



**Funktionelle Charakterisierung**  
**von**  
**p75TNF-Rezeptor-Isoformen**



**Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften**  
**- Dr. rer. nat. -**  
**der naturwissenschaftlichen Fakultät IV**  
**Chemie und Pharmazie**  
**der Universität Regensburg**

**vorgelegt von**  
**Monika Bäumel**  
**aus Ansbach**

**2006**

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von August 2003 bis August 2006 unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel am Institut für Immunologie des Klinikums der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:

14. September 2006

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Sigurd Elz

Prof. Dr. Daniela N. Männel

Prüfungsausschuß:

Prof. Dr. Armin Buschauer (Vorsitz)

Prof. Dr. Sigurd Elz

Prof. Dr. Daniela N. Männel

Prof. Dr. Jörg Heilmann

**Für meine Eltern**

**Überall geht ein frühes Ahnen dem späteren Wissen voraus.**

Alexander von Humboldt (1769-1859)

# Inhaltsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>              | IX |
| <b>A Einleitung</b>                       | 1  |
| 1. Das Immunsystem – ein kurzer Überblick | 1  |
| 2. Zytokine und ihre Rezeptoren           | 2  |
| 3. Die TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie     | 3  |
| 3.1. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)           | 6  |
| 3.2. Der p55TNF-Rezeptor                  | 9  |
| 3.3. Der p75TNF-Rezeptor                  | 10 |
| 4. TNF als Ziel für Therapeutika          | 11 |
| 4.1. TNF-Therapie                         | 11 |
| 4.2. Anti-TNF-Therapie                    | 12 |
| <b>B Material und Methoden</b>            | 15 |
| 1. Material                               | 15 |
| 1.1. Chemikalien und Reagenzien           | 15 |
| 1.2. Verbrauchsmaterial und Geräte        | 16 |
| 1.3. Kits                                 | 18 |
| 1.4. Molekulargewichtsstandard            | 18 |
| 1.5. Antikörper                           | 18 |
| 1.6. Enzyme                               | 19 |
| 1.7. Oligonukleotide                      | 20 |
| 1.8. Puffer und Lösungen                  | 20 |
| 1.9. Zelllinien                           | 23 |
| 1.10. Tiere                               | 23 |
| 2. Methoden                               | 24 |
| 2.1. Arbeiten mit RNA                     | 24 |
| 2.1.1. Präparation von Gesamt-RNA         | 24 |
| 2.1.2. Reverse Transkription              | 24 |
| 2.2. Arbeiten mit DNA                     | 25 |
| 2.2.1. Isolierung genomischer DNA         | 25 |
| 2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)    | 26 |

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 2.2.3.   | Agarose-Gelelektrophorese  | 27 |
| 2.2.4.   | Southern Blot  | 27 |
| 2.2.5.   | Radioaktive Markierung von DNA-Sonden  | 28 |
| 2.3.     | Zellbiologische Methoden   | 29 |
| 2.3.1.   | Zellkulturbedingungen  | 29 |
| 2.3.2.   | Einfrieren und Auftauen von Zellen   | 29 |
| 2.3.3.   | Bestimmung der Lebend-Zellzahl   | 30 |
| 2.3.4.   | Mycoplasmentest  | 30 |
| 2.3.5.   | Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation  | 30 |
| 2.3.6.   | TNF-induzierter Zytotoxizitätstest   | 31 |
| 2.3.7.   | Gewinnung der Peritonealexsudatzellen (PEC)  | 32 |
| 2.3.8.   | Gewinnung der Milzzellen   | 32 |
| 2.3.9.   | Gewinnung der Thymozyten   | 33 |
| 2.3.10.  | Durchflusszytometrie   | 33 |
| 2.3.11.  | MACS-Reinigung   | 35 |
| 2.3.12.  | Zellsortierung   | 36 |
| 2.3.13.  | CFSE-Färbung   | 36 |
| 2.3.14.  | Radioaktive Markierung mit <sup>3</sup> H-Thymidin   | 37 |
| 2.3.15.  | Bestimmung der Zellproliferation   | 37 |
| 2.3.16.  | Bestimmung der suppressiven Aktivität  | 37 |
| 2.4.     | Immunologische Methoden  | 38 |
| 2.4.1.   | Serumgewinnung aus Mausblut  | 38 |
| 2.4.2.   | ELISA  | 38 |
| 2.4.3.   | Messung der Konzentration der Leber-Aminotransferasen (ALT/AST)                                      | 39 |
| 2.5.     | Tierexperimente  | 40 |
| 2.5.1.   | Tierhaltung und Versuchstiere  | 40 |
| 2.5.2.   | Induktion einer experimentellen akuten und chronischen Colitis mit<br>Dextransulfat (DSS)            | 41 |
| 2.5.3.   | Bestimmung von Entzündungsparametern des Dickdarmes  | 42 |
| 2.5.3.1. | Histologischer Score   | 42 |
| 2.5.3.2. | Bestimmung des Lymphfollikelscores   | 43 |
| 2.5.3.3. | Gewichtsveränderung  | 43 |
| 2.5.3.4. | Dickdarmlänge  | 43 |
| 2.5.4.   | D-Galaktosamin-/LPS-induzierter Hepatotoxizitätstest   | 43 |
| 2.5.5.   | Concanavalin A (Con A)-induzierter Hepatotoxizitätstest  | 44 |
| 2.5.6.   | Concanavalin A (Con A)-induzierter Hepatotoxizitätstest nach<br>Etanercept-Gabe                      | 44 |
| 2.5.7.   | Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels<br>zökaler Ligatur und Punktion (CLP) | 45 |
| 2.5.7.1. | Anästhesie   | 45 |

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| 2.5.7.2.  | Laparotomie   | 45        |
| 2.5.7.3.  | Ligatur und Perforation   | 45        |
| 2.5.7.4.  | Verschluss  | 45        |
| 2.6.      | Statistik   | 46        |
| <b>C</b>  | <b>Ergebnisse</b>   | <b>47</b> |
| <b>1.</b> | <b>Generierung und Züchtung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse</b>                           | <b>47</b> |
| 1.1.      | Generierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse (Vorarbeiten)                                 | 47        |
| 1.2.      | Züchtung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse auf Homozygotie                                  | 50        |
| <b>2.</b> | <b>Genotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse</b>                                    | <b>54</b> |
| 2.1.      | Nachweis des hicp75TNFR-Transgens in der genomischen DNA                                  | 54        |
| 2.1.1.    | Nachweis des hicp75TNFR-Transgens mit Hilfe der<br>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)       | 54        |
| 2.1.2.    | Nachweis des hicp75TNFR-Transgens durch Southern-Hybridisierung                           | 55        |
| 2.2.      | Nachweis der Transkription des hicp75TNFR-Transgens                                       | 56        |
| 2.3.      | Nachweis des hicp75TNFR-Proteins in transgenen Mäusen                                     | 57        |
| <b>3.</b> | <b>Phänotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse und<br/>p75TNFR-defizienten Mäuse</b> | <b>59</b> |
| 3.1.      | Nachweis der Bindungsfähigkeit für mTNF   | 59        |
| 3.2.      | Untersuchung der Organstrukturen der hicp75TNFR-transgenen Mäuse                          | 61        |
| 3.3.      | Untersuchungen des hicp75TNFR auf Makrophagen transgener Mäuse                            | 62        |
| 3.4.      | Untersuchungen zur Funktion des p75TNFR und hicp75TNFR<br>in Entzündungsmodellen          | 63        |
| 3.4.1.    | Akute DSS-induzierte Colitis  | 63        |
| 3.4.1.1.  | Histologische Auswertung  | 64        |
| 3.4.1.2.  | Anzahl der Lymphfollikel  | 65        |
| 3.4.1.3.  | Gewichtsverlauf   | 66        |
| 3.4.1.4.  | Dickdarmlänge   | 67        |
| 3.4.2.    | Chronische DSS-induzierte Colitis   | 68        |
| 3.4.2.1.  | Histologische Auswertung  | 69        |
| 3.4.2.2.  | Anzahl der Lymphfollikel  | 70        |
| 3.4.2.3.  | Dickdarmlänge   | 70        |
| 3.4.3.    | Untersuchung der DGalN/LPS-induzierten Hepatotoxizität                                    | 71        |
| 3.4.4.    | Untersuchung der Con A-induzierten Hepatotoxizität  | 73        |
| 3.4.5.    | Untersuchung der Con A-induzierten Hepatotoxizität nach<br>Vorbehandlung mit Etanercept   | 75        |
| 3.5.      | Untersuchungen zur Funktion des p75TNFR und hicp75TNFR<br>auf T-Zellen                    | 78        |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| 3.5.1.    | Oberflächenexpression auf Thymozyten   | 78  |
| 3.5.2.    | Oberflächenexpression auf peripheren T-Zellen aus der Milz                               | 80  |
| 3.5.3.    | Regulierung der p75TNFR-Oberflächenexpression auf peripheren T-Zellen aus der Milz       | 81  |
| 3.5.4.    | Quantitative Untersuchung peripherer T-Zellen in Abhängigkeit von p75TNFR und hicp75TNFR | 87  |
| 3.5.5.    | Qualitative Untersuchung peripherer T-Zellen in Abhängigkeit von p75TNFR und hicp75TNFR  | 88  |
| 3.5.6.    | Quantitative Bestimmung regulatorischer T-Zellen in naiven Mäusen                        | 91  |
| 3.5.7.    | Quantitative Bestimmung regulatorischer T-Zellen nach akuter Entzündung                  | 95  |
| 3.5.8.    | Qualitative Untersuchung regulatorischer T-Zellen  | 97  |
| <b>D</b>  | <b>Diskussion</b>  | 99  |
| <b>1.</b> | <b>Genotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse</b>                                   | 99  |
| <b>2.</b> | <b>Phänotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse und p75TNFR-defizienten Mäuse</b>    | 101 |
| 2.1.      | Untersuchung des hicp75TNFR auf Makrophagen  | 103 |
| 2.2.      | Untersuchungen zur Funktion des p75TNFR auf T-Zellen                                     | 104 |
| 2.3.      | p75TNFR auf regulatorischen T-Zellen   | 107 |
| 2.4.      | Untersuchungen zur Funktion des hicp75TNFR und p75TNFR in Entzündungen                   | 110 |
| 2.4.1.    | Akute und chronische entzündliche Darmerkrankung   | 110 |
| 2.4.2.    | Induzierte Lebertoxizität  | 115 |
| <b>E</b>  | <b>Zusammenfassung</b>   | 122 |
| <b>F</b>  | <b>Literaturverzeichnis</b>  | 124 |
|           | <b>Danksagung</b>  | 137 |
|           | <b>Anhang</b>  | 139 |
|           | <b>Erklärung</b>   | 140 |

## Abkürzungsverzeichnis

|      |  |
|------|--|
| A    | Adenin und Absorption                                  |
| Abb. | Abbildung  |
| ad   | auffüllen auf  |
| ADAM | <i>a disintegrin and metalloproteinase</i>             |
| Ak   | Antikörper   |
| ALT  | Alanin-Transaminase                                    |
| AP-1 | <i>activator protein-1</i>                             |
| APC  | Allophycocyanin oder Antigen-präsentierende Zelle      |
| APS  | Ammoniumperoxodisulfat                                 |
| ARE  | AU-reiches Element                                     |
| AS   | Aminosäure   |
| AST  | Aspartat-Transaminase                                  |
| bp   | Basenpaare   |
| BSA  | <i>bovine serum albumin</i> (Rinder Serum Albumin)     |
| bzw. | beziehungsweise  |
| C    | Cytosin  |
| ca.  | circa  |
| CD   | <i>cluster of differentiation</i>                      |
| cDNA | <i>complementary DNA</i>                               |
| Ci   | Curie  |
| CLP  | <i>cecal ligation and puncture</i>                     |
| CRD  | <i>cysteine-rich domain</i>                            |
| Da   | Dalton   |
| DD   | <i>death domain</i> (Todesdomäne)                      |
| DMEM | <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>                |
| DMSO | Dimethylsulfoxid                                       |
| DNA  | <i>desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxyribonucleosid-triphosphat                        |
| DSS  | <i>dextran sulfate sodium</i>                          |
| DTT  | Dithiothreitol   |

---

|                |  |
|----------------|--|
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i>  |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat   |
| ELISA          | <i>enzyme-linked immunosorbent-assay</i>                                     |
| FADD           | <i>Fas-associated death domain</i>   |
| FCS            | <i>fetal calf serum</i> (fötales Kälberserum)                                |
| FITC           | Fluoresceinisothiocyanat   |
| Foxp3          | <i>forkhead box P3</i>   |
| FSC            | <i>forward scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)                                  |
| g              | Gramm oder Erdbeschleunigung   |
| G              | Guanin   |
| GM-CSF         | <i>granulocyte-/macrophage-colony stimulating factor</i>                     |
| Gy             | Gray   |
| h              | Stunde oder human  |
| HACA           | human anti-chimär Antikörper   |
| HEPES          | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure                               |
| HRP            | <i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)                       |
| ICAM           | <i>intercellular adhesion molecule</i>                                       |
| Ig             | Immunglobulin  |
| IFN            | Interferon   |
| I $\kappa$ B   | <i>inhibitory <math>\kappa</math>B</i>                                       |
| IKK            | <i>inhibitory <math>\kappa</math>B kinase</i> (Inhibitor- $\kappa$ B-Kinase) |
| IL             | Interleukin  |
| ILP            | <i>isolated limb perfusion</i> (isolierte Extremitäten-Perfusion)            |
| i. p.          | intraperitoneal  |
| i. v.          | intravenös   |
| JNK            | <i>c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i>                                  |
| kb             | Kilobase   |
| kDa            | Kilodalton   |
| kg             | Kilogramm  |
| LB             | <i>Luria Broth</i> , Bakterienmedium   |
| LDH            | Lactatdehydrogenase  |
| LPS            | Lipopolysaccharid  |
| Lsg.           | Lösung   |

---

|                |  |
|----------------|--|
| LT             | Lymphotoxin  |
| m              | aus der Maus oder milli ( $10^{-3}$ ) oder Meter                           |
| M              | molar (mol/l)  |
| MACS           | <i>magnetic cell sorting</i>   |
| MAPK           | <i>mitogen-activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) |
| MCS            | <i>multiple cloning site</i>   |
| M-CSF          | <i>macrophage-colony stimulating factor</i>                                |
| MDH            | Malatdehydrogenase   |
| MG             | Molekulargewicht   |
| MHC            | <i>major histocompatibility complex</i>                                    |
| min            | Minuten  |
| mRNA           | <i>messenger RNA</i>   |
| MS             | Multiple Sklerose  |
| MW             | Mittelwert   |
| $\mu$          | mikro ( $10^{-6}$ )  |
| n              | nano ( $10^{-9}$ ) oder Anzahl   |
| NaCl           | Natriumchlorid   |
| NAD            | Nicotinamidadenindinukleotid   |
| NF- $\kappa$ B | <i>nuclear factor</i> $\kappa$ B (Nukleärer Faktor $\kappa$ B)             |
| NOD            | <i>non-obese diabetic</i>  |
| OD             | optische Dichte  |
| PBS            | <i>phosphate buffered salt solution</i><br>(phosphatgepufferte Salzlösung) |
| PCR            | <i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)               |
| PE             | Phycoerythrin  |
| Per-CP         | Peridinin Chlorophyll-a Protein  |
| pg             | Pikogramm  |
| PI             | Propidiumjodid   |
| PLAD           | <i>pre-ligand binding assembly domain</i>                                  |
| r              | rekombinant  |
| RIP            | <i>receptor interacting protein</i>  |
| RNA            | <i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)                                 |

|            |  |
|------------|--|
| rpm        | <i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)    |
| RPMI       | <i>Roswell Park Memorial Institute</i>               |
| RT         | Raumtemperatur oder Reverse Transkription            |
| s          | <i>soluble</i> (löslich)                             |
| s.         | siehe  |
| SCF        | <i>stem cell factor</i>                              |
| SDS        | <i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat) |
| SLE        | systemischer Lupus erythematoses                     |
| sog.       | sogenanntes  |
| SSC        | <i>sideward scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)        |
| T          | Thymidin   |
| TACE       | <i>TNF-alpha converting enzyme</i>                   |
| <i>Taq</i> | <i>Thermophilus aquaticus</i>                        |
| tg         | transgen   |
| sTNF       | lösliches TNF  |
| TNF        | Tumor Nekrose Faktor                                 |
| TNFR       | TNF-Rezeptor   |
| TRADD      | <i>TNF-receptor-associated death domain</i>          |
| TRAF       | <i>TNF-receptor-associated factor</i>                |
| TRAIL      | <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>         |
| TWEAK      | <i>TNF-like weak inducer of apoptosis</i>            |
| U          | <i>Unit</i> (1 internationale Einheit)               |
| UV         | ultraviolette Strahlung                              |
| VCAM       | <i>vascular cell adhesion molecule</i>               |
| v/v        | <i>volume/volume</i>                                 |
| wt         | Wildtyp  |
| w/v        | <i>weight/volume</i>                                 |
| z. B.      | zum Beispiel   |
| -/-        | defizient  |

# A Einleitung

## 1. Das Immunsystem – ein kurzer Überblick

Die physiologische Bedeutung des Immunsystems ist, den Organismus primär vor Infektionen zu schützen. Die Protektion bezieht sich dabei nicht nur auf Angriffe von außen, wie z. B. durch Bakterien oder Viren, sondern auch von innen, wie beispielsweise durch entartete Zellen. Dabei muss der Körper im Rahmen der Immunantwort zum einen Pathogene effektiv beseitigen und zum anderen zwischen Eigen- und Fremdanitigenen unterscheiden. Dem Organismus stehen dabei grundsätzlich zwei immunologische Effektorsysteme zur Verfügung, die unterschiedlich organisiert sind:

Das angeborene (unspezifische, nicht-adaptive) und das erworbene (spezifische, adaptive) Immunsystem.

Während das angeborene Immunsystem für die erste, wirksame Abwehrreaktion zuständig ist, entwickelt sich die erworbene Immunantwort erst durch die Anwesenheit von Krankheitserregern. Die wichtigsten Effektoren des angeborenen Immunsystems sind neben den Makrophagen und neutrophilen, eosinophilen sowie basophilen Granulozyten auch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und das Komplementsystem. Sie sind allesamt konstitutiv vorhanden, erkennen allerdings die Erreger nicht spezifisch. Dafür ist die erworbene Immunantwort verantwortlich. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass Pathogene spezifisch erkannt werden und ein sog. immunologisches Gedächtnis ausgebildet werden kann, wodurch ein gezielter Schutz vor einer erneuten Infektion gewährleistet wird. Die zentrale Funktion übernehmen dabei T- und B-Lymphozyten, die nach Antigenkontakt durch antigenpräsentierende Zellen (APC) aktiviert werden. T-Lymphozyten können daraufhin andere Immunzellen unterstützen bzw. infizierte Zellen töten und B-Lymphozyten produzieren Antikörper, die Pathogene binden.

Neben den zellulären Komponenten spielt das lymphatische Gewebe eine wichtige Rolle, in dem zum Teil die Reifung von Lymphozyten stattfindet. Es ist auch der Ort, an dem durch den Kontakt von APC und Lymphozyten die erworbene Immunität ausgelöst wird. Des Weiteren findet eine Immunmodulation durch eine Vielzahl von löslichen Molekülen, wie das Komplementsystem, Antikörper und Zytokine, statt.

In jedem Fall basiert aber eine erfolgreiche Immunantwort auf der Kooperation von beiden Systemen, dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem (Janeway, 2002, Vollmar, 2005).

## **2. Zytokine und ihre Rezeptoren**

Wie bereits erwähnt, nehmen Zytokine eine wichtige Stellung in der Modulation der Immunantwort ein. Sie sind sowohl für das angeborene wie auch für das erworbene Immunsystem von Bedeutung und vermitteln die Kommunikation unterschiedlicher immunkompetenter Zellen.

Bei den Zytokinen handelt es sich um kleine Proteine (Molekulargewicht ~25 kDa), die auf entsprechende Stimuli von Zellen im Organismus sezerniert werden und über die Bindung an spezifische Rezeptoren zahlreiche Reaktionen auslösen. Sie stellen dabei autokrine, parakrine und zum Teil endokrine Botenstoffe dar und sind in ihrer Funktion pleiotrop und redundant. Dies bedeutet, dass Zytokine auf verschiedene Zelltypen wirken und somit unterschiedliche Effekte initiieren. Zudem kann die distinkte Wirkung eines bestimmten Zytokins durch andere ersetzt werden, wodurch eine Therapie gegen Zytokine einen verminderten Erfolg liefern kann. Aufgrund des Pleiotropismus kann eine derartige Therapie zu einer Vielzahl von berechenbaren bzw. unberechenbaren Nebeneffekten führen. Darüber hinaus beeinflussen sich Zytokine in der Regel untereinander, was synergistische aber auch antagonistische Reaktionen zur Folge haben kann. Da sie mit einer sehr hohen Affinität an ihre jeweiligen Rezeptoren binden ( $K_D$ -Werte von  $10^{-10}$  bis  $10^{-12}$  M), reichen bereits geringe Zytokinmengen aus, um biologische Effekte zu erzielen. Zytokine sind in ihrer Funktion und Struktur sehr heterogen und lassen sich in folgende Gruppen einteilen:

Interferone, Interleukine, Chemokine, Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sowie die TNF-Familie.

Die Zytokinrezeptoren werden von den entsprechenden Zielzellen exprimiert und sind über eine Transmembrandomäne in der Plasmamembran verankert. Die Extrazellulärdomäne bildet die Bindungsstelle für das jeweilige Zytokin. Aufgrund dessen struktureller Homologien lassen sich die Rezeptoren in fünf Familien einteilen.

Die erste Gruppe bilden die Typ I Zytokinrezeptoren, die auch als Familie der Hämatoetinrezeptoren bezeichnet wird. Sie besitzen in ihrer Extrazellulärdomäne ein Motiv aus zwei konservierten Cysteinpaaren, sowie einen proximal zur Membran lokalisierten Sequenzabschnitt aus Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin (WSXWS), wobei X eine beliebige Aminosäure sein kann. Neben dem ersten bekannten Mitglied, dem Hämatoetinrezeptor, gehören u. a. zu dieser Gruppe die Rezeptoren für IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF und Prolaktin.

Die Familie der Typ II Zytokinrezeptoren ähnelt sehr stark den Typ I Zytokinrezeptoren, besitzen aber nicht die WSXWS-Sequenz. Prominente Vertreter sind IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  sowie IL-10.

Einige Zytokinrezeptoren weisen in ihrer extrazellulären Domäne Immunglobulin (Ig)-Domänen auf, weshalb sie als Ig-Superfamilie bezeichnet werden. Zu ihnen gehören die beiden Rezeptoren von IL-1, wie auch die Rezeptoren von M-CSF und SCF.

Die Chemokine stellen eine weitere Gruppe dar, die sieben transmembranäre  $\alpha$ -Helices besitzen, die ihnen auch den Namen „Siebenspänner“ verliehen haben. Nach Bindung der Chemokine an ihre Rezeptoren wird die Signaltransduktion über G-Proteine vermittelt.

Die fünfte Gruppe wird schließlich von der TNF-Rezeptor-Superfamilie gebildet, die als gemeinsames Merkmal eine konservierte Cystein-reiche Extrazellulärdomäne (*cysteine-rich domains*, CRD) aufweisen. Nach Aktivierung durch ihre Liganden trimerisieren sie und rekrutieren unterschiedliche Adaptermoleküle, die Apoptose auslösen oder Genexpression stimulieren (Abbas, 2000, Ibelgaufts, 2004, Janeway, 2002).

### **3. Die TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie**

Ende des 19. Jahrhunderts machte der amerikanische Chirurg William Bradley Coley, der Pionier der Krebstherapie, die Beobachtung, dass bei einigen Patienten inoperable Sarkome zurückgingen, wenn sie gleichzeitig mit Bakterien infiziert wurden, die ein Erysipel verursachen (Coley, 1893). Diesen Bakterienextrakt, das nach ihm benannte „Coley's toxin“, setzte er ohne die aktive Komponente zu kennen ein, und löste neben hohem Fieber bei einigen Patienten Tumornekrose von Sarkomen, Karzinomen und Lymphomen aus. In der folgenden Zeit wurde allgemein daran festgehalten, dass es

Moleküle bzw. Zytokine gibt, die selektiv Tumorzellen abtöten und somit ein therapeutisches Potenzial in der Krebsbehandlung haben können.

1975 wurde schließlich im Serum LPS-behandelter Mäuse ein Molekül identifiziert, das nekrotische Effekte auf Tumorzellen ausübte und daraufhin Tumornekrosefaktor (TNF) genannt wurde (Carswell, 1975). Dr. Gale A. Granger entdeckte sieben Jahre zuvor ein weiteres Molekül, das eine zytotoxische Aktivität zeigte und von Lymphozyten produziert wurde, weshalb er es Lymphotoxin (LT) nannte (Williams, 1968). Als später die Aminosäuresequenzen ermittelt und ihre cDNAs kloniert wurden, zeigten beide Moleküle eine Homologie (Aggarwal, 1985). Man hatte damit die beiden ersten Mitglieder der nach dem Prototyp TNF benannten TNF-Superfamilie identifiziert (Locksley, 2001). Mittlerweile umfasst diese Familie auf Ligandseite 19 und auf der korrespondierenden Rezeptorseite 29 Mitglieder, die unterschiedliche physiologische Effekte, wie Proliferation, Zelldifferenzierung, verbessertes Überleben aber auch Apoptose induzieren. Andererseits vermitteln einige Mitglieder der TNF-/TNFR-Superfamilie, darunter auch vor allem TNF, pathophysiologische Prozesse wie septischer Schock, Kachexie, Kanzerogenese und Autoimmunität (Aggarwal, 2002).

Die Liganden sind vornehmlich Typ II Transmembranproteine und sind für proteolytische Enzyme, wie z. B. Metalloproteasen, zugänglich. Die durch Abspaltung entstandene lösliche Form ist ebenso wie ihre Vorläuferform, das membrangebundene Protein, biologisch aktiv, indem sie Hetero- bzw. Homotrimere bilden (Idriss, 2000). Durch Bindung der Liganden an die jeweiligen Rezeptoren erfolgt ebenfalls auf der Rezeptorseite eine Trimerisierung. Es kann aber auch eine Konformationsänderung bereits vorgeformter Rezeptormultimere initiiert werden, wie dies für Rezeptoren mit einer *pre-ligand assembly domain* (PLAD), wie z. B. beide TNF-Rezeptoren und CD40, beschrieben wurde (Chan, 2000). Einige Liganden können an mehrere Rezeptoren innerhalb der TNF-/TNF-Rezeptor-Superfamilie binden, wodurch die Flexibilität aber auch die Komplexität dieses Systems erhöht wird (Idriss, 2000).

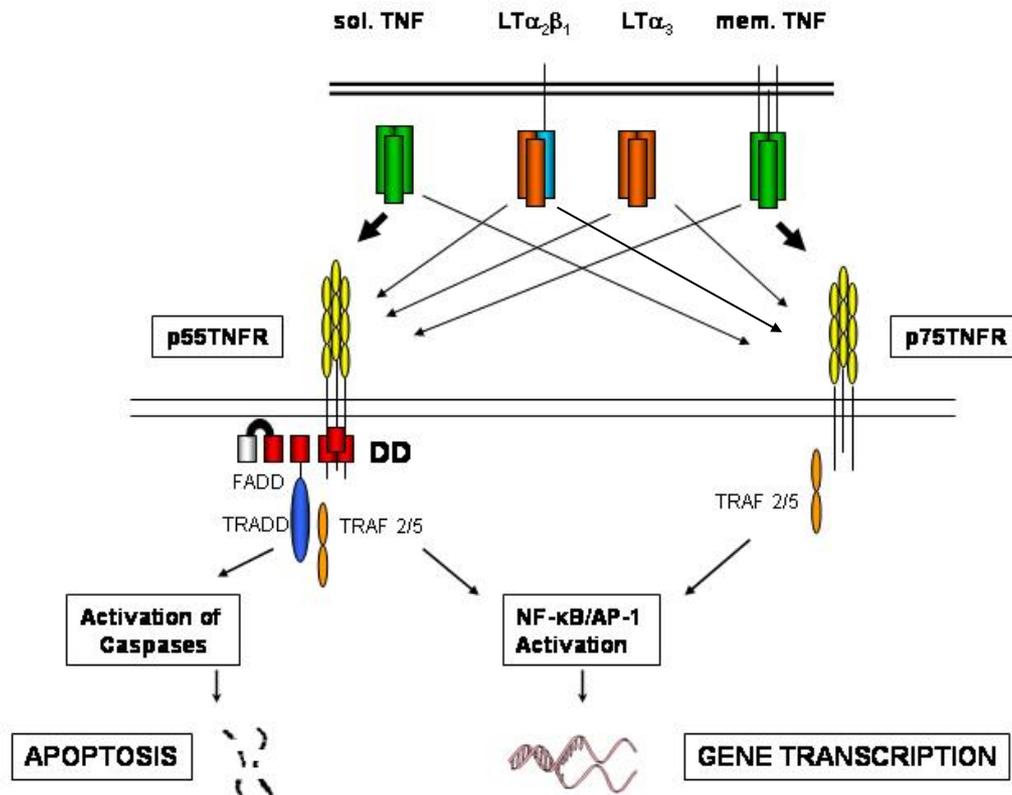
Die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind Typ I Transmembranproteine und lassen sich aufgrund ihrer intrazellulären Strukturhomologien und der damit verbundenen Signalkaskaden in drei Gruppen einteilen.

Die erste Gruppe bilden die Rezeptoren mit intrazellulären Todesdomänen (*death domain*, DD), an die sich nach Rezeptoraktivierung weitere DD-enhaltende zytosolische Proteine, wie beispielsweise TRADD oder FADD, anlagern (Itoh, 1993, Tartaglia, 1993a). Dadurch werden Caspasen aktiviert, die schließlich Apoptose induzieren. Als wichtige Vertreter dieser Familie sind der p55TNFR (TNFR1, CD120a) und Fas (CD95, Apo1) zu nennen.

Eine weitere Gruppe ist dadurch gekennzeichnet, dass sie anstatt der Todesdomänen intrazelluläre Sequenzen besitzen, an die TNF-Rezeptor assoziierte Faktoren (TRAF) binden können (Rothe, 1994b). Bisher sind sechs verschiedene TRAF-Moleküle beschrieben worden, die durch zytosolische Anlagerungen an TNF-Rezeptoren die Aktivierung von NF- $\kappa$ B vermitteln (Gaur, 2003). Ein prominentes Beispiel für einen solchen Rezeptor ist der p75TNFR (TNFR2, CD120b).

In der dritten Gruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie werden die sog. Decoy-Rezeptoren (DcR) zusammengefasst, die keine funktionellen intrazellulären Domänen besitzen. Da sie folglich zu keiner Signaltransduktion fähig sind, übernehmen sie eher die Aufgabe eines kompetitiven Inhibitors, der durch Abfangen der Liganden die Zytokinantwort abdämpfen kann (Gaur, 2003).

In Abbildung 1 ist ein kurzer Überblick über einen Teil der Mitglieder des TNF-/TNF-Rezeptor-Systems dargestellt, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.



**Abb. 1: Übersicht über die Moleküle des TNF-/TNF-Rezeptor-Systems.** Neben TNF binden auch LT $\alpha_3$  und das Heterotrimer LT $\alpha_2\beta_1$  an beide TNF-Rezeptoren. Die breiteren Pfeile bedeuten eine höhere Affinität zwischen Ligand und Rezeptor. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nicht alle an der Signaltransduktion beteiligten Proteine in der Abbildung dargestellt.

TRADD: TNF-Rezeptor assoziierte DD; FADD: Fas assoziierte DD; LT: Lymphotoxin

### 3.1. Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

Nachdem es 1985 gelang TNF zu klonieren und in *Escherichia coli* zu exprimieren (Aggarwal, 1985), bewiesen weitere Untersuchungen, dass TNF dem bereits bekannten Kachektin entspricht (Beutler, 1985). Dabei handelt es sich um ein Protein, welches von Makrophagen sezerniert wird und als erstes bei Tumorkranken beobachtet wurde. Neben der Tumornekrose gilt es ebenso als Ursache für Fieber und für die starken Abmagerungen bei Patienten (Kachexie), die an chronischen Erkrankungen, wie beispielsweise Krebs, leiden.

In der Tat lassen sich zwar unter physiologischen Bedingungen keine zirkulierenden TNF-Konzentrationen messen, jedoch sind erhöhte TNF-Serumspiegel in akuten und vor allem in chronischen Erkrankungen nachweisbar. Die detektierbaren TNF-Mengen sind also häufig mit pathologischen Zuständen verbunden (Aggarwal, 2002). So führt eine Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) oder anderen bakteriellen Produkten, sowie gram-positiven und gram-negativen Bakterien zu einer dramatischen Erhöhung der TNF-Konzentration im Serum. Im Zusammenspiel mit anderen Zytokinen gilt TNF als zentrales Molekül bei der Entstehung des septischen Schocks (Männel, 2000). Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre belegten die Beteiligung von TNF an einer Vielzahl von Erkrankungen, wie beispielsweise bakterielle Meningitis, rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose, Transplantatabstoßungen, akutes Lungen- und Leberversagen, sowie Herzinsuffizienz und Herzinfarkt (Eigler, 1997).

Aufgrund dieser eindrucksvollen Präsenz in den unterschiedlichsten Krankheitssyndromen verwundert es nicht, dass TNF ein Zytokin ist, mit dem sich nach wie vor zahlreiche Forschergruppen weltweit intensiv beschäftigen. Dabei kristallisierte sich immer mehr die zweiseitige Rolle des TNF heraus. Neben zahlreichen pathogenen Krankheitssymptomen, vermittelt TNF auch regenerative bzw. regulatorische Prozesse, wie z. B. die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie oder die Regulation von Immunzellen (Locksley, 2001, Yamada, 1997).

Das Gen für humanes TNF liegt im Bereich des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Ware, 2005), während das Gen in der Maus auf Chromosom 17 lokalisiert ist. In der 3'-untranslatierten Region der TNF-mRNA befindet sich ein Bereich der *AU-rich elements* (ARE), in dem ein Polymorphismus zur Veränderung der Stabilität führt (Ruuls, 1999). In gentechnisch veränderten Mäusen, denen dieses Element fehlt, wurde eine ungewöhnlich stabile TNF-mRNA gefunden, was wiederum eine erhöhte TNF-Produktion in Fibroblasten zur Folge hatte. Aufgrund dessen entwickelten diese Tiere rheumatoide Arthritis und Colitis. Diese Symptome traten allerdings nicht auf, wenn die Mäuse mit p75TNFR-defizienten Mäusen gekreuzt wurden (Kontoyiannis, 1999). Dadurch wird deutlich, wie kleine Veränderungen im TNF-Molekül zu TNF-vermittelten Erkrankungen führen können und wie wichtig der p75TNFR in chronischen Entzündungen ist.

TNF wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen (Higuchi, 1990, Locksley, 2001, Männel, 1980), aber auch von zahlreichen anderen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, T- und B-Lymphozyten produziert. Zunächst wird TNF als 26 kDa schweres transmembranäres Protein sezerniert und kann durch proteolytische Spaltung der Metalloprotease TACE (*TNF-alpha converting enzyme*) als lösliche, ebenso biologisch aktive 17 kDa schwere Form (*soluble* TNF, sTNF) freigesetzt werden (MacEwan, 2002). Die Protease TACE, die diesen auch als *shedding* bezeichneten Prozess vollzieht, gehört der ADAM (*a disintegrin and metalloproteinase*)-Familie an und ist auch unter dem Namen ADAM17 bekannt (Black, 1997, Moss, 1997).

Sowohl membrangebundenes als auch lösliches TNF trimerisiert und interagiert als Homotrimer mit den beiden TNF-Rezeptoren, p55TNFR (TNFR1, CD120a, TNFRSF1A) und p75TNFR (TNFR2, CD120b, TNFRSF1B). Die Bindungsaffinität des TNF-Liganden an seine Rezeptoren hängt im Wesentlichen von dessen Form ab. Lösliches TNF weist eine kleinere Dissoziationskonstante und damit eine stärkere Bindung für den p55TNFR ( $K_d \approx 20$  pM) als für den p75TNFR ( $K_d \approx 300$  pM) auf (Grell, 1995a). Demgegenüber ist membranständiges TNF affiner für den p75TNFR (Grell, 1995b). Weitere experimentelle Daten zeigten für lösliches TNF eine deutlich unterschiedliche Kinetik der Bindung, die für den p55TNFR mit einer Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von 33 min. und für den p75TNFR mit  $t_{1/2} < 2$  min. angegeben wird (Grell, 1998b, Krippner-Heidenreich, 2002). Während humanes TNF speziesübergreifend nur an den p55TNFR, nicht aber an den p75TNFR in der Maus bindet, aktiviert Maus-TNF beide humane Rezeptoren (Lewis, 1991).

Beide Rezeptoren wurden sowohl für den Menschen als auch für die Maus erst einige Jahre nach TNF kloniert (Goodwin, 1991, Lewis, 1991, Loetscher, 1990, Smith, 1990). Ihre Sequenzhomologie beträgt 28 % und beschränkt sich auf die Extrazellulärdomäne, die vier konservierte Cystein-reiche Domänen (CRD) enthält. In der intrazellulären Sequenz unterscheiden sie sich jedoch weitgehend und weisen keine Homologie auf (MacEwan, 2002). Die cDNA des p55TNFR aus der Maus ist zu 64 % dem humanen Pendant identisch, wohingegen sich der humane und der Maus-p75TNFR zu 62 % gleichen (Lewis, 1991). Beide TNF-Rezeptoren enthalten in der extrazellulären Region die bereits erwähnte PLAD-Domäne, die eine Trimerisierung und nach Ligandbindung die Clusterbildung ermöglicht und somit die entsprechende Signalkaskade (Chan, 2000).

Darüberhinaus sind der p55TNFR und der p75TNFR Transmembranproteine und können ebenso wie ihr Ligand durch TACE proteolytisch gespalten und in die ebenfalls bioaktiven löslichen Formen überführt werden (Bazzoni, 1996). Sie sind vermehrt bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Cope, 1992), Lupus erythematoses (Aderka, 1993), Krebs (Aderka, 1991), Sepsis (Schroder, 1995) sowie HIV (Hober, 1996) vorzufinden und gelten dabei als diagnostische Marker. Diese löslichen Rezeptoren verfolgen hauptsächlich das Ziel, ihren zirkulierenden Liganden TNF zu neutralisieren (Wallach, 1991).

### **3.2. Der p55TNF-Rezeptor**

Obwohl sich die beiden TNF-Rezeptoren in ihrer extrazellulären Struktur sehr ähneln, unterscheiden sie sich doch gravierend in ihrer intrazellulären Sequenz und damit verbunden in ihren Signal-vermittelten Effekten.

Der p55TNFR enthält intrazellulär im carboxyterminalen Ende eine ca. 80 Aminosäuren umfassende Todesdomäne (*death domain*, DD), die andere Signalproteine wie TRADD rekrutiert und schließlich über die Aktivierung von Caspasen Apoptose induziert (Gaur, 2003, Tartaglia, 1993a). Über TRADD kann aber auch unter Beteiligung von TRAF2 der anti-apoptotische und proinflammatorische NF- $\kappa$ B-Signalweg eingeleitet werden (s. Abb. 1). Während die Aktivierung von NF- $\kappa$ B als frühes Ereignis nach der Rezeptorstimulierung an der Plasmamembran stattfindet, erfordert die Caspasen-vermittelte Apoptose die Internalisierung des Rezeptor-Ligand-Komplexes (Schneider-Brachert, 2004).

Die physiologische Bedeutung dieses Rezeptors wurde u. a. durch die Phänotypisierung gendefizienter Mäuse in den letzten Jahren intensiv erforscht. Die Abwesenheit des p55TNFR in Mäusen verursacht eine teilweise Störung der Entwicklung sekundärer lymphatischer Organe (Pasparakis, 1997). Außerdem sind sie zwar in der Abwehr von Pathogenen beeinträchtigt, doch gegenüber LPS-vermittelten Schock sind sie resistent (Pfeffer, 1993, Rothe, 1993). Wie wichtig die Neutralisierung des TNF über die Interaktion zwischen löslichen Rezeptor und Ligand sein kann, zeigt eine Genmutation der Extrazellulärdomäne des p55TNFR, die bei Patienten nachgewiesen wurde. Infolge dieser Mutation kann der Rezeptor nicht mehr proteolytisch gespalten werden, was

schließlich zu dem sog. *tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome* führt, eine Erkrankung, die gekennzeichnet ist durch immer wiederkehrende Fieberschübe und Entzündungen (Aksentijevich, 2001).

### 3.3. Der p75TNF-Rezeptor

Während der p55TNFR auf fast allen Zellen des Organismus konstitutiv exprimiert ist, wird der p75TNFR durch proinflammatorische Zytokine, LPS aber auch durch Noxen wie Hypoxie ausschließlich auf Zellen des Immunsystems induziert (Seitz, 1998).

Der p75TNFR besitzt intrazellulär keine Todesdomäne, sondern rekrutiert Adapterproteine wie TRAF2. TRAF2 wiederum besitzt die Möglichkeit über nachgeschaltete Moleküle, die Mitglieder der MAPK- (*mitogen-activated protein kinase*) Familie sind, den anti-apoptotischen Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B zu aktivieren (MacEwan, 2002). Unter bestimmten Bedingungen können jedoch mittels Anlagerung von TRAF2 an die DD-haltige Proteinkinase RIP, die wiederum mit FADD interagiert, Caspasen aktiviert und somit Apoptose induziert werden (Pimentel-Muinos, 1999).

Die Funktion des p75TNFR liegt hauptsächlich in der Thymozytenproliferation (Grell, 1998a, Tartaglia, 1993b), der Differenzierung und Aktivierung von Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Mason, 1995) sowie in der Costimulation der T-Zellaktivierung (Aspalter, 2003, Kim, 2004). In der letzten Zeit gewinnt der p75TNFR außerdem immer mehr an Bedeutung im Zusammenhang mit regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, auf denen er im Vergleich zu den CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt exprimiert wird. Eine Hochregulierung des p75TNFR ist zudem bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Holtmann, 2002, Mizoguchi, 2002), sowie nach Schlaganfall und Herzinfarkt (Semenza, 1998) zu beobachten. In p75TNFR-defizienten Mäusen konnte eine verringerte Sensitivität der T-Lymphozyten gegenüber TNF-Toxizität nachgewiesen werden, doch zeigten sie ansonsten keinen auffälligen Phänotyp (Erickson, 1994).

Zusätzlich zu der von Seitz *et al.* entdeckten und in dieser Arbeit charakterisierten Spleissvariante, der icp75TNFR (*intracellular p75TNF-Rezeptor*), wurde erst kürzlich eine weitere Spleissform des p75TNFR kloniert, die für einen löslichen Rezeptor kodiert (Lainez, 2004). Durch Herausspleissen der Exone 7 und 8 verliert sie ihre Transmembrandomäne und die daraus resultierende Verschiebung des Leserasters führt

zum vorzeitigen Abbruch der Translation im Bereich der Intrazellulärdomäne. Die extrazelluläre Sequenz bleibt unverändert. Diese Isoform wird sezerniert und ist mit einem Anteil von 45 % an der Gesamtmenge an detektierbaren löslichen p75TNFR im Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis beteiligt.

## **4. TNF als Ziel für Therapeutika**

### **4.1. TNF-Therapie**

Als Ende des 19. Jahrhunderts der Arzt W. B. Coley seinen Bakterienextrakt, damals noch unwissend hinsichtlich dessen Wirkkomponente, zur Behandlung von Tumoren in Patienten einsetzte, war dies der Beginn der TNF-Therapie zur Behandlung von Krebs (Coley, 1893, Coley, 1896).

Nachdem erkannt wurde, dass die nekrotische Wirkung des bereits erwähnten „Coley`s toxin“ durch die Freisetzung von TNF verursacht wurde, begann man gut 80 Jahre später in klinischen Experimenten TNF bei der Bekämpfung von Tumoren einzusetzen. Aufgrund des Pleiotropismus und des damit zusammenhängenden komplexen Wirkspektrums war und ist bis heute die systemische Anwendung von TNF mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden. Zudem kommt hinzu, dass die für die Tumornekrose erforderliche Dosis wesentlich größer ist als die maximal tolerierbare Dosis beim Menschen (Vollmar, 2005). Deshalb wurde eine lokale Therapie etabliert, in welcher der Wirkstoff Tasonermin (Beromun<sup>®</sup>) seine Anwendung findet. Es handelt sich dabei um rekombinantes TNF, das aus einem stabil transformierten *E. coli*-Stamm gewonnen wird, und ebenso wie sein natürlich vorkommendes Pendant als Homotrimer vorliegt. Zugelassen ist dieses Medikament nur für die Behandlung von nicht resezierbaren Weichteilsarkomen in Kombination mit dem Zytostatikum Melphalan (Alkeran<sup>®</sup>). Dabei wird es über eine isolierte Extremitäten-Perfusion (*isolated limb perfusion*, ILP) unter milder Hyperthermie erfolgreich eingesetzt (Eggermont, 1997, Lejeune, 2001). Diese Therapie ist allerdings sehr aufwendig, so dass sie nur von chirurgischen Teams mit Erfahrung in Spezialkliniken durchgeführt werden kann. Die in der ILP verwendete hohe, lokale TNF-Dosis induziert hauptsächlich in den Endothelzellen der Tumorgefäße Apoptose. Durch diese Zerstörung des

Tumorgefäßsystems und der erhöhten Permeabilität des Tumorgewebes wird eine bessere Wirksamkeit für das coapplizierte Zytostatikum erreicht.

Als weitere therapeutische Möglichkeiten, die verbreitet im Kampf gegen Krebs zum Einsatz kommen, haben sich darüberhinaus andere Wirkstoffe etabliert, wie beispielsweise Antikörper gegen EGFR (*epidermal growth factor receptor*) (Cetuximab, Erbitux<sup>®</sup>) oder Her2/Neu (Trastuzumab, Herceptin<sup>®</sup>), sowie gegen CD20 (Rituximab, MabThera<sup>®</sup>), die bei der Behandlung unterschiedlicher Tumore ihre Anwendung finden.

## 4.2. Anti-TNF-Therapie

Es ist inzwischen hinreichend bekannt, dass TNF bei vielen sowohl chronischen als auch akuten entzündlichen Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt. In Placebo-kontrollierten Studien wurde mehrfach die Wirksamkeit von TNF-Antagonisten bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis (Moreland, 1997, Weinblatt, 2003), Psoriasis-Arthropathie (Mease, 2000), der juvenilen rheumatoiden Arthritis (Lovell, 2000) sowie bei Morbus Crohn belegt (Present, 1999). Es handelt sich dabei jeweils um Krankheiten, in denen TNF eine zentrale Stellung in der Pathogenese einnimmt. Daher war es überraschend, dass die Anti-TNF-Therapie in Erkrankungen wie Sepsis und Multiple Sklerose (MS), dessen Symptome ebenfalls sehr stark durch erhöhte TNF-Serumspiegel verursacht werden, keinen Erfolg brachte. Ganz im Gegenteil führte die Behandlung mit TNF-Inhibitoren bei einigen Patienten zur Verschlechterung des Krankheitszustandes (Butty, 2003, Robinson, 2001). Im Falle von MS wurde sogar davon berichtet, dass die Demyelinisation im Bereich des zentralen Nervensystems wohl erst nach Behandlung mit dem TNF-Inhibitor Lenercept, ein Dimer aus humanem p55TNFR und humanem IgG-Fc-Teil, auftrat und somit als Nebenwirkung anzusehen war (Schwid, 1999). Die Studie mit diesem Medikament wurde daraufhin vorzeitig eingestellt.

Nach zahlreichen klinischen Erprobungen der Anti-TNF-Therapeutika an Patienten, kann man davon ausgehen, dass die von den Arzneimittelbehörden zugelassenen Medikamente im Allgemeinen gut vertragen werden (Roberts, 2004). Allerdings wurde auch von ernst zu nehmenden Nebenwirkungen berichtet, wie z. B. das Auftreten von opportunistischen Infektionen mit Pilzen wie *Histoplasma capsulatum*, Hefepilzen wie *Cryptococcus neoformans* oder *Candida*-Arten, mit Schimmelpilzen wie *Aspergillus fumigatus* sowie

mit Bakterien wie beispielsweise *Listeria monocytogenes* (Ellerin, 2003). Ein besonderes Augenmerk gilt der Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*, bei dessen Abwehr TNF ein wichtiger Mediator für den Organismus ist. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass TNF- bzw. p55TNFR-defiziente Mäuse eine kürzere Überlebensdauer nach Infektionen mit dem Mycobacterium aufwiesen als Wildtypmäuse (Ehlers, 1999, Kaneko, 1999). Es verwundert daher nicht, dass bei einigen Patienten, die mit einem TNF-Inhibitor behandelt wurden, innerhalb der ersten Monate nach Therapiebeginn eine Tuberkulose-Infektion auftrat. Im Dezember 2002 wurde von 350 000 behandelten Patienten 210 Fälle darüber berichtet (Kavanaugh, 2003). Inzwischen werden daher schon vor der Behandlung die Patienten auf eine aktive oder latente (inaktive) Tuberkulose hin überprüft. Im Falle einer aktiven Tuberkulose darf eine derartige Therapie nicht begonnen werden. Wird eine latente Tuberkulose diagnostiziert, so muss eine prophylaktische Anti-Tuberkulose-Therapie eingeleitet werden.

Nichtsdestotrotz stellt die Anti-TNF-Therapie für viele Patienten ein Benefit dar. Es gibt inzwischen mehrere Antikörper gegen TNF, die als Arzneimittel zugelassen und erfolgreich eingesetzt werden. Im Folgenden sollen diese kurz vorgestellt werden.

**Infliximab (Remicade<sup>®</sup>)** ist seit 1999 zugelassen und wird seitdem erfolgreich in der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Weitere Indikationsgebiete sind Morbus Crohn und ankylosierende Spondylitis. Es handelt sich dabei um einen chimären monoklonalen Antikörper gegen TNF, der einen konstanten Teil eines humanen IgG1,  $\kappa$  enthält. Da Infliximab zu 25 % aus Maus-Anteil besteht, wurde in Patienten die Bildung von human-anti-chimär Antikörpern (HACA) beobachtet, aufgrund dessen zum einen Infusions-Reaktionen, zum anderen eine Verkürzung der Halbwertszeit festgestellt wurde. Durch die Coadministration von Immunsuppressiva wie Methotrexat oder Azathioprin kann jedoch die Bildung von HACA reduziert werden (Elliott, 1994, Robinson, 2001, Sandborn, 2005). Als Folge der TNF-Neutralisierung sind IL-6- und IL-1-Konzentrationen im Serum reduziert, womit die Regulierung anderer proinflammatorischer Zytokine über TNF gezeigt wird. Zudem wird durch Behandlung die Expression von E-Selectin, VCAM-1, ICAM-1, GM-CSF sowie Chemokine wie z. B. IL-8 herabgesetzt und damit die Infiltration von Leukozyten und Granulozyten in das Gelenk vermindert (Taylor, 2001).

**Adalimumab (Humira®)** ist ein vollständiger, rekombinanter humaner TNF-Antikörper mit einem ebenfalls konstanten Teil eines humanen IgG1,  $\kappa$ . Die Herstellung erfolgt über die *Phage-Display*-Technologie. Sein Wirkprofil entspricht dem des Infliximabs und ist derzeit zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis zugelassen.

**Etanercept (Enbrel®)** besteht aus der Extrazellulärdomäne des humanen p75TNFR und dem Fc-Teil eines humanen IgG1-Antikörpers. Durch die Fusion an den Fc-Teil wird dessen Halbwertszeit erheblich verlängert und aufgrund der Dimerisierung eine gesteigerte Affinität für TNF erzielt. Neben TNF kann das Fusionsprotein auch lösliches  $LT\alpha_3$  binden, das allerdings keinen Einfluss auf das Wirkspektrum hat. Zugelassen ist Etanercept derzeit für die rheumatoide Arthritis und bei Plaque Psoriasis.

Darüberhinaus befinden sich derzeit noch weitere Proteine in der klinischen Entwicklung, die ebenfalls die Wirkung von TNF hemmen sollen. Eines davon ist Certolizumab pegol (CDP-870), ein aus Stabilitätsgründen pegyliertes Fab-Fragment eines humanisierten, monoklonalen Anti-TNF-Antikörpers. Der Wirkstoff befindet sich in klinischen Studien für die Indikationen Morbus Crohn und rheumatoide Arthritis. Ebenfalls ein durch Pegylierung stabilisiertes Protein ist Pegsunercept. Es handelt sich dabei um die lösliche Form des p55TNFR-Trimers, die zur Verlängerung der Halbwertszeit an Polyethylenglykol gebunden ist.

Auch die zukünftigen Arzneistoffe werden wohl aufgrund ihrer Proteinstruktur eine parenterale Applikation erfordern, was für einige Patienten nicht immer angenehm ist und die *compliance* nicht gerade verbessert. Dennoch stehen mit diesen Proteinen potente Medikamente zur Verfügung, die dann einen Erfolg versprechen, wenn konventionelle Therapien versagen.

## B Material und Methoden

### 1. Material

#### 1.1. Chemikalien und Reagenzien

|  |                               |
|--|-------------------------------|
| 2-Mercaptoethanol  | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| 2'-Azino-di (3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure(6))<br>(ABTS)       | Roche Diagnostics, Mannheim   |
| 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| <sup>3</sup> H-Thymidin  | Hartmann Analytics, Krefeld   |
| ABTS Substrat Puffer   | Roche Diagnostics, Mannheim   |
| Actinomycin D  | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| Agarose, electrophoresis grade                                   | GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe   |
| Ampicillin   | Roche Diagnostics, Mannheim   |
| [ $\alpha^{32}$ P] dCTPs, 10 mCi/ml, 3000 Ci/mmol                | Amersham, Uppsala, S          |
| Bovines Serum Albumin (BSA)                                      | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| CFSE   | Invitrogen, Karlsruhe         |
| Chloroform   | Merck, Darmstadt              |
| Concanavalin A   | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade                     | Roche Diagnostics, Mannheim   |
| Dextransulfat (DSS, MG: 36000-50000)                             | ICN Biochemicals, Ohio, USA   |
| D-Galactosamin   | Roth, Karlsruhe               |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)  | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| DMEM-Fertigmedium  | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| Enbrel <sup>®</sup> 50 mg  | Wyeth Pharma GmbH,<br>Münster |
| Ethidiumbromid   | Sigma Aldrich, Deisenhofen    |
| Ethanol  | Merck, Darmstadt              |
| Fötale Kälberserum (FCS)   | PAN Biotech, Aidenbach        |
| Gentamycin   | ICN, Meckenheim               |

|                               |                             |
|-------------------------------|-----------------------------|
| HEPES                         | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| Human-TNF, rekombinant        | BASF, Ludwigshafen          |
| Ketaminhydrochlorid 5 %       | WDTeG Garbsen               |
| LPS                           | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| Maus-TNF, rekombinant         | Matthias Grell, Stuttgart   |
| Nuclease free water           | Promega, Madison, USA       |
| Oligo-dT Primer               | Promega, Madison, USA       |
| PCR-Puffer, 10x conc.         | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Phenol                        | Roth, Karlsruhe             |
| Propidiumiodid                | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| RNaseZAP <sup>®</sup>         | Ambion, Austin, USA         |
| RPMI 1640-Pulvermedium        | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| SIGMA104                      | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| Sucrose                       | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| Trypanblau                    | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| Trypsin-EDTA-Lösung           | Tecnomara, Fernwald         |
| Tween 20                      | Fluka, Buchs, CH            |
| ULTRAhyb Hybridisation Buffer | Ambion, Austin, USA         |
| Xylazinhydrochlorid 2 %       | WDTeG Garbsen               |

Alle nicht aufgeführten Lösungsmittel (p.A.) wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen, die nicht aufgeführten Feststoffe (p.A.) von Sigma Aldrich (Deisenhofen).

## 1.2. Verbrauchsmaterial und Geräte

|                                  |  |
|----------------------------------|--|
| ARIA Durchflusszytometer         | Becton Dickinson, Heidelberg           |
| Begasungsbrutschrank – Cell Safe | Integra Biosciences, Baar, CH          |
| BioMax MR Filme                  | Kodak, Cedex, F                        |
| CCD-Kamera, gekühlt              | Princeton Instruments,<br>Trenton, USA |
| ELISA Reader                     | MWG Biotech, Ebersberg                 |
| Eppendorfcups (1,5 ml / 2ml)     | Eppendorf, Hamburg                     |

|  |                                  |
|--|----------------------------------|
| Eppendorf Thermoblock                      | Eppendorf, Hamburg               |
| Eppendorf Plastik-Pistille                 | Eppendorf, Hamburg               |
| FACS Röhrchen                              | Labor Schubert, Schwandorf       |
| FACScan Flow Cytometer                     | Becton-Dickinson, Heidelberg     |
| Gelelektrophorese-Apparaturen              | BioRad, München                  |
| Gewebekulturschalen                        | Becton Dickinson, Heidelberg     |
| Hypercassette                              | Amersham, Little Chalfont,<br>GB |
| Hyperfilm ECL                              | Amersham, Uppsala, S             |
| Inkubatoren                                | Heraeus, Hanau                   |
| Kanülen                                    | Becton Dickinson, Heidelberg     |
| Kryo-Röhrchen                              | Nunc, Naperville, USA            |
| Laminair Flow HB 2448– Sterilbank          | Heraeus, Hanau                   |
| MACS Separation Columns 25 LS              | Miltenyi Biotec, Auburn, USA     |
| Microplate Scintillation counter Topcount  | Packard Canberra, Dreieich       |
| Mikroskop (Zellkultur)                     | Olympus, Hamburg                 |
| Mikrotiterplatten                          | Falcon, Heidelberg               |
| Neubauer Zählkammer                        | Brand, Gießen                    |
| Nitrocellulosemembran                      | Osmonics, Minnetonka, USA        |
| Nylon Transfer Membran                     | Pall GmbH, Dreieich              |
| PCR-Thermocycler                           | Perkin Elmer, Shelton, USA       |
| Pipetten, steril                           | Sarstedt, Nümbrecht              |
| Polystyrolröhrchen                         | Falcon, Heidelberg               |
| Spannungsgerät:                            |                                  |
| Biorad 200/2,0 Constant Voltage            | BioRad, München                  |
| Spritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)        | Becton Dickinson, Heidelberg     |
| UV-Schirm (254 nm und 366 nm)              | Bachhofer, Reutlingen            |
| UV Stratalinker 2400                       | Stratagene, Cedar Creek, USA     |
| Waagen: Sartorius R16OP                    | Sartorius, Göttingen             |
| Sartorius L2200S                           | Sartorius, Göttingen             |
| Whatman Filterpapier                       | Laborcenter, Nürnberg            |
| Zellkulturflaschen (70, 250, 750 ml)       | Falcon Heidelberg                |
| Zentrifugen: Beckmann J2-21 M/E Zentrifuge | Beckmann, München                |

|                                |                    |
|--------------------------------|--------------------|
| Beckmann L-70 Ultrazentrifuge  | Beckmann, München  |
| Tischzentrifuge                | Eppendorf, Hamburg |
| Zentrifugenröhrchen (15, 50ml) | Falcon, Heidelberg |
| Zellsiebe (Cellstrainer)       | Falcon, Heidelberg |

### 1.3. Kits

|   |                              |
|---|------------------------------|
| ELISA: mIFN $\gamma$                    | R&D Systems, Wiesbaden       |
| mIL-2                                   | R&D Systems, Wiesbaden       |
| löslicher mTNFR2                        | R&D Systems, Wiesbaden       |
| löslicher hTNFR2                        | R&D Systems, Wiesbaden       |
| Mycoplasma detection kit                | Roche Diagnostics, Mannheim  |
| PE anti-mouse/rat Foxp3 Staining Set    | eBioscience, San Diego, USA  |
| PCR Purification Kit                    | Qiagen, Hilden               |
| Prime-It II Random Primer Labelling Kit | Stratagene, Cedar Creek, USA |
| QIAshredder                             | Qiagen, Hilden               |
| Reverse Transcription System            | Promega, Madison, USA        |
| RNeasy Mini Kit                         | Qiagen, Hilden               |

### 1.4. Molekulargewichtsstandard

|                        |                             |
|------------------------|-----------------------------|
| DNA-Längenstandard XIV | Roche Diagnostics, Mannheim |
|------------------------|-----------------------------|

### 1.5. Antikörper

|                              |                           |
|------------------------------|---------------------------|
| anti-mouse CD3-FITC (17A2)   | BD Pharmingen, Heidelberg |
| anti-mouse CD4-FITC (L3T4)   | BD Pharmingen, Heidelberg |
| anti-mouse CD4-PE (L3T4)     | BD Pharmingen, Heidelberg |
| anti-mouse CD8a-APC (Ly-2)   | BD Pharmingen, Heidelberg |
| anti-mouse CD8a-PerCP (Ly-2) | BD Pharmingen, Heidelberg |

|  |                              |
|--|------------------------------|
| anti-mouse CD25-APC (PC61)   | BD Pharmingen, Heidelberg    |
| anti-mouse CD25-PE (PC61)  | BD Pharmingen, Heidelberg    |
| anti-mouse/rat Foxp3-PE (FJK-16s)                                      | eBioscience, San Diego, USA  |
| anti-PE Micro Beads  | Miltenyi Biotec, Auburn, USA |
| CD4 Micro Beads, mouse (L3T4)  | Miltenyi Biotec, Auburn, USA |
| CD8a Micro Beads, mouse (Ly-2)   | Miltenyi Biotec, Auburn, USA |
| CD90 Micro Beads, mouse (Thy1.2)                                       | Miltenyi Biotec, Auburn, USA |
| Hamster (armenischer) anti-mouse TNF Receptor Type II,<br>biotinyliert | BD Pharmingen, Heidelberg    |
| rat anti-mouse CD3 $\epsilon$ (2C11)                                   | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| rat anti-mouse CD28 (35.71)  | Becton-Dickinson, Heidelberg |
| rat anti-mouse Fc $\gamma$ -Rezeptor II/III (2.4G2)                    | eigene Herstellung           |
| rat IgG2a, $\kappa$ -PE  | BD Pharmingen, Heidelberg    |
| Streptavidin-APC   | BD Pharmingen, Heidelberg    |

## 1.6. Enzyme

|                    |                             |
|--------------------|-----------------------------|
| Restriktionsenzyme | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Taq-DNA-Polymerase | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Proteinase K       | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |
| Pronase E          | Sigma Aldrich, Deisenhofen  |

## 1.7. Oligonukleotide

Die Synthese der verwendeten Oligonukleotide erfolgte über die Firma Metabion (Martinsried). Die Primer wurden in der PCR in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt, so dass ihre Endkonzentration schließlich 10 pmol/ml betrug.

| Oligonukleotid   | Sequenz                        |
|--|--------------------------------|
| <b>Genotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse</b> |                                |
| UBI 3' Not in  | 5' GTCCAACGTTCCGTTTCGCGCGG 3'  |
| hicp75 3' out  | 5' GCTCCTCCCAAGCCAGCTCCAC 3'   |
| <b>Genotypisierung der p75TNFR defizienten Mäuse</b>   |                                |
| 2A p75 k.o.  | 5' CCTCTCATGGTCTCCCGGATT 3'    |
| Neo p75 k.o.   | 5' GCGCATCGCCTTCTATCGCC 3'     |
| <b>Nachweis des hicp75TNFR</b>                         |                                |
| 5' icp-tg forw.  | 5' AAACCCCATCTCTATAAAGAAATC 3' |
| 3' icp-tg rev.   | 5' CGGGCGGCACTTGCGCAG 3'       |
| 5' $\beta$ -Aktin                                      | 5' TGACGGGGTCACCCACACTGT 3'    |
| 3' $\beta$ -Aktin                                      | 5' CTAGAAGCATTGCGGTGGAC 3'     |

## 1.8. Puffer und Lösungen

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| ACK-Puffer (6x)                | 0,155 M NH <sub>4</sub> Cl<br>0,1 M KHCO <sub>3</sub><br>0,1 mM Na-EDTA x 2 H <sub>2</sub> O |
| Blockierlösung für ELISA       | 1 % BSA in PBS   |
| Einfriermedium für Zellen (2x) | 20 % DMSO<br>80 % FCS  |
| Ethidiumbromid-Stammlösung     | 10 mg/ml Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O  |

|                                  |   |
|----------------------------------|---|
| FACS-Waschpuffer                 | 10 % FCS in PBS   |
| Lyse-Puffer (DNA-Isolierung)     | 5 ml 1M Tris HCl (pH 8,5)<br>25 ml 10 mM EDTA (pH 8,0)<br>10 ml 1 M NaCl<br>5 ml SDS 10%<br>5 ml Wasser                           |
| MACS-Puffer (entgast)            | 500 ml PBS<br>5 ml FCS<br>2 ml 0,5 M EDTA   |
| PBS (pH 7,3)                     | 137 mM NaCl<br>6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O<br>1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>2,7 mM KCl |
| PBS-T                            | 500 µl Tween 20 in 1 Liter PBS  |
| Phosphat-Puffer (0,05 M, pH 7,5) | 6,8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>11,4 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Wasser ad 1000 l                               |
| Phosphat-Puffer (0,1 M, pH 7,4)  | 13,6 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>22,8 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>Wasser ad 1000 l                              |
| Pronase E                        | 10 ml Stocklösung (10 mg/ml)<br>100 µl 1M Tris HCl (pH 8,0)<br>20 µl 5 M NaCl   |
| Proteinase K                     | 10 µl Stocklösung (10 mg/ml)<br>500 µl Lysepuffer   |

|   |  |
|---|--|
| Southern-Blot<br>Depurinierungs-Puffer            | 0,2 N HCl  |
| Southern-Blot<br>Denaturierungs-Puffer            | 1,5 M NaCl<br>0,5 M NaOH                                       |
| Southern-Blot<br>Neutralisierungs-Puffer (pH 7,0) | 0,5 M Tris base<br>1,5 M NaCl                                  |
| Southern-Blot<br>Waschpuffer 1                    | 2x SSC<br>0,1 % SDS  |
| Southern-Blot<br>Waschpuffer 2                    | 0,1x SSC<br>0,1 % SDS  |
| SSC (20x; pH 7,0)                                 | 875 g NaCl<br>440 g Na <sub>3</sub> Citrat<br>Wasser ad 5000 g |
| TAE-Puffer  | 40 mM Tris-acetat<br>1 mM EDTA                                 |
| Trypanblau-Lösung                                 | 0,15 % Trypanblau (w/v)<br>150 mM NaCl                         |

## 1.9. Zelllinien

| Zelllinie |  | Kulturmedium   | Art des Wachstums |
|-----------|--|----------------|-------------------|
| HEK 293T  | Humane immortalisierte embryonale Nierenzellen | DMEM; 10 % FCS | adhärent          |
| L929      | Maus-Fibrosarkomzelllinie                      | RPMI; 10 % FCS | adhärent          |

## 1.10. Tiere

|                                   |                              |
|-----------------------------------|------------------------------|
| C57BL/6 Wildtyp                   | Charles River, Sulzfeld      |
| C57BL/6 x FvB Wildtyp             | Eigenzucht                   |
| C57BL/6 p75TNFR -/-               | (Erickson, 1994), Eigenzucht |
| C57BL/6 x FvB hicp75TNFR-transgen | Eigenzucht                   |

## **2. Methoden**

### **2.1. Arbeiten mit RNA**

Alle Arbeiten mit RNA erfolgten mit gestopften Pipettenspitzen und mit Latexhandschuhen, um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden. Zusätzlich wurden dafür die Arbeitsflächen mit RNaseZAP<sup>®</sup> vor der Präparation gereinigt. Wasser wurde mit 0,1 % Diethylcarbonat versetzt, kräftig geschüttelt, über Nacht stehen gelassen und am nächsten Tag autoklaviert. Die RNA wurde während der einzelnen Arbeitsschritte auf Eis gelagert und bei -80° C in RNase freiem Wasser aufbewahrt.

#### **2.1.1. Präparation von Gesamt-RNA**

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits isoliert, wobei als Ausgangsmaterial zur RNA-Gewinnung in allen Fällen Gewebe diente. Dabei wurde das Material im Eppendorf-Cup mit einem Eppendorf-Pistill mechanisch zerkleinert bevor es über QIAshredder-Säulchen weiter homogenisiert wurde. Die nachfolgende RNA-Isolierung aus der erhaltenen Suspension wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die präparierte RNA in RNase freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm am Photometer bestimmt.

#### **2.1.2. Reverse Transkription**

Um DNA-Kopien eines RNA-Moleküls (= complementary DNA; cDNA) zu synthetisieren, wurde in der reversen Transkription eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (reverse Transkriptase; RTase) verwendet.

Die RNA wurde in einer Konzentration von 1 µg pro Ansatz eingesetzt. Nach entsprechender Verdünnung zu einem Endvolumen von 9,9 µl wurde sie zu dem folgenden Reaktionsansatz, dessen Zusammensetzung pro Probe gilt, hinzugefügt.

---

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| MgCl <sub>2</sub>          | 4 µl   |
| 10x Puffer                 | 2 µl   |
| dNTPs                      | 2 µl   |
| RNase Inhibitor            | 0,5 µl |
| Reverse Transkriptase      | 0,6 µl |
| Oligo (dT)-Primer          | 1 µl   |
| RNA in RNase freiem Wasser | 9,9 µl |

Dieser Ansatz wurde 15 min. bei 42° C und 5 min. bei 99° C inkubiert. Zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente durch PCR wurden von der erhaltenen cDNA-Lösung 5 µl eingesetzt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

## 2.2. Arbeiten mit DNA

### 2.2.1. Isolierung genomischer DNA

Die aliquotierte Pronase E-Lösung wurde für eine Stunde bei 37° C voraktiviert. Der Verdau der 0,5 bis 1 cm langen Schwanzbiopsien erfolgte unter Zusatz von 500 µl Lyse-Puffer, 10 µl Proteinase K und 25 µl voraktivierter Pronase E bei 56° C über Nacht in Eppendorf-Cups. Um die Festbestandteile zu entfernen, wurden die Cups zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Aus diesem Überstand wurde durch zweimalige Zugabe von Phenol im Verhältnis 1:1 die DNA isoliert. Es folgten jeweils zwei weitere Reinigungsschritte mit Phenol/Chloroform und Chloroform. Die DNA wurde schließlich aus der Lösung mit Ethanol (100%) und Natriumacetat (3M, pH 5,2) bei -20° C für mindestens 30 min. gefällt. Nach Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen und an der Luft getrocknet bis es einen durchsichtigen Anschein nahm. Je nach Pelletgröße wurde die DNA in 30 bis 50 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst bevor deren Konzentration durch Messung der Absorption bei 260 nm am Photometer bestimmt wurde. Die DNA-Lösung wurde bei 4° C gelagert.

Zur Amplifikation der spezifischen DNA-Fragmente durch PCR wurde 1 µl der DNA-Lösung in einer Konzentration von 0,2 µg/µl eingesetzt.

### 2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter Verwendung spezifischer Primer wurden durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) spezifische DNA-Fragmente amplifiziert. Die Reaktion wurde jeweils in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt.

Zur Amplifizierung der aus Schwanzbiopsien isolierten genomischen DNA wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

|                         |                  |
|-------------------------|------------------|
| DNA                     | 1 $\mu\text{l}$  |
| 10x Puffer              | 5 $\mu\text{l}$  |
| 5' Primer (1:10)        | 5 $\mu\text{l}$  |
| 3' Primer (1:10)        | 5 $\mu\text{l}$  |
| Desoxynucleotidmischung | 1 $\mu\text{l}$  |
| Taq-Polymerase          | 1 $\mu\text{l}$  |
| Nuklease-freies Wasser  | 32 $\mu\text{l}$ |

Nach einem Denaturierungsschritt von 5 min. bei 94° C wurden 45 Zyklen des nachfolgenden Reaktions-Schemas durchlaufen:

|                   |               |
|-------------------|---------------|
| DNA-Denaturierung | 94° C, 1 min. |
| Primerannealing   | 60° C, 1 min. |
| Elongation        | 72° C, 1 min. |

Für die Amplifizierung der cDNA-Fragmente wurde folgender Ansatz verwendet:

|                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| cDNA                    | 5 $\mu\text{l}$    |
| 10x Puffer              | 5 $\mu\text{l}$    |
| 5' Primer (1:10)        | 0,5 $\mu\text{l}$  |
| 3' Primer (1:10)        | 0,5 $\mu\text{l}$  |
| Desoxynucleotidmischung | 1 $\mu\text{l}$    |
| Taq-Polymerase          | 1,2 $\mu\text{l}$  |
| Nuklease-freies Wasser  | 36,8 $\mu\text{l}$ |

Nachdem ein Denaturierungsschritt von 5 min. bei 94° C eingehalten wurde, wurden 35 Zyklen des folgenden Reaktions-Schemas angewandt:

|                   |                |
|-------------------|----------------|
| DNA-Denaturierung | 94° C, 30 sek. |
| Primerannealing   | 70° C, 30 sek. |
| Elongation        | 72° C, 45 sek. |

In beiden Fällen wurden nach einer abschließenden Elongation für weitere 7 min. die amplifzierten PCR-Fragmente auf einem Agarosegel analysiert.

### **2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese**

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen erfolgte mit Hilfe von Agarosegelen, deren Konzentration 1-1,5 % (w/v) betrug. Die Agarose wurde dafür in 1x TAE-Puffer aufgekocht und in die Gelapparatur gegossen. Um eine vollständige Auspolymerisierung der Agarose zu gewährleisten, wurden die Gele für mindestens 30 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach dem Abkühlen wurde das Gel mit 1x TAE-Puffer in der Laufkammer überschichtet. Die DNA-Proben wurden mit Laufpuffer im Verhältnis 1:5 vermischt, bevor sie in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert wurden. Zur Bestimmung der Fragment-Länge wurde zusätzlich ein entsprechender DNA-Standard (DNA-Molekulargewichtsstandard XIV) aufgetragen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei einer elektrischen Spannung von 5-10 V/cm. Zur Analyse der DNA-Fragmente wurde das Gel nach der Elektrophorese in einem Ethidiumbromidbad für ca. 15 min. inkubiert und anschließend auf einem UV-Schirm bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm betrachtet und photographiert.

### **2.2.4. Southern Blot**

Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel mit den aufgetrennten DNA-Fragmenten für 20 min. in Depurinierungspuffer, 20 min. in Denaturierungspuffer und anschließend zweimal für jeweils 10 bis 20 min. in Neutralisierungspuffer bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gel auf drei Lagen mit 20x SSC getränktem Whatmanpapier gelegt, die auf einer Glasplatte lagen und am oberen und unteren Rand in ein 20x SSC-Puffer-Reservoir eintauchten. Mit einer Nylon-Transfermembran in passender Größe wurde das Gel abgedeckt und die Ränder mit Klarsichtfolie versehen, um zu verhindern, dass SSC-Puffer aus dem Reservoir an der Membran vorbei gesaugt

werden kann. Auf die Membran kamen wiederum drei weitere Lagen an 20x SSC getränktem Whatmanpapier und darauf ein hoher Stapel Zellstoff-Tücher, die dazu dienten, durch ihre Saugkraft den Puffer-Strom aus dem Reservoir über das Gel und die Membran zu leiten. Die im Gel erhaltenen DNA-Fragmente werden dabei auf die Membran transferiert und reversibel gebunden. Um einen effektiven Pufferfluss zu gewährleisten, wurde der komplette Aufbau mit einem geeigneten Gewicht beschwert und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Geltaschen mit Bleistift auf der Membran eingezeichnet und die DNA auf der Nylon-Transfermembran durch UV-Licht (*UV-crosslinking*) immobilisiert und fixiert.

Die Nylonmembran wurde in der Hybridisierungsflasche mit der DNA-Seite nach innen für 1 h bei 45° C in 6 bis 10 ml Hybridisierungslösung (ULTRAhyb *Hybridisation Buffer*) im Hybridisierungsöfen prähybridisiert, bevor die radioaktiv markierte Sonde (s. Kap. 2.2.5.) dazu pipettiert wurde. Es folgte eine Hybridisierung bei 45° C über Nacht. Am darauf folgenden Tag wurden die Hybridisierungslösung und Sonde entfernt und die Membran in der Flasche zweimal mit Southern-Blot Waschpuffer 1 gespült. Es folgten ein weiterer Waschschrift mit 200 ml Waschpuffer 1 für 20 min. bei 45° C, sowie ein weiterer mit Waschpuffer 2 unter den gleichen Bedingungen. Für den letzten Waschschrift in 200 ml Waschpuffer 2 wurde die Temperatur im Hybridisierungsöfen auf 65° C erhöht. Die spezifisch gebundene Sonde wurde schließlich autoradiographisch detektiert, indem ein Röntgenfilm (Kodak BioMax) auf die in Klarsichtfolie gepackte Membran gelegt und bis zur Entwicklung in der Filmkassette bei – 80° C gelagert wurde. Um nachher Banden auf dem Autoradiogramm einer bestimmten Fragmentlänge zuordnen zu können, wurde dem Film in der Kassette ein Längenstandard beigelegt.

### **2.2.5. Radioaktive Markierung von DNA-Sonden**

Die radioaktive Markierung einer DNA-Sonde mit <sup>32</sup>P erfolgte unter Verwendung des Prime It<sup>®</sup> II Random Primer Labelling Kits.

Folgender Reaktionsansatz wurde dafür pipettiert:

|                          |               |                 |
|--------------------------|---------------|-----------------|
| DNA                      | 25 ng         |                 |
| Random Primer            | 10 $\mu$ l    |                 |
| Nuklease freies Wasser   | ad 34 $\mu$ l | → 5 min., 95° C |
| dCTP Puffer              | 10 $\mu$ l    |                 |
| [ $\alpha^{32}$ P] dCTPs | 5 $\mu$ l     |                 |
| Exo(-) Klenow Enzym      | 1 $\mu$ l     | → 1 h, 37° C    |

Die nicht eingebauten Nukleotide wurde abschließend durch Zentrifugation der radioaktiv markierten DNA über Micro Spin S-200 HR Säulen entfernt. Die gereinigte DNA-Sonde wurde für 5 min. bei 95° C denaturiert, bevor sie für die Hybridisierung verwendet wurde.

## 2.3. Zellbiologische Methoden

### 2.3.1. Zellkulturbedingungen

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter Verwendung steriler Reagenzien, Pipetten und Gefäße in einer Sterilbank (Laminair Flow) durchgeführt. Die verwendeten Zelllinien bzw. Primärkulturen wurden in Zellkulturflaschen mit in dem in Kapitel 1.9. angegebenen Medium bei 37° C,  $^3$ H-Thymidin und 95 % Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Cell Safe) kultiviert. Die Zellkulturen wurden je nach Linie dreimal wöchentlich im Verhältnis 1:5 oder zweimal wöchentlich im Verhältnis 1:10 geteilt. Um einen Medienwechsel oder Waschschrift vor zu nehmen, wurden die Zellen in sterile Falcon-Röhrchen überführt, bei ca. 300 g für 5 min. zentrifugiert und anschließend das Zellpellet in der entsprechenden Lösung resuspendiert.

### 2.3.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurde die Zellsuspension bei 300 g pelletiert und in einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in kaltem Einfriermedium (50 % RPMI 1640; 40 % FCS; 10 % Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Anschließend wurden Aliquots von 1,8 ml in Kryoröhrchen gefüllt, bei -80° C tiefgefroren und nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um im Stickstoff gelagerte Zellen in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension aufgetaut, möglichst rasch in 10 ml kaltem Medium gewaschen und schließlich in frisches Kulturmedium überführt.

### **2.3.3. Bestimmung der Lebend-Zellzahl**

Sollten Zellen in einer definierten Zellzahl in die entsprechenden Kulturgefäße eingesät werden, wurde mittels Trypanblau-Ausschlußtest die Anzahl der lebenden Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es wurde dafür eine geeignete Verdünnung, in den meisten Fällen 1:10, aus Zellsuspension und Trypanblaulösung hergestellt und in einer Neubauer-Zählkammer die Zahl an lebenden, also nicht durch Trypanblaulösung angefärbten Zellen, mikroskopisch ermittelt. Dazu wurden alle vier großen Quadrate à 16 Kleinquadrate ausgezählt und daraus ein Mittelwert für diese Kleinquadrate gebildet.

Die Zellkonzentration wurde wie folgt berechnet:

$$\text{MW der Zellzahl in 16 Kleinquadraten} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellzahl} \times 10^4 / \text{ml}$$

### **2.3.4. Mycoplasmentest**

In regelmäßigen Abständen wurden die Zelllinien mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kits auf einen Mycoplasmenbefall untersucht.

### **2.3.5. Transfektion mittels Calcium-Phosphat-Präzipitation**

Um Zellen transient mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wurden  $4 \times 10^6$  HEK-Zellen in eine 10 cm Schale ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Stunde vor Transfektion das Medium gewechselt, um optimale pH-Bedingungen zu gewährleisten. Für die Transfektion wurden 10 µg des entsprechenden Vektors mit 450 µl sterilem, Nuklease-freiem Wasser und mit 50 µl einer 2,5 M  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -Lösung versetzt. Diese DNA-Mischung wurde auf dem Vortexer in der Sterilbank zu 500 µl 2x HEPES-Puffer langsam eingetropt. Anschließend wurde dieser Mix zügig auf die 10 ml Zellkulturmedium der HEK-Zellen tropfenweise verteilt, für 5 h unter den üblichen Bedingungen inkubiert und anschließend das Medium gewechselt. Nach 48 h Transfektion wurde der Überstand, in dem das entsprechende Protein nun vorlag, abgenommen und als konditioniertes Medium in den Zytotoxizitätstest eingesetzt.

### 2.3.6. TNF-induzierter Zytotoxizitätstest

Für den TNF-induzierten Zytotoxizitätstest wurden in eine 96-Loch-Platte  $2 \times 10^4$  L929-Zellen pro Loch in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  ausgesät und über Nacht unter den üblichen Bedingungen für L929-Zellen inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde im konditionierten Medium, dass aus der transienten Transfektion von HEK-Zellen stammte (s. Kap. 2.3.5.), rekombinantes Human- oder Maus-TNF verdünnt. Das Medium der L929-Zellen wurde abgesaugt und die Mischung aus TNF und Medium in einer log<sub>2</sub>-Verdünnung über die lange Reihe der 96-Loch-Platte titriert, wobei das erste Loch eine empirisch ermittelte, absolut toxische Menge an TNF enthielt (100 %-Wert). Für das letzte Loch in der Reihe wurde dem Medium kein TNF zugefügt (0 %-Wert). Die Randlöcher der Platte enthielten keine Zellen, wurden ansonsten jedoch wie der Rest der Platte behandelt (Mediumkontrolle). Zu den 100  $\mu\text{l}$  TNF-enthaltenden Mediums wurden anschließend 100  $\mu\text{l}$  Actinomycin D-haltiges Medium der Konzentration 4  $\mu\text{g/ml}$  gegeben, um die Proteinbiosynthese zu blockieren. Die Platte wurde schließlich für weitere 24 h inkubiert. Zur Bestimmung des Anteils an lebenden Zellen wurden dem Medium 10  $\mu\text{l}$  einer MTT-Stammlösung zugesetzt und die Platte für 4 h in den Inkubator gegeben. MTT wird ausschließlich von stoffwechselaktiven Zellen aufgenommen und in deren Mitochondrien oxidativ umgesetzt, was zur Bildung des blauen Farbstoffes Formazan führt. Die Menge dieser entstandenen Kristalle verhält sich direkt proportional zur Viabilität der in der Kultur enthaltenen Zellen. Durch die Zugabe von 70  $\mu\text{l}$  einer 20 %-igen (w/v) SDS-Lösung wurden die Farbstoff-Kristalle aufgelöst und gleichzeitig die Reaktion durch die SDS-vermittelte Lyse der Zellen abgestoppt. Nach Vermessung der optischen Dichte des Reaktionsproduktes bei 540 nm wurde die Viabilität wie folgt berechnet:

$$\text{Viabilität im Loch } y \text{ [\%]} = 100 \% \times (A_y - A_{\text{Mediumkontrolle}}) / (A_{100 \% \text{-Wert}} - A_{\text{Mediumkontrolle}})$$

In allen Fällen wurden mindestens Duplikate pipettiert.

Für den TNF-induzierten Zytotoxizitätstest an Peritonealmakrophagen wurden in eine 96-Loch-Platte  $1 \times 10^5$  Peritonealexsudatzellen (PEC) pro 100  $\mu\text{l}$  pro Loch ausgesät und für eine Stunde inkubiert, damit die Peritonealmakrophagen adhäreren. Das Medium wurde abgesaugt und durch frisches ersetzt, bevor die Zellen mit mTNF stimuliert wurden. Dafür wurden im ersten Loch 5 ng/ml mTNF eingesetzt und in einer log<sub>2</sub>-Verdünnung

über die lange Reihe titriert. Die Platte wurde schließlich für 24 h inkubiert und der Anteil an lebenden Zellen mittels MTT-Umsetzung wie bereits beschrieben photometrisch bestimmt.

### **2.3.7. Gewinnung der Peritonealexsudatzellen (PEC)**

Für die Gewinnung der Peritonealexsudatzellen (PEC) wurde C57BL/6 Mäusen 1 ml/Maus steriles Thioglykolat (3 %, w/v) i. p. injiziert, bevor sie 3 Tage danach durch Genickzug getötet wurden. Anschließend wurde das Fell mit Ethanol (70 %) desinfiziert und vom gesamten Rumpfbereich abpräpariert. Zum Auswaschen der Peritoneallavage wurde eine mit Medium (RPMI, 10 % FCS, 0,1 % Gentamycin) gefüllte 10 ml Spritze, die auf Eis gelagert wurde, und eine 0,9 mm Kanüle verwendet. Das Medium wurde zügig mit hohem Druck in das Peritoneum appliziert, mit den darin befindlichen Zellen möglichst vollständig wieder aufgenommen und nach Abziehen der Kanüle in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 100 g für 5 min. zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Medium (DMEM, 5 % FCS, 0,1 % Gentamycin) resuspendiert und zur Zellzählung vorbereitet.

### **2.3.8. Gewinnung der Milzzellen**

Um während der Gewinnung die Viabilität der Milzzellen zu erhalten wurden das Organ bzw. die Zellen sowie das Medium (RPMI, 10 % FCS, 0,1 % Gentamycin, 0,01 % 2-Mercaptoethanol) stets auf Eis gelagert.

Die entsprechenden Mäuse wurden durch Genickzug getötet, das Fell mit Ethanol (70 %) desinfiziert und von dem betreffenden Körperbereich abpräpariert. Die Milz wurde semisteril entnommen und in einem mit Medium gefüllten 50 ml Falcon Röhrchen auf Eis gestellt. Zur Aufarbeitung der Zellen wurde in einer Petrischale den Milzen anhaftendes Bindegewebe entfernt, das Organ auf einer Seite aufgeschnitten und die Zellen vorsichtig mit einer gebogenen Pinzette aus der Organhülle ausgestrichen. Die Zellaggregate wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren möglichst in eine Einzelzellsuspension überführt und diese durch Filtration über ein Zellsieb (Maschenweite 40 µm) von übrig gebliebenen Gewebestücken sowie größeren Aggregaten befreit. Nach einem Waschschrift mit ca. 40 ml Medium wurde das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert und die enthaltenen Erythrozyten durch hypotone Lyse mittels ACK-Puffer (5 ml, 4 min.) entfernt. Nach Abstoppen der Lyse mit 45 ml Medium und einem weiteren Waschschrift

wurden die Zellen erneut über ein Zellsieb filtriert, um bei der Lyse entstandene Präzipitate zu entfernen. Die Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert (10 min., 300 g) und das Pellet in 5 bis 10 ml Medium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 2.3.9. Gewinnung der Thymozyten

Um den Thymus nicht zu verletzen, wurden die Mäuse nicht mittels Genickzug, sondern durch Einschlafen mit Diethylether getötet. Das Fell der Maus wurde mit Ethanol (70 %) desinfiziert und am gesamten Rumpf abgetrennt. Der Brustkorb wurde aufgeschnitten und nach oben weggeklappt, um den Thymus vorsichtig zu entfernen. Das Organ wurde in ein mit Medium (RPMI, 10 % FCS, 0,1 % Gentamycin) gefülltes 50 ml Falcon Röhrchen überführt und schließlich durch ein Zellsieb (Maschenweite 40  $\mu$ m) mit dem hinteren Teil einer Spritze gedrückt. Nach einem Waschschrift mit ca. 40 ml Medium wurde das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert und die Zellen gezählt.

### 2.3.10. Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden auf einem FACScan Flow Cytometer der Firma Becton Dickinson durchgeführt, als Listmode-Dateien abgespeichert und die Auswertung mit dem Programm WinMDI 2.8 vorgenommen. Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten FITC-, PE-, PerCP- und APC-Farbstoffe. Zusätzlich wurden die Zellen bei Oberflächenfärbungen kurz vor der Messung mit Propidium-Iodid (PI), einem DNA-Farbstoff, versetzt, um PI-positive und damit tote Zellen ausschließen zu können.

Für die Belegung der unterschiedlichen Kanäle des FACScan Durchflusszytometers ergibt sich demnach:

|                                  |                                     |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| 1. <i>Forward Scatter</i> (FSC)  | Zellform / Zellgröße                |
| 2. <i>Sideward Scatter</i> (SSC) | Granularität                        |
| 3. Fluoreszenzkanal 1 (F11-H)    | FITC-Fluoreszenzintensität          |
| 4. Fluoreszenzkanal 2 (F12-H)    | PE-Fluoreszenzintensität            |
| 5. Fluoreszenzkanal 3 (F13-H)    | PerCP- und PI-Fluoreszenzintensität |
| 6. Fluoreszenzkanal 4 (F14-H)    | APC-Fluoreszenzintensität           |

Alle Parameter wurden bei der Auswertung logarithmisch aufgetragen.

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurden die Zellen auf FACS-Röhrchen verteilt (1 bis  $2 \times 10^6$  Zellen), bei 300 g für 10 min. pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Anschließend erfolgte ein Blockierschritt, durch den unspezifische Bindungen der Antikörper verringert werden sollten. Die Zellen wurden mit 50  $\mu$ l eines spezifischen Antikörpers gegen die Fc $\gamma$ -Rezeptoren I und II in PBS / 10 % FCS für 20 bis 30 min. blockiert. Die Antikörper wurden dann in den entsprechenden Konzentrationen (s. Tabelle 1), die in vorausgegangenen Titrationen ermittelt wurden, in weiteren 50  $\mu$ l PBS / 10 % FCS zugegeben, womit das Reaktionsvolumen für die Färbung 100  $\mu$ l betrug. Nach Inkubation für 30 min. auf Eis wurden die Zellen pelletiert, der Überstand mit ungebundenen Antikörpern abgenommen, die Zellen in 4 ml PBS / 2 % FCS resuspendiert und bei 300 g wiederum für 10 min. zentrifugiert. Im Falle biotinylierter Antikörper erfolgte eine 30-minütige zweite Inkubation mit einem Sekundärantikörper (Streptavidin), der ebenfalls durch den Waschschrift mit 4 ml PBS / 2 % FCS entfernt wurde. Die Zellen wurden schließlich in 250 bis 300  $\mu$ l PBS / 2 % FCS aufgenommen und am Durchflusszytometer vermessen.

Alle Inkubationen wurden auf Eis und aufgrund der fluoreszenzmarkierten Antikörper unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung durchgeführt. Bei Oberflächenfärbungen wurden die Proben kurz vor der Messung mit PI-Lösung (25  $\mu$ g/ml w/v) im Verhältnis 1:10 versehen, um eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen zu ermöglichen.

| <b>Antikörper</b>                             | <b>eingesetzte Konzentration</b> |
|---|----------------------------------|
| anti-mouse CD3-FITC (17A2)                    | 12,5 µg/ml                       |
| anti-mouse CD4-FITC (L3T4)                    | 5 µg/ml                          |
| anti-mouse CD4-PE (L3T4)                      | 5 µg/ml                          |
| anti-mouse CD8a-APC (Ly-2)                    | 5 µg/ml                          |
| anti-mouse CD8a-PerCP (Ly-2)                  | 3 µg/ml                          |
| anti-mouse CD25-APC (PC61)                    | 2 µg/ml                          |
| anti-mouse CD25-PE (PC61)                     | 1 µg/ml                          |
| anti-mouse/rat Foxp3-PE (FJK-16s)             | 4 µg/ml                          |
| anti-mouse TNF Receptor Type II, biotinyliert | 15 µg/ml                         |
| rat IgG2a,κ-PE                                | 4 µg/ml                          |
| Streptavidin-APC                              | 30 µg/ml                         |

**Tabelle 1:** Eingesetzte Konzentrationen der Antikörper.

Im Falle der Färbung mit Foxp3-Antikörpern wurden die Zellen zusätzlich intrazellulär gefärbt. Dazu wurden sie, wie zuvor beschrieben, mit einem spezifischen Antikörper gegen die Fcγ-Rezeptoren I und II in PBS / 10 % FCS blockiert und anschließend die Zelloberflächen mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Für die folgende intrazelluläre Färbung wurden die Zellen mit Hilfe des PE anti-mouse/rat Foxp3 Farbe-Sets nach Angaben des Herstellers fixiert, permeabilisiert sowie gefärbt. Als Isotypkontrolle wurde ein rat IgG2a, κ-PE-Antikörper mitgeführt.

### **2.3.11. MACS-Reinigung**

Zur Anreicherung von Primärzellen wurden die Zellen aus der Milz wie in Kap. 2.3.8. aufbereitet und deren Zellzahl bestimmt. Im Anschluß wurden sie pelletiert und pro  $1 \times 10^8$  Zellen 900 µl PBS / 10 % FCS und 100 µl der entsprechenden Micro Beads zugegeben. Die Inkubation mit den Magnet-gekoppelten Beads erfolgte für 20 min. auf Eis. Die Zellen wurden anschließend in 50 ml MACS-Puffer gewaschen, über ein Zellsieb (Maschenweite 40 µm) filtriert, pelletiert (10 min., 300 g) und möglichst luftblasenfrei in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Aufreinigung der mit magnetischen Micro Beads versehenen Zellen erfolgte durch Bindung an eine im magnetischen Feld befindliche

MACS Separations-Säule, die vorher mit MACS-Puffer equilibriert wurde. In drei Waschschritten mit jeweils 3 ml MACS-Puffer wurden die unspezifisch haftenden Zellen von der Säule gespült. Nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war, konnte die angereicherte Fraktion eluiert, mit PBS / 10 % FCS rekonstituiert und gezählt werden.

Im Falle der Anreicherung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen aus der Milz wurden die Zellen nach der Zellaufarbeitung und Zählung mit einem Antikörper gegen die Fcγ-Rezeptoren I und II in PBS / 10 % FCS blockiert. Anschließend wurden die blockierten Zellen mit dem anti-CD25-PE Antikörper für 20 min. auf Eis markiert. Nach einem Waschschriff wurden sie pro 1 x 10<sup>8</sup> Zellen mit 900 µl PBS / 10 % FCS und 100 µl der anti-PE Micro Beads für 20 min. inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und wie zuvor beschrieben über die MACS Separations-Säule gegeben. Die erhaltenen CD25<sup>+</sup>- und CD25<sup>-</sup>-Fraktionen wurden wiederum gezählt und die CD25<sup>-</sup>-Fraktion aufgeteilt. Ein Teil wurde mit anti-CD4 Micro Beads, der andere Teil mit anti-CD90 Micro Beads (T-Zelldepletion) versetzt und nach dem bereits erwähnten Prinzip angereichert. Die dadurch erhaltene CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responder-T-Zellpopulation bzw. die CD90<sup>-</sup>-Zellpopulation (APC) wurde gezählt und zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert. Die Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wurden zuvor noch mit 30 Gy bestrahlt. Die CD25<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit anti-CD4-FITC Antikörpern für 20 min. auf Eis inkubiert und im Anschluß gewaschen, bevor sie in 1 ml Medium resuspendiert wurden. Danach wurden sie im ARIA-Durchflusszytometer sortiert.

Die Reanalysen der nach MACS-Separation erhaltenen Zellfraktionen sowie die der Gesamtmilzpopulation erfolgten mit Hilfe der Durchflusszytometrie.

### **2.3.12. Zellsortierung**

Die Sortierung der aus der Milz gewonnenen und mittels MACS angereicherten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (s. Kap. 2.3.11) erfolgte am ARIA-Durchflusszytometer. Dabei wurden die Zellen mit einer Reinheit von nahezu 100 % gewonnen.

### **2.3.13. CFSE-Färbung**

Um die Proliferation von Zellen zu bestimmen, eignet sich der Fluoreszenzfarbstoff CFSE, der sich an die DNA anlagern kann. Während jedem Zellteilungsschritt verdoppelt sich die DNA und dementsprechend halbiert sich die CFSE-Intensität. Diese Abnahme

kann schließlich durchflusszytometrisch gemessen werden. Dabei verhält sich das Ausmaß der Proliferation indirekt proportional zur CFSE-Intensität.

Die mittels MACS angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz (s. Kap. 2.3.11.) wurden auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS/2 % FCS eingestellt. Der in DMSO gelöste CFSE-Farbstoff wurde zu den Zellen pipettiert (Endkonzentration 2  $\mu$ M), 10 sek. auf dem Vortexer gemischt und für 10 min. im Wasserbad bei 37° C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit dem fünf-fachen Volumen an eiskaltem PBS/2 % FCS versetzt und gewaschen. Ein Aliquot der markierten Zellen wurde schließlich im Durchflusszytometer getestet (FITC-Kanal) und zur weiteren Verarbeitung auf Eis im Dunkeln gelagert.

#### **2.3.14. Radioaktive Markierung mit <sup>3</sup>H-Thymidin**

Die in 96-Loch-Platten inkubierten Zellen wurden mit 0,5  $\mu$ Ci/Loch für 14-18 h bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert. Die proliferierenden Zellen bauen dabei <sup>3</sup>H-Thymidin in ihre DNA ein. Im Anschluß wurden die Zellen in einem Harvester geerntet und die Aufnahme an radioaktivem <sup>3</sup>H-Thymidin in einem Szintillationszähler bestimmt. Die Proliferationsrate der Zellen ist direkt proportional zur <sup>3</sup>H-Thymidin-Einlagerung.

#### **2.3.15. Bestimmung der Zellproliferation**

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden die aus der Milz gewonnenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS angereichert (s. Kap. 2.3.11.).

Eine 96-Loch-Platte wurde über Nacht bei 4° C mit 10  $\mu$ g/ml anti-CD3 Antikörper beschichtet, bevor  $1 \times 10^6$  Zellen/ml pro Loch ausgesät und ein löslicher anti-CD28 Antikörper in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ml dazu gegeben wurden. Die Proliferation wurde nach 72 h durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau bestimmt (s. Kap. 2.3.14). Im Falle der Proliferationsmessung mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes CFSE wurden die Zellen zuvor dementsprechend markiert (s. Kap. 2.3.13.) und durchflusszytometrisch analysiert.

#### **2.3.16. Bestimmung der suppressiven Aktivität**

Für die Bestimmung der suppressiven Aktivität der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen wurden die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen und die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responder-T-Zellen aus Mausmilzen wie in Kap. 2.3.8. beschrieben gewonnen und entsprechend über MACS angereichert bzw. im ARIA-Durchflusszytometer sortiert (s. Kap. 2.3.11. und

2.3.12). In die jeweiligen Löcher einer 96-Loch-Platte wurden 50 µl anti-CD3-haltiges Medium (1 µg/ml pro well; RPMI, 10 % FCS, 0,1 % Gentamycin, 0,01 % 2-Mercaptoethanol) vorgelegt und danach 100 000 bestrahlte Antigen-präsentierende Zellen (APC) pro 50 µl und 50 000 Responder-T-Zellen pro 50 µl ausgesät. Im Anschluß wurden die sortierten regulatorischen T-Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen dazu gegeben. Für die Stimulierung mit Maus-TNF wurde auf die Platte zusätzlich 1 ng/ml Maus-TNF pro Loch pipettiert. Nach 72 h Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Proliferation der Responder-T-Zellen durch Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin bestimmt.

Als Negativkontrolle wurden Responder-T-Zellen verwendet, die zwar mit APC, nicht aber mit anti-CD3 Antikörpern stimuliert wurden. Die Responder-T-Zellen der Positivkontrolle jedoch wurden mit beiden Stimuli inkubiert. Zu den jeweiligen Kontrollzellgruppen wurden außerdem keine regulatorischen T-Zellen pipettiert.

## **2.4. Immunologische Methoden**

### **2.4.1. Serumgewinnung aus Mausblut**

Den Mäusen wurde durch retro-orbitales Blutentnahme unter Anästhesie (Diethylether) Blut entnommen. Das Blut wurde zunächst für 1 h bei RT und anschließend über Nacht bei 4° C im Kühlschrank gelagert. Am darauf folgenden Tag wurde der gebildete Blutkuchen für 5 min. bei 13000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde abgenommen und in Eppendorf-Cups bei -20° C gelagert.

### **2.4.2. ELISA**

Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte mit den entsprechenden ELISA-Kits von R&D Systems, bei denen das „Sandwich“-Prinzip zugrunde liegt.

Dazu wird prinzipiell eine 96-Loch-Mikrotiterplatte mit einem *Capture*-Antikörper beschichtet, an dem das nachzuweisende Protein aus der Probenlösung spezifisch binden kann. Im Anschluss wird ein biotinylierter *Zweitantikörper*, der sog. *Detection*-Antikörper, dazugegeben, der ebenfalls an das Protein bindet. Die Detektion erfolgt unter Verwendung von Streptavidin, das mit dem Enzym HRP (*horse radish peroxidase*) markiert ist, und ABTS gelöst in ABTS-Puffer, welches durch die Peroxidase in ein grünes Produkt umgesetzt wird. Die Konzentration des entstandenen Farbstoffes und

damit auch die Konzentration an nachzuweisendem Produkt kann schließlich durch die Absorption bei 405 nm bestimmt werden.

Diese Durchführung erfolgte mit den jeweiligen, in den Kits vorhandenen Antikörpern nach den Vorschriften des Herstellers. Als Proben wurden Mausseren bzw. Zellkulturüberstände eingesetzt, die zuvor abgenommen und zentrifugiert wurden, um eventuell verbliebene Zellen zu entfernen.

Das Ausmaß der Umsetzung von ABTS wurde durch photometrische Messung der Absorption bei 405 nm detektiert und mit Hilfe des mitgeführten Standards bzw. der resultierenden Standardgerade in Proteinmenge umgerechnet.

#### **2.4.3. Messung der Konzentration der Leber-Aminotransferasen (ALT /AST)**

Für die Messung der Aminotransferasenaktivität im Serum wurden alle Reagenzien bei Raumtemperatur verwendet. Als Ausgangssubstrat wurde zur Bestimmung der Aspartat-Aminotransferase (AST) 1 ml Aspartat-Puffer (190 mM in 0,1 M Phosphatpuffer) zusammen mit 20 µl NADH (12 nM) und 2 µl Malatdehydrogenase (MDH 2 mg/ml) sowie 20 µl Serumprobe in eine Quarzküvette pipettiert. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 40 µl α-Ketoglutarat (0,6 M) gestartet. Die Substanzen wurden in der Pipette zügig gemischt. Im Abstand von 30 – 60 sek. wurde die Absorption bei 340 nm im UV-Meter gemessen und notiert. Die Messung wurde beendet, sobald sich die abnehmende Absorption auf einen konstanten Wert eingependelt hatte. Folgende Reaktion findet dabei statt:



Dementsprechend wurde auch die Menge der Alanin-Aminotrasferase (ALT) bestimmt. Als Ausgangssubstrat diente dabei 1 ml L-Alanin (1,1 M in 0,05 M Phosphatpuffer), das wiederum mit 20 µl NADH (12 mM) und 20 µl Serumprobe versetzt wurde. Als katalysierendes Enzym wurde 4 µl Lactatdehydrogenase (LDH 5 mg/ml) dazu gegeben. Für den Reaktionsstart wurden 50 µl α-Ketoglutarat (0,2 M) zu den übrigen Substanzen pipettiert, gut vermischt und die abnehmende Absorption bei 340 nm im Abstand von 30 – 60 sek. bis zur Wertkonstanz gemessen.

Für die Umsetzung der Substrate durch ALT gilt folgende Reaktionsgleichung:



In beiden Fällen wurde der enzymatisch katalysierte Umbau von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu  $\text{NAD}^+$  bei 340 nm photometrisch vermessen. Dabei ist die Absorptionsabnahme direkt proportional zur Enzymmenge AST bzw. ALT.

Die Enzymkonzentration, die letztendlich in der Serumprobe vorliegt, wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Enzymkonzentration [U/ml]} = [V / (\epsilon_{\text{NADH}} \times d \times p)] \times \Delta E/\text{min.}$$

V = Volumen der Küvette (1,082 ml)

$\epsilon_{\text{NADH}} = 6,32 \text{ l}/(\text{mmol} \times \text{cm})$

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

p = Probenvolumen

$\Delta E/\text{min.}$  = Absorptionsabnahme

Die gemessene Absorption (Ordinate) wurde gegen die Zeit (Abszisse) aufgetragen. Die Absorptionsabnahme  $\Delta E/\text{min.}$  entspricht der aus der Geraden ermittelten Steigung  $\Delta y/\Delta x$ .

## 2.5. Tierexperimente

### 2.5.1. Tierhaltung und Versuchstiere

Alle verwendeten Mäuse waren entsprechend den Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12 h Hell-Dunkel Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser *ad libitum*.

Experimente wurden an C57BL/6, C57BL/6 x FvB, C57BL/6-p75TNFR-defiziente (Erickson, 1994) und C57BL/6 x FvB-hicp75TNFR-transgenen Mäusen durchgeführt. Dabei wurden die C57BL/6 als Kontrollen für C57BL/6-p75TNFR-defiziente Mäuse und C57BL/6 x FvB als Kontrollen für C57BL/6 x FvB-hicp75TNFR-transgene Mäuse

eingesetzt. Die Mäuse wurden im Tierstall des José-Carreras-Forschungsbauers am Klinikum der Universität Regensburg gehalten.

Die Zucht der C57BL/6 x FvB- und C57BL/6 x FvB-hicp75TNFR-transgenen Mäuse erfolgte unter denselben Bedingungen wie die Haltung und die Tiere wurden im Alter von 4 bis 6 Wochen genotypisiert.

C57BL/6-p75TNFR-defiziente Mäuse (Erickson et al. 1994b) wurden im SPF-Tierstall der Universität Regensburg entsprechend den Haltungsvorschriften gezüchtet und für mindestens 4 Wochen im Tierstall des José-Carreras-Forschungsbauers am Klinikum gehalten, bevor sie in Experimente eingesetzt wurden.

C57BL/6 wurden von Charles River, Sulzfeld bezogen und ebenfalls zunächst für mindestens 4 Wochen im Tierstall des José-Carreras-Forschungsbauers untergebracht, bevor sie für Tierexperimente verwendet wurden.

Da die hicp75TNFR-transgenen Mäuse beider Linien (46 und 62) in den bisher durchgeführten Experimenten keine erkennbaren Unterschiede aufwiesen, wurde auf eine differenzierte Kennzeichnung der beiden Mauslinien in den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten verzichtet.

### **2.5.2. Induktion einer experimentellen akuten und chronischen Colitis mit Dextransulfat (DSS)**

Zur Induktion einer akuten Colitis wurde den Mäusen, deren Körpergewicht mindestens 22 g betrug, 1,5 % Dextransulfat (DSS, MG 36000-50000) im Trinkwasser über 7 Tage gegeben (Okayasu, 1990). Am Tag 8 wurden die Mäuse mittels Genickzug getötet.

Eine chronische Colitis wurde den Mäusen (Körpergewicht mindestens 22 g) induziert, indem sie in vier Zyklen über sieben Tage eine 0,5 % ige DSS-Behandlung über das Trinkwasser erhielten. Zwischen den einzelnen Zyklen bekamen sie jeweils für 10 Tage normales Trinkwasser. Etwa 21 Tage nach der letzten DSS-Gabe wurden die Mäuse durch Genickzug getötet.

### 2.5.3. Bestimmung von Entzündungsparametern des Dickdarmes

#### 2.5.3.1. Histologischer Score

Aus den Mäusen wurde der Dickdarm herauspräpariert und von Stuhlpellets befreit. Vom distalen Teil des Dickdarmes wurde ein etwa 1,5 cm langes Stück abgetrennt, der Länge nach aufgeschnitten und über Nacht in 10 % Formaldehyd (in PBS) fixiert. Am nächsten Tag wurden die Darmproben mit Hilfe unterschiedlicher Ethanol-Konzentrationen entwässert, bevor sie schließlich in Paraffin eingebettet wurden. Von den paraffinierten Darmstücken wurden jeweils drei 3 µm dicke Längsschnitte im Abstand von 100 µm angefertigt und auf einen Objektträger überführt. Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin / Eosin gefärbt und mit einem Deckglas versehen. Anschließend folgte die histologische Beurteilung („verblindet“), wobei pro Dickdarmprobe alle drei Schnitte einen Punktscore erhielten. Der daraus resultierende Mittelwert repräsentierte den jeweiligen histologischen Score des Tieres.

Für die histologische Beurteilung wurde folgender Score, der je nach Schweregrad von 0 bis 4 reichte, aufgestellt:

| Score | Epithelschaden                         | Infiltrat  |
|-------|--|--|
| 0     | normale Morphologie                    | kein Infiltrat   |
| 1     | Verlust einzelner Becherzellen         | wenig Infiltrat an der Kryptenbasis  |
| 2     | Flächenhafter Verlust von Becherzellen | Infiltrat zwischen Krypten und <i>Muscularis mucosae</i>                       |
| 3     | Kryptenverlust                         | mehr Infiltrat, mit Oedem (Gewebe aufgeschwollen)                              |
| 4     | Flächenhafter Kryptenverlust           | Infiltrat durch <i>Muscularis mucosae</i> bis in die <i>Submucosa</i> reichend |

Die histologischen Parameter Epithelschaden und Infiltrat wurden einzeln bewertet und mit einem Score versehen. Der histologische Gesamtscore einzelner Mäuse wurde aus der Summe der beiden Parameter berechnet (Gesamtscore = Epithelschaden + Infiltrat). Demnach ergibt sich ein maximaler Gesamtscore von 8 Scorepunkten.

### 2.5.3.2. Bestimmung des Lymphfollikelscores

Zur Bestimmung der Anzahl der Lymphfollikel wurden die Dickdarmpräparate wie in 2.5.3.1. aufbereitet und folgendem Score bewertet, wobei pro Schnitt ein Abschnitt von 1 cm bewertet wurde.

| Score | Anzahl Lymphfollikel / Schnitt |
|-------|--------------------------------|
| 0     | kein Lymphfollikel             |
| 1     | 1 Lymphfollikel                |
| 2     | 2 Lymphfollikel                |
| 3     | 3 Lymphfollikel                |
| 4     | 4 oder mehr Lymphfollikel      |

Pro Dickdarmprobe erhielten wiederum alle drei Schnitte einen Score. Der daraus resultierende Mittelwert repräsentierte den jeweiligen Lymphfollikelscore der Maus.

### 2.5.3.3. Gewichtsveränderung

Während der Induktion der akuten Colitis wurden die Mäuse täglich gewogen und das Körpergewicht gemessen. Die auftretende Gewichtsveränderung wurde auf das Ausgangsgewicht bezogen und in Prozent ausgedrückt.

### 2.5.3.4. Dickdarmlänge

Nach der Behandlung wurden die Mäuse mittels Genickzug getötet, der Dickdarm herauspräpariert und von Stuhlpellets befreit. Da der Darm aufgrund der Stuhlpellets und der Präparation etwas gedehnt war, wurde er für kurze Zeit zur Entspannung liegengelassen. Danach wurde die Länge des Dickdarmes mit einem Lineal gemessen.

Je länger der Darm ist, desto weniger liegt eine entzündungsverursachte Verkürzung, wie z. B. durch Ödeme, vor. Je länger also der Darm ist, desto weniger entzündet ist er.

## 2.5.4. D-Galaktosamin-/LPS-induzierter Hepatotoxizitäts-Test

Der D-Galaktosamin-/LPS-induzierte Hepatotoxizitäts-Test ist ein *in vivo* TNF-Test, bei dem durch exogene Gabe subletaler Dosen von LPS endogenes TNF freigesetzt wird. Durch die gleichzeitige Applikation des Transkriptions-Inhibitors D-Galaktosamin (DGalN) wird die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und damit die Expression anti-apoptotischer

Moleküle verhindert. Besonders betroffen von der TNF-induzierten Toxizität sind die stoffwechselaktiven Hepatozyten. Während die Verabreichung der Einzelsubstanzen nicht zum Tod führt, sterben die Mäuse nach gleichzeitiger Gabe von DGalN und LPS innerhalb von 5 h.

Pro 20 g Maus wurden 100 ng LPS und 14 mg DGalN in 200 µl PBS i. p. injiziert. Die Mäuse wurden über ca. 5 h beobachtet und sofort die Lebern entnommen, sobald es den DGalN/LPS-behandelten Mäusen schlechter ging. Dafür wurden die Tiere mittels Genickzug getötet, das Fell mit Ethanol (70 %) desinfiziert und von der entsprechenden Körperstelle entfernt. Die herauspräparierte Leber wurde über Nacht in 10 % Formaldehyd (in PBS) fixiert und am nächsten Tag in Paraffin eingebettet. Die angefertigten Schnitte wurden mit Hämatoxylin / Eosin gefärbt und histologisch beurteilt.

#### **2.5.5. Concanavalin A (Con A)-induzierter Hepatotoxizitätstest**

Für den Con A-induzierten Hepatotoxizitätstest wurde den Mäusen 30 mg/kg Con A i. v. injiziert. Den Kontrollmäusen wurde die entsprechende Menge an 0,9 %-iger NaCl i. v. appliziert. Nach 8 h wurden die Mäuse mittels Genickzug getötet, die Lebern entnommen und anschließend für histologische Untersuchungen präpariert (s. Kap. 2.5.4.).

#### **2.5.6. Concanavalin A (Con A)-induzierter Hepatotoxizitätstest nach Etanercept-Gabe**

Der Wirkstoff Etanercept (Enbrel<sup>®</sup> 50 mg, Wyeth) wurde nach Angaben des Herstellers in sterilem Wasser gelöst. Anschließend wurde den Mäusen 5 mg/kg von der Etanercept-Lösung i. p. injiziert. Die Kontrollmäuse bekamen die entsprechende Menge an 0,9 %-iger NaCl i. p. verabreicht. Nach 1 h wurde allen Versuchstieren 30 ml/kg Con A i. v. appliziert (s. Kap. 2.5.5.), bevor sie nach weiteren 8 h mittels Genickzug getötet wurden. Die Lebern wurden entnommen und schließlich für histologische Untersuchungen präpariert (s. Kap. 2.5.4.).

### **2.5.7. Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis mittels zökaler Ligatur und Punktion (CLP)**

Alle operativen Eingriffe wurden unter semisterilen Bedingungen durchgeführt. Um das Risiko einer Infektion mit exogenen Erregern zu vermindern, wurden sämtliche Geräte und Arbeitsflächen mit Ethanol (70 %) desinfiziert.

#### 2.5.7.1. Anästhesie

Vor dem chirurgischen Eingriff wurden die Mäuse mit einer Lösung aus 15 % Ketamin 5 % (Ketaminhydrochlorid) und 8 % Xylazin 2 % (Xylazinhydrochlorid) in PBS anästhesiert. Den Tieren wurde von dieser Mischung 10 ml pro kg Maus i. p. injiziert.

#### 2.5.7.2. Laparotomie

Nach Feststellung der vollständigen Anästhesie mittels Drucktest an der Hinterpfote, wurde der untere Bauchbereich der Maus mit Ethanol (70 %) benetzt und das Fell an der entsprechenden Stelle mit einem ca. 1 cm langen Schnitt aufgeschnitten. Die Laparotomie erfolgte durch einen ebenfalls ca. 1 cm langen Schnitt entlang der *Linea alba*, um möglichst keine Blutgefäße zu verletzen. Anschließend wurde der Blinddarm vorsichtig durch die Öffnung herausgezogen und auf ein zurechtgeschnittenes und desinfiziertes Stück Parafilm<sup>®</sup> gelegt.

#### 2.5.7.3. Ligatur und Perforation

Für die subletale CLP wurde der Blinddarm zu 30 % vom distalen Ende her mit einem Baumwollfaden abgebunden. Dabei diente ein doppelter Knoten als Verschluss und die überstehenden Enden des Fadens wurden entfernt.

Die nachfolgende Perforation erfolgte durch einen Einstich in den abgebundenen Teil des Blinddarmes mit einer sterilen Kanüle (0,4 µm Durchmesser).

#### 2.5.7.4. Verschluss

Der Blinddarm wurde wieder in das Peritoneum zurückgebracht und die Bauchdecke und das Fell sind gemeinsam durch drei bis fünf Wundklammern verschlossen worden. Die Mäuse wurden schließlich auf dem Rücken in frisch eingestreute Käfige gelegt.

## 2.6. Statistik

Wenn nicht anders angegeben, wurden aus Organen gewonnene Zellen in Gruppen vereint und in Triplikaten inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus Messdaten von Triplikaten  $\pm$  Standardabweichung.

Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bei Auswertung von Einzelmäusen wurden mit dem Mann-Whitney U Test bestimmt.

Das Signifikanzniveau lag bei  $p < 0,05$ . Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS für Windows, Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

## C Ergebnisse

In früheren Arbeiten wurde neben den beiden bekannten TNF-Rezeptoren, Typ 1 (p55TNFR) und Typ 2 (p75TNFR), bei Untersuchungen zur Regulierung der p75TNFR-Expression eine neue p75TNFR-cDNA sowohl im Maus-, als auch im Humansystem identifiziert. Sequenzanalysen zeigten, dass in beiden Fällen durch Benutzung eines weiter 5' liegenden Transkriptionsstarts und anschließendes alternatives Spleissen das ursprüngliche N-terminale Signalpeptid fehlt und im humanen Fall durch eine neue Aminosäuresequenz ersetzt wird, während die Extrazellulär-, Transmembran sowie Intrazellulär-Domäne erhalten bleibt (Seitz, 2001). In ersten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurde die funktionelle Isoform des p75TNFR intrazellulär lokalisiert, woraufhin das Protein als *intracellular* (ic)p75TNFR bezeichnet wurde. Außerdem haben *in vitro* Untersuchungen dieses neuen TNF-Rezeptors ergeben, dass human icp75TNFR (hicp75TNFR) überexprimierende Zellen für TNF-induzierte Zytotoxizität resistent sind (Seitz, 2001).

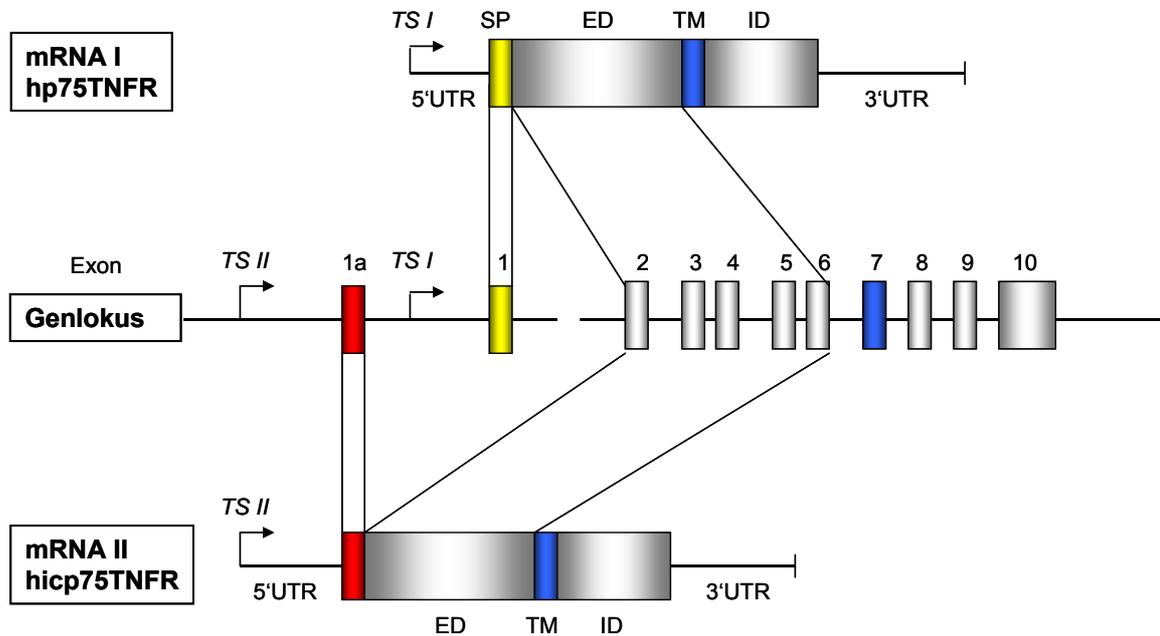
Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung der Überexpression des hicp75TNFR sowie die der Defizienz des p75TNFR untersucht werden, um die Bedeutung dieser beiden TNF-Rezeptor-Isoformen kennen zu lernen. Als Vorarbeit wurden daher Mäuse generiert, die für den hicp75TNFR transgen sind. In diesem Projekt wurden diese Tiere genotypisch und phänotypisch charakterisiert und die Ergebnisse mit der Funktion des p75TNFR verglichen.

### 1. Generierung und Züchtung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse

#### 1.1. Generierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse (Vorarbeiten)

Für die Herstellung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse, wurde ein Konstrukt kloniert, das die hicp75TNFR-cDNA enthält, beginnend mit dem 5'-Translationsstart ATG des Exons 1a bis einschließlich des Stoppkodons am 3'-Ende des Exons 10 (Abb. 2). Diese

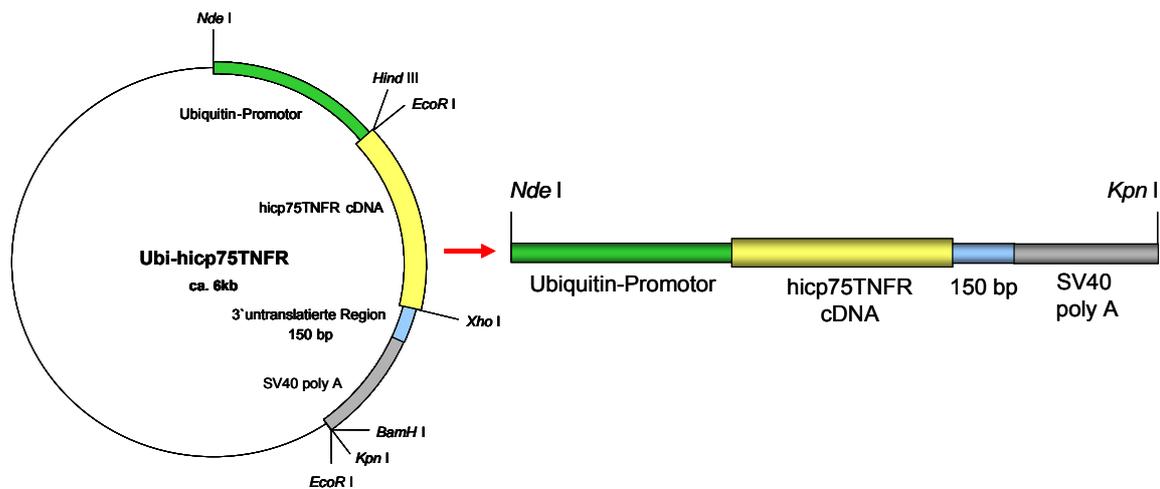
cDNA wurde unter die Kontrolle des Ubiquitin-Promotors gestellt, um das entstehende Transgen ubiquitär in den Zellen der Maus zu exprimieren.



**Abb. 2: Genlokus und Struktur der beiden p75TNFR-Isoformen.** Die beiden mRNA-Isoformen unterscheiden sich prinzipiell in den Transkriptionsstartpunkten I und II. Während im Falle der human p75TNFR-mRNA (hp75TNFR-mRNA) für die Bildung des Signalpeptids, das von Exon 1 codiert wird, vom Startpunkt I aus transkribiert wird, entsteht die human icp75TNFR-mRNA (hicp75TNFR-mRNA) durch die Benutzung des alternativen Transkriptionsstarts II. Die für den hicp75TNFR spezifische Sequenz beschränkt sich somit auf das Exon 1a, welches direkt an die Exone 2-10 gespleißt wird, inklusive der 5' untranslatierten Region.

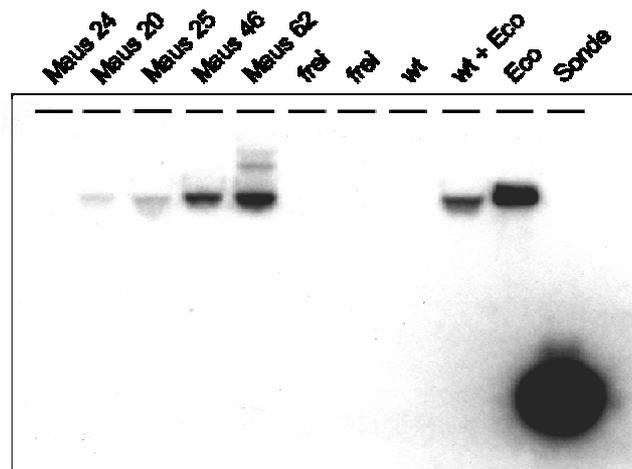
TS: Transkriptionsstart, SP: Signalpeptid, ED: Extrazellulärdomäne, TM: Transmembrandomäne, ID: Intrazellulärdomäne, UTR: untranslatierte Region

Für die Klonierung wurde aus dem von M. Schorpp *et al.* zuerst beschriebenen Ubi-JunB-Vektor (Schorpp, 1996) mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Hind* III und *Xho* I die junB-cDNA entfernt und durch die hicp75TNFR-cDNA ersetzt. Bei dem anschließenden Verdau des resultierenden Ubi-hicp75TNFR-Vektors durch die Enzyme *Nde* I und *Kpn* I entstand ein Fragment, welches den Ubiquitin-Promotor, die hicp75TNFR-cDNA, an der sich 150 Basenpaare (bp) der 3'untranslatierten Region des humanen c-jun-Gens anschließen, und einen PolyA-Rest, der eine SV40-Spleißseite beinhaltet, umfasst (Abb. 3). Das klonierte Konstrukt wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung auf seine korrekte Sequenz hin untersucht, bevor es in einen der beiden Pronuklei einer befruchteten Oozyte mikroinjiziert wurde.



**Abb. 3: Klonierung des hicp75TNFR-Transgens.** Die cDNA des Ubi-junB-Vektors wurde durch die hicp75TNFR-cDNA (1400 bp) über die Restriktionsenzyme *EcoR* I und *Xho* I ersetzt und daraus resultierte der Ubi-hicp75TNFR-Vektor. Durch Verdau mit Hilfe der beiden Enzyme *Nde* I und *Kpn* I wurde diesem Vektor ein Fragment entnommen, das als Konstrukt für die Generierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse diente. bp: Basenpaare

Nach der Mikroinjektion des Ubi-hicp75TNFR-Konstruktes in Oozyten von FvB-Mäusen, wurden diese anschließend in die Eileiter scheinchwangerer Mäuse des gleichen Stammes transferiert. Die Nachkommen (Foundermäuse) wurden daraufhin mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse auf Transgenität untersucht (Abb. 4). Als Sonde wurde ein  $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTP-markiertes Fragment verwendet, das sich durch die Anlagerung des einen Primers am 3'-Ende des Exons 10 der hicp75TNFR-cDNA bzw. durch die Lage des zweiten Primers innerhalb der 150 bp umfassenden untranslatierten Region ergab. Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *EcoR* I (Abb. 3) wurde ein Stück des Ubi-hicp75TNFR-Vektors (Eco-Fragment) entfernt, das als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Um zu überprüfen, ob das Transgen unter diesen Aufarbeitungsbedingungen nachweisbar ist, wurde zusätzlich dieses Eco-Fragment zusammen mit einer Wildtyp-DNA eingesetzt. Eine genomische DNA, die aus einer Wildtypmaus isoliert wurde, diente als Negativkontrolle (Abb. 4).



**Abb. 4: Nachweis des *hicp75TNFR*-Transgens in genomischer DNA.** Die aus den Schwanzbiopsien der Foundermäuse isolierte genomische DNA wurde durch die Restriktionsenzyme *Hind* III und *Bam* HI verdaut und anschließend mit Hilfe der Southern-Hybridisierung auf Transgenität hin untersucht. Als Positivkontrollen dienten zum einen die Sonde, sowie ein Fragment, das mit Hilfe des Enzyms *Eco*R I aus dem Ubi-junB-Vektor geschnitten wurde (Eco). Zum anderen wurde dieses Stück zusammen mit einer Wildtyp-DNA (wt) als Positivkontrolle eingesetzt. Die aus einer Wildtypmaus isolierte DNA wählte man als Negativkontrolle.

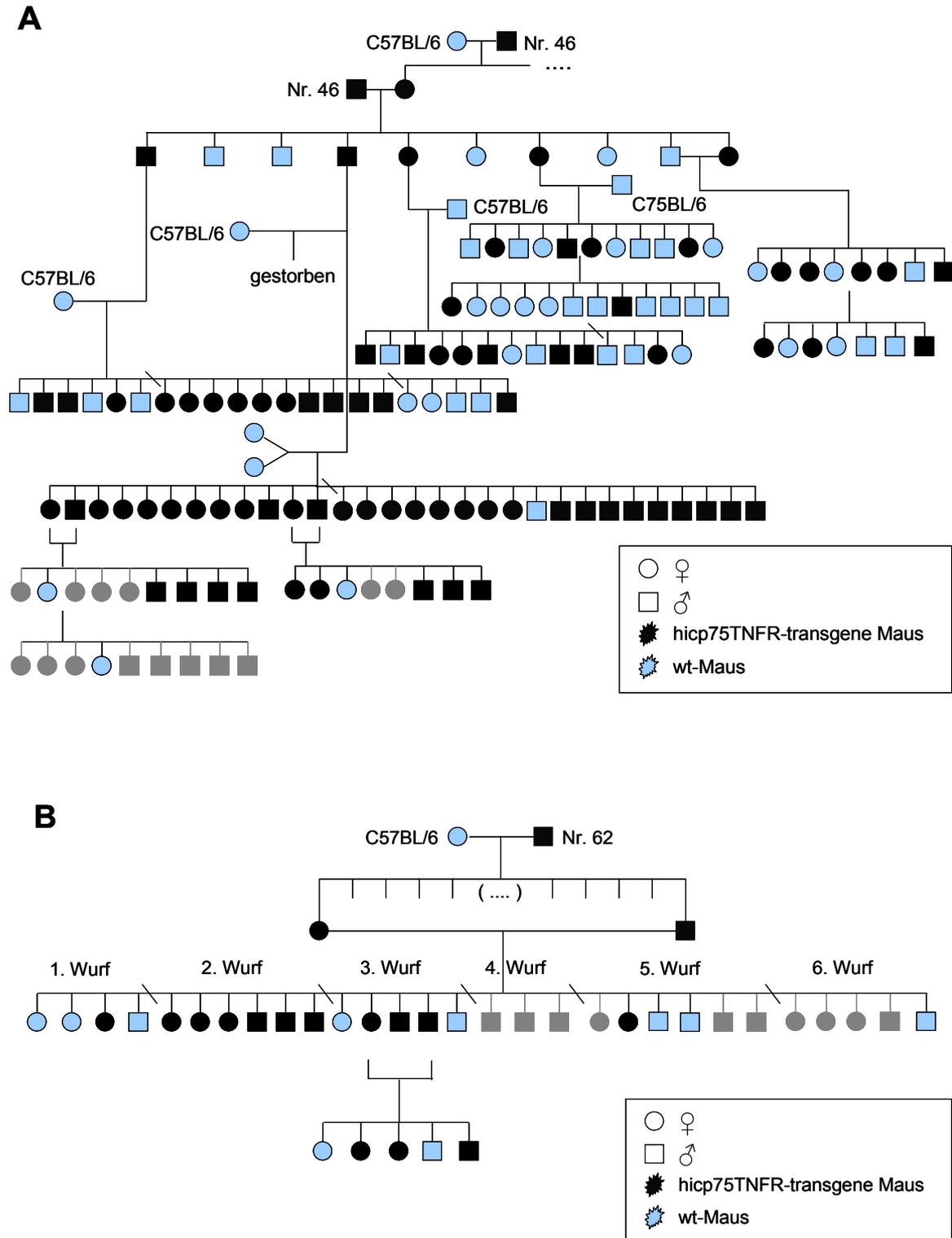
Von den gesamten Nachkommen zeigten vier Mäuse eine charakteristische Bande bei 280 bp, die somit als transgen identifiziert wurden. Bei den Mäusen Nr. 46 bzw. Nr. 62 waren die Banden im Southern-Blot stärker ausgeprägt als in den übrigen getesteten Tieren (Abb. 4). Um auszuschließen, dass ein auftretender Phänotyp der gentechnisch veränderten Mäuse zufällig durch den Insertionslokus des Transgens verursacht wird, wurden parallel zwei Zuchtlinien, ausgehend von den Mäusen 46 und 62, etabliert und beide in der vorliegenden Arbeit genotypisch und phänotypisch charakterisiert.

## 1.2. Züchtung der *hicp75TNFR*-transgenen Mäuse auf Homozygotie

Um einen potentiell vorhandenen Phänotyp der gentechnisch veränderten Mäuse zu verstärken, wurden die transgenen Nachkommen (F1-Generation) der heterozygoten Foundermäuse Nr. 46 und Nr. 62 zusätzlich jeweils untereinander mit dem Ziel verpaart, eine homozygote Linie zu erhalten und um zu testen, ob das Transgen vererbt wird.

Da der genaue Insertionslokus der beiden transgenen Foundermäuse (Maus Nr. 46 und 62) nicht ermittelt wurde, musste zur Feststellung der Homozygotie jede transgene und damit potentiell homozygote Maus der F2-Generation mit einer Wildtypmaus (C57BL/6)

rückgekreuzt werden (Abb. 5). Falls alle Nachkommen einer derartigen Verpaarung transgen sind, so wäre nach den Grundsätzen der Mendelschen Regeln der transgene Elter homozygot für den *hicp75TNFR*.



**Abb. 5: Ausschnitt aus den Stammbäumen der beiden Zuchtlinien.** (A) Die Foundermaus Nr. 46 (F0-Generation) wurde mit einem ihrer heterozygot *hicp75TNFR*-transgenen Nachkommen aus der F1-Generation verpaart. Deren transgene Nachkommen (F2-Generation) wiederum wurden auf Homozygotie getestet, indem sie mit C57BL/6-Mäusen gekreuzt wurden. Die Nachkommen sollten im Falle eines homozygoten Elternteiles alle transgen für *hicp75TNFR* sein. (B) Zwei heterozygot *hicp75TNFR*-

transgene Nachkommen (F1-Generation) der Foundermaus Nr. 62 (F0-Generation) wurden verpaart. Deren transgene Nachkommen (F2-Generation) wurden zum Teil auf Homozygotie getestet, indem man sie mit C57BL/6-Mäusen gekreuzt und deren Nachkommen genotypisiert hat (o. Abb.). Zusätzlich wurden zwei als heterozygot transgen genotypisierte Mäuse aus der F2-Generation miteinander verpaart. Die Nachkommen dieser Verpaarung wurden ebenfalls auf Homozygotie getestet.

Die Querstriche in **(A)** und **(B)** stellen jeweils die einzelnen Mauswürfe dar. Die mit schwarzen Symbolen dargestellten Tiere **(A)** und **(B)** waren nach dem Test ihres Genotyps heterozygot. Bei den transgenen Mäusen, die in grauer Farbe symbolisiert werden, konnte kein Genotyp im Hinblick auf Homozygotie festgelegt werden, da sie entweder während der gesamten Testphase keine Nachkommen bekamen bzw. ohne Nachkommen frühzeitig verstarben oder die Mäuse wurden in Tierexperimente eingesetzt. Die sowohl in **(A)** als auch in **(B)** in blauer Farbe dargestellten Mäuse wurden nach der Genotypisierung als Wildtypmäuse eingestuft.

wt: Wildtyp

In der Linie 46 waren die Nachkommen einer männlichen transgenen Maus der F2-Generation zwar in einem Wurf einheitlich, im zweiten Wurf jedoch mit einer Ausnahme transgen für *hicp75TNFR*, wodurch die Wahrscheinlichkeit groß war, dass der männliche Elternteil homozygot ist. Leider verstarb diese Maus ohne sichtbaren Grund kurz nach dem zweiten Wurf. Alle anderen genotypisch getesteten und potentiell homozygoten Nachkommen sowohl der Mauslinie 46 (Abb. 5A) als auch der Mauslinie 62 (Abb. 5B) waren heterozygot. Zu berücksichtigen sind allerdings die Mäuse, die während der Zuchtphase ohne Nachkommen gestorben sind bzw. die zu Versuchszwecken genutzt wurden, ohne ein Ergebnis bezüglich der Homozygotie zu bekommen. Daher konnte leider auch nach intensiven Bemühungen und vielen Verpaarungen keine homozygote Mauslinie erhalten werden.

Aus diesem Grund wurden für alle folgenden Tierexperimente heterozygot *hicp75TNFR*-transgene Mäuse beider Mauslinien verwendet.

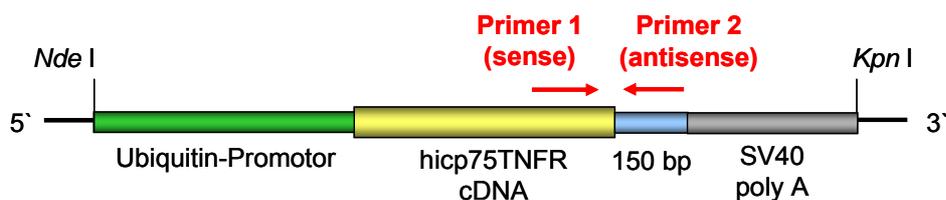
## 2. Genotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse

### 2.1. Nachweis des hicp75TNFR-Transgens in der genomischen DNA

Um sicher zu gehen, dass die Jungtiere weiterhin das Transgen für hicp75TNFR in ihrem Genom inseriert haben, wurden alle gezüchteten Mäuse daraufhin überprüft. Dafür wurde aus Schwanzspitzenbiopsien von jungen Tieren genomische DNA isoliert, um auf das Transgen zu testen.

#### 2.1.1. Nachweis des hicp75TNFR-Transgens mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

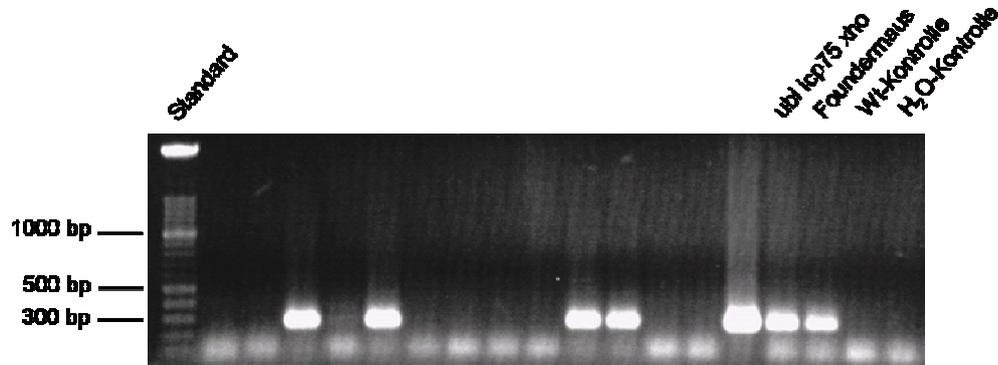
Für den Nachweis des Transgens mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurden Primer gewählt, von denen einer sich im Exon 10 der cDNA und der andere sich in der außerhalb der cDNA liegenden, 150 bp umfassenden, untranslatierten Region des inserierten Plasmids befand (Abb. 6). Als Positivkontrollen wurde der gesamte klonierte Ubi-hicp75TNFR-Vektor und eine schon als positiv-transgen getestete DNA einer Foundermaus eingesetzt. Die DNA einer Wildtypmaus bzw. Nuklease-freies Wasser dienten als Negativkontrollen (Abb. 7).



**Abb. 6: Detektion des in das Genom inserierten Transgens.** Die Lage der Primer für die PCR wurde so gewählt, dass Primer 1 (hicp75 3'out) im Exon 10 der hicp75TNFR-cDNA bindet und Primer 2 (UBI 3'Not in) sich in der 150 bp umfassenden, untranslatierte Region befindet. Das erhaltene Amplikon umfasste 280 bp.

Das erhaltene, 280 bp umfassende Amplikon wurde schließlich auf ein Agarose-Gel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Molekulargewicht der Bande,

welche die Transgenität der Mäuse beweist, wurde mit Hilfe eines entsprechenden DNA-Standards bestimmt (Abb. 7).



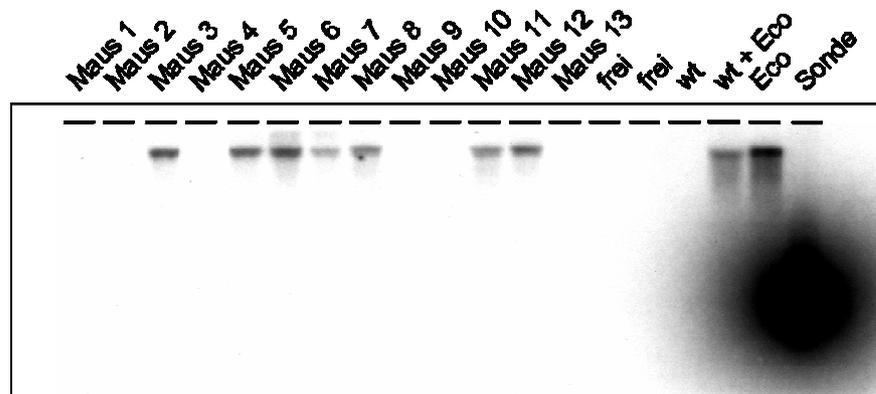
**Abb. 7: Genotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse.** Die genomische DNA aus Schwanzbiopsien transgener Nachkommen der Foundermäuse wurde mittels PCR auf Transgenität geprüft. Die Bande bei 280 bp beweist die Anwesenheit des Transgens in den einzelnen Mäusen. Als Positivkontrollen setzte man den Ubi-hicp75TNFR-Vektor (ubi icp75 xho), sowie die genomische DNA der Foundermouse Nr. 46 ein. Die DNA einer Wildtypmaus (Wt) und Nuklease-freies Wasser dienten als Negativkontrollen.

### 2.1.2. Nachweis des hicp75TNFR-Transgens durch Southern-Hybridisierung

Um die Ergebnisse aus den PCR-Analysen zu bestätigen, wurde als weitere Möglichkeit das Transgen in genomischer DNA nachzuweisen, die Southern-Hybridisierung gewählt. Die aus den Mausschwanzbiopsien isolierte genomische DNA wurde mit den beiden Restriktionsenzymen *Hind* III und *Bam*HI verdaut (Abb. 3). Nachdem die DNA in einem Kontrollgel auf die Qualität des Verdaus hin geprüft war, wurde diese DNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen, nach der Elektrophorese auf eine Membran transferiert und anschließend hybridisiert. Als spezifische Sonden dienten  $^{32}\text{P}$  radioaktiv markierte Fragmente, die in ihrer Sequenz identisch mit den in der PCR-Analyse verwendeten Primern waren (Abb. 6).

Um geeignete Positivkontrollen zu verwenden, wurde der Ubi-hicp75TNFR-Vektor mit Hilfe des *Eco*RI-Enzymes verdaut (Abb. 3). Das somit erhaltene Fragment (Eco-Fragment) wurde zum einen direkt als Kontrolle benutzt und zum anderen zu einer Wildtyp-DNA gemischt, um zu zeigen, dass unter den angewendeten Aufarbeitungs- und Hybridisierungsbedingungen das hicp75TNFR-Transgen nachweisbar ist.

Durch Hybridisierung wurde das Transkript für den *hicp75TNFR* in den dafür transgenen Mäusen nachgewiesen (Abb. 8).

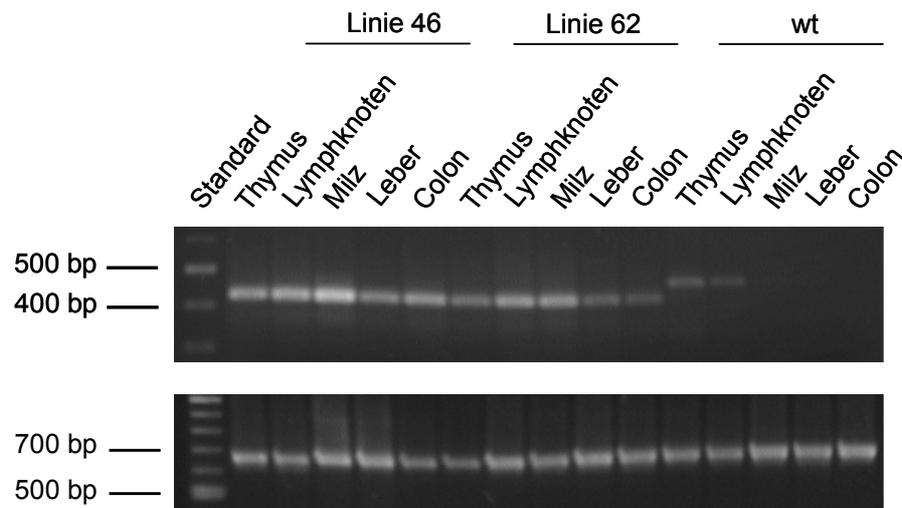


**Abb. 8: Nachweis der *hicp75TNFR* cDNA in transgenen Mäusen.** Den Nachkommen der Foundermäuse wurde genomische DNA entnommen und diese in der Southern-Blot Analyse untersucht. Die Banden beweisen jeweils die Transgenität der einzelnen Mäuse. Für die Positivkontrollen verwendete man die Sonde, ein Eco-Fragment (Eco) des Ubi-*hicp75TNFR*-Vektors, das nach Verdau durch das Restriktionsenzym *Eco RI* erhalten wurde, sowie die Kombination aus Wildtyp-DNA und Eco-Fragment (wt + Eco), wodurch die Einhaltung der Hybridisierungsbedingungen überprüft werden konnte. Als Negativkontrolle wurde eine Wildtyp-DNA (wt) eingesetzt.

## 2.2. Nachweis der Transkription des *hicp75TNFR*-Transgens

Nach erfolgreichem Nachweis des Transgens auf DNA-Ebene, sollte nun der *hicp75TNFR* auf RNA-Ebene detektiert werden.

Dafür wurden aus transgenen Mäusen der Linie 46 bzw. 62 und aus Wildtypmäusen jeweils verschiedene Organe präpariert und daraus Gesamt-RNA isoliert. Anschließend erfolgte eine RT-PCR mit für *hicp75TNFR* sowie für  $\beta$ -Actin spezifischen Primern. Die Untersuchungen ergaben, dass die Transkripte für *hicp75TNFR* in Thymus, Milz, mesenterialen Lymphknoten, Colon und Leber der transgenen Tiere beider Linien nachweisbar sind. Die PCR mit den spezifischen Primern für das „housekeeping“-Gen  $\beta$ -Actin belegte die gleichmäßige Durchführung (Abb. 9).



**Abb. 9: Nachweis der hicp75TNFR-Expression in der Gesamt-RNA aus Organen.** Aus beiden Mauslinien der hicp75TNFR-transgenen Mäuse (Linie 46 und 62) sowie aus deren Wildtypmäusen (wt) wurden lymphoide Organe, wie Thymus, Lymphknoten und Milz, sowie Leber und Colon isoliert. Die daraus präparierte Gesamt-RNA wurde in cDNA transkribiert und nach RT-PCR im Agarose-Gel aufgetrennt. Die im oberen Gelbild vorhandenen Banden bei ca. 430 bp wiesen auf die Expression des hicp75TNFR in der Gesamt-RNA unterschiedlicher Organe der transgenen Mäuse hin. Die entsprechende  $\beta$ -Actinkontrolle wird im unteren Gelbild dargestellt.

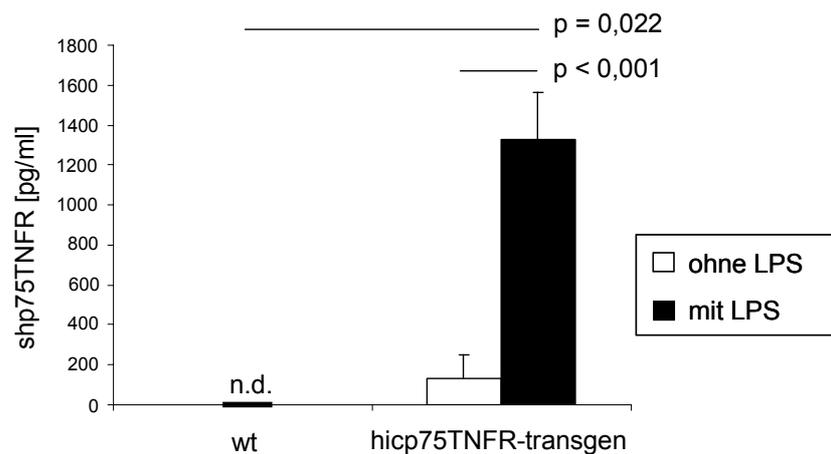
### 2.3. Nachweis des hicp75TNFR-Proteins in transgenen Mäusen

Nach Stimulierung, z. B. mit LPS, wird die Extrazellulärdomäne des membranständigen p75TNFR durch die Metalloprotease TACE, auch bekannt als ADAM17, von der Zelloberfläche abgespalten (Moss, 1997). Diese lösliche Form des Rezeptors kann somit *in vitro* in Zellüberständen bzw. *in vivo* im Plasma oder Serum mit Hilfe der ELISA-Technik detektiert werden.

Da sich die Extrazellulärdomäne des hicp75TNFR nur durch das Vorhandensein des Exons 1a anstatt des Exons 1 von dem hp75TNFR unterscheidet, konnte man davon ausgehen, dass nach Gabe eines Stimulus auch im Serum hicp75TNFR-transgener Mäuse dieser lösliche Rezeptor nachweisbar sein muss.

Folglich erhielten transgene Mäuse bzw. Wildtypmäuse LPS intraperitoneal, bevor nach 90 min. den Tieren Blut abgenommen wurde. Das daraus gewonnene Serum der einzelnen Mäuse wurde im ELISA auf die Anwesenheit des löslichen hp75TNFR

(shp75TNFR) und damit die hcp75TNFR-Expression geprüft. Im Gegensatz zu Wildtyptieren wurde im Serum der transgenen Mäuse dieses Protein detektiert. Nach LPS-Gabe erhöhte sich die Konzentration an löslichem hcp75TNFR signifikant (Abb. 10). Dies bestätigte, dass hcp75TNFR als Protein an die Zelloberfläche transportiert und durch proteolytische Enzyme abgespalten werden kann.



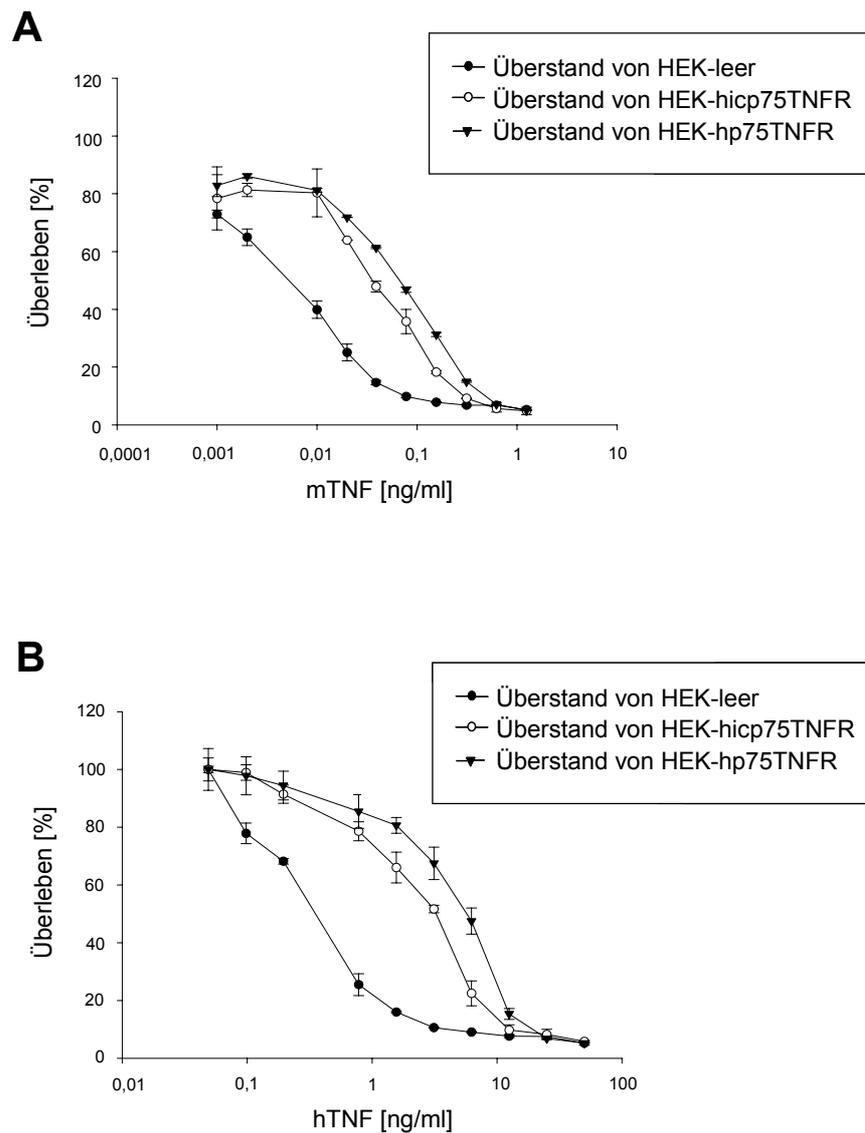
**Abb. 10: ELISA auf shp75TNFR.** Wildtypmäusen (wt) (n=3) und hcp75TNFR-transgenen Mäusen (n=12) wurde LPS [50 µg / kg] i.p. injiziert und nach 90 min. Blut abgenommen. Die jeweiligen Mauseren wurden im ELISA eingesetzt und auf löslichen hp75TNFR (shp75TNFR) detektiert. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung. n. d.: nicht detektierbar

### **3. Phänotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse und p75TNFR-defizienten Mäuse**

#### **3.1 Nachweis der Bindungsfähigkeit für mTNF**

Nachdem gezeigt war, dass der hicp75TNFR als Protein in den transgenen Mäusen vorliegt, sollte getestet werden, ob dieser humane Rezeptor wie sein Isomer, der hp75TNFR, seinen Liganden, den Maus-Tumor-Nekrose-Faktor (mTNF), binden kann.

Dafür wurden L929-Zellen mit abnehmenden Konzentrationen von mTNF zusammen mit Überständen aus hicp75TNFR- bzw. hp75TNFR-transient transfizierten HEK-Zellen inkubiert. Aktivierung des mp55TNFR durch mTNF führt zum Zelltod. In Gegenwart von löslichem p75TNFR jedoch, der als Positivkontrolle dient, wird das toxische mTNF im Überstand gebunden und steht somit zur Aktivierung des mp55TNFR nicht mehr zur Verfügung. Der lösliche Rezeptor, der mTNF binden kann, wirkt somit als Inhibitor. Daher überleben in diesem Zytotoxizitätstest die Zellen besser, die in Gegenwart von löslichem Rezeptor im Überstand inkubiert werden. Um die Zellen für die Zytotoxizität zu sensibilisieren, wurde Actinomycin D zugesetzt, welches als RNA-Polymerase-Inhibitor die Proteinbiosynthese hemmt. Wie in Abb. 11A zu sehen ist, unterscheidet sich in Anwesenheit von mTNF die Überlebensrate der L929-Zellen, die zusammen mit löslichem hicp75TNFR inkubiert wurden, kaum von denen, die mit löslichem hp75TNFR inkubiert wurden. Dieser indirekte Nachweis zeigt, dass auch der hicp75TNFR mTNF binden und im Zytotoxizitätstest L929-Zellen schützen kann. Als zusätzliche Positivkontrolle für diesen Test wurde anstatt mTNF die humane Form des Tumor-Nekrose-Faktors (hTNF) eingesetzt, von dem bekannt ist, dass er sowohl an hicp75TNFR als auch an hp75TNFR bindet (Abb. 11B). Zusätzlich wurden Überstände aus HEK-Zellen verwendet, die mit einem Leervektor transfiziert waren, und daher als Negativkontrollen zu betrachten sind.

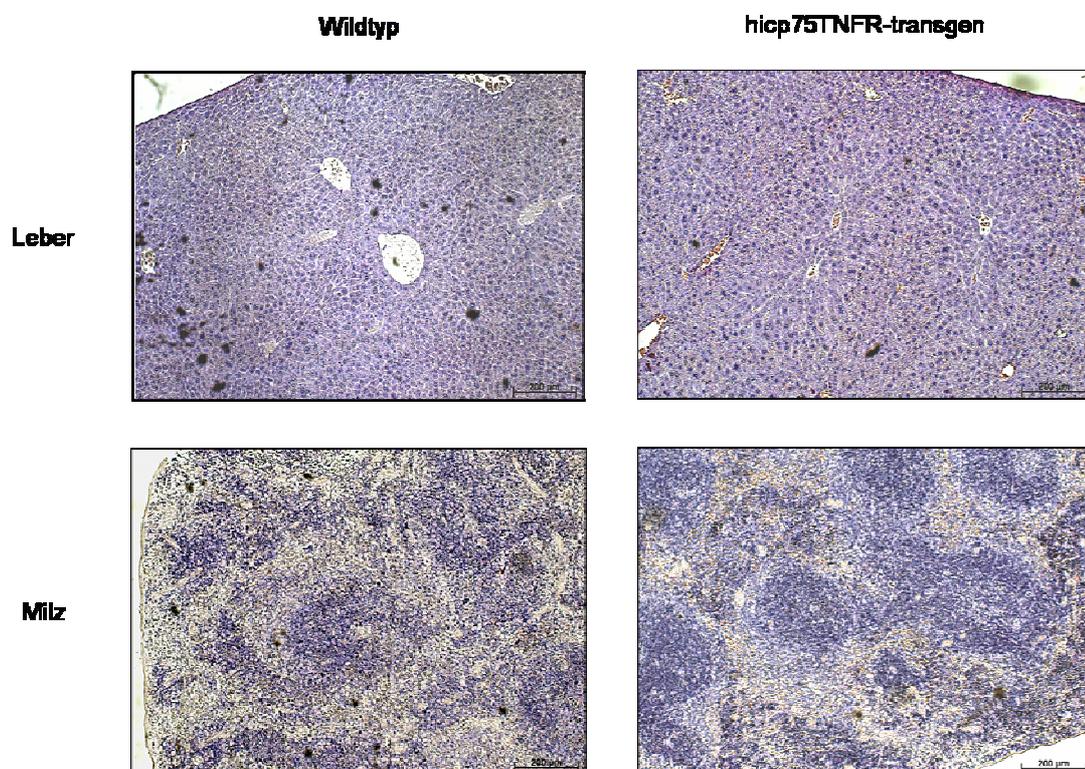


**Abb. 11: TNF-induzierter Zytotoxizitätstest mit konditioniertem Medium.** L929-Zellen wurden jeweils mit Überständen der Transfektanden sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen an mTNF (max. Konzentration: 1,25 ng/ml) (A) bzw. hTNF (max. Konzentration: 50 ng/ml) (B) inkubiert.

Da somit gezeigt wurde, dass hicp75TNFR mTNF binden kann, war die Voraussetzung erfüllt, um als humaner Rezeptor eine Funktion im Maussystem prinzipiell übernehmen zu können.

### 3.2. Untersuchung der Organstrukturen der *h1cp75TNFR*-transgenen Mäuse

Da die *h1cp75TNFR*-transgenen Mäuse äußerlich keine erkennbaren Unterschiede zu Wildtypmäusen aufwiesen, wurden verschiedene Organe histologisch untersucht. Weder in lymphatischen Organen wie Milz, mesenterialen Lymphknoten, Thymus oder Peyer'sche Plaques, noch in nicht-lymphatischen Organen wie Colon, Intestinum und Leber wurden makroskopische oder mikroskopische Auffälligkeiten beobachtet (Abb. 12).

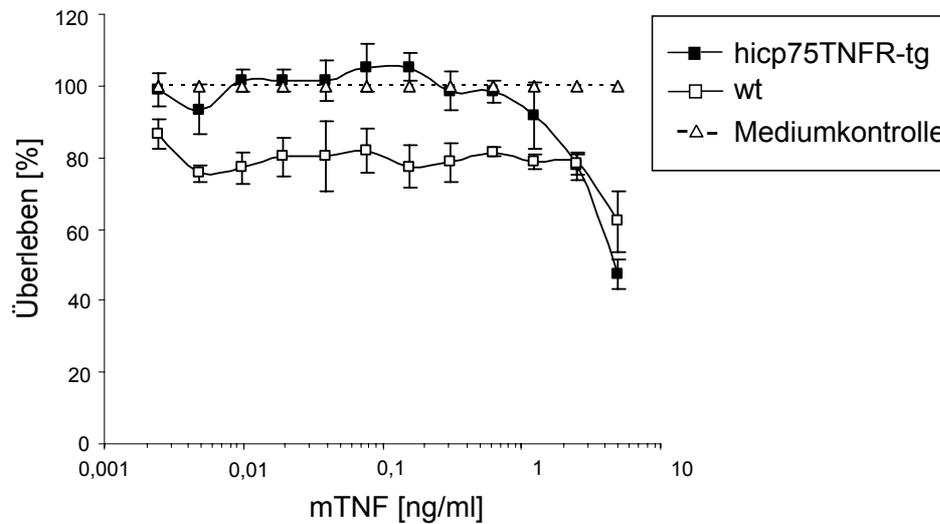


**Abb. 12: Beispiele aus histologischen Schnitten der Organe.** Die Paraffinschnitte der jeweiligen Organbiopsien wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Sie sind jeweils in 100-facher Vergrößerung dargestellt (Meßbalken: 200 µm).

In den transgenen Mäusen ließen sich keine Veränderungen im Aufbau und in der Struktur der Organe erkennen. Ihre Architektur unterschied sich nicht von der in Wildtypmäusen.

### 3.3. Untersuchungen des hicp75TNFR auf Makrophagen transgener Mäuse

Im TNF-induzierten Zytotoxizitätstest an transient transfizierten Zellen (Abb. 11) wurde gezeigt, dass der lösliche hicp75TNFR wie der lösliche p75TNFR vor Zelltod durch Neutralisieren des TNF schützt. Anstelle von *in vitro* hergestellten hicp75TNFR-Transfektanden sollte an Makrophagen aus dem Peritoneum, die p75TNFR bzw. icp75TNFR auf der Oberfläche exprimieren, dies *ex vivo* überprüft werden. Dafür wurden Makrophagen aus dem Peritonealexsudat (PEC) von hicp75TNFR-transgenen Mäusen und von Wildtypmäusen isoliert. Nach Stimulierung der Makrophagen mit unterschiedlichen Konzentrationen an mTNF wurde die mitochondriale Aktivität durch Umsetzung von MTT in Formazan gemessen. Je größer die Vitalität der Zellen ist, desto kräftiger ist die Blaufärbung durch entstandenes Formazan. Diese Blaufärbung wurde im UV-Meter bei 540 nm gemessen. Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, neutralisierte hicp75TNFR im Überstand hicp75TNFR-transgener Makrophagen mTNF soweit, dass es für die Makrophagen weniger toxisch war. Während die Überlebensrate der Wildtyp-Makrophagen in niedrigeren mTNF-Konzentrationen bei ca. 80 % lag, überlebten die Makrophagen der transgenen Tiere nahezu hundertprozentig. Sowohl bei Makrophagen aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen als auch aus Wildtypmäusen stieg die Zytotoxizität ab einer mTNF-Konzentration von 2,5 ng/ml an. Durch die Überexpression des hicp75TNFR und die damit erhöhte Kapazität, mTNF zu binden, verbesserte sich also bei niedrigeren mTNF-Konzentrationen die Überlebensrate der Makrophagen.



**Abb. 13: mTNF-induzierter Zytotoxizitätstest an Makrophagen.** Makrophagen aus dem Peritonealexsudat von hicp75TNFR-transgenen Mäusen wurden mit mTNF (max. Konzentration: 5 ng/ml) in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die Überlebensrate der Makrophagen wurde durch Umsetzung von MTT in Formazan photometrisch ermittelt. Als Kontrollen dienten Makrophagen, die in Medium ohne TNF kultiviert wurden (Mediumkontrolle), sowie Makrophagen aus Wildtypmäusen (wt).

Somit besaßen sowohl die mit dem Transgen transfizierten Zellen als auch die aus transgenen Mäusen isolierten Makrophagen, die hicp75TNFR exprimierten, die Möglichkeit, ein gewisses Quantum an mTNF zu binden und damit Zielzellen vor TNF-vermittelter Toxizität zu schützen.

### 3.4. Untersuchungen zur Funktion des p75TNFR und hicp75TNFR in Entzündungsmodellen

#### 3.4.1. Akute DSS-induzierte Colitis

TNF als proinflammatorisches Zytokin und seine Rezeptoren spielen bei vielen entzündlichen Erkrankungen sowohl beim Menschen als auch in der Maus eine zentrale Rolle.

Im Modell der DSS-induzierten Colitis wird Mäusen Trinkwasser mit DSS verabreicht, um dadurch innerhalb einer Woche eine akut entzündliche Darmerkrankung zu

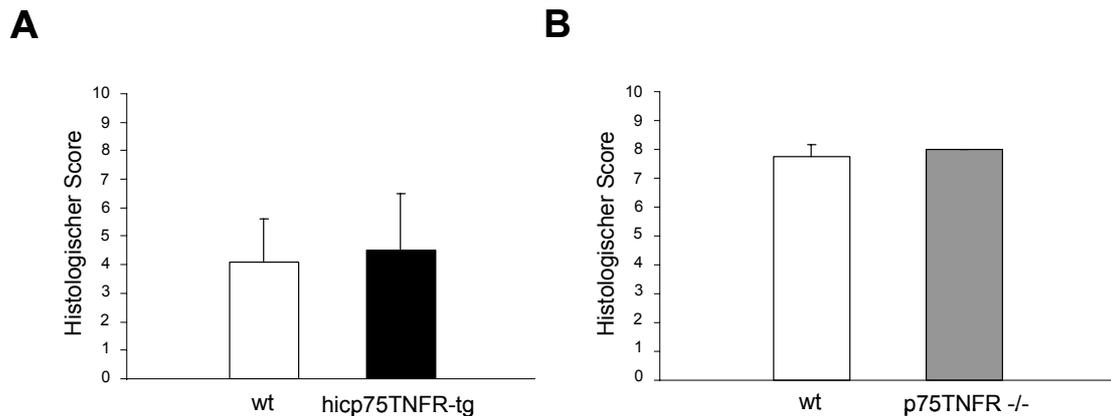
induzieren. Nach 7 Tagen werden die Mäuse auf charakteristische Parameter einer akuten Colitis hin untersucht. Als Kontrollen für die hicp75TNFR-transgenen Mäuse wurden Wildtypmäuse eingesetzt, die zwar nicht den hicp75TNFR als Transgen tragen, aber sehr wohl sein Maus-Isomer, den mp75TNFR. Um eine Signaltransduktion über den p75TNFR komplett auszuschalten, dienten zusätzlich p75TNFR-defiziente Mäuse, mit deren Hilfe die Funktion des mp75TNFR untersucht werden sollte. Sie waren somit eine Art „Negativkontrolle“ zu den transgenen Mäusen.

#### 3.4.1.1. Histologische Auswertung

Um das Ausmaß der akuten Colitis bemessen zu können, dient v. a. der histologische Score als zuverlässiges Mittel. Dabei werden Biopsien des distalen Dickdarmendes entnommen und anschließend die Hämatoxylin-Eosin gefärbten Darmschnitte nach einem festgelegten Scoremuster beurteilt. Im Falle der transgenen Mäuse war - wie auch in den entsprechenden Kontrollmäusen - ein flächenhafter Verlust an Becherzellen zu erkennen. Zwischen Krypten und der *Lamina muscularis mucosae* befand sich entzündliches Infiltrat. Daher hatten die Darmbiopsien beider Mausgruppen einen ähnlich hohen histologischen Score (Abb. 14A).

Auch die p75TNFR-defizienten Mäuse zeigten im Vergleich zu ihren Kontrollen keine Veränderung im Ausmaß der Darmentzündung. Es wurde ein großflächiger Verlust der Krypten und Becherzellen beobachtet, sowie entzündliches Infiltrat, das bereits bis in die Submucosa reichte. Das Gewebe war in allen Mäusen aufgeschwollen und mit Ödemen versetzt. Der Schweregrad der Colitis wurde in beiden Mausgruppen mit einem hohen histologischen Score bewertet (Abb. 14B).

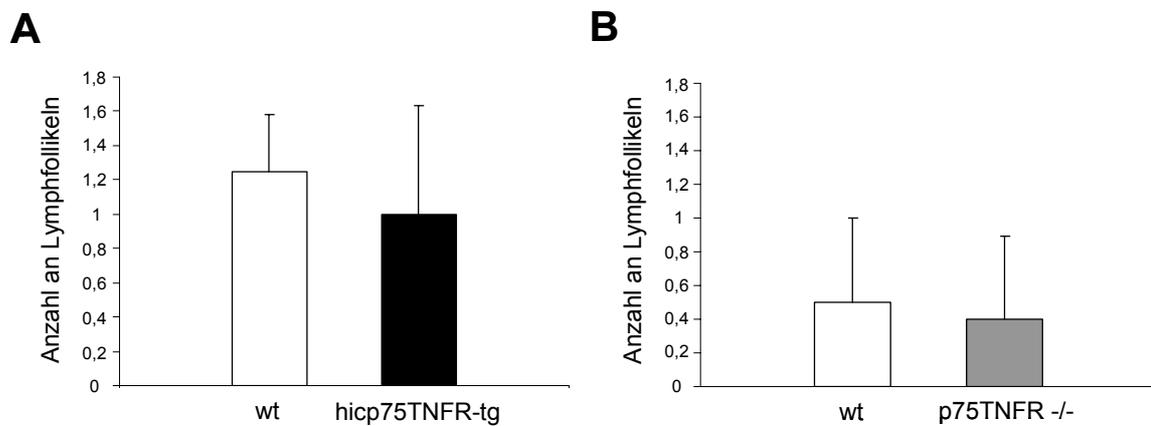
Der unterschiedliche genetische Hintergrund könnte der Grund dafür sein, dass bei gleicher Behandlung die Gruppe der p75TNFR-defizienten Mäuse zusammen mit den Kontrolltieren (C57BL/6) einen insgesamt höheren Score als die Gruppe der hicp75TNFR-transgenen Mäuse einschließlich ihrer Kontrollen (C57BL/6 x FvB) aufwiesen.



**Abb. 14: Histologischer Score.** Das Ausmaß der akuten DSS-induzierten Colitis wurde anhand dieses Scores an Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Dickdarmbiopsien ermittelt. **(A)** Die Biopsien stammten von h1cp75TNFR-transgenen Mäusen (n=10) bzw. Wildtypmäusen (wt; C57BL/6 x FvB) (n=10). **(B)** Die Biopsien wurden p75TNFR-defizienten Mäusen (n=5) bzw. C57BL/6-Mäusen (wt) (n=5) entnommen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

#### 3.4.1.2. Anzahl der Lymphfollikel

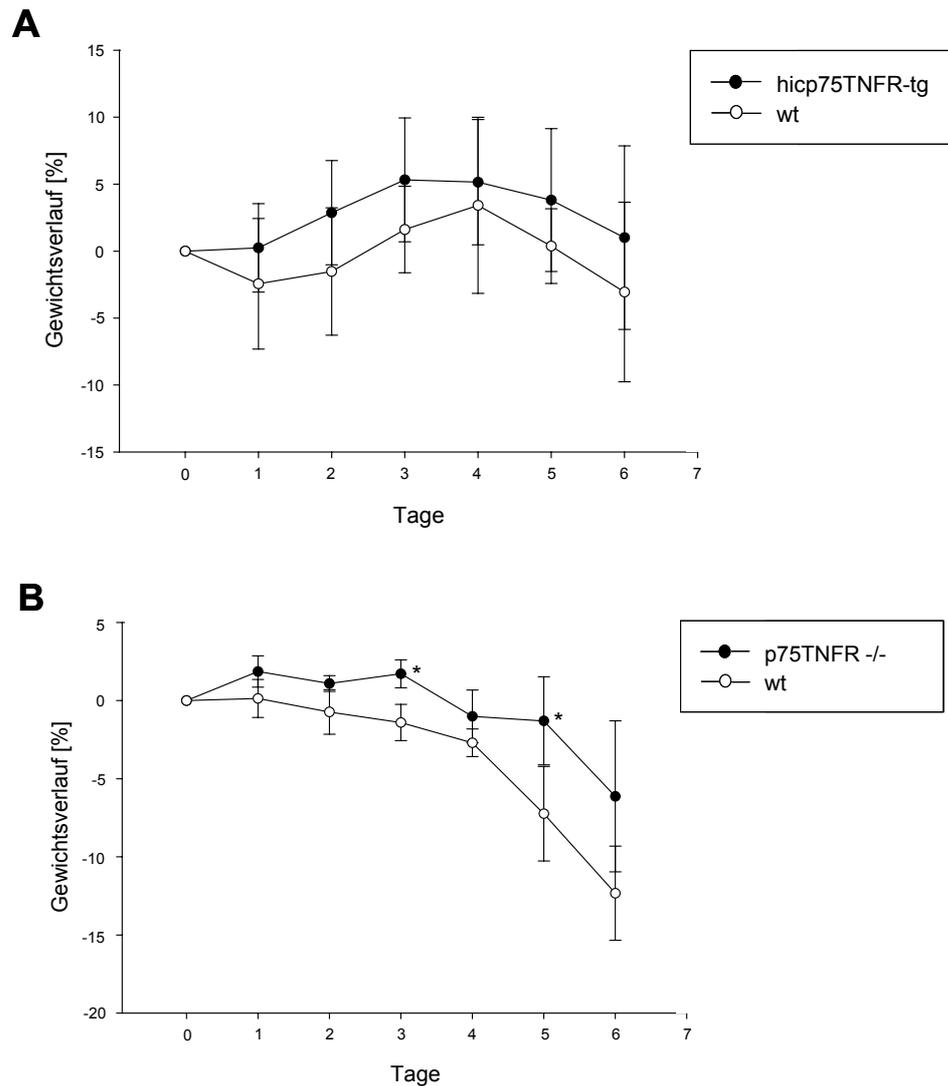
Ein weiteres Maß für die intestinale Inflammation ist die Anzahl an Entzündungs-induzierten Lymphfollikeln. Je mehr tertiäre Lymphfollikel sich in der Lamina propria des Colons befinden, desto stärker ist der Entzündungsgrad. Der histologische Befund der Dickdarmschnitte von DSS-behandelten Mäusen zeigte, dass sich die Mausgruppen auch dahingehend nicht unterschieden (Abb. 15).



**Abb. 15: Anzahl der Lymphfollikel.** Die Dickdarmbiopsien zur Ermittlung der Lymphfollikelanzahl stammten in **(A)** aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen (n=10) bzw. Wildtypmäusen (wt; C57BL/6 x FvB) (n=10) und in **(B)** aus p75TNFR-defizienten Mäusen (n=5) bzw. C57BL/6-Mäusen (wt) (n=5). Allen Mäusen wurde durch DSS-Gabe eine akute Colitis induziert. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

### 3.4.1.3. Gewichtsverlauf

Da der Zeitraum einer DSS-induzierten akuten Colitis 7 Tage umfasst, kann aus dem Gewichtsverlauf innerhalb dieser Woche Rückschlüsse auf das allgemeine Befinden der Mäuse gezogen werden. Im Falle der hicp75TNFR-transgenen Mäuse unterschied sich der Gewichtsverlauf kaum von dem der Wildtypmäuse (Abb. 16A). Die p75TNFR-defizienten Mäuse allerdings zeigten am Tag 3 und am Tag 5 eine statistisch signifikante geringere Gewichtsabnahme im Vergleich zu Wildtypmäusen. Insgesamt ging es den Mäusen, die den p75TNFR nicht exprimieren, systemisch besser, da die Gewichtsabnahme tendenziell geringer war (Abb. 16B).

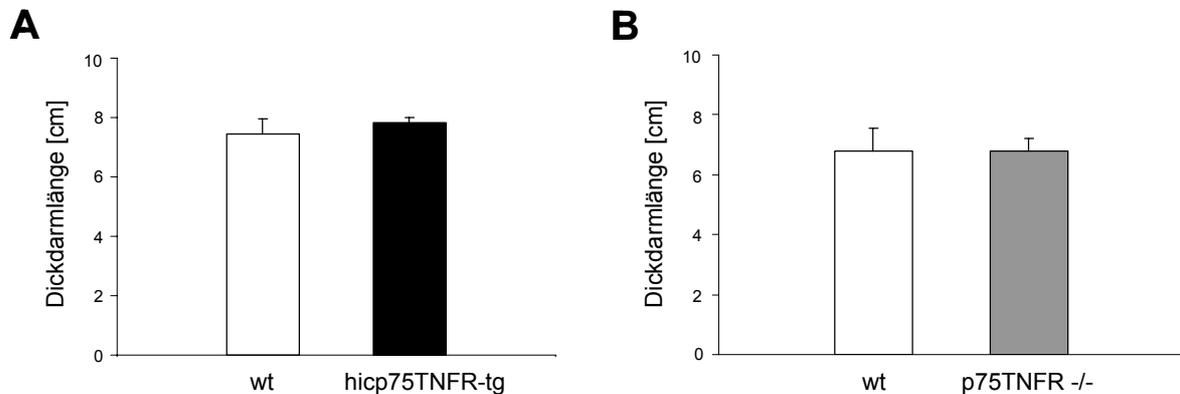


**Abb. 16: Gewichtsverlauf während der Induktion einer akuten Colitis.** Die gemessenen Gewichtsänderungen der hicp75TNFR-transgenen Mäuse (n=10) bzw. Wildtypmäuse (wt; C57BL/6 x FvB) (n=10) (**A**) und der p75TNFR-defizienten Mäuse (n=5) bzw. C57BL/6-Mäuse (wt) (n=5) (**B**) beziehen sich jeweils auf das Ausgangsgewicht der einzelnen Mäuse am Tag 0. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* bedeutet  $p < 0,05$ .

#### 3.4.1.4. Dickdarmlänge

Im Verlauf einer akuten Colitis schwillt das Dickdarmgewebe an und durch Wassereinlagerungen bilden sich Ödeme. Die daraus resultierende Verkürzung des Colons ist desto stärker ausgeprägt je entzündeter der Darm ist. Wie aus Abb. 17

ersichtlich wird, ergaben sich keine Unterschiede in den Mausgruppen hinsichtlich der Dickdarmlänge.



**Abb. 17: Dickdarmlänge.** Die Länge des Colons wurde nach einer akuten DSS-induzierten Colitis von hicp75TNFR-transgenen Mäusen (n=10) bzw. Wildtypmäusen (wt; C57BL/6 x FvB) (n=10) (A) und von p75TNFR-defizienten Mäusen (n=5) bzw. C57BL/6-Mäusen (wt) (n=5) (B) gemessen. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

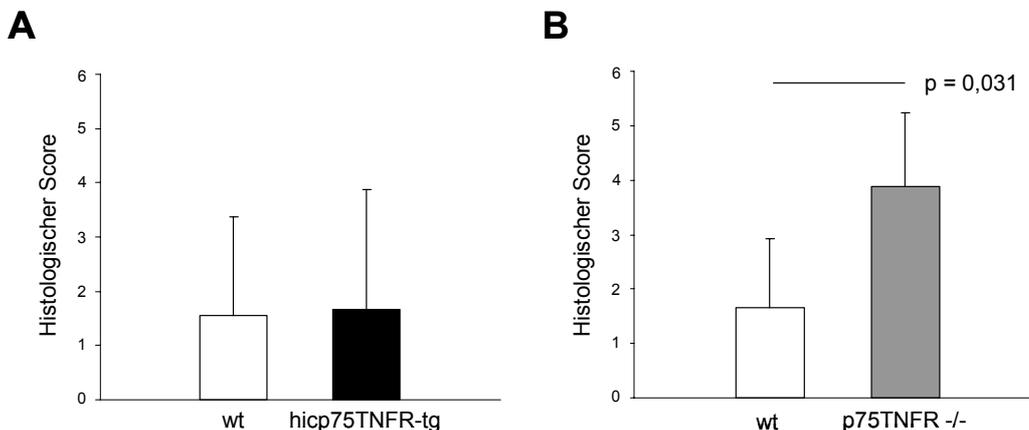
### 3.4.2. Chronische DSS-induzierte Colitis

Wie bereits gezeigt wurde, führt in der chronischen Phase einer DSS-induzierten Colitis die Neutralisierung von TNF zu einer Verminderung der Darmentzündung (Kojouharoff, 1997). Um die Bedeutung des p75TNFR im chronischen Verlauf einer Inflammation zu untersuchen, wurde dieses Modell in Mäusen eingesetzt, die entweder den p75TNFR bzw. den icp75TNFR vermehrt oder überhaupt nicht exprimieren. hicp75TNFR-transgene Mäuse und ihre entsprechenden Wildtypmäuse wurden nach Induktion einer chronischen Colitis auf die Parameter hin untersucht, die das Ausmaß der entzündlichen Erkrankung charakterisieren. Zusätzlich wurden diese Versuche mit p75TNFR-defizienten Mäusen bzw. den entsprechenden Wildtypmäusen durchgeführt, um die Auswirkungen im Falle eines Fehlens des p75TNFR zu erfassen.

### 3.4.2.1. Histologische Auswertung

Wie in der akuten Colitis so dient auch in der chronischen Colitis der histologische Befund und der damit verbundene Score als zuverlässiger Parameter für den Grad der Entzündung. In den Schnitten der Dickdarmbiopsien *hicp75TNFR*-transgener Mäuse zeigte sich ein geringer Verlust an einzelnen Becherzellen. An der Kryptenbasis konnte nur wenig entzündliches Infiltrat beobachtet werden. Dies entspricht dem histologischen Score der Wildtypmäuse (Abb. 18A). Beide Mausgruppen hatten somit in diesem Modell eine geringe Entzündung des Colons.

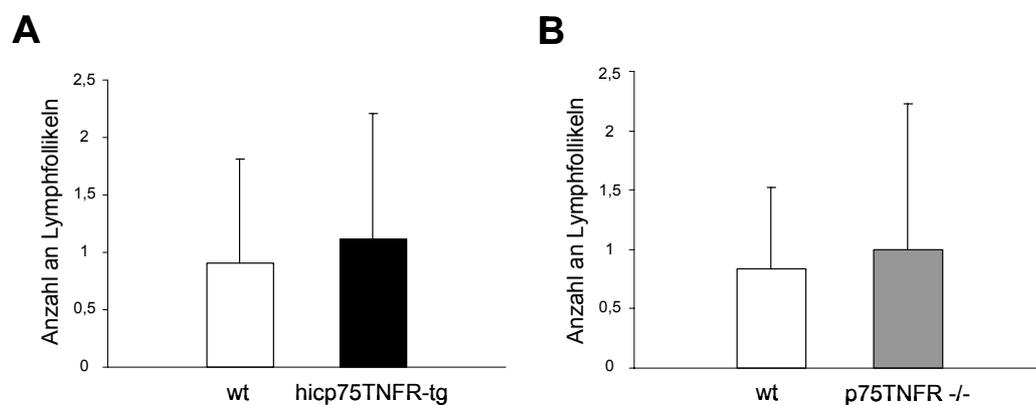
Im Gegensatz dazu entwickelten die *p75TNFR*-defizienten Mäuse einen signifikant höheren histologischen Score als die Wildtypmäuse (Abb. 18B). Neben vielen Bereichen mit entzündlichem Infiltrat, das bis in die *Lamina muscularis mucosae* reichte, waren teilweise aufgeschwollene Gewebe mit Ödembildungen feststellbar. Außerdem war im Gegensatz zu den Wildtypmäusen der Epithelschaden des Dickdarms durch einen flächenhaften Verlust an Becherzellen gekennzeichnet. Die intestinale Entzündung war folglich in Mäusen, in denen keine Signaltransduktion über den *p75TNFR* stattfinden kann, stärker ausgeprägt als in den Vergleichsmäusen.



**Abb 18 : Histologischer Score.** Das Ausmaß der Entzündung einer chronischen DSS-induzierten Colitis wurde anhand des histologischen Scores bestimmt. Die Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Biopsien des distalen Dickdarms stammten aus (A) *hicp75TNFR*-transgenen Mäusen (n=9) bzw. entsprechenden Wildtypmäusen (wt; C57BL/6 x FvB) (n=11). In (B) entnahm man Dickdarmbiopsien aus *p75TNFR*-defizienten Mäusen (n=8) sowie C57BL/6 Mäusen (wt) (n=6). Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

### 3.4.2.2. Anzahl der Lymphfollikel

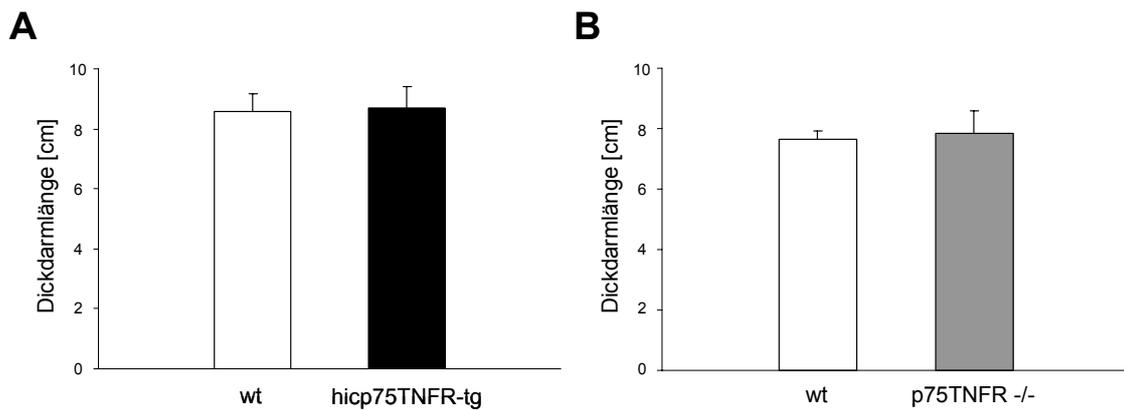
Ebenso wie in der akuten Entzündung können sich im Verlauf einer chronischen Colitis tertiäre lymphoide Strukturen bilden. Die Anzahl dieser induzierten Lymphfollikel, die im histologischen Schnitt festgestellt werden kann, war allerdings in allen Mausgruppen gleich (Abb. 19).



**Abb. 19: Anzahl der Lymphfollikel.** Die Lymphfollikelanzahl wurde anhand histologischer Schnitte von distalen Dickdarmbiopsien bestimmt. Diese Gewebe stammen in (A) aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen (n=9) sowie entsprechenden Wildtypmäusen (wt; C57BL/6 x FvB) (n=11). In (B) wurden Biopsien von p75TNFR-defizienten (n=8) und C57BL/6 Mäusen (wt) (n=6) untersucht. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

### 3.4.2.3. Dickdarmlänge

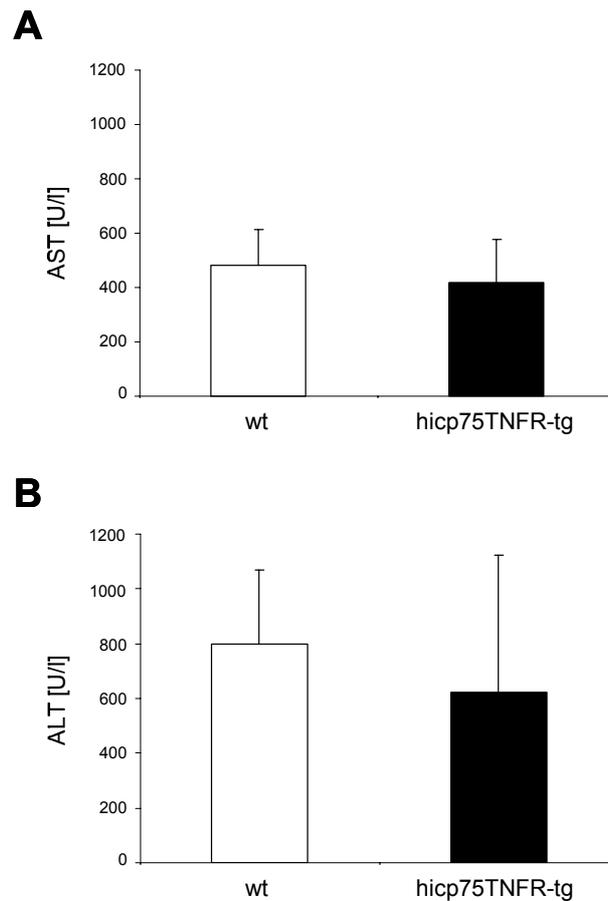
Für einen weiteren Hinweis auf den Darmentzündungsstatus der Maus ebenso nach chronischer DSS-Gabe eignet sich das Messen der Colonlänge. Auch hier differierten weder die hicp75TNFR-transgenen Mäuse noch die p75TNFR-defizienten Mäuse von den Wildtypmäusen (Abb. 20A und B).



**Abb. 20: Dickdarmlänge.** Nach der chronisch induzierten DSS-Colitis wurde die Länge des Colons der (A) hicp75TNFR-transgenen Mäuse (n=9) bzw. der entsprechenden Wildtypmäuse (wt; C57BL/6 x FvB) (n=11), und der (B) p75TNFR-defizienten Mäuse (n=8) bzw. der C57BL/6 Mäuse (wt) (n=6) gemessen. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung.

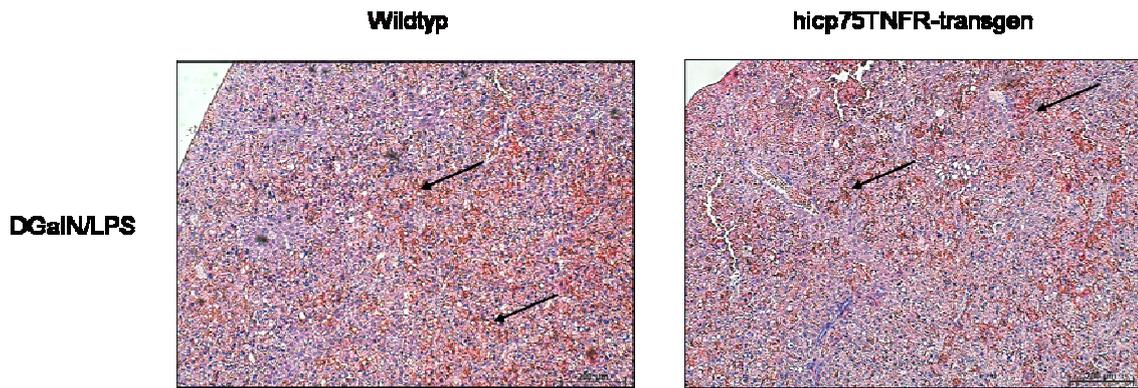
### 3.4.3. Untersuchung der DGalN/LPS-induzierten Hepatotoxizität

Ein anderes Modell für eine akute Entzündung, in dem TNF als proinflammatorischer Mediator eine wichtige Stellung einnimmt, ist die Lebertoxizität. In der Maus kann eine akute hepatische Entzündung durch bestimmte Toxine, beispielsweise durch Bakterienzellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS), ausgelöst werden. Um die Tiere dafür zu sensibilisieren, injiziert man LPS in Kombination mit D-Galaktosamin (DGalN) in das Peritoneum (i. p.) (Galanos, 1979). Im Serum wird die Konzentration der Leberenzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) gemessen, die während einer Leberschädigung vermehrt vorliegen. Wie in Abb. 21 dargestellt ist, zeigten die hicp75TNFR-transgenen Mäuse keinen veränderten Entzündungsstatus im Vergleich zu den Wildtypmäusen. In beiden Mausgruppen waren Transferasekonzentrationen detektierbar, die eine Entzündung der Leber indizierten, sich mengenmäßig aber nicht signifikant von denen in Kontrollmäusen unterschieden.



**Abb. 21: Konzentration der Aminotransferasen im Serum.** Wildtypmäusen (wt) (n=3) und hcp75TNFR-transgenen Mäusen (n=3) wurde durch i. p. Injektion von DGalN und LPS eine akute Lebertoxizität induziert. Nach 5 h wurde den Mäusen Blut entnommen und im Serum die Konzentration des in (A) dargestellten Leberenzym Aspartat-Aminotransferase (AST) bzw. des in (B) aufgetragenen Enzyms Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Auch eine Leberhistologie der Testmäuse zeigte in beiden Gruppen gleichermaßen vorkommende Areale mit vielen nekrotischen Bereichen mit Einblutungen (Abb. 22).

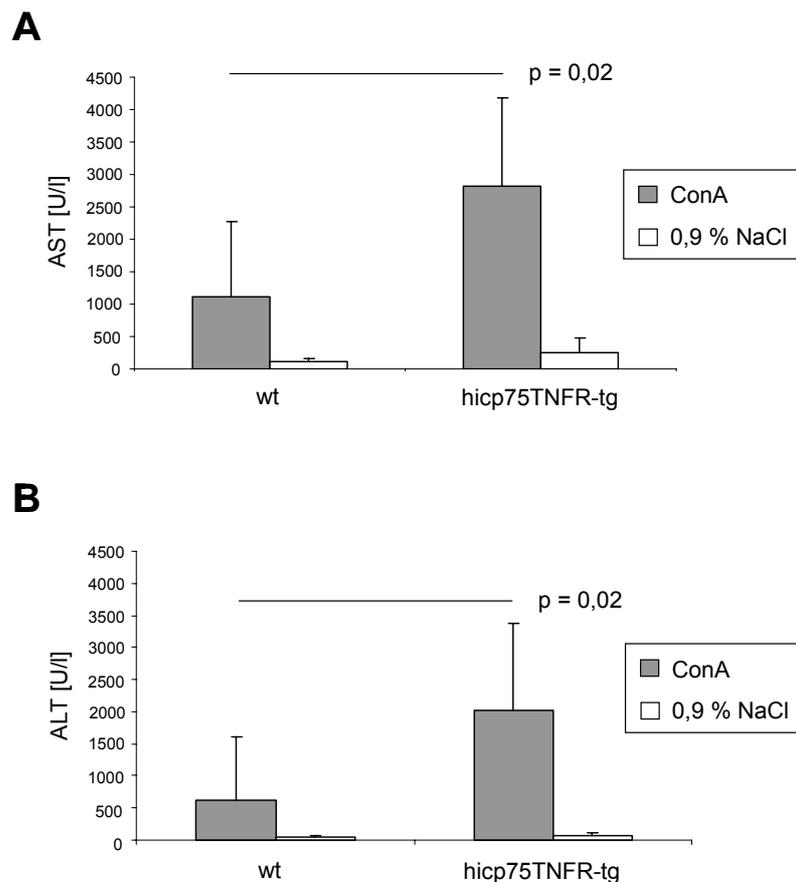


**Abb. 22: Mikroskopische Aufnahmen der Leber aus DGalN/LPS-behandelten Mäusen.** 5 h nach i. p. Injektion von DGalN/LPS wurden Wildtyp- und hicp75TNFR-transgenen Mäusen Leberbiopsien entnommen. Die davon präparierten Paraffinschnitte wurden mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. In der 100-fachen Vergrößerung sind die zahlreichen Einblutungen (Pfeile) im nekrotischen Gewebe deutlich zu erkennen. Meßbalken: 200 µm

#### 3.4.4. Untersuchung der Con A-induzierten Hepatotoxizität

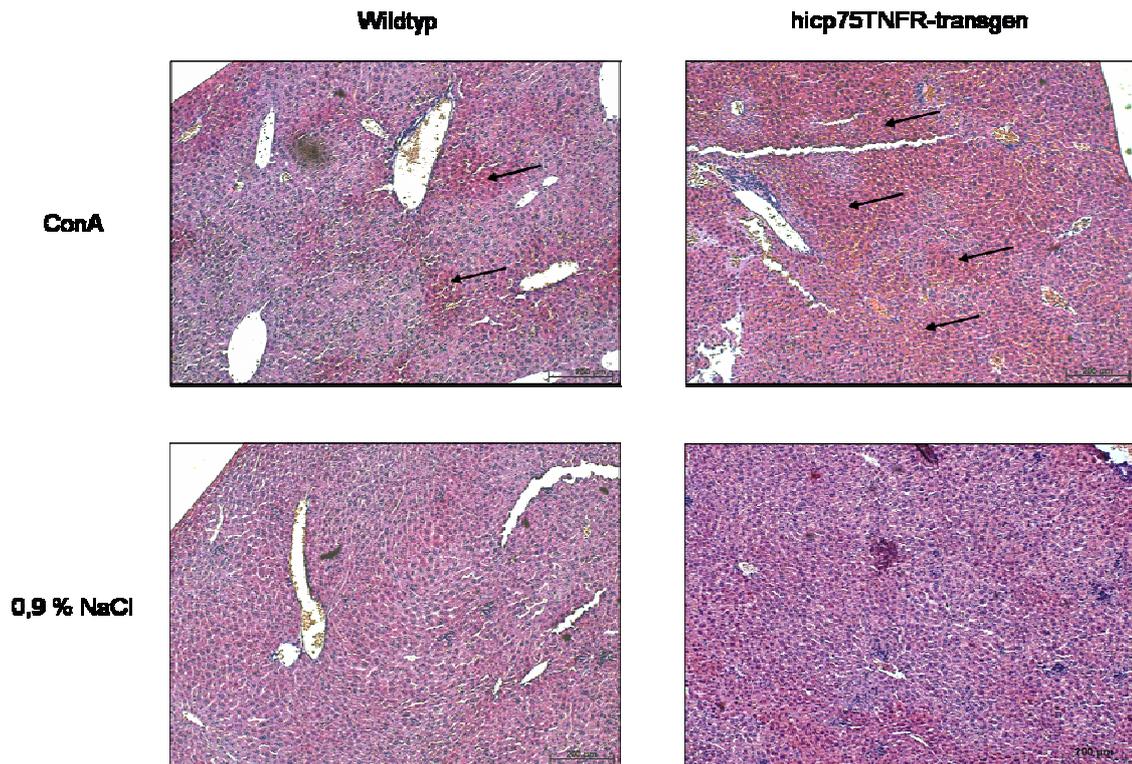
Während die durch D-Galaktosamin und LPS hervorgerufene Leberschädigung über Makrophagen verursacht wird, ist die akute Leberentzündung nach Gabe von dem Lektin Concanavalin A (Con A), das sich im Lebersinus der Maus anreichert, T-Zell-vermittelt, da Con A als T-Zell-Mitogen ein guter T-Zell-Aktivator ist. Nach Injektion dieses Lektins findet man einen Anstieg an unterschiedlichen Zytokinen, u. a. auch an TNF. Um zu untersuchen, ob der hicp75TNFR in einer T-Lymphozyten-abhängigen akuten Entzündung wichtig ist, wurde den transgenen Mäusen Con A intravenös verabreicht. Das Ausmaß der sich innerhalb von 8 h entwickelnden Hepatitis wurde wieder durch die Konzentrationsbestimmung der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) ermittelt.

Wie der Abb. 23 zu entnehmen ist, wurden im Serum der Con A-behandelten hicp75TNFR-transgenen Mäuse signifikant höhere Konzentrationen an beiden Aminotransferasen gemessen als in den Wildtypmäusen. Isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) wurde als Kontrolle injiziert und führte in beiden Mausgruppen nicht zur Entzündung.



**Abb 23: Konzentration der Aminotransferasen im Serum.** Die Konzentrationen der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (AST) (**A**) und Alanin-Aminotransferase (ALT) (**B**) wurden in Seren aus hicp75TNFR-transgenen (n=8) bzw. aus Wildtypmäusen (wt) (n=6) gemessen, nach Injektion von Concanavalin A (Con A) i. v.. Als Negativkontrolle erhielten Mäuse beider Gruppen isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) i. v.. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Dementsprechend waren in den histologischen Schnitten der Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Leberbiopsien aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen 8 h nach Injektion von Con A starke zusammenhängende Nekrosen mit vielen Einblutungen zu erkennen, was dem Bild einer Schockleber gleicht. Innerhalb des hepatischen Gewebes waren zahlreiche bereits stark verdichtete Zellkerne vorhanden, die als typisches Merkmal für Zelltod gelten. In den Wildtypmäusen kamen dagegen nur vereinzelte Nekroseherde mit geringeren Einblutungen vor, die von noch teilweise gesundem Gewebe mit intakten Zellkernen umfasst wurden. Die Injektion isotonischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) als Negativkontrolle ergab in beiden Mausgruppen keinen Hinweis auf eine Entzündung der Leber (Abb. 24).

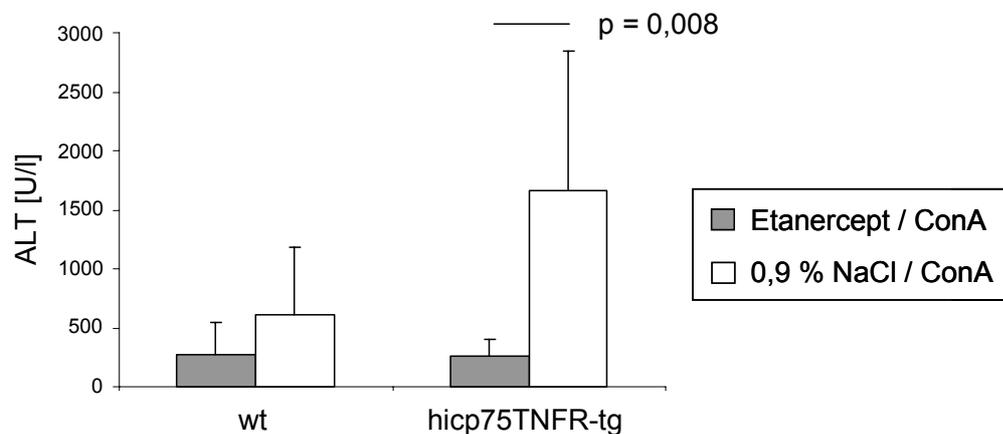


**Abb. 24: Mikroskopische Aufnahmen histologischer Schnitte der Leber.** Aus Concanavalin A (Con A) oder mit 0,9 % NaCl behandelten Wildtyp- und h1cp75TNFR-transgenen Mäusen wurden 8 h nach i. v. Injektion Leberbiopsien entnommen. Die 100-fache Vergrößerung der Hämatoxylin/Eosin-gefärbten Schnitte zeigt nach Con A-Behandlung zahlreiche zusammenhängende Nekrosen (rosa gefärbt) mit bereits verdichteten Zellkernen auf (dunkelblau gefärbt, Pfeile), die vermehrt in den Biopsien transgener Mäuse zu finden sind. In den Leberschnitten 0,9 % NaCl-behandelter Kontrolltiere, die in den beiden unteren Abbildungen dargestellt sind, ist dagegen vorwiegend gesundes Gewebe (lila gefärbt) mit intakten Zellkernen (dunkelblau gefärbt) zu erkennen. Meßbalken: 200 µm

#### 3.4.5. Untersuchung der Con A-induzierten Hepatotoxizität nach Vorbehandlung mit Etanercept

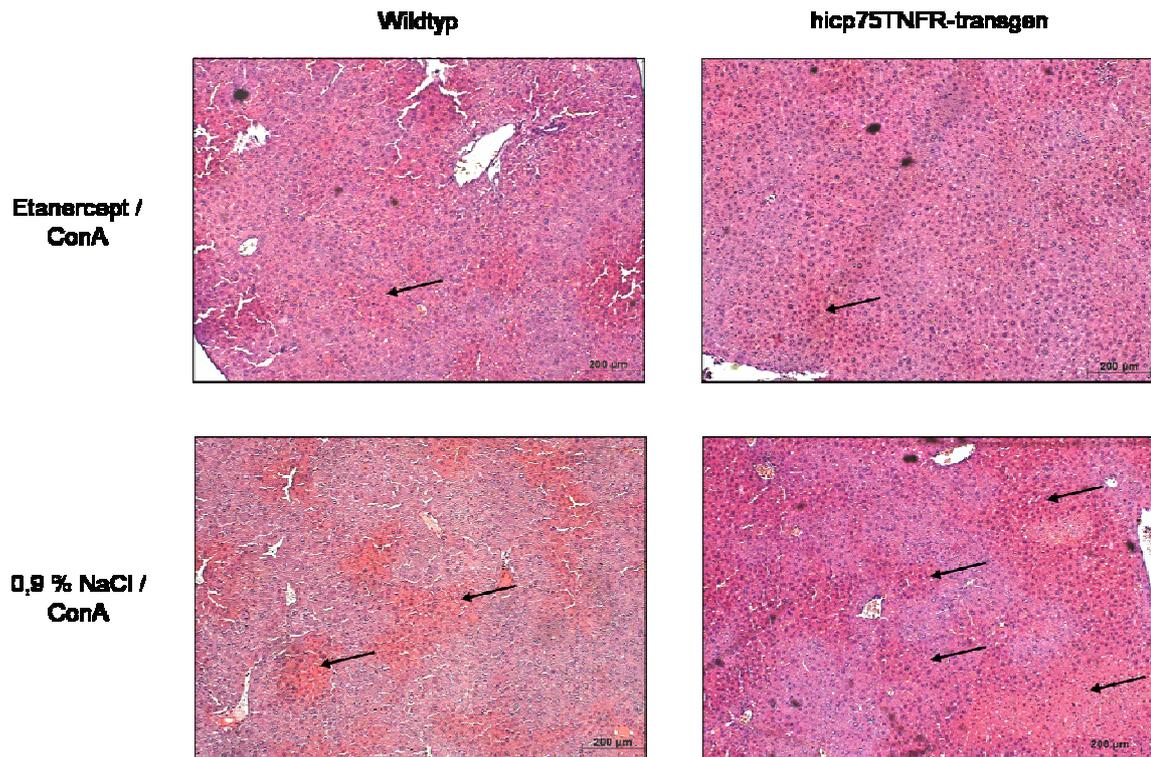
Da h1cp75TNFR-transgene Mäuse nach Behandlung mit Con A eine massivere akute Leberentzündung entwickelten als Wildtypmäuse, könnte der Grund dafür in einer Überexpression des TNF-bindenden löslichen h1cp75TNFR liegen. Um diese Annahme zu prüfen, wurde TNF *in vivo* durch den löslichen hp75TNFR neutralisiert. Bevor den Mäusen Con A intravenös appliziert wurde, erhielten sie 1 h zuvor Etanercept in das Peritoneum. Es handelt sich dabei um ein dimeres Fusionsprotein, das aus der

extrazellulären Domäne des humanen p75TNFR und dem Fc-Teil des humanen Immunglobulins G1 besteht. Als Parameter für das Ausmaß der sich entwickelnden Hepatitis diente wieder die Serum-Konzentration des Leberenzym Alanin-Aminotransferase (ALT). Wie in Abb. 25 dargestellt ist, nahm die Transferasenkonzentration der mit Etanercept vorbehandelten hicp75TNFR-transgenen Mäuse im Vergleich zu den transgenen Mäusen, denen das Fusionsprotein nicht injiziert wurde, signifikant ab. Auch in der Gruppe der Wildtypmäuse ging die Serumkonzentration des Leberenzym in etwa auf den gleichen Wert zurück, wenn sie mit Etanercept vorbehandelt wurden.



**Abb. 25: Konzentration der Aminotransferasen im Serum.** Durch i. v. Injektion von Con A wurde den hicp75TNFR-transgenen Mäusen (n=5) und den Wildtypmäusen (wt) (n=4) Hepatitis induziert, nachdem ihnen 1 h zuvor i. p. Etanercept bzw. als Negativkontrolle 0,9 % NaCl appliziert wurde. Die Konzentration der Alanin-Aminotransferase (ALT) wurde anschließend im Serum bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Die histologische Untersuchung der entsprechenden Leberschnitte ergab wieder eine massive Schädigung des hepatischen Gewebes in den Mäusen, denen nach Vorbehandlung mit 0,9 % NaCl Con A verabreicht wurde. Dabei wiesen die Leberbiopsien der transgenen Mäuse erneut weitläufigere nekrotische Bereiche als die Wildtyptiere auf, in denen man stark geschrumpfte apoptotische Zellkerne, die zum Teil bereits schon abgeblasst waren, erkennen konnte. Die Zellstruktur war zum Teil in diesen Arealen bereits aufgelöst. In den Mäusen, die eine Stunde vor der Con A-Gabe Etanercept erhalten hatten, wurde gleichermaßen in beiden Mausgruppen eine deutliche Reduktion der hepatischen Schädigung beobachtet (Abb. 26).



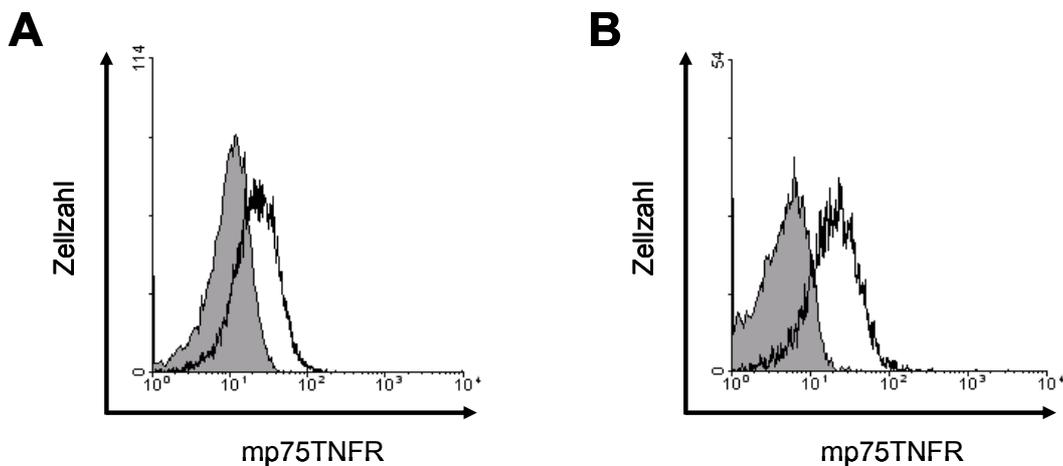
**Abb. 26: Mikroskopische Aufnahmen histologischer Schnitte der Leber.** Vor Behandlung von Wildtypmäusen (links im Bild) und hlc75TNFR-transgenen Mäusen (rechts im Bild) mit Con A (i. v.) wurde ihnen Etanercept (obere Reihen) respektive 0,9 % NaCl (untere Reihe) i. p. appliziert. 8 h später wurden Leberbiopsien entnommen. An den apoptotischen Zellkernen (dunkelblau gefärbt) sind die nekrotischen Bereiche (Pfeile) zu erkennen. Die mit Hämatoxylin/Eosin gefärbten Paraffinschnitte sind 100-fach vergrößert dargestellt. Meßbalken: 200 µm

### **3.5. Untersuchungen zur Funktion des p75TNFR und hicp75TNFR auf T-Zellen**

Da bereits bekannt war, dass über den p75TNFR die Proliferation sowohl unreifer Thymozyten als auch peripherer T-Zellen stimuliert werden kann (Grell, 1998a, Tartaglia, 1993b), wurde das Augenmerk auf diesen Zelltyp gerichtet, um die Rolle des icp75TNFR sowie des p75TNFR im Organismus näher zu beleuchten. Ein weiteres Indiz für die Hypothese, die beiden Rezeptor-Isomere könnte im Zusammenhang mit T-Zellen eine wichtige Funktion haben, war die Beobachtung, dass im T-Zell-vermittelten Hepatotoxizitätstest nach Con A-Behandlung die transgenen Mäuse eine signifikant stärkere Leberentzündung aufwiesen als die Kontrolltiere. Daher sollte im Folgenden der hicp75TNFR und sein Isomer, der p75TNFR, auf T-Zellen näher charakterisiert werden.

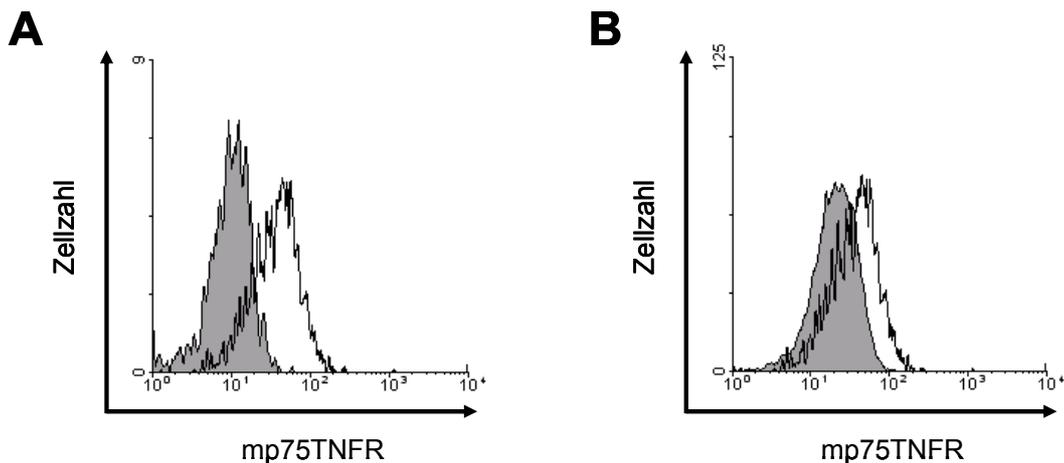
#### **3.5.1. Oberflächenexpression auf Thymozyten**

Aus den Thymi der C57BL/6 Mäuse wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchflusszytometrisch auf p75TNFR-Expression hin analysiert. Wie in Abb. 27 gezeigt, konnte der Rezeptor auf beiden T-Zell-Populationen der Wildtypmäuse detektiert werden. Die p75TNFR-defizienten Tiere dienten für diese Untersuchungen als Negativkontrolle.



**Abb. 27: p75TNFR-Expression auf T-Zellen aus dem Thymus.**  $CD4^+$  T-Zellen (A) und  $CD8^+$  T-Zellen (B) wurden in der durchflusszytometrischen Analyse auf die Oberflächenexpression des p75TNFR untersucht. Die Zellen stammten aus Thymi, die den p75TNFR-defizienten Mäusen (grau ausgefüllter Peak) bzw. den C57BL/6 Mäusen (schwarzer Peak) entnommen wurden. Auf der Oberfläche beider T-Zell-Subtypen konnte der Rezeptor mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten Antikörpers in der Wildtypmaus nachgewiesen werden. Thymozyten der p75TNFR-defizienten Maus dienten als Negativkontrolle.

Die intrinsischen regulatorischen T-Zellen, die im Thymus zu finden sind, tragen neben CD4 als charakteristisches Oberflächenprotein die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25). Auch auf diesen  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen, die aus Wildtypmäusen isoliert wurden, konnte der p75TNFR detektiert werden (Abb. 28A), wie bereits im Humansystem gezeigt wurde (Annunziato, 2002). Diese zentralen regulatorischen  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen exprimierten sogar mehr p75TNFR als  $CD4^+$  T-Zellen, die kein CD25-Protein auf der Oberfläche tragen (Abb. 28B).



**Abb. 28: p75TNFR-Expression auf intrinsischen regulatorischen T-Zellen aus dem Thymus.** In der Durchflusszytometrie konnte die Rezeptorexpression in (A) auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen, die aus den C57BL/6 Mäusen (schwarzer Peak) stammten, detektiert werden. Der grau ausgefüllte Peak stellt die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation aus p75TNFR-defizienten Mäusen dar. In (B) wurde die vermehrte Expression von p75TNFR auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen (schwarzer Peak) verglichen mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (grau ausgefüllter Peak) dargestellt. Beide Zellgruppen wurden aus Thymi von C57BL/6 Mäusen isoliert.

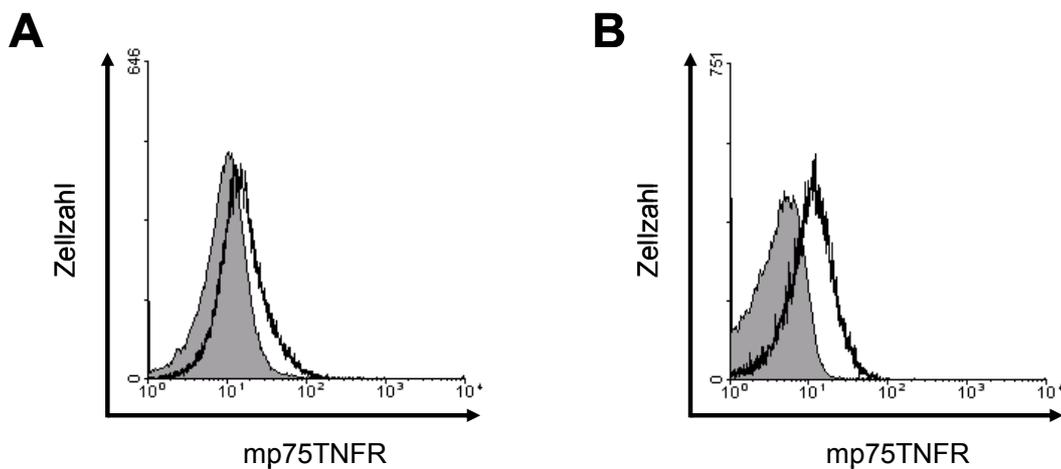
Da sich der hicp75TNFR vom hp75TNFR lediglich im Exon 1 unterscheidet, sollte die Oberflächenexpression auch in den transgenen Mäusen untersucht werden. Leider ist der Nachweis von hp75TNFR bzw. hicp75TNFR auf Maus-Thymozyten nicht eindeutig, da der eingesetzte Antikörper gegen den humanen p75TNFR mit dem p75TNFR in der Maus kreuzreagiert.

### 3.5.2. Oberflächenexpression auf peripheren T-Zellen aus der Milz

Nachdem gezeigt wurde, dass p75TNFR auf T-Lymphozyten aus dem Thymus vorhanden ist, sollte dies auch für periphere T-Zellen nachgeprüft werden. In der Literatur wurde bereits eine konstitutive Expression von p75TNFR auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen beschrieben, die aus dem Lymphknoten von Wildtypmäusen (C57BL/6) isoliert wurden (Kim, 2004). Für den Nachweis des p75TNFR im Rahmen dieser Arbeit wurden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Milzzellen von C57BL/6 Mäusen untersucht. Eine Anreicherung erfolgte über magnetvermittelte Zellsortierung (MACS), um einheitliche Zellpopulationen zu erhalten,

da in der Milz neben T-Zellen auch andere Zelltypen, wie z. B. Makrophagen oder B-Zellen, existieren.

Die durchflusszytometrische Analyse zeigt, dass beide naive T-Zellpopulationen den p75TNFR auf der Oberfläche exprimieren. Als Negativkontrolle wurden entsprechende Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen verwendet (Abb. 29).



**Abb. 29: p75TNFR-Expression auf peripheren T-Zellen aus der Milz.** CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A) bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B) wurden über MACS aus isolierten Milzzellen angereichert und mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert. Die Milzen stammten aus C57BL/6 (schwarzer Peak) bzw. aus p75TNFR-defizienten Mäusen (grau ausgefüllter Peak), die als Negativkontrolle dienen.

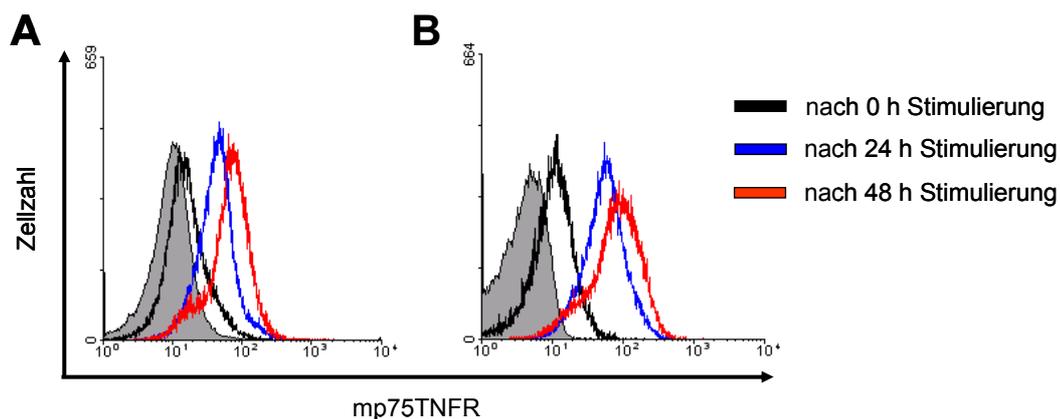
### 3.5.3. Regulierung der p75TNFR-Oberflächenexpression auf peripheren T-Zellen aus der Milz

Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung des p75TNFR für T-Zellen und somit möglicherweise auch für die Bedeutung des icp75TNFR ist die Tatsache, dass in der Literatur der p75TNFR als ein kostimulatorisches Protein für T-Zellen beschrieben wurde (Aspalter, 2003, Kim, 2001, Kim, 2004, Kim, 2006). Außerdem ist bekannt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Lymphknoten nach Stimulierung vermehrt p75TNFR auf der Zelloberfläche exprimieren (Kim, 2004).

Um diesen Befund zu bestätigen, wurden aus Milzzellen von p75TNFR-defizienten Mäusen bzw. von C57BL/6 Mäusen mit Hilfe von magnetvermittelter Zellsortierung

(MACS)  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen gewonnen. Diese wurden über ihren T-Zellrezeptor mit einem anti-CD3 Antikörper, der zuvor an die Kulturplatte gebunden wurde, und mit einem löslichen anti-CD28 Antikörper für 24 bzw. 48 h stimuliert. In der durchflusszytometrischen Analyse wurde die p75TNFR-Expression anschließend ermittelt.

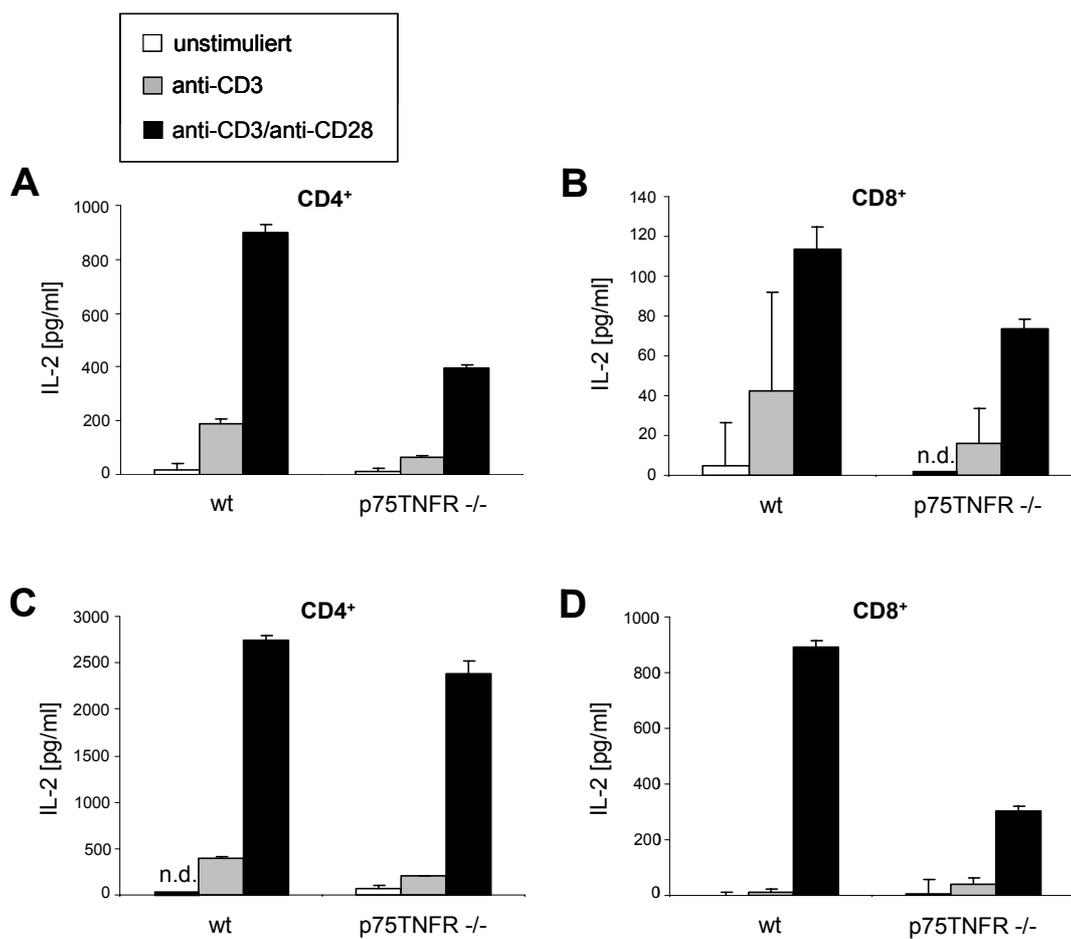
Nach einem Tag Stimulierung ließ sich der p75TNFR verstärkt auf der Oberfläche sowohl der  $CD4^+$  (Abb. 30A) als auch der  $CD8^+$  T-Zellen (Abb. 30B) aus Wildtypmäusen (C57BL/6) nachweisen. Eine weitere Erhöhung der Expression konnte nach 48 h beobachtet werden, jedoch war die Zunahme weitaus geringer als innerhalb der ersten 24 h. Ein Grund dafür könnte in der Abspaltung der extrazellulären Domäne des p75TNFR liegen. Löslicher p75TNFR wurde auch im 2 Tage-Zellüberstand vermehrt vorgefunden (Abb. 33).



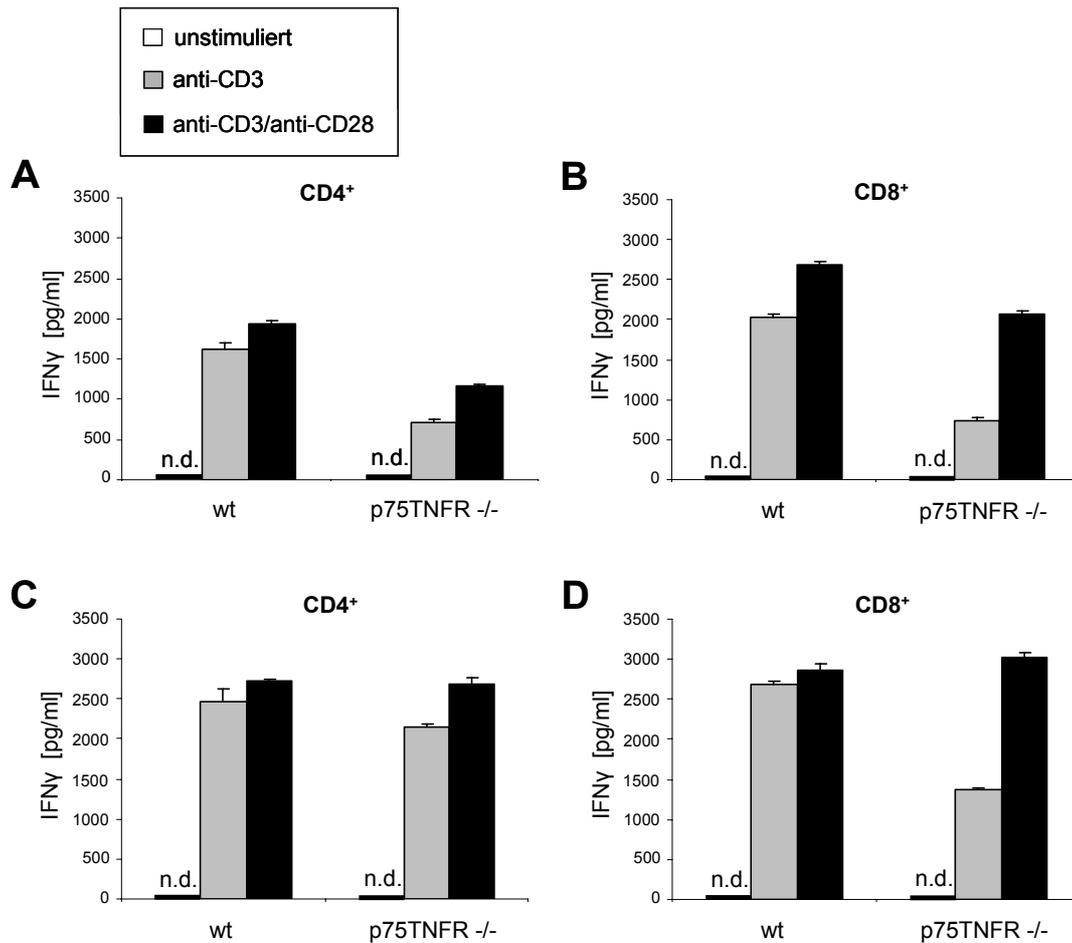
**Abb. 30: Durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenexpression des p75TNFR auf stimulierten T-Zellen.** Aus der Milz von C57BL/6 Mäusen wurden T-Zellen isoliert, die mit Hilfe von MACS angereichert wurden. In (A) wurden  $CD4^+$  T-Zellen, in (B) wurden  $CD8^+$  T-Zellen jeweils für 24 h (blauer Peak) bzw. für 48 h (roter Peak) mit einem anti-CD3 Ak (gebunden) und einem löslichen anti-CD28 Ak *ex vivo* stimuliert, bevor sie durchflusszytometrisch analysiert wurden. Der schwarze Peak stellt die Rezeptorexpression unstimulierter T-Zellen dar. Als Negativkontrollen dienen  $CD4^+$  T-Zellen (A) bzw.  $CD8^+$  T-Zellen (B), die aus der Milz von p75TNFR-defizienten Mäusen gewonnen wurden (grau ausgefüllter Peak).

In früheren Arbeiten war eine Abnahme der IL-2 und IFN- $\gamma$  Produktion in Überständen von stimulierten T-Zellen aus Lymphknoten beobachtet worden (Kim, 2001, Kim, 2004).

Um die Rolle des p75TNFR bei der T-Zell-Aktivierung weiter zu untersuchen, wurden daher in den Überständen der mittels MACS angereicherten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz die Zytokinmengen in Abhängigkeit von der Stimulierung im ELISA gemessen (Abb. 31). Nach 24 h Stimulierung der T-Zellen mit einem an der Platte gebundenen anti-CD3 und einem löslichen anti-CD28 Antikörper, war sowohl die IL-2 (Abb. 31) als auch die IFN- $\gamma$ -Konzentration (Abb. 32) in den Überständen beider T-Zellpopulationen aus p75TNFR-defizienten Mäusen vermindert. Nach weiteren 24 h allerdings wurde in beiden Mausgruppen eine ähnlich hohe IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Überständen der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen detektiert. Im Gegensatz dazu war die IL-2-Konzentration auch nach 48 h in den p75TNFR-defizienten Kulturen weiterhin reduziert, wobei die Reduktion der IL-2-Menge in den CD8<sup>+</sup>-T-Zellüberständen der gendefizienten Mäuse stärker ausgeprägt war als in den CD4<sup>+</sup>-T-Zellüberständen (Abb. 31 und Abb. 32).

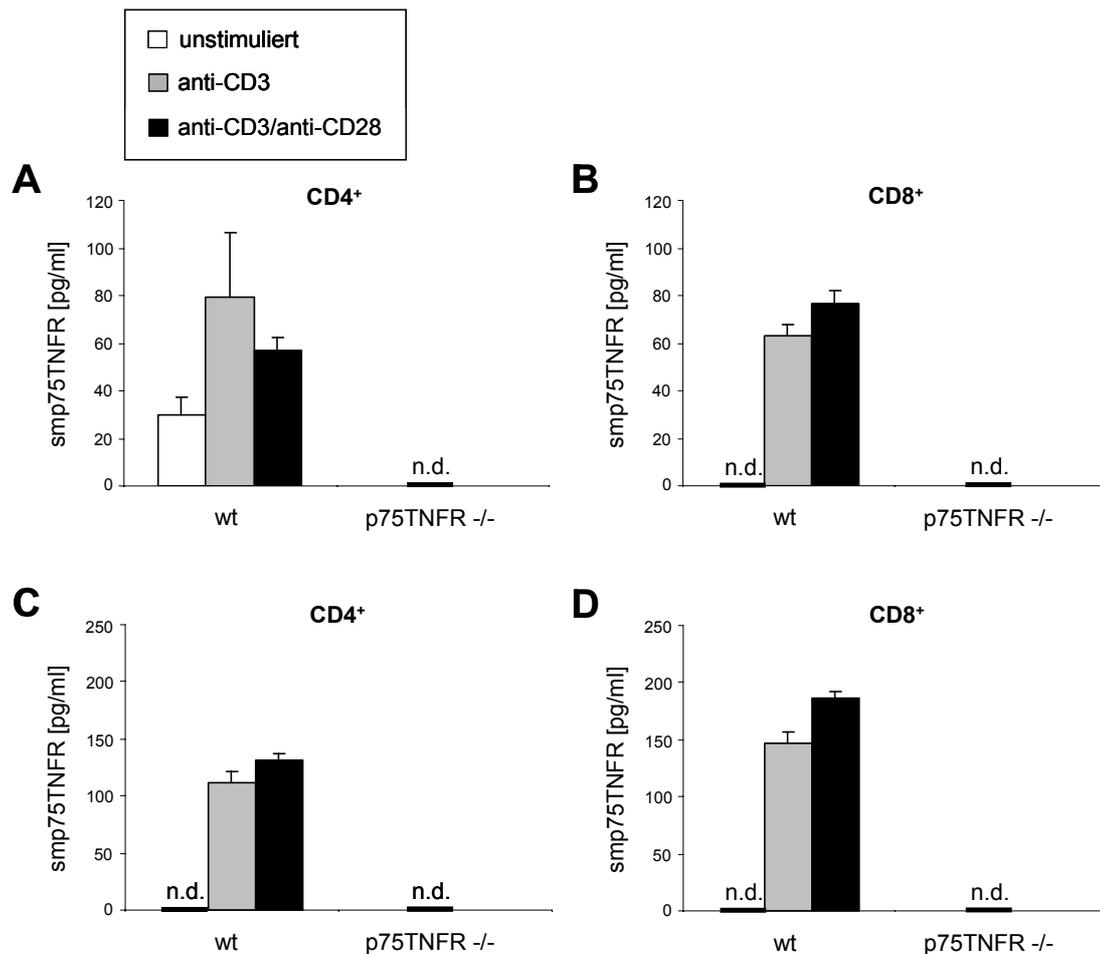


**Abb. 31: IL-2-Konzentration im Überstand von stimulierten T-Zellen.** Aus Milzzellen von C57BL/6 Mäusen (wt) und p75TNFR-defizienten Mäusen wurden jeweils CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A und C) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B und D) mittels MACS angereichert und mit einem anti-CD3 Ak (gebunden) und einem löslichen anti-CD28 Ak stimuliert. Nach 24 h (A und B) bzw. 48 h (C und D) wurden in deren Überständen die IL-2-Konzentrationen im ELISA gemessen.



**Abb. 32: IFN $\gamma$ -Konzentration im Überstand von stimulierten T-Zellen.** Die aus Milzzellen von C57BL/6 Mäusen (wt) und p75TNFR-defizienten Mäusen angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A und C) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B und D) wurden mit einem anti-CD3 Ak (gebunden) und einem löslichen anti-CD28 Ak für 24 h (A und B) bzw. 48 h (C und D) stimuliert. Aus den jeweiligen Überständen der stimulierten Zellen wurden die IFN $\gamma$ -Konzentrationen im ELISA ermittelt.

Wie schon aus den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse der p75TNFR-Oberflächenexpression (Abb. 30) zu vermuten war, wurde der extrazelluläre Teil als löslicher Maus-p75TNFR (smp75TNFR) innerhalb 24 h sowohl nach anti-CD3- als auch nach anti-CD3- plus anti-CD28-Stimulierung in den Zellüberstand abgegeben. Diese lösliche Rezeptormenge erhöhte sich nach weiteren 24 h in den Wildtypzellüberständen beider T-Zellpopulationen (Abb. 33). In den Überständen der Zellen, die von p75TNFR-defizienten Mäusen stammten, wurde erwartungsgemäß kein löslicher p75TNFR nachgewiesen und sie diente daher als Negativkontrolle.



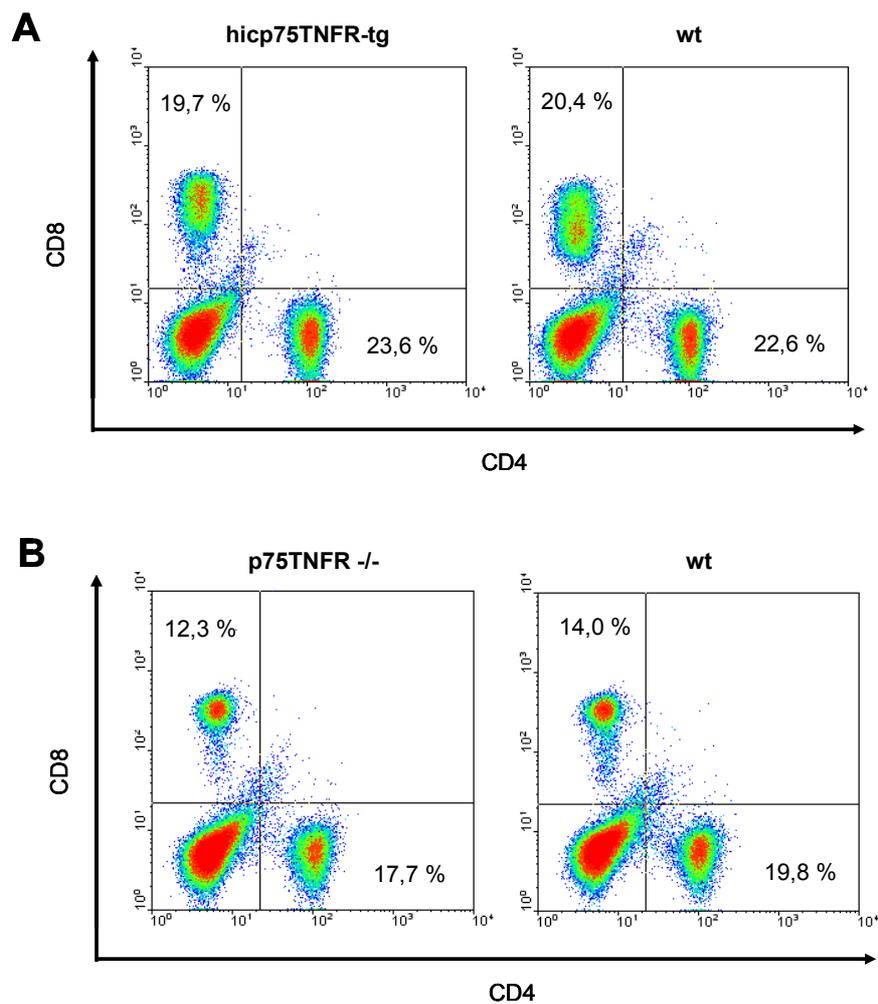
**Abb. 33: smp75TNFR-Konzentration im Überstand von stimulierten T-Zellen.** Nach 24 h (A und B) bzw. 48 h (C und D) Stimulierung wurde im Überstand der mit einem anti-CD3 Ak (gebunden) und einem löslichen anti-CD28 Ak stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (A und C) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B und D) die Konzentration an smp75TNFR im ELISA bestimmt. Die T-Zellen stammten aus C57BL/6 Mäusen (wt) und p75TNFR-defizienten Mäusen, die als Negativkontrolle eingesetzt wurden.

Ohne Stimulierung wurde in allen Kulturen kaum eine Produktion an Zytokinen beobachtet. Die durch anti-CD3-Antikörper stimulierte Zytokinproduktion konnte durch Kostimulation mit anti-CD28-Antikörpern verstärkt werden.

### 3.5.4. Quantitative Untersuchung peripherer T-Zellen in Abhängigkeit von p75TNFR und hicp75TNFR

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression des p75TNFR bzw. des icp75TNFR auf T-Zellen und deren Anzahl, die in peripheren lymphoiden Organen vor zu finden sind, besteht. Dazu wurden Zellen aus der Milz von hicp75TNFR-transgenen Mäusen isoliert und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die an die CD4 und CD8 Oberflächenproteine binden, gefärbt. Die Menge an CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz naiver Mäuse wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Um die Auswirkungen der Abwesenheit des p75TNFR auf die Anzahl der T-Zellen zu prüfen, wurde der gleiche Versuchsansatz mit Milzzellen p75TNFR-defizienter Mäuse durchgeführt. In beiden Experimenten wurden als Kontrollen die jeweiligen Wildtypmäuse getestet.

Wie Abb. 34A zu entnehmen ist, gab es weder in der CD4<sup>+</sup> Population noch in der CD8<sup>+</sup> Population einen quantitativen Unterschied zwischen den hicp75TNFR-transgenen Mäusen und den Wildtypmäusen. Ebenso hatte das Fehlen des p75TNFR keine Auswirkungen auf die Verteilung der in der Milz vorliegenden T-Zellpopulationen. Die p75TNFR-defizienten Mäuse wiesen ähnliche Mengen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen wie die entsprechenden Wildtypmäuse auf (Abb. 34B).

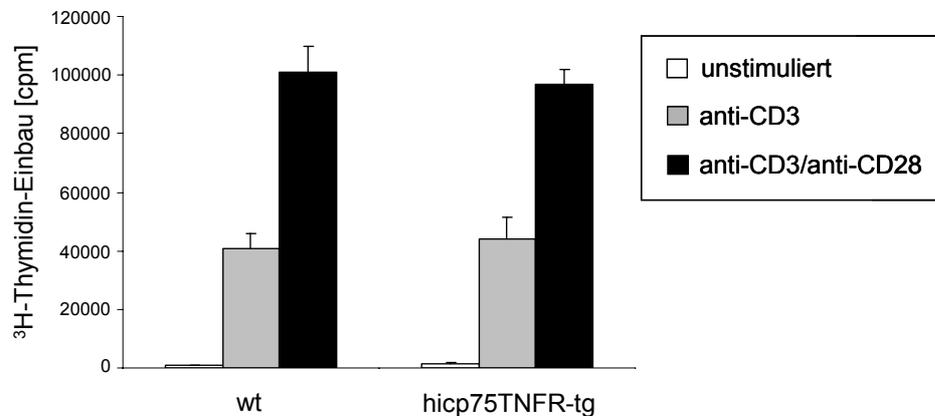


**Abb. 34: Anteil an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz.** Der Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen an gesamten Milzzellen aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen (**A**, links im Bild) und p75TNFR-defizienten Mäusen (**B**, links im Bild) wurde quantitativ in der Durchflusszytometrie untersucht. Die Milzzellen wurden dafür mit einem FITC-markierten anti-CD4 Ak bzw. einem PerCP-markierten anti-CD8 Ak gefärbt. Die in (**A**) und (**B**) jeweils auf der rechten Seite abgebildeten Plots zeigen die Zellverteilung der jeweiligen Wildtypmäuse (wt).

### 3.5.5. Qualitative Untersuchung peripherer T-Zellen in Abhängigkeit von p75TNFR und hicp75TNFR

Da in naiven Mäusen die Anzahl der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in lymphoiden Organen unabhängig von der p75TNFR-Expression zu sein scheint (Abb. 34), wurde auf möglicherweise vorhandene qualitative Unterschiede geprüft. Ein Funktionsmerkmal der T-Lymphozyten ist die Fähigkeit, nach Stimulierung ihres T-Zellrezeptors zu

proliferieren. Aus vorhergehenden Daten war bekannt, dass Thymozyten aus p75TNFR-defizienten Mäusen eine geringere Proliferationsrate aufwiesen als Thymozyten aus Wildtypmäusen (Grell, 1998a). Um die Zellproliferation von T-Lymphozyten zu prüfen, wurden Milzzellen aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen isoliert, aus denen mit Hilfe von MACS CD4<sup>+</sup> T-Zellen sortiert wurden. Diese angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden über ihren T-Zellrezeptor mit einem anti-CD3 Antikörper, der zuvor an die Platte gebunden wurde, bzw. mit einer Kombination aus einem anti-CD3 Antikörper (gebunden) und einem löslichen anti-CD28 Antikörper stimuliert. Als Vergleich dienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von Wildtypmäusen. Nach 3 Tagen Stimulierung wurde die Zellproliferation durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau ermittelt. Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen zeigten dabei keinen Unterschied in der <sup>3</sup>H-Thymidin-Einlagerung. Diese Zellen reagierten also ähnlich auf den spezifischen T-Zellstimulus und proliferierten wie die T-Zellpopulation der Wildtypmäuse (Abb. 35).



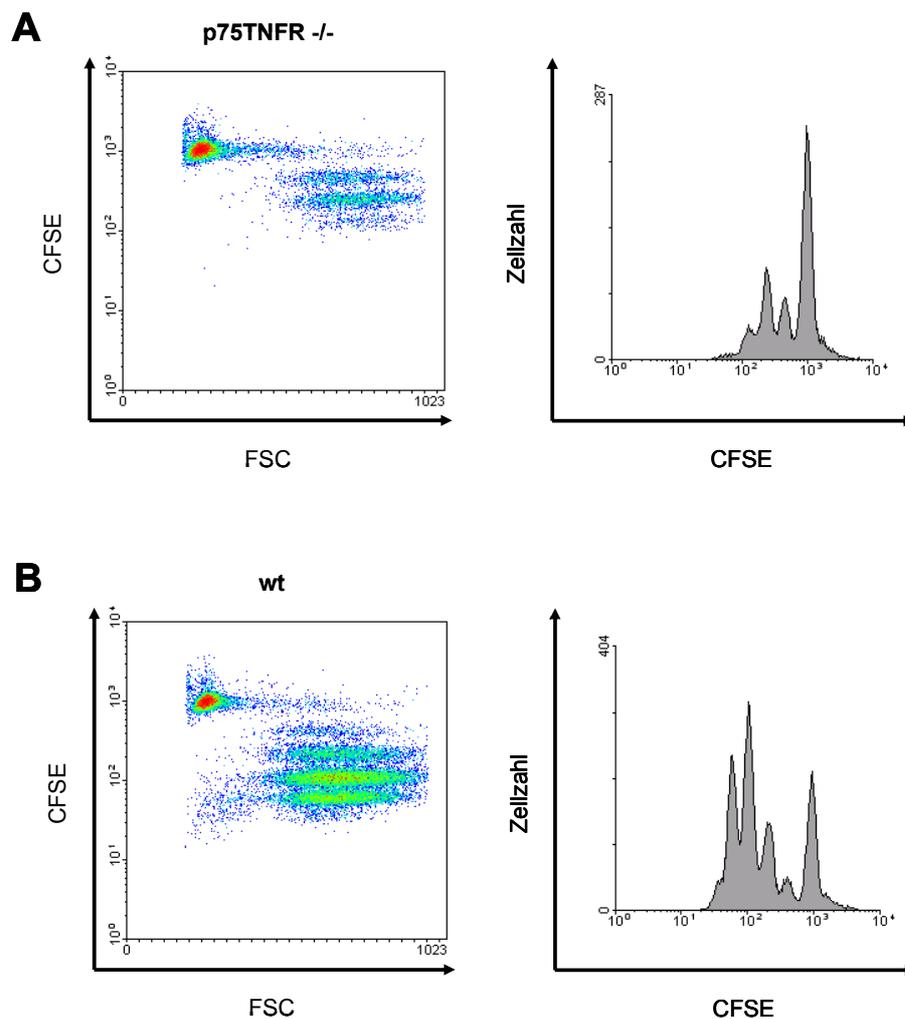
**Abb. 35: Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen.** Aus Milzen hicp75TNFR-transgener Mäuse bzw. Wildtypmäusen (wt), die als Vergleichsgruppe dienen, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels MACS angereichert, die anschließend mit anti-CD3 Ak (gebunden) und löslichen anti-CD28 Ak für 72 h stimuliert wurden. Die Proliferation wurde durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau ermittelt. Unstimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen dienten als Negativkontrolle.

Der alleinige Stimulus mit anti-CD3 Antikörpern führte dabei in allen Fällen zu einer schwächeren Proliferation als die Kombination mit anti-CD28 Antikörpern (Abb. 35).

Unstimulierte Zellen vermehrten sich erwartungsgemäß unter den angewandten Bedingungen nicht.

Ein vergleichbarer Versuch wurde mit p75TNFR-defizienten Mäusen angesetzt. Die aus Milzzellen über MACS angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden zusammen mit anti-CD3 Antikörpern (gebunden) und löslichen anti-CD28 Antikörpern für 72 h stimuliert. Um die Proliferationsrate messen zu können, wurden die Zellen vor der Kultur mit dem Farbstoff CFSE, der sich an die DNA anlagert, markiert. Bei jedem Zellteilungsschritt verdoppelt sich die Menge an DNA und der angelagerte Farbstoff halbiert sich somit. Diese Abnahme der Farbintensität wird in der durchflusszytometrischen Messung nachgewiesen.

Die Anzahl der Zellteilungszyklen war in den CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die keinen p75TNFR auf der Oberfläche exprimieren, geringer, d.h. ihre Proliferation war gegenüber den Wildtyp-T-Zellen vermindert. Die Zellen aus der Wildtypmaus zeigten vier Teilungszyklen, wohingegen die T-Zellen der p75TNFR-defizienten Maus nur drei Zyklen aufwiesen (Abb. 36). In beiden Zellgruppen wurde keine Proliferation von unstimulierten Zellen detektiert (o. Abb.).



**Abb. 36: Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen.** Die aus Milzzellen über MACS angereicherten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus p75TNFR-defizienten Mäusen (A) bzw. aus C57BL/6 Mäusen (wt) (B) isoliert. Nach Markierung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE wurden die Zellen drei Tage lang mit anti-CD3 Ak (gebunden) und löslichen anti-CD28 Ak stimuliert. Die Proliferation der T-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Histogramme rechts in der Darstellung geben die Ergebnisse des entsprechenden Plots, links in der Abbildung, wieder.

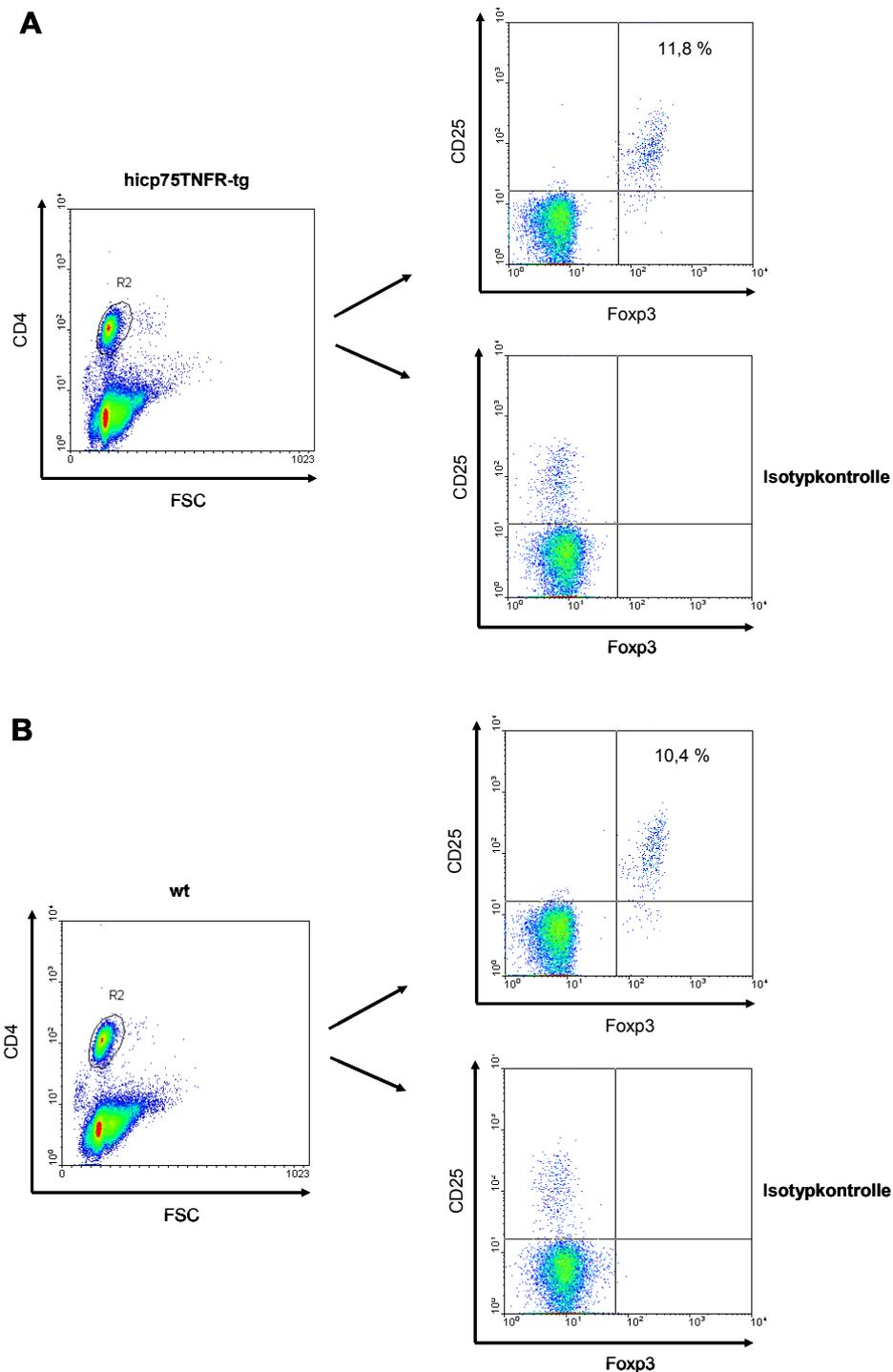
### 3.5.6. Quantitative Bestimmung regulatorischer T-Zellen in naiven Mäusen

Ein weiterer Zelltyp, der den p75TNFR auf der Oberfläche trägt, sind die regulatorischen T-Zellen. Sie sind u. a. durch die Expression der Oberflächenproteine CD4 und CD25, der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, gekennzeichnet sowie durch den intrazellulär vorliegenden Transkriptionsfaktor Foxp3. Wie bereits in Abb. 28 gezeigt, exprimieren CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Thymozyten mehr p75TNFR auf der Oberfläche als CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die negativ für CD25

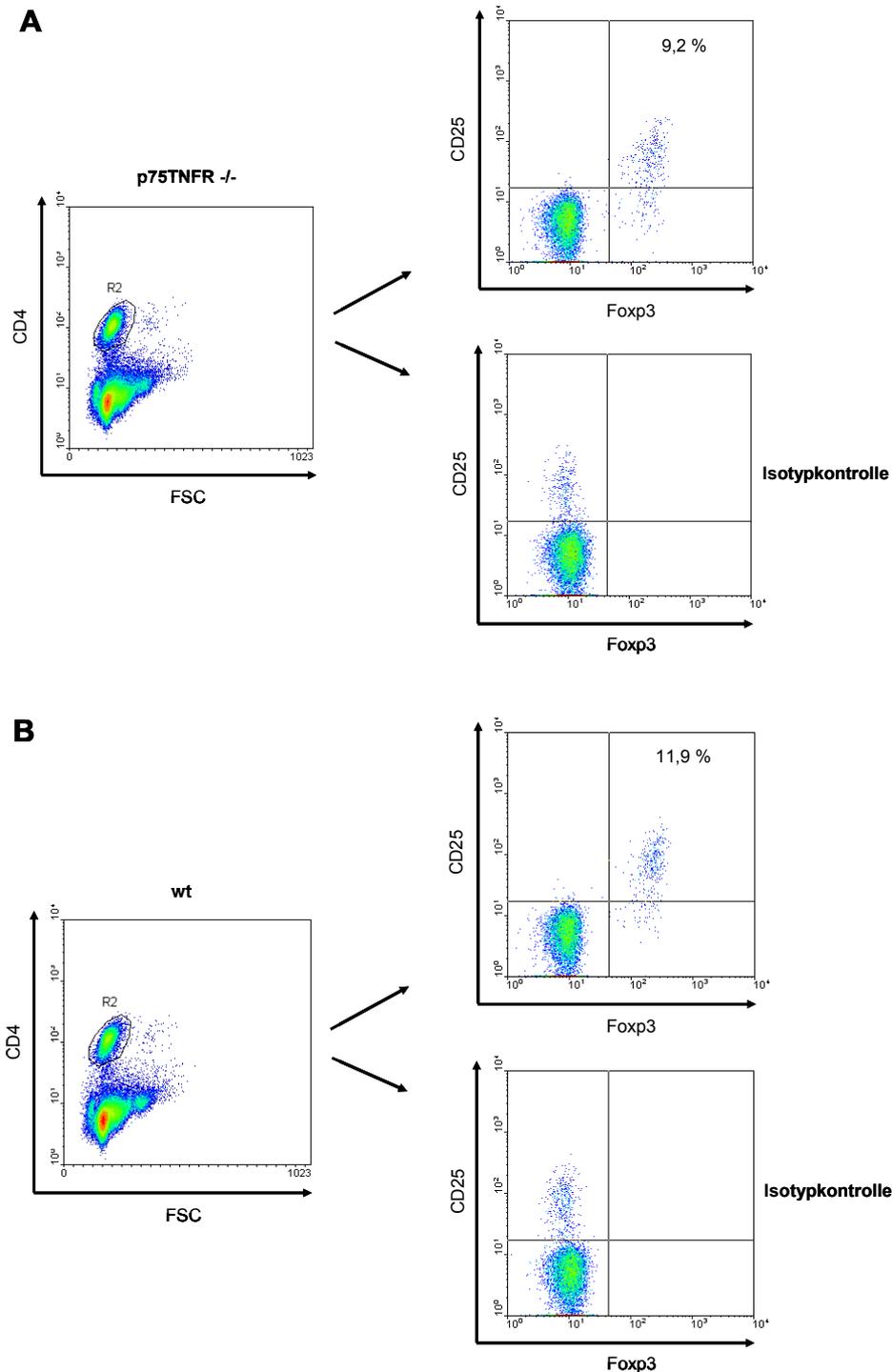
sind. Es sollte daher die Menge dieser  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen in Abhängigkeit der beiden Rezeptor-Isoformen anhand  $p75TNFR$ -defizienter sowie  $hicp75TNFR$ -transgener Mäuse untersucht werden.

Zunächst wurde aus Milzen der Anteil der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen an den gesamten  $CD4^+$  T-Zellen bestimmt. Milzzellen  $hicp75TNFR$ -transgener Mäuse und  $p75TNFR$ -defizienter Mäuse wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen  $CD4$ ,  $CD25$  und  $Foxp3$  gefärbt. Um die  $Foxp3$ -positive Zellpopulation eindeutig in der Auswertung festlegen zu können, wurde außerdem ein fluoreszenzmarkierter Kontrollantikörper (IgG2a,  $\kappa$ -PE) mitgeführt. Die quantitative Verteilung der  $CD4^+$  T-Zellen, welche die Marker für regulatorische T-Zellen trugen, wurde schließlich durchflusszytometrisch ermittelt. Als Vergleich für die  $hicp75TNFR$ -transgenen und  $p75TNFR$ -defizienten Mäuse dienten die entsprechenden Wildtypmäuse.

Weder die  $hicp75TNFR$ -transgenen Mäuse (Abb. 37) noch die  $p75TNFR$ -defizienten Mäuse (Abb. 38) wiesen eine veränderte Menge an regulatorischen T-Zellen in der  $CD4^+$  T-Zellpopulation auf. Bei beiden gentechnisch veränderten Mäusen wurde eine den jeweiligen Wildtypmäusen ähnliche Menge an  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T-Zellen in Höhe von etwa 10 % detektiert.



**Abb. 37: Anteil der regulatorischen T-Zellen an  $CD4^+$  T-Zellen in hicp75TNFR-transgenen Mäusen.** Zellen, die aus Milzen hicp75TNFR-transgener Mäuse (**A**) bzw. der dazugehörigen Wildtymäuse (wt) (**B**) stammten, wurden auf der Oberfläche mit anti-CD4-FITC Ak und anti-CD25-PE Ak, sowie intrazellulär mit anti-Foxp3-PE Ak gefärbt. Der Anteil an regulatorischen T-Zellen ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ), der durchflusszytometrisch ermittelt wurde, bezieht sich auf die jeweilige  $CD4^+$  Population (R2). Als Isotypkontrolle der Foxp3-Färbung wurde ein IgG2a,  $\kappa$  Ak eingesetzt (jeweils rechts unten abgebildet).



**Abb. 38: Anteil der regulatorischen T-Zellen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in p75TNFR-defizienten Mäusen.** Aus p75TNFR-defizienten Mäusen (**A**) und aus C57BL/6 Mäusen (wt) (**B**) wurden Milzzellen isoliert, die mit anti-CD4-FITC Ak, anti-CD25-PE Ak, sowie intrazellulär mit anti-Foxp3-PE Ak markiert wurden. Als Ausgangspopulation zur durchflusszytometrischen Ermittlung des Anteils der regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>) dienen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen (R2). Der Ak IgG2a, κ wurde als Isotypkontrolle für die Foxp3-Färbung eingesetzt (jeweils rechts unten abgebildet).

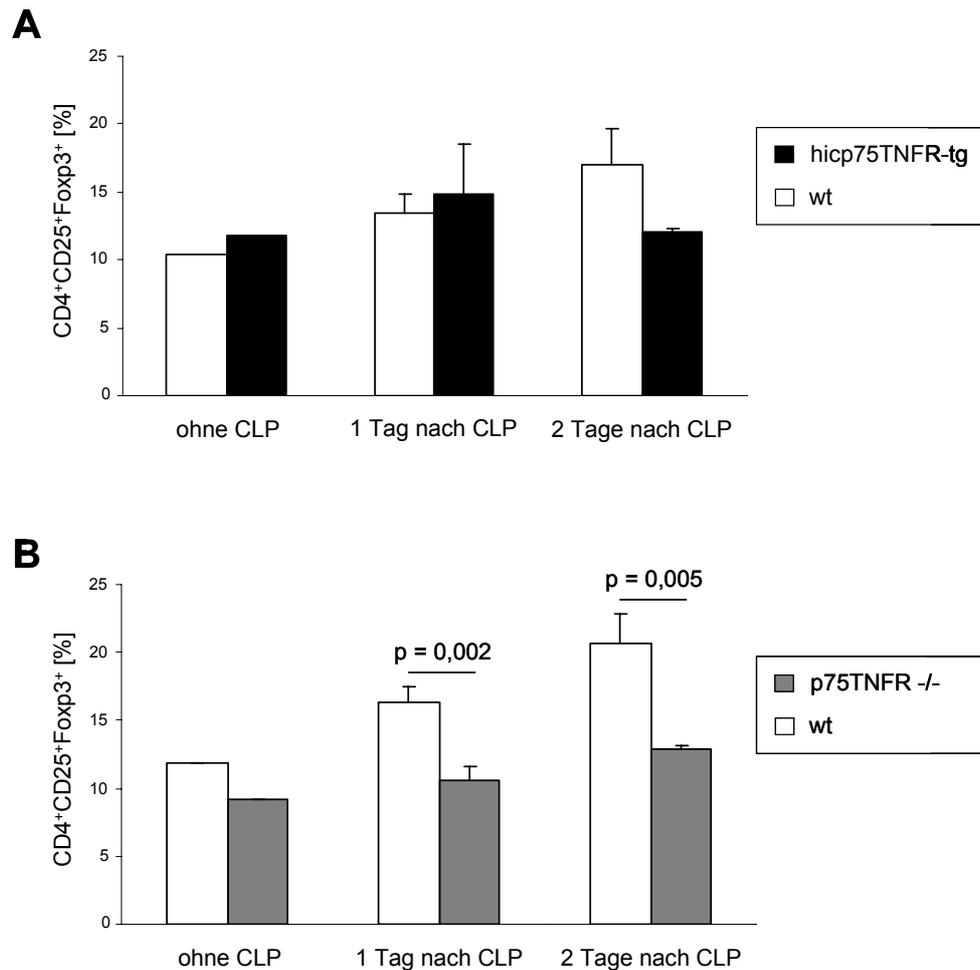
### 3.5.7. Quantitative Bestimmung regulatorischer T-Zellen nach akuter Entzündung

Die Anwesenheit regulatorischer T-Zellen spielt hauptsächlich dann eine Rolle, wenn in einem Organismus eine Entzündung abläuft und das Zusammenspiel von aktivierten und regulatorischen T-Lymphozyten entscheidend zu dem Verlauf der Infektion beiträgt. Daher sollte nach einer akuten Entzündung die Anzahl an regulatorischen T-Zellen in Abhängigkeit des p75TNFR bzw. des hicp75TNFR ermittelt werden.

Als akutes Entzündungsmodell wurde die CLP (*cecal ligation and puncture*) gewählt, bei dem durch Abbinden des Blinddarms und anschließender Perforation des abgebundenen Stückes eine akute Peritonitis induziert wird. Ein bzw. zwei Tage nach CLP wurde den hicp75TNFR-transgenen Mäusen bzw. den p75TNFR-defizienten Mäusen die Milz entnommen. Die für regulatorische T-Zellen charakteristischen Oberflächenproteine CD4 und CD25 sowie der Transkriptionsfaktor Foxp3 der Milzzellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt. Der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen an CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt, wobei der ebenfalls fluoreszenzmarkierte IgG2a, κ Antikörper als Kontrollantikörper mitgeführt wurde, um die Foxp3<sup>+</sup> Population eindeutig eingrenzen zu können. Mit den entsprechenden Wildtypmäusen wurde auf gleiche Weise verfahren.

In den Wildtypmäusen nahm die Anzahl an regulatorischen T-Zellen im Verlauf der Entzündung zu, so dass nach zwei Tagen CLP mehr dieser Zellen zu finden waren als nach einem Tag. Diese Vermehrung der regulatorischen T-Zellpopulation blieb im Falle der hicp75TNFR-transgenen Mäuse aus. Während nach einem Tag der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen in etwa dem Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Zellpopulation der Wildtypmäuse gleich war, blieb ein weiterer Anstieg zwei Tage nach CLP aus (Abb. 39A).

Die Vermehrung der regulatorischen T-Zellen in den p75TNFR-defizienten Mäusen nach CLP fiel ebenfalls schwächer aus als in den Wildtypmäusen. Außerdem war ein und zwei Tage nach CLP insgesamt der Anteil der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen an CD4<sup>+</sup> T-Zellen statistisch signifikant geringer im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen (Abb. 39B).



**Abb. 39: Anteil der regulatorischen T-Zellen an  $CD4^+$  T-Zellen nach akuter Entzündung.** In hicp75TNFR-transgenen Mäusen (ohne CLP n=1; Tag 1, 2 n=5) bzw. Wildtypmäusen (wt; C57BL/6 x FvB) (ohne CLP n=1; Tag 1, 2 n=5) (**A**) und p75TNFR-defizienten Mäusen (ohne CLP n=1; Tag 1 n=6; Tag 2 n=7) (**B**) sowie den entsprechenden Wildtypmäusen (wt; C57BL/6) (ohne CLP n=1; Tag 1 n=6; Tag 2 n=5) wurde durch CLP eine akute Entzündung induziert. Die aus den jeweiligen Milzen gewonnenen regulatorischen T-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten anti-CD4 Ak, anti-CD25 Ak und anti-Foxp3 Ak detektiert. Der Anteil der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T-Zellpopulation ist auf die  $CD4^+$  T-Zellen bezogen. Als Isotypkontrolle zur anti-Foxp3-Markierung diente ein IgG2a,  $\kappa$  Ak. Die Werte für das Histogramm stammten aus der Auswertung der Dot Plots der durchflusszytometrischen Messung. Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

### 3.5.8. Qualitative Untersuchung regulatorischer T-Zellen

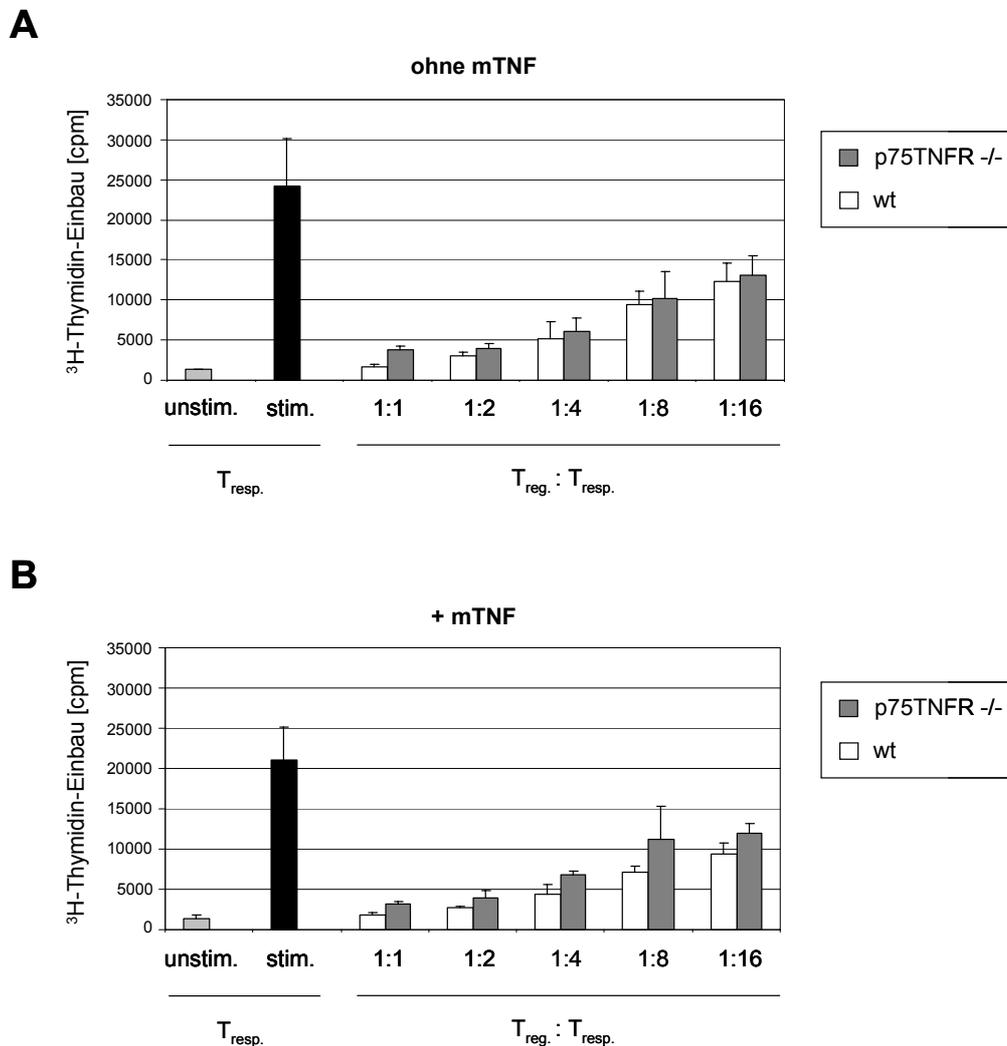
Die regulatorischen T-Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen sollten auf ihre Funktionalität hin geprüft werden. Die Hauptaufgabe regulatorischer T-Zellen liegt darin, die bei immunologischen Prozessen wichtige Homöostase aufrecht zu erhalten und Autoimmunerkrankungen zu verhindern. Die aktivierten T-Lymphozyten werden dabei von den regulatorischen T-Zellen kontrolliert, indem ihre Proliferation und ihre Zytokinproduktion gehemmt wird.

Diese Suppression der Zellvermehrung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurde *in vitro* mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T-Zellpopulationen aus p75TNFR-defizienten Mäusen getestet. Die beiden T-Zellgruppen wurden über magnetvermittelte Sortierung (MACS) aus Milzzellen isoliert, wobei die regulatorischen T-Zellen noch zusätzlich durchflusszytometrisch sortiert wurden, um reine Populationen zu erhalten. Um eine Proliferation der aus C57BL/6 gewonnenen Responder-T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>) zu ermöglichen, wurden diese mit ebenfalls über MACS angereicherten und zuvor bestrahlten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) sowie mit löslichen anti-CD3 Antikörpern inkubiert. In Gegenwart von funktionstüchtigen regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) sollte die Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responder-T-Zellen aus der Wildtypmaus vermindert sein. Je mehr regulatorische T-Zellen in der Kultur vorhanden sind, desto stärker sollte die Proliferationshemmung sein. In Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen wurde nach drei Tagen die Proliferation der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responderzellen über den <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau ermittelt.

Der gleiche Versuchsansatz wurde in Anwesenheit von mTNF durchgeführt, um die Auswirkungen einer verstärkten Signaltransduktion über den p75TNFR auf die suppressive Aktivität zu überprüfen.

Wie Abb. 40 zu entnehmen ist, proliferierten die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Responder-T-Zellen der Wildtypmäuse nach Stimulierung durch Antigen-präsentierenden Zellen und anti-CD3-Antikörpern deutlich. Nach Zugabe unterschiedlicher Mengen an regulatorischen T-Zellen war die Proliferation dosisabhängig vermindert. Die suppressive Aktivität der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen aus p75TNFR-defizienten Tieren war in Anwesenheit von TNF tendenziell etwas geringer als die Suppression der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen, die aus Wildtypmäusen stammten. Aufgrund einer reduzierten suppressiven Aktivität der regulatorischen T-Zellen der p75TNFR-defizienten

Mäuse in Gegenwart von TNF war die Proliferation der Responder-T-Zellen aus den Wildtypmäusen weniger stark beeinträchtigt (Abb. 40).



**Abb. 40: Suppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen.** Aus Milzen der C57BL/6 Mäuse (wt) wurden über MACS angereicherte CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen (T<sub>resp.</sub>) isoliert und diese mit bestrahlten Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die aus den gleichen Wildtypmäusen stammten, und löslichen anti-CD3-Ak stimuliert. Als Negativkontrolle (hellgrauer Balken) wurden unstimulierte Responder-T-Zellen (T<sub>resp.</sub>) mitgeführt. Die regulatorischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) wurden den p75TNFR-defizienten Mäusen bzw. den C57BL/6 Mäusen entnommen. Nach durchflusszytometrischer Sortierung wurden sie in abnehmender Konzentration (1:1 bis 1:16) den Responder-T-Zellen zugesetzt. So bedeutet z. B. eine Verdünnung von 1:4, dass zu einem Teil Responderzellen ein Viertel regulatorische T-Zellen gegeben wurden. In der Positivkontrolle (schwarzer Balken) inkubierten die Responder-T-Zellen ohne Regulatoren. Die Proliferationsrate der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen wurde über <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau nach 3 Tagen gemessen. Die durch die regulatorischen T-Zellen vermittelte Suppression wurde in Abwesenheit (A) bzw. in Anwesenheit (B) von mTNF ermittelt.

## D Diskussion

Tumornekrosefaktor (TNF) nimmt als pleiotropes, inflammatorisches Zytokin in zahlreichen akuten wie auch chronischen Erkrankungen eine wichtige Stellung ein. Seine Effekte werden über die Aktivierung von zwei transmembranständigen Rezeptoren, dem p55TNF-Rezeptor (p55TNFR, TNFR1, CD120a) und dem p75TNF-Rezeptor (p75TNFR, TNFR2, CD120b), vermittelt. Während die Bedeutung des p55TNFR weitestgehend geklärt ist, wird sich um die Erforschung der Funktion des p75TNFR weiter intensiv bemüht. Da in einigen inflammatorischen Prozessen beide TNF-Rezeptoren involviert sind, liegt es nahe, dass auch die erst kürzlich entdeckte Isoform des p75TNFR, der icp75TNFR (Seitz, 2001), eine wichtige Rolle spielt. Für eine mögliche biologische Relevanz spricht auch die Tatsache, dass der icp75TNFR nicht nur in unterschiedlichen Spezies, wie Maus und Mensch, sondern auch in einigen Primaten vorzufinden ist. Durch zahlreiche Sequenzvergleiche wurde entdeckt, dass aus phylogenetischer Sicht der Grundstein für die Entstehung dieser Isoform schon vor mehreren Millionen Jahren gelegt wurde und bis heute dem evolutiven Wettstreit Stand gehalten hat (Singer, 2004). Aufgrund dieser nachgewiesenen Entstehungsgeschichte und der Möglichkeit, einen weiteren funktionsträchtigen Rezeptor für den zentralen Mediator TNF zu haben, wurde das Augenmerk in dieser Arbeit auf die Charakterisierung von Mäusen gerichtet, die diesen humanen icp75TNFR überexprimieren, sowie auf die weitere Charakterisierung des p75TNFR.

### 1. Genotypisierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse

Damit eine Zucht mit den hicp75TNFR-transgenen Mäusen etabliert werden konnte, wurde in dieser Arbeit damit begonnen, die Foundertiere zunächst mit Wildtyptieren zu verpaaren, in diesem Fall mit C57BL/6-Mäusen. Als heterozygote Foundermäuse wurden die zwei Tiere Nr. 46 und 62 ausgewählt, da mit Hilfe der Southern Hybridisierung in den jeweils aus ihren Schwanzbiopsien isolierten DNA-Proben eine deutliche Bande, die das vorhandene Transgen beweist, zu erkennen war. Mit diesen beiden Mäusen wurden zwei Linien aufgebaut, um festzustellen, ob eventuell abweichende Integrationsorte des

Transgens im Genom verschiedene Auswirkungen auf den Phänotyp zeigen können und ob das Transgen vererbt wird. Die Nachkommen dieser Verpaarungen wurden schließlich sowohl durch PCR-Analysen als auch mittels Southern Hybridisierung genotypisiert (s. Abb. 7 und 8). Mit beiden Nachweismethoden konnte das insertierte Transgen in der genomischen DNA detektiert werden. Um sicher zu gehen, dass dieses Gen auch transkribiert wird, wurde der *hicp75TNFR* auch in der RNA, die aus lymphoiden Organen, wie Thymus, Lymphknoten und Milz, sowie aus Leber und Colon der transgenen Mäuse isoliert wurde, nachgewiesen (s. Abb. 9). Der im ELISA detektierte lösliche, humane *p75TNFR* (*shp75TNFR*), der nach LPS-Injektion in den Seren *hicp75TNFR*-transgener Mäuse gefunden wurde, deutet darauf hin, dass auch Translation stattgefunden hat (s. Abb. 10). Da die Extrazellulärdomäne des *hicp75TNFR* sich nicht von der des humanen *p75TNFR* unterscheidet (s. Abb. 2), muss davon ausgegangen werden, dass ebenso im Falle der Isoform die Metalloprotease TACE (ADAM17) die Extrazellulärdomäne nach einem bestimmten Stimulus, wie hier LPS, abspalten kann und dadurch eine lösliche Form des Rezeptors gebildet wird, die im ELISA nachgewiesen wurde (Black, 1997, Moss, 1997). Die Detektion des *hicp75TNFR* sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene und der Nachweis des löslichen Rezeptors im Serum der Mäuse, waren die Beweise dafür, dass die gentechnischen Veränderungen des Genoms bis zur Produktion des Proteins umgesetzt wurden.

Um einen möglicherweise spezifischen Phänotyp der transgenen Mäuse weiter zu verstärken, sollten homozygote Tiere gezüchtet werden. Dafür wurden Zuchtpaare gebildet, die aus heterozygot transgenen Weibchen und Männchen bestanden. Nach den Mendelschen Gesetzen sollten 25 % der Nachkommen nicht transgen und 50 % heterozygot transgen sein. 25 % der Jungtiere müssten demnach das Transgen auf beiden Allelen tragen. Eine Möglichkeit diese Homozygotie nachzuweisen, ist die Rückkreuzung potentiell homozygoter Tiere mit Wildtypmäusen, wie z. B. mit C57BL/6 Mäusen. Alle Nachkommen sollten transgen sein, falls der entsprechende Elternteil wirklich homozygot ist. Lediglich eine männliche Maus der F2-Generation erfüllte diese Bedingungen fast (s. Abb. 5). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass unter den Jungtieren des zweiten Wurfes eine Maus war, in der sowohl mittels PCR-Analyse als auch mit Hilfe der Southern Hybridisierung das Transgen nicht detektiert werden konnte. Außerdem ist der eventuell homozygot transgene Elter nach den beiden Würfen verstorben, so dass die

Genotypisierung nicht weiter verfolgt werden konnte. Weiter ist bei der Festlegung der Homozygotie wichtig, dass alle Tiere eines Wurfes erfasst werden, da schon ein einzelnes Tier, das frühzeitig verstirbt, das Ergebnis verfälschen kann. Problematisch war zudem die Tatsache, dass einige möglicherweise homozygote Mäuse ungeachtet des Geschlechts nicht fertil waren und keine Nachkommen bekamen. Man kann an dieser Stelle darüber spekulieren, ob sich eine Sterilität in der Insertion des Transgens begründet. Auch eine Letalität homozygoter Tiere während der Embryonalphase, könnte die Ursache dafür sein, trotz mehrerer Verpaarungen keine homozygot transgene Maus erhalten zu haben. Um diese Mutationen in homozygoter Form aber belegen zu können, müssten Embryonalfibroblasten einzelner Tiere untersucht werden.

Da sich ein biologisch relevanter Phänotyp, der einen Hinweis auf die Bedeutung des *hicp75TNFR* geben kann, auch in einer heterozygot transgenen Maus erweisen sollte, wurde diese Problematik nicht weiter verfolgt. Alle in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Phänotypisierung wurden somit mit heterozygoten *hicp75TNFR*-transgenen Mäusen durchgeführt.

## **2. Phänotypisierung der *hicp75TNFR*-transgenen Mäuse und *p75TNFR*-defizienten Mäuse**

Die Voraussetzung für das potentielle Auftreten eines charakteristischen Phänotyps der *hicp75TNFR*-transgenen Mäuse ist die Fähigkeit des transgenen humanen Rezeptors, seinen endogenen Liganden TNF in der Maus (mTNF) zu binden. Aus der Literatur ist bekannt, dass der *p75TNFR*, im Gegensatz zum *p55TNFR*, speziesspezifisch ist. So besitzt dieser Rezeptor in der Maus (*mp75TNFR*) eine äußerst geringe Affinität für humanes TNF (hTNF) (Lewis, 1991). Der humane *p75TNFR* allerdings kann neben dem hTNF auch mTNF binden. Im Falle des *hicp75TNFR* wurde diese Bindungsfähigkeit indirekt untersucht. Man machte sich die Eigenschaft des *hicp75TNFR* sowie des *p75TNFR* zunutze, dass die extrazelluläre Domäne durch Metalloproteasen abgespalten werden kann (Black, 1997). Falls eine genügend große Ligand-Rezeptor Affinität vorhanden ist, wird TNF von dieser löslichen Form des Rezeptors gebunden. Durch Komplexieren von TNF im Zellüberstand wird somit die über den *p55TNFR* induzierte Apoptose der Zielzellen gehemmt. Bis zu einer Konzentration von 0,01 ng/ml mTNF

waren die Zellen, die mit dem löslichen hicp75TNFR bzw. löslichen p75TNFR enthaltenden Überstand inkubiert wurden, vor der Zytotoxizität des mTNF partiell geschützt. Im Vergleich dazu lag die Überlebensrate der Zielzellen, die mit dem Überstand der mit einem Kontrollvektor transient transfizierten Zellen versetzt waren, bei gleicher mTNF-Konzentration nur bei ca. 40 %. Dass die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor höher ist, wenn man innerhalb der gleichen Spezies bleibt, zeigen die Ergebnisse aus der Inkubation der Zellen mit hTNF. Sowohl der lösliche p75TNFR als auch der lösliche hicp75TNFR haben humanes TNF bis zu einer Konzentration von 0,9 ng/ml neutralisiert und die Zielzellen gut vor Apoptose geschützt. Die Zellen, die keinen löslichen TNFR aus dem konditionierten Medium erhielten, wiesen in Anwesenheit der entsprechenden hTNF-Konzentration lediglich eine Überlebensrate von ca. 25 % auf (s. Abb. 11). Die Fähigkeit des hicp75TNFR das in der Maus vorhandene endogene mTNF zu binden, konnte dadurch indirekt nachgewiesen werden. Der Grundstein war damit gelegt, um prinzipiell eine Veränderung des Phänotyps von Mäusen durch Überexpression des hicp75TNFR zu provozieren.

TNF-Rezeptoren und TNF wie andere Mitglieder der TNFR-Familie mit ihren Liganden nehmen neben anderen wichtigen immunologischen Funktionen einen großen Einfluss auf die Organogenese des peripheren lymphatischen Systems. Sekundäre lymphatische Gewebe, wie Milz, Lymphknoten oder Peyer'sche Plaques, werden für die ersten Orte gehalten, in denen sich eine humorale Antwort des Immunsystems entwickelt. Über Chemokin- und Zytokin-vermittelte Interaktionen von Antigen-präsentierenden Zellen mit T- und B-Lymphozyten werden beispielsweise Keimzentren oder entsprechende Antikörper produziert (Aggarwal, 1996, Liu, 1996). Fehlt dem Organismus TNF oder eine seiner verwandten Liganden bzw. Rezeptoren, dann hat dies für die adaptive Immunantwort massive Auswirkungen zur Folge. So sind in p55TNFR-defizienten Mäusen die Peyer'schen Plaques in ihrer Struktur komplett zerstört und sind in ihrer Anzahl vermindert. (Le Hir, 1996, Neumann, 1996, Pasparakis, 1997). Wie auch in den TNF-defizienten Mäusen ist in diesen Tieren die Milzarchitektur hauptsächlich in der B-Zell-Region verändert. Beide defizienten Mauslinien können außerdem keine funktionsfähigen Keimzentren für die B-Zell-Reifung bilden (Korner, 1997, Pasparakis, 1996). Im Gegensatz dazu wurden für p75TNFR-defiziente Mäuse bisher keine Defekte in der Organogenese des Immunsystems beschrieben. Auch dessen Isomer, der

icp75TNFR, scheint darauf keinen Einfluss zu haben, wie mikroskopische Untersuchungen von Hämatoxylin/Eosin gefärbten histologischen Schnitten der einzelnen Organpräparationen zeigten (s. Abb. 12). Die lymphatischen Organe, wie mesenteriale Lymphknoten, Peyer'sche Plaques, Thymus und Milz sind in den hicp75TNFR transgenen Mäusen normal entwickelt. Auch die nicht-lymphatischen Organe wie Leber und Colon wiesen keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Struktur auf.

Die Morphologie der Organe sowie die Verhaltensweisen der hicp75TNFR-transgenen Mäuse waren, den durchgeführten Experimenten nach zu schließen, völlig normal. Ähnlich den p75TNFR-defizienten Mäusen zeigten sich rein äußerlich keine Auffälligkeiten.

## **2.1. Untersuchung des hicp75TNFR auf Makrophagen**

Der cDNA, die den hicp75TNFR kodiert, wurde ein Ubiquitin-Promotor vorangestellt, aufgrund dessen der Rezeptor in der Maus nach Integration des Transgens auf allen Zellen zu finden sein sollte. Sein Isomer, der p75TNFR wird auch auf Immunzellen exprimiert, weshalb Makrophagen, die einen entscheidenden Beitrag in der Immunantwort liefern, für die funktionellen Untersuchungen als ein interessanter Zelltyp angesehen wurden. Da Makrophagen eine gute Quelle für TNF sind, wäre es prinzipiell denkbar, dass über den icp75TNFR diese Zellpopulation vor endogenem TNF geschützt sein könnte, indem sie zwar das Zytokin sezernieren, zugleich jedoch dessen zytotoxische Wirkung sich aufgrund der intrazellulären Signalkaskade des icp75TNFR nicht entfalten kann. Wie häufig beschrieben, ist TNF neben einer Vielzahl an anderen biologischen Aktivitäten auch an der LPS-induzierten Apoptose von Makrophagen beteiligt (Freudenberg, 1988). Dieser programmierte Zelltod wird eingeleitet über den p55TNFR und über dessen weitere Signalkaskade, die eine Caspase-Aktivierung mit einschließt.

Peritoneal-Exsudat-Zellen (PEC), die für dieses Experiment verwendet wurden, bestehen zu 50 % aus Makrophagen, wenn die Mäuse 3 Tage zuvor durch intraperitoneale Injektion von Thioglykolat behandelt wurden. Man inkubiert diese Makrophagen mit mTNF für 24 Stunden und bestimmt dann ihre mitochondriale Aktivität photometrisch über die Umsetzung des Farbstoffes MTT zu Formazan. Wie bereits zuvor beschrieben, sollten auch hicp75TNF-Rezeptoren von den Makrophagen transgener Mäuse nach

Stimulierung über mTNF in den Überstand abgegeben werden und TNF binden. Durch diese Neutralisierung müssten Makrophagen aus transgenen Mäusen daher vor der mTNF-induzierten Zytotoxizität geschützt sein. Wie die Ergebnisse in Abb. 13 zeigen, war der Schutz der Zellen vor mTNF-vermittelter Zytotoxizität durch Überexpression des *hpc75TNFR* nur mäßig ausgeprägt. Dennoch ließ sich auch an diesen isolierten Makrophagen *ex vivo* zeigen, dass durch die Bildung der löslichen Rezeptorform, mTNF neutralisiert werden kann. Entsprechend wurden LPS-induzierte Zytotoxizitätstests mit Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen beschrieben. Diesen Zellen fehlt die Fähigkeit, löslichen p75TNFR zu bilden und damit TNF zu komplexieren. Die Überlebensrate der Makrophagen, die aus den p75TNFR-defizienten Mäusen isoliert wurden, war nach LPS-Stimulierung sehr viel geringer als in Wildtypmäusen (Takada, 2003). Da Makrophagen nach LPS-Stimulierung vermehrt TNF freisetzen (Xaus, 2000), entspricht diese Theorie der TNF-Neutralisierung durch löslichen TNF-Rezeptor zum Schutz vor Zytotoxizität den Ergebnissen dieser Arbeit.

## **2.2. Untersuchungen zur Funktion des p75TNFR auf T-Zellen**

In der adaptiven Immunantwort nehmen T-Zellen eine zentrale Stellung ein. Um eine effektive Aktivierung zu erzielen, benötigt es neben einer Antigen-spezifischen Erkennung über den T-Zellrezeptor zusätzlich costimulatorische Moleküle, die sowohl ein positives Signal für eine stabile T-Zellantwort liefern als auch die Feinabstimmung der T-Zell-Differenzierung steuern. Zwei Familien an costimulatorischen Rezeptoren wurden für T-Zellen identifiziert: die CD28- und die TNFR-Superfamilie.

CD28 verringert zum einen den Schwellenwert für Signale, der über den T-Zellrezeptor für die T-Zellaktivierung erforderlich ist. Zum anderen spielt CD28 eine Rolle in der Steigerung der anfänglichen klonalen Expansion. So wird die Produktion des T-Zellwachstumsfaktors IL-2 reguliert und die Expression an antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie vergrößert (Boise, 1995, Fraser, 1991).

Während CD28 für die initialen Stadien der Aktivierung innerhalb von 24 h nach Antigenerkennung wichtig ist, scheinen die Mitglieder der TNFR-Superfamilie, OX40 (CD134), 4-1BB und CD27, für die Erhaltung der Immunantwort verantwortlich zu sein. So erreichen sie nach Antigenstimulierung ihre höchste Expression an den Tagen 2 bis 4

(Croft, 2003). Ihre Aufgaben bestehen darin, das Überleben der T-Zellen zu fördern. Sie sind aber ebenso für den Übergang der Effektor-T-Zellen in Gedächtnis-T-Zellen zuständig.

Seit einiger Zeit gibt es Hinweise darauf, dass auch TNF und einer seiner Rezeptoren, der p75TNFR, einen entscheidenden Beitrag zur Costimulation von T-Zellen leisten (Tartaglia, 1993b, Yokota, 1988). Eine weitere Studie belegte diese Funktion an humanen T-Zellen (Aspalter, 2003). Antigen-präsentierende Zellen (APC) produzieren neben CD28-Liganden auch TNF in ihrem aktivierten Zustand. Außerdem wird die T-Zellproliferation nach exogener Zugabe von T-Zellrezeptoragonisten und TNF beträchtlich gesteigert. Diese proliferative T-Zellantwort konnte wiederum durch einen neutralisierenden Antikörper gegen TNF aufgehoben werden (Pimentel-Muinos, 1994). Aus der Literatur ist weiter bekannt, dass aus Lymphknoten der Maus isolierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen den p75TNFR konstitutiv auf der Oberfläche tragen (Kim, 2004). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in denen gezeigt werden konnte, dass CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowohl aus dem Thymus, als auch aus der Milz von Wildtypmäusen diesen Rezeptor auf der Oberfläche exprimierten (s. Abb. 27 und 29). Nach Stimulierung mit anti-CD3- und anti-CD28-Antikörpern wurde nach 24 bzw. 48 h eine Erhöhung der Rezeptorexpression auf beiden T-Zellpopulationen, die man aus der Milz gewann, beobachtet (s. Abb. 30). Für CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Lymphknoten wurde dies bereits beschrieben (Kim, 2004). Ebenso konnte schon demonstriert werden, dass nach mehreren Stunden Stimulierung die IL-2 Produktion, die wichtig für die T-Zellproliferation ist, und die IFN $\gamma$ -Produktion, die während der T-Zellaktivierung stattfindet, von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Lymphknoten p75TNFR-defizienter Mäuse vermindert war (Kim, 2001). In dieser Arbeit wurde an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und an CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz Ähnliches festgestellt. So wurde in Zellüberständen dieser T-Zellpopulationen, die aus p75TNFR-defizienten Mäusen isoliert wurden, nach 24 stündiger anti-CD3 und anti-CD28 Stimulierung eine reduzierte IL-2- respektive IFN $\gamma$ -Konzentration gemessen. Mit Ausnahme der IL-2-Produktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen, die deutlich niedriger lag als von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, nivellierte sich nach 48 h die Menge der Zytokine und Werte wie in Wildtypüberständen konnten nahezu erreicht werden (s. Abb. 31 bis 33). Diese Resultate untermauern die Hypothese, dass der p75TNFR die Funktion eines Costimulators hat, indem er gerade in der Initialphase der T-Zellantwort neben Herabsetzung der Reizschwelle auch durch entsprechende Zytokinproduktion für

das notwendige Milieu sorgt, um eine optimale T-Zellproliferation und damit Immunantwort zu gewährleisten. Diese Aufgaben schrieb man diesem Rezeptor der TNFR-Superfamilie bereits in mehreren Publikationen zu. So wurde schon 1988 berichtet, dass *in vitro* TNF als Wachstumsfaktor für Mausthymozyten nach Lektinstimulierung diene (Ranges, 1988). Wie bereits erwähnt, erkannte man an humanen Thymozyten, dass TNF die Proliferation in Anwesenheit von Con A steigerte. Zusätzlich wurde eine Stimulierung der Proliferation sowohl unreifer T-Zellen aus dem Thymus, als auch peripherer T-Zellen durch einen agonistischen Antikörper gegen den p75TNFR, nicht aber gegen den p55TNFR, beobachtet (Tartaglia, 1993b). Dass die Proliferation über den p75TNFR unabhängig von dem p55TNFR gesteigert werden kann, wurde zusätzlich für Thymozyten, die aus TNFR-defizienten Mäusen gewonnen wurden, beschrieben (Grell, 1998a). Um die gleiche proliferative Antwort auf ein spezifisches T-Zellrezeptor vermitteltes Signal wie in Wildtyp-T-Zellen zu erhalten, benötigt es in p75TNFR-defizienten T-Zellen einer viel höheren Konzentration an anti-CD3-Antikörpern (Kim, 2001). Die Ergebnisse dieser Arbeit mit p75TNFR-defizienten Mäusen bestätigte diese Erkenntnis. Nach anti-CD3 und anti-CD28 Stimulierung wiesen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen der p75TNFR-defizienten Tiere ein Defizit in ihrer Fähigkeit zu proliferieren auf (s. Abb. 36). Bei den aus hicp75TNFR-transgenen Mäusen isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen hätte man demnach erwarten können, dass sie aufgrund ihrer vermehrten Expression des Rezeptors stärker expandieren. Die Daten zeigen allerdings keinen Unterschied zu Wildtypmäusen im <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau, sondern eine unveränderte Proliferation (s. Abb. 35). Vergleicht man die Zusammensetzung der T-Zellen, die aus den gentechnisch veränderten Mäusen gewonnen wurden, im Hinblick auf ihren Anteil an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen, so wurde weder in den hicp75TNFR-transgenen Mäusen noch in den p75TNFR-defizienten Mäusen eine Veränderung festgestellt (s. Abb. 34). Die grundsätzliche Verteilung und damit die Möglichkeit der T-Zellen in beide Populationen auszudifferenzieren, scheint wohl nicht von dem p75TNFR oder von seinem Isomer abzuhängen. Die Aufgabe des Rezeptors liegt demnach vielmehr darin, als Costimulator für die IL-2 Induktion klonale Expansion und für das Überleben respektive den Erhalt funktionstüchtiger T-Zellen in der frühen Phase der T-Zellantwort zu sorgen. An p75TNFR-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen war demonstriert worden, dass während des initialen Stadiums der T-Zellaktivierung diese Zellen empfindlicher für Apoptose reagierten (Kim, 2004). Des Weiteren wurde kürzlich gezeigt, dass der p75TNFR auch

das Überleben der T-Zellen während der T-Zelldifferenzierung reguliert (Kim, 2006). Es scheint also für eine optimale und kontrollierte T-Zellantwort eine wichtige Beziehung zwischen dem T-Zellrezeptor, CD28 und dem p75TNFR zu geben. Inwieweit der icp75TNFR eine gesonderte Rolle hierbei spielt bleibt fraglich, da weder quantitative noch qualitative Untersuchungen Hinweise ergeben haben.

### 2.3. p75TNFR auf regulatorischen T-Zellen

Zu einer Untergruppe der T-Lymphozyten zählt man die regulatorischen T-Zellen. Sie sind von großer Bedeutung in der Aufrechterhaltung und Kontrolle der T-Zell-Homöostase sowie in der Regulierung der Immunantwort auf Autoantigene, Alloantigene, Pathogene und Krebszellen (Sakaguchi, 2001). Neben den beiden regulatorischen T-Zellgruppen Tr1 und Th3 stellen die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen die Population dar, die bisher am Besten charakterisiert wurde. Eine Funktionsstörung oder ein Mangel an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen kann die Ursache für Autoimmunkrankheiten, wie Diabetes oder rheumatoide Arthritis, sein. Die Expansion dieser Population soll wiederum zu einer Toleranz gegenüber Transplantationen führen (Sakaguchi, 2005). *In vitro* besitzen regulatorische T-Zellen die Fähigkeit nach T-Zellrezeptor vermittelter Stimulation, die Proliferation von Effektor-T-Zellen zu unterdrücken (Bach, 2003). Außerdem sind sie dadurch gekennzeichnet, dass sie nach einer polyklonalen Aktivierung im Gegensatz zu Effektor-T-Zellen keine Zytokine, wie IL-2 oder IFN $\gamma$ , produzieren (Annunziato, 2002). Als spezifischer Marker zur Detektion dieser regulatorischen T-Zellpopulation dient neben CD25, der  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors, Foxp3 (Roncador, 2005). Es handelt sich dabei um einen Transkriptionsfaktor, der spezifisch von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen endogen exprimiert wird und als Marker in ihrer Entwicklung und Funktion angesehen wird (Fontenot, 2003, Hori, 2003). So wurde berichtet, dass die Abwesenheit von Foxp3 sowohl in der Maus als auch im Menschen eine tödliche Immunerkrankung als Konsequenz einer chronischen T-Zellaktivierung zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu wiesen transgene Mäuse, die Foxp3 überexprimierten, verminderte T-Zellfunktion auf (Khattari, 2001).

Die vorliegenden Untersuchungen an Thymozyten der Maus haben gezeigt, dass CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen den p75TNFR auf der Oberfläche exprimieren. Darüberhinaus

wurde auf dieser regulatorischen T-Zellpopulation mehr p75TNFR detektiert als auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Effektor-T-Zellen (s. Abb. 28). Diese Beobachtungen decken sich mit früheren Studien, in denen bereits die konstitutive Oberflächenexpression des p75TNFR auf humanen Thymozyten gefunden wurde (Annunziato, 2002).

Die Vermutung liegt daher nahe, dass TNF einen direkten Effekt auf regulatorische T-Zellen ausüben kann. Gestützt wird dies außerdem durch eine Publikation, in der demonstriert wurde, dass durch Neutralisierung von TNF die beeinträchtigte Funktion der regulatorischen T-Zellen in Patienten mit rheumatoider Arthritis wieder hergestellt werden konnte (Ehrenstein, 2004).

Wie in Abb. 37 und 38 dargestellt, wurde der relative Anteil an intrinsischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen an gesamten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz naiver Mäuse bestimmt. Dabei unterschieden sich die Zellpopulationen sowohl der hicp75TNFR-transgenen Tiere als auch der p75TNFR defizienten Mäuse mengenmäßig nicht von denen der Kontrollen. Die Bildung CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen hängt somit wohl grundsätzlich weniger von der Anwesenheit des p75TNFR ab. Auch die Überexpression seines Isomers, der hicp75TNFR, scheint darauf keinen Einfluss zu nehmen.

Da die kontrollierenden Aufgaben der regulatorischen T-Zellen hauptsächlich nach T-Zellaktivierung respektive bei Entzündungen zum Tragen kommen, wurden die Funktionen des hicp75TNFR und des p75TNFR während einer polymikrobiellen Sepsis untersucht. Ein geeignetes Tiermodell ist dafür die subletale CLP (*cecal ligation and puncture*), in der durch Abbinden und Perforation des Caecums eine septische Peritonitis induziert wird (Wichterman, 1980). Während sich in der Anzahl an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen die hicp75TNFR-transgenen Mäuse nur wenig von den Wildtypmäusen unterschieden, fehlte im Verlauf der 48 h nach Behandlung in den p75TNFR-defizienten Mäusen die in den Vergleichsmäusen beobachtete Erhöhung der regulatorischen T-Zellen. In den Mäusen, die keinen p75TNFR exprimierten, konnte sowohl nach einem als auch nach zwei Tagen subletaler CLP signifikant weniger CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen detektiert werden. Ein den Wildtypmäusen vergleichbarer Anstieg der Zahl an regulatorischen T-Zellen blieb in den p75TNFR-defizienten Mäusen nach Induktion der Sepsis aus (s. Abb. 39). Die Interaktion von TNF mit p75TNFR scheint daher für die Induktion regulatorischer T-Zellen nach einer Infektion von Bedeutung zu sein.

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Experimente mit p75TNFR-defizienten und p55TNFR-defizienten Mäusen, in denen mittels letaler CLP ebenfalls eine polymikrobielle Sepsis induziert wurde. Im Gegensatz zu den p55TNFR-defizienten Tieren, wiesen die p75TNFR-defizienten Mäuse ein ausgeprägtes Krankheitsbild auf, das sich durch eine stärkere Hypothermie und eine verkürzte Überlebensdauer auszeichnete. Diese Daten deuten darauf hin, dass der p55TNFR die TNF-induzierte Pathogenese der Sepsis vermittelt, wohingegen der p75TNFR für die protektiven Effekte verantwortlich ist (Ebach, 2005). Dass TNF in akuten Entzündungen ebenso einen suppressiven Effekt ausüben kann, zeigte ein weiterer Bericht. Die Vorbehandlung von Wildtypmäusen mit geringen Mengen LPS führte zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber Zweitinfektionen mit beispielsweise letalen Mengen LPS oder letaler CLP. Diese LPS-induzierte Resistenz fehlte allerdings in TNF-defizienten und p75TNFR-defizienten Mäusen, da deren entsprechende Vorbehandlung zu keiner Reduzierung der Mortalität führte. Die Aktivierung des p75TNFR über endogenes TNF trägt wohl dazu bei, eine LPS-induzierte Toleranz zu entwickeln (Echtenacher, 2002). Aus diesen Erkenntnissen kann man ebenfalls aufgrund der p75TNFR-Defizienz auf eine mangelhafte Erhöhung der Anzahl der Regulatoren schließen, wodurch eine Protektion vor septischer Peritonitis im letalen CLP-Modell respektive eine Toleranzinduktion erschwert wird.

In Diskrepanz dazu wurde kürzlich behauptet, dass TNF im humanen System über den p75TNFR die suppressive Aktivität von regulatorischen T-Zellen hemmt. Diese Inhibition war mit einer Reduktion der Foxp3-Expression auf humanen Regulatoren verbunden (Valencia, 2006). Allerdings gibt es auch einen Bericht, in dem nach Verabreichung von TNF, NOD (*non-obese diabetic*)-Mäuse, die als klassisches Autoimmuntiermodell für insulinabhängigen Diabetes mellitus Typ 1 gelten, eine Expansion an regulatorischen T-Zellen aufwiesen und dadurch vor Diabetes geschützt waren (Wu, 2002).

*In vitro* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Effektor-T-Zellen nach Zugabe von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen tendenziell mehr proliferierten als T-Zellen, die mit Wildtyp-Regulatoren versetzt wurden. Die regulatorischen T-Zellen, die keinen p75TNFR auf der Oberfläche besitzen, wiesen daher auf einen Mangel in ihren suppressiven Eigenschaften hin. In Anwesenheit von TNF wurde diese dosisabhängige Beeinträchtigung tendenziell etwas deutlicher (s. Abb. 40). Diese Beobachtung passt zu den in dieser Arbeit ermittelten Daten im CLP-Modell, in der

eine verminderte Expansion der regulatorischen T-Zellen im Falle der Abwesenheit des p75TNFR nachgewiesen werden konnte.

## **2.4. Untersuchungen zur Funktion des h1c1p75TNFR und p75TNFR in Entzündungen**

### **2.4.1. Akute und chronische entzündliche Darmerkrankung**

Die beiden Hauptformen inflammatorischer Darmerkrankungen beim Menschen sind Colitis ulcerosa und Morbus Crohn. Während sich die Entzündung in der Colitis ulcerosa auf das Rektum und den Colon beschränkt, können bei Morbus Crohn alle Abschnitte des Verdauungstrakts, wie Colon, Caecum und Ileum, betroffen sein. Studien zeigten, dass als Ursachen für diese in der Regel chronisch und in Schüben verlaufenden Erkrankungen Umweltfaktoren wie auch genetische Prädispositionen gelten (Satsangi, 1997).

Seit einiger Zeit wird ein monoklonaler Antikörper gegen TNF, der unter dem Wirkstoffnamen Infliximab (Remicade<sup>®</sup>) als Arzneimittel zugelassen ist, als heilsame Therapie bei Patienten mit Morbus Crohn eingesetzt, die nicht auf eine adäquate, konservative Medikation mit Glukokortikoiden oder Immunsuppressiva ansprechen (Ellerin, 2003). Da zudem die zentrale Rolle von TNF als Mediator in entzündlichen Darmerkrankungen beim Menschen in Publikationen mehrfach beschrieben wurde (Neurath, 1997, Powrie, 1994), sollte in diesem Zusammenhang die Funktion des h1c1p75TNFR geprüft werden.

Als Tiermodell wurde die erstmals von Okayasu *et al.* beschriebene DSS (*dextran sodium sulphate*) induzierte Colitis eingesetzt, mit dem sowohl eine akute als auch eine chronische Form der Darmentzündung ausgelöst werden kann (Okayasu, 1990).

In der induzierten Colitis ist die konzentrations- und zeitabhängige Toxizität von DSS vor allem gegen intestinale Epithelzellen gerichtet. In der Initialphase findet eine direkte DSS-vermittelte Zytotoxizität statt, die im Nachfolgenden zu einer pathologischen Interaktion zwischen Lymphozyten und Epithelzellen führt (Ni, 1996). Der gesunde Gastrointestinaltrakt dient neben der Nahrungsaufnahme auch gleichzeitig durch ein intaktes Darmepithel als Barriere für pathogene Keime. Wird diese Epithelschicht geschädigt, z. B. durch DSS, so können Bakterien die Mucosa und Submucosa

durchdringen und eine Immunantwort auslösen, die schließlich zu einer Entzündung führt. Aktivierte Makrophagen sezernieren daraufhin IL-12 und andere proinflammatorische Moleküle, was zu einer Differenzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Th1-Effektor T-Zellen führt, die ihrerseits wiederum hauptsächlich TNF und IFN $\gamma$  produzieren. Dieser Kreislauf wird normalerweise von regulatorischen T-Zellen (T<sub>H</sub>3) kontrolliert, die antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$  abgeben (O'Garra, 1998, Parronchi, 1997, Simpson, 1998). Für die Chronifizierung der Erkrankung scheint außerdem das Zusammenspiel zwischen aktivierten Makrophagen und ebenfalls aktivierten T-Zellen verantwortlich zu sein, während in der akuten Colitis die Makrophagen allein die entscheidenden Aktivatoren sind (Egger, 2000).

Die Ergebnisse der akuten Colitis in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass sich die hicp75TNFR-transgenen Mäuse in ihrem Entzündungsgrad nicht signifikant von den Kontrollmäusen unterschieden. Sowohl der histologische Score, der sich aus dem Maß an Epithelschaden und Infiltrat von Lymphozyten, Neutrophilen und Eosinophilen zusammensetzt, als auch die Anzahl der Lymphfollikel in der Dickdarmmucosa sowie die Dickdarmlängen und Gewichtsverläufe ähnelten sich in den beiden Versuchsgruppen (s. Abb. 14 bis 17). Alle genannten Parameter deuteten auf eine gleichermaßen ausgeprägte Entzündungsreaktion im Colon hin.

In der Literatur wird die Bedeutung von TNF in der akuten Phase einer Inflammation kontrovers diskutiert. So konnte im Tiermodell durch die Gabe eines anti-TNF-Antiserums das Ausmaß einer akuten DSS-induzierten Colitis weder gehemmt noch überhaupt verändert werden. Weiter wurde von dieser Arbeitsgruppe postuliert, dass TNF in dem Modell der DSS-induzierten Colitis in der Maus nicht der entscheidende entzündliche Mediator zu sein scheint (Olson, 1995). Das Gegenteil zeigen Kojouharoff *et al.* in ihren Experimenten, in denen ebenfalls mittels DSS-Gabe eine akute Colitis ausgelöst wurde. Dabei erhielten Wildtypmäuse fünf Tage lang während der DSS-Applikation anti-TNF-Antikörper intraperitoneal injiziert. Die Tiere entwickelten daraufhin eine stärkere intestinale Entzündung als die Mäuse, die nicht mit den entsprechenden anti-TNF-Antikörpern behandelt wurden (Kojouharoff, 1997). Die TNF-Neutralisierung durch anti-TNF-Antikörper hemmt die über den p55TNFR-induzierte antimikrobielle Wirkung und ermöglicht folglich translozierenden Bakterien, eine stärkere akute Entzündung zu verursachen. Darüberhinaus gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass gerade in der Initialphase einer akuten Entzündung TNF eine protektive

Rolle übernimmt. In TNF-defizienten Mäusen führte eine siebentägige DSS-Gabe zu einer Verschlimmerung der Colitissymptome. Ebenso waren die Überlebensraten dieser TNF-defizienten Tiere drastisch gesunken im Gegensatz zu Wildtypmäusen (Naito, 2003).

Ebenfalls ein Modell, um akute entzündliche Darmerkrankungen in Mäusen experimentell nachzuahmen, ist die TNBS-induzierte Colitis. TNBS dient dabei als Hapten, das zu einer verzögerten Hypersensibilisierung führt und schließlich eine T<sub>H</sub>1-vermittelte T-Zellantwort gegen eigene Antigene verursacht. p75TNFR-defiziente Mäuse, die nach TNBS-Gabe Colitis entwickelten, wiesen nach fünf Tagen einen geringeren Gewichtsverlust, normale Körpertemperaturen und eine insgesamt verbesserte Überlebensrate auf als die Wildtypmäuse (Ebach, 2005). Diese Ergebnisse decken sich mit denen, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden. Während sich in den p75TNFR-defizienten Mäusen nach DSS-Induktion einer akuten Colitis, die Entzündungsparameter, wie histologischer Score, Anzahl an Lymphfollikeln und Dickdarmlänge, nicht von den Wildtypmäusen unterschieden, zeigten sie im DSS-Modell insgesamt tendenziell und an zwei Tagen signifikant einen geringeren Gewichtsverlust als die Kontrolltiere (s. Abb. 14 bis 17).

Als Folge der p75TNFR-Defizienz, scheint eine alleinige Signaltransduktion von TNF über p55TNFR zu einer systemischen Verbesserung des Krankheitsbildes in der akuten Initialphase zu führen, indem TNF durch Bindung an den p55TNFR eine antibakterielle Wirkung erzielen kann. Dies lässt sich in den vorliegenden Ergebnissen in der signifikant geringeren Gewichtsreduktion am Tag 3 und 5 erkennen. Auch die Tatsache, dass p55TNFR-defiziente Mäuse nach TNBS-Gabe eine stärkere Entzündungsreaktion, die sich durch größeren Gewichtsverlust, Hypothermie und gesteigerte Mortalität äußerte, entwickelten, bekräftigt diese Theorie (Ebach, 2005). Indem in p75TNFR-defizienten Mäusen die Möglichkeit fehlt, lösliches TNF zu neutralisieren, kann über die Bindung von TNF an den p55TNFR eine Signalkasade eingeleitet werden, die in der akuten Inflammation protektive Auswirkungen hat, wohingegen die Interaktion mit dem p75TNFR die Pathologie in diesen Modellen vermittelt.

Die gemessene Serumkonzentration an löslichem p75TNFR, der durch proteolytische Abspaltung der Extrazellulärdomäne des p75TNFR bzw. hicp75TNFR nach Stimulierung entsteht, beträgt in der hicp75TNFR-transgenen Maus etwa 1300 pg/ml. Wie wichtig die Expressionsmenge eines Transgens in unterschiedlichen Experimenten sein kann, wurde

in einer Publikation dargelegt, in der Mäuse, die maximal 0,1 µg/ml ihres Transgens, ein TNFR1-Fusionsprotein, exprimierten, weniger empfindlich auf Infektionen mit *Listerien* und *Leishmanien* reagierten als transgene Mäuse, die das Protein in einer höheren Konzentration besaßen (Garcia, 1995). Die in den hicp75TNFR-transgenen Mäusen vorliegende lösliche Rezeptormenge scheint daher möglicherweise zu gering zu sein, um in diesem Modell über effektive Neutralisierung von TNF eine Entzündungsreaktion im Colon zu modifizieren. Daher verhalten sich die hicp75TNFR-transgenen Mäuse nach Induktion einer Colitis wie die entsprechenden Wildtypmäuse.

Wie anhand des CLP-Modells gezeigt werden konnte (s. Abb. 39), scheinen p75TNFR-defiziente Mäuse in der Induktion von regulatorischen T-Zellen ( $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ) beeinträchtigt zu sein. Während sich im Beginn einer septischen Peritonitis nach ein und zwei Tagen CLP die Anzahl der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen in Wildtypmäusen erhöhte, blieb der Anstieg der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen in p75TNFR-defizienten Mäusen aus. Aufgrund der verminderten Anzahl an regulatorischen T-Zellen in p75TNFR-defizienten Mäusen kann der antibakteriellen Entzündungsreaktion während der Colitis nicht effizient genug entgegengewirkt werden. Die antibakterielle Wirkung über den p55TNFR steht somit im Vordergrund und den Mäusen geht es in der akuten Colitis tendenziell systemisch besser.

Ganz anders ist die Aufgabe von TNF in chronischen Entzündungen zu betrachten. Für einige Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt sind, ist Infliximab, der als monoklonaler Antikörper TNF bindet, ein Gewinn.

Die hicp75TNFR-transgenen Mäuse zeigten in der chronischen DSS-induzierten Colitis wie schon in der akuten Colitis keine signifikanten Veränderungen im histologischen Score, in der Anzahl an Lymphfollikeln und in der Länge des Colons gegenüber den entsprechenden Kontrollmäusen (s. Abb. 18 bis 20). Die Befunde wiesen auf eine moderate Darmentzündung hin, die in beiden Mausgruppen jedoch gleichermaßen ausgeprägt war. Wie bereits erwähnt, scheint auch in diesem chronischen Entzündungsmodell die Menge an erhöhtem löslichen p75TNFR in den transgenen Mäusen nicht ausgereicht zu haben, um TNF soweit zu neutralisieren, dass es in der chronischen Phase zu einer pathologischen Veränderung kommt. Wie wichtig TNF für die Perpetuierung einer chronischen Entzündung sein kann, verdeutlichte eine Publikation, in der in chronischer DSS-induzierter Colitis mit Wildtypmäusen TNF

neutralisiert wurde. Mäusen wurde fünf Tage lang vier bis sechs Wochen nach Vollendung der vier Zyklen, in denen sie DSS-versetztes Wasser bekommen hatten, anti-TNF intraperitoneal injiziert. Durch die Applikation des monoklonalen Antikörpers, der TNF neutralisiert, wurde das Ausmaß der Colitis in den behandelten Mäusen reduziert (Kojouharoff, 1997). Ebenso konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass in p75TNFR-defizienten Mäusen, die also keine Möglichkeit besitzen über Abspaltung der Extrazellulärdomäne des p75TNFR TNF zu binden, die Entzündungsreaktion lokal im Darm stärker ausgeprägt war als in Wildtypmäusen. Die histologischen Untersuchungen ergaben einen signifikant erhöhten Score in den p75TNFR-defizienten Tieren, der durch eine massivere Menge an entzündlichem Infiltrat, sowie durch einen erhöhten Epithelschaden gekennzeichnet wurde (s. Abb. 18).

Neben induzierten Colitismodellen gibt es auch adoptive Transfermodelle, in denen ein selektiver T-Zell Transfer nach einigen Wochen zu entzündlichen Darmerkrankungen führt. Als Empfängermause dienen meist immundefiziente SCID-Mäuse, denen bestimmte T-Zellpopulationen aus Wildtypmäusen oder naiven Mäusen intraperitoneal appliziert werden. Es ist bekannt, dass eine Reihe von Mitgliedern der TNFR-Superfamilie auf T-Zellen exprimiert werden, wie beispielsweise OX40. Nach adoptivem Transfer von  $CD4^+CD45RB^{high}$  T-Zellen aus Wildtypmäusen in SCID-Mäuse konnte durch Behandlung mit anti-OX40L, ein monoklonaler Antikörper gegen den Liganden von OX40, eine Verbesserung der chronischen Colitis beobachtet werden. Nach zusätzlicher Administration von anti-TNF wurde diese Besserung noch weiter verstärkt (Totsuka, 2003). Die Beobachtung, dass TNF-Blockade zu einer erfolgreichen Intervention von entzündlichen Darmerkrankungen führen kann, passt zu den vorliegenden Ergebnissen: Die erhöhte Entzündungsreaktion lokal im Colon der p75TNFR-defizienten Mäuse basiert wahrscheinlich auf dem Unvermögen, erstens mangels löslicher p75TNFR TNF zu neutralisieren und zweitens effizient regulatorische T-Zellen zu generieren. Um diese zuletzt genannte Hypothese zu klären, müsste in folgenden Versuchen mit p75TNFR-defizienten Mäusen die Anzahl und Funktion von  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen in dem Modell der DSS-induzierten chronischen Colitis untersucht werden.

Dem widersprechend wurde von einem Tiermodell berichtet, in dem eine inflammatorische Darmerkrankung durch Transfer von  $CD4^+CD62L^+$  T-Zellen in SCID-Mäuse induziert wurde. Die transgene Überexpression von p75TNFR auf den

transferierten T-Zellen verursachte eine Verschlimmerung der chronischen Entzündung im Intestinum (Holtmann, 2002). Allerdings ist dazu zu bemerken, dass die p75TNFR-transgene Mauslinie, aus der die Spender-T-Zellen stammten, generell ein unerklärtes überentzündliches Syndrom entwickelt.

Auf alle Fälle besitzen die Interaktionen zwischen TNF und seinen zwei Rezeptoren eine zentrale Bedeutung in entzündlichen Darmerkrankungen. In Patienten, die an Morbus Crohn erkrankt sind, ist die Expression von p75TNFR sowohl auf Epithelzellen im Colon (Mizoguchi, 2002) als auch auf T-Zellen der *Lamina propria* (Holtmann, 2002) erhöht. Es wird postuliert, dass TNF eine entscheidende Rolle in der Homöostase übernimmt, welche die Dauer und den Umfang bzw. das Entzündungsausmaß beschränkt (Naito, 2003). Während in der akuten Colitis TNF als ein protektives Zytokin angesehen wird, das antibakteriell über den p55TNFR wirkt, scheint es in der chronischen Darminflammation einerseits für das Fortbestehen der entzündlichen Erkrankung verantwortlich zu sein und andererseits über die Generierung von regulatorischen T-Zellen über den p75TNFR auch zur Dämpfung der Entzündung beizutragen.

#### **2.4.2. Induzierte Lebertoxizität**

Eine entzündliche Leberschädigung kann als Folge von viralen Infektionen, von Vergiftungen mit Alkohol, Arzneimitteln oder anderen Xenobiotika oder durch autoimmune Vorgänge ausgelöst werden. Dabei setzen T-Lymphozyten und Makrophagen proinflammatorische Zytokine frei, die schließlich zu hepatischen Gewebsschädigungen führen. Ein wichtiger Mediator ist dabei TNF, der allerdings eine ambivalente Rolle in der Leber spielt. TNF scheint eine wichtige Funktion in der Proliferation und Regeneration der Leber zu übernehmen, nachdem ein erhöhter hepatischer TNF-Spiegel nach partieller Hepatektomie gemessen wurde (Loffreda, 1997). Einen weiteren Hinweis dafür lieferte eine Forschergruppe, die Ratten mit einem neutralisierenden Antikörper gegen TNF vorbehandelte und nach Entnahme eines Teils der Leber eine reduzierte DNA-Synthese in den Hepatozyten beobachtete (Akerman, 1992). Doch TNF vermittelt auch akute Hepatotoxizität, wie in Hepatitis-Patienten gezeigt werden konnte, bei denen vermehrt TNF im Blut gefunden wurde. Es besteht

dabei eine negative Korrelation zwischen Patientenmortalität und TNF-Spiegel (Bird, 1990, Muto, 1988).

Ein auslösendes Agens für entzündliche Lebererkrankungen in Tiermodellen ist die kombinierte Gabe von Endotoxin und D-Galaktosamin. Als Endotoxin wird der Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien bezeichnet, der aus Lipopolysaccharid (LPS) besteht und eine entzündliche Antwort initiiert. Um die Tiere für LPS zu sensibilisieren, verabreicht man ihnen zusätzlich den Aminosucker D-Galaktosamin (DGalN), der in der Leber metabolisiert wird und über selektive Depletion von Uridin-Nukleotiden die Transkription in Hepatozyten hemmt (Bradham, 1998, Galanos, 1979). Dadurch werden die schützenden Abwehrmechanismen der Leberzellen, wie beispielsweise die Produktion zytoprotektiver Proteine, blockiert (Sass, 2002). LPS verursacht schließlich über direkte Makrophagenaktivierung und deren Freisetzung von Zytokinen, v. a. von TNF, die hepatische Gewebsschädigung (Beutler, 1985, Freudenberg, 1988, Männel, 1980).

In dem an *hicp75TNFR*-transgenen Mäusen angewendeten DGalN/LPS-induzierten Hepatotoxizitätsmodell wurden als Parameter für das Ausmaß der Leberschädigung die beiden Enzyme Alaninaminotransferase (ALT) und Aspartataminotransferase (AST) im Serum gemessen. Diese beiden Transferasen kommen hauptsächlich in der Leber vor und sind bei hepatischen Entzündungen erhöht. Nachdem TNF als wichtiger Mediator in diesem inflammatorischen Modell gilt, hätte man davon ausgehen können, dass aufgrund der erhöhten Rezeptordichte und der damit verbundenen vermehrten potentiellen Produktion von löslichem *hicp75TNFR* nach LPS-Stimulus die transgenen Mäuse aufgrund der verbesserten TNF-Neutralisierung geschützt sein müssen. Doch die Ergebnisse der Experimente zeigten keinen Unterschied in den Leberenzymkonzentrationen zwischen *hicp75TNFR*-transgenen Mäusen und Wildtypmäusen (s. Abb. 21). Auch in den histologischen Untersuchungen ergab sich in den transgenen Mäusen und Kontrollmäusen das gleiche Bild (s. Abb. 22). In beiden Mausgruppen wurde eine ähnlich hohe Leberentzündung beobachtet. Der Grund dafür könnte wiederum in der relativ geringen Konzentration an löslichem *hicp75TNFR* liegen, wie bereits in den Colitismodellen diskutiert wurde.

Es ist bekannt, dass nach Behandlung der Mäuse mit DGalN/LPS in der Leber apoptotische Kennzeichen auftreten, die durch die Fragmentierung der DNA

charakterisiert sind (Zhou, 2003). Die Signalwirkung, die schließlich zu Apoptose und Letalität führt, wird hauptsächlich über die Bindung von TNF an den p55TNFR induziert (MacEwan, 2002, Tartaglia, 1993c). Die in diesem Modell herausragende Rolle dieses Rezeptors wird auch durch ein Experiment deutlich, in dem p55TNFR-defiziente Mäuse nach Verabreichung von DGalN und LPS keine DNA-Fragmentierung aufwiesen und geschützt waren im Gegensatz zu p75TNFR-defizienten Mäusen (Zhou, 2005). Es wurde ebenfalls schon vorher berichtet, dass p55TNFR-defiziente Mäuse resistent gegen die letalen Effekte von DGalN und LPS sind (Rothe, 1994a). Man kann daher davon ausgehen, dass die durch LPS induzierte apoptotische DNA-Fragmentierung hauptsächlich über den p55TNFR vermittelt wird. In dem DGalN/LPS induzierten Lebertoxizitätsmodell scheint wohl der p55TNFR für die Pathogenese verantwortlich zu sein. Der p75TNFR, respektive *hpcp75TNFR*, hat somit eine eher untergeordnete Rolle in diesem Modell, was sich wiederum in dem zu Wildtypmäusen gleichen Entzündungsausmaß der transgenen Mäuse widerspiegelt.

Im Gegensatz zu der DGalN und LPS vermittelten Hepatotoxizität, die primär von Makrophagen verursacht wird, gibt es ein Leberentzündungsmodell, in dem das Krankheitsbild hauptsächlich durch T-Zellaktivierung induziert wird. Dabei wird im Tiermodell den Mäusen intravenös Concanavalin A (Con A) verabreicht (Tiegs, 1992). Con A ist ein pflanzliches Lektin, das isoliert wird aus den Samen der Jackbohne *Canavalia ensiformis* L. und dessen Reinigung und Kristallisierung dem Forscher James Batcheller Sumner 1946 den Nobelpreis für Chemie einbrachte. Experimente mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markiertem Con A zeigten, dass in Mäusen nach intravenöser Injektion die größte Menge an Fluoreszenz in der Leber vor zu finden war (Gantner, 1995). Histologische Untersuchungen ergaben außerdem, dass apoptotische Entzündungsareale bevorzugt in der Leber und weniger in anderen Organen der Mäuse beobachtet werden konnte. Die Akkumulierung des Mitogens im hepatischen Sinus führt weiter zu einem gesteigerten Lymphozyteninflux und Proliferation (Bradham, 1998). Nachdem immundefiziente SCID-Mäuse, die keine T- und B-Lymphozyten besitzen, sowie Nackt-Mäuse, die aufgrund des Fehlens ihres Thymus keine reifen T-Zellen produzieren können, keine Hepatitis nach Con A-Administration entwickelten, wurde man auf die Bedeutung der Lymphozyten in diesem Modell aufmerksam (Gantner, 1995, Tiegs, 1992). Durch selektive Immunsuppression mit Cyclosporin A oder FK506

(Tacrolimus, Fujimycin) konnte nach Con A-Verabreichung die Leberschädigung verhindert werden, womit ebenfalls demonstriert wurde, dass die T-Zellaktivierung in diesem Modell eine wichtige Rolle übernimmt (Gantner, 1995, Tiegs, 1992). Weiteren Berichten zur Folge, wurde nach anti-CD4-Vorbehandlung, nicht aber durch einen anti-CD8-Antikörper eine Verbesserung der Entzündung in der Leber erzielt (Tiegs, 1992). Die Con A-induzierte Hepatitis scheint also neben Makrophagen hauptsächlich über die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt zu werden. Als Konsequenz folgt daraus die Produktion einer Reihe von Zytokinen. Innerhalb weniger Stunden nach Con A-Verabreichung lassen sich hohe Konzentrationen an TNF und IFN $\gamma$  sowohl im Plasma als auch im Lebergewebe messen. Ebenso detektierte man erhöhte Mengen an proinflammatorischen Mediatoren wie IL-4 und IL-2 (Sass, 2002). Letzteres ist ein wichtiger Costimulator und Wachstumsfaktor für die T-Zellproliferation.

Die Con A-induzierte Hepatotoxizität ist durch Ausbildung apoptotischer Bereiche und die damit verbundene DNA-Fragmentierung, sowie die Freisetzung von Aminotransferasen in den Blutkreislauf charakterisiert (Leist, 1995). Untersuchungen an *hlc75TNFR*-transgenen Mäusen zeigten, dass sowohl die Konzentration an Alaninaminotransferasen (ALT) als auch an Aspartataminotransferasen (AST) in den transgenen Tieren signifikant erhöht war im Vergleich zu Wildtypmäusen (s. Abb. 23). Die massivere Gewebsschädigung äußerte sich ebenfalls in den histologischen Untersuchungen von Paraffinschnitten der Leber (s. Abb. 24). Aufgrund der vermehrten Expression des *hlc75TNFR* wurde in den transgenen Mäusen eine stärkere Entzündungsreaktion und damit eine ausgeprägtere Pathogenese festgestellt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Beobachtungen von Küsters *et al.* überein, dass Mäuse, die transgen für den humanen p75TNFR sind, eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber dem Mitogen Con A aufwiesen (Kusters, 1997). Eine besondere Bedeutung kommt dabei dem membrangebundenen TNF zu, das eine hohe Affinität für den p75TNFR besitzt. Transgene Mäuse, die defizient für die lösliche Form des TNF sind, die membranständige Vorläuferform jedoch exprimierten, entwickelten Leberentzündung (Kusters, 1997). Weiter ist denkbar, dass das innerhalb von einer Stunde freigesetzte TNF mit Hepatozyten, die viel p75TNFR exprimieren, heftig reagieren und damit stärkere zytotoxische Effekte auslösen kann. Gestützt wird diese Hypothese durch Experimente, welche die Steigerung der TNFR-Expression auf Hepatozyten nach Gabe des proinflammatorischen Zytokins IL-6 3 bis 6 h post Con A-Injektion belegten (Mizuhara,

1994). Dass das Zusammenspiel der beiden TNF-Rezeptoren für die Hepatotoxizität verantwortlich ist, demonstrierten Studien mit p55TNFR- und p75TNFR-defizienten Mäusen, in denen beide Mausgruppen resistent gegenüber der Con A induzierten Zytotoxizität waren (Kunstle, 1999, Kusters, 1997).

Das Arzneimittel Etanercept ist ein dimeres Fusionsprotein, das aus der extrazellulären Ligandbindungsstelle des humanen p75TNFR und der Fc-Domäne des humanen Immunglobulins G1 besteht. Es ist seit einiger Zeit unter dem Namen Enbrel<sup>®</sup> im Handel, das v. a. in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis bei Patienten zum Einsatz kommt. Seine Wirkung beruht hauptsächlich auf der Neutralisierung von TNF.

Wenn hicp75TNFR-transgenen Mäusen dieses Medikament eine Stunde vor der Con A Verabreichung injiziert wurde, reduzierte sich der ALT-Spiegel auf den Wert der entsprechenden Kontrollmäuse (s. Abb. 25). Auch die histologischen Ergebnisse bestätigten die signifikante Verminderung der Leberentzündung (s. Abb. 26). Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen, dass TNF ein wichtiger Mediator in der Con A induzierten Leberschädigung ist. So wurde beschrieben, dass die passive Immunisierung mit anti-TNF-Antikörpern Mäuse vor Con A-vermittelter Toxizität schützte (Mizuhara, 1994). Ebenso hatte die Behandlung der Tiere mit anti-Maus TNF-Antiserum einen protektiven Einfluss auf die Manifestierung der Hepatotoxizität (Gantner, 1995).

Kontrovers dazu wird allerdings davon berichtet, dass TNF nicht der Hauptmediator in der Con A-induzierten Hepatitis ist. So reagierten TNF-defiziente Mäuse ebenfalls sensibel auf Con A und entwickelten eine in ihrem Ausmaß ähnliche Hepatotoxizität wie die Kontrolltiere. Ein dem TNF sehr ähnliches Zytokin, Lymphotoxin-alpha (LT $\alpha$ ), könnte in diesen TNF-defizienten Mäusen die Rolle von TNF übernehmen. IFN $\gamma$ -defiziente Mäuse wiesen hingegen eine stark reduzierte Gewebsschädigung nach Con A Behandlung auf. Als Begründung wurde dabei die Apoptoseinduktion über Fas-Antigen diskutiert, das ebenfalls als Mitglied der TNFR-Familie bekannt ist. Die Fas-Antigen-Expression auf Hepatozyten ist während dieser Form der Leberentzündung erhöht und kann über IFN $\gamma$  vermittelt werden (Tagawa, 1997). Anzumerken ist, dass bei all diesen Untersuchungen zum einen der genetische Hintergrund der Mäuse, zum anderen die Mengen an verabreichtem Con A variierten.

Seit längerem ist bekannt, dass die über Con A stimulierte Proliferation humaner Thymozyten *in vitro* über TNF erhöht werden kann. Vermittelt wird dies hauptsächlich über den p75TNFR, wie Untersuchungen mit agonistischen anti-p75TNFR-Antikörpern zeigten. Dabei wurde die Proliferation nicht nur der unreifen T-Zellen im Thymus, sondern auch die der peripheren T-Zellen stimuliert (Tartaglia, 1993b).

Daher kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse der Con A-induzierten Hepatotoxizität in hicp75TNFR transgenen Mäusen vermutet werden, dass nach einer potentiellen Steigerung der Proliferation der T-Lymphozyten über den p75TNFR respektive seines Isomers die Entzündung in diesen Tieren verstärkt wird. Nach ausreichender Neutralisierung des proinflammatorischen Agens TNF durch beispielsweise Etanercept, wurde das Maß der Entzündung wieder auf ein mit Wildtypmäusen vergleichbares Niveau gebracht. Diese Hypothese wird durch Ergebnisse unterstrichen, die mit p75TNFR-defizienten Mäusen in einem Modell für Glomerulonephritis erzielt wurden. In diesem Modell waren die p75TNFR-defizienten Mäuse geschützt und entwickelten keine Glomerulonephritis im Gegensatz zu Wildtypmäusen. Zudem wurde eine Erhöhung der p75TNFR-Expression auf Nierenendothelzellen während der Entzündung beobachtet (Vielhauer, 2005). Auch in der Con A vermittelten Hepatotoxizität könnten die Hepatozyten aufgrund der Überexpression des p75TNFR respektive icp75TNFR sensibler für TNF reagieren und damit die Entzündung verstärken.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Signalwirkung von TNF auf den p75TNFR einen entscheidenden Einfluss auf die Anzahl und Funktion der  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen insbesondere in Entzündungen hat. Durch das Zusammenspiel zwischen TNF und p75TNFR besteht somit die Möglichkeit Art und Ausmaß der Immunantwort zu kontrollieren. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass TNF nicht nur als proinflammatorisches Zytokin, sondern auch als suppressiver Mediator fungieren kann. Entsprechend der jeweiligen Situation, besitzt TNF die Potenz, innerhalb von wenigen Stunden über eine rasche Induktion der Immunantwort in den Körper eindringende Pathogene erfolgreich zu eliminieren. Auf der anderen Seite kann eine überschießende Immunreaktion bis hin zur Chronifizierung einer Inflammation über den Einfluss von TNF auf regulatorische T-Zellen vermindert, wenn nicht sogar vermieden werden. Allem Anschein nach erfolgt diese Kontrolle, insbesondere die Expansion und

Aktivierung der Regulatoren, unter Zuhilfenahme des Signalweges von TNF über den p75TNFR. Demgegenüber spielt dabei sein Isomer, der hicp75TNFR, wohl weder quantitativ noch qualitativ eine wichtige Rolle. Im Gegensatz dazu scheint in manchen Modellen, wie z. B. in der in dieser Arbeit untersuchten Con A-vermittelten Lebertoxizität, der p75TNFR und daher auch die Überexpression in Form des icp75TNFR die Toxizität zu erhöhen. Um die genauen Mechanismen dieser Feinabstimmung der Immunantwort und das mögliche Kooperieren einzelner Mediatoren zu erkennen, bedarf es noch weiterer zahlreicher Untersuchungen, mit dem Ziel, vielleicht in naher Zukunft eine erfolgreiche und gezielte Therapie gegen chronische entzündliche Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten oder auch bei Organabstoßungsproblemen in der Transplantationsmedizin zu erhalten.

## E Zusammenfassung

Neben den beiden bekannten TNF-Rezeptoren, p55TNFR und p75TNFR, wurde der icp75TNFR als Isoform des p75TNFR identifiziert, die durch die Benutzung eines alternativen Transkriptionsstarts entsteht. Während die Intrazellulär- sowie Transmembrandomäne identisch mit dem p75TNFR ist, unterscheidet sich die Extrazellulärdomäne des icp75TNFR darin, dass ihr ein N-terminales Signalpeptid fehlt. Aufgrund des alternativen Spleissens wird bei der Transkription das Exon 1 des p75TNFR durch das Exon 1a ersetzt. Es wurden gentechnisch veränderte Mauslinien hergestellt, die transgen für den humanen icp75TNFR (hicp75TNFR) sind. In dieser Arbeit wurden anhand der hicp75TNFR-transgenen Mäuse sowie an p75TNFR-defizienten Mäusen die Funktionen des hicp75TNFR und des p75TNFR unter verschiedenen Aspekten untersucht.

Sowohl auf DNA- als auch auf RNA-Ebene wurde der hicp75TNFR in den dafür transgenen Mäusen identifiziert. Auch als lösliches Protein wurde er detektiert. Der icp75TNFR kann somit wie sein Isomer, der p75TNFR, von der Zellmembran proteolytisch gespalten und sezerniert werden. Die Fähigkeit mTNF und hTNF zu binden und damit Zielzellen bis zu einem gewissen Maß zu schützen, wurde ebenfalls für den hicp75TNFR gezeigt.

Der p75TNFR übernimmt costimulatorische Aufgaben, was sich vor allem kurzfristig bei der T-Zellaktivierung anhand der IL-2- und IFN $\gamma$ -Sekretion bemerkbar macht.

In quantitativen Untersuchungen unterschied sich die Anzahl an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz hicp75TNFR-transgener und p75TNFR-defizienter Mäuse nicht von den Wildtypmäusen. Während CD4<sup>+</sup> T-Zellen von hicp75TNFR-transgenen Mäusen ähnlich wie die Kontrollzellen proliferierten zeigten CD4<sup>+</sup> T-Zellen von p75TNFR-defizienten Mäusen eine verminderte Proliferation.

Während die Anzahl an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in der Milz naiver hicp75TNFR-transgener und p75TNFR-defizienter Mäuse den Kontrollen ähnlich war, blieb im Verlauf einer CLP-induzierten septischen Peritonitis ein mit den Wildtypmäusen vergleichbarer Anstieg der Zahl an CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen in p75TNFR-defizienten Mäusen aus. Die hicp75TNFR-transgenen Mäuse hingegen

unterschieden sich nur wenig von den Kontrollen. Die suppressive Aktivität von  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  regulatorischen T-Zellen aus p75TNFR-defizienten Mäusen war dosisabhängig und besonders in Anwesenheit von TNF beeinträchtigt.

Weder im akuten noch im chronischen DSS-induzierten Colitis-Modell konnte ein Unterschied im Entzündungsausmaß in hicp75TNFR-transgenen Mäusen zu Wildtypmäusen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten p75TNFR-defiziente Mäuse in der akuten DSS-vermittelten Colitis ein tendenziell verbessertes Krankheitsbild und in der chronischen DSS-induzierten Colitis eine stärkere intestinale Entzündung als die Wildtypmäuse auf. Dies lässt sich zum einen durch das Fehlen des TNF-Inhibitors (löslicher p75TNFR) und zum anderen durch das geringere Vorkommen von regulatorischen T-Zellen erklären, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde.

Während sich in der DGalN/LPS-induzierten Hepatotoxizität keine Veränderung im Krankheitsbild der hicp75TNFR-transgenen Mäuse gegenüber Wildtypmäusen ergab, zeigten sie im Con A-vermittelten Hepatotoxizitätsmodell eine signifikant höhere Leberentzündung als die Kontrollen. Durch Vorbehandlung mit Etanercept wurde das Ausmaß der Entzündung ähnlich wie in Wildtypmäusen reduziert. Es bleibt zu prüfen, ob die Überexpression von p75TNFR bzw. icp75TNFR auf Hepatozyten für TNF-Toxizität sensibilisiert.

Die funktionellen Untersuchungen unterstrichen die zentrale Bedeutung hauptsächlich des p75TNFR auf T-Zellen respektive regulatorischen T-Zellen. Besonders in akuten und chronischen Entzündungen kommt diese kontrollierende Rolle des p75TNFR zum Tragen, indem durch die Bindung von TNF an p75TNFR in der akuten Phase proinflammatorische Signalwege gefördert werden, die Chronifizierung der Erkrankung jedoch über Induktion regulatorischer T-Zellen verhindert werden kann.

## F Literaturverzeichnis

- Abbas, A. K., Lichtmann, A. H., Pober, J. S.** (2000) Cellular and molecular immunology. *W.B.Saunders company*
- Aderka, D., Englemann, H., Hornik, V., Skornick, Y., Levo, Y., Wallach, D., Kushtai, G.** (1991) Increased serum levels of soluble receptors for tumor necrosis factor in cancer patients. *Cancer Res.* **51**, 5602-5607.
- Aderka, D., Wysenbeek, A., Englemann, H., Cope, A. P., Brennan, F., Molad, Y., Hornik, V., Levo, Y., Maini, R. N., Feldmann, M., .** (1993) Correlation between serum levels of soluble tumor necrosis factor receptor and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **36**, 1111-1120.
- Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V., Harkins, R. N.** (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J Biol.Chem.* **260**, 2345-2354.
- Aggarwal, B. B., Natarajan, K.** (1996) Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur.Cytokine Netw.* **7**, 93-124.
- Aggarwal, B. B., Shishodia, S., Ashikawa, K., Bharti, A. C.** (2002) The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr.Drug Targets.Inflamm.Allergy* **1**, 327-341.
- Akerman, P., Cote, P., Yang, S. Q., McClain, C., Nelson, S., Bagby, G. J., Diehl, A. M.** (1992) Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am.J.Physiol* **263**, G579-G585.
- Aksentijevich, I., Galon, J., Soares, M., Mansfield, E., Hull, K., Oh, H. H., Goldbach-Mansky, R., Dean, J., Athreya, B., Reginato, A. J., Henrickson, M., Pons-Estel, B., O'Shea, J. J., Kastner, D. L.** (2001) The tumor-necrosis-factor receptor-associated periodic syndrome: new mutations in TNFRSF1A, ancestral origins, genotype-phenotype studies, and evidence for further genetic heterogeneity of periodic fevers. *Am J Hum.Genet.* **69**, 301-314.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S.** (2002) Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4(+)CD25(+) human thymocytes. *J Exp.Med* **196**, 379-387.
- Aspalter, R. M., Eibl, M. M., Wolf, H. M.** (2003) Regulation of TCR-mediated T cell activation by TNF-RII. *J Leukoc.Biol.* **74**, 572-582.
- Bach, J. F.** (2003) Regulatory T cells under scrutiny. *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 189-198.

- Bazzoni, F., Beutler, B.** (1996) The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N.Engl.J.Med.* **334**, 1717-1725.
- Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C., Mathison, J., Ulevitch, R., Cerami, A.** (1985) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* **316**, 552-554.
- Bird, G. L., Sheron, N., Goka, A. K., Alexander, G. J., Williams, R. S.** (1990) Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis. *Ann.Intern.Med.* **112**, 917-920.
- Black, R. A., Rauch, C. T., Kozlosky, C. J., Peschon, J. J., Slack, J. L., Wolfson, M. F., Castner, B. J., Stocking, K. L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K. A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J. N., Johnson, R. S., Paxton, R. J., March, C. J., Cerretti, D. P.** (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* **385**, 729-733.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lindsten, T., Thompson, C. B.** (1995) CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity.* **3**, 87-98.
- Bradham, C. A., Plumpe, J., Manns, M. P., Brenner, D. A., Trautwein, C.** (1998) Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury. *Am.J.Physiol* **275**, G387-G392.
- Butty, V. L., Roux-Lombard, P., Garbino, J., Dayer, J. M., Ricou, B.** (2003) Anti-inflammatory response after infusion of p55 soluble tumor necrosis factor receptor fusion protein for severe sepsis. *Eur.Cytokine Netw.* **14**, 15-19.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., Williamson, B.** (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **72**, 3666-3670.
- Chan, F. K.-M., Chun, H. J., Zheng, L., Siegel, R. M., Bui, K. L., Lenardo, M. J.** (2000) A Domain in TNF Receptors That Mediates Ligand-Independent Receptor Assembly and Signaling. *Science* **288**, 2351-2354.
- Coley, W. B.** (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 487-
- Coley, W. B.** (1896) Further observations upon the treatment of malignant tumors with the toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus* with a report of 160 cases. *Bull Johns Hopkins Hosp* **7**,
- Cope, A. P., Aderka, D., Doherty, M., Engelmann, H., Gibbons, D., Jones, A. C., Brennan, F. M., Maini, R. N., Wallach, D., Feldmann, M.** (1992) Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases. *Arthritis Rheum.* **35**, 1160-1169.

- Croft, M.** (2003) Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat.Rev.Immunol.* **3**, 609-620.
- Ebach, D. R., Riehl, T. E., Stenson, W. F.** (2005) Opposing effects of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 in sepsis due to cecal ligation and puncture. *Shock* **23**, 311-318.
- Echtenacher, B., Mannel, D. N.** (2002) Requirement of TNF and TNF receptor type 2 for LPS-induced protection from lethal septic peritonitis. *J.Endotoxin.Res.* **8**, 365-369.
- Egger, B., Bajaj-Elliott, M., MacDonald, T. T., Inglin, R., Eysselein, V. E., Buchler, M. W.** (2000) Characterisation of acute murine dextran sodium sulphate colitis: cytokine profile and dose dependency. *Digestion* **62**, 240-248.
- Eggermont, A. M., Schraffordt, K. H., Klausner, J. M., Lienard, D., Kroon, B. B., Schlag, P. M., Ben Ari, G., Lejeune, F. J.** (1997) Isolation limb perfusion with tumor necrosis factor alpha and chemotherapy for advanced extremity soft tissue sarcomas. *Semin.Oncol.* **24**, 547-555.
- Ehlers, S., Benini, J., Kutsch, S., Endres, R., Rietschel, E. T., Pfeffer, K.** (1999) Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. *Infect.Immun.* **67**, 3571-3579.
- Ehrenstein, M. R., Evans, J. G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D. A., Mauri, C.** (2004) Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J Exp.Med* **200**, 277-285.
- Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., Endres, S.** (1997) Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol.Today* **18**, 487-492.
- Ellerin, T., Rubin, R. H., Weinblatt, M. E.** (2003) Infections and anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *Arthritis Rheum.* **48**, 3013-3022.
- Elliott, M. J., Maini, R. N., Feldmann, M., Kalden, J. R., Antoni, C., Smolen, J. S., Leeb, B., Breedveld, F. C., Macfarlane, J. D., Bijl, H., .** (1994) Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* **344**, 1105-1110.
- Erickson, S. L., de Sauvage, F. J., Kikly, K., Carver-Moore, K., Pitts-Meek, S., Gillett, N., Sheehan, K. C., Schreiber, R. D., Goeddel, D. V., Moore, M. W.** (1994) Decreased sensitivity to tumour-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* **372**, 560-563.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A., Rudensky, A. Y.** (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* **4**, 330-336.

- Fraser, J. D., Irving, B. A., Crabtree, G. R., Weiss, A.** (1991) Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science* **251**, 313-316.
- Freudenberg, M. A., Galanos, C.** (1988) Induction of tolerance to lipopolysaccharide (LPS)-D-galactosamine lethality by pretreatment with LPS is mediated by macrophages. *Infect.Immun.* **56**, 1352-1357.
- Galanos, C., Freudenberg, M. A., Reutter, W.** (1979) Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76**, 5939-5943.
- Gantner, F., Leist, M., Lohse, A. W., Germann, P. G., Tiegs, G.** (1995) Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* **21**, 190-198.
- Garcia, I., Miyazaki, Y., Araki, K., Araki, M., Lucas, R., Grau, G. E., Milon, G., Belkaid, Y., Montixi, C., Lesslauer, W., .** (1995) Transgenic mice expressing high levels of soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and are highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections. *Eur.J.Immunol.* **25**, 2401-2407.
- Gaur, U., Aggarwal, B. B.** (2003) Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem.Pharmacol.* **66**, 1403-1408.
- Goodwin, R. G., Anderson, D., Jerzy, R., Davis, T., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Smith, C. A.** (1991) Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol.Cell Biol.* **11**, 3020-3026.
- Grell, M.** (1995a) Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF. *J Inflamm.* **47**, 8-17.
- Grell, M., Becke, F. M., Wajant, H., Mannel, D. N., Scheurich, P.** (1998a) TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNF receptor type 1. *Eur.J.Immunol.* **28**, 257-263.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K., .** (1995b) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **83**, 793-802.
- Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., Scheurich, P.** (1998b) The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 570-575.
- Higuchi, M., Higashi, N., Taki, H., Osawa, T.** (1990) Cytolytic mechanisms of activated macrophages. Tumor necrosis factor and L-arginine-dependent mechanisms act synergistically as the major cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J.Immunol.* **144**, 1425-1431.

- Hober, D., Benyoucef, S., Delannoy, A. S., De Groote, D., Ajana, F., Mouton, Y., Wattre, P.** (1996) High plasma level of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in asymptomatic HIV-1-infected patients. *Infection* **24**, 213-217.
- Holtmann, M. H., Douni, E., Schutz, M., Zeller, G., Mudter, J., Lehr, H. A., Gerspach, J., Scheurich, P., Galle, P. R., Kollias, G., Neurath, M. F.** (2002) Tumor necrosis factor-receptor 2 is up-regulated on lamina propria T cells in Crohn's disease and promotes experimental colitis in vivo. *Eur.J.Immunol.* **32**, 3142-3151.
- Hori, S., Nomura, T., Sakaguchi, S.** (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061.
- Ibelgaufts, H.** (2004) Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia.  
<http://www.copewithcytokines.de>
- Idriss, H. T., Naismith, J. H.** (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc.Res.Tech.* **50**, 184-195.
- Itoh, N., Nagata, S.** (1993) A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. *J.Biol.Chem.* **268**, 10932-10937.
- Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.** (2002) Immunologie.
- Kaneko, H., Yamada, H., Mizuno, S., Udagawa, T., Kazumi, Y., Sekikawa, K., Sugawara, I.** (1999) Role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab Invest* **79**, 379-386.
- Kavanaugh, A., Cush, J., Matteson, E.** (2003) FDA Meeting: Update on the Safety of New Drugs for Rheumatoid Arthritis.
- Khattari, R., Kasprovicz, D., Cox, T., Mortrud, M., Appleby, M. W., Brunkow, M. E., Ziegler, S. F., Ramsdell, F.** (2001) The amount of scurf protein determines peripheral T cell number and responsiveness. *J.Immunol.* **167**, 6312-6320.
- Kim, E. Y., Priatel, J. J., Teh, S. J., Teh, H. S.** (2006) TNF Receptor Type 2 (p75) Functions as a Costimulator for Antigen-Driven T Cell Responses In Vivo. *J.Immunol.* **176**, 1026-1035.
- Kim, E. Y., Teh, H. S.** (2001) TNF type 2 receptor (p75) lowers the threshold of T cell activation. *J.Immunol.* **167**, 6812-6820.
- Kim, E. Y., Teh, H. S.** (2004) Critical role of TNF receptor type-2 (p75) as a costimulator for IL-2 induction and T cell survival: a functional link to CD28. *J.Immunol.* **173**, 4500-4509.
- Kojouharoff, G., Hans, W., Obermeier, F., Mannel, D. N., Andus, T., Scholmerich, J., Gross, V., Falk, W.** (1997) Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin.Exp.Immunol.* **107**, 353-358.

- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., Kollias, G.** (1999) Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*. **10**, 387-398.
- Korner, H., Cook, M., Riminton, D. S., Lemckert, F. A., Hoek, R. M., Ledermann, B., Kontgen, F., Fazekas de St, G. B., Sedgwick, J. D.** (1997) Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. *Eur.J.Immunol.* **27**, 2600-2609.
- Krippner-Heidenreich, A., Tubing, F., Bryde, S., Willi, S., Zimmermann, G., Scheurich, P.** (2002) Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J.Biol.Chem.* **277**, 44155-44163.
- Kunstle, G., Hentze, H., Germann, P. G., Tiegs, G., Meergans, T., Wendel, A.** (1999) Concanavalin A hepatotoxicity in mice: tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation. *Hepatology* **30**, 1241-1251.
- Kusters, S., Tiegs, G., Alexopoulou, L., Pasparakis, M., Douni, E., Kunstle, G., Bluethmann, H., Wendel, A., Pfizenmaier, K., Kollias, G., Grell, M.** (1997) In vivo evidence for a functional role of both tumor necrosis factor (TNF) receptors and transmembrane TNF in experimental hepatitis. *Eur.J.Immunol.* **27**, 2870-2875.
- Lainez, B., Fernandez-Real, J. M., Romero, X., Esplugues, E., Canete, J. D., Ricart, W., Engel, P.** (2004) Identification and characterization of a novel spliced variant that encodes human soluble tumor necrosis factor receptor 2. *Int.Immunol.* **16**, 169-177.
- Le Hir, M., Bluethmann, H., Kosco-Vilbois, M. H., Muller, M., di Padova, F., Moore, M., Ryffel, B., Eugster, H. P.** (1996) Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. *J.Exp.Med.* **183**, 2367-2372.
- Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., Germann, P. G., Wendel, A.** (1995) Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models. *Am.J.Pathol.* **146**, 1220-1234.
- Lejeune, F. J., Kroon, B. B., Di Filippo, F., Hoekstra, H. J., Santinami, M., Lienard, D., Eggermont, A. M.** (2001) Isolated limb perfusion: the European experience. *Surg.Oncol.Clin.N.Am.* **10**, 821-32, ix.
- Lewis, M., Tartaglia, L. A., Lee, A., Bennett, G. L., Rice, G. C., Wong, G. H., Chen, E. Y., Goeddel, D. V.** (1991) Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 2830-2834.
- Liu, Y. J., Banchereau, J.** (1996) Mutant mice without B lymphocyte follicles. *J.Exp.Med.* **184**, 1207-1211.

- Locksley, R. M., Killeen, N., Lenardo, M. J.** (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**, 487-501.
- Loetscher, H., Pan, Y. C., Lahm, H. W., Gentz, R., Brockhaus, M., Tabuchi, H., Lesslauer, W.** (1990) Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor. *Cell* **61**, 351-359.
- Loffreda, S., Rai, R., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Diehl, A. M.** (1997) Bile ducts and portal and central veins are major producers of tumor necrosis factor alpha in regenerating rat liver. *Gastroenterology* **112**, 2089-2098.
- Lovell, D. J., Giannini, E. H., Reiff, A., Cawkwell, G. D., Silverman, E. D., Nocton, J. J., Stein, L. D., Gedalia, A., Ilowite, N. T., Wallace, C. A., Whitmore, J., Finck, B. K.** (2000) Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. *N.Engl.J.Med.* **342**, 763-769.
- MacEwan, D. J.** (2002) TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br.J.Pharmacol.* **135**, 855-875.
- Männel, D. N., Echtenacher, B.** (2000) TNF in the inflammatory response. *Chem.Immunol.* **74**, 141-161.
- Männel, D. N., Moore, R. N., Mergenhagen, S. E.** (1980) Macrophages as a source of tumoricidal activity (tumor-necrotizing factor). *Infect.Immun.* **30**, 523-530.
- Mason, A. T., McVicar, D. W., Smith, C. A., Young, H. A., Ware, C. F., Ortaldo, J. R.** (1995) Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *J Leukoc.Biol.* **58**, 249-255.
- Mease, P. J., Goffe, B. S., Metz, J., VanderStoep, A., Finck, B., Burge, D. J.** (2000) Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis: a randomised trial. *Lancet* **356**, 385-390.
- Mizoguchi, E., Mizoguchi, A., Takedatsu, H., Cario, E., de Jong, Y. P., Ooi, C. J., Xavier, R. J., Terhorst, C., Podolsky, D. K., Bhan, A. K.** (2002) Role of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) in colonic epithelial hyperplasia and chronic intestinal inflammation in mice. *Gastroenterology* **122**, 134-144.
- Mizuhara, H., O'Neill, E., Seki, N., Ogawa, T., Kusunoki, C., Otsuka, K., Satoh, S., Niwa, M., Senoh, H., Fujiwara, H.** (1994) T cell activation-associated hepatic injury: mediation by tumor necrosis factors and protection by interleukin 6. *J.Exp.Med.* **179**, 1529-1537.
- Moreland, L. W., Baumgartner, S. W., Schiff, M. H., Tindall, E. A., Fleischmann, R. M., Weaver, A. L., Ettlinger, R. E., Cohen, S., Koopman, W. J., Mohler, K., Widmer, M. B., Bloch, C. M.** (1997) Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N.Engl.J.Med.* **337**, 141-147.

- Moss, M. L., Jin, S. L., Becherer, J. D., Bickett, D. M., Burkhart, W., Chen, W. J., Hassler, D., Leesnitzer, M. T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J., Willard, D.** (1997) Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol.* **72**, 127-129.
- Muto, Y., Nouri-Aria, K. T., Meager, A., Alexander, G. J., Eddleston, A. L., Williams, R.** (1988) Enhanced tumour necrosis factor and interleukin-1 in fulminant hepatic failure. *Lancet* **2**, 72-74.
- Naito, Y., Takagi, T., Handa, O., Ishikawa, T., Nakagawa, S., Yamaguchi, T., Yoshida, N., Minami, M., Kita, M., Imanishi, J., Yoshikawa, T.** (2003) Enhanced intestinal inflammation induced by dextran sulfate sodium in tumor necrosis factor-alpha deficient mice. *J.Gastroenterol.Hepatol.* **18**, 560-569.
- Neumann, B., Luz, A., Pfeffer, K., Holzmann, B.** (1996) Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* **184**, 259-264.
- Neurath, M. F., Fuss, I., Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Haralambous, S., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Strober, W., Kollias, G.** (1997) Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur.J.Immunol.* **27**, 1743-1750.
- Ni, J., Chen, S. F., Hollander, D.** (1996) Effects of dextran sulphate sodium on intestinal epithelial cells and intestinal lymphocytes. *Gut* **39**, 234-241.
- O'Garra, A.** (1998) Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity.* **8**, 275-283.
- Okayasu, I., Hatakeyama, S., Yamada, M., Ohkusa, T., Inagaki, Y., Nakaya, R.** (1990) A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* **98**, 694-702.
- Olson, A. D., DelBuono, E. A., Bitar, K. N., Remick, D. G.** (1995) Antiserum to tumor necrosis factor and failure to prevent murine colitis. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **21**, 410-418.
- Parronchi, P., Romagnani, P., Annunziato, F., Sampognaro, S., Becchio, A., Giannarini, L., Maggi, E., Pupilli, C., Tonelli, F., Romagnani, S.** (1997) Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am.J.Pathol.* **150**, 823-832.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Episkopou, V., Kollias, G.** (1996) Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J.Exp.Med.* **184**, 1397-1411.
- Pasparakis, M., Alexopoulou, L., Grell, M., Pfizenmaier, K., Bluethmann, H., Kollias, G.** (1997) Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B

lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* **94**, 6319-6323.

- Pfeffer, K., Matsuyama, T., Kundig, T. M., Wakeham, A., Kishihara, K., Shahinian, A., Wiegmann, K., Ohashi, P. S., Kronke, M., Mak, T. W.** (1993) Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell* **73**, 457-467.
- Pimentel-Muinos, F. X., Munoz-Fernandez, M. A., Fresno, M.** (1994) Control of T lymphocyte activation and IL-2 receptor expression by endogenously secreted lymphokines. *J.Immunol.* **152**, 5714-5722.
- Pimentel-Muinos, F. X., Seed, B.** (1999) Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. *Immunity.* **11**, 783-793.
- Powrie, F., Leach, M. W., Mauze, S., Menon, S., Caddle, L. B., Coffman, R. L.** (1994) Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity.* **1**, 553-562.
- Present, D. H., Rutgeerts, P., Targan, S., Hanauer, S. B., Mayer, L., van Hogeand, R. A., Podolsky, D. K., Sands, B. E., Braakman, T., DeWoody, K. L., Schaible, T. F., van Deventer, S. J.** (1999) Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N.Engl.J.Med.* **340**, 1398-1405.
- Ranges, G. E., Zlotnik, A., Espevik, T., Dinarello, C. A., Cerami, A., Palladino, M. A., Jr.** (1988) Tumor necrosis factor alpha/cachectin is a growth factor for thymocytes. Synergistic interactions with other cytokines. *J.Exp.Med.* **167**, 1472-1478.
- Roberts, L., McColl, G. J.** (2004) Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis. *Intern.Med.J.* **34**, 687-693.
- Robinson, W. H., Genovese, M. C., Moreland, L. W.** (2001) Demyelinating and neurologic events reported in association with tumor necrosis factor alpha antagonism: by what mechanisms could tumor necrosis factor alpha antagonists improve rheumatoid arthritis but exacerbate multiple sclerosis? *Arthritis Rheum.* **44**, 1977-1983.
- Roncador, G., Brown, P. J., Maestre, L., Hue, S., Martinez-Torrecedrada, J. L., Ling, K. L., Pratap, S., Toms, C., Fox, B. C., Cerundolo, V., Powrie, F., Banham, A. H.** (2005) Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur.J.Immunol.* **35**, 1681-1691.
- Rothe, J., Lesslauer, W., Lotscher, H., Lang, Y., Koebel, P., Kontgen, F., Althage, A., Zinkernagel, R., Steinmetz, M., Bluethmann, H.** (1993) Mice lacking the tumour necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* **364**, 798-802.

- Rothe, J., Mackay, F., Bluethmann, H., Zinkernagel, R., Lesslauer, W.** (1994a) Phenotypic analysis of TNFR1-deficient mice and characterization of TNFR1-deficient fibroblasts in vitro. *Circ.Shock* **44**, 51-56.
- Rothe, M., Wong, S. C., Henzel, W. J., Goeddel, D. V.** (1994b) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* **78**, 681-692.
- Ruuls, S. R., Sedgwick, J. D.** (1999) Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. *Am J Hum.Genet.* **65**, 294-301.
- Sakaguchi, S.** (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat.Immunol.* **6**, 345-352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Shimizu, J., Yamazaki, S., Sakihama, T., Itoh, M., Kuniyasu, Y., Nomura, T., Toda, M., Takahashi, T.** (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol.Rev.* **182**, 18-32.
- Sandborn, W. J.** (2005) New concepts in anti-tumor necrosis factor therapy for inflammatory bowel disease. *Rev.Gastroenterol.Disord.* **5**, 10-18.
- Sass, G., Heinlein, S., Agli, A., Bang, R., Schumann, J., Tiegs, G.** (2002) Cytokine expression in three mouse models of experimental hepatitis. *Cytokine* **19**, 115-120.
- Satsangi, J., Jewell, D. P., Bell, J. I.** (1997) The genetics of inflammatory bowel disease. *Gut* **40**, 572-574.
- Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., Schutze, S.** (2004) Compartmentalization of TNF Receptor 1 Signaling; Internalized TNF Receptosomes as Death Signaling Vesicles. *Immunity.* **21**, 415-428.
- Schorpp, M., Jager, R., Schellander, K., Schenkel, J., Wagner, E. F., Weiher, H., Angel, P.** (1996) The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acids Res.* **24**, 1787-1788.
- Schroder, J., Stuber, F., Gallati, H., Schade, F. U., Kremer, B.** (1995) Pattern of soluble TNF receptors I and II in sepsis. *Infection* **23**, 143-148.
- Schwid, S. R., Noseworthy, J. H.** (1999) TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* **53**, 457-465.
- Seitz, C., Männel, D. N., Hehlhans, T.** (1998) Isolation and functional characterization of the mouse p75 TNF receptor promoter. *Genomics* **48**, 111-116.

- Seitz, C., Müller, P., Krieg, R. C., Männel, D. N., Hehlhans, T.** (2001) A Novel p75TNF Receptor Isoform Mediating NF $\kappa$ B Activation. *J.Biol.Chem.* **276**, 19390-19395.
- Semenza, G. L.** (1998) Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *J Lab Clin.Med* **131**, 207-214.
- Simpson, S. J., de Jong, Y. P., Comiskey, M., Terhorst, C.** (1998) T cells in mouse models of gut inflammation. *Chem.Immunol.* **71**, 118-138.
- Singer, S. S., Männel, D. N., Hehlhans, T., Brosius, J., Schmitz, J.** (2004) From "Junk" to Gene: Curriculum vitae of a Primate Receptor Isoform Gene. *Journal of Molecular Biology* **342**, 883-886.
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D., Goodwin, R. G.** (1990) A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* **248**, 1019-1023.
- Tagawa, Y., Sekikawa, K., Iwakura, Y.** (1997) Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN-gamma(-/-) mice, but not in TNF-alpha(-/-) mice: role for IFN-gamma in activating apoptosis of hepatocytes. *J.Immunol.* **159**, 1418-1428.
- Takada, Y., Aggarwal, B. B.** (2003) Genetic deletion of the tumor necrosis factor receptor p60 or p80 sensitizes macrophages to lipopolysaccharide-induced nuclear factor-kappa B, mitogen-activated protein kinases, and apoptosis. *J.Biol.Chem.* **278**, 23390-23397.
- Tartaglia, L. A., Ayres, T. M., Wong, G. H., Goeddel, D. V.** (1993a) A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell* **74**, 845-853.
- Tartaglia, L. A., Goeddel, D. V., Reynolds, C., Figari, I. S., Weber, R. F., Fendly, B. M., Palladino, M. A., Jr.** (1993b) Stimulation of human T-cell proliferation by specific activation of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor. *J.Immunol.* **151**, 4637-4641.
- Tartaglia, L. A., Rothe, M., Hu, Y. F., Goeddel, D. V.** (1993c) Tumor necrosis factor's cytotoxic activity is signaled by the p55 TNF receptor. *Cell* **73**, 213-216.
- Taylor, P. C.** (2001) Anti-tumor necrosis factor therapies. *Curr.Opin.Rheumatol.* **13**, 164-169.
- Tiegs, G., Hentschel, J., Wendel, A.** (1992) A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J.Clin.Invest* **90**, 196-203.
- Totsuka, T., Kanai, T., Uraushihara, K., Iiyama, R., Yamazaki, M., Akiba, H., Yagita, H., Okumura, K., Watanabe, M.** (2003) Therapeutic effect of anti-OX40L and anti-TNF-alpha MAbs in a murine model of chronic colitis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* **284**, G595-G603.

- Valencia, X., Stephens, G., Goldbach-Mansky, R., Wilson, M., Shevach, E. M., Lipsky, P. E.** (2006) TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. *Blood* **108**, 253-261.
- Vielhauer, V., Stavrakis, G., Mayadas, T. N.** (2005) Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J.Clin.Invest* **115**, 1199-1209.
- Vollmar, A., Dingermann, T.** (2005) Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe.
- Wallach, D., Engelmann, H., Nophar, Y., Aderka, D., Kemper, O., Hornik, V., Holtmann, H., Brakebusch, C.** (1991) Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. *Agents Actions Suppl* **35**, 51-57.
- Ware, C. F.** (2005) Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu.Rev.Immunol.* **23**, 787-819.
- Weinblatt, M. E., Keystone, E. C., Furst, D. E., Moreland, L. W., Weisman, M. H., Birbara, C. A., Teoh, L. A., Fischkoff, S. A., Chartash, E. K.** (2003) Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* **48**, 35-45.
- Wichterman, K. A., Baue, A. E., Chaudry, I. H.** (1980) Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J.Surg.Res.* **29**, 189-201.
- Williams, T. W., Granger, G. A.** (1968) Lymphocyte in vitro cytotoxicity: lymphotoxins of several mammalian species. *Nature* **219**, 1076-1077.
- Wu, A. J., Hua, H., Munson, S. H., McDevitt, H. O.** (2002) Tumor necrosis factor-alpha regulation of CD4+CD25+ T cell levels in NOD mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **99**, 12287-12292.
- Xaus, J., Comalada, M., Valledor, A. F., Lloberas, J., Lopez-Soriano, F., Argiles, J. M., Bogdan, C., Celada, A.** (2000) LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood* **95**, 3823-3831.
- Yamada, Y., Kirillova, I., Peschon, J. J., Fausto, N.** (1997) Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**, 1441-1446.
- Yokota, S., Geppert, T. D., Lipsky, P. E.** (1988) Enhancement of antigen- and mitogen-induced human T lymphocyte proliferation by tumor necrosis factor-alpha. *J.Immunol.* **140**, 531-536.
- Zhou, B. R., Gumenscheimer, M., Freudenberg, M., Galanos, C.** (2003) A striking correlation between lethal activity and apoptotic DNA fragmentation of liver in response of D-galactosamine-sensitized mice to a non-lethal amount of lipopolysaccharide. *Acta Pharmacol.Sin.* **24**, 193-198.
- Zhou, B. R., Gumenscheimer, M., Freudenberg, M. A., Galanos, C.** (2005) Lethal effect and apoptotic DNA fragmentation in response of D-GalN-treated mice to

bacterial LPS can be suppressed by pre-exposure to minute amount of bacterial LPS: dual role of TNF receptor 1. *World J.Gastroenterol.* **11**, 3398-3404.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die mir beim Anfertigen der Arbeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben, ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel für die Überlassung des Themas und der großzügigen Bereitstellung der Mittel bei der Durchführung der Arbeit, sowie für das entgegengebrachte Vertrauen. Die wöchentlichen Besprechungen, Mittwochsseminare und „Journal-Clubs“ haben sehr dazu beigetragen, die wissenschaftliche Betrachtungsweise und das fachliche Argumentieren zu erlernen

Herrn Prof. Dr. Sigurd Elz möchte ich für die Bereitschaft zur fakultätsinternen Vertretung dieser Dissertation danken, die diese Promotion erst ermöglichte.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Petra Hoffmann für die Einführung in die Grundlagen der Durchflusszytometrie.

Ein ganz herzlicher Dank gilt der Arbeitsgruppe der Hämatologie/Onkologie, insbesondere Julia Albrecht, Tina Böld und Rüdiger Eder, die mich in vielerlei Hinsicht bei durchflusszytometrischen Analysen freundschaftlich unterstützten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Thomas Schubert und Frau Dr. Frauke Bataille, die mir mit ihrem pathologischen Fachwissen eine außerordentliche Hilfe bei der Beurteilung histologischer Untersuchungen waren.

Für die Vorarbeiten und Klonierungen zur Generierung der hicp75TNFR-transgenen Mäuse möchte ich mich sehr herzlich bei Frau Veronika Hochleitner bedanken, die damit die Grundlage für dieses Projekt geschaffen hat.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Dr. Andrea Hauser, die mir mit ihren stets wertvollen Ratschlägen eine große Hilfe war.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Frau Michaela Jungbeck, die geduldig in den letzten Wochen ein Büro mit mir teilte.

Ein ganz besonderer Dank gilt schließlich allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Immunologie, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich in besonderem Maße herzlichst bei meinen Eltern bedanken, ohne deren jahrelange Unterstützung Vieles nicht möglich gewesen wäre.

## Anhang

Manuskript, das im Rahmen der Promotion entstanden ist:

**Interaction of TNF with TNF Receptor 2 Promotes the Expansion and Function of Mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Regulatory Cells**

Xin Chen, Monika Bäumel, Daniela N. Männel, O. M. Zack Howard, and Joost J. Oppenheim

(Manuskript eingereicht)

Poster:

Posterpräsentation bei *16<sup>th</sup> European Congress of Immunology*, 2006 in Paris:  
„**Characterization of human icp75TNFR transgenic mice**“.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

.....  
Monika Bäumel

