4 LPS-abhängiger Leberschaden mit und ohne Präkonditionierung mit CpG-Oligonukleotiden

IL-18 wurde als Zytokin beschrieben, dessen biologische Wirkung von dem jeweiligen Zytokinenmilieu abhängt (Hoshino T. et al., 2001). Lipopolysaccharide (LPS) z.B. rufen eine starke inflammatorische Immunantwort durch Produktion von IFN- $\gamma$  hervor, für die der Synergismus von IL-18 und IL-12 eine entscheidende Rolle spielt. Der Körper hat stabile Schutzmechanismen gegen LPS entwickelt, bei denen die Leber eine zentrale Rolle spielt. Die Antwort der Leber auf LPS besteht unter anderem in der Produktion von Zytokinen (Luster M.I. et al., 1994), von denen viele eine wichtige pathogene Rolle spielen, wie z.B. TNF- $\alpha$ . Eine mögliche hepatotoxische Wirkung von IL-18 bei einer LPS-abhängigen Leberschädigung wurde in dieser Arbeit *in vivo* bei proIL-18- und SP-IL-18-transgenen Mausmodellen untersucht. Daneben sollte die Aktivierung und Sezernierung des IL-18 aus Hepatozyten durch LPS in den proIL-18-transgenen Tieren geklärt werden.

Um den Leberschaden durch LPS zu verstärken, wurde die Präkonditionierung mit CpG-Oligonukleotiden vor der Behandlung mit LPS verwendet (Schuchmann M. et al., 2004). IL-18 spielt eine Schlüsselrolle beim Leberschaden nach LPS-Gabe in mit *Propionibacterium acnes* sensibilisierten Mäusen (Okamura H. et al., 1995). Die Präkonditionierung mit CpG-Oligonukleotiden ist mit der *Propionibacterium acnes*-Sensibilisierung vergleichbar. Die CpG-präkonditionierten Mäuse produzieren 10-fach mehr IFN- $\gamma$  ohne Veränderungen in der IL-12-Produktion, aber mit einer 10-fachen Erhöhung der IL-18-Produktion im Vergleich zu nicht präkonditionierten Mäusen (Gould M.P. et al., 2004). Daher wurden die proIL-18- und SP-IL-18-transgenen Mäuse zur Klärung der Rolle der leberspezifischen Überexpression von IL-18 in diesem Leberschädigungsmodell sequentiell mit CpG und LPS behandelt.

### Leberschaden bei proIL-18-transgenen Mäusen

Die Hepatozyten exprimieren sowohl TLR-4 (ein Rezeptor für LPS) als auch TLR-9 (ein Rezeptor für CpG) (Liu S. et al., 2002; Hemmi H. et al., 2000). Nach der Bindung von LPS zu CD14 und TLR4, den Rezeptoren für LPS, findet die Aktivierung von Caspase-1 statt, die zur Prozessierung von IL-18 notwendig ist (Creagh E.M. et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß nach LPS-Behandlung der proIL-18-transgenen Mäuse aktives IL-18 aus Hepatozyten sezerniert wird. Das deutet auf eine direkte Antwort von Hepatozyten auf LPS hin. Diese Ergebnisse sollten aber in weiteren Versuchen mit proIL-18-transgenen Hepatozyten *in vitro* überprüft werden. Dagegen kam es nach der Behandlung der proIL-18-transgenen Mäuse mit CpG zu keiner Sezernierung von IL-18. Wahrscheinlich führt die CpG-Erkennung durch TLR9 zu keiner Aktivierung von Caspase-1 und folgender Sezernierung von IL-18 aus den Hepatozyten. Die Erhöhung von IL-18 im Serum nach der Behandlung mit LPS bei proIL-18-transgenen Mäusen im Vergleich zu nichttransgenen Tieren war statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ), löste aber keinen systemisch erhöhten IFN- $\gamma$ -Spiegel aus. Es gab auch keinen Unterschied beim Ausmaß des Leberschadens. Hierfür scheinen weitere Stimuli notwendig zu sein, von denen einer CpG sein kann.

Nach Präkonditionierung mit CpG und LPS-Behandlung der Mäuse kam es zu einer stärkeren Leberschädigung und einer stärkeren Produktion von IL-18 und IFN- $\gamma$  als ohne Sensibilisierungsphase. Es fanden sich allerdings keine Unterschiede zwischen transgenen und nichttransgenen Mäusen. Die Produktion von IL-18 sowie von IFN- $\gamma$  war nach sequentieller CpG- und LPS-Behandlung etwa doppelt so hoch wie nach alleiniger Behandlung mit LPS. Bei Gould et al. wurde aber eine 10-fache Erhöhung von IL-18 im Serum nach sequentieller CpG und LPS-Behandlung im Vergleich zu LPS-Behandlung ohne CpG-Präkonditionierung beschrieben. Die Stärke der Immunantwort hängt vom Mausstamm ab. Die C3H/HeN-Mäuse, die bei den Versuchen von Gould verwendet wurden, produzieren mehr Serum-Zytokine nach der LPS-Behandlung als z.B. C57BL/6- oder BALB/c-Mäuse (Gould M.P. et al., 2004). Der in dieser Arbeit verwendete FVB-Mausstamm ist stärker LPS-resistent und zeigt keine so hohe Immunreaktion wie C3H/HeN-Mäuse.

Das Fehlen von Unterschieden zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren kann damit erklärt werden, daß CpG-Oligonukleotide keinen Einfluß auf die Aktivierung von IL-18 und dessen Sezernierung aus Hepatozyten haben. Daher kam es nur zu einer LPS-abhängigen Sezernierung von IL-18 aus Hepatozyten. IL-18, das aus geschädigten Hepa-

tozyten sezerniert wurde, wurde vermutlich durch beim Untergang der Zelle freigesetzte Proteinase inaktiviert und hatte damit keinen Einfluß auf die Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und die Leberwerte.

LPS-Gabe nach der Präkonditionierung mit CpG führte bei proIL-18-transgenen Mäusen zu einer 16%igen Erhöhung des relativen Lebergewichts im Vergleich zu Wildtyp-tieren. Dagegen hatte eine LPS-Behandlung ohne Präkonditionierung mit CpG keinen Einfluß auf das relative Lebergewicht. Die in dieser Arbeit durchgeführten histologischen Untersuchungen der Leber zeigten ein erhöhtes Blutvolumen in CpG-sensibilisierten und LPS-behandelten Mäusen verglichen mit nur mit LPS behandelten Tieren. Einen sichtbaren Unterschied zwischen transgenen und nichttransgenen Mäusen gab es aber nicht. Es kann angenommen werden, daß es bei transgenen Tieren zu stärkeren metabolischen Veränderungen in Hepatozyten kam als bei Wildtyp-Mäusen, wie z.B. im Glycogen-, Lipiden- und Proteine-Metabolismus. Die Zunahme der K<sup>+</sup>-Konzentration und des gesamten Wassergehaltes in Hepatozyten könnte auch zur Erhöhung des Hepatozyten-Volumens und somit des Lebergewichts führen (Qian D. und Brosnan J.T., 1996).

### **Leberschaden bei SP-IL-18 transgenen Mäusen**

Die LPS-Behandlung der SP-IL-18-transgenen Mäuse, die basal hohe IL-18-Serumwerte haben, führte zur weiteren Steigerung der IL-18-Konzentration im Serum. Da ein Anstieg von Transaminasen nicht zu beobachten war, hat die Überexpression von IL-18 keine hepatotoxische Wirkung nach alleiniger LPS- sowie der CpG-Gabe gezeigt. IL-18 zeigte auch keinen Einfluß auf die Zytokin-Produktion. Bei SP-IL-18-transgenen Tieren waren weder IFN- $\gamma$  noch TNF- $\alpha$  im Serum nach der LPS- oder CpG-Behandlung nachweisbar. Vermutlich lag das an einer zu niedrigen Dosis, die keine starke Immunreaktion hervorgerufen hat. Im weiteren sollte dieses Leberschädigungsmodell unter dem Gesichtspunkt der Dosis-Abhängigkeit untersucht werden.

Wie es auch bei dem proIL-18-Mausmodell beschrieben wurde, kam es nach der LPS-Behandlung der CpG-präkonditionierten SP-IL-18-transgenen Mäuse zu einer stärkeren IL-18 und IFN- $\gamma$ -Produktion als nach LPS-Gabe ohne Sensibilisierung mit CpG. Im Gegensatz zu proIL-18-transgenen Mäusen, bei denen keine Unterschiede zu Wildtyp-Kontrollen nach CpG+LPS-Behandlung beobachtet wurde, produzierten die SP-IL-18-transgenen Tiere etwa viermal mehr IL-18 als die Wildtyp-Kontrollen. Es kam auch zu stärkerer Produktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zu nichttransgenen Mäusen.

Trotzdem konnten keine signifikanten Unterschiede in GPT, der leberspezifischen Transaminase, im Serum festgestellt werden. Die transgenen Mäuse zeigten aber signifikant höhere GOT-Werte im Serum als Wildtyp-Mäuse. Die GOT hat eine niedrige Leberspezifität und kann z.B. bei Muskel- oder Herzschädigung freigesetzt werden. Man kann annehmen, daß die SP-IL-18-transgenen Mäuse dabei doch eine schwerere Leberschädigung bekommen haben als Wildtypiere. Der GOT/GPT-Quotient, der den Grad des Leberschadens (mit Einschränkungen) bestimmen kann, war bei SP-IL-18-transgenen Mäusen höher als bei Wildtypieren. Die GPT kommt innerhalb der Zelle im Zytosol vor, und schon bei einem leichteren Leberschaden kann sie bereits dann ins Blut übertreten, wenn nur die Zellwand geschädigt ist. Die GOT hingegen kommt zum größten Teil in den Mitochondrien der Zelle vor. Wenn Zellen vollständig zu Grunde gehen, tritt vermehrt GOT ins Blut über. Es sollten aber im weiteren auch andere Organe untersucht werden.

Bei dem Leberschädigungsmodell hatte die Überexpression der aktiven Form von IL-18 keinen Einfluß auf die Erhöhung des Lebergewichts. IL-18 wurde aus den Hepatozyten sezerniert und führte zu keinem Parenchymschaden und metabolischen Veränderungen der Zelle, wie es bei proIL-18-transgenen Mäusen der Fall war.

## 6.5 Bedeutung des IL-18-transgenen Mausmodells für das Verständnis der Rolle von IL-18 in der Leber. Ausblick.

Die vorliegende Arbeit legt die Grundlage zu weiteren Untersuchungen der proIL-18- und SP-IL-18-transgenen Mausmodelle mit Expression der inaktiven bzw. aktiven Form von IL-18 in Hepatozyten.

Die Bedeutung der basalen Expression von proIL-18 in Wildtyp-Hepatozyten und somit die Beteiligung dieser Zellen bei der Immunreaktion sollte weiter untersucht werden. Die molekularen Mechanismen der Prozessierung von IL-18 könnten durch *in vitro*-Versuche mit den proIL-18-transgenen Hepatozyten geklärt werden. Dabei könnten verschiedene Stimulantien (LPS, CpG, anti-Fas-Antikörper u.a.) verwendet werden.

Der Einfluß von IL-18 auf die Veränderungen in Zellpopulationen in der Leber, wie z.B. T-Zellen, NK-Zellen oder Kupffer-Zellen, sollte durch Untersuchung der Leber der IL-18-transgenen Mäuse mittels FACS-Analyse oder Immunhistochemie geklärt werden.

Eine mögliche Rolle von IL-18 in der Fibrogenese kann weiter untersucht werden. Hierzu sollten die Mechanismen der IL-18-vermittelten Kupffer-Zellen- und Sternzellen-Aktivierung sowie Veränderungen an der Zytokinen-Expression (z.B. TGF- $\beta$ ) in der Leber geklärt werden. Die Fibrogenese in der Leber der transgenen Tiere könnte durch Gallengangsligatur sowie durch Einkreuzung in transgene Mäuse mit leberspezifischer Expression der fibrogenen Zytokine PDGF-A, PDGF-B und TGF- $\beta$  untersucht werden.

Die Rolle von IL-18 beim Leberschaden sollte in IL-18-transgenen Mäusen mittels verschiedenen Leberschädigungsmodellen studiert werden. Die Induktion des Caspase-1-abhängigen Leberschadens kann z.B. durch LPS-vermittelten Leberschaden mit und ohne CpG-Präkonditionierung in Zeit- und Dosis-Kinetik, und durch Caspase-1-unabhängigen Leberschaden, z.B. durch Fas-vermittelte Leberschädigung (Kakinuma C. et al., 1999), erreicht werden. Die Rolle von IL-18 bei einem T-Zell-abhängigen Leberschaden könnte in IL-18-transgenen Mäusen durch Injektion von pflanzlichen T-Lymphozyten Mitogen Concavalin A untersucht werden (Tiags G. et al., 1998).

Zur Klärung einer potentiellen antitumorösen Wirkung von IL-18 könnte ein Leberkarzinommodell mit Diethylnitrosamin (DEN) verwendet werden (Weghorst C.M. et al., 1994). Der Einfluß der Überexpression von MHC-II-Molekülen auf die Präsentation von Tumorpeptiden läßt sich durch die Kreuzung von C2TA- und IL-18-transgenen Mäusen mit der vermuteten antitumorösen Wirkung von IL-18 kombinieren.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Interleukin-18 (IL-18) in der Leber untersucht. IL-18 wurde eine Bedeutung bei verschiedenen Lebererkrankungen zugeschrieben, die genauen Mechanismen sind jedoch nicht geklärt. IL-18 kann ein wesentlicher Faktor bei der Regulierung des Th1/Th2-Gleichgewichts in der Leber sein.

Es wurden transgene Mäuse mit konstitutiver Überexpression der inaktiven Form von IL-18 (proIL-18) sowie transgene Mäuse mit Expression der aktiven Form von IL-18 ohne Signalpeptid (FLAG-IL-18) und mit Signalpeptid (SP-IL-18) in Hepatozyten unter der transkriptionellen Kontrolle des murinen Albumin-Promoters etabliert. In eigenen Vorarbeiten wurde eine konstitutive Expression von proIL-18 in Wildtyp-Hepatozyten festgestellt. Bei der Überexpression von proIL-18 in Hepatozyten zeigte sich eine Akkumulation des Proteins in der Zelle und eine spontane entzündliche und fibrotische Aktivität in der Leber. Die Expression der aktiven Form von IL-18 ohne Signalpeptid (FLAG-IL-18) in Hepatozyten führte zu einer Speicherkrankheit in der Leber. Das Fusionieren des aktiven Teils von IL-18 mit *IgG-kappa chain leader sequence* (SP-IL-18) ermöglichte die Sezernierung von IL-18 aus der Zelle ohne Einfluß auf die Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 sowie Transaminasen.

Die Rolle von IL-18 bei einem LPS-abhängigen Leberschaden mit und ohne Präkonditionierung mit CpG-Oligonukleotiden *in vivo* wurde untersucht. Die Behandlung proIL-18-transgener Mäuse mit einer subletalen LPS-Dosis führte zur Sezernierung von biologisch aktivem IL-18 aus Hepatozyten. IL-18 hatte bei proIL-18- sowie bei SP-IL-18-transgenen Mäusen nach der LPS-Gabe keinen Einfluß auf die Leberschädigung und Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4. Nach sequentieller Behandlung mit CpG und LPS fand sich bei SP-IL-18-transgenen Tieren im Gegensatz zu proIL-18-transgenen Mäusen eine stärkere Produktion von GOT, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  im Vergleich zu Wildtyptieren. ProIL-18-transgene Mäuse zeigten nach gleicher Behandlung ein erhöhtes relatives Lebergewicht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß IL-18 alleine keine hepatotoxische Wirkung und keinen Einfluß auf die Produktion von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-4 hat, wofür ein zusätzlicher Stimulus notwendig ist. Die in der vorliegenden Arbeit etablierten proIL-18- und SP-IL-18-transgenen Mausmodelle mit hepatozytenspezifischer Überexpression der inaktiven bzw. aktiven Form von IL-18 liefern die Grundlage zu weiteren Untersuchungen der Rolle von IL-18 in der Leber bei der Immunmodulation.

## Literatur

- [1] Adachi O., Kawai T., Takeda K., Matsumoto M., Tsutsui H., Sakagami M., Nakanishi K., Akira S. (1998). Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*, **9**: 143-150
- [2] Ahn H.J., Maruo S., Tomura M., Mu J., Hamaoka T., Nakanishi K., Clark S., Kurimoto M., Okamura H., Fujiwara H. (1997). A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma-inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J. Immunol.*, **159**: 2125-2131
- [3] Airoidi I., Raffaghello L., Cocco C., Guglielmino R., Roncella S., Fedeli F., Gambini C., Pistoia V (2004). Heterogeneous expression of interleukin-18 and its receptor in B-cell lymphoproliferative disorders deriving from naive, germinal center, and memory B lymphocytes. *Clin Cancer Res.*, **10**: 144-154
- [4] Akita K., Ohtsuki T., Nukada Y., Tanimoto T., Namba M., Okura T., Takakura-Yamamoto R., Torigoe K., Gu Y., Su M.S., Fujii M., Satoh-Itoh M., Yamamoto K., Kohno K., Ikeda M., Kurimoto M. (1997). Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin-18 in monocytic THP.1 cells. *J. Biol. Chem.*, **272**: 26595-26603
- [5] Barbulescu K., Becker C., Schlaak J.F., Schmitt E., Meyer zum Buschenfelde K.H., Neurath M.F. (1998). IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN-gamma promoter in primary CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.*, **160**: 3642-3647
- [6] Born T.L., Thomassen E., Bird T.A., Sims J.E. (1998). Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J. Biol. Chem.*, **273**: 29445-29450
- [7] Brossart P., Grunebach F., Stuhler G., Reichardt V.L., Mohle R., Kanz L., Brugger W. (1998). Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, **92**: 4238-4247

- [8] Car B.D., Eng V.M., Schnyder B., Ozmen L., Huang S., Gallay P., Heumann D., Aguet M., Ryffel B. (1994). Interferon gamma receptor deficient mice are resistant to endotoxic shock. *J. Exp. Med.*, **179**: 1437-1444
- [9] Chen D.Y., Lan J.L., Lin F.J., Hsieh T.Y. (2004). Proinflammatory cytokine profiles in sera and pathological tissues of patients with active untreated adult onset Still's disease. *J. Rheumatol.*, **31**: 2189-2198
- [10] Chernavsky A.C., Paladino N., Rubio A.E., De Biasio M.B., Periolo N., Cuarterolo M., Goni J., Galoppo C., Canero-Velasco M.C., Munoz A.E., Fainboim H., Fainboim L. (2004). Simultaneous expression of Th1 cytokines and IL-4 confers severe characteristics to type I autoimmune Hepatitis in children. *Hum. Immunol.*, **65**: 683-691
- [11] Chisari F.V., Ferrari C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**: 29-60
- [12] Conti B., Jahng J.W., Tinti C., Son J.H., Joh T.H. (1997). Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J. Biol. Chem.*, **272**: 2035-2037
- [13] Conti B., Park L.C., Calingasan N.Y., Kim Y., Kim H., Bae Y., Gibson G.E., Joh T.H. (1999). Cultures of astrocytes and microglia express interleukin-18. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, **67**: 46-52
- [14] Cosman D. (1987). Control of messenger RNA stability. *Immunol. Today*, **8**: 16-17
- [15] Creagh E.M., Conroy H., Martin S.J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol. Rev.*, **193**: 10-21
- [16] Dao T., Ohashi K., Kayano T., Kurimoto M., Okamura H. (1996). Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. *Cell Immunol.*, **173**: 230-235
- [17] Dao T., Mehal W.Z., Crispe I.N. (1998). IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T-cells. *J. Immunol.*, **161**: 2217-2222
- [18] Dinarello C.A., Gelfand J.A., Wolff S.M. (1993). Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *J. Am. Med. Assoc.*, **269**: 1829-1835

- [19] Dinarello C.A. (1999). IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **103**: 11-24
- [20] Enari M., Talanian R.V., Wong W.W., Nagata S. (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. *Nature*, **380**: 723-726
- [21] Faggioni R., Cattley R.C., Guo J., Flores S., Brown H., Qi M., Yin S., Hill D., Scully S., Chen C., Brankow D., Lewis J., Baikalov C., Yamane H., Meng T., Martin F., Hu S., Boone T., Senaldi G. (2001). IL-18-binding protein protects against lipopolysaccharide-induced lethality and prevents the development of Fas/Fas ligand-mediated models of liver disease in mice. *J. Immunol.*, **167**: 5913-5920
- [22] Fantuzzi G., Dinarello C.A. (1999). Interleukin-18 and Interleukin-1 $\beta$ : two cytokine substrates for ICE (caspase-1). *J. Clin. Immunol.*, **19**: 1-11
- [23] Fearn C., Kravchenko V.V., Ulevitch R.J., Loskutoff D.J. (1995). Murine CD14 gene expression in vivo: Extramyeloid synthesis and regulation by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.*, **181**: 857-866
- [24] Fehniger T.A., Shah M.H., Turner M.J., VanDeusen J.B., Whitman S.P., Cooper M.A., Suzuki K., Wechsler M., Goodsaid F., Caligiuri M.A. (1999). Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: Implications for the innate immune response. *J. Immunol.*, **162**: 4511-4520
- [25] Finotto S., Siebler J., Hausding M., Schipp M., Wirtz S., Klein S., Protschka M., Doganci A., Lehr H.A., Trautwein C., Khosravi-Fahr R., Strand D., Lohse A., Galle P.R., Blessing M., Neurath M.F. (2004). Severe hepatic injury in interleukin 18 (IL-18) transgenic mice: a key role for IL-18 in regulating hepatocyte apoptosis in vivo. *Gut*, **53**: 392-400
- [26] Galle P.R., Hofmann W.J., Walczak H., Schaller H., Otto G., Stremmel W., Krammer P.H., Runkel L. (1995). Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. *J. Exp. Med.*, **182**: 1223-1230

- [27] Ghayur T., Banerjee S., Hugunin M., Butler D., Herzog L., Carter A., Quintal L., Sekut L., Talanian R., Paskind M., Wong W., Kamen R., Tracey D., Allen H. (1997). Caspase-1 processes IFN-gamma-inducing factor and regulates LPS-induced IFN-gamma production. *Nature*, **386**: 619-623
- [28] Giese N.A., Gabriele L., Doherty T.M., Klinman D.M., Tadesse-Heath L., contursu C., Epstein S.L., Morse H.C. (1997). Interferon (IFN) consensus sequence-binding protein, a transcription factor of the IFN regulatory factor family, regulates immune responses *in vivo* through control of interleukin-12 expression. *J. Exp. Med.*, **186**: 1535-1546
- [29] Gorski K., Carneiro M., Schibler U. (1986). Tissue-specific *in vitro* transcription from the mouse albumin promoter. *Cell*, **47**: 767-776
- [30] Gould M.P., Greene J.A., Bhoj V., DeVecchio J.L., Heinzl F.P. (2004). Distinct modulatory effect of LPS and CpG on IL-18-dependent IFN- $\gamma$  synthesis. *J. Immunol.*, **172**: 1754-1762
- [31] Gressner A.M., Bachem M.G. (1994). Cellular communications and cell-matrix interactions in the pathogenesis of fibroproliferative diseases: liver fibrosis as a paradigm. *Ann. Biol. Clin.*, **52**: 205-226
- [32] Gu Y., Kuida K., Tsutsui H., Ku G., Hsiao K., Fleming M.A., Hayashi N., Higashino K., Okamura H., Nakanishi K., Kurimoto M., Tanimoto T., Flavell R.A., Sato V., Harding M.W., Livingston D.J., Su M.S. (1997). Activation of IFN-gamma inducing factor mediated by interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Science*, **275**: 206-209
- [33] Guidotti L.G., Matzke B., Schaller H., Chisari F.V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.*, **69**: 6158-6169
- [34] Gupta S. (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin. Cancer Biology*, **10**: 161-171
- [35] Hashimoto W., Osaki T., Okamura H., Robbins P.D. Kurimoto M., Nagata S., Lotze M.T., Tahara H. (1999). Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively. *J. Immunol.*, **163**: 583-589

- [36] Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, **408**: 740-745
- [37] Hirata H., Takahashi A., Kobayashi S., Yonehara S., Sawai H., Okazaki T., Yamamoto K., Sasada M. (1998). Caspases are activated in a branched protease cascade and control distinct downstream processes in Fas-induced apoptosis. *J. Exp. Med.*, **187**: 587-600
- [38] Hochholzer P., Lipford G.B., Wagner H., Pfeffer K., 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. Immunol.*, **68**: 3502-3508
- [39] Hogan B.M.L., Costatini F., Lacy E. (1986). Manipulating the mouse embryo. A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*.
- [40] Hoshino T., Wiltrot R.H., Young H.A. (1999). IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J. Immunol.*, **162**: 5070-5077
- [41] Hoshino T., Winkler-Pickett R.T., Mason A.T., Ortaldo J.R., Young H.A. (1999). IL-13 production by NK cells: IL-13 producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.*, **162**: 51-59
- [42] Hoshino T., Yagita H., Ortaldo J.R., Wiltrot R.H., Young H.A. (2000). In vivo administration of IL-18 can induce IgE production through Th2 cytokine induction and up-regulation of CD40 ligand (CD154) expression on CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.*, **30**: 1998-2006
- [43] Hoshino T., Kawase Y., Okamoto M., Yokota K., Yoshino K., Yamamura K., Miyazaki J., Young H., Oizumi K. (2001). Cutting edge: IL-18-transgenic mice: in vivo evidence of a broad role for IL-18 in modulating immune function. *J. Immunol.*, **166**: 7014-7018

- [44] Hunter C.A., Timans J., Pisacane P., Menon S., Cai G., Walker W., Aste-Amezaga M., Chizzonite R., Bazan J.F., Kastelein R.A. (1997). Comparison of the effects of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and interferon-gamma-inducing factor on the production of interferon-gamma by natural killer. *Eur. J. Immunol.*, **27**: 2787-2792
- [45] Hyodo Y., Matsui K., Hayashi N., Tsutsui H., Kashiwamura S., Yamauchi H., Hiroishi K., Takeda K., Tagawa Y., Iwakura Y., Kayagaki N., Kurimoto M., Okamura H., Hada T., Yagita H., Akira S., Nakanishi K., Higashino K. (1999). IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J. Immunol.*, **162**: 1662-1668
- [46] Jarvik J.W., Telmer C.A. (1998). Epitope tagging. *Annu. Rev. Genet.*, **32**: 601-618
- [47] Jiang Y., Li Q., Gu C. (2001). Fas and ICE expression in the hepatocyte of tupaia with HDV/HBV infection. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.*, **9**: 9-11
- [48] Kakinuma C., Takagaki K., Yatomi T., Nakamura N., Nagata S., Uemura A., Shibutani Y. (1999). Acute toxicity of an anti-Fas antibody in mice. *Toxicol. Pathol.*, **27**: 412-420
- [49] Kasprzak A., Seidel J., Spachacz R., Biczysko W., Malkowska A., Kaczmarek E., Zabel M. (2004). Intracellular expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1alpha, TNF-alpha, and IL-6) in chronic hepatitis C. *Rocz. Akad. Med. Bialymst.*, **1**: 207-209
- [50] Kawamura T., Furusaka A., Koziel M.J., Chung R.T., Wang T.C., Schmidt E.V., Liang T.J. (1997). Transgenic expression of hepatitis C virus structural proteins in the mouse. *Hepatology*, **25**: 1014-1021
- [51] Kim Y.M., Kang H.S., Paik S.G., Pyun K.H., Anderson K.L., Torbett B.E., Choi I. (1999). Roles of IFN consensus sequence binding protein and PU.1 in regulating IL-18 gene expression. *J. Immunol.*, **163**: 2000-2007
- [52] Kim S.H., Eisenstein M., Reznikov L., Fantuzzi G., Novick D., Rubinstein M., Dinarello C.A. (2000). Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the interleukin-18 binding protein to inhibit interleukin-18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 1190-1195

- [53] Kim S.H., Cho D., Kim T.S. (2001). Induction of in vivo resistance to *Mycobacterium avium* infection by intramuscular injection with DNA encoding interleukin-18. *J. Immunol.*, **102**: 234-241
- [54] Kim S.H., Reznikov L.L., Stuyt R.J., Selzman C.H., Fantuzzi G., Hoshino T., Young H.A., Dinarello C.A. (2001). Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL-18R beta chain. *J. Immunol.*, **166**: 148-154
- [55] Kimura K., Kakimi K., Wieland S., Guidotti L.G., Chisari F.V. (2002). Interleukin-18 inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J. Virology*, **76**: 10702-10707
- [56] Kohka H., Yoshino T., Iwagaki H., Sakuma I., Tanimoto T., Matsuo Y., Kurimoto M., Orita K., Akagi T., Tanaka N. (1998). Interleukin-18/interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, up-regulates ICAM-1 (CD54) expression in KG-1 cells. *J. Leukoc. Biol.*, **64**: 519-527
- [57] Kohno K., Kataoka J., Ohtsuki T., Suemoto Y., Okamoto I., Usui M., Ikeda M., Kurimoto. (1997). IFN-gamma-inducing factor (IGIF) is a costimulatory factor on the activation of Th1 but not Th2 cells and exerts its effect independently of IL-12. *J. Immunol.*, **158**: 1541-1550
- [58] Kondo T., Suda T., Fukuyama H., Adachi M., Nagata S. (1997). Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis. *Nat. Med.*, **3**: 409-413
- [59] Konishi H., Tsutsui H., Murakami T., Yumikura-Futatsugi S., Yamanaka K., Tanaka M., Iwakura Y., Suzuki N., Takeda K., Akira A., Nakanishi K., Mizutani H. (2002). IL-18 contributes to the spontaneous development of atopic dermatitis-like inflammatory skin lesion independently of IgE/stat6 under specific pathogen-free conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **99**: 11340-11345
- [60] Krammer P.H. (1999). CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv. Immunol.*, **71**: 163-210
- [61] Leite-de-Moraes M.C., Hameg A., Pacilio M., Koezuka Y., Taniguchi M., Van Kaer L., Schneider E., Dy M., Herbelin A. (2001). IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells. *J. Immunol.*, **166**: 945-951

- [62] Liu S., Salyapongse A.N., Geller D.A., Vodovotz Y., Billiar T.R. (2000). Hepatocyte toll-like receptor 2 expression in vivo and in vitro: role of cytokines in induction of rat TLR2 gene expression by lipopolysaccharide. *Shock*, **14**: 361-365
- [63] Liu S., Gallo D.J., Green A.M., Williams D.L., Gong X., Shapiro R.A., Gambotto A.A., Humphris E.L., Vodovotz Y., Billiar T. (2002). Rolle of toll-like receptors in changes in gene expression and NF-kappa B activation in mouse hepatocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Infect. Immun.*, **70**: 3433-3442
- [64] Lochner M., Wagner H., Classen M., 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
- [65] Luster M.I., Germolec D.R., Yoshida T., Kayama F., Thompson M. (1994). Endotoxin-induced cytokine gene expression and excretion in the liver. *Hepatology*, **19**: 480-488
- [66] Magram J., Sfarra J., Connaughton S., Faherty D., Warriar R., Carvajal D., Wu C.Y., Stewart C., Sarmiento U., Gately M.K. (1996). IL-12-deficient mice are defective but not devoid of type 1 cytokine responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **795**: 60-70
- [67] Marshall J.D., Aste-Amezaga M., Chehimi S.S., Murphy M., Olsen H., Trinchieri G. (1999). Regulation of human IL-18 mRNA expression. *Clin. Immunol.*, **90**: 15-21
- [68] Matsui K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Hyodo Y., Hayashi N., Hiroishi K., Kawada N., Okamura H., Nakanishi K., Higashino K. (1997). *Propionibacterium acnes* treatment diminishes CD4<sup>+</sup>NK1.1<sup>+</sup> T cells in the liver by induction of IL-12 and IL-18 production from Kupffer cells. *J. Immunol.*, **159**: 97-106
- [69] Matsumura T., Ito A., Takii T., Hayashi H., Onozaki K. (2000). Endotoxin and cytokine regulation of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 gene expression in murine liver and hepatocytes. *J. Interferon Cytokine Res.*, **20**: 915-921
- [70] McClain C.J., Barve S., Deaciuc I., Kugelmas M., Hill D. (1999). Cytokines in alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.*, **19**: 205-219

- [71] Micallef M.J., Ohtsuki T., Kohno K., Tanabe F., Ushio S., Namba M., Tanimoto T., Torigoe K., Fujii M., Ikeda M., Fukuda S., Kurimoto M. (1996). Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur. J. Immunol.*, **26**: 1647-1651
- [72] Morikawa A., Sugiyama T., Kato Y., Koide N., Jiang G.Z., Takahashi K., Tamada Y., Yokochi T. (1996). Apoptotic cell death in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model. *Infect Immun.*, **64**: 734-738
- [73] Morrison D.C., Ryan J.L. (1987). Endotoxin and disease mechanisms. *Annu. Rev. Med.*, **38**: 417-432
- [74] Munder M., Mallo M., Eichmann K., 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
- [75] Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. (2001). 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
- [76] Novick D., Kim S.H., Fantuzzi G., Reznikov L., Dinarello C.A., Rubinstein M. (1999). Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity*, **10**: 127-136
- [77] Novick D., Schwartsburd B., Pinkus R., Suissa D., Belzer I., Stoecker Z., Keane W.F., Chvatchko Y., Kim S.H., Fantuzzi G., Dinarello C.A., Rubinstein M. (2001). A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18. *Cytokine*, **14**: 334-342
- [78] O'garra A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, **8**: 275-283
- [79] Ogasawara J., Watanabe-Fukunaga R., Adachi M., Matsuzawa A., Kasugai T., Kitamura Y., Itoh N., Suda T., Nagata S. (1993). Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, **364**: 806-809

- [80] Ogata A., Kitano M., Yamanaka J., Yamasaki T., Hashimoto N., Iwasaki T., Hamano T., Fujimoto J., Kakishita E. (2003). Interleukin 18 and hepatocyte growth factor in fulminant hepatic failure of adult onset Still's disease. *J. Rheumatol.*, **30**: 1093-1096
- [81] Okamoto I., Kohno K., Tanimoto T., Ikegami H., Kurimoto. (1999). Development of CD8<sup>+</sup> effector T cells is differentially regulated by IL-18 and IL-12. *J. Immunol.*, **162**: 3202-3211
- [82] Okamura H., Tsutsi H., Komatsu T., Yutsudo M., Hakura A., Tanimoto T., Torigoe K., Okura T., Nukada Y., Hattori K., et al. (1995). Cloning of a new cytokine that induces IFN- $\gamma$  production by T cells. *Nature*, **378**: 88-91
- [83] Okamura H., Nagata K., Komatsu T., Tanimoto T., Nukata Y., Tanabe F., Akita K., Torigoe K., Okura T., Fukuda S., et al. (1995). A novel costimulatory factor for gamma interferon induction found in the livers of mice causes endotoxic shock. *Infect. Immun.*, **63**: 3966-3972
- [84] Okamura H., Kashiwamura S., Tsutsui H., Yoshimoto T., Nakanishi K. (1998). Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr. Opin. Immunol.*, **10**: 259-264
- [85] Okamura H., Tsutsui H., Kashiwamura S., Yoshimoto T., Nakanishi K. (1998). Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv. Immunol.*, **70**: 281-312
- [86] Parnet P., Garka K.E., Bonnert T.P., Dower S.K., 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
- [87] Pasquetto V., Wieland S.F., Uprichard S.L., Tripodi M., Chisari F.V. (2002). Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *J. Virology*, **76**: 5646-5653
- [88] Pasquinelli C., Shoenberger J.M., Chung J., Chang K.M., Guidotti L.G., Selby M., Berger K., Lesniewski R., Houghton M., Chisari F.V. (1997). Hepatitis C virus core and E2 protein expression in transgenic mice. *Hepatology*, **25**: 719-727

- [89] Prinz M., Hanisch U.K. (1999). Murine microglial cells produce and respond to interleukin-18. *J. Neurochem.*, **72**: 2215-2218
- [90] Puren A.J., Razeghi P., Fantuzzi G., Dinarello C.A. (1998). Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. *J. Infect. Dis.*, **178**: 1830-1834
- [91] Puren A.J., Fantuzzi G., Gu Y., Su M.S., Dinarello C.A. (1998). Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNF-alpha production from non-CD14<sup>+</sup> human blood mononuclear cells. *J. Clin. Invest.*, **101**: 711-721
- [92] Qian D., Brosnan J.T. (1996). Administration of Escherichia coli endotoxin to rat increases liver mass and hepatocyte volume in vivo. *Biochem. J.*, **313**: 479-486
- [93] Ramage P., Cheneval D., Chvei M., Graff P., Hemmig R., Heng R., Kocher H.P., Mackenzie A., Memmert K., Revesz L., et al. (1995). Expression, refolding, and autocatalytic proteolytic processing of the interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme precursor. *J. Biol. Chem.*, **270**: 9378-9383
- [94] Robinson D., Shibuya K., Mui A., Zonin F., Murphy E., Sana T., Hartley S.B., Menon S., Kastelein R., Bazan F., O'Garra A. (1997). IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NFkappaB. *Immunity*, **7**: 571-581
- [95] Rosenberg W. (1999). Mechanismus of immune escape in viral hepatitis. *Gut*, **44**: 759-764
- [96] Roth R.A., Harkema J.R., Pestka J.P., Ganey P.E. (1997). Is exposure to bacterial endotoxin a determinant of susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **147**: 300-311
- [97] Rothe J., Lesslauer W., Lotscher H., Lang Y., Koebel P., Kontgen F., Althage A., Zinkernagel R., Steinmetz M., Bluethmann H. (1993). Mice lacking the tumor necrosis receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature.*, **364**: 798-802

- [98] Sakao Y., Takeda K., Tsutsui H., Kaisho T., Nomura F., Okamura H., Nakanishi K., Akira S. (1999). IL-18-deficient mice are resistant to endotoxin-induced liver injury but highly susceptible to endotoxin shock. *Int. Immunol.*, **11**: 471-480
- [99] Shackelford R., Adams D.O., Johnson S.P. (1995). IFN-gamma and lipopolysaccharide induce DNA binding of transcription factor PU.1 in murine tissue macrophages. *J. Immunol.*, **154**: 1374-1382
- [100] Sharf R., Azriel A., Lejbkowitz F., Winograd S.S., Ehrlich R., Levi B.Z. (1995). Functional domain analysis of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) and its association with interferon regulatory factors. *J. Biol. Chem.*, **270**: 13063-13069
- [101] Sharf R., Meraro D., Azriel A., Thornton A.M., Ozato K., Petricoin E.F., Lerner A.C., Schaper F., Hauser H., Levi B.Z. (1997). Phosphorylation events modulate the ability of interferon consensus sequence binding protein to interact with interferon regulatory factors and to bind DNA. *J. Biol. Chem.*, **272**: 9785-9792
- [102] Scharton-Kersten T., Contursi C., Masumi A., Sher A., Ozato K. (1997). Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin-12 p40 induction. *J. Exp. Med.*, **186**: 1523-1534
- [103] Schuchmann M., Hermann F., Herkel J., van der Zee R., Galle P.R., Lohse A.W. (2004). HSP60 and CpG-DNA-oligonucleotides differentially regulate LPS-tolerance of hepatic Kupffer cells. *Immunol. Lett.*, **15**: 199-204
- [104] Schumann R.R., Belka C., Reuter D., Lamping N., Kirschning C.J., Weber J.R., Pfeil D. (1998). Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood*, **91**: 577-584
- [105] Strand S., Hofmann W.J., Grambihler A., Hug H., Volkmann M., Otto G., Wesch H., Mariani S.M., Hack V., Stremmel W., Krammer P.H., Galle P.R. (1998). Hepatic failure and liver cell damage in acute Wilson's disease involve CD95 (APO-1/Fas) mediated apoptosis. *Nat. Med.*, **4**: 588-593

- [106] Stoll S., Muller G., Kurimoto M., Saloga J., Tanimoto T., Yamauchi H., Okamura H., Knop J., Enk A.H. (1997). Production of IL-18 (INF-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J. Immunol.*, **159**: 298-302
- [107] Takeda K., Tsutsui H., Yoshimoto T., Adachi O., Yoshida N., Kishimoto T., Okamura H., Nakanishi K., Akira S. (1998). Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18-deficient mice. *Immunity*, **8**: 383-390
- [108] Tanaka M., Suda T., Haze K., Nakamura N., Sato K., Kimura F., Motoyoshi K., Mizuki M., Tagawa S., Ohga S., Hatake K., Drummond A.H., Nagata S. (1996). Fas ligand in human serum. *Nat. Med.*, **2**: 317-322
- [109] Tanaka M., Suda T., Yatomi T., Nakamura N., Nagata S. (1997). Lethal effect of recombinant human Fas ligand in mice pretreated with *Propionibacterium acnes*. *J. Immunol.*, **158**: 2303-2309
- [110] Taieb J., Mathurin P., Poynard T., Gougerot-Pocidallo M.A., Chollet-Martin S. (1998). Raised plasma soluble Fas und Fas-ligand in alcoholic liver disease. *Lancet.*, **351**: 1930-1931
- [111] Thomassen E., Bird T.A., Renshaw B.R., Kennedy M.K., Sims J.E. (1998). Binding of interleukin-18 to the interleukin-1 receptor homologous receptor IL-1Rrp1 leads to activation of signaling pathways similar to those used by interleukin-1. *J. Interferon Cytokine Res.*, **18**: 1077-1088
- [112] Thurman R.G. (1998). II. Alcoholic liver injury involves activation of Kupffer cells by endotoxin. *Am. J. Physiol.*, **275**: G605-G611
- [113] Tiegs G., Kusters S., Kunstle G., Hentze H., Kiemer A.K., Wendel A. (1998). *J. Pharmacol. Exp., Ther.*, **287**: 1098-1104
- [114] Tomura M., Maruo S., Mu J., Zhou X.Y., Ahn H.J., Hamaoka T., Okamura H., Nakanishi K., Clark S., Kurimoto M., Fujiwara H. (1998). Differential capacities of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> T cell subsets to express IL-18 receptor and produce IFN-gamma in response to IL-18. *J. Immunol.*, **160**: 3759-3765

- [115] Tone M., Thompson S.A., Tone Y., Fairchild P.J., Waldmann H. (1997). Regulation of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) gene expression. *J. Immunol.*, **159**: 6156-6163
- [116] Torigoe K., Ushio S., Okura T., Kobayashi S., Taniai M., Kunikata T., Murakami T., sanou O., Kojima H., Fuji M., Ohta T., Ikeda M., Ikegami H., Kurimoto M. (1997). Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**: 25737-25742
- [117] Trinchieri G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv. Immunol.*, **70**: 83-243
- [118] Tsuji H., Mukaida N., Harada A., Kaneko S., Matsushita E., Nakanuma Y., Tsutsui H., Okamura H., Nakanishi K., Tagawa Y., Iwakura Y., Kobayashi K., Matsushima K. (1999). Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed IFN-gamma-deficient mice by a concomitant reduction of TNF-alpha, IL-12, and IL-18 production. *J. Immunol.*, **162**: 1049-1055
- [119] Tsutsui H., Nakanishi K., Matsui K., Higashino K., Okamura H., Miyazawa Y., Kaneda K. (1996). IFN-gamma-inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J. Immunol.*, **157**: 3967-3973
- [120] Tsutsui H., Matsui K., Kawada N., Hyodo Y., Hayashi N., Okamura H., Higashino K., Nakanishi K. (1997). IL-18 accounts for both TNF- $\alpha$ - and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J. Immunol.*, **159**: 3961-3967
- [121] Tsutsui H., Kayagaki N., Kuida K., Nakano H., Hayashi N., Takeda K., Matsui K., Kashiwamura S., Hada T., Akira S., Yagita H., Okamura H., Nakanishi K. (1999). Caspase-1 independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity*, **11**: 359-367
- [122] Tsutsui H., Adachi K., Seki E., Nakanishi K. (2003). Cytokine-induced inflammatory liver injuries. *Curr. Mol. Med.*, **3**: 545-559

- [123] Udagawa N., Horwood N.J., Elliott J., Mackay A., Owens J., Okamura H., Kurimoto M., Chambers T.J., Martin T.J., Gillespie M.T. (1997). Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/makrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J. Exp. Med.*, **185**: 1005-1012
- [124] Vodovotz Y., Liu S., McCloskey C., Shapiro R., Green A., Billiar T. R. (2001). The hepatocyte as a microbial product-responsive cell. *J. Endotoxin Res.*, **7**: 365-373
- [125] Wakita T., Taya C., Katsume A., Kato J., Yonekawa H., Kanegae Y., Saito I., Hayashi Y., Koike M., Kohara M. (1998). Efficient conditional transgenic expression in hepatitis C virus cDNA transgenic mice mediated by the Cre/loxP system. *J. Biol. Chem.*, **273**: 9001-9006
- [126] Walker W., Aste-Amezaga M., Kastelein R.A., Trinchieri G., Hunter C.A. (1999). IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.*, **162**: 5894-5901
- [127] Wan Y., Freeswick P.D., Khemlani L.S., Kispert P.H., Wang S.C., Su G.L., Billiar T.R. (1995). Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes from LPS-treated rats. *Infect. Immun.*, **63**: 2435-2442
- [128] Wang S., Miura M., Jung Y-K., Zhu H., Li E., Yuan J. (1998). Murine caspase-11, an ICE-interacting protease, is essential for the activation of ICE. *Cell*, **92**: 501-509
- [129] Weghorst C.M., Devor D.E., Henneman J.R., Ward J.M. (1994). Promotion of hepatocellular foci and adenomas by di(2-ethylhexyl) phthalate and phenobarbital in C3H/HeNCr mice following exposure to N-nitrosodiethylamine at 15 days of age. *Exp. Toxicol. Pathol.*, **45**: 423-431
- [130] Wieland S.F., Guidotti L.G., Chisari F.V. (2000). Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral DNA-containing caspids in hepatitis B virus transgenic mice. *J. Virology*, **74**: 4165-4173

- [131] Wild J.S., Sigounas A., Sur N., Siddiqui M.S., Alam R., Kurimoto M., 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**: 2701-2710
- [132] Wu C.Y, Maeda H., Contursi C., Ozato K., Seder R.A. (1999). Differential requirement of IFN consensus sequence binding protein for the production of IL-12 and induction of Th1-type cells in response to IFN-gamma. *J. Immunol.*, **162**: 807-812
- [133] Xu D., Chan W.L., Leung B.P., Hunter D., Schulz K., Carter R.W., McInnes I.B., Robinson J.H., Liew F.Y. (1998). Selective expression and functions of interleukin-18 receptor on T helper (Th1) type 1 but not Th2 cells. *J. Exp. Med.*, **188**: 1485-1492
- [134] Xu D., Trajkovic V., Hunter D., Leung B.P., Schulz K., Gracie J.A., McInnes I.B., 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
- [135] Yamano T., Higashi T., Nouse K., Nakatsukasa H., Kariyama K., Yumoto E., Kobayashi Y, Yamamoto K., Iwagaki H., Yagi T., Tanimoto T., Kurimoto M., Tanaka N., Tsuji T. (2000). Serum interferon-gamma-inducing factor/IL-18 levels in primary biliary cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.*, **122**: 227-231
- [136] Yang J., Murphy TL., Ouyang W., Murphy K.M. (1999). Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4<sup>+</sup> T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation. *Eur. J. Immunol.*, **29**: 548-555
- [137] Yoshimoto T., Okamura H., Tagawa YI., Iwakura Y., Nakanishi K. (1997). Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 3948-3953
- [138] Yoshimoto T., Takeda K., Tanaka T., Ohkusu K., Kashiwamura S., Okamura H., Akira S., 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**: 3400-3407

- [139] Yoshimoto T., Tsutsui H., Tominaga K., Hoshino K., Okamura H., Akira S., Paul W.E., Nakanishi K. (1999). IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**: 13962-13966
- [140] Yoshimoto T., Mizutani H., Tsutsui H., Noben-Trauth N., Yamanaka K., Tanaka M., Izumi S., Okamura H., Paul W.E., Nakanishi K. (2000). IL-18 induction of IgE: dependence on CD4<sup>+</sup> T cells, IL-4 and STAT6. *Nat. Immunol.*, **1**: 132-137
- [141] Yoshimura K., Hazama S., Iizuka N., Yoshino S., Yamamoto K., Muraguchi M., Ohmoto Y., Noma T., Oka M. (2001). Successful immunogene therapy using colon cancer cells (colon 26) transfected with plasmid vector containing mature interleukin-18 cDNA and the Igekappa leader sequence. *Cancer Gene Ther.*, **8**: 9-16