

**Etablierung von Interleukin-10 (IL-10)-Reportermäusen
zur Identifizierung der IL-10-produzierenden
Zellen *in vivo***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Hicham Bouabe
aus Kenitra

Köln, 2008

Die Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden am Max von Pettenkofer Institut unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann, am Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried in der Abteilung von Prof. Dr. Rihard Fässler, und unter der Betreuung von Prof. Dr. Jonathan C. Howard am Institut für Genetik der Universität zu Köln durchgeführt.

Berichterstatter: Prof. Dr. Jonathan C. Howard
 Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann
 Prof. Dr. Klaus Pfeffer

Tag der mündlichen Prüfung: 11.02.2008

„Wer Mittel für wissenschaftliche Zwecke spendet, ist ein Wohltäter der Menschheit und verschafft ihr, wenn auch nicht sich selbst, immer einen Gewinn, bald einen größeren, bald einen kleineren. Wenn die Pflege der Wissenschaften davon abhängig gemacht würde, dass ihre Resultate sofort praktisch verwendbar sein sollen, würde man ihnen allen den Todesstoß versetzen. Es wäre das ein barbarischer Kindermord der grässlichsten Art, welcher die Fortentwicklung der menschlichen Kultur zum Stillstand brächte. Die Wissenschaft ist universell und nicht nur an keinen bestimmten Ort, an keine bestimmte Nationalität, sondern auch an keinen bestimmten religiösen Glauben gebunden.“

Max von Pettenkofer

bei seiner Antrittsrede als Präsident der „Bayerische Akademie der Wissenschaften“

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Pathologische Effekte der Entzündungen und Immunantworten	1
1.2. Entzündung: Zusammenspiel von zellulären und humoralen Faktoren	2
1.3. Die zellulären Komponenten der Entzündung	3
1.4. Die humoralen Faktoren der Entzündung.....	9
1.4.1. Lipidmediatoren	9
1.4.2. Gerinnungs- und Komplementsystem.....	10
1.4.3. Reaktive Sauerstoff und Stickstoff-Spezies (ROS/RNS).....	11
1.4.4. Cytokine	11
1.4.4.1. Interferone	12
1.4.4.2. Tumor-Nekrose-Faktor.....	15
1.4.4.3. Interleukine.....	16
1.5. Interleukin-10: Suppressor von pathologischen Immunantworten.....	19
1.6. Biologische Eigenschaften von Interleukin-10.....	21
1.6.1. Expression und Signalweg von IL-10	21
1.6.2. Effekte von IL-10 auf die Immunzellen.....	24
1.6.3. IL-10 und Krankheitserreger	25
1.6.4. Therapiemöglichkeiten mit IL-10	26
1.7. Zielsetzung der Arbeit	27
2. Material und Methoden	29
2.1. Material	29
2.1.1. Chemikalien, fertige Reagenzien, Medien und Medienzusätze	29
2.1.2. Radiochemikalien.....	31
2.1.3. Enzyme, Gewichts- und Längenstandards	31
2.1.4. Plasmide	31
2.1.5. Primer	32
2.1.6. Bakterienstämme	36
2.1.7. Zelllinien	36
2.1.8. Antikörper	37
2.1.9. Kits	37
2.1.10. Geräte	37

2.2. Methoden.....	39
2.2.1. Molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.1.1. Herstellung transformations-kompetenter Bakterien	39
2.2.1.2. Transformation	39
2.2.1.3. Lagerung der Bakterien	40
2.2.1.4. Klonierung von DNA-Fragmenten.....	40
2.2.1.5. Präparation von Plasmid-DNA.....	40
2.2.1.6. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz oder Organen.....	41
2.2.1.7. Isolierung genomischer DNA aus Zellen	41
2.2.1.8. Restriktions-Endonuklease Spaltung von DNA	42
2.2.1.9. Phenol-Chloroform-Extraktion	42
2.2.1.10. Fällern von DNA	43
2.2.1.11. Agarosegele	43
2.2.1.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	44
2.2.1.13. Southernblot-Analyse.....	44
2.2.1.14. Herstellung radioaktiv markierter Sonden	46
2.2.1.15. Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden auf Membranen	47
2.2.1.16. Bakterienkolonie-Hybridisierung.....	48
2.2.1.17. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	49
2.2.1.18. PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	49
a. PCR zur Klonierung von DNA-Fragmenten	49
b. Direkt PCR nach Bakteriolyse	50
c. PCR aus genomischer DNA: Genotypisierung von Mäusen.....	51
2.2.1.19. Sequenzierung	51
2.2.2. Kultur von Zelllinien und Transfektion	52
2.2.2.1. Kultivierung der HEK-293 und J774-Zellen.....	52
2.2.2.2. Transfektion der HEK-293 und J774-Zellen.....	52
2.2.2.3. Lagerung der Zellen	52
2.2.3. Generierung der IL-10-Reportermäuse	53
2.2.3.1. Isolierung und Behandlung von embryonalen Mausfibroblasten	53
2.2.3.2. ES-Zellkultur	54
2.2.3.3. Elektroporation der Targeting-Konstrukte in ES-Zellen.....	54
2.2.3.4. Selektion und Isolieren G418-resistenter ES-Klone	55
2.2.3.5. Einfrieren der G418-resistenten ES-Klone	56
2.2.3.6. DNA-Präparation aus ES-Klonen	56
2.2.3.7. Identifizierung homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone.....	57
2.2.3.8. Blastozysten-Injektion, -Transfer und Verpaarungsschema	57
2.2.3.9. Genotypisierung der Mäusen	58
2.2.4. Zellbiologische und immunologische Methoden	59

2.2.4.1. Gewinnung von Peritonealmakrophagen	59
2.2.4.2. Gewinnung von Makrophagen und DCs aus Knochenmark.....	59
2.2.4.2. Präparation von Einzelzellsuspensionen aus der Milz	60
2.2.4.3. Separation von T-Zellen aus Einzelzellsuspensionen der Milz	61
2.2.4.4. Stimulierung der Zellen <i>in vitro</i>	61
a) Stimulierung mit PAMPs	61
b) Stimulierung mit dem Superagonisten D665	62
2.2.4.5. Immunfluoreszenzfärbung	62
2.2.4.6. Cytokinmessung mittels Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set	63
2.2.4.7. β -Lactamase-Assay	64
2.2.4.8. Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS)-Analyse	66
2.2.5. Biochemische Methoden	67
2.2.5.1. Herstellung von Zelllysaten	67
2.2.5.2. Herstellung von Gewebelysaten.....	67
2.2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration.....	67
2.2.5.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Westernblotanalyse.....	68
2.2.5.5. Luciferase-Assay	69
2.2.5. Infektionsversuche	71
2.2.5.1. Kultivierung und Lagerung von <i>Y. enterocolitica</i>	71
2.2.5.2. Infektion der Mäuse mit <i>Y. enterocolitica</i>	71
2.2.5.3. Bestimmung der Yersinienanzahl (cfu) in Milz und Leber.....	72
3. Ergebnisse	73
3.1. Die IL10-EGFP-Reportermaus.....	73
3.1.1. Generierung des IL10-EGFP-Targeting-Konstrukts.....	74
3.1.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-EGFP-ES-Klone	76
3.1.3. Etablierung der IL10-EGFP-Mauslinie	77
3.1.4. Analyse der IL10-EGFP-Mauslinie	78
3.1.4.1. EGFP-Expressionsstudien mit der IL10-EGFP-Mauslinie	79
3.2. Die IL10-IRESEGFP-Reportermaus.....	83
3.2.1. Generierung des IL10-IRESEGFP-Targeting-Konstrukts	83
3.2.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-IRESEGFP-ES-Zellen	85
3.2.3. Etablierung der IL10-IRESEGFP-Reportermaus.....	86
3.2.4. Analyse der IL10-IRESEGFP-Reportermaus	87
3.2.4.1. Expressionsstudien von EGFP in der IL10-IRESEGFP-Reportermaus.....	88

3.3. Strategien zur Verbesserung der Reporteraktivität	92
3.3.1. IRES-vermitteltes polycistronisches Reporter System	93
3.3.1.1. Generierung von IRES-vermittelten polycistronischen Vektoren.....	93
3.3.1.2. Verbesserung der Reporteraktivität durch IRES-vermittelte polycistronische EGFP-Expression.....	94
3.3.1.3. Multiple Tandem-IRESEGFP-Module beeinträchtigen nicht die Cap-abhängige Genexpression.....	96
3.3.1.4. Multiple Tandem-IRESEGFP-Module haben keinen Einfluß auf die posttranskriptionale Regulation durch 3'UTR.....	96
3.3.1.5. Die proportionale Erhöhung der Tandem-EGFP-Fluoreszenzintensität ist unabhängig von der posttranskriptionalen Regulation durch 3'UTR.....	99
3.3.2. β -Lactamase-Reportersystem	102
3.3.2.1. Testen des β -Lactamase-Reportersystems <i>in vitro</i>	104
3.4. Die IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus	107
3.4.1. Generierung des IL10-2xIRES-Bla-Targeting-Konstrukts	107
3.4.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-2xIRES-Bla-ES-Zellen	109
3.4.3. Etablierung der IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus.....	111
3.4.4. Analyse der IL10-IRESBla-Reportermaus.....	111
3.4.4.1. Bla-Reporteraktivität ist in DCs und Makrophagen detektierbar.....	113
3.4.4.2. Die IL10-IRESBla-Reportermaus ermöglicht kinetische IL-10-Expressionsanalysen.....	116
3.4.4.3. Identifizierung von IL10-produzierenden Zellen <i>ex vivo</i>	117
3.5. IL10-3xIRESEGFP-Reportermausmodell.....	121
3.5.1. Generierung des IL10-3xIRESEGFP-Targeting-Konstrukts	121
3.5.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-3xIRESEGFP-ES-Klone.....	122
3.5.3. Generierung von IL10-3IRESEGFP chimäre Mäuse.....	123
4. Diskussion.....	124
4.1. Die IL10-EGFP-Mauslinie.....	125
4.1.1. Fehlen der EGFP-Expression aufgrund anormales Spleißens.....	125
4.2. Die IL10-IRESEGFP-Mauslinie	128
4.2.1. EGFP kann nicht in allen Zelltypen detektiert werden	128
4.3. Verbesserung der Reporteraktivität.....	131
4.3.1. IRES-vermitteltes polycistronisches Reporter System	131

4.4. Die IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus	133
4.4.1. Die IL10-2xIRES-Bla-Maus: Ein hoch sensitives Reportersystem	134
4.4.2. Folgerungen der IL10-Bla-Maus für andere Reportermause	136
4.4.3. Hypothese: <i>Autokrine IL10-abhängige Regulation</i>	137
5. Zusammenfassung	141
6. Abstract	142
7. Literaturverzeichnis.....	143
8. Abkürzungsverzeichnis.....	168
9. Danksagung.....	172
10. Erklärung	173
11. Lebenslauf	174

1. Einleitung

„Entzündung für sich ist nicht als Krankheit zu betrachten [...] und im Krankheitsfall, wo sie die krankmachende Wirkungsweise ändern kann, führt sie zur Heilung; doch wenn sie den heilsamen Zweck nicht erreichen kann, [...] löst sie Unheil aus“ mit diesen Zeilen beschrieb schon 1794 der schottische Arzt John Hunter in seinem für lange Zeit als medizinisch wegweisend geltenden Buch *„Abhandlung über das Blut, Entzündung und Schusswunden (A Treatise on the Blood, Inflammation and Gunshot Wounds)“* den doppelseitigen Effekt der Entzündung. Hunters Feststellung fiel in einer Zeit, in welcher kaum etwas über das Immunsystem und dessen humoralen und zellulären Komponenten bekannt war, umso erstaunlicher ist das visionäre Potential seiner Beobachtung. Heute wissen wir mehr über die Entstehungsweise der Entzündungen, über die dabei beteiligten humoralen und zellulären Komponenten und wissen, dass in der Tat Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle bei der Einleitung sowohl von protektiven als auch von pathologischen Immunantworten spielen.

1.1. Pathologische Effekte der Entzündungen und Immunantworten

Die akute Phase der Entzündungsreaktionen scheint dafür zu sorgen, dass der Infektionsort durch Entzündungszellen und Fibrinen eingeschlossen wird, so daß die Ausbreitung der Erreger verhindert und der Heilungsprozeß eingeleitet wird.

Die Entzündungsreaktion kann jedoch neben diesem protektiven Effekt auch Gewebeschäden hervorrufen, wenn sie nicht kontrolliert abläuft. Die Exsudate (wie reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies; TNF; Metalloproteasen, etc.) aktivierter Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, T-Zellen, B-Zellen) sind toxisch nicht nur für die Erreger, sondern auch für das Gewebe (Krishnamoorthy et al. 2006). Die Bekämpfung der Erreger ist immer mit der Schädigung des infizierten Gewebes verbunden. Eine andauernde Entzündungsreaktion kann zur Entstehung chronisch entzündlicher Krankheiten führen. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa gehören zu den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). In Westeuropa und den USA sind zwei von tausend Menschen davon betroffen (Annacker et al. 2003). Als Ursache für CED wird eine überschießende und anhaltende inflammatorische Reaktion des Immunsystems vermutet, die sich gegen die harmlose Darmflora richtet, oder die einmal gegen pathogene Mikroorganismen eingeschaltet, auch nach Eliminierung des Erregers nicht runterreguliert wird (Lalani et al. 1997).

Die Pathophysiologie der Artherosklerose wird klassischerweise der Anlagerung von fetthaltigen Micellen an den Arterien zugrunde gelegt. Mittlerweile deuten Studien darauf hin, dass zelluläre und humorale Aktivitäten während der Entzündungen eine entscheidende Rolle bei der Initiierung und Entwicklung der Artherosklerose spielen. Einige der Faktoren, die Atherosklerose fördern, sind erhöhte Mengen an oxidierte Lipoproteine, freie Radikale und Infektionen (Ross et al. 1999a,b; Libby et al. 2002a,b,c; Stoll et al. 2006).

Auch Asthma ist die Folge chronischer Entzündungen der Atmungsorgane. Die Hauptsymptome dieser Krankheit sind u.a. erhöhte Sekretion der Mucosa und starke Infiltration der Eosinophile. Verschiedene humorale und zelluläre Mediatoren sind beim Ablauf der Entzündungsprozesse bei Asthma beteiligt, wobei den Lipidmediatoren, wie Leukotriene, eine Hauptrolle zugeordnet wird (Luster et al. 2004; Wenzel et al. 2003a,b).

Mastzellen, T-Zellen, Makrophagen, Basophile und Eosinophile sind die wichtigsten Zelltypen, die bei der Entzündung in Asthma beteiligt sind (Hamid et al. 2003a,b). Nach der Erkennung eines IgE-opsonisierten Allergens mittels FcεRI setzen Mastzellen die Inhalte ihrer Granula frei, welche u.a. Histamine, Prostaglandine (PGD₂) und Leukotriene (LTC₄) beinhalten. Diese Mediatoren sind in der Lage Charakteristika von Asthma, wie die Einengung der Bronchien, sowie Schwellung und erhöhte Sekretion zu induzieren (Bradding et al. 2006).

Psoriasis ist eine Hauterkrankung, von der 2-3 % der Weltbevölkerung betroffen sind (Krishnamoorthy et al. 2006). Sie ist charakterisiert durch chronische Entzündungen der Haut, verbunden mit erhöhter Vermehrung von Keratinozyten und Infiltrierung der Haut mit Immunzellen (Schon et al. 2005). Cytokine sind stark involviert in der Entstehung von Psoriasis. Sie spielen, zusammen mit Adhäsionsmolekülen, eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung der Immunzellen (Griffiths et al. 1989a,b).

1.2. Entzündung: Zusammenspiel von zellulären und humoralen Faktoren

Entzündung (Inflammation) als Antwort auf Trauma, endogene Reize oder Exposition gegenüber Mikroorganismen bzw. ihren Bestandteilen ist charakterisiert durch die nach Aulus Cornelius Celsus (ca. 40 n.Chr.) definierten klassischen Entzündungszeichen Calor, Dolor, Rubor und Tumor (Wärme, Schmerz, Rötung und Schwellung) (Nathan, 2002). All dies beruht auf Auswirkungen von residenten, sowie rekrutierten Zellen und ihren Exsudaten. Dabei spielen die Effekte, vor allem der Exsudate, auf die lokalen Blutgefäßen eine entscheidende Rolle, indem sie die Vergrößerung ihres Durchmessers und die Erhöhung ihrer Durchlässigkeit induzieren. Ein verstärkter Blutfluß und lokale Flüssigkeitsansammlung ist

die Folge, daher die Erwärmung, Rötung und Schwellung-. Außerdem beeinflusst das Exsudat die Adhäsion von lokal zirkulierenden Leukozyten und Endothelzellen. Die Leukozyten folgen dann dem Gradienten, durchqueren die Endothelbarrieren und wandern zum Infektionsherd. Die Migration von Zellen in das Gewebe und ihre Aktivität am Entzündungsort, sowie die Wirkungen der Exsudate induzieren das Schmerzgefühl (Janeway et al. 2002).

1.3. Die zellulären Komponenten der Entzündung

Das Immunsystem verfügt über verschiedene Typen der sogenannten weißen Blutkörperchen (Leukozyten), die Krankheitserreger und transformierte Zellen (Krebszellen) erkennen und bekämpfen. Man unterscheidet dabei zwischen Monozyten / Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophile), natürlichen Killer Zellen, T-Zellen und B-Zellen. Die zwei letzteren Zelltypen, genannt Lymphozyten, zeichnen sich durch klonale Vielfalt aus, die sich auf spezifische Oberflächenproteine (T-Zell-Rezeptor „TCR“ bzw. B-Zell-Rezeptor „BCR“) bezieht. Jede T- bzw. B-Zelle produziert einen unterschiedlichen TCR bzw. BCR. Dieses Rezeptorrepertoire erkennt ca. 10^{12} unterschiedliche Epitope von Antigenen (im wesentlichen Fremdanogene). Erkennt eine T-Zelle oder B-Zelle einen Erreger bzw. Erregerbruchstück, so beginnt diese sich stark zu vermehren und zu expandieren. Weil sämtliche Abkömmlinge von derselben Zelle abstammen, spricht man von einem Klon bzw. klonaler Expansion. Es findet eine quantitative und qualitative Anpassung (Adaptation) an den jeweiligen infizierenden Erreger statt. Aus diesem Grund fasst man die T- und B-Zellen als adaptives Immunsystem zusammen.

T-Zellen erkennen in der Regel nicht direkt Antigene (Moleküle, die vom Immunsystem als fremd erkannt und gebunden werden). Sie benötigen die Hilfe von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), wie Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs). Diese exprimieren auf ihrer Oberfläche Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle oder MHC-ähnliche CD-1 Moleküle, an die Epitope (z.B. Oligopeptide von ca. 8-10 Aminosäuren für MHC-I-Moleküle) gebunden sind (Janeway et al. 2002). Der MHC-Epitop-Komplex wird von den T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor erkannt. Die Erkennung von tumor- oder erregerabgeleiteten Antigenen führt zur Aktivierung und Proliferation der T-Zellen. Für die volle Aktivierung und Effektorfunktion der Zellen sind jedoch Cytokine, wie Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ) nötig (Janeway et al. 2002).

T-Zellen werden, aufgrund der selektiven Expression bestimmter Oberflächenproteine (CD4 oder CD8) und/oder ihrer Cytokine-Produktion bzw. Effektorfunktion, in unterschiedliche Typen unterteilt.

Die drei Haupt-T-Zellen sind die CD8-T-Zellen, T-Helfer-CD4-Zellen des Typus 1 (T_H1 -Zellen) und T-Helfer-CD4-Zellen des Typus 2 (T_H2 -Zellen) (CD steht für *Cluster of Differentiation*).

CD8-T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen mittels ihres T-Zellrezeptors die MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC-I)/Peptid-Komplexe, die auf allen kernhaltigen Zellen präsentiert werden. Handelt es sich dabei um fremde (z.B. Erreger-Antigene) oder anormale von malignen Zellen abgeleitete Peptide, so werden die CD-8-T-Zellen aktiviert (Townsend et al. 1989). Infolgedessen schütten sie Perforin aus, welches Poren in der Zielzellmembran bildet, sowie Granzyme (Proteasen), die zusammen in der Zelle Apoptose (programmierter Zelltod) auslösen. Apoptose wird auch mittels der Interaktion eines auf aktivierten T-Zellen exprimierten membranständigen Effektormoleküls Fas-Ligand (Fetal alcohol syndrome-Ligand) mit dem Fas-Rezeptor auf der Zielzelle ausgelöst (Kim KS. 2002).

T_H1 - und T_H2 -Zellen exprimieren den CD4-Rezeptor und erkennen Antigen determinanten (Epitope), die auf MHC-Klasse-II-Moleküle (MHC-II) präsentiert werden. MHC-II werden auf professionellen APZ (Makrophagen, DCs und B-Zellen) exprimiert. Die Erkennung von an MHC-II gebundenen fremden Antigenen führt zur Aktivierung der T_H1 -Zellen, welche daraufhin Effektormoleküle wie $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und GM-CSF ausschütten, und den membranständigen CD40-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Effektormoleküle und die Bindung des CD40-Liganden an den CD40-Rezeptor führen zur Aktivierung von Phagozyten (Jaiswal et al. 1997; Hamilton et al. 2003), die dann in der Lage versetzt werden, die intrazellulären Erreger abzutöten.

Die T_H2 -Zellen sind auf die Aktivierung der B-Zellen spezialisiert. Sie sezernieren Cytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-6, die die Vermehrung und Differenzierung der B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen fördern. Weitere stimulierende Signale bekommen die B-Zellen durch die Interaktion ihres CD40-Rezeptors mit dem membranständigen CD40-Liganden auf der Oberfläche aktivierter T_H2 -Zellen (Friedl et al. 2001).

B-Zellen benötigen neben der Erkennung des spezifischen Antigens die Hilfe von T-Helfer-Zellen, um aktiviert zu werden und sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen zu differenzieren. Allerdings gibt es auch T-Zell-unabhängige Antigene, die B-Zellen direkt zu spezifischen antikörperbildenden Plasmazellen differenzieren. Die Antikörper binden Antigene auf der Oberfläche der Erreger, die dadurch für die Phagozytose durch

Makrophagen, dendritische Zellen oder Granulozyten markiert (opsoniert) werden. Darüber hinaus können Antikörper auch direkt Exotoxine neutralisieren.

Bei den Makrophagen, dendritischen Zellen, Granulozyten (Mastzellen, basophile Zellen, neutrophile Zellen) und natürlichen Killerzellen werden die Gene für die Rezeptoren (z.B. Toll-like Rezeptoren; NOD-Rezeptoren), die für die Erregererkennung und die Initiierung der Immunantwort verantwortlich sind, schon in der befruchteten Eizelle festgelegt. Säugetiere werden mit einem festgelegten Sortiment solcher Rezeptoren geboren. Man spricht daher bei solchen Zellen vom angeborenem Immunsystem. Ein weiterer Unterschied zum adaptiven Immunsystem besteht darin, dass die Zellen des angeborenem Immunsystems keine klonale Expansion durchlaufen.

Mastzellen (MC), die einst von Paul Ehrlich vor mehr als einem Jahrhundert beschrieben wurden, sind 9–17µm große, mononukleäre, gewebeständige Zellen, deren Zytoplasma mit Granula angereichert ist. Sie kommen ubiquitär im Bindegewebe und in den Schleimhäuten des Körpers vor. In der Haut befinden sie sich in der Nähe von Gefäßen, Haarfollikeln, Talgdrüsen und Nervenzellen. Sie sind auch im Gastrointestinal- und Respirationstrakt vorhanden. Sie stehen damit in engem Kontakt mit der äußeren Umwelt und gehören zu den ersten Zellen, die Kontakt mit Eindringlingen aufnehmen (Metz et al. 2007; Theoharides et al. 2007).

Unterschiedliche Stimuli induzieren die Aktivierung der Mastzellen. Der bestuntersuchte Aktivierungsmechanismus ist der durch die Kreuzvernetzung des FcεRI-Rezeptors. FcεRI ist der hochaffine Rezeptor des Immunglobulins E (IgE). Weitere Aktivierungsmechanismen werden durch die Bindung der Komplement-Faktoren C3a, C5a, C3b, und C4b an den entsprechenden Rezeptoren auf den Mastzellen initiiert. Erregerbestandteile, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular pattern*), wie Peptidoglykan, doppelsträngige RNA, Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin etc. induzieren über Toll-like-Rezeptoren (TLRs) die Aktivierung der Mastzellen (Malbec et al. 2007). Darüber hinaus kann ihre Aktivität durch Cytokine wie IL-1, IL-12, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und Lipidmediatoren wie Prostaglandin E₂ reguliert werden.

Nach ihrer Aktivierung setzen Mastzellen den Inhalt cytoplasmatischer Granula (Körnchen) frei, ein Prozess, den man als Degranulierung bezeichnet. Die Granula enthalten verschiedene biologisch aktive Produkte. Dazu gehören Histamin (bei Nagetiere, Serotonin); das Proteoglykan Heparin; diverse Proteasen (z.B. Trypsin, Kathepsin G und Carboxypeptidase A); Lipidmediatoren (wie Prostaglandin D₂ und Leukotrine C₄, D₄, E₄) und Cytokine (wie IL-1, IL-4, IL-6, IL-12, TNF-α, GM-CSF, RANTES, TGF-β, KC und MIP-1) (Tannenbaum

et al. 1980; Ziai et al. 1990; Grassi-Kassisse et al. 1992; Graham et al. 2006). Histamin ist ein vasoaktives Amin, das die Durchblutung und Gefäßdurchlässigkeit fördert. Außerdem wirkt Histamin chemotaktisch auf Granulozyten. Histamin ist maßgeblich für die allergischen Reaktionen verantwortlich (Caughey GH. 2007).

Mastzellen können, während der Entzündungsreaktionen in die Milz und Lymphknoten einwandern und dort sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort beeinflussen. Mastzellen können die Migration und Reifung von Neutrophilen und DCs bewirken (Metz et al. 2007). Sie können auch als APZs wirken und direkt T-Zellen aktivieren (Sayed et al. 2007). Die perivaskuläre Lokalisierung der Mastzellen im Gewebe, in der Haut, in der Lunge und im Darm, ist von strategischer Bedeutung. Sie gehören damit zu den ersten Sensoren für Infektionen und Verletzungen und sie können sehr schnell darauf reagieren. Ihre wichtige Rolle spiegelt sich z.B. in Mastzellen-defizienten Mäusen (c-kit-defizient-Mäuse) wider, die eine verminderte antibakterielle Aktivität gegen eine *Klebsiella pneumoniae* Infektion zeigen (Malaviya et al. 1996). Diese Anfälligkeit war mit einem verminderten Zustrom der Neutrophile in den Ort der Infektion verbunden. Ferner konnten Tannebaum et al. durch Induktion der Mastzellen-Degranulierung mittels subkutaner Injektion des Polypeptid-ähnlichen Substrats 48/80 oder durch Injektion gereinigter Mastzellen-Granula, einen schnellen PMN-Einstrom in der Haut von Ratten schon nach 1 bis 2 Stunden beobachten (Tannebaum et al. 1980).

Neutrophile Granulozyten, die als polymorphnukleare Neutrophile (PMN) bekannt sind, machen ca. 50-60% der zirkulierenden Leukozyten aus. Neutrophile Granulozyten werden als erste Immunzellen an den Ort der Infektion rekrutiert und spielen damit eine zentrale Rolle bei akuten Entzündungsreaktionen.

Für die Rekrutierung der PMNs aus dem Blut ins Gewebe ist vor allem das Chemokin IL-8 von entscheidender Bedeutung. Bei der Extravasation der PMNs sind die interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM)-1 und ICAM-2 auf den Endothelzellen, und deren jeweiligen Liganden auf den PMNs, funktionelle Leukozytenantigen (LFA)-1 bestehend aus dem CD11a/ α_L -Integrin und dem CD18/ β_2 -Integrin, beteiligt (Reaves et al. 2005). Weitere Chemoattraktoren für PMNs sind der plättchenaktivierende Faktor (PAF), das bakterielle Oligopeptid N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP), der Komplement-Faktor C5a, Leukotrien B4 (LTB4) und Lipoxin (LX) (Sala et al. 2001).

PMNs können die Erreger binden und phagozytieren. Die Phagozytose kann durch unmittelbare Wechselwirkung mikrobieller Komponenten mit entsprechenden Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen eingeleitet werden. Zu diesen Rezeptoren gehören der

Makrophagen-Mannoserezeptor, ein Lektin vom C-Typ, das bestimmte Zuckermoleküle an der Oberfläche zahlreicher Bakterien und einiger Viren bindet. Darüber hinaus wird die Phagozytose durch Opsonisierung der Erreger bzw. Erregerpartikel über Serum-Faktoren gefördert. Zu den Opsoninen gehören das Immunglobulin G (IgG) und das Komplementfragment C3b und C3bi. Die Phagozytose der opsonierten Erreger wird anschließend mittels den Fc-Rezeptoren FcγRII (CD32) und FcγRIII (CD16) bzw. den Komplement-Rezeptoren CR1 (CD35) und CR3 vermittelt. Die Erreger-enthaltenden Phagosomen fusionieren mit den lysosomalen Granula zu Phagolysosomen (Segal AW. 2005).

Die Granula enthalten unterschiedliche antibakterielle und zytotoxische Substanzen, wie die Myeloperoxidase (MPO), welche die Bildung von Hypochlorid-Ionen (OCl^-) aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) katalysiert und Proteasen: Cathepsin G, Elastase, und Proteinase3. Bei den Proteasen handelt es sich um positiv geladene (kationische) Polypeptide (zwischen 25 und 29 kDa groß), die proteolytische Aktivität gegen eine Reihe von Komponenten der extrazellulären Matrix aufweisen, wie Elastin, Fibronectin, Laminin, Kollagen-Typ IV und Vitronectin. Weiterhin induzieren die Proteasen die Aktivierung der Endothelzellen, Makrophagen, Lymphozyten, Epithelzellen und Blutplättchen. Kollagenabbau hat chemotaktischen Effekt auf Monozyten, PMNs und Fibroblasten (Kougiass et al. 2005).

Weitere Bakterizide der Granula sind: Lysozym, Bakterizid/Permeabilitätinduzierendes Protein (BPI), Defensine, Lactoferrin, humanes Cathelicidin Protein (hCAP)-18, Neutrophil Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) und Nramp-1 (Iovine et al. 1997; Faurschou et al. 2003). Die Spaltung von hCAP-18 durch Elastase oder Proteinase-3 führt zur Freisetzung des C-terminalen antimikrobiellen Peptid, genannt LL-37 (weil das Peptid mit zwei Leucin-Resten beginnt und aus 37 Aminosäuren besteht). LL-37 wirkt bakterizid gegen gramnegative und grampositive Bakterien, sowie Pilze und Parasiten. Außerdem wirkt LL-37 chemotaktisch auf PMNs, T-Zellen, Mastzellen und Monozyten. LL-37 kann auch die Degranulierung von Mastzellen induzieren, wobei proinflammatorische Mediatoren wie Histamine and Prostagladine freigesetzt werden (Yang et al. 2000).

Die Matrix-Metalloproteasen (MMP) sind in der Lage, die meisten Strukturen der extrazellulären Matrix, einschließlich Kollagen, Fibronectin, Proteoglykane und Laminin zu hydrolysieren. Dies unterstreicht den gewebedestruktiven Effekt der Entzündungsreaktionen. Nachdem PMNs aktiviert worden sind, leben sie nur wenige Stunden, um Erreger aufzunehmen und in Phagolysosomen abzutöten oder den toxischen Inhalt ihrer Granula nach außen abgeben, um extrazelluläre Erreger zu neutralisieren. Kürzlich wurde ein weiterer

antimikrobieller Mechanismus der Neutrophilen entdeckt. Ihr Absterben führt zum Freisetzen von extrazellulären „Netzen“ (**neutrophil extracellular trap: NETs**). Diese NETs bestehen aus Granula-Komponenten und Chromatin, die durch Fusion von Kern- und Granula-Membranen entstehen und die Erreger immobilisieren und abtöten (Brinkmann et al. 2004; Urban et al. 2006; Fuchs et al. 2007). Die kurzlebigen PMNs scheinen mit diesem letzten Aufopferungsakt über ihren Tod hinaus noch antimikrobiell zu wirken.

Wenn Neutrophile nicht über dieses neue NETs-vermittelte Zelltod-Programm absterben, machen sie, wenige Stunden nach ihrer Aktivierung, Apoptose. Anschließend werden sie von Makrophagen phagozytiert, die nach dem PMNs-Einstrom als nächstes (ca. 24-48 h nach dem Entzündungsbeginn) in den Ort der Inflammation verstärkt einwandern (Ryan et al. 1977; Melnicoff et al. 1989; Doherty et al. 1988).

Makrophagen („Fresszellen“) entstehen kontinuierlich aus zirkulierenden Monozyten (12-20 µm Durchmesser), die den Blutkreislauf verlassen und in Gewebe hineinwandern. Man findet sie im Bindegewebe, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge (Alveolarmakrophagen), der Leber (Kupffersche Zellen) und der Milz. Monozyten / Makrophagen verlassen den Blutstrom über die Interaktion ihres LFA-1 und Mac-1 mit den jeweiligen Liganden auf den Endothelzellen ICAM-1 und ICAM-2 und wandern in das Gewebe ein. Bei der Extravasation der Monozyten sind nicht wie im Falle der Neutrophilen IL-8, sondern die Chemokine Monozyten-Chemoattraktor-Protein (MCP)-1, IFN γ -induzierbares Protein-10 (IP-10), MIP-1 (Makrophagen Inflammatory-Protein-1) und RANTES (regulated on activation normal T-Cell expressed and secreted) beteiligt, wobei MCP-1 eine Schlüsselrolle spielt (Janeway et al. 2002).

Makrophagen spielen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger (Parasiten, Bakterien, Pilze, Würmer). Nach der Phagozytose erfolgt in der Regel die Fusion der Phagosomen mit den Lysosomen (Phagosomenreifung). Die reaktiven Sauerstoff (O)-haltigen Substanzen wie ROS, Proteasen, Defensine, Lysozym, etc. in den Phagolysosomen inhibieren die Replikation der Erreger und führen zur Abtötung. Die Phagosomenreifung wird u.a. durch Stimulierung der Makrophagen mit IFN- γ induziert.

Aktivierte Makrophagen schütten weitere inflammatorische Cytokine wie TNF- α , PGE₂, IL-1, IL-6, und reaktive (NO)- und (O)-spezies (NOS, ROS) aus (Porcheray et al. 2005).

Darüber hinaus generieren Makrophagen Antigene, die auf MHC-I oder MHC-II den T-Zellen präsentiert werden.

Ruhende Makrophagen exprimieren allerdings wenig oder kein MHC-II und kaum costimulatorische B7-Moleküle (CD80 und CD86). Ihre Expression wird erst durch die

Interaktion der Erreger bzw. Erregerbestandteile mit Erreger erkennende Rezeptoren (Pathogen recognition receptor: PRR), wie Toll-like Rezeptoren (TLR), induziert. Ähnlich wie PMNs verfügen Makrophagen auch über diverse PAMP-Rezeptoren (PAR) um Erreger spezifisch zu erkennen.

Dendritische Zellen (DCs) wurden erstmals 1973 beschrieben (Steinmann et al. 1973). Sie gelten als die potentesten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Sie spielen eine maßgebliche Rolle in der Initiierung und Modulierung der adaptiven Immunantwort gegen unterschiedliche Erreger, indem sie naive T-Zellen aktivieren. DCs kommen in allen Geweben vor, vor allem in der Haut (Langerhans-Zellen), den lymphatischen Organen (Milz, Thymus, Lymphknoten) und in den Schleimhäuten. Neben den myeloiden DCs (mDCs), die sich von der monozytären Reihe ableiten, gibt es auch einen kleinen Teil der DCs, sogenannte plasmacytoiden DCs (pDCs), die eine lymphoide Herkunft haben (Colonna et al. 2004; Kadowaki et al. 2001; Chen M. et al. 2007). Die plasmacytoiden und myeloiden DCs unterscheiden sich in ihrem Phänotyp, ihrer Lokalisation und Funktion. Die pDCs exprimieren, im Unterschied zu den mDCs, den CD8 Rezeptor der T-Zellen. Die Hauptaufgabe der mDCs besteht darin, Antigene im peripheren Gewebe aufzunehmen, zu den Lymphorganen (z.B. Lymphknoten) zu wandern und anschließend die prozessierten Antigene den T-Zellen zu präsentieren. Die pDCs befinden sich in der Medulla des Thymus und in den T-Zell-Arealen der Lymphknoten, wo sie eine wichtige Rolle bei der Immuntoleranz spielen.

1.4. Die humoralen Faktoren der Entzündung

Die Reaktion der Immun-, Gewebe- und Endothelzellen auf z.B. Infektionserreger führt einerseits zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und andererseits zur Aktivierung humoraler Abwehrsysteme. Folgende Komponenten sollen hier näher besprochen werden: **(1)** Lipidmediatoren wie der plättchenaktivierende Faktor (PAF) und die Arachidonsäure-Derivate (Prostaglandine, Leukotrine); **(2)** das Gerinnungssystem und das Komplementsystem; **(3)** reaktive Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies (ROS und RNS), und **(4)** Cytokine.

1.4.1. Lipidmediatoren

Phospholipide sind die Hauptkomponenten der Zellmembranen. Phospholipasen (PL), besonders PLA₂ und PLC, werden während einer Entzündungsreaktion aktiviert und katalysieren den Abbau von Phospholipiden zu Arachidonsäure, welches das Ausgangssubstrat von Lipidmediatoren ist: Der Cyclo-Oxygenase-Weg (katalysiert durch die

Enzyme Cyclooxygenase (COX)-1 und -2) führt zur Synthese ua. von Prostaglandinen (PG), während der Lipoxygenase-Weg zur Produktion von Leukotrienen und Lipoxinen führt (Levy et al. 2001; Schwab et al. 2001).

Leukotriene werden von allen aktivierten Leukozyten synthetisiert. Leukotrien B₄ (LTB₄) ist ein starker Chemoattraktor für Leukozyten. LTC₄, LTD₄ und LTE₄ erhöhen die Gefäßpermeabilität, steigern die Kontraktion der glatten Muskulatur der Atemwege und verstärken die Schleimsekretion. Die Prostaglandine PGE₂ und PGF₂ werden hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert. Neutrophile synthetisieren mäßige Mengen von PGE₂, während PGD₂ von Mastzellen produziert wird. Prostaglandine wirken chemotaktisch auf Immunzellen, steigern die Blutgefäßdurchlässigkeit und sind pyrogen.

Der plättchenaktivierende Faktor (PAF), der von Blutplättchen, PMNs, Makrophagen, Endothelzellen und Epithelzellen produziert wird, induziert die Adhäsionsmoleküle von Endothelzellen und Leukozyten, und damit deren Rekrutierung und Aktivierung. PAF induziert die Translokation der Nuklear Faktor kappa B (NFκB) in den Zellkern und reguliert die Produktion von Cytokinen. Außerdem induziert PAF die Rekrutierung von Blutplättchen und deren Aggregation, welche die Einleitung der Blutgerinnung unterstützt. Die Bildung von Blutgerinnsel reduziert die Dissemination von Infektionserregern.

1.4.2. Gerinnungs- und Komplementsystem

Das Komplementsystem besteht aus mehr als 30 Plasmaproteinen, die im Blut und Interstitium in inaktiver Form (Zymogene) vorliegen. Viele dieser Komplementfaktoren sind Proteasen, die ihrerseits durch proteolytische Spaltung aktiviert werden. Antigen-Antikörper-Komplex (Immunkomplexe) aktivieren das klassische Komplementsystem, mannosehaltige Kohlenhydrate von Erregern aktivieren den Mannan-Bindungs-Lektin-Weg, und Lipopolysaccharide können direkt den alternativen Komplementweg induzieren. Alle drei Aktivierungswege führen zur Bildung der C3-Konvertase. Die C3-Konvertase ist der Ausgang für die Ausbildung und Aktivierung der lytischen Komplementkomponenten C5-C9. Die aktivierten Komplementfaktoren können Krankheitserreger auch opsonisieren durch Bindung an C3b, oder die Rekrutierung von Phagozyten durch die Spaltprodukte C3a und C5a induzieren. Ferner spielen die Komplementproteinklassen C3a und C5a eine Rolle bei der Permeabilisierung der Blutgefäße (Janeway et al. 2002).

Eine zusätzliche physikalische Barriere, welche die Ausbreitung der Infektion begrenzt, stellt das Gerinnungssystem dar. Die Gefäßschädigungen führen zur Aktivierung einer Enzymkaskade von Plasmaproteinen, die in die Aktivierung von Thrombin resultiert.

Thrombin katalysiert schließlich die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin. Das unlösliche Fibrin aggregiert, zusammen mit Blutplättchen, und bildet Gerinnsel. Die Fibrinbildung bewirkt das Verschließen der offenen Blutgefäße und die Immobilisierung von Bakterien, und wirkt damit deren aktiver oder passiver Verteilung im Gewebe entgegen.

1.4.3. Reaktive Sauerstoff und Stickstoff-Spezies (ROS/RNS)

Die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und mononuklearen Phagozyten ist mit der Produktion von reaktiven Sauerstoff ($O^{\cdot-}$) und Stickoxid (\underline{N})-Spezies (ROS und RNS) verbunden. Dabei wird Sauerstoff (O_2) durch das IFN- γ induzierbare Enzym Nicotinamadeninucleotidwasserstoff (NADPH)-Oxidase (auch als "phagocyte oxidase: Phox" bezeichnet) zu Superoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) reduziert. Über weitere Reaktionen entstehen u.a. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) und Hypochlorid-Ion (OCl^{\cdot}) (Forman et al. 2002).

Zu den reaktiven Stickstoff-Spezies (RNS) gehört Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}). (NO^{\cdot}) wird durch das Enzym NO-Synthetase (NOS) produziert, welche L-Arginin zu L-Citrulin und NO umsetzt. Stickstoffoxid kann mit Hyperoxidanionen ($O_2^{\cdot-}$) zu dem hoch toxischen Peroxinitrit (ONO_2^{\cdot}) reagieren, welches im sauren Milieu (z.B. in reifen Phagosomen) über Peroxinitritsäure in Hydroxylradikale zerfällt.

Die reaktiven Sauerstoff und Stickstoff Spezies haben mehrere antimikrobielle Effekte. Oxidation von Nukleotiden führen zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA, zu Modifikationen der DNA-Basen, DNA-Protein-Quervernetzungen und zu Fragmentierungen des Zucker-Phosphat-Gerüsts. Oxidative Modifizierungen von Proteinen, vor allem an Cystein-, Methionin-, Tyrosin, Phenylalanin- und Tryptophan-Resten, führen zu ihrer Schädigung bzw. Inaktivierung der Proteinfunktionen. Durch Nitrolyse von z. B. Zink-Metalloproteine kann die Replikation beeinträchtigt werden. Betroffen von den toxischen Modifikationen können auch Proteine der Atmungskette oder Resistenzproteine sein. Die Virulenz oder das Überleben der Krankheitserreger wird dadurch eingeschränkt. ROS und RNS können allerdings auch auf gleiche Weise körpereigene Strukturen schädigen (Wiseman et al. 1996).

1.4.4. Cytokine

Cytokine sind kleine (vorwiegend) lösliche Proteine oder Glykoproteine mit einem Molekulargewicht ab 5 kDa, die ins Blut bzw. in die Gewebsflüssigkeit von Zellen freigesetzt werden. Sie werden von verschiedenen hämatopoetischen und nichthämatopoetische Zellen

gebildet und wirken nicht-enzymatisch in pico- bis nanomolareren Konzentrationen über spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen. Sie induzieren die Expression von verschiedenen anti-mikrobiellen Proteinen und immunmodulatorischen Faktoren. Ihre Wirkungsweise ist hauptsächlich autokrin oder parakrin (Meager 1998).

Zu den Cytokinen gehören Interleukine (IL), Interferone (IFN), Kolonie-stimulierende Faktoren (CSF), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF), Chemokine und transformierende Wachstumsfaktoren (TGF). Die Funktionen der verschiedenen Cytokine überschneiden sich vielfach. Im Folgenden werden die für die Infektionsbiologie wichtigen Cytokine beschrieben.

1.4.4.1. Interferone

Interferone (IFN), die ersten entdeckten Cytokine (Isaacs and Lindenmann, 1957), werden in zwei Klassen (Typ I und Typ II) unterteilt. IFN- α und IFN- β , die bisher am besten charakterisierten Vertreter der Typ I-Interferone, zeigen eine starke antivirale Aktivität. Virale Komponenten, wie doppelsträngige RNA (dsRNA), sind starke Induktoren der IFN- α/β -Expression. IFN- β wird hauptsächlich von Fibroblasten exprimiert, während IFN- α von allen Leukozyten synthetisiert wird. Beide können auf verschiedene Zelltypen über denselben dimeren Rezeptor IFNAR1/IFNAR2 agieren (Abbildung 1.1.).

Der einzige Typ II-Interferon ist IFN- γ . Die hauptsächlich zellulären Produzenten von IFN- γ sind aktivierte T-Helfer (T_H1) Zellen, aktivierte zytotoxische ($CD8^+$) T-Zellen, sowie aktivierte natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Neuere Studien zeigten, daß IFN- γ auch von Makrophagen, B-Zellen, und dendritischen Zellen (DC) synthetisiert werden kann (Schroder et al. 2004).

IFN γ bindet an den heterodimeren Rezeptor IFNGR1/IFNGR2 und induziert über JAK1 und JAK2 die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, hauptsächlich STAT1 und STAT2, welche die Expression verschiedener Gene induzieren (Abbildung 1.1.).

Zu den IFN Typ I- und II-induzierbaren antiviralen Mechanismen gehören ds-RNA abhängige Protein Kinase (PKR) und 2'-5' oligoadenylate synthetase (2'-5' OAS). PKR induziert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B, welcher die Expression weiterer Gene der Immunantwort induziert. Ein direkter antiviraler Effekt von PKR besteht in der Phosphorylierung der α -Untereinheit des "eukaryotic initiation factor 2" (eIF2), was dessen Inaktivierung bewirkt. Dies führt zur raschen Inhibierung der mRNA-Translation und damit der Virus-Multiplikation.

2'-5' OAS katalysiert die Polymerisierung von Adenosintriphosphat (ATP) zu einer Reihe von 2'-5'-verbundenen Oligomeren, die sich mit hoher Affinität an das inaktive monomere Enzym, Endoribonuklease L (RNaseL) binden und dessen Homodimerisierung und damit Aktivierung induzieren. Aktivierte RNaseL degradiert virale und zelluläre einzelsträngige RNA sowie 28S ribosomale RNA. Dies führt zur Inhibierung der Translation und somit zur Virus-Vermehrung (Janeway et al. 2002).

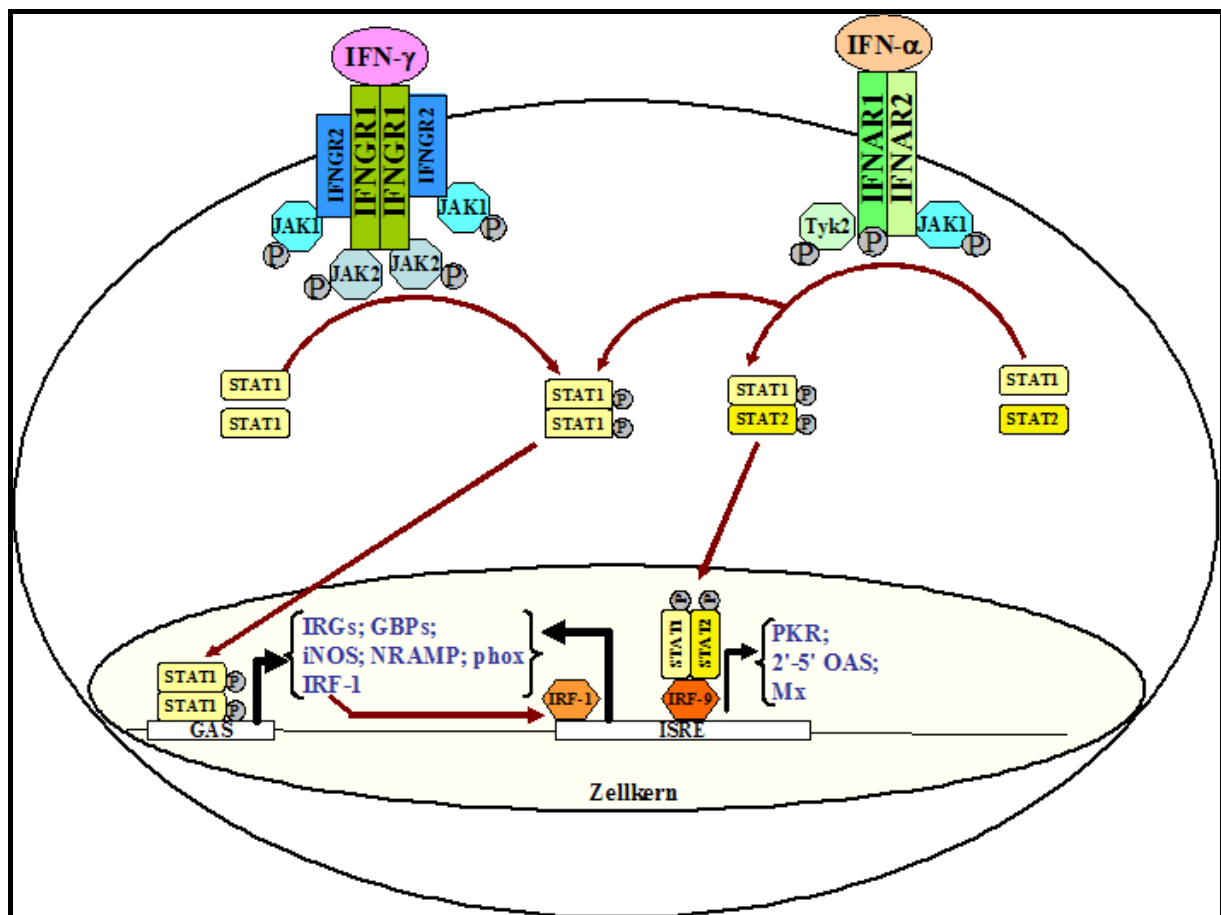


Abbildung 1.1: IFN-Signalwege. Interferone binden an ihre entsprechenden Rezeptoren und induzieren Signalkaskaden über die Phosphorylierung von JAK1, JAK2 und Tyk2, welche wiederum die Rezeptoren phosphorylieren und somit zugänglich für STAT1- und STAT2-Bindung machen. Die Rezeptorassoziierten Januskinasen (JAK) phosphorylieren die STATs-Moleküle, die dadurch aktiviert werden und Dimere bilden. STAT-Dimere gelangen in den Zellkern, wo sie sich an ihre entsprechenden Erkennungsequenzen der DNA binden und die Transkription verschiedener Gene (u.a. antimikrobieller Gene) induzieren.

Die am besten charakterisierten IFN-induzierbaren Komponenten antimikrobieller Resistenzmechanismen sind die Produktion von ROS und RNS, sowie NRAMP (natürliche Resistenzassoziierte Makrophagenprotein“-Familie / **n**atural **r**esistance-**a**ssociated **m**acrophage **p**rotein).

Der Metall-Ionen Transporter, NRAMP1, ist ein integrales Membranprotein, das in endosomalen/lysosomalen Kompartimenten von phagozytierenden Zellen (z.B. Makrophagen) exprimiert wird. Phagozytose führt zur schnellen Rekrutierung von NRAMP1

in die phagosomale Membran, wo es den Transport von Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , und wahrscheinlich auch anderer Metall-Ionen wie Zn^{2+} in das Cytoplasma übernimmt. NRAMP1 kann damit die intrazelluläre Replikation der Erreger inhibieren (Nevo et al. 2006).

Eine besondere Rolle bei zellautonomen Resistenzprogrammen gegen intrazelluläre Krankheitserreger spielen IFN-induzierbare GTPasen. Hierzu gehören die Mx Proteine, Guanylat-bindende Proteine (GBPs) und Immunitätsassoziierte GTPasen (Immunity-related GTPases: IRGs, früher p47 GTPasen genannt) (Taylor GA. 2007; Martens S. and Howard JC., 2006; Taylor et al. 2004). Bei den meisten dieser GTPasen konnten Lipidankermotive und/oder Membranbindungssignale beschrieben werden (Dever et al. 1987; Taylor et al. 1997; Haller et al. 2002; Zerrahn et al. 2002; Martens et al. 2004). Nach der Induktion der Zellen mit Interferon und/oder Erreger, zeigen die GTPasen eine subzelluläre Reorganisation zwischen spezifischen Membrankompartimenten und Zytosol. Es wird vermutet, dass die antimikrobiellen Wirkungen der GTPasen durch strukturelle Modifizierungen der Membranen erfolgen (Martens et al. 2006).

Die IFN Typ-I induzierbaren Mx Proteine sind hoch konservierte GTPasen, die zur Dynamine-Superfamilie großer GTPasen gehören. Wie Dynamine, bilden Mx GTPasen auch Oligomere (Kochs et al. 2002a), die sich wahrscheinlich direkt an viralen Komponenten binden und deren intrazellulären Transport und Viruspartikelreifung hemmen (Kochs et al. 2002b).

Die Expression von GBPs wird sehr stark durch IFN- γ in verschiedenen Zelltypen induziert. Sie sind wahrscheinlich auch an antiviralen Funktionen beteiligt, wobei bisher nur am humanen (h)GBP-1 eine direkte antivirale Wirkung gegen Vesicular Stomatitis Virus (VSV) und dem Encephalomyocarditis Virus (ECMV) zugeschrieben werden konnte (Anderson et al. 1999; Tripal et al. 2007).

Ein großer Teil der Gene, die für typischerweise 47 kDa großen IRG kodieren wird durch IFN- γ induziert. Im Vergleich zur Maus, in der 23 IRG Gene vorhanden sind, ist diese GTPase Familie beim Menschen interessanterweise nur durch zwei Gene, IRGM und IRGC (CINEMA), vertreten, wobei diese nicht IFN- γ induzierbar sind (Bekpen et al. 2005).

In der Maus stellen die IFN-induzierbaren IRGs vermutlich das wirkungsvollste Resistenzsystem gegen intrazelluläre Krankheitserreger dar. Mäuse, bei denen gezielt eines der IRG Gene zerstört wurde, zeigen eine erhöhte erregerspezifische Anfälligkeit, wobei *Irgm1* (LRG-47) eine zentrale Rolle dabei zu spielen scheint. *Irgm1*-defiziente Mäuse sind anfällig gegenüber zahlreichen Krankheitserregern wie, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* (Collazo et al. 2001; MacMicking et al. 2003;

Feng et al. 2004; Taylor et al. 2004; Santiago et al. 2005; Martens et al. 2006; Henry et al. 2007).

1.4.4.2. Tumor-Nekrose-Faktor

Carswell und seine Mitarbeiter experimentierten Anfang der 70er Jahre an Mäusen mit Tumoren (Carswell et al. 1975). Dabei injizierten sie den Mäusen eine abgeschwächte Form des Tuberkulose-Erregers, *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), und einige Tage später Lipopolysaccharid (LPS). Bei den behandelten Tieren kam es zu einer Rückbildung des Tumors. Sogar das Serum dieser Mäuse löste Nekrose in Krebszellen *in vitro* aus (Carswell et al. 1975, Helson et al. 1975). Da BCG und LPS als Ursache für die Tumornekrose ausgeschlossen werden konnten, wurde die Wirkung auf einen LPS-induzierten Serum-Faktor zurückgeführt. Dieser Faktor wurde als Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) bezeichnet.

TNF wird entweder membrangebunden oder löslich exprimiert. Zur TNF-Familie gehören drei Gruppen: TNF- α (inzwischen wieder nur TNF bezeichnet), TNF- β (Lymphotoxin- α : LT- α) und Lymphotoxin- β (LT- β) (Meager 1998; McDevitt et al. 2002). TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen und LT- α sowie LT- β von Lymphozyten produziert. Bei dem von Carswell et al. entdeckten Cytokin handelt es sich um TNF- α .

TNF- α ist einer der stärksten entzündungsfördernden Cytokine, der zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Immunreaktion gebildet wird. Er wird vorwiegend von aktivierten Makrophagen synthetisiert. Die Aktivierung der Zellen kann z.B. durch Erreger-Bestandteile (wie LPS) induziert werden. TNF- α induziert Makrophagen zur Produktion von IL-1, IL-6, PAF und ROS. Auch in PMNs induziert TNF- α die Synthese von ROS sowie die Degranulation und erhöht die Phagozytose-Fähigkeit sowie die antikörperabhängige zellvermittelte Cytotoxizität (ADCC). Darüber hinaus induziert TNF- α die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Granulozyten, wodurch die Anlagerung von Granulozyten an die Gefäßwand und deren Extravasation gefördert wird.

Eine weitere wichtige Rolle spielt TNF- α bei der Blutgerinnung. Es inhibiert die Synthese vom Plasminogen Aktivator (PA); gleichzeitig induziert TNF- α die Expression vom PA-Inhibitor. PA induziert die Bildung der Protease Plasmin aus dem Proenzym Plasminogen. Plasmin spaltet Fibrin und führt damit zur Rückbildung von Blutgerinnseln (Janeway et al. 2002). TNF- α spielt damit eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der Blutgerinnung. Wie bereits erwähnt, ist eine lokale Blutgerinnung, die kleine Blutgefäße verschließt, wichtig zum Unterbinden des Blutdurchflusses. Dies trägt wahrscheinlich zur Reduktion der Erregerdissemination bei.

Das aktive TNF- α Homotrimer bindet an den TNF-Rezeptor (TNFR)-1 (auch p55 genannt) oder TNFR-2 (p75), was zur Trimerisierung des Rezeptors führt (Abbildung 1.2.).

Unterschiedliche Signalkaskaden können durch die Bindung von TNF- α an seinen Rezeptor ausgelöst werden, die die Vermehrung (Überleben, Differenzierung), entzündliche Reaktionen (Abwehrmechanismen und -mediatoren gegen Erreger aktivieren) oder Zelltod (Apoptose, Nekrose) vermitteln (Abbildung 1.2.) (MacEwan et al. 2002).

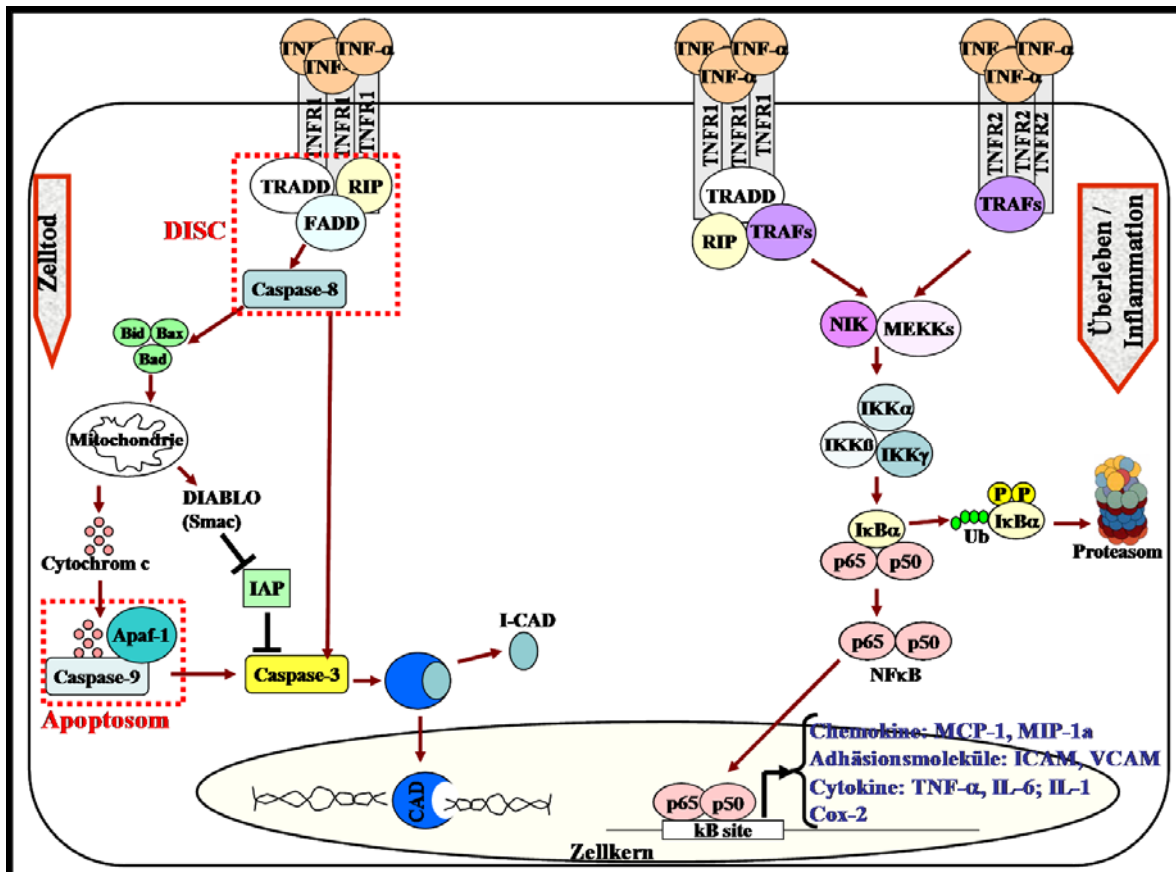


Abbildung 1.2. TNF-Signalkaskaden. Unterschiedliche Signalkaskaden können durch die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren (TNFR1 und TNFR2) ausgelöst werden. Über TNFR1 wird über direkte oder indirekte (Mitochondrien-abhängig) Aktivierung von Caspase-3 Apoptose induziert. Über TNFR1 und TNFR2 werden Signalwege initiiert, die u.a. zur NF κ B-Aktivierung, zur antiapoptotischen Aktivitäten, zur Differenzierung und Synthese inflammatorischer Faktoren führen.

1.4.4.3. Interleukine

Interleukine (IL) stellen eine wichtige Familie der Cytokine dar, die regulierende Funktionen für das Wachstum, die Differenzierung und Aktivierung von Zellen haben. Sie spielen eine wichtige Rolle bei immunologischen Reaktionen. Viele Interleukine benutzen gemeinsame Rezeptorkomponenten, wie IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 sowie IL-3 und IL-5. Dies erklärt

zum Teil ihre redundante Funktionalität. Auf einige Mitglieder der Interleukine, vor allem der entzündungsrelevanten, wird im Folgenden eingegangen.

Interleukin-1 (IL-1) ist ein multifunktionelles Protein, welches hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert wird. IL-1 wurde ursprünglich als endogenes Pyrogen beschrieben (Meager 1998). Es spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen. IL-1 α und IL-1 β haben eine costimulatorische Wirkung auf T-Zellen und verstärken die Reifung und Vermehrung der B-Zellen. Sie aktivieren auch Endothelzellen und Fibroblasten. IL-1 α und IL-1 β werden als inaktive Vorläuferproteine hergestellt, aus denen durch proteolitische Spaltung die aktiven Formen prozessiert und anschließend ausgeschüttet werden. Sie wirken auf die Zellen über ihre Bindung an den Rezeptor IL-1RI (CD121a). Ein weiterer Rezeptor für IL-1 ist der IL-1RII (CD121b). IL-1RII scheint aber nicht aktiv zu sein. Er ist eher eine Art Köder, der IL-1-Moleküle einfängt, um eine Überstimulierung über IL-1RI zu verhindern. Ein weiterer negativer Mechanismus wirkt über den Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra), der sich an IL-1RI bindet, ohne diesen zu aktivieren. IL-1ra blockiert somit den Zugang der Agonisten IL-1 α und IL-1 β .

Interleukin-2 (IL-2) ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor, der nur von aktivierten T-Zellen selber produziert wird. Die Bindung des T-Zell-Rezeptors an den MHC-Antigen-Komplex initiiert die Synthese verschiedener Transkriptionsfaktoren, wie NFAT, NF κ B und AP. NFAT (nuclear factor of activated T cells) ist ein wichtiger Transkriptionsaktivator von IL-2. Für die Stabilisierung der IL-2-mRNA, die letztlich zur Proteinsynthese führt, wird ein costimulierendes Signal benötigt; und zwar die Bindung von B7 (welches auf aktivierten APCs exprimiert wird) an den CD28-Rezeptor auf den T-Zellen. Bindung von IL-2 an den IL-2-Rezeptor (bestehend aus den Ketten IL-2R α , IL-2R β , IL-2R γ) bewirkt, dass die T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus eintritt. Außerdem induziert es die Produktion von IL-2 und der α -Kette des IL-2-Rezeptors (Janeway et al. 2002).

Interleukin-6 (IL-6) spielt, neben IL-1 und TNF- α , eine zentrale Rolle bei der Regulierung der angeborenen und adaptiven Immunantwort. IL-6 wird von Makrophagen, Neutrophilen, DCs, T-Zellen und Endothelzellen produziert. Es stimuliert PMNs zur Synthese von Elastase, PAF, und zur Sekretion von IL-1Ra. IL-6 begünstigt die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen und induziert ihre respiratorische Entladung. IL-6 stimuliert andere Makrophagen zu Produktion von MCP-1 und IL-1Ra und inhibiert die Produktion von IL-1 β , TNF- α und IL-12. Auf Endothelzellen induziert IL-6 die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (Naka et al. 2002; Kishimoto et al. 2005).

Der Rezeptor für IL-6 besteht aus dem heterodimeren Komplex gp130 (CD130) und gp80 (CD126 oder IL-6R). CD126 ist eine für IL-6 spezifische Kette (daher wird sie in der Literatur auch als IL-6R bezeichnet), während das membranständige CD130 auch von anderen Agonisten, wie LIF (leukemia inhibitory factor), CNTF (ciliary neurotrophic factor), OSM (oncostatin M), IL-11, CT-1 (cardiotropin-1) und BSF-3 (B cell-stimulating factor-3) verwendet wird. gp130 wird auf allen Zelltypen exprimiert, dagegen wird gp80 hauptsächlich auf Hepatozyten, PMNs, Monozyten/Makrophagen und einige Lymphozyten exprimiert. gp80 wird als membrangebundene oder lösliche Form exprimiert. Beide wirken aktivierend. Das lösliche gp80 (sIL-6R), welches in diversen Körperflüssigkeiten vorkommt, wird über zwei unabhängige Wege hergestellt. Entweder durch proteolytische Spaltung der membranständigen Form, oder durch alternatives Spleißen (Lust et al. 1992; Müllberg et al. 2000; Naka et al. 2002; Matthews et al. 2003; Kishimoto et al. 2005). IL-6 bindet sich zuerst an das membranständige gp80 oder an das sIL-6R. Anschließend assoziiert sich der Komplex aus IL-6/IL6-R bzw. IL-6/sIL-6R mit dem Signalvermittelnden gp130. Dies führt zur Rezeptor-Dimerisierung und Aktivierung der konstitutiv am gp130 assoziierten intrazellulären Janus-Kinasen (JAK1, JAK2, Tyk2). Die aktivierten Janus-Kinasen können Tyrosine von gp130 phosphorylieren. Die Rezeptor-Phosphorylierung ermöglicht nun kompetitiv sowohl STAT-Faktoren als auch der Phosphatase SHP2 (Src homology 2-containing tyrosine phosphatase), über ihre SH2-Domänen spezifisch an die verschiedenen Phosphotyrosine zu binden. Über SHP2 wird die Aktivierung von ERK/MAPK und PI3K Signalwege eingeleitet. Interessanterweise stimulieren sIL-6R zusammen mit IL-6 Zellen, die nur gp130 exprimieren. Dieser Prozess wird Trans-Signaling genannt (Taga et al. 1989; Mackiewicz et al. 1992; Rose-John et al. 2003). T-Zellen (Atreya et al. 2000; Becker et al. 2004), embryonale Stammzellen (Rose-John et al. 2002), hämatopoetische Stammzellen (Peters et al. 1997; Audet et al. 2001) und Endothelzellen (Romano et al. 1997), die nur gp130 exprimieren, reagieren auf IL-6 nur in Gegenwart von sIL-6R. Die Tatsache, dass die Wundheilung durch IL-6/sIL-6R induziert wird, spricht dafür, dass auch Keratinozyten dem Trans-Signaling-Prozess unterliegen (Wang et al. 2004). Der sIL-6R bzw. das Trans-Signaling spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von Leukozyten, ihrer Aktivierung und Apoptose (Jones SA, 2005). Die Inhibierung der IL-6/sIL-6R-Aktivität wird u.a. mittels einer löslichen Form von gp130 (sgp130) induziert. Sgp130 zirkuliert in relativ großen Mengen im menschlichen Serum (100-300 ng/ml) (Narazaki et al. 1993). Dieser natürlich vorkommende Antagonist bindet den IL-6/sIL-6R-Komplex, und verhindert damit seine Bindung an das membranständige gp130 (Narazaki et al. 1993).

IL-6 spielt eine wichtige Rolle beim Übergang der Neutrophilen- zu Monozyten/Makrophagen-Rekrutierung während der Entzündung (Kaplanski et al. 2003). Wie bereits erwähnt, sind PMNs die ersten Zellen, die an den Ort der Entzündung rekrutiert werden. Ihre starke respiratorische Entladung und Sekretion toxischer Stoffe macht sie nicht nur für die Erreger, sondern auch für den eigenen Körper schädlich. Ihre aggressive Aktivität sollte daher zeitlich begrenzt sein. Makrophagen spielen nicht nur bei der angeborenen Immunabwehr eine wichtige Rolle, sondern auch bei der Initiierung der adaptiven Immunantwort. Dafür müssen die PMNs eliminiert und die Makrophagen rekrutiert werden. IL-6 koordiniert beides: Es induziert einerseits Apoptose in PMNs (Afford et al. 1992) und andererseits die Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen. Die letztere Funktion wird erfüllt durch die Induktion der Expression von Chemokinen, wie MCP-1, und Adhäsionsmolekülen.

Interleukin-10 (IL-10) wirkt im Allgemeinen anti-inflammatorisch und dämpft die Wirkungen von z.B. TNF- α und IL-1 ein. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Inhibierung von pathologischen Immunantworten. In den nächsten Kapiteln wird auf IL-10 etwas ausführlich eingegangen.

1.5. Interleukin-10: Suppressor von pathologischen Immunantworten

Um die Entzündungsreaktion zu beenden und fehlgeleitete Immunreaktionen zu verhindern, muss eine ausgewogene Immuntoleranz hergestellt werden, die einerseits die Entzündungsreaktion gegen Erreger zeitlich und örtlich eingrenzt, und andererseits eine Immunreaktion gegen körpereigene Antigene oder gegen Allergene (z.B. Pollen) verhindert. Die Suppression der Immunantwort ist dementsprechend genau so wichtig wie ihre Aktivierung.

Der Körper verfügt über mehrere Mechanismen und Faktoren, um die Immunreaktion zu dämpfen. Dazu gehören, IFN- α , IFN- β , IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13, G-CSF, c-AMP, PGE₂, Transforming Growth Faktor (TGF)- β , sTNFR1 (Soluble TNF receptor p55), sTNFR2 (Soluble TNF receptor p75), sIL-1RII (Soluble IL-1 receptor type 2), mIL-1RII (Membrane-bound IL-1 receptor type 2) und IL-18BP (IL-18 binding protein) (Opal et al. 2000; Serhan 2007).

IL-10 spielt eine zentrale Rolle bei der Deaktivierung mehrerer entzündungsvermittelnder Signalwege und der Dämpfung bzw. Inhibierung der Aktivität vieler Immunzellen ein. Seine immunsuppressive Schlüsselrolle zeigt sich u.a. beim LPS-induzierten septischen Schock. Die

Vorbehandlung von Mäusen mit rekombinanten IL-10 führt zu deren Schutz bei letaler LPS-Gabe (Howard et al. 1993).

Es ist allgemein anerkannt, dass IL-10 eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Autoimmunerkrankungen, chronischen inflammatorischen Krankheiten, Krebs und Allergien spielt.

Die starke Inflammation bei CED korreliert mit einer verminderten Sekretion von Interleukin-10 (IL-10) (Asadullah et al. 1999). IL-10 defiziente Mäuse entwickeln eine überschießende T-Helfer-1 (TH1)-Antwort und erkranken spontan an einer chronischen Enterocolitis, einer der Colitis ulcerosa beim Menschen ähnlichen Darmerkrankung, und stellen damit ein wichtiges Versuchsmodell für CED dar (Kühn et al. 1993).

Die Rolle von IL-10 beschränkt sich nicht nur auf das mukosale Immunsystem. IL-10-defiziente Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp (Wt)-Tieren wesentlich heftigere Reaktionen auf Kontaktallergene und unterstreichen damit die Rolle von IL-10 bei der Regulation von allergischen Immunantworten (Berg et al. 1995). In mehreren Tierversuchen konnte ein Zusammenhang zwischen IL-10-Induktion und Genesung von Allergien gezeigt werden (Kearley et al. 2005; Zemann et al. 2003).

Interessanterweise zeigen Menschen, die mit bestimmten Würmerarten (wie *Schistosoma haematobium*) infiziert sind, eine verminderte Anfälligkeit für allergische Erkrankungen. Es konnte gezeigt werden, dass diese „Allergieresistenz“ einer Induktion der IL-10-Produktion durch Nematoden zugrunde liegt (van den Biggelaar et al. 2000).

Bei Autoimmunkrankheiten spielt IL-10 eine Doppelrolle. Bei zellulärbasierenden Autoimmunkrankheiten, wie z.B. multipler Sklerose (MS), eine häufige neurologisch entzündliche Erkrankung des jungen Erwachsenenalters, inhibiert IL-10 die Überproduktion von inflammatorischen Zytokinen und unterdrückt damit die Autoimmunantwort (Beebe et al. 2002). Bei humoral (Antikörper)-basierenden Autoimmunkrankheiten wird ein anderes Konzept diskutiert. Bei der systemischen Autoimmunkrankheit Systemischer Lupus Erythematodes (SLE) mit Symptomen wie Gelenkschmerzen, Müdigkeit, Leistungsschwäche, Hautveränderungen, Nierenentzündungen etc, spielt die Bildung von Autoantikörpern eine wichtige Rolle (Beebe et al. 2002). Diese greifen unterschiedliche Organe an und verursachen die erwähnten Symptome. Da IL-10 zwar inhibierend auf die meisten Immunzellen, wie Makrophagen, dendritische Zellen und T-Zellen, jedoch aktivierend auf B-Zellen und damit auf die Antikörper-Bildung wirkt, begünstigt in diesem Fall IL-10 eher die Entstehung solcher humoral-basierenden Autoimmunkrankheiten. IL-10 wird bei SLE-Patienten in starken

Mengen von B-Zellen und Monozyten produziert, was zu abnormalen Produktion von Antikörpern führt (Llorente et al. 1993, 1994, 1995 und 1997; Richaud-Patin et al. 1995).

Mausversuche bestätigen den Zusammenhang zwischen IL-10 und Autoimmunkrankheiten. IL-10-Gabe inhibiert das Fortschreiten von Collagen-induzierter Arthritis in Mäusen (Walmsley et al. 1996; Quattrocchi et al. 2001). Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell, welches unterschiedliche Facetten der MS-Pathologie widerspiegelt. Versuche mit diesem Mausmodell zeigen, dass die Produktion von IL-10 durch B-Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Autoimmunität spielt (Fillatreau et al. 2002). In Mäusen mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID), die infolgedessen keine Antikörper produzieren können, konnte man durch die Injektion von zuvor aus SLE-Patienten isolierten Lymphozyten und Monozyten die Rolle von diesen Autoantikörpern und IL-10 *in vivo* testen. Die Neutralisierung von IL-10 durch Behandlung der SCID-Mäuse mit IL-10-Antikörpern führte zur starken Reduktion der Autoantikörper-Bildung (Llorente BL, et al. 1995).

IL-10 spielt eine wichtige Rolle auch bei Tumoren. In der Regel ist das Immunsystem in der Lage Tumorzellen zu erkennen und zu eliminieren. Tumore können jedoch u.a. durch die Überexpression von IL-10 eine Mikroumgebung schaffen, die - wie vermutet wird - eine effiziente Antitumor-Immunantwort supprimiert (Asadullah et al. 2003). Interessanterweise zeigen aktuelle Studien jedoch, dass IL-10 Expression eher eine Tumorabstoßung begünstigt (Mocellin et al. 2005). In jedem Fall scheint IL-10 eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Abwehrmechanismen gegen Krebs zu spielen.

1.6. Biologische Eigenschaften von Interleukin-10

1.6.1. Expression und Signalweg von IL-10

Interleukin-10 wurde erstmals 1989 als ein Faktor entdeckt, der von Maus T_H2-Zellen produziert wird und die Cytokinproduktion von T_H1-Zellen inhibiert, beschrieben. Aufgrund dieser Wirkung wurde es als *cytokine synthesis inhibiting factor* (CSIF) bezeichnet (Fiorentino et al. 1989). Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass nicht nur T_H2-Zellen, sondern weitere unterschiedliche Zelltypen, wie Makrophagen, DCs, Mastzellen, T_H1-Zellen, B-Zellen etc., IL-10 produzieren können (Moore et al. 2001).

Das IL-10 Gen ist bei Maus (m) und Mensch (h), auf dem Chromosom 1 lokalisiert und wird von 5 Exons kodiert (Kim et al., 1992) (Abbildung 1.3.).

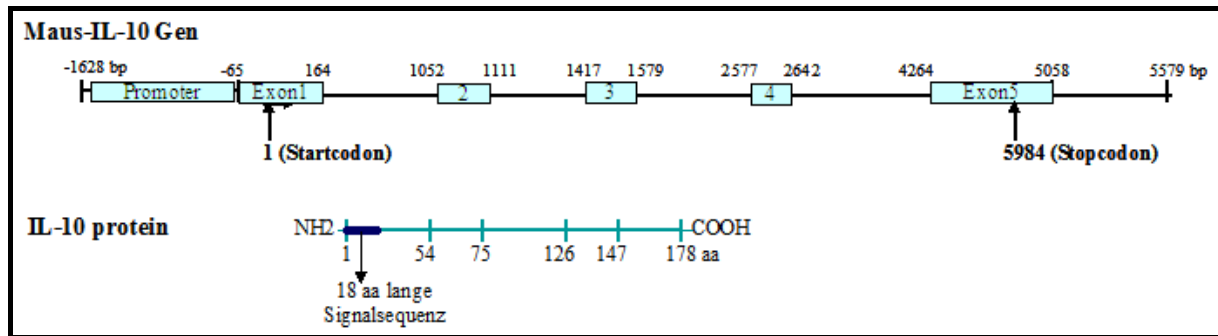


Abbildung 1.3. Organisation des Maus-IL-10-Gens und -Proteins (nach Kim et al. 1992). Das IL-10-Gen besteht aus 5 Exons. Exon1 enthält die 5'-nichttranslatierbare Region (UTR), eine codierende Sequenz für die ersten N-terminalen 54 Aminosäuren (aa), welche die Sekretions-Signalsequenz enthält. Die codierenden Bereiche der Exons sind durch Angabe der Nukleotid-Positionen dargestellt. Das IL-10-Protein besteht aus 178 aa, wobei die ersten 18 aa als Signalsequenz für die Sekretion des Proteins dienen und später abgespalten werden. Die Aminosäure-Positionen geben die Sequenzabschnitte, die von den jeweiligen Exons kodiert werden.

Das offene Leseraster von IL-10 kodiert für ein 178 Aminosäuren (aa) großes Vorläuferprotein. Das reife IL-10, das schließlich ausgeschüttet wird, ist 160 aa lang. Im Gegenteil zu mIL-10, ist hIL-10 nicht glykosyliert. Ferner ist hIL-10 aktiv für Maus- und humane Zellen, während mIL-10 nur für Mauszellen aktiv ist (Moore et al. 2001). mIL-10 und hIL-10 sind zu 73% identisch. IL-10 weist eine helikale Struktur auf (Zdanov et al., 1995 und 1996), ähnlich der Struktur von Interferonen.

Die Induktion der IL-10-Expression erfolgt u.a. über die Aktivierung der NF- κ B- und MAPK-Signalwege (ERK, JNK und p38). Dabei werden die Transkriptionsfaktoren Sp1 und EBP δ aktiviert, welche an den IL-10-Promoter binden (Ma et al. 2001; Liu et al. 2006). STAT3, das u.a. über den p38 MAPK-Signalweg aktiviert wird, kann auch durch Bindung am 5'-flankierenden Bereich des IL-10-Promoters die IL-10-Expression induzieren (Benkhart et al. 2000). Weiterhin induziert auch der cAMP-abhängige Signalweg die IL-10-Expression, mittels Aktivierung der Transkriptionsfaktoren CREB/ATF (*cAMP-responsive element binding protein/activating transcription factor*) und C/EBP (*CCAAT/enhancer-binding proteins*), durch Bindung an den IL-10-Promoter (Platzer et al. 2000; Brenner et al. 2003).

Das aktive IL-10 wirkt als Homodimer (Zdanov et al., 1995; Vieira et al., 1991; Moore et al., 1990) und bindet spezifisch an den heterodimeren Transmembranrezeptor IL-10R α / IL-10R β (auch IL-10R1 und -2 genannt) besteht (Liu et al. 1994) (Abbildung 1.4.). Beide Ketten sind essentiell für die IL-10-Signalvermittlung. Die IL-10R1-Kette ist ein 90-110 kDa großes Polypeptid (abhängig vom N-Glykosylierungszustand), das hauptsächlich für die hochaffine Ligandenbindung verantwortlich und mit der Kinase JAK1 assoziiert ist (Finbloom et al. 1995). Die IL-10R2-Kette ist ein 30-50 kDa großes Polypeptid (abhängig vom N-Glykosylierungszustand), das eine essentielle Rolle bei der Signalweiterleitung spielt und mit

der Kinase Tyk2 assoziiert ist (Gibbs et al. 1997; Kotenko et al. 1997). Im Gegensatz zu der IL-10R2-Kette, die in allen Immunzellen konstitutiv exprimiert wird, ist die Expression von IL-10R1 induzierbar (Liu et al. 1994; Ding et al. 2001).

Die Bindung von IL-10 an IL-10R1 führt zur Rezeptor-Dimerisierung mit der IL-10R2-Kette. Dies führt zur Zusammenlagerung der rezeptorassoziierten Januskinasen. Dadurch können sich JAK auto- bzw. transphosphorylieren (Gauzzi et al. 1996). Die aktivierten JAKs, phosphorylieren ihrerseits zwei Tyrosinreste (Y446 und Y496) in der intrazellulären Domäne von IL-10R1 (Weber-Nordt et al 1996; Donnelly et al. 1999). Der phosphorylierte Rezeptor wird vom Transkriptionsfaktor STAT3 mittels seiner SH2-Domäne erkannt und gebunden (Finbloom et al. 1995; Haan et al. 1999; Wiederkehr-Adam et al. 2003).

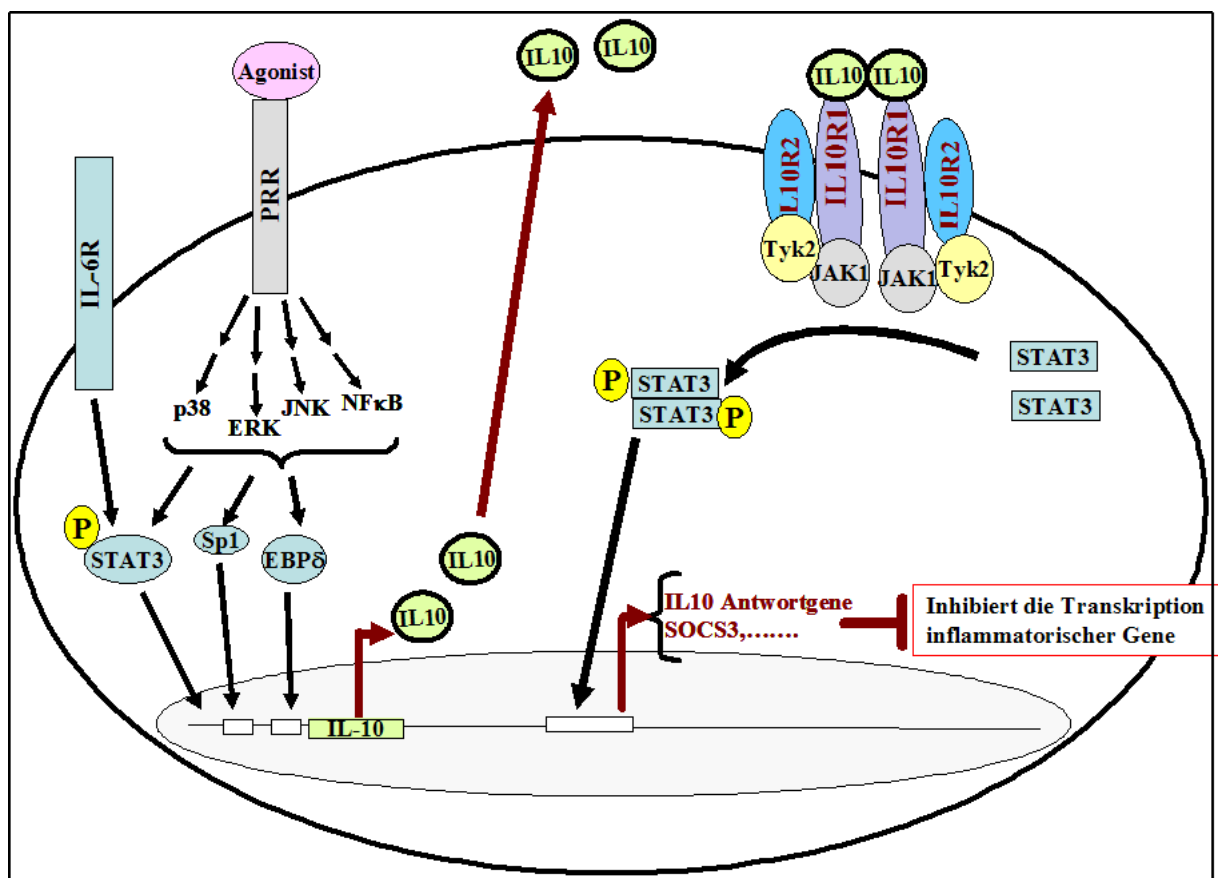


Abbildung 1.4. IL-10-Signalweg. IL-10-Expression wird u.a. über aktivierte MAPK- und NFκB-Signalwege induziert. Hier sind nur einige Transkriptionsfaktoren für IL-10 gezeigt. STAT3, welches über MAPK-, IL-6- oder IL-10-Signalwege aktiviert wird, trägt auch durch Bindung an den 5'-flankierenden Bereich des IL-10-Promoters zur IL-10-Expression bei. Das IL-10-Homodimer bindet an die IL-10R1-Kette und ermöglicht anschließend die Bindung an die IL-10R2-Kette. Die rezeptorassoziierten Januskinasen aktivieren sich gegenseitig und anschließend die IL-10R1-Kette durch Phosphorylierung. Der phosphorylierte Rezeptor wird von STAT3 gebunden und von JAK1 phosphoryliert. Daraufhin löst sich STAT3 vom Rezeptor, bildet u.a. Homodimere und wandert in den Zellkern, wo er an spezifische Elemente im Promotor bindet, und die Transkription von Genen (wie SOCS3) bewirkt.

STAT-Transkriptionsfaktoren sind latent im Zytoplasma vorhanden und werden u.a. durch Cytokinrezeptor-assoziierte Kinasen aktiviert. STAT3 bindet an die zwei phosphorylierten

Tyrosinreste der IL-10R α -Kette, wobei auch ein Serinrest am Carboxy-Ende des Rezeptors an der Bindung beteiligt ist (Weber-Nordt et al. 1996; Riley et al. 1999). Anschließend phosphoryliert JAK den Tyrosinrest 705 von STAT3, was zu dessen Dissoziation vom Rezeptor führt (Sasse et al. 1997; Schaefer et al. 1997). Daraufhin bilden die phosphorylierten STAT3-Moleküle Homodimere (sie können auch Heterodimere bilden, z.B. mit STAT1). STAT3-Dimere wandern in den Zellkern und binden an STAT3-bindende Elemente von Promotoren und aktivieren die Transkription von Genen, die die IL-10-Wirkung vermitteln (Horvath et al. 1995; Xu et al. 1996; Ehret et al. 2001). Einer der wichtigsten IL-10-induzierbaren Faktoren, der die immunsuppressive Funktion von IL-10 vermittelt kann, ist SOCS3 (*Suppressor of Cytokine Signaling*). Durch die Bindung an die zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren von Cytokinen wie IL-6- und IFN- γ unterbindet SOCS3 die Signalweiterleitung. Über den gleichen Mechanismus kann SOCS3 auch den Signalweg von IL-10 inhibieren (Ito et al. 1999; Lang et al. 2003; Berlato et al. 2002).

Neben STAT3 vermittelt IL-10 die Phosphorylierung und Aktivierung auch von STAT1 und STAT5 (Finbloom et al. 1995; Wehinger et al. 1996). Allerdings scheinen STAT1 und STAT5 nicht direkt auf den IL-10/IL-10R-Komplex zu wirken (Weber-Nordt et al. 1996). Die biologischen Effekte von STAT1 und STAT5 sind noch nicht klar. Die Überexpression von dominant negativen STAT1 oder STAT5 führt nicht zur Inhibierung des IL-10-Effekts in Makrophagen (O'Farrell et al. 1998) und STAT1-defiziente Makrophagen reagieren weiterhin auf IL-10 (Meraz et al. 1996).

IL-10 wirkt inhibierend auf diverse inflammatorische Faktoren. So induziert IL-10 den schnellen Abbau der TNF- α -mRNA mittels Inhibierung der Aktivierung von p38 MAP Kinase und der Expression von HuR (Rajasingh et al. 2006). Darüber hinaus inhibiert IL-10 NF- κ B-Aktivierung in Monozyten und Makrophagen (Schottelius et al. 1999; Clarke et al. 1998).

1.6.2. Effekte von IL-10 auf die Immunzellen

In Monozyten und Makrophagen hemmt IL-10 die Synthese von proinflammatorischen Cytokinen, wie IL-6, IL-12, IL-1 α , IL-1 β und TNF- α (Fiorentino et al. 1991; De Waal Malefyt et al. 1991a) und die Expression von MHC-II und der costimulatorischen Molekülen CD86 und CD80 (De Waal Malefyt et al. 1991b; Willems et al. 1994). Dies führt indirekt zur verminderten Aktivierung von T-Zellen. Weiterhin inhibiert IL-10 die Expression verschiedener Chemokine, wie MCP1, MIP, IL-8, IP-10 und KC (Marfaing-Koka et al. 1996; Kopydlowski et al. 1999; Rossi et al. 1997; Berkman et al. 1995) und des IL-1-Rezeptors (IL-

1RI und IL-1RII) (Jenkins et al. 1994; Dickensheets et al. 1997a). Auch auf Mastzellen wirkt IL-10 inhibierend. Es hemmt ihre Degranulierung (Bundoc et al. 2007).

Der antiinflammatorische Effekt von IL-10 wird durch die Induktion der natürlichen Antagonisten für diverse entzündungsvermittelnde Faktoren gesteigert. IL-10 induziert u.a. die Expression von IL-1Ra, sTNFR1 und sTNFR2 (Hart et al. 1996; Joyce et al. 1996; Linderholm et al. 1996; Dickensheets et al. 1997b).

Die Behandlung von Monozyten mit GM-CSF und IL-4, in Anwesenheit von IL-10, führt nicht wie üblich zu deren Ausdifferenzierung zu DCs sondern zu Makrophagen (Allavena et al. 1998). DCs sind hoch effiziente APCs. Die Reduktion ihrer Entstehung führt indirekt zur Inhibierung der T-Zell-Aktivierung.

IL-10 kann auch direkt auf T-Zellen inhibierend wirken. Es hemmt die Transkription von IL-2 (der notwendige T-Zell-Wachstumsfaktor) und den CD28-Signalweg (Taga et al. 1993; Schandene et al. 1994; Akdis et al. 2000). Ferner können sich in Anwesenheit von IL-10 aus aktivierenden T-Zellen regulatorische T-Zellen entwickeln. Regulatorische T-Zellen inhibieren andere T-Zellen über Zell-Zell-Kontakt oder über lösliche Faktoren (Read et al. 2001). Interessanterweise wirkt IL-10 auf B-Zellen stimulierend. Es steigert deren Differenzierung und Vermehrung. Außerdem induziert IL-10 die Expression von MHC-II auf B-Zellen und deren Produktion von Antikörpern (Rousset et al. 1992; Burdin et al. 1995).

1.6.3. IL-10 und Krankheitserreger

Diverse Krankheitserreger scheinen die immunsuppressive Funktion von IL-10 zu ihren Gunsten zu nutzen, indem sie dessen Expression induzieren, um die Evasion des Wirtsimmunsystems zu bewirken. *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocytogenes*, HIV-1, Rhinovirus, Respiratory syncytial virus (RSV) und *Yersinia enterocolitica* sind nur einige Beispiele solcher Erreger, die während ihrer Infektion eine starke IL-10-Expression induzieren können (Redpath et al. 2001, Sing et al. 2002a,b). In Übereinstimmung hiermit zeigen IL-10-defiziente Mäuse höhere Erregerresistenz (z.B. Sewnath et al 2001, Sing et al. 2002a).

Interessanterweise verfügen einige Viren über ein eigenes homologes IL-10-Gen. Das vom BCRF-Gen kodierte ebvIL-10 des Epstein–Barr-Virus wird in der späten Phase des lytischen Zyklus produziert. ebvIL-10 induziert das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen. Damit schaffen EB-Viren sich neue Zielzellen für neu synthetisierte Virionen (Hsu et al. 1990). Weitere virale homologe IL-10-Gene wurden auch bei Cytomegalovirus (cmvIL-10),

Equine Herpesvirus-2, Parapoxvirus, Herpesvirus Saimiri und andere der Herpesviren-Familie von Primaten entdeckt (Kotenko et al. 2000; Fleming et al. 1997; Rode et al. 1993; Knappe et al. 2000; Lockridge et al. 2000).

Zellkultur-Experimente und Mausversuche zeigen, dass die Neutralisierung von IL-10 durch den Einsatz von Anti-IL-10 monoklonalen Antikörpern zur Einschränkung der Immunmodulation durch die Erreger führt und diese effizienter eliminiert werden können (z.B. van der Sluijs et al. 2004, Sing et al. 2002a).

1.6.4. Therapiemöglichkeiten mit IL-10

Mehrere Strategien zur Verabreichung von IL-10 zwecks Behandlung von z.B. chronisch entzündlichen Krankheiten, Autoimmunkrankheiten, Transplantatabstoßung etc. werden eingesetzt bzw. getestet. (i) Rekombinant hergestelltes IL-10; (ii) Genetisch veränderte Bakterien, die IL-10 produzieren und absondern; (iii) IL-10 enthaltende Gelatine-Mikropartikel als Depotpräparat; (iv) genetisch veränderte Adenoviren bzw. adenovirale Vektoren, die IL-10 exprimieren; und (v) Wirkstoffe, die die endogene Expression von IL-10 stimulieren (Asadullah et al. 2003; Zhou X, et al. 2005).

Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, Sepsis und Hauterkrankungen wie psoriatische Arthritis wurden zuerst IL-10 als Therapeutikum eingesetzt. Die systemische Gabe von Interleukin-10 bei Patienten z.B. mit Morbus Crohn zeigt jedoch nur geringe positive Effekte. Außerdem treten eine Reihe von unerwünschten Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Fieber und Blutarmut auf (Madsen K, 2002). Man geht inzwischen davon aus, dass IL-10 schnell abgebaut wird, bevor es in der gewünschten Stelle wirken kann. Eine Möglichkeit zur lokalen Gabe von IL-10 im Darm könnte der Einsatz gentechnisch modifizierter, IL-10-erzeugende *Lactococcus lactis* Bakterien sein (Steidler et al. 2000). Klinische Studien zeigten jedoch auch hier bisher nicht den erwünschten Erfolg. Ein weiterer therapeutischer Ansatz, der aber sehr aufwendig ist, beruht darauf, den Patienten Immunzellen zu entnehmen, sie außerhalb des Körpers zu kultivieren und gentechnisch zu verändern, sodaß sie verstärkt IL-10 exprimieren. Diese „umprogrammierten“ Zellen können reinfusioniert (van Montfrans et al. 2002 a u. b).

Da die biologisch relevante IL-10-Ausschüttung und seine immunologische Wirkung von der zellulären und physiologischen Mikroumgebung abhängen, könnte der Einsatz von Wirkstoffen, die, je nach Krankheitsfall, spezifisch die endogene IL-10-Expression von pathophysiologisch relevanten Zellen stimulieren, praktischer und erfolgversprechender sein.

Viele solcher IL-10-induzierenden Stoffe werden bereits in der Medizin eingesetzt (u.a. zusammengefasst in: Zhou X, et al. 2005).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Vor diesem Hintergrund ist es notwendig, die entscheidenden pathophysiologisch relevanten Zelltypen für IL-10-Produktion herauszufinden (Abbildung 1.5.). Diese könnten dann Ziel spezifischer Modulationen werden, die, je nach Ziel der Therapie, zur verstärkten IL-10 Ausschüttung oder zur Inhibierung der IL-10 Sekretion so animiert werden könnten, dass die fehlgeleiteten Immunantworten korrigiert bzw. die Persistenzen von Infektion eliminiert werden können.

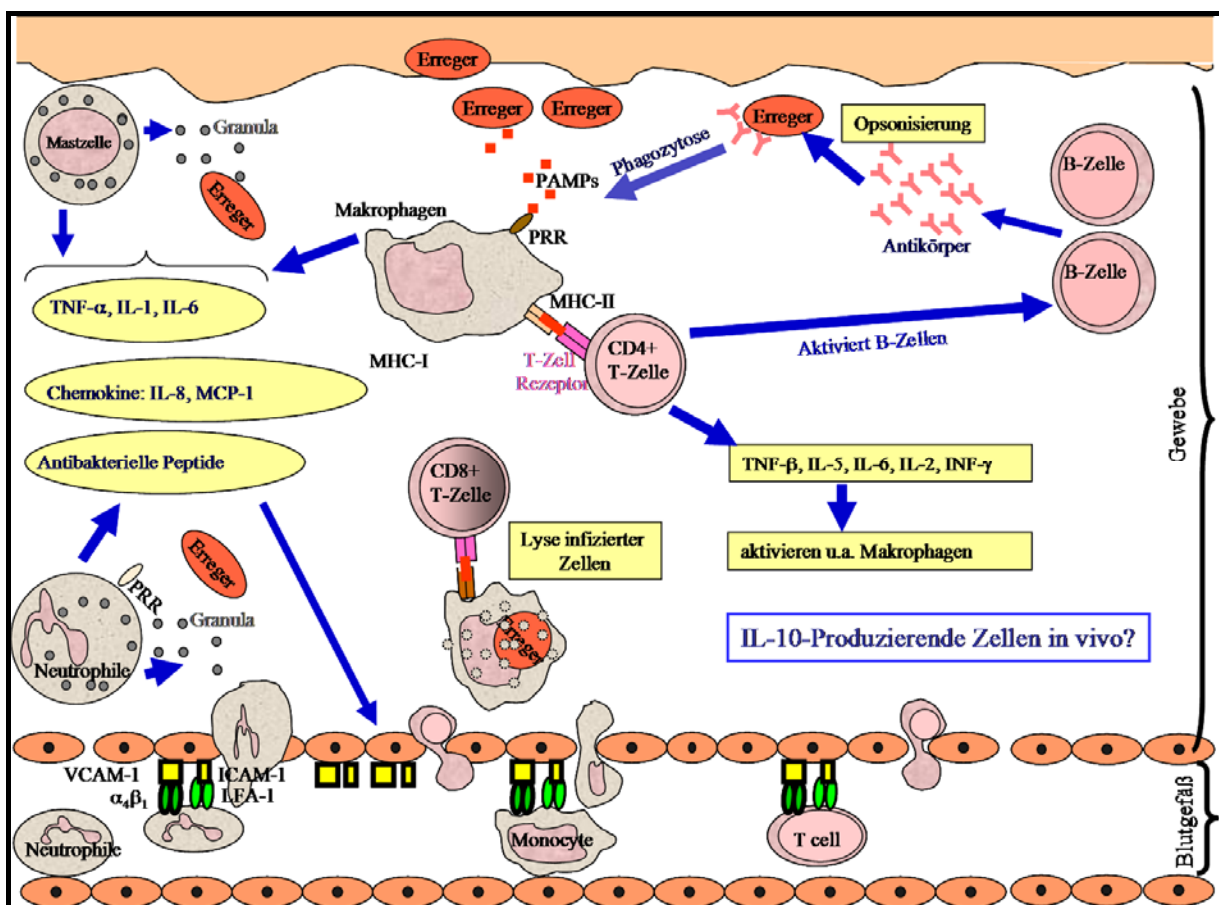


Abbildung 1.5. IL-10-produzierende Zellen in vivo während einer Immunantwort. Bei einer Entzündung werden unterschiedliche Immunzellen (Neutrophile, Makrophagen, DCs, B-Zellen, T-Zellen, etc.) in den Ort der Infektion rekrutiert. Sie produzieren, zusammen mit lokalen Gewebeständigen Zellen, u.a. inflammatorische Cytokine aus, die eine gegen die Erreger gerichtete Immunantwort einleiten. In der Regel wird diese Immunantwort zeitlich und örtlich begrenzt, um keine pathologische Effekte hervorzurufen. Diese Kontrolle der Immunantwort wird u.a. durch die Produktion von IL-10 bewerkstelligt. Die Identifizierung der IL-10-produzierenden Zellen *in vivo*, während einer Entzündung bzw. Immunantwort, ist daher von wichtiger Bedeutung, um die Regulationsmechanismen der Immunantwort auf zellulärer Ebene verstehen zu können.

Die schnelle Sekretion von IL-10 und seine kurze Halbwertszeit macht es jedoch schwierig, die IL-10-produzierenden Zellen *in vivo* zu bestimmen. Bei Reporterermäusen werden

Reportergene durch homologe Rekombination in den gewünschten Gen-Lokus eingeschleust und unter dem endogenen Promoter exprimiert. Dadurch kann die Expression des angesteuerten Gens in den einzelnen Zellen leichter detektiert werden.

Zu den Reportergenen, die bisher für Reporter-mäuse eingesetzt wurden, sind Luciferase (Luc), β -Galactosidase (LacZ) und Enhanced grün fluoreszierendes Protein (EGFP) (Maggi et al. 2004). Wobei EGFP, aufgrund seiner Autofluoreszenz und der Möglichkeit seine Expression in intakten Zellen zu detektieren, am häufigsten Anwendung findet. Beispielsweise wurden EGFP-Reporter-mäuse für IL-12/23p40, IL-2, IL-4 und CCL17 etabliert (Mohrs M et al. 2001; Im W et al. 2005; Reinhardt et al. 2006; Mohrs K et al. 2005; Naramura et al. 1998; Alferink et al. 2003). Dabei wurde EGFP anstelle vom angesteuerten Gens exprimiert oder wurde seine Expression an die vom endogenen Gen über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) gekoppelt (Abbildung 1.6.).

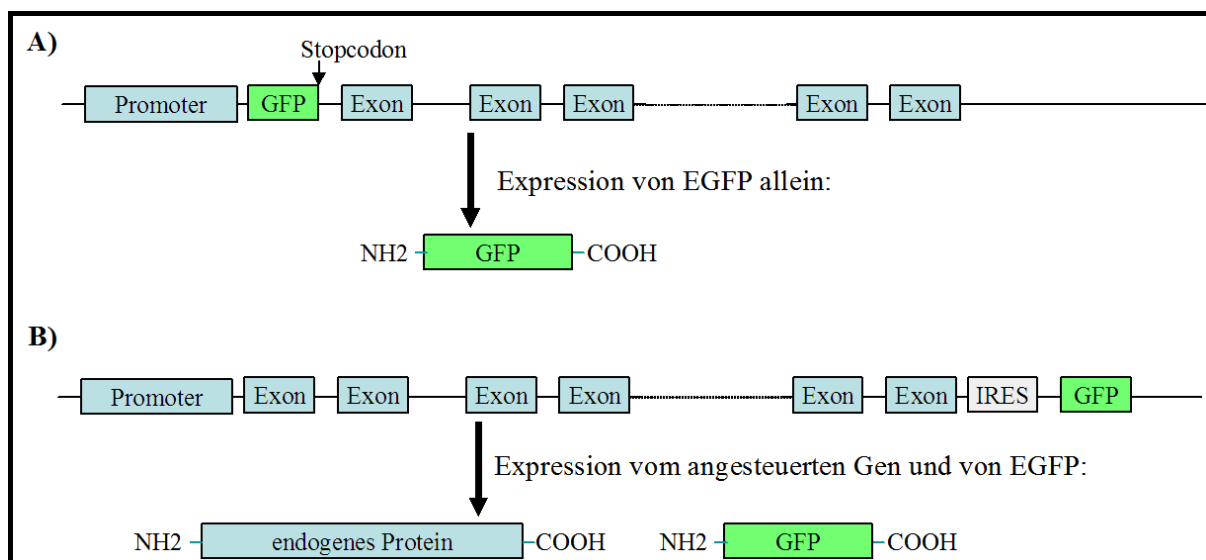


Abbildung 1.6. Integration einer EGFP-codierenden Sequenz in den gewünschten Gen-Lokus, erlaubt die Expression von EGFP unter den Promoter des angesteuerten Gens und die Visualisierung der exprimierenden Zellen. EGFP wird exprimiert, **(A)** bei gleichzeitiger Stilllegung der Expression des angesteuerten Gens, dessen Sequenz durch EGFP unterbrochen wird, Oder **(B)** über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) aus einer dicistronischen mRNA, wobei die Expression vom angesteuerten Gens beibehalten wird.

Das Anfangsziel dieser Arbeit war, in Anlehnung an bereits etablierten transgenen Mäusen eine IL10-EGFP-Reporter-maus, wie in Abbildung 1.6.A dargestellt ist, herzustellen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, fertige Reagenzien, Medien und Medienzusätze

Acrylamid/Bisacrylamid	National Diagnostics, Atlanta, USA
Agar	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf, Deutschland
Ampicillin-Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua bidest, DNase- frei	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Bacto-Hefeextrakt	MP Biomedicals Inc.
Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BHI (Brain Heart Infusion)-Medium	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg,
Borsäure	Merck Darmstadt, Deutschland
BSA (bovine serum albumine)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Calciumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Carbenicillin	Biomol, Hamburg, Deutschland
CCF2/4	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Chloroform	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt, Deutschland
D- Luciferin (Firefly Luciferin)	BIOMOL, Hamburg, Deutschland
DMSO	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DMEM (Dulbecco's modified eagle media)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Längenstandard (Ready Load™ 1 kb)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT (1,4- Dithio-DL- threitol)	Applichem, Darmstadt, Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FCS (fötale Kälberserum)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd 37 %	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Geneticin (G418)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	MP Biomedicals Inc.

HEPES	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
IL-2 rekombinant	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
Isoamylalkohol	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kanamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Agar	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
LB (Luria Bertani)-Medium	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LIF	Chemicon, Hampshire, UK
LPS	Quadrantech Diagnostics, England
Luminol (3-Aminophthalhydrazide)	Fluka (Sigma), Artikelnr.0925321
MDC (Monodansylcadaverin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
MEDM	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM NON- ESSENTIAL AMINOACID SOLUTION (100x)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Moviol 4-88	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge (36 %)	MERCK, Darmstadt, Deutschland
Nukleotide /Nukleotid-Mix	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
PBS	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
p-Cumarsäure (p-Coumaric acid)	Fluka, Artikelnr.28200
Penicillin-Streptomycin-Lösung (100X)	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phenollösung	Roth Diagnostics GmbH, Mannheim
Ponceau S-Konzentrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Probenecid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Proteose Peptone	Difco Laboratories, Detroit
RPMI	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure rauchend	MERCK, Darmstadt, Deutschland
SDS	Roth Diagnostics GmbH, Mannheim
Solution D (Probenecid)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Biomol, Hamburg, Deutschland
Trichloressigsäure	MERCK, Darmstadt, Deutschland
TritonX-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Tris	MP Biomedicals Inc.
Trypanblau (Benzaminblau)	SERVA, Heidelberg, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypton	MP Biomedicals Inc.
Tween20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Zymosan A	Molecular Probes, Europe BV, Holland

2.1.2. Radiochemikalien

$\alpha^{32}\text{P}$ –dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
-----------------------------	---------------------------------

2.1.3. Enzyme, Gewichts- und Längenstandards

Bench Mark Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Leiter für Agarosegele	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Klenow-Fragment	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Pfu-Polymerase	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Pre-stained Molekulargewichtsmarker	Invitrogen
Proteinase K	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Shrimp alkaline phosphatase	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland

2.1.4. Plasmide

pBluescript-II-KS	Stratagene
pEasyFlox	zur Verfügung vom Institut für Genetik Uni-Köln
pBluescript-frt-Neo-frt-loxP	zur Verfügung vom MPI-Martinsried, AG. Fässler
pBluescript-frt-Neo-frt	in dieser Arbeit durch Klonierung von frt-Neo-frt in pBluescript hergestellt.
pEGFP-1	BD Biosciences Clontech
pIRES2-EGFP	BD Biosciences Clontech
pGL3-basic	Promega
pBR322	Bolivar et al. 1977
pTZ18R10	zur Verfügung gestellt von Prof. Werner Müller
pIC-Cre	Gu, H. et al., 1993

2.1.5. Primer

Die Primer wurden von Metabion international AG, Martinsried, synthetisiert.

F steht für Forward (vorwärts) Primer

B steht für Backward (Rückwärts) Primer

Die eingebauten Schnittstellen sind im Namen des Primers angegeben und in der Oligonukleotidsequenz fett geschrieben. Falls Zwei Schnittstellen vorhanden waren, so wurde die zweite rot geschrieben.

Primer zur Genotypisierung der Mäuse:

IL10-2630F:	GCCAGGAAGGCCCCACTGAGC
IL10-3125B:	TGGAAATAGGGGAGGAGCAGCA
IL10-3126B:	GCTGGAAATAGGGGAGGAGCAGC-3'
IL10-6775F:	GCTGGGAGAAGGTATAGGAGAAACAGGGG
IL10-7150B:	GCTAAGATCCCTGGATCAGATTTAGAGAGCTCTG
IL10-6800F:	CAGGGGAAGGCACGGCC
EGFP1-80B:	CGCCGGACACGCTGAACTTG
EGFP1-230B:	CGGGGTAGCGGCTGAAGCAC
EGFP1-336F:	CCCGCGCCGAGGTGAAG
EGFP1-350-F:	CACCCTCGTGACCACCCTGA
EGFP1-350-B:	TGCCGTCCTCGATGTTGTGG
EGFP1-410-F:	AGCTGTTACCCGGGTGGTG
EGFP1-410-B:	CTCCAGCTTGTGCCCCAGGA
EGFP1-665-F:	GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGG-3'
pIRES2-786B:	CCGGGCCCTCACATTGCC
pIRES2-1020F:	GTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG
Bla-80B:	CTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCC
Bla-555F:	GACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGG

Primer zur Klonierung der Targeting-Konstrukte

Die eingebauten Schnittstellen sind im Namen des Primers angegeben und in der Oligonukleotidsequenz fett geschrieben. Falls Zwei Schnittstellen vorhanden waren, so wurde die zweite rot geschrieben.

IL10-E1- <i>SalI</i> -F:	CCG CGTCGAC ATGCCTGGCTCAGCACTGCTATG CTGCC
--------------------------	---

IL10-6320- <i>Xho</i> I-B:	CCGCCTCGAGGCTTCAATTGCTTCCCAAGGAAG AACCC
IL10-6320- <i>Hind</i> III-B:	GAATAGAAGCTTCAATTGCTTCCCAAGGAAGAACC
IL10-2,7kb-5'- <i>Sac</i> II-F:	CGCCC GC GGC AC GACTTCTGGACTGACTCAGGCC
IL10-3598- <i>Bam</i> HI-B:	CGCGGATCCAGTTGTTTTTAAAACTTCTGACTG
IL10-3599- <i>Bam</i> HI-F:	CGCGGATCCCAAGAGGAAGGACTTTG
IL10E5- <i>Bam</i> H- <i>Eco</i> RV-B:	CGCGGATCC GATATC GGTGTTTTAGCTTTTCATTTTGA TCATC
EGFP1- <i>Sac</i> II-F:	CGCCC GC GGCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGG CGAGG (mit Kozak consensus translation initiation site)
EGFP1- <i>Pvu</i> I-B:	CGCCGATCGCCACAACCTAGAATGCAGTG
IL10-2,7kb-5'- <i>Sac</i> II-F:	CGCCC GC GGC AC GACTTCTGGACTGACTCAGGCC
IL10-E1- <i>Sac</i> II-B:	ATACCGCGGGATGGAGCTCTCTTTTCTGCAAGGCTGC
IRES2-EGFP- <i>Sal</i> I-F:	GCGCGT CGAC GGGATCCGCCCTCTCCCTCC
IRES2-EGFP- <i>Sal</i> I-B:	ATACG TCGAC CTTACAATTTACGCCTTAAGATACATT GATG
LpNeoLp- <i>Afl</i> II-F:	CGCCTTAAGCATAGCGGCCGCGGATCCAT
LpNeoLp- <i>Not</i> I-F:	CGCGCGGCCGCCATAGCGGCCGCGGATCCAT
LpNeoLp- <i>Afl</i> II-B:	CGCCTTAAGAGTTATGTCGACTCTAGATA
IL10-3' Arm- <i>Afl</i> II-F:	CGCCTTAAGTGCAGTGTGTATTGAGTCTGCTGGAC
IL10-3' -Arm2100- <i>Xho</i> I-B:	CGCCTCGAGGAAGAACCTCTGGGCTAGAGAGTTCAG
Lact- <i>Bst</i> XI-F:	CGCCCACAACCATGGGACACCCAGAAACGCTGGTGA AAG
Lact- <i>Not</i> I-B:	CGCGCGGCCGCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
IRES2- <i>Not</i> I-F:	CGCGCGGCCGCCCGCGGGCCCGGGATCCG
Lact- <i>Afl</i> II-B:	CGCCTTAAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
pBSupMCS- <i>Xho</i> I- <i>Asc</i> I:	CGCCTCGAG GGCGCGCC CGCGTAATACGACTCACT ATAGGGCG
pBSdownMCS- <i>Xho</i> I:	CCGGGCCCCCCCTCGAG

Primer zur Klonierung der polycistronischen IRES-EGFP/ β -Lactamase-Konstrukte

Die eingebauten Schnittstellen sind im Namen des Primers angegeben und in der Oligonukleotidsequenz fett geschrieben. Falls Zwei Schnittstellen vorhanden waren, so wurde die zweite rot geschrieben.

Luc- <i>Xho</i> I-F:	CGCCTCGAGATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG
Luc- <i>Eco</i> RI-B:	CGCGAATTCTTACACGGCGATCTTTCCGCCCTTC
IRES2- <i>Not</i> I-F:	CGCGCGGCCGCCCCGCGGGCCCCGGGATCCG
EGFP- <i>Eco</i> RV- <i>Not</i> IB:	CGCGCGGCCGCGATATCTTACTTGTACAGCTCG TCCATGCCGAG
IRES2- <i>Eco</i> RV-F:	CGCGATATCCCGCGGGCCCCGGGATCCG
IL10-7118- <i>Xba</i> IF:	GCGTCTAGAGTGCAGTGTGTATTGAGTCTGCTGG
IL10-832- <i>Afl</i> II-B:	GCGCTTAAGCCGAGCTCAACCCCTTCCTGGAG
Lact- <i>Bst</i> XI-F:	CGCCCACAACCATGGGACACCCAGAAACGCTGGTGA AAG
Lact- <i>Not</i> I-B:	CGCGCGGCCGCTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC
Lact- <i>Afl</i> II-B:	CGCCTTAAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC

Primer für cDNA-Analyse

IL-10-Primer: (Produktgröße: 418)

mIL10F-RT418: CTATGCTGCCTGCTCTTACTGACTGG

mIL10B-RT418: AATCACTCTTCACCTGCTCCACTGC

IL-10-Primer: (Produktgröße: 461)

mIL10-F-RT: GCACTGCTATGCTGCCTGCTCTTACTG

mIL10-B-RT: ATGGCCTTGTAGACACCTTGGTCTTGG

Luciferase-Primer: (Produktgröße: 441 bp)

Luc-Fneu: GGCGCTCCCCTCTCTAAGGA

Luc-Bneu: GGGGTGTTGGAGCAAGATGG

Humane (Hum) und Maus (m) HPRT-Primer: (Produktgröße ca. 850 bp)

HumHPRT-F: CAGCCCTGGCGTCGTGATTAGTGATG

HumHPRTB: GGGAAGCTGATAGTCTATAGGCTCATAGTGC

mHPRT-828F1: ATTAGCGATGATGAACCAGG

mHPRT-828B1: TGGCCTATAGGCTCATAGTG

weitere Primer, die beliebig kombiniert wurden:

IL10-Ex3-B: CGCCTCAGCCGCATCCTGAGGGTC

IL10-5'UTR: CCAAAGCCACAAGGCAGCCTTGC

EGFP1-410-F: AGCTGTTACCCGGGGTGGTG

EGFP1-410-B: CTCCAGCTTGTGCCCCAGGA

Sequenzierprimer:

Primer	Sequenziercodon
pBSvorMCS-F: GCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC	1
Seq-IL10-2592F: GGAGGAGGAGCCTGAATAAC	2
Seq-IL10-6891F: GGTCCTTCAGCTCCCAACAC	3
Seq-IL10-5782F: CCAAATCAGAACGAGCAGAAAGC	4
IL10-7181-F: CAGAGGTCCTGGGGTGAAC	5
IL10-10-B: ATGGACCCTCACTGCCCTCT	6
IL10-6221bp-F: TAACCTGTGTTTAAGCTGTTTCCATTGGGG	7
IL10-10-B: ATGGACCCTCACTGCCCTCT	8
IL10 (4531bp)-B: CTCAACACCTAGTGCCCTGTGC	9
IL10 (4532bp)-F: GAGAGTGACATAGGAAACAGAAAG	10
IL10-370F: GGAGAGAGTGAGCAACAACCTTGAAG	11
IL10-822F: CGGGAAGATATAAGAGGTGCTGC	12
IL10-1315F: GGGATGGAGGCAGCTTGTCCC	13
IL10-1960F: CAGGGCCATGGTAAGGTCTACC	14
IL10-2370F: GGGCCTCTGTACATAGAACAGC	15
IL10-2650F: GGGGGACCAAGAACAGGAGG	16
EGFP1-336F: CCCGCGCCGAGGTGAAG	17
EGFP1-675F: GGAGTTCGTGACCGCCGCCG	18
Neo-500B : GGCCCGGAGATGAGGAAGAGG	19
Neo-1000F : GCCGGTCTTGTCGATCAGGATG	20
IL10-2875B: CACCTGGCTGAAGGCAGTCCGC	21
IL10-2746F: GGCTCAGCACTGCTATGCTGC	22
IL10-3250F: CTCTAGATCTGGGGGACAGAGG	23
IL10-3886F: GGGACGGGACGGGAGGTGC	24
IL10-4460F: GCCTGTCCGGTGTCCGG	25
IL10-5026F: CAGGTGCCTTGGAGCTCTGAG	26
IL10-5626F: CAGGGCACTAGGTGTTGAGGAG	27
IL10-6186F: GCTTCCCTTGCTGACTCCTGG	28
IL10-6800F: CAGGGGAAGGCACGGCC	29
IL10-6960B: GGCCTTG TAGACACCTTGGTC	30
pBSnachMCS-B: GCGCGCAATTAACCCTCAC	31
IRES2-EGFP- <i>Sall</i> -B: ATACGTCGACCTTACAATTTACGCCTTAAG ATACATTGATG	32
frt-Neo-frt-495F: CGAAGGTCCTCCGGAGGCC	33
frt-Neo-frt-3'-576B: GCGCTGCGAATCGGGAGC	34
EGFP1-80B: CGCCGGACACGCTGAACTTG	35
EGFP1-410-B: CTCCAGCTTGTGCCCCAGGA	36
EGFP1-665-F: GGAGTTCGTGACCGCCGCCGGG-3	37
IL10-3'-Arm1140- <i>Xho</i> I-B: CGCCTCGAGGATCTAAGTTCACCCCAGGAC CTCTGG	38
pIRES2-433F: CCACCCATTGACGTCAATGGG	39
pIRES2-786B: CCGGGCCCTCACATTGCC	40
LucGL3-F: GGGCGCGGTCGGTAAAGTTG	41
IL10-UTR-3'-2100- <i>Xho</i> I-B: CGCCTCGAGGAAGAACCTCTGGGCTAGAG	42

	AGTTCAGG	
IL10-7460B:	GGACACCATAGCAAAGGGCCC	43
IL10-7860B:	CAACCCCTTCTGGAGAGGTTGC	44
IL10-8160F:	GAGTGTGTGCCGGCACCAG	45
IL10-8560F:	CCGCTGCCCAAGTACTGGG	46
Neo-1460F:	CCGGGACGCCGGCTGGATG	47
EGFP-200B:	GCACGCCGTAGGTCAGGGTG	48
mIL10B-RT418Neu:	AATCACTCTTCACCTGCTCCACTGC	49
pIRES2-1020F:	GTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTG	50
pIRES2-2175B:	GATGAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGC	51
IL10-6775F:	GCTGGGAGAAGGTATAGGAGAAACAGGGG	52
IL10-7150B:	GCTAAGATCCCTGGATCAGATTTAGAGAG CTCTG	53
Lact-NeuAflII-B:	CGCCTTAAGTTACCAATGCTTAATCAGT GAGGC	54
Lact-BstXI-F:	CGCCCACAACCATGGGACACCCAGAAACGCT GGTGAAAG	55
Seq-EGFP-N1-F:	GTCGTAACAACCTCCGCCCC	56
Seq-EGFP-N1-B:	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG	57
TurboGFPvorMitoF:	TCACGGGGATTTCCAAGTCTCC	58
Seq-UpYopM-B:	GTGTTACCCG ACCAAGATAA CCG	59
Seq-DownYopM-F:	CAGTCTGTTGAAATTACTGTGTCTGAG	60
IRES2-EGFP-Sall-B:	ATACGTCGACCTTACAATTTACGCCTTAAG ATACATTGATG	61
EndIRES2-F:	CCGAACCACGGGGACGTGG	62
IL10UTR-20F-XhoI:	CGCCTCGAGGCTCTTGCCTACCAAAGCCA CAAAGC	63
IL10-Ex3-B:	CGCCTCAGCCGCATCCTGAGGGTC	64

2.1.6. Bakterienstämme

Escherichia coli DH5 α

Genotype: Φ 80dlacZ Δ M15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rk-, mk+), supE44, relA1, deoR, Δ (lacZYA-argF) U169

Erläuterungen der Genotypsymbole findet man in Bachmann (1990 und 1983) und Sambrook J. et al. (1989).

E.coli-Stamm (ATCC 47045)

Yersinia enterocolitica, WAC-pYV: WAC komplementiert mit pYV Serovar O:8; klinisches Isolat, welches das Virulenz-plasmid pYVO:8 besitzt, NaIR (Heesemann und Laufs, 1983).

2.1.7. Zelllinien

HEK-293 Human embryonic kidney cells 293

2.1.8. Antikörper

Anti-GFP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Actin	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-GFP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HRP-konjugierter anti-Kaninichen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
FITC-konjugierter anti-Kaninichen IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FITC-konjugierter anti-Maus IgG	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PE-konjugierter Anti-B220 (CD45R)	BD, Heidelberg
PE-konjugierter Anti-CD4	BD, Heidelberg
FITC-konjugierter Anti-CD4	BD, Heidelberg
PE-konjugierter Anti-CD8a (Ly2)	BD, Heidelberg
FITC-konjugierter Anti-CD8a (Ly2)	BD, Heidelberg
PE-konjugierter Anti-Gr1 (Ly6G)	BD, Heidelberg
PE-konjugierter Anti-CD11c	BD, Heidelberg
Ratte Anti-Maus CD16/CD32	BD, Heidelberg
FITC-konjugierter Anti-NK-1.1	BD, Heidelberg
PE-Texas Red konjugierter F4-80	Caltag Laboratories

2.1.9. Kits

Plasmid Madi Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Gene JET Miniprep Kit (Fermentas)	MBI Fermentas, St Leon-Rot, Deutschland
QIAEX II Gel-Extraction-Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit	BD, Heidelberg
BD, Heidelberg	
BCA Protein Assay Kit	Pierce Bonn, Deutschland
JetPEI™	Polyplus transfection, Illkirch, Frankreich
Mouse Cytokin Flex Set (CBA)	BD, Heidelberg

2.1.10. Geräte

Brutschränke	BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
--------------	---------------------------------------

DNA-Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
FACScanto	BD Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop	Leitz DM RBE, Leica, Mannheim, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX-61, Olympus Deutschland, Hamburg
Geldokumentationssystem/ Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Luminometer Luminometer	READIT, BERTHOLD, Bad Wildbach, Deutschland
Protein-Elektrophoresekammer	BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Schüttelinkubatoren	Braun Biotech International, Osterode am Harz
Sterilwerkbänke	Heraeus, HS12, Hanau, Deutschland
Thermocycler	T3 Thermocycler, Biometra
Thermoschüttler	Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg
Transferapparatur Multiblot, C.	Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
UV- Schneidetisch	BACHHOFER, Reutlingen, Deutschland
UV-Transilluminator	BIO- RAD Laboratories, München, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland Sigma, 3K30, B. Braun Biotech International, Osterode Sigma, 1K15, B. Braun Biotech International, Osterode Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Deutschland Optima™ TL Ultracentrifuge, Beckman Coulter

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Herstellung transformations-kompetenter Bakterien

(Modifiziert nach Inoue et al. 1990)

200 ml LB-Medium, 50 mM MgCl₂ wurden mit den jeweiligen Bakterien beimpft und über Nacht bei 27°C unter Schütteln inkubiert. Nach Erreichung einer mittleren exponentiellen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0,45-0,6) (nach ca. 23h) wurde die Kultur für mindestens 10 min auf Eis inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Die Bakterien wurden bei 4500 g, 4°C für 8 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterien-Pellet in 65 ml kaltem Transformationspuffer (TB-Puffer) vorsichtig resuspendiert und ca. 10 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien nochmals bei 4°C und 4500 g für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterien-Pellet wurde vorsichtig in 10 ml (bei Startkultur von OD = 0,45) bzw. 16 ml (bei Startkultur von OD = 0,6) kaltem TB-Puffer resuspendiert. Darauf hin wurde DMSO zu einer Endkonzentration von 7% (0,7 ml DMSO/10 ml bzw. 1,12 ml DMSO/16 ml) zugegeben, die Kultur leicht durchmischt und 10 min auf Eis inkubiert. Aliquots von 200 µl oder 500 µl wurden in vorgekühlte autoklavierte Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff oder im Äthanol/Trockeneis schockgefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

TB-Puffer: (steril filtriert und bei 4°C gelagert).

10 mM Pipes

15 mM CaCl₂

250 mM KCl

pH auf 6,7 mit 1 M KOH eingestellt, dann Zugabe von:

55 mM MnCl₂ (Endkonzentration)

2.2.1.2. Transformation

Ein Aliquot kompetenter Bakterien wurde auf Eis aufgetaut und mit DNA (z.B. Ligationsansatz) vorsichtig gemischt. Dann folgten hintereinander Inkubation auf Eis für 10 bis 30 min, Hitzeschock bei 42°C für 40 bis 90 Sekunden und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes LB- oder SOC-Medium zugegeben und bei 30°C bis 37°C auf einen Überkopfröller für 30 min bis 1 Stunde inkubiert. Die Bakterien wurden bei 11300g für 30 s abzentrifugiert, der Überstand bis auf 200 µl abgenommen und

die Bakterien vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausplattiert und über Nacht bei 27°C oder 37°C inkubiert.

2.2.1.3. Lagerung der Bakterien

5 ml oder 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden 5 min. bei 3000-5000g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 2 ml 10 mM MgSO₄ (0,4 ml für die 1,5 ml Kultur) vorsichtig resuspendiert und 4 ml 80 % Glycerin (Glycerol) (bzw. 0,8 ml für die 1,5 ml Kultur) zugegeben. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt, in vorgekühlte autoklavierte Gefäße aliquotiert (je 1-1,5 ml) und bei -80°C gelagert.

2.2.1.4. Klonierung von DNA-Fragmenten

Vektoren wurden mit entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, so dass sie kompatible Enden zu der einzuklonierenden Passagier-DNA aufwiesen. Zur Vermeidung von Selbstligation der Vektorenden wurden die 5'-Phosphatgruppen durch Behandlung mit Shrimp alkalischer Phosphatase abgespalten (nach Protokoll des Herstellers, Fermentas).

Vektor und Insert wurden in einem Verhältnis von 1:5 bis 1:15 zusammengegeben, wobei maximal 100 ng Vektor-DNA bei 20 µl Volumen eingesetzt wurden. Es wurde die T4-DNA-Ligase (Fermentas) benutzt und der Ligationsansatz nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde bei RT für ca. 3h oder bei 16°C über Nacht (mindestens 16h) inkubiert. Anschließend wurde die Ligase durch Inkubation für 15 min bei 65°C inaktiviert und der Ligationsansatz zu kompetenten *E. coli* zweck Transformation gegeben. Die Überprüfung der klonierten Fragmente erfolgte mittels Restriktionsverdauanalysen und / oder DNA-Sequenzierung.

2.2.1.5. Präparation von Plasmid-DNA

Für Plasmid-Präparationen im kleinen Maßstab wurden 2-5 ml Übernachtskulturen (die jeweils mit einer Bakterienkolonie angeimpft waren) eingesetzt. Das Plasmid-Mini-Kit (Qiagen) oder das Gene JET Miniprep Kit (Fermentas) verwendet. Die Isolierung der DNA erfolgte (nach den Protokollen der Hersteller).

Für großen Plasmid-Präparationen wurden 100 ml Übernachtskulturen eingesetzt, und der Plasmid-Midi-Kit von Qiagen wurde zur Plasmidisolierung verwendet (Nach den Protokollen des Herstellers).

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

2.2.1.6. Isolierung genomischer DNA aus Mausschwanz oder Organen

5-10 mm Mausschwanz (für Southernblot braucht man viel DNA, daher 10 mm) oder ca. 300-600 mg Gewebe eines Organs wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, 500 µl DNA-Lysepuffer mit 200-300 µg Proteinase K/ml (frisch herstellen!) zugegeben und über Nacht bei 55 °C unterSchütteln (ca. 700-800 rpm) inkubiert.

Nach dem vollständigen Verdau des Gewebes wurden die verflüssigten Proben bei ca. 15000g RT für ca. 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 1xVolumen Isopropanol (500 µl) zugeben und gut gemischt (nicht vortexen!). Bei großer DNA-Menge, wurde die DNA als Faden sichtbar und konnte mit einer Pipettenspitze aufgewickelt und in ein neues Gefäß mit TE-Puffer (50-400 µl) überführt werden. Wenn die DNA nicht sichtbar war, wurde die Probe nach Isopropanol-Zugabe für 15 min bei ca. 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 500 µl 70% Äthanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und Äthanolreste durch Inkubation des DNA-Pellets bei 50°C auf einem Heizblock entfernt. Das DNA-Pellet wurde in 50-400 µl TE-Puffer aufgenommen und durch Inkubation über Nacht bei 55°C aufgelöst. Die DNA wurde bei RT gelagert.

Für PCR-Reaktion wurde 1 µl (ca. 50-200 ng) der DNA-Probe und für Southernblot wurden mindestens 30 µl (3 µg) der DNA-Probe eingesetzt.

DNA-Lysepuffer für Gewebe:

100 mM Tris-HCl (pH 8,5); 5 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,2 % SDS. Bei RT gelagert.

200-300 µg Proteinase K/ml Lysepuffer wurden vor Gebrauch frisch hergestellt.

TE-Puffer:

10 mM Tris-HCL (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0). Wurde autoklaviert und bei RT gelagert.

0,5 M EDTA (pH 8,0): (200 ml Stock)

37,2 g EDTA (Ethyldiamintetraessigsäuredinatriumsalz) in ca. 150 ml bidest. H₂O aufnehmen (erst bei pH 8 löslich!) und unter starkem Rühren den pH-Wert mit 10 M NaOH (ca. 11 ml 10 M NaOH!) auf 8,0 einstellen. Mit H₂O auf 200 ml auffüllen.

2.2.1.7. Isolierung genomischer DNA aus Zellen

Zellen wurden auf 6- oder 24-Well-Platten (für embryonale Stammzellen 24-Well-Platten) ausgesät und bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. Anschließend wurde Medium abgenommen und Lysepuffer (jeweils 1,5 ml für 6-Well-Platten und 500 µl für die 24-Well-Platten) darauf gegeben und im Zellinkubator bei 37°C für mindestens 8h inkubiert. 1 x

Volumen Isopropanol (1,5 ml oder 500 µl) wurden zugegeben und bei RT für mindestens 3h auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert, bis die DNA sichtbar wurde. DNA wurde mit einer Pipettenspitze gefischt, in ein Eppendorfgefäß mit TE-Puffer (ca. 150 µl) überführt und zur vollständigen Auflösung über Nacht bei 55°C inkubiert. Die DNA wurde bei RT gelagert.

30-50 µl der DNA-Probe wurden für Southernblot-Analyse eingesetzt.

DNA-Lyse-Puffer für Zellen:

100 mM Tris-HCl (pH 8,5); 5 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,2 % SDS.

100 mg/ml Proteinase K (frisch hergestellt) zugegeben.

2.2.1.8. Restriktions-Endonuklease Spaltung von DNA

Zur Analyse von Plasmid- oder genomischer DNA wurde sie einer Restriktionsendonuklease (RE)-Spaltung unterzogen. Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C für mindestens eine Stunde (genomische DNA und PCR-Produkte über Nacht) inkubiert. Es wurden Restriktionsenzyme der Firma Fermentas eingesetzt. Der Restriktionsansatz erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurden 1-3 Units RE pro 1 µg DNA eingesetzt.

Die Analyse des Restriktionsansatzes erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung der verdauten DNA auf einem Agarosegel.

2.2.1.9. Phenol-Chloroform-Extraktion

Um die DNA von Proteinen zu reinigen wurde sie einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen.

DNA wurde in ein Volumen von mindestens 200 µl aufgenommen und mit 1xVol. Tris-gepuffertem-Phenol versetzt, gut gemischt (große DNA-Vektoren, wie Targeting-Konstrukte wurden nicht „gevortext“, um Strangbrüche durch Scherkräfte zu vermeiden) und bei mindestens 10000 g für 1-2 min. abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die DNA enthält, wurde vorsichtig und mit Vermeidung der proteinhaltigen Interphase entnommen. Zur Entfernung von Phenol- und Proteinresten, wurde die DNA-Lösung mit einem Volumen 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch gut gemischt und erneut abzentrifugiert. Die DANN-enthaltende obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde die DNA ausgefällt.

2.2.1.10. Fällern von DNA

Na-Acetatlösung (3M, pH 5,2) wurde bis zur Endkonzentration von 0,3 M der DNA-Lösung zugegeben. Nach Durchmischung der DNA-Lösung wurde 2,5 faches Volumen vom kalten absoluten Äthanol zugegeben, wieder durch Umschwenken gemischt und auf Eis oder bei -20°C für 15-60 min. inkubiert. Die DNA wurde direkt mit einer Pipettenspitze aufgewickelt (Targeting-Konstrukte wurden grundsätzlich so isoliert) oder bei ca. 16000 g, 4°C für 15-30 min pelletiert. Die DNA wurde mit 70% kaltem Äthanol gewaschen. Durch Inkubation bei 50°C für ca. 10 min wurden Äthanolreste vollständig verdampft. Anschließend wurde die DNA im gewünschten Puffer (z.B. TE-Puffer) oder einfach im Wasser aufgenommen und resuspendiert.

Alternativ wurde die DNA mittels Isopropanol (1xVolumen) ausgefällt. Die DNA wurde direkt mit einer Pipettenspitze gefischt oder bei ca. 16000 g für 15-30 min pelletiert. Durch Inkubation bei 50°C für ca. 10 min wurden Isopropanolreste vollständig entfernt. Anschließend wurde die DNA im gewünschten Puffer oder im Wasser aufgenommen und resuspendiert.

2.2.1.11. Agarosegele

Für Southernblot wurden 0,7-0,8% Agarosegele mit 1 x TBE-Puffer hergestellt und als Laufpuffer 1 x TBE eingesetzt. Für alle anderen Zwecke (DNA-Restriktions-Analyse; DNA-Extraktion, etc) wurden 0,7-2% Agarosegele mit 1 x TAE-Puffer hergestellt und als Laufpuffer 1 x TAE eingesetzt.

50 x TAE:

242 g Tris base

57,1 ml 100% Essigsäure (Eisessig)

100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Auf 1 Liter bidest. H_2O auffüllen.

5 x TBE-Puffer:

54 g Tris-Base

27,5 g Borsäure

20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

auf 1 L mit bidest. H_2O auffüllen.

2.2.1.12. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Agarose-Gelelektrophorese wurde das gewünschte DNA-Fragment unter schwachem UV-Licht mit Hilfe eines Skalpell herausgeschnitten. Das Ausschneiden erfolgte schnell, um UV-induzierte DNA-Schäden zu vermeiden. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe des QIAEX II Gel-Extraction-Kits (Qiagen) für große Fragmente (ab ca. 6 kb) oder des QIAquick Gel-Extraction-Kits (Qiagen) für DNA-Fragmente unter 5 kb. Die Extraktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.1.13. Southernblot-Analyse

Restriktionsverdau genomischer DNA:

3-9 µg genomische DNA (z.B. aus ES-Zellen oder Mausschwanz) wurden mit dem entsprechenden Enzym über Nacht verdaut (es wurden 2-3 U Enzym / 1µg DNA eingesetzt). Der Restriktionsansatz wurde in ca. 40-60 µl Gesamtvolumen durchgeführt.

Gelelektrophoretische Auftrennung:

Die DNA-Proben wurden mit Probenpuffer versetzt und auf einem 0,7-0,8 % TBE-Agarosegel (mit ca. 1 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen und in 1 x TBE-Laufpuffer bei 20-40 Volt (je nach Gelgröße) über Nacht oder bei 80 Volt für ca. 6-8h aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde ein geeigneter Größenstandard zusätzlich auftragen. Anschließend wurde das Gel mit einem angelegten Lineal (um eine spätere Größenbestimmung der Banden zu ermöglichen) unter UV-Licht photographiert.

Gelbehandlung vor dem Bloten:

Das Gel wurde für ca. 45 min in einer Depurinierungslösung unter leichtem Schwenken inkubiert (bis die blaue Farbe des Ladepuffers gelb wurde). Dann wurde kurz mit bidest. H₂O gewaschen und anschließend in einer Denaturierungslösung für ca. 45 min unter Schwenken inkubiert, bis der Probenpuffer wieder blau war. Das Gel wurde erneut kurz in kurz in bidest. H₂O gewaschen. Anschließend in einer Neutralisierungslösung (siehe Zusammensetzung am Ende dieses Kapitels) unter Schwenken für ca. 45 min inkubiert. Das Gel wurde dann in bidest. H₂O gewaschen und in 20 x SSC für 10 min inkubiert.

Kapillar-Transfer von DNA (Southernblot)

Positiv geladene Nylonmembran und Whatmann 3 MM Papiere wurden auf die Größe des Gels angepasst und mit 20 x SSC (Blotting-Puffer) für mindestens 10 min zum Äquilibrieren

inkubiert. Eines der 3 unteren Whatmann-Papierlagen muß länger sein, damit sie in den Puffertank eintaucht (siehe Abbildung 2.1.).

Der Aufbau der Kapillar-Blot-Apparatur ist in der Abbildung 2.1. Drei Lagen mit Blotting-Puffer (20 x SSC) angefeuchtetes Whatmann Papier wurde auf eine Glasplatte aufgelegt, wobei das unterste Blatt Kontakt zu einem 20 x SSC-Lösungsreservoir hat und so als eine Brücke wurde. Durch Rollen mit einer Glaspipette auf den Papier-Lagen wurden Luftblasen entfernt. Das vorbereitete Agarosegel wurde mit den Taschenöffnungen nach unten (also umgedreht), luftblasenfrei auf den Papierstapel aufgelegt (dies erleichtert DNA-Transfer, da die DNA auf der Gelunterseite angereichert ist). Die äquilibrierte Nylonmembran wurde dann auf das Gel luftblasenfrei aufgelegt. Anschließend wurden weitere drei mit 20 x SSC angefeuchtete Lagen Whatmann Papier auf die Membran aufgelegt, und mit einer Glaspipette die Luftblasen entfernt. Insgesamt wurde eine Schicht von 7 cm Papierhandtücher auf das Whatmann-Papier zum Flüssigkeitsaufsaugen aufgelegt. Der Saugstapel wurde mit einer Glasplatte und einem Gewicht von ca. 250-500g beschwert. Der Transfer der DNA auf die Nylonmembran erfolgte über einen Zeitraum von ca. 8-20 h.

Nach dem Transfer wurde die Nylonmembran kurz durch leichtes Schwenken in 6 x SSC gewaschen und anschließend für mindestens 15 min bei RT luftgetrocknet.

Die irreversible Vernetzung der DNA auf die Nylonmembran geschah durch UV-Bestrahlung der Membran für ca. 30-50 s induziert. Die Membran wurde bis zur Verwendung bei RT dunkel gelagert werden.

Depurinierungslösung:

0,2 M HCl (500 ml bidest. H₂O + 8 ml 37% HCl).

20 x SSC (pH 7,0):

3 M NaCl (175,3 g); 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (88,2 g), auf 1 L mit bidest. H₂O auffüllen, pH stellt sich selbst auf ca. 7,2.

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH (20 g); 1,5 M NaCl (87,6 g) auf 1 L mit bidest. H₂O auffüllen.

Neutralisierungslösung (pH 7,2):

0,5 M Tris-HCl (60,5 g); 1,5 M NaCl (87,6 g); auf 900 mL bidest. H₂O auffüllen, ca. 36 ml 37 % HCl sind nötig, um auf pH 7,2 einzustellen, anschließend auf 1 L mit bidest. H₂O aufgefüllt.

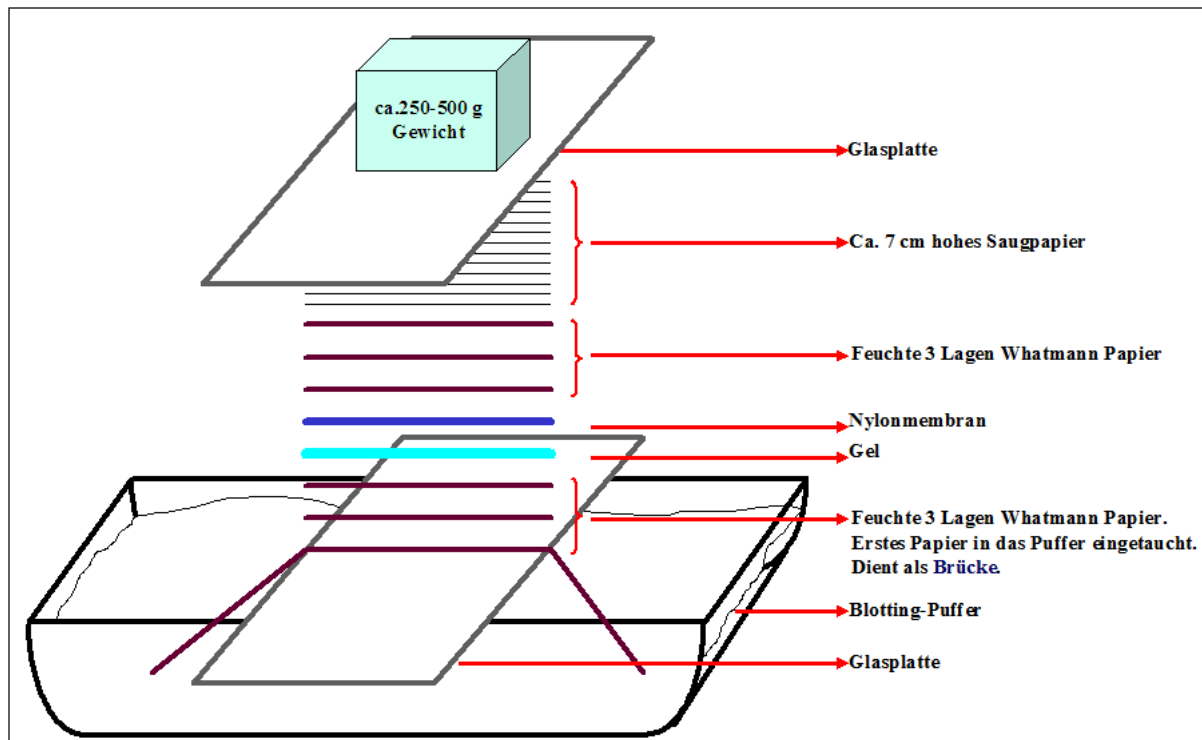


Abbildung 2.1. Aufbau der Kapillar-Blot-Apparatur (Siehe Beschreibung im Text). Die unterste Lage Whatmann Papier ist länger und taucht in den Puffertank ein.

2.2.1.14. Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter Sonden wurde mit dem HexaLabel[®] DNA Labeling Kit (Fermentas, Artikelnr. K0611 bzw. K0612) durchgeführt.

100 ng des zu markierenden ca. 400-650 bp DNA-Fragment (z.B. gereinigtes PCR-Produkt) wurden mit 10 µl 5x „Reaction Buffer“ gemixt und auf 40 µl mit bidest. Wasser aufgefüllt. Dann wurde die Probe bei 95 °C für ca. 5-10 min inkubiert und anschließend auf Eis für 5-10 min inkubiert. Alle weiteren Schritte wurden bei 0°C (Eisbad) durchgeführt. Danach wurden 3 µl MixA (dNTP Mix ohne dATP) zugegeben (falls radioaktiv markiertes dCTP verwendet wurde, so wurde MixC (dNTP Mix ohne dCTP) eingesetzt). Anschließend wurde zu der Probe 6 µl α -³²P-dATP (250 µCi / 9,25 MBq) und 1 µl Klenow Fragment (5 U) zugegeben; und für ca. 10 s gut gemischt, in vorgekühlter Zentrifuge (4 °C) kurz zentrifugiert und für 10-13 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 1 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) gestoppt. Falls die Sonden-DNA nicht sofort verwendet wurde, konnte sie bei -20°C gelagert werden. Der Reaktionsansatz wurde zuerst bei 95-100°C für 5 min, dann direkt auf Eis für ca. 5 min inkubiert. Die Sonde wurde auf die (blockierten) prä-hybridisierten Membran gegeben. In der Regel wurde die Hälfte der so bereiteten Sonde für eine Membran der Größe 10 x 20 cm eingesetzt.

2.2.1.15. Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden auf Membranen

Nach dem Transfer der DNA auf die Nylonmembran (Southernblot), wurde die Membran in ein Hybridisierung-Glasröhrchen (260×40mm, Amersham) eingelegt und 15 ml Hybridisierungslösung (die 100 µg/ml frisch denaturierte, einzelsträngige Heringssperma-DNA enthält) zugegeben und eine Stunde bei 42°C unter Rotationsmischung inkubiert. Anschließend wurde die radioaktiv markierte Sonde zugegeben (die Sonde wurde kurz vorher durch Inkubation für 5 min bei 95°C denaturiert) und mindestens 16 Stunde (über Nacht) bei 42°C unter Rotation mit der Filtermembran inkubiert.

Danach wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran zweimal mit Waschpuffer 1 (2 x SSC, 0.1%SDS) für jeweils 10 min gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit Waschpuffer 2 (0.5 x SSC, 0.4 % SDS) für jeweils 20 min bei 70°C gewaschen. Die Membran wurde auf Whatmann-Papier getrocknet und in eine Durchsichtfolie eingepackt. Die radioaktiven Signale wurden mittels des Fuji Film Scanner FLA-3000 detektiert und mit der Aida Image Analyser v.4.00 software analysiert. Danach wurde die Membran zwischen Intensivierschirme bei -80°C mit Röntgenfilm für 2-5 Tage je nach Stärke des Signals exponiert.

Heringssperma-DNA (SERVA):

wurde in Wasser zu einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch wurde sie bei 95-100°C für 5-10 min denaturiert und sofort auf Eis für 5 min inkubiert.

100x Denhardt's Reagenz:

10 g Ficoll 400	2 % Ficoll 400
10 g Polyvinylpyrrolidon K30	2% Polyvinylpyrrolidon
10 g Rinderserumalbumin (BSA)	2 % Rinderserumalbumin

Hybridisierungslösung:

Menge/Volumen	Endkonzentration:
72 ml Formamid	50 % Formamid
36 ml 20 x SSC	5 x SSC
1.5 ml 1M Tris-HCl pH 7.5	10 mM Tris-HCl
1.5 g SDS	1 % SDS
1,5 ml 100 x Denhardts	5 x Denhardts
30 ml 50 % Dextransulfat (Pharmacia)	10 % Dextransulfat

auf 150 ml mit bidest. H₂O auffüllen.

2.2.1.16. Bakterienkolonie-Hybridisierung

Zur Identifizierung von Bakterienkolonien, die ein bestimmtes kloniertes DNA-Fragment enthalten, wurde die Bakterienkolonie-Hybridisierung durchgeführt. Die Agarplatten sollten vorher bei 4°C gekühlt werden. Membran und Agarplatte werden so markiert, dass eine spätere Identifizierung und Zurückverfolgung der positiven Kolonien auf der Platte möglich ist (am besten 2-3 asymmetrische Markierungen!).

Nylonmembran (positiv geladen) mit der Porengröße 0,45 µm und Durchmesser von 87 mm (Schleicher&Schuell) wurde auf die Agarplatte mit den Bakterienkolonien vorsichtig aufgelegt. Die Bakterien der Kolonien wurden durch Kontakt mit der Membran übertragen.

Die Agarplatte wurde danach für einige Stunden bei 37°C inkubiert, um Nachwachsen der Kolonien zu ermöglichen.

Die Nylonmembran mit den übertragenen Kolonien wurde wie folgt behandelt:

Zur Lyse der Bakterien und Freisetzung der DNA wurden zwei Whatman-Filter passend geschnitten und in 10% SDS getränkt; überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen wurden mit einer Glaspipette durch Rollen entfernt. Anschließend wurde die Membran mit der Rückseite auf mit 10% SDS angefeuchtetem Whatman-Filter gelegt und für ca. 10 min inkubiert. Danach wurde die Membran auf einem trocknen Whatman-Filter kurz gelegt. Zur Denaturierung der frei gesetzten bakteriellen DNA wurden zwei Whatman-Filter in Denaturierungslösung getränkt; überschüssige Flüssigkeit und Luftblasen wurden entfernt. Anschließend wurde die Membran mit der Rückseite auf dem angefeuchteten Whatman-Papier für ca. 10 min inkubiert. Danach wurde die Membran auf einem Whatman-Filter kurz zum Trocknen inkubiert.

Zur Neutralisierung der Membran wurde dieselbe Prozedur wie oben, allerdings mit zwei in Neutralisierungspuffer getränkten Whatman-Papierstücke, durchgeführt.

Die Membran wurde danach auf einem 2xSSC-getränktes Whatman-Filter überführt und ca. 5-10 min inkubiert, und anschließend auf einem Whatman-Filter bei RT für ca. 30 min getrocknet. Die irreversible Vernetzung der DNA auf die Nylonmembran erfolgte durch UV-Bestrahlung der Membran für ca. 30-50 s.

Die Nylonmembran konnte bis zu ihrer Hybridisierung mit der Sonde zwischen zwei Whatman-Papierstücke, in Alufolie eingewickelt und bei RT gelagert werden.

Die Herstellung der Sonde und ihre Hybridisierung auf der Membran sind in den Kapiteln 2.2.1.8. und 2.2.1.9. beschrieben.

2.2.1.17. RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Gesamt-RNA aus Zellen wurde mithilfe des MasterPure RNA Purification Kit (Biozym) oder RNAeasy Mini Kit (QIAGEN), nach Protokoll des Herstellers, isoliert. Zur Isolierung der RNA aus den Geweben, wurden die Organe direkt nach deren Entnahme in RNAlater RNA Stabilization Reagent (Qiagen) überführt und bei -20°C (bis zu einem Monat gelagert). Gesamt-RNA wurde aus den Geweben mithilfe des RNAeasy Mini Kit (QIAGEN) isoliert. DNA-Kontamination wurde durch Behandlung der RNA mit der Baseline-Zero DNase (Biozym) entfernt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

cDNA wurde aus Gesamt-RNA mithilfe des RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Protokoll des Herstellers) hergestellt. Je 1 µg Gesamt-RNA und Oligo(dT)18-Primer wurden für die Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) eingesetzt. Als negative Kontrolle wurden RT-PCR-Ansätze mit allen Komponenten, außer der reversen Transkriptase, eingesetzt. Diese Kontrolle soll ausschließen, dass die amplifizierten Produkte aus DNA-Kontaminationen stammen. Jeweils 1 µl des cDNA-Produkts wurde für eine folgende PCR eingesetzt. Als Kontrollgen wurde das Transkript für hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase (HPRT) amplifiziert.

2.2.1.18. PCR (Polymerase-Kettenreaktion)

a. PCR zur Klonierung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmenten, die für *Targeting*-Konstrukte oder für Genexpression eingesetzt wurden, wurden mittels Pfu-Polymerase gewonnen. Die Pfu-Polymerase (stammt aus *Pyrococcus furiosus*) besitzt eine hohe Temperaturstabilität (höher z.B. als Taq-Polymerase), ihre Halbwertszeit bei 95°C liegt bei ca. 12 Stunden. Außerdem verfügt sie über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, die eine Korrekturaktivität erlaubt (Fehlerhäufigkeit liegt bei ca. 10⁻⁶ je eingebauter Base). Ihre Amplifikationsprodukte besitzen deshalb keinen Basenüberhang wie Taq-generierte Produkte, sondern glatte Enden. Die Syntheserate von Pfu liegt bei ca. 550 Nukleotiden pro Minute (Cline J et al. 1996 ; Mülhardt C., 2000).

Die PCR-Produkte wurden mittels PCR-Purification Kit (Qiagen) gereinigt und direkt über glatte Enden in die entsprechenden Vektoren ligiert. Für einfachere Klonierung der PCR-Produkte, wurden die Primer mit Restriktionsschnittstellen und einen Überhang von mindestens 3 Basen (CGC oder ATA) entworfen. Die Überhänge erlauben eine effizientere Erkennung, Bindung und Spaltung der Schnittstellen durch die entsprechenden Enzyme. Die amplifizierte DNA wurde restringiert, gereinigt und über die passenden Restriktionsschnittstellen in die gewünschten Vektoren kloniert.

PCR-Ansatz:

Template DNA	1 ng
Vorwärtsprimer	20 pmol
Rückwärtsprimer	20 pmol
10 x Pfu-Puffer	5 µl
Nukleotidmix (2 mM)	5 µl (0,2 mM)
Pfu-Polymerase	3 Units
Bidest. H ₂ O	auf 50 µl aufgefüllt.

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus:	95°C:	2 min
30-40 Zyklen:	95°C:	40 s
	58-62°C:	20 s
	72°C	ca. 2 min 20 s / 1 kb-DNA
1 Zyklus:	72°C	10 min 1 Zyklus

b. Direkt PCR nach Bakteriolyse

Zur schnellen und einfachen Identifizierung von positiven Kolonien, die den Vektor mit der gewünschten Passagier-DNA enthalten, wurde die PCR direkt an Kolonielysaten durchgeführt. Dafür wurden spezifische Primer oder Vektor-Passagier-DNA-übergreifende Primer eingesetzt. Die Primer wurden so gewählt, dass Produkte der Größe 300-600 bp amplifiziert werden konnten.

Kleine Bakterienklonien wurden isoliert und in jeweils 50 µl LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C unter leichtem Schütteln (ca. 145 rpm) für 1 Stunde inkubiert. Große Kolonien in 50 µl LB-Medium resuspendiert und direkt verwendet. Jeweils 1 µl aus jeder Bakteriensuspension wurde für PCR eingesetzt.

Für die PCR wurde der BioMix Red, welches Polymerase, Nukleotide und Puffer enthält, verwendet (Bioline).

PCR- Master-Mix für n Proben und 20 µl pro Ansatz:

2xBioMix Red:	(n+1) x 10 µl	(z.B. für 10 Proben, 110 ml BioMix)
50mM MgCl ₂ :	(n+1) x 0,2 µl,	um Endkonzentration von 2 mM zu erreichen.
Rückwärts-/Vorwärtsprimer:	(n+1) x 10 pmol	

reines DMSO: (n+1) x 0,6 µl, um Endkonzentration von 3% zu erreichen.
H₂O: (n+1) x auf 20 µl

Zu jeweils 19 µl des Master-Mix wurde 1 µl der Bakteriensuspension zugegeben.

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus: 95°C: 1 min 50 s
40-50 Zyklen: 95°C: 40 s
 55-60°C: 20 s
 72°C: 30 s (ca. 1 min / 1 kb-DNA)
1 Zyklus: 72°C: 5 min

Die Proben wurden, ohne Zugabe vom Probenpuffer, direkt aufs Gel auftragen.

c. PCR aus genomischer DNA: Genotypisierung von Mäusen

Zur Genotypisierung von Mäusen, wurde die DNA aus Schwanzabschnitten der Mäuse isoliert (siehe Abschnitt 2.2.1.6.) und 1 µl der DNA-Lösung für PCR eingesetzt. Die PCR-Ansätze wurden wie bei der PCR an Bakterien (siehe oben) durchgeführt.

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus: 95°C: 1 min 50 s
40 Zyklen: 95°C: 40 s
 60°C: 20 s
 72°C: 30 s
1 Zyklus: 72°C: 5 min

2.2.1.19. Sequenzierung

Die DNA wurde bei GATC Biotech AG, Konstanz; oder bei QIAGEN GmbH, Sequencing Service, Hilden sequenziert.

2.2.2. Kultur von Zelllinien und Transfektion

2.2.2.1. Kultivierung der HEK-293 und J774-Zellen

HEK-293 (Human embryonic kidney)-Zellen und J774A.1 murine Makrophagen wurden in RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin (0,3 g/L), 10% FCS, 10 mM HEPES und Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg /ml) kultiviert. Geneticin (G418) resistente Zellen wurden im selben Medium, welches zusätzlich 400 µg -1 mg / ml G418 enthielt, kultiviert.

Zur Überführung der Zellen, wurden sie mit Trypsin-Lösung (1x, Gibco, Invitrogen) behandelt. Das Medium wurde entfernt und die Zellen durch Zugabe von sterilem PBS und vorsichtiges Schwenken gewaschen. Anschließend wurde Trypsin zu den Zellen gegeben und ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1-2 x Vol Kulturmedium (welches FCS enthält) wurde Trypsin inaktiviert. Die abgelösten Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und dann in frische Kulturschalen bzw. -Flaschen überführt.

2.2.2.2. Transfektion der HEK-293 und J774-Zellen

Die Zellen wurden ein Tag vor der Transfektion auf 6 Well-Platten (ca. $3 \cdot 10^5$ Zellen / Well) ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mithilfe des jetPEI Transfection Reagent (Qbiogene Molecular Biology), nach dem Protokoll des Herstellers, transfiziert. Bei stabilen Transfektionen wurde das Medium nach 24-28h gegen ein G418-haltiges Medium ausgetauscht. Stabile Transfektanden waren nach 6 bis 8 Wochen selektioniert.

2.2.2.3. Lagerung der Zellen

Die Zellen (ca. 10^6 - 10^7) wurden in kaltem DMEM mit 20% FCS und 10% DMSO aufgenommen, in spezielle Einfriergefäße überführt und für 15-30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80°C. Nach einigen Wochen bis Monaten wurden sie in flüssigen Stickstoff zur Langzeitlagerung überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte dagegen sehr schnell, um die toxische Wirkung von DMSO zu verhindern. Die Zellen wurden sofort auf 37°C erwärmt und mit vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen. Anschließend wurden sie in das entsprechende Kulturmedium überführt und bei 37°C kultiviert.

2.2.3. Generierung der IL-10-Reportermause

2.2.3.1. Isolierung und Behandlung von embryonalen Mausfibroblasten

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) wurden als Nährzellen für die Kultivierung der embryonalen Stamm (ES)-Zellen verwendet. MEF exprimieren ein membranständiges LIF (*Leukemia inhibitory factor*), welches die Differenzierung der ES-Zellen inhibiert. Vor deren Einsatz wurden bei 5000 R, 300 kV und 12 mA für 5 min gamma (γ)-bestrahlt, um sie anti-mitotisch gemacht.

Die MEF wurden aus C57Bl/6J-Mäusen, die ein Neomycin-Resistenz-Transgen tragen, isoliert. Dafür wurden die Mäuse verpaart und die Embryonen von den Weibchen am Tag E13,5 unter sterilen Bedingungen entnommen. Das Mausfell wurde mit 70% Äthanol desinfiziert und der Bauch durch einen medianen Schnitt geöffnet. Die zwei Uteri wurden vorsichtig entnommen und in Petrischalen mit PBS überführt. Die Embryonen wurden aus den Uteri herauspräpariert und in eine Petrischale mit PBS überführt. Kopf, Herz und Innereien der Embryonen wurden entnommen. Die Embryonenreste wurden in kleine Stücke geschnitten und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen vereinigt. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung pro Embryo wurden die Gewebestücke mittels mehrfachem Pipettieren durch eine 10 ml Pipette homogenisiert, dann wurden sie für 10 min bei 37°C inkubiert. Die Prozedur wurde unter Verwendung einer 5 ml Glaspipette dann einer 2 ml Plastikpipette wiederholt. Anschließend wurden 4 ml EF-Medium pro Embryo zugegeben. Nach Sedimentation größerer Gewebestücke wurde die Zellsuspension abpipettiert und auf 10 cm-Zellkulturschalen in 10 ml EF-Medium ausplattiert (1 Schale pro Embryo) und kultiviert. Nachdem die Zellen nach 1-2 Tagen einen Konfluenzgrad von 80-90% erreicht hatten, wurden sie trypsinisiert, 5 min bei 200g abzentrifugiert und auf 175 cm²-Zellkulturflaschen (1 Flasche pro Embryo) zur Expansion ausplattiert. Die Zellen wurden 1-2 Tage nach dem Erreichen 100%-iger Konfluenz weiterkultiviert, anschließend trypsinisiert und abzentrifugiert. 10% von den Zellen wurden erneut in eine 175 cm²-Flasche kultiviert (zweite Passage). Die restlichen 90% der Zellen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde bei 5000 R/300 kV/12 mA für 5 min einer Röntgenstrahlung ausgesetzt, um die Zellen mitotisch inaktiv zu machen. Anschließend wurde Einfriermedium auf die Zellen gegeben (3 ml pro 750 ml Zellkulturflasche), resuspendiert und in 0,5 ml Aliquots eingefroren. Mit der zweiten Passage wurde ebenso verfahren.

EF-Medium

DMEM (komplementiert mit 4500 mg/ml Glucose und 1 mM Na-Pyruvat), 10% FCS.

Einfriermedium

70%; DMEM; 20% FCS; 10% DMSO

2.2.3.2. ES-Zellkultur

Die embryonale Stamm (ES)-Zellkultur bis zur Isolierung der DNA wurde nach dem Protokoll Talts et al. (1999) durchgeführt. Die murinen embryonale Stammzellen (R1-Linie) aus einer 129Sv Mauslinie wurden in Anwesenheit von mitotisch inaktivierten MEF im ES-Medium (ohne G418) kultiviert. EF-Zellen unterdrücken die Differenzierung der ES-Zellen durch die Expression des membranständigen LIF (Leukemia inhibitory factor). Es wurde zusätzlich lösliches LIF ins Medium zugefügt, um die Differenzierung noch effizienter zu unterdrücken. Starke ES-Zell-Dichte führt auch zur Differenzierung der ES-Zellen. Beginnende Differenzierung war durch zentrale, bräunliche Verfärbung der ES-Klone zu erkennen. Daher wurden die Zellen rechtzeitig aufgeteilt, bevor sie eine kritische Zelldichte erreichten (Zellkulturverdünnung: 1:5 bis 1:7). Das ES-Medium wurde täglich gewechselt. Antibiotika wurden nicht verwendet. So konnten Mykoplasmen-Infektionen als Indikatoren mikrobieller Kontaminationen frühzeitig nachgewiesen werden. Die ES-Zell-Passagen wurden klein gehalten, um die Fähigkeit der Zellen zur Transmission in die Keimbahn zu fördern.

ES-Medium

DMEM (komplementiert mit 4500 mg/ml Glucose und 1 mM Na-Pyruvat); 20% FCS; 0,1 mM β -Mercaptoethanol; nicht essentielle Aminosäuren (NEA); 1000 U/ml Leukemia inhibitory factor (LIF); zur positiven Selektion 350-500 μ g/ml G418 (und bei zusätzlicher negativen Selektion 2 μ M FIAU: 1-[2-deoxy-2-fluoro-8-darabinofuranosyl]-5-iodouracil).

2.2.3.3. Elektroporation der Targeting-Konstrukte in ES-Zellen

Vor der Elektroporation in ES-Zellen, wurden die Plasmid-Konstrukte linearisiert. Dafür wurde eine Schnittstelle ausgewählt, die ausschließlich außerhalb des Targeting-Konstrukts liegt.

150 μ g DNA des jeweiligen Targeting-Konstruktes wurden in einem Reaktionsvolumen von 400 -500 μ l mit 300 U Restriktionsenzym (XhoI oder AscI) über Nacht in einem Brutschrank

bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 150 U Enzym zugegeben und für 2-4 Stunden weiter inkubiert. Die vollständige Linearisierung der Konstrukte wurde durch Gelelektrophorese von 5 µl des Ansatzes auf einem 0,8% Agarosegel überprüft. Anschließend wurde die linearisierte DNA einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen (siehe Kapitel 2.2.1.9.) und anschließend mit Äthanol ausgefällt (siehe Kapitel 2.2.1.10.). Die DNA wurde isoliert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 70% Äthanol überführt und so bei -20°C bis zur Elektroporation aufbewahrt. Für die Elektroporation wurden 80-100 µg DNA eingesetzt. Die in 70%-Äthanol gelagerte DNA wurde abzentrifugiert, unter sterilen Bedingungen luftgetrocknet, in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel in 700 µl PBS aufgenommen und 10-15 min auf einen Heizblock bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert, bis die DNA aufgelöst war.

Die ES-Zellen wurden mit PBS gewaschen und 5-10 min bei 37°C trypsiniert. 10 ml ES-Medium wurde zugegeben und die ES-Zellen wurden resuspendiert und in ein 15 ml-Falcon-Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung der Gesamtzellzahl in einer Neubauerkammer wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. 4×10^7 Zellen wurden erneut abzentrifugiert, in 700 µl DNA-haltigem PBS resuspendiert und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 0,8 kV, 3 µF und RT. Der Widerstand der eingesetzten Zellsuspension, der durch die Zeitkonstante erfasst wird, betrug 0,04-0,1 Millisekunden (die Zeitkonstante einer Reaktion entspricht jener Zeit in Millisekunden, die nach einem elektrischen Puls bis zum Abfall der Spannung auf 37% des ursprünglichen Wertes verstreicht, sie stellt einen Parameter für die Effizienz der Elektroporation dar). Anschließend wurden die Zellen auf acht 10cm-Schalen ausplattiert und für 24 h ohne Antibiotikum kultiviert.

2.2.3.4. Selektion und Isolieren G418-resistenter ES-Klone

24 h nach der Elektroporation wurde das Medium durch G418-haltiges ES-Medium (0,35 bis 0,5 mg/ml) ausgetauscht, um die Selektion und klonale Expansion Antibiotikum-resistenter ES-Zellen zu ermöglichen. Für Negativselektion mittels Thymidinkinase wurden 48 h nach der Elektroporation zusätzlich 2 µM FIAU (1-[2-deoxy-2-fluoro-8-darabinofuranosyl]-5-iodouracil) im Medium zugefügt. Das Medium wurde jeden Tag gewechselt. Nach Heranwachsen der ES-Kolonien (ab Tag 6-7 nach der Elektroporation) wurde mit dem Isolieren der ES-Klone begonnen. Mittelgroße ES-Klone ohne bräunliche Verfärbung wurden mit einer 200 µl Pipette isoliert. Die isolierten ES-Klone wurden in 150 µl Trypsin/EDTA-Lösung pro Well (96-Well Platte) überführt und 5 min bei 37°C trypsiniert. 150 µl ES-

Medium wurde zugefügt, die Zellen resuspendiert und in eine 24-Well Platte auf zuvor ausplattierte Nährzellen transferiert. 24 Kolonien je Durchlauf wurden isoliert, trypsinisiert und anschließend transferiert. Insgesamt wurden so 240 bis 720 ES-Klone pro Targeting-Konstrukt innerhalb von 2 bis 3 Tagen gewonnen. Nach einmaligem Medienwechsel 24 h nach dem Isolieren wurden die Zellen für 2-5 Tage kultiviert bzw. bis sich das Medium gelb zu verfärben begann.

2.2.3.5. Einfrieren der G418-resistenten ES-Klone

Die Hälfte von jedem selektionierten ES-Klon wurde eingefroren und die andere Hälfte zur Genotypisierung weiter expandiert. Es wurden jeweils die ES-Klone einer kompletten 24-Well-Platte eingefroren, auch wenn sie nicht gleichmässig gewachsen waren. Dazu wurde Medium aus den Napf abgesaugt, 120 µl Trypsin/EDTA pro Well zugegeben und 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jeweils 1 ml Einfriermedium zugegeben, 0,7 ml der ES-Zellsuspension wurden in ein Einfrierröhrchen transferiert und sofort auf Trockeneis eingefroren. Anschließend wurden die Nöpfe mit der restlichen ES-Zellsuspension mit je 1,5-2 ml ES-LIF^{1/2}Medium (mit der Hälfte der LIF-Konzentration: 500 U/ml) aufgefüllt. Das große Mediumvolumen verdünnt DMSO und minimiert damit seinen toxischen Effekt. Nach den die ES-Zellen adhärirt haben (frühenstens nach 6 h und spätestens nach ca. 20 h), wurde das Medium abgenommen und 1 ml frisches ES-LIF^{1/2}Medium zugegeben. Die Zellen wurden kultiviert bis das Medium leuchtend gelb wurde (dies wurde nach 2-4 Tagen erreicht).

Einfriermedium

70%; DMEM; 20% FCS; 10% DMSO

2.2.3.6. DNA-Präparation aus ES-Klonen

Näpfen mit leuchtend-gelbem Kulturmedium wurden abgesaugt und mit 0,5 ml Lysepuffer versetzt. Die ES-Zellen wurden dann weiter im Inkubator (bei 37°C) belassen. Die Prozedur wurde durchgeführt bis in allen Näpfen einer Platte das Medium mit Lysepuffer ausgetauscht war. Nach dem letzten Wechsel, wurde die Platte noch ein letztes Mal für 8-24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 0,5 ml Isopropanol zugegeben und bei RT für mindestens 3h auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert, bis die DNA-Fäden sichtbar wurde. DNA wurde mit einer Pipettenspitze aufgerollt, in ein Eppendorfgefäß mit TE-Puffer (ca. 150 µl) überführt und zur vollständigen Auflösung über Nacht bei 55°C inkubiert. Die DNA wurde bei RT gelagert.

2.2.3.7. Identifizierung homolog-rekombinanter ES-Zell-Klone

Die Identifizierung von ES-Zell Klonen mit homolog-rekombinanter Integration der Targeting-Konstrukte erfolgte mittels Southernblot Analyse (siehe Abschnitt 2.2.1.13. bis 2.2.1.15.). 30-40 µl der DNA-Probe wurden für Southernblot-Analyse eingesetzt. Die Lage der (externen und internen) Sonden sowie die Restriktionsstellen der verwendeten Enzyme sind im Ergebnisteil, in den entsprechenden Abbildungen dargestellt.

Positive Klone mit annähernd gleicher Signalstärke vom Wildtyp (WT)- und rekombinanten Allel wurden noch einmal zur Kontrolle charakterisiert.

2.2.3.8. Blastozysten-Injektion, -Transfer und Verpaarungsschema

Die als endgültig positiv definierten ES-Klone wurden aufgetaut, expandiert (mit täglichem ES-Medium-Wechsel) und mindestens vier Aliquots davon wieder eingefroren. Der Rest wurde für die Blastozysten-Injektion vorbereitet. Die ES-Zellen wurden trypsiniert und zweimal in ES-Medium gewaschen. 10% der Suspension wurden erneut in ES-Medium gewaschen, der Überstand nach Zentrifugation bis auf 100-200 µl abgesaugt, die Zellen durch leichtes Finger-Schnippen am Röhrchen resuspendiert und bis zur Injektion auf Eis aufbewahrt. Es wurden 10-20 ES-Zellen pro Blastozyste injiziert. Die Mikroinjektion der ES-Zellen in Blastozysten sowie der Blastozysten-Transfer in Scheinschwangere Mäuse wurden von einer Service-Einheit des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried, durchgeführt. Die verwendeten ES-Zellen (R1 ES-Zellen) wurden aus einer 129Sv Mauslinie isoliert. Diese Mäuse haben durch das Tragen des dominanten agouti-Gens braune Fellfarbe. Die Blastozysten wurden aus C57Bl/6-Mauslinie isoliert. C57Bl/6J-Mäuse haben eine schwarze Fellfarbe. Die veränderten Blastozysten (5 bis 10 Stück) wurden dann in den Uterus scheinchwangerer CD-1-Mäuse (Albinos) implantiert. Bei den Nachkommen dieser Mäuse, die Fellchimärität (Mischung aus braun und schwarz) zeigten, waren die mutierten ES-Zellen und Wildtyp-ES-Zellen beteiligt. Der Grad des Chimärismus der Nachkommen lag von 50-60% bei gleichmäßiger schwarz-brauner Streifung bis hin zu 90-100% bei ausschließlich brauner erkennbarer Fellfarbe. Ob die manipulierten ES-Zellen auch an der Bildung der Keimzellen beteiligt waren (Keimbahn-Transmission der Transgens sattgefunden hat), ließ sich durch Rückkreuzung der chimären Mäuse (am besten die 90-100% braune Mäuse) mit C57Bl/6J-Mäuse oder ihre Kreuzung unter sich ermitteln. Die chimären Nachkommen aus diesen Kreuzungen bekamen eine Ohrmarkierung (mit einer Zahl) und wurden genotypisiert, um die Integration des Targeting-Konstrukts in den IL-10-Lokus zu prüfen. Diese keimbahnchimären Tiere (F1-Generation) waren der Ausgangspunkt für die Etablierung der

transgenen Mauslinien. Die Deletion der Neomycin (Neo)-Kassette erfolgte durch die Verpaarung der transgenen Mäuse mit FLP- oder Cre-Rekombinase exprimierenden Mäusen. Für alle im Rahmen der Arbeit durchgeführten Analysen wurden Tiere mit gemischtem genetischem Hintergrund (129Sv / C57Bl/6J) verwendet.

2.2.3.9. Genotypisierung der Mäusen

Die Genotypisierung von Mäusen erfolgte analog zu der von ES-Zellen (s. oben). Die Tiere der F1-Generation wurden mittels Southern-blot (externe Sonde) (siehe Abschnitt 2.2.1.13. bis 2.2.1.15.) und PCR genotypisiert, um die Zuverlässigkeit der PCR zu testen. Die weiteren Nachkommen wurden nur noch mittels PCR genotypisiert.

Zur Gewinnung der DNA wurde den Tieren im Alter von 4-5 Wochen nach der Ohrmarkierung ein etwa 3-10 mm langes Stück von der Schwanzspitze abgeschnitten. Die Ohrmarkierung und Schwanzspitzen-Biopsien wurden von den Tierpflegern des Tierhauses am Max von Pettenkofer Instituts durchgeführt. Die Isolierung der DNA aus den Mausschwänzen erfolgte wie im Abschnitt 2.2.1.6. beschrieben und die Typisierung mittels PCR wurde wie im Abschnitt 2.2.1.18. durchgeführt. Die Primer zur Genotypisierung der Mäuse sind im Materialteil (Abschnitt 2.1.6.) aufgelistet. Die Primer wurden so entworfen, daß eine hohe *Annealing*-Temperatur gewählt werden konnte. Dies verhinderte unspezifische PCR-Produkte. Die erwarteten Produktgrößen lagen zwischen 350 und 700 bp. Die PCR-Bedingungen für alle Reporter-Mäuse waren wie folgt:

PCR-Bedingungen:

1 Zyklus:	95°C:	1 min 50 s
40 Zyklen:	95°C:	40 s
	60°C:	20 s
	72°C:	30 s
1 Zyklus:	72°C:	5 min

2.2.4. Zellbiologische und immunologische Methoden

2.2.4.1. Gewinnung von Peritonealmakrophagen

Um eine verstärkte Einwanderung von Makrophagen in das Peritoneum der Mäuse zu induzieren, wurde eine Peritonitis (Bauchfellentzündung) durch intraperitoneale Injektion von 1mL 10%ige Proteose Peptone (Difco Laboratories, Detroit) in PBS erzeugt. Nach drei Tagen wurden die Mäuse getötet und die Peritonealmakrophagen mittels Peritoneallavage mit kaltem 10 ml PBS gewonnen. Die Zellen wurden bei 200 g, 4°C für 5 min abzentrifugiert, und in RPMI 1640 mit 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin und 10 % FCS resuspendiert und in 24-Well-Platten ($5 \cdot 10^5$ Zellen/mL) ausgesät. Nach mindestens sechs Stunden Inkubation bei 37 °C, wurden nicht-adhärenente Zellen durch Medium-Wechsel entfernt. Die verbleibenden sogenannte PPEMs (proteose peptone- elicited macrophages) bestanden zu über 90% aus Makrophagen.

2.2.4.2. Gewinnung von Makrophagen und DCs aus Knochenmark

Die Oberschenkelknochen von Hinter- und Vorderläufen wurden aus den Mäusen präpariert und von Geweberesten befreit. Ein Knochenende wurde unter sterilen Bedingungen abgeschnitten und das Knochenmark von 2-4 Femuren mit einer Injektionsnadel (0,45 µm Durschnesser) und 5 ml kaltem PBS pro Oberschenkelknochen ausgespült. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in M-CSF- oder GM-CSF-Medium resuspendiert und in Petrischalen ausgesäht ($5 \cdot 10^6$ pro Schale) und bei 37°C inkubiert.

GM-CSF konditioniertes Medium (DC-Medium) diente zur Differenzierung der Knochenmarkzellen zu dendritischen Zellen (DCs) (Lutz et al. 1999), während M-CSF konditioniertes Medium (LCCM) zur Differenzierung der Knochenmarkzellen zu Makrophagen führte. Die Zusammensetzung der Medien ist unten angegeben.

Für die Makrophagen-Differenzierung wurden nach ca. 12 h nicht-adhärenente Zellen leicht vom Boden der Petrischalen mit Medium abgespült, in Falcontube überführt und bei 200g für 5 min bei RT abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in M-CSF-DMEM resupendiert, abgezählt und, je nach Versuchsvorhaben, wie folgt ausgesäht und bei 37°C weiter inkubiert:

$5 \cdot 10^4$ Zellen pro Napf einer 48-Wellplatte in 500 µl Medium

$5 \cdot 10^5$ Zellen pro Napf einer 24-Wellplatte in 1 ml Medium

$2 \cdot 10^6$ Zellen pro Napf einer 6-Wellplatte in 2 ml Medium

$5 \cdot 10^6$ Zellen pro 10 cm Petrischale in 10 ml Medium

Am dritten Tag wurde 1 x Volumen M-CSF-Medium der Kultur zugegeben. Nachdem die Zellen am Tag 8 zu Makrophagen ausdifferenziert waren, wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit DMEM, welches Penicillin/Streptomycin, aber kein LCCM und FCS enthält, gewaschen und im diesem FCS-/LCCM-freiem DMEM für weitere 24h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für Versuche eingesetzt.

Für DC-Differenzierung wurde am dritten Tag 1 x Volumen GM-CSF-Medium der Kultur zugegeben. Am sechsten Tag wurde die Hälfte des Mediums entnommen, bei 180g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und frisches GM-CSF konditioniertes Medium dem Zellpellet zugegeben. Die Zellen wurden sanft resuspendiert und in die Petrischalen zurückgegeben. Diese Prozedur wurde am achten Tag wiederholt. Nachdem die Zellen am Tag 9 oder 10 ausdifferenziert waren, wurden die DCs sanft vom Boden der Petrischalen mit Medium abgespült, in Falcontube überführt und bei 200g für 5 min, RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Zellen einmal mit DMEM, welches Penicillin/Streptomycin, aber kein GM-CSF und FCS enthält, gewaschen. Anschließend wurden die DCs in DMEM (ohne FCS und GM-CSF) resuspendiert, abgezählt und in gewünschte Wellplatten (z.B. 1×10^6 pro Napf einer 24-Wellplatte) ausgesät und bei 37°C für 24h weiter inkubiert, bevor sie für Versuche eingesetzt wurden.

DC-Medium:

DMEM (komplementiert: mit 1000mg/l Glucose; 2 mM L-Glutamine; 1 mM Pyruvate); 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; 10% FCS; 15% Kulturüberstand von GX3-Zellen, die mit murinem GM-CSF-Gen transfiziert sind (GX3-GM-CSF); 50 µM 2-Mercaptoethanol.

M-CSF-Medium:

DMEM (komplementiert: mit 1000mg/l Glucose; 2 mM L-Glutamine; 1 mM Pyruvate); 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin; 10% FCS; 15% Kulturüberstand von L929-Zellen, (L929 cell conditioned medium: LCCM); 50 µM 2-Mercaptoethanol.

2.2.4.2. Präparation von Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Die Milz wurde mit dem Stempel einer Einmalspritze unter PBS zuerst durch einen Zellsieb der Porengröße 70 µm, dann durch einen Zellsieb der Porengröße 40 µm passiert. Die Zellen wurden für 5 min bei 180g abzentrifugiert. Zur osmotischen Lyse von Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in PBS resuspendiert und mittels einer

Neubauerkammer gezählt. Die Zellen wurden in DMEM (mit Penicillin/Streptomycin und 10% FCS) für Stimulationsversuche weiter inkubiert und/oder durch Immunfluoreszenzmarkierung im FACS analysiert.

2.2.4.3. Separation von T-Zellen aus Einzelzellsuspensionen der Milz

Die CD4-T-Zellen wurden mittels Magnetkugel-gekoppelten CD4-Antikörpern (CD4-AK), (Miltenyi Bioscience) aus der Einzelzellsuspension der Milz isoliert. Die Isolierung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Milzzellsuspension wurde in PBS/1% BSA/0.01% NaN_3 resuspendiert mit den Magnetkugel-gekoppelten CD4-AK für 15-30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in PBS/1% BSA/0.01% NaN_3 resuspendiert und über Säulen in einem Magnetischen Feld durchlaufen lassen. Die CD4^+ -Zellen werden zurückgehalten werden, während alle anderen Zellen die Säule ungehindert passieren und als Durchfluss austreten. Nach einem Waschschrift wurde die Säule aus dem magnetischen Feld genommen und die angereicherten Zellen mithilfe eines Spritzenstempels aus der Säule gedrückt. Die Reinheit der Zellpopulation war in der Regel größer als 85 %.

2.2.4.4. Stimulierung der Zellen *in vitro*

a) Stimulierung mit PAMPs

Die Stimulierung der Zellen erfolgte in kleinem Volumen FCS-freiem Medium (DMEM/ Penicillin/Streptomycin). Die Zellen wurden für 48-Wellplatten in einem Volumen von 200 μl Medium, für 24-Wellplatten in einem Volumen von 500 μl Medium oder für 6-Wellplatten in 1 ml Medium stimuliert.

Die Zellen wurden mit LPS (50-500 ng/ml); Zymosan (50 $\mu\text{g/ml}$, entspricht ca. 10-20 Partikel Zymosan/Zelle) oder mit *Yersinia-LcrV* (5-9 $\mu\text{g/ml}$) stimuliert. Je 2 Ansätze für jede Stimulation und definierte Zeitdauer wurden durchgeführt.

Nach der Stimulation wurden die Kultur-Überstände für Cytokin-Bestimmung abgenommen und bei -20°C gelagert, bzw. wurden die Zellen einer Immunfärbung oder einem Beta-Lactamase-Assay unterzogen und in der Durchflußzytometrie bzw. fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS: Fluorescence activated cell sorting) oder unter Fluoreszenz-Mikroskop analysiert.

Es wurden eingesetzt: das LPS von Salmonella minnesota RE595 ultra pure (Alexia Deutschland GmbH; catalognr. 581-008-L002), Zymosan aus *Saccharomyces cerevisiae*

(Molecular Probes, catnr. Z2849) und LcrV von *Y. enterocolitica* O:8 (Max von Pettenkofer Institut, Sing et al. 2002a).

b) Stimulierung mit dem Superagonisten D665

Stimulierung der gesamten Milzzellen *in vitro*:

Milzzellen (1×10^6) wurden in 6 Wellplatten mit 1ml RPMI-Medium (mit 2mM L-glutamine, 10% FCS, 10mM Hepes, Penicillin/Streptomycin, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 2U per ml IL-2) und 12,5-20,0 μ g/ml des CD28-AK, D665 (Lin et al. 2003), inkubiert. Die Zellen wurden 2-3 Tage stimuliert. Die Zellkultur-Überstände wurden für Cytokinmessung abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden nach Immunfluoreszenzmarkierung im FACS analysiert.

Stimulierung von isolierten CD4-T-Zellen *in vitro*:

Eine 6-Wellplatte wurde über Nacht mit 1 ml Ziegen- α -Maus IgG (40 μ g/ml) bei 4°C beschichtet. CD4-T-Zellen wurden in IgG-beschichteten Well-Platten (Je 1×10^6 /Napf) in 1ml RPMI-Medium (mit 2mM L-glutamine, 10% FCS, 10mM Hepes, Penicillin/Streptomycin, 50 μ M 2-Mercaptoethanol, 2U per ml IL-2) inkubiert. Jeweils 12,5-20,0 μ g/ml des CD28-AK, D665, wurden zugefügt. Die Zellen wurden 2-3 Tage stimuliert. Die Zellkultur-Überstände wurden für Cytokinmessung abgenommen und bei -20°C gelagert. Die Zellen wurden im FACS analysiert.

2.2.4.5. Immunfluoreszenzfärbung

Für Fluoreszenz-Mikroskopie wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesäht. Nach dem Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurden 0,25 μ g CD16/32/ 10^6 Zellen (Fc-Block) zugegeben (Blockierung von FC-Rezeptoren) und 20 min bei 4°C inkubiert. Die Fc-Block-Lösung wurde entfernt und ohne Waschen der Zellen mit der Antikörper-Färbung gestartet.

Antikörper gegen Zelldifferenzierungsantigene wurden 1:100 in PBS/3% BSA (fraction V) verdünnt und auf die Zellen gegeben und für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS/3% BSA gewaschen.

Für intrazelluläre Färbung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dazu wurden die Zellen mit 3,7 % Formaldehyd für 10 min bei RT inkubiert. Dann folgte 2-3 x Waschen der Zellen mit PBS/3%BSA. Zum Blockieren der überschüssigen Aldehydgruppen (verursachen Hintergrundfluoreszenz) wurden die Zellen 20 min mit 50 mM NH₄Cl inkubiert, und anschließend 2-3 x mit PBS/3% BSA gewaschen. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 0,1 % Saponin in PBS/3% BSA (ab hier als Wasch- und Permeabilisierung-Puffer) für 20 min. Die Färbung mit dem primären AK (1:100 verdünnt)

gegen intrazelluläre Proteine, wie GFP, erfolgte in PBS/3% BSA/0,1% Saponin für 1-12h. Die Zellen wurden mit dem Permeabilisierungspuffer 3 x gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (z.B. FITC-konjugiert) für 30-60 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x gewaschen. Zur Färbung der DNA, die Zellen wurden mit 10 µg/ml 4'-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) in PBS für 2-5 min im Dunkeln inkubiert und anschließend 2 x gewaschen. Die Deckgläschen wurden mit Fluoprep-Tropfen auf Objektträger geklebt, mit Nagellack an den Rändern versiegelt und bei 4-8 °C im Kühlschrank unter Lichtabschluss gelagert. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

2.2.4.6. Cytokinmessung mittels Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set

Cytokinmessung in Flüssigkeiten (Serum, Zellüberstand etc.) mithilfe des CBA Flex Set der Firma BD Biosciences basiert auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA. Allerdings sind die Antikörper gegen die zu charakterisierenden Proteine (Cytokine) nicht auf einer Platte immobilisiert, sondern an Kunststoffkugeln (*beads*) gekoppelt. Diese binden spezifisch ihre löslichen Antigene (Cytokine), welche anschließend durch Immun-Fluoreszenzfärbung quantifiziert werden (Abbildung 2.2.).

Die Vorteile des CBA sind: (1) mehrere Cytokine können in derselben Probe gemessen werden; (2) da die Probe nicht für die Messung mehrerer Cytokine aufgeteilt werden muß (wie bei ELISA), reichen kleine Volumina (maximal 50 µl), um alle gewünschten Cytokine zu messen; (3) die Prozedur der Probenbereitung ist mit nur drei Pipettierschritten, nicht zeitaufwendig (ca. 3,5 Stunden Dauer).

Die zu messenden Cytokine binden an ihre entsprechenden Kugeln, welche jeweils eine charakteristische Fluoreszenz aufweisen. Die Mikrokugeln sind mit *capture*-Antikörper beschichtet, die jeweils spezifisch ein Cytokin erkennen und binden. Ein Reporter (Detektor)-Antikörper bindet anschließend an das auf der Kugelchenoberfläche immobilisierte Cytokin. Der Reporter-AK ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Die Kombination der Bead- und Detektor-Farben bestimmt die Art des Cytokins. Durch Waschen werden ungebundene Proteine und Reporter-AK entfernt (Abbildung 2.2.).

Für die Probenbereitung wurde anhand des Protokolls des Herstellers durchgeführt. Die Messungen wurden mittels BD FACSAarray™ Bioanalyzer am FACSCanto durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACP Array software (BD Biosciences).

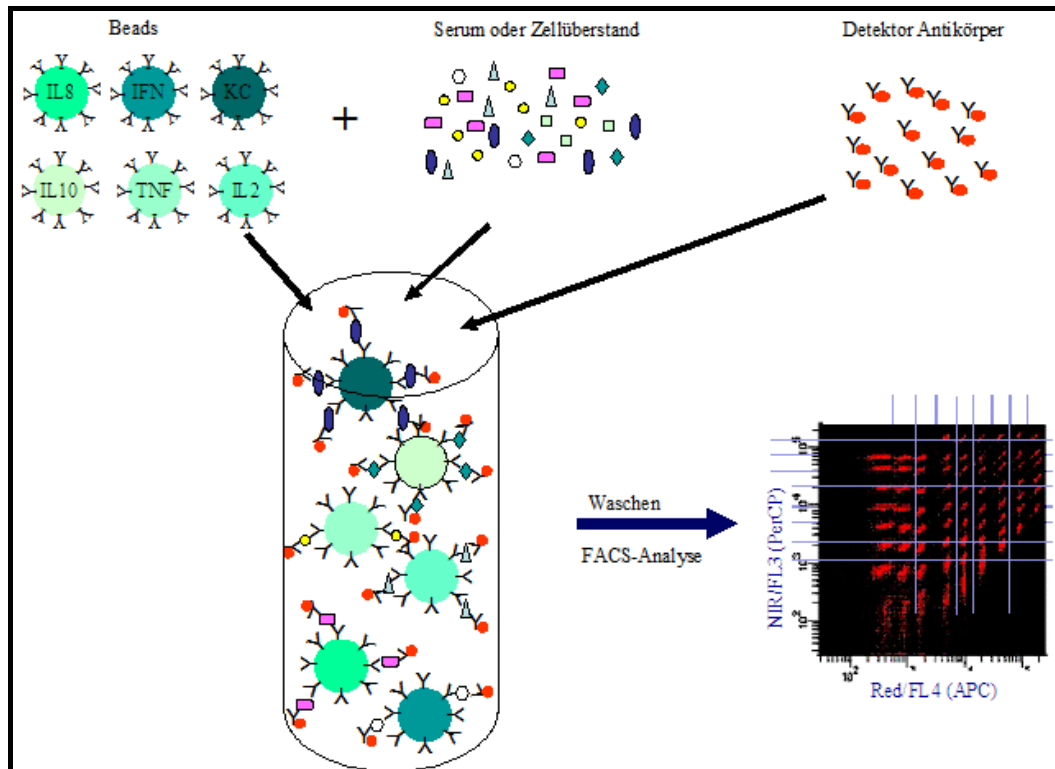


Abbildung 2.2. CBA-Assay zur Cytokinmessung. Die Probe (Zellüberstand oder Serum) werden mit den Beads, an die jeweils ein AK gegen ein spezifisches Cytokin gekoppelt ist, für 1 Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend werden die Detektor-AK gegen die jeweiligen Cytokine zugegeben und für eine weitere Stunde bei RT im Dunkeln inkubiert. 1 ml Waschpuffer wurde zugegeben und die Beads bei 200 g und RT für 5 min abzentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig ausgeschüttet und die Beads in 300 μ l Waschpuffer resuspendiert. Die Beads wurden mittels BD FACSArray™ Bioanalyzer am FACSCanto bestimmt und die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACP Array software (BD Biosciences).

2.2.4.7. β -Lactamase-Assay

Das Substrat für β -Lactamase, CCF4-AM (Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein (Typ 4)-Acetoxymethyl), wurde von Invitrogen bezogen. CCF4-AM wurde in DMSO in einer Stammlösung von 1 mM gelöst, aliquotiert (20-40 μ l Aliquots) und bei -20°C licht geschützt gelagert. Die Beladung der Zellen mit dem Substrat wurde nach dem Protokoll von Invitrogen durchgeführt.

Die *6 X Substrate Loading Solution* wurde vor Gebrauch frisch angesetzt (ist für ca. 12h stabil): 6 μ l CCF4-AM wurden zu 60 μ l Solution B (100 mg /ml Pluronic-F127 surfactant in DMSO, 0,1 % Acetic acid –Essigsäure-) zugegeben und gut gemischt; anschließend wurden 934 μ l Solution C (24% w/w PEG 400, 18% TR-40 in H_2O) zugegeben und gut gemischt.

Für die Bestimmung der β -Lactamase-Aktivität in Zellen (wie DCs und Makrophagen) wurde Probenecid (siehe Bereitung der Stocklösung unten) in einer Endkonzentration von 2,5 mM und die doppelte Menge an CCF4-AM (12 μ l) zu der *6 X Substrate Loading Solution*

zugegeben. Probenecid ist ein Anionen-Inhibitor, welcher den Rücktransport von CCF4 aus der Zelle inhibieren soll.

Aus der *6 X Substrate Loading Solution* wurde durch Verdünnung mit PBS *1 X Substrate Loading Solution* hergestellt.

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und in *1 X Substrate Loading Solution* aufgenommen. Wenn die Beladung in einem Eppendorf-Gefäß stattfand, so wurden die Zellen im Substrat resuspendiert. Es wurden 1 ml *1 X Substrate Loading Solution* pro Well einer 6-Wellplatte bzw. pro 1×10^6 Zellen zugegeben.

Die Zellen wurden 1 bis 2 Stunden bei RT, im Dunkeln und unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit 3,7% Formaldehyd fixiert. Falls die Färbung von Zelloberflächenantigenen folgen sollte, so wurden die Zellen nicht fixiert. Für FC-Blokierung und Immunfärbung wurden Puffern mit 2,5 mM Probenecid benutzt (siehe Abschnitt 2.2.4.8). Die Zellen wurden im FACS Cyan ADP-LX analysiert und mithilfe der FlowJo-8.4.6 Software (Tree Star Inc; San Carlos, CA, USA) ausgewertet.

Für Analysen am Fluoreszenz-Mikroskop wurden die Deckgläschen (auf denen die Zellen befanden) in Fluoprep-Tropfen auf Objektträger geklebt, ca. 5-10 min bei 37°C getrocknet und die Ränder mit Nagellack abgedichtet. Die Proben wurden bis ihrer Analyse bei 4°C gelagert. Die Analyse der Lactamase Aktivität erfolgte durch Anregung der Zellen bei 409 nm. Lactamase-Aktivität resultiert in eine Emission bei 447 nm (blau). Das Fehlen einer Lactamase-Aktivität zeigt sich an der Emission bei 520 nm (grün).

CCF4-AM bestehen aus zwei Fluorophoren: Hydroxycoumarin und Fluorescein, die über ein Cephalosporin-Molekül miteinander verbunden sind. Im intakten Substrat führt die Anregung von Coumarin (Donor) bei 409 nm zu einem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) auf Fluorescein (Akzeptor). Dadurch wird Fluorescein angeregt und strahlt grünes Licht aus (detektierbar bei 520 nm). Die β -Lactamase katalysiert die Hydrolyse des Substrats, was zur Trennung vom Donor (Coumarin) und Akzeptor (Flourescein) und damit zur Unterbrechung des FRET führt. Die Anregung des Donors (Coumarin) führt dann zur Emission vom blauen Licht (detektierbar bei 447 nm). Weitere Details zur Funktionsweise der β -Lactamase sind im Abschnitt 3.3.2. aufgeführt.

Probenecid (ca. 180 mM) wurde wie folgt vorbereitet:

25g Brobenecid (Sigma, Kat No. P-8761; MW = 285.4) wurden in 219 mL einer 400 mM NaOH-Lösung resuspendiert und gut gemixt, anschließend wurden 219 mL eines 100 mM

Natrium-Phosphat-Puffers (pH 8,0) zugegeben und der pH auf 8,0 mit 1 M HCl und/oder 1 M NaOH eingestellt. Niederschlag wurde durch Mixen aufgelöst. 1 ml Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

2.2.4.8. Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS)-Analyse

Vor der Färbung der Zellsuspension mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene (Oberflächenmarker), wurden die Fc-Rezeptoren blockiert (siehe Abschnitt 2.2.4.5.). Für die Färbungen gegen die Oberflächenantigene wurden spezifische Antikörper eingesetzt, die mit FITC, PE oder PE-Texas Rot konjugiert waren. Die Antikörper und Fc-Blocker wurden in PBS/1% BSA/0.01% NaN₃ (PBA) verdünnt. Die Antikörper wurden 1:100 verdünnt. Falls die Fc-Rezeptorblockierung bzw. die Oberflächenfärbung nach der Beladung der Zellen mit dem β -Lactamase-Substrat (2.2.4.6) erfolgen sollte, so wurde dem Puffer 2,5 mM Probenecid zugefügt. Nach der Fc-Rezeptorblockierung wurden die Zellen bei 200g / 4°C für 5 min abzentrifugiert, der Überstand entfernt und die Antikörper-Lösung zugegeben. Die Proben wurden 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend 2 x mit Waschpuffer (PBS/1% BSA/0.01% NaN₃ und ggf. 2,5 mM Probenecid) behandelt. Die Zellen wurden mit 3,7% Formaldehyd/PBS fixiert, dann 2 x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in Waschpuffer aufgenommen und bis zu ihrer FACS-Analyse bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte mithilfe der FlowJo-8.4.6 Software (Tree Star Inc; San Carlos, CA, USA).

2.2.5. Biochemische Methoden

2.2.5.1. Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden 1 x in PBS gewaschen und in kaltem Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2% Chaps or 1 % Triton X-100) aufgenommen und 30 min. auf Eis inkubiert. Für 1×10^6 Zellen wurden jeweils 100 μ l Lyse-Puffer eingesetzt. Unlösliches Material wurde bei 11000-16000 g / 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand (das Zelllysate) wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.5.2. Herstellung von Gewebelysaten

Je 50 mg Mausgewebe wurden in 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1-1,5 ml kaltem RIPA-Puffer/ Protease-Inhibitoren überführt. Zu jedem Gefäß wurde ein Stahlkugeln (*Stainless Steel Beads*, 5 mm Durchmesser, Qiagen) zugegeben und die Organproben wurden 3 min in einem Vibrator bei einer Amplitude von 90 (Retsch MM2000) durch Schütteln homogenisiert. Die Proben wurden auf Eis für 30 min inkubiert, anschließend bei 10000-14000g / 4°C für 30 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schock-gefroren und bei -70°C gelagert.

Die Proteinmenge wurde mittels BCA Protein Assay Kit (Pierce) ermittelt.

RIPA-Puffer:

SDS:	0,1 %
Na-Deoxycholate	1 %
Triton X-100:	1 %
Tris-HCl (pH 8):	50 mM
NaCl:	150 mM
EDTA:	10 mM
NaF	20 mM

Unmittelbar vor Gebrauch wurde Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma, P8340) frisch zugegeben.

2.2.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Zelllysaten wurde der BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet. Der Test wurde nach der Vorschrift des Herstellers durchgeführt.

2.2.5.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und Westernblotanalyse

Es wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. Zwei Gele mit unterschiedlichen pH-Werten wurden übereinander geschichtet: ein weitmaschiges Sammelgel, das zur Konzentrierung der Proteine dient, und das engmaschige Trenngel, in dem die Proteine schließlich getrennt werden. An der Grenzfläche beider Gele entsteht zunächst eine elektrische Feldspannung.

Gleiche Proteinlysatsmengen wurden mit 2 x Probenpuffer, der 7 % β -Mercaptoethanol enthielt, versetzt und für mindestens 5-15 min bei 65°C geschüttelt. Die Proben wurden auf ein 12 % SDS-PAGE aufgetragen und bei RT und einer konstanten Stromstärke von 20-40 mA aufgetrennt. Bis zum Erreichen des Trenngels wurde zunächst eine Stromstärke von 10-20 mA eingesetzt. Anschließend wurde die Protein vom Gel auf eine 0,45 μ m Nitrocellulose Membran (Schleier und Schüll) mittels Westernblot transferiert. Die Membran wurde in 5 % Milchpulver (in PBS und 0,1 % Tween 20) geblockt und anschließend mit dem primären, dann dem sekundären Antikörper angefärbt. Die Antikörper wurden 1:500 in PBS (mit 10% FCS und 0,1 % Tween 20) verdünnt. Die Membran wurde in 1xPBS, 0,1 % Tween 20 gewaschen.

Sammelgel (4 % Acrylamid) 300 ml Stock:

39 ml 30 % (w / v) Acrylamid, 0,8 % (w / v) N, N'-Methylenbisacrylamid

75 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

auf 300 ml mit H₂O aufgefüllt und bei 4°C gelagert.

Vor Gebrauch 0,1 % SDS zugefügt. Für die Katalyse der Polymerisation wurden 15 μ l TEMED (pro 10 ml) eingesetzt. Durch Zugabe von 50 μ l 10 % APS wurde die Polymerisierung gestartet.

Trenngel (12 % Acrylamid)

1,9 ml 30 % (w / v) Acrylamid, 0,8 % (w / v) N, N'-Methylenbisacrylamid

1,3 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

49,2 μ l 0,1 % SDS

2 μ l TEMED

14 μ l 10 % APS.

1,7 ml H₂O

Diese Angaben gelten für ein kleines SDS-PAGE (Biorad-Minigelkammer)

2 x Proben puffer:

10 ml 10 % SDS, 10 ml 100 % Glycerol, 12,5 ml 0,5 M Tris (pH 6,8), 17,5 ml H₂O,

einige Kristalle Bromphenolblau.

Detektionslösung (ECL):

Kurz vor dem Gebrauch wurden die Detektionslösungen 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt und auf der Membranoberfläche gleichmäßig verteilt (Schütteln vermeiden)

benötigte Reagenzien:

Luminollösung: 250 mM Luminol (3-Aminophthalhydrazide bei Fluka) in DMSO

z.B: 0,44 g Luminol wurden in 10 ml DMSO aufgenommen (ca. 250mM) und in 1 ml Aliquots bei -20°C gefroren (dunkelgehalten).

p-Cumarsäurelösung: (p-Coumaric acid Luminol; bei Fluka): 90 mM in DMSO

0,15 g p-Cumarsäure wurden in 10 ml DMSO (90 mM) aufgenommen und 440 µl Aliquots bei -20°C gefroren.

1M Tris-HCl pH 8,5 wurde steril filtriert.

30 % H₂O₂ (Wasserstoffperoxid, Hydrogenperoxide)

Detektionslösung 1: dunkel halten bei 4°C

70 ml H₂O (autoklaviertes Seralwasser)

10 ml 1M Tris-HCl pH 8,5

1 ml Luminol (1 Aliquot, siehe oben: benötigte Reagenzien)

0,44 ml p-Cumarsäure (1 Aliquot, siehe oben)

auf 100 ml mit H₂O auffüllen

Detektionslösung 2: bei 4°C halten

70 ml H₂O (autoklaviertes Seralwasser)

10 ml 1M Tris-HCl pH 8,5

60 µl H₂O₂

auf 100 ml mit H₂O auffüllen.

2.2.5.5. Luciferase-Assay

Aus den verschiedenen Zelllinien wurde die gleiche Anzahl von Zellen in PBS gewaschen, in Luciferase-Lyse-Puffer (Luc-Puffer) resuspendiert und auf Eis für 15-30 min inkubiert. Für 1×10^6 Zellen wurden jeweils 100 µl Luc-Puffer eingesetzt. Unlösliches Material wurde bei 11000-16000 g, bei 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei -20°C gelagert. Die Proteinmenge wurde mittels BCA Protein Assay Kit (Pierce) bestimmt. Damit BSA die Bestimmung der Proteinkonzentration nicht beeinträchtigt, wurde es erst nach der Proteinmessung zu einer Endkonzentration von 0,5% zu den Lysaten zugegeben. Gleiche Proteinmengen (10-60 µg) wurden aus den unterschiedlichen Zelllinien in

weiße Mikrotiterplatte (für Luminometer) überführt und das Volumen wurde mit Luc-Puffer/0,5%BSA auf 50 oder 100 µl angepasst. 1 x Volumen Luciferase-Reagenz wurde auf die Zellysate zugegeben und die Chemilumineszenz wurde sofort mit Hilfe eines MicroLumatPlus LB96V Microplate Luminometer (EG&G Berthold) gemessen. Von jeder Zelllinie wurden drei Proben eingesetzt und die Versuche wurden mindestens dreimal wiederholt.

Luciferase-Lyse-Buffer (Luc-Buffer):

80 mM K_2HPO_4 ; 20 mM KH_2PO_4 ; 2 mM EDTA; 1% Triton X-100; pH auf 7,8 mit 1 M KOH eingestellt. DTT wurde frisch zugesetzt (Endkonzentration 1 mM).

Luciferase-Reagenz:

20 mM Tricine; 1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$; 0,1 mM EDTA; pH auf 7,8 mit 1 M HCl eingestellt; 33,3 mM DTT; 270 mM Li_3 -Coenzyme A; 470 mM D-luciferin; 530 mM Mg-ATP.

2.2.5. Infektionsversuche

2.2.5.1. Kultivierung und Lagerung von *Y. enterocolitica*

Yersinia-Kulturen Ascarvierung wurden bei 27 °C in flüssigem LB-Medium unter Schütteln, oder auf CIN-Yersinia-Agarplatten (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland), kultiviert.

Zur Lagerung der Bakterien, wurden 100 ml LB-Medium mit *Y. enterocolitica* angeimpft und über Nacht bei 27°C inkubiert. Die Bakterien wurden auf Eis für 10 min inkubiert, dann bei 4000 g für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 ml LB-Medium/15% Glycerin resuspendiert, in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Nach einem oder mehreren Tagen, wurden aus dem Stock 100 µl entnommen und daraus Verdünnungsreihen auf CIN-Agarplatten ausplattiert und bei 27°C für 24-40 Stunden inkubiert. Die Anzahl der Kolonien wurde gezählt und die CFU (*colony forming units*) pro 100 µl *Yersinia*-Probe bestimmt. Die CFU der eingefrorenen Yersinia-Proben lag in der Regel unter der oben beschriebenen Bedingung zwischen 1×10^8 und 1×10^9 pro 100 µl.

2.2.5.2. Infektion der Mäuse mit *Y. enterocolitica*

Ein Aliquot der tiefgefrorenen *Y. enterocolitica*-Proben wurde auf Eis aufgetaut, die Bakterien bei 4°C und 4000g für 10 min abzentrifugiert und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Bakterien wurden mit PBS verdünnt, um eine Konzentration von 1×10^4 bis 6×10^4 CFU pro 100 µl für intraperitoneale Infektion und $5-10 \times 10^8$ CFU pro 30 µl für orale Infektion zu erreichen. Den Mäusen wurden 100 µl der Yersinien-Suspension intraperitoneal inokuliert. Bei der oralen Infektion wurde den Mäusen 6 h vor Versuchbeginn das Futter entzogen, um eine Störung der Resorption und Invasion der Erreger durch Nahrungsbestandteile zu verhindern. Den Mäusen wurde anschließend die Infektionsdosis in einer 30 µl PBS-Lösung mit Hilfe einer Pipette verfüttert. Dazu wurde die Pipettenspitze seitlich in den Mundraum eingeführt, sodass die Tiere selbständig die Bakteriensuspension trinken können. 2 h nach der oralen Applikation stand den Tieren wieder Futter zur Verfügung. Trinkwasser stand den Tieren die ganze Zeit zur Verfügung. Die Mäuse wurden täglich beobachtet. Am Ende des Infektionsversuchs wurden die Mäuse getötet und die Milz für Präparation der Einzelzellsuspension (siehe Abschnitt 2.2.4.2.). Zur Bestimmung der Anzahl der infizierenden Bakterien wurden Milz und Leber entnommen und wie im folgenden Kapitel weiter verfahren.

2.2.5.3. Bestimmung der Yersinienanzahl (cfu) in Milz und Leber

Nach Tötung der infizierten Mäuse durch CO₂- Inhalation wurden Milz und Leber entnommen, in 2 ml Reaktionsgefäße mit PBS überführt und auf Eis gestellt. Zu jedem Organ wurde ein Stahlkugelchen (Stainless Steel Beads, 5 mm Durchmesser, Qiagen) zugefügt und die Organproben 3 min lang in einem Vibrator bei einer Amplitude von 90 (Retsch MM2000) geschüttelt. Die Organe wurden durch Scherkraft homogenisiert. Verdünnungsreihen der Organsuspension wurden auf CIN- Agarplatten ausplattiert und bei 27°C für 24 bis 40 Stunden inkubiert. Die Kolonien wurden gezählt, und die mittleren CFU-Werte aus den verschiedenen Verdünnungen für ein Organ ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Die IL10-EGFP-Reportermaus

Beim ersten Schritt für die Konstruktion einer IL-10 Reportermaus wurde das Reportergen EGFP unmittelbar nach der 5'UTR und vor dem Start-Codon des Exon1 im IL-10-Lokus eingebaut. Ein Stop-Codon am Ende der EGFP-codierenden Sequenz soll dafür sorgen, dass die Translation von EGFP hier endet und kein EGFP-IL-10-Fusionsprotein entsteht. Zusätzlich soll ein Polyadenylierungssignal (pA) aus dem Simianvirus (SV)40 zwischen der EGFP-Sequenz und dem Exon1 von IL-10 eingebaut werden, um einerseits die Transkription hier zu beenden und andererseits die Expression von EGFP zu stabilisieren. Da hiermit die IL-10-Expression unterbunden wird, soll nur mit etablierten heterozygoten IL-10-EGFP-Mäusen gearbeitet werden, um die IL-10-Expression durch ein intaktes Allel zu sichern. Die IL-10-exprimierenden Zellen sollen damit durch die Expression von EGFP markiert und leicht detektierbar werden.

Die Integration von EGFP in die gewünschte Stelle im IL-10-Lokus embryonaler Stammzellen (ES) wird über einen Targeting-Vektor erreicht, welcher in die ES-Zellen durch Elektroporation transfiziert wird. Wenn der Targeting-Vektor über ausreichend lange homologe 5'- und 3'-IL10-Arme verfügt, kann er über homologe Rekombination genau in den Sequenz-Bereich integriert werden, zu dem die Arme Homologie aufweisen. Zur Selektion der erfolgreich transfizierten ES-Zellen soll das Targeting-Konstrukt einen Selektionsmarker (z.B. Neomycin-Kassette) enthalten. Nach Isolierung und Restriktionsspaltung der genomischen DNA G418-resistenter ES-Klone, wird sie mittels Southernblot und Hybridisierung mit entsprechender externer Sonde (die außerhalb des Targeting-Konstrukts hybridisiert) auf homologe Rekombination / Insertion des Reportergens geprüft. Bei den homolog rekombinanten ES-Klonen soll ein DNA-Fragment abweichender Größe, im Vergleich zu ES-Zellen mit dem Wildtyp (WT)-Allel, generiert werden. Um die Expression von EGFP nicht zusätzlich zu beeinflussen, soll nach der erfolgreichen homologen Rekombination, der Selektionsmarker (Neomycin-Kassette) eliminiert werden. Hierfür soll die Kassette mit kurzen, 34 bp langen, DNA-Erkennungssequenzen (LoxP oder Frt) für spezifischen Rekombinasen flankiert werden. Die LoxP-Sequenzen werden von der Cre-Rekombinase, die Frt-Sequenzen von der Flp-Rekombinase erkannt, gespalten und die Enden wieder ligiert, was in die Deletion der Neomycin-Kassette führt. Die Expression der entsprechenden Rekombinase kann direkt in den positiven ES-Zellen durch eine erneute

Transfektion mit einem Rekombinase-exprimierenden Vektor erfolgen. Alternativ kann die Selektionskassette erst nach der Generierung der transgenen Maus, durch Kreuzung mit Rekombinase-produzierenden Mäusen eliminiert werden. In dieser Arbeit wurde die Neomycin-Kassette durch die zweite Methode eliminiert. Hiermit sollen weitere Zell-Passagen und Stress, welche die Pluripotenz und Keimbahn-Transmissionseffizienz der ES-Zellen beeinträchtigen, verhindert werden.

3.1.1. Generierung des IL10-EGFP-Targeting-Konstrukts

Das IL-10-Gen liegt bei der Maus auf Chromosom 1 und umfasst 5 Exons. Das Startcodon befindet sich in Exon 1. Das Polyadenylierungssignal und der 3'-UTR folgen Exon 5.

Der Ausgangspunkt für die Klonierung des Targeting-Vektors war das Plasmid pBluescript-II-KS. Alle für die Klonierung verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.1.6. aufgelistet. Die homologen Arme wurden aus dem Vektor pTZ18R10 (zur Verfügung gestellt von Prof. Werner Müller) amplifiziert. pTZ18R10 enthält eine ca. 7,1 kb große genomische Sequenz von IL-10, die den Promoter-Bereich und alle Exons und Introns einschließt. Um das IL10-EGFP-Targeting-Konstrukt zu generieren, wurde die im Folgenden beschriebene Klonierungsstrategie durchgeführt:

Der 4,7 kb große 3'-homologe Arm wurde aus dem pTZ18R10 mittels der Primer IL10-E1-*SalI*-F und IL10-6320-*XhoI*-B (siehe Abschnitt 2.1.6.) amplifiziert, mit *SalI* und *XhoI* verdaut, gereinigt und anschließend in pBluescript-II-KS über *SalI* und *XhoI* kloniert. Der so generierte Zwischenvektor wurde pBS-4,7kb3'IL10 genannt. Der 3'Arm beginnt mit dem Startcodon von IL-10.

Das EGFP-SV40pA-Fragment wurde samt der *Kozak consensus translation initiation site* aus dem pEGFP1-Vektor mittels der Primer EGFP1-*SacII*-F und EGFP1-*PvuI*-B amplifiziert, nur mit *SacII* verdaut, gereinigt und anschließend in pBS-4,7kb3'IL10-Vektor über *SacII/EcoRV* kloniert. Das so generierte Zwischenvektor wurde pBS-EGFPpA-4,7kb3'IL10 genannt.

Als nächstes wurde der 2,7 kb große 5'-homologe Arm aus dem pTZ18R10 mittels der Primer IL10-2,7kb-5'-*SacII*-F und IL10-E1-*SacII*-B amplifiziert, mit *SacII* verdaut, gereinigt und anschließend in pBS-EGFPpA-4,7kb3'IL10 über *SacII*-Schnittstelle kloniert. Der so generierte Vektor wurde als pBS-2,7kb5'IL10-EGFPpA-4,7kb3'IL10 bezeichnet. Der 5'Arm enthält den IL-10-Promoter und an seinem 3'Ende die 5'UTR von IL-10.

Eine *Frt*-flankierte Neomycin-Kassette wurde aus dem Konstrukt pBluescript-*frt*-Neo-*frt* mittels *SalI*-Verdau herausgeschnitten und die Überlappenden Enden wurden durch die Behandlung mit T4-DNA-Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurde die Kassette über

EcoRV in pBS-2,7kb5'IL10-EGFPpA-4,7kb3'IL10 kloniert. Das Targeting-Konstrukt wurde als pBS-2,7kb5'IL10-EGFPpA-FrtNeoFrt-4,7kb3'IL10 (IL10-EGFP-Targeting-Konstrukt) bezeichnet. Nach einer ersten Elektroporation dieses Konstrukts in ES-Zellen waren alle untersuchten 360 Klone negativ. Darauf wurde das Konstrukt mit einer Herpes-Simplexvirus-Thymidinkinase (HSV-TK) als zusätzlichen negativen Selektionsmarker im Anschluß an den 3'-Arm des Targeting-Konstrukts erweitert. HSV-TK wird der Einfachheit halber als TK-Kassette bezeichnet.

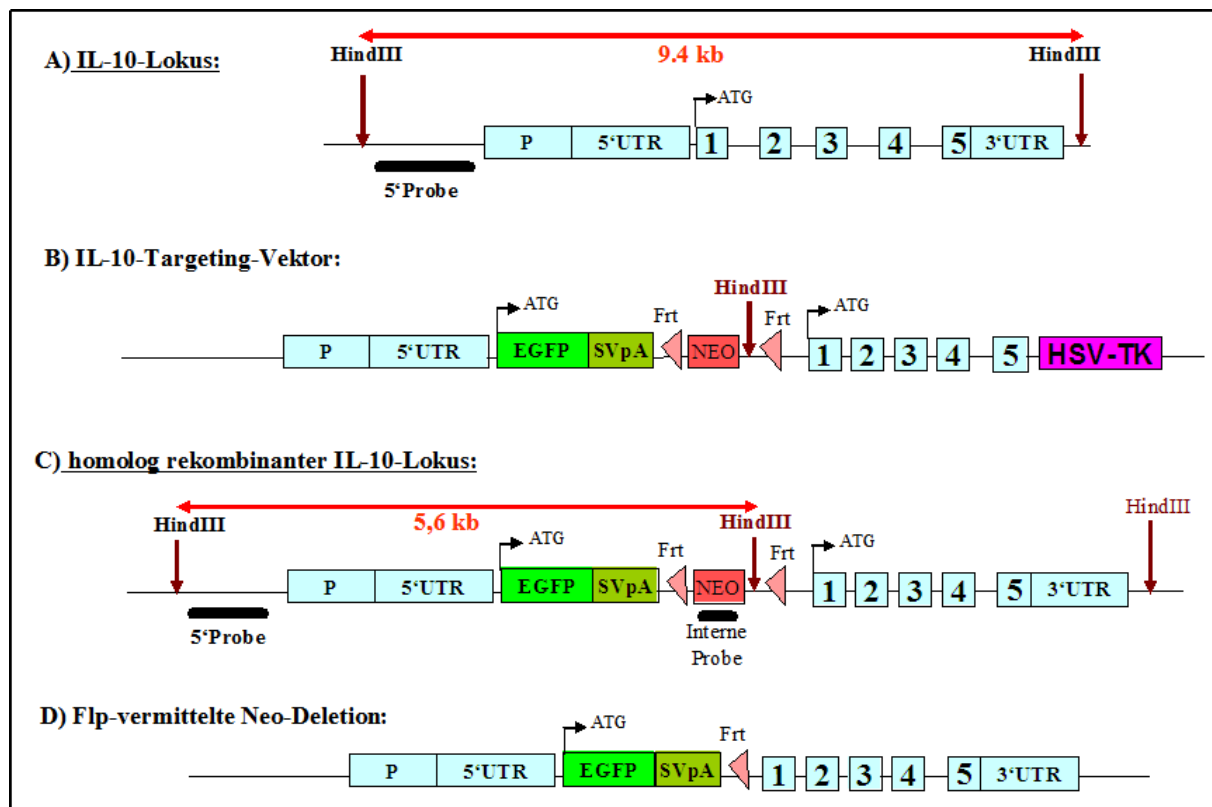


Abbildung 3.1. Gen-Targeting-Strategie zur Herstellung der IL10-EGFP transgenen Maus. **A)** Organisation des IL-10-Gens der Maus. **B)** IL10-EGFP-Targeting-Vektor enthält eine EGFP-Sv40pA-Sequenz, eine Frt-flankierte Neo-Kassette als positive Selektionsmarker, einen 2,7 kb 5'-Arm, einen 4,7 kb 3'-homologen Arm, und eine TK-Kassette als negativen Selektionsmarker. **C)** Homolog rekombinierter IL-10-Lokus mit Darstellung der für die Charakterisierung der ES-Klone verwendeten Hybridisierungsproben (externe 5'Probe und interne Neo-Probe), sowie der verwendeten *HindIII*-Restriktionsstellen und der erwarteten Fragmentgrößen (9,4 kb für Wildtyp Allel und 5,6 kb für das modifizierte Allel) nach Southernblot-Analyse. **D)** Deletion der Neomycin-Kassette nach der Verpaarung der IL10-EGFP-FrtNeo-Mäuse mit Flp-exprimierenden Mäusen.

Die HSV-TK phosphoryliert Nucleosid-Analoga, wie z.B. Ganciclovir und FIAU, im Gegensatz zum endogenen Enzym mit einer ca. 200fach höheren Substratspezifität. In neu synthetisierte DNA eingebautes Ganciclovir oder FIAU führt zum Kettenabbruch bei der DNA-Replikation, und dadurch zum Tod der Zellen, die das HSV-TK-Gen integriert haben. Die ca. 2,8 kb lange TK-Kassette wurde aus dem pEasyFlox-Plasmid mittels *HindIII/Scal* verdaut. Die Überhang-Enden wurden mittels T4-DNA-Polymerase aufgefüllt und das HSV-

TK-Fragment über die ebenfalls aufgefüllte *XhoI*-Schnittstelle des pBS-2,7kb5'IL10-EGFPpA-FrtNeoFrt-4,7kb3'IL10-Konstrukts eingebaut. Durch das Auffüllen der *XhoI*-Schnittstelle wurde im nun als pBS-2,7kb5'IL10-EGFPpA-FrtNeoFrt-4,7kb3'IL10-TK (IL10-EGFP-TK-Targeting-Konstrukt) bezeichneten Konstrukt eine *XhoI*-Schnittstelle im Anschluß an die TK-Kassette wiederhergestellt. Diese Restriktionsschnittstelle diente zur Linearisierung des Konstrukts für die Elektroporation. Die einzelnen Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalysen überprüft. Das resultierende ca. 16 kb große IL10-EGFP-TK-Targeting-Konstrukt wurde sequenziert, um die Sequenz auf Fehler zu überprüfen. Abbildung 3.1 zeigt eine schematische Darstellung des IL-10-Gens, des targeting-Konstrukts, der homologen Rekombinationsergebnisse und die zur Identifizierung der rekombinanten ES-Zellkone verwendeten Restriktionsfragmentlängen-polymorphismen (RFLP). Die homologe Integration des Targeting-Konstrukts wird durch Southernblot Analyse geprüft. Das rekombinante Allel wies nach *HindIII*-Verdau und Hybridisierung mit der externen 5'-Probe das erwartete Fragment der Größe 5,6 kb, welches um 3,8 kb kleiner als das Wildtyp-Fragment (9,4 kb) ist, auf.

3.1.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-EGFP-ES-Klone

Das IL10-EGFP-Targeting-Konstrukt wurde mit *XhoI* linearisiert und in ES-Zellen durch Elektroporation eingeführt (siehe Abschnitt 2.2.3.3.). In dieser Arbeit wurde die ES-Zelllinie (R1, 129/sv) verwendet. Für die Elektroporation wurden 4×10^7 ES-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden mit ca. 90 µg des linearisierten IL10-EGFP-Targeting-Vektors in PBS gemischt. Die Elektroporation erfolgte bei 0,8 kV, 3 µF und RT (siehe Abschnitt 2.2.3.3.). 360 G418-resistente ES-Klone wurden isoliert, die DNA gereinigt, mit *HindIII* verdaut (siehe Abschnitt 2.2.1.13.). Anschließend wurde die DNA der Southernblot-Analyse mit der externen 5'-Probe, wie im Methodenteil beschrieben ist, unterzogen. Die Analyse ergab, dass bei allen 360 ES-Klonen keine homologe Integration des Targeting-Vektors stattgefunden hat. Um die Rate der homologen Rekombination zu erhöhen, wurde der Targeting-Vektor mit einer zusätzlichen HSV-TK-Kassette als negativer Selektionsmarker im Anschluß an den 3'-Arm des Targeting-Konstrukts erweitert. Wenn das Targeting-Konstrukt über homologe Rekombination in das Wildtyp-IL-10 integriert wird, führt das zur Deletion der TK-Kassette. Wird dagegen das Konstrukt nicht homolog integriert, so wird in der Regel das gesamte Konstrukt, samt der TK-Kassette, eingebaut. Die Thymidinkinase wird somit exprimiert, und vermittelt den Einbau von Ganciclovir oder FIAU in die neusynthetisierte DNA, was die Replikation inhibiert und den Zelltod hervorruft (negative Selektion).

Das erweiterte IL10-EGFP-Konstrukt wurde nach *XhoI* Linearisierung erneut in ES-Zellen elektroporiert. Die ES-Zellen wurden im ES-Medium mit G418 und FIAU kultiviert (siehe Methodenteil). Insgesamt 720 ES-Klone wurden isoliert und analysiert. Davon waren 23 positiv. Zusätzliche Analyse mit der internen Neo-Probe zeigte, dass bei allen positiven Klone das IL10-EGFP-Targeting-Konstrukt nur einmal, in den IL-10-Lokus integriert wurde. In der Abbildung 3.2. sind Southernblot-Ergebnisse zu einigen ES-Klonen exemplarisch dargestellt.

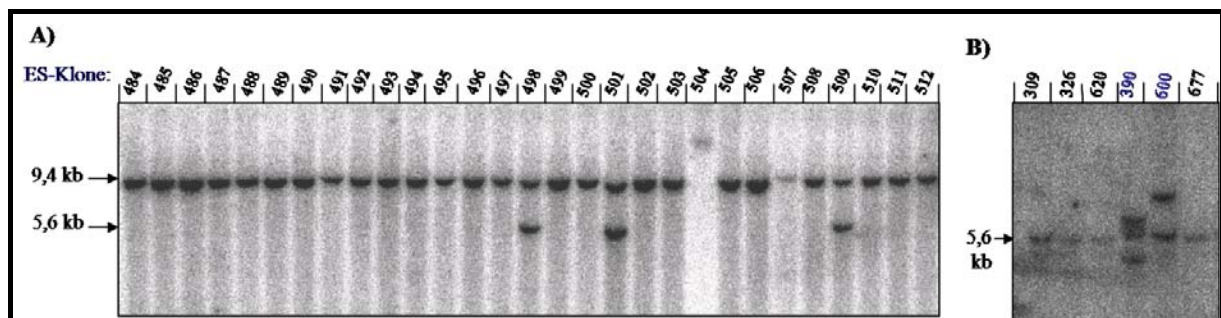


Abbildung 3.2. Darstellung der Southernblot-Analyse einiger ES-Zellklone. (A) Genomische DNA von ES-Zellklonen wurde mit *HindIII* verdaut und in der Southern Blot Analyse mit der externen 5'Probe (siehe Lage der Sonde in Abb. 3.1.) hybridisiert. Die positiven Klone zeigen zwei Banden. Die nach unten verschobene Bande entstand durch homologe Integration des IL-10-EGFP-Allels im IL10-Lokus. (B) Southernblot-Analyse mit der internen Neo-Probe für ausgewählte positive und negative ES-Klone. Die negativen Klone (360 und 600) zeigen jeweils 3 und 2 genomische Integrationen des Targeting-Konstrukts. Die positiven ES-Klone zeigen dagegen eine einzige Integration des Targeting-Konstrukts.

3.1.3. Etablierung der IL10-EGFP-Mauslinie

Vier der positiven ES-Klone wurden in C57Bl/6J-Blastozysten injiziert. Die Blastozysten wurden dann in den Uterus scheinchwangerer CD-1-Mäuse (Albinos) implantiert. Fellchimäre Mäuse unter den Nachkommen wurden untereinander verpaart. Die aus dieser Kreuzung resultierenden braunen Mäuse wurden auf Keimbahnbeitragsung der rekombinanten ES-Zellen mittels Southernblot und PCR analysiert (Abbildung 3.3.). Für die PCR-Genotypisierung wurden die Primer IL10-2630F und IL10-3125B (für WT-Allel), sowie die Primer IL10-2630F und IL10-EGFP1-350-B (für das IL10-EGFP-Allel) verwendet (siehe Abschnitt 2.1.6.). Alle vier homolog rekombinanten ES-Klone, die in Blastozysten injiziert wurden, trugen zur Keimzellenbildung bei.

Positive Mäuse wurden mit Flp-Mäusen verpaart, um die Neomycin-Kassette zu deletieren. Die Deletion der Neo-Kassette wurde mittels Southernblot überprüft (Abbildung 3.3.). Die IL10-EGFP-Mauslinie wurde damit generiert. IL10-EGFP-homozygote Mäuse (+/+) wurden durch Verpaarung der heterozygoten IL10-EGFP-Mäuse (+/-) untereinander generiert.

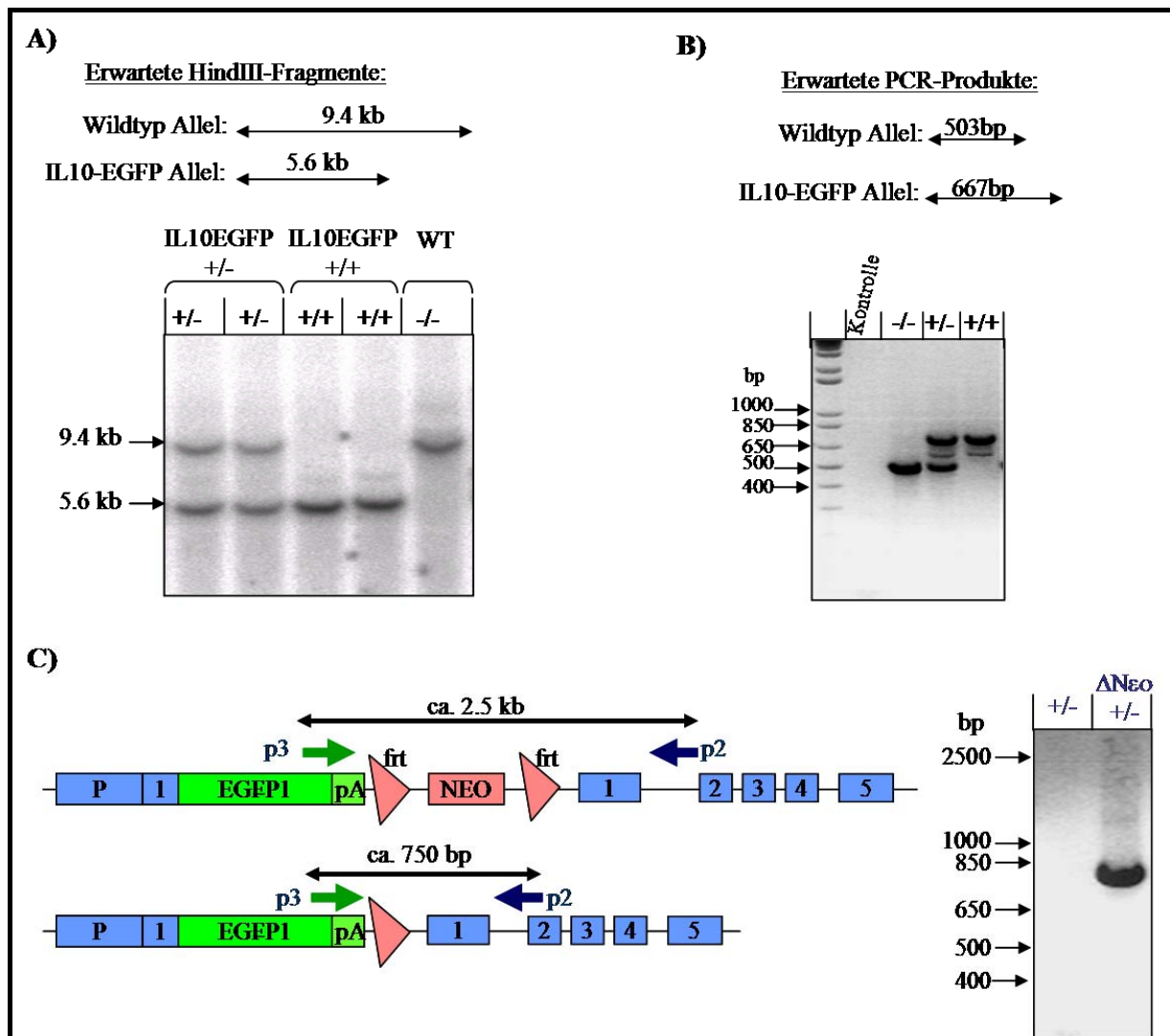


Abbildung 3.3. Analyse genomischer Mausschwanz-DNA der IL10-EGFP-Mauslinie. (A) Genomische Mausschwanz-DNA wurde mit *HindIII* verdaut und in der Southern Blot Analyse mit der externen 5'Probe (siehe Lage der Sonde in Abb. 3.1.) hybridisiert. Die erwarteten Fragmentgrößen für transgene und WT-Mäuse sind dargestellt. Die heterozygoten (+/-) Mäuse zeigen zwei Banden. Die für IL10-EGFP homozygoten Mäuse zeigen nur die 5,6 kb-lange Bande. WT-Mäuse weisen erwartungsgemäß eine Bande bei 9,4 kb auf. (B) PCR-Analyse der genomischen Mausschwanz-DNA. Die erwarteten Fragmentgrößen für transgene und WT-Mäuse sind dargestellt. (C) Die Deletion der Neo-Kassette wurde mittels PCR-Analyse der genomischen Mausschwanz-DNA ermittelt. Die erwartete Fragmentgröße bei erfolgreicher Neo-Deletion ist dargestellt.

3.1.4. Analyse der IL10-EGFP-Mauslinie

Heterozygote transgene Mäuse zeigten keine äußeren oder inneren Merkmalsunterschiede zu Wildtyptieren. Die heterozygoten Mäuse (IL10-EGFP^{+/-}) sind vital und fertil. Ihr Körpergewicht und -größe sowie Fellbeschaffenheit wiesen keine Unterschiede zu WT-Mäusen auf. Die inneren Organe (Milz, Leber, Magen, Herz, Darm, etc.) der transgenen Mäuse und Wildtyptiere zeigten während der gesamten Untersuchungsdauer (12-16 Monate) keine Unterschiede bezüglich ihres Gewichts, ihrer Farbe (Zeichen für z.B. Entzündung) oder Größe.

Die homozygoten Mäuse (IL10-EGFP^{+/+}), da sie IL10-defizient sind, entwickelten erwartungsgemäß (Kühn et al. 1993) spontan eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die sich vom Duodenum bis zum Rektum erstreckte. Sie wiesen reduziertes Gewicht (altersabhängig bis zu 35%) und kürzere Lebensdauer im Vergleich zu WT-Mäusen auf.

3.1.4.1. EGFP-Expressionsstudien mit der IL10-EGFP-Mauslinie

Die Analyse der EGFP-Expression erfolgte mittels Westernblot-Analyse, FACS (Fluorescence activated cell sorting) und Reverse-Transkriptase (RT)-PCR. Zwei Dreier Gruppen von WT-Mäusen und heterozygoten Mäusen (IL10-EGFP^{+/-}) wurden mit 6×10^8 *Yersinia enterocolitica* (WAC-pYV) oral infiziert. *Y. enterocolitica* gehört zu den Erregern, die die Expression von IL-10 induzieren (Sing et al. 2002a; Brubaker Robert, 2003). Fünf Tage nach der Infektion wurden Blut und Organe entnommen. Aus den Blutproben wurden nach Spontangerinnung Serum gewonnen. Aus den Organen wurden Proteinlysate hergestellt. Während in den Seren und Leber-Homogenaten IL-10 mittels CBA-Assay gemessen werden konnte (Abbildung 3.4.B), konnte mit Westernblot von sogar 100 µg Proteinlysaten in allen untersuchten Mausgeweben keine EGFP-Expression detektiert werden (Abbildung 3.4.A).

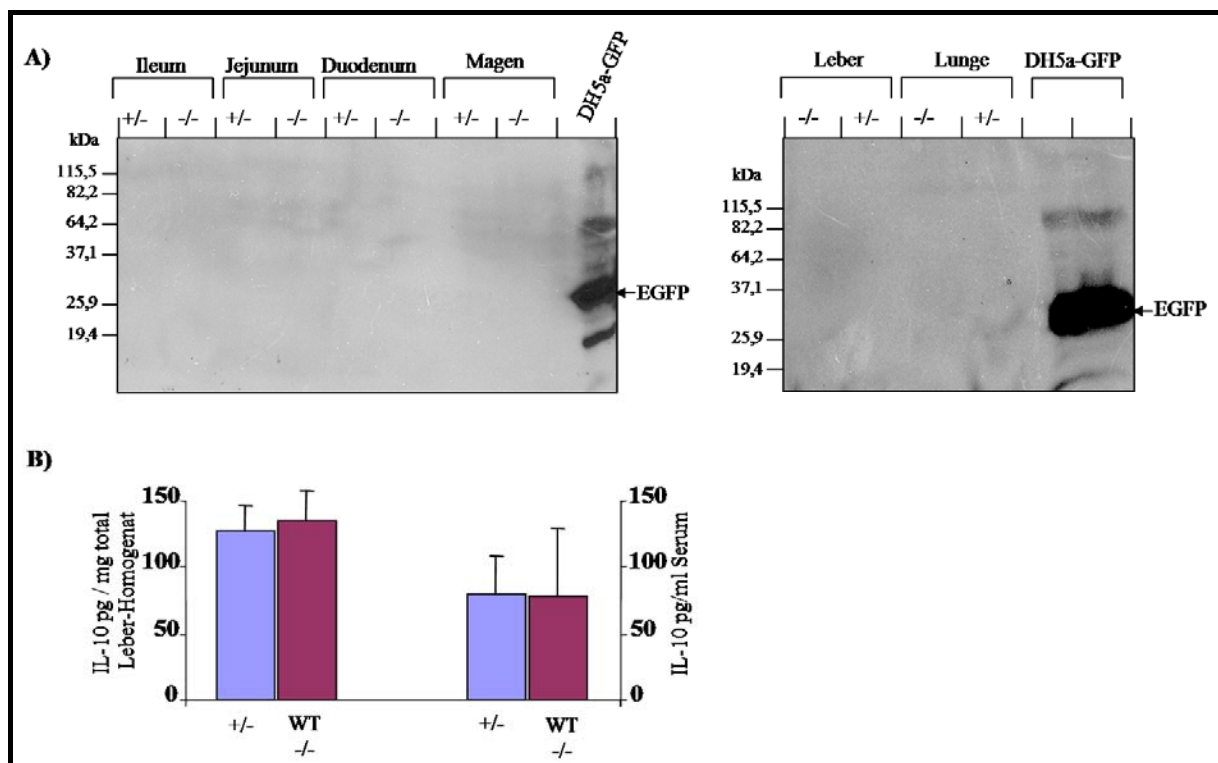


Abbildung 3.4. Expressionsanalyse von EGFP und IL-10 mittels Westernblot und CBA-Assay.

Wildtyp- (^{-/-}) und heterozygote IL10-EGFP (^{+/-}) Mäuse wurden mit 6×10^8 *Y. enterocolitica* (WAC-pYV) oral infiziert. 5 Tage später wurden Serum und Organe entnommen. (A) 100 µg Proteinlysate wurden auf 12% SDS-Gel aufgetrennt. Nach dem Bloten auf eine Nitrozellulosemembran wurde eine Immunfärbung mit einem GFP-Antikörper durchgeführt. Als positive Kontrolle wurden Lysate vom GFP-exprimierenden DH5α *E. coli*-Stamm eingesetzt. (B) die IL-10-Menge im Serum wurde mittels CBA-Assay bestimmt.

Da IL-10 in kleinen Mengen spezifisch in Serum und Leber nachgewiesen wurde, scheint der negative Befund der EGFP-Expression mittels Westernblot mit der schwachen Aktivität des IL-10-Promoters zusammenzuhängen. Als sensitiveres Nachweisverfahren wurde deshalb die FACS-Analyse gewählt.

Zellsuspensionen aus der Milz wurden präpariert und die CD4-T-Zellen mittels Magnetkugelngekoppelten CD4-AK isoliert (siehe Methodenteil). Die T-Zellen wurden mit dem Superagonisten D665 für 3 Tage stimuliert (siehe Abschnitt 2.2.4.4.). D665 ist ein Antikörper gegen CD28, welcher ohne die Beteiligung bzw. Aktivierung des T-Zell-Rezeptors starke mitogene Wirkung auf T-Zellen aufweist. D665 induziert vor allem eine starke Sekretion von IL-10 (Lin et al. 2003).

Die aus Knochenmarkgewonnenen DCs (BMDCs) und Makrophagen (BMDM) (siehe Methodenteil) wurden mit 300 ng/ml LPS für ca. 24 Stunden stimuliert. LPS ist ein starker Stimulus der IL-10-Produktion (Daftarian et al. 1996; Brightbill et al. 2000; Shanley et al. 2000; Liu et al. 2006). Anschließend wurden die stimulierten CD4-T-Zellen, BMDCs und BMDM im FACS analysiert. Während im Überstand von heterozygoten Zellen IL-10 gemessen werden konnte weder in den hetero- noch in den homozygoten Zellen EGFP-Fluoreszenz detektiert werden (Abbildung 3.5.).

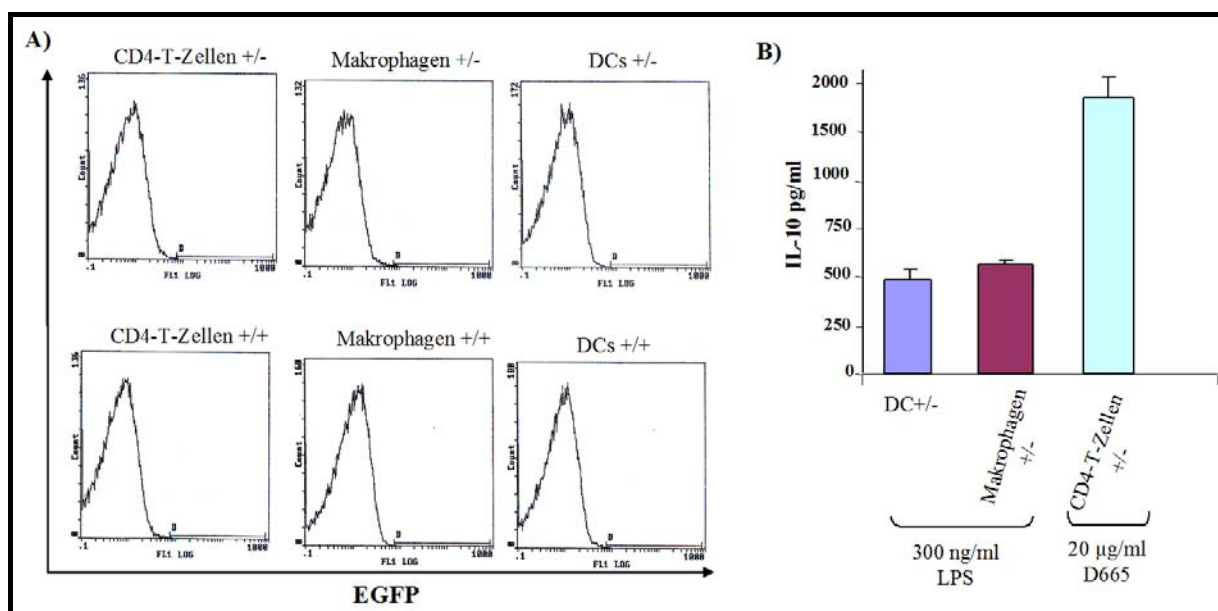


Abbildung 3.5. Analyse der EGFP- und IL-10-Expression in verschiedenen Immunzellen. CD4-T-Zellen wurden aus der Milz heterozygoter (+/-) und homozygoter (+/+) Mäuse isoliert und mit 20 µg/ml des Superagonisten D665 für 3 Tage stimuliert. BMDCs und BMDM aus heterozygoten (+/-) und homozygoten (+/+) Mäusen wurden mit 300 ng/ml LPS für 24 h *in vitro* stimuliert. Anschließend wurden die Zellen im FACS auf grüne Fluoreszenz analysiert (A); und die IL-10-Menge in gesammelten Zellüberständen heterozygoter (+/-) Mäuse mittels CBA-Assay bestimmt (B).

Um auszuschließen, daß die fehlende Detektion von EGFP auf Proteinebene, sowohl mittels Westernblot- als auch FACS-Analysen nicht mit einem möglichen Defekt der EGFP-Expression schon auf RNA-Ebene zusammenhängt, wurde die Expression von EGFP mittels RT-PCR untersucht. Da die Expression von IL-10-mRNA konstitutiv ist (Abbildung 3.6.), muß die Expression von EGFP auf RNA-Ebene genauso detektierbar sein wie die von IL-10. Um neben IL10/EGFP-Gesamttranskript als auch Transkriptfragmente von Zellen der IL10-EGFP-Mäusen nachzuweisen, wurden Primer eingesetzt, die ein Teil von EGFP, ein Hybrid aus EGFP und IL-10, oder ein Teil von IL-10 amplifizieren können. Die Lokalisierung der eingesetzten Primern ist in der Abbildung 3.6. dargestellt. Hinter der EGFP-Sequenz und vor dem Exon1 von IL-10 liegt ein Polyadenylierungssignal aus dem Simianvirus (SV)40. Die Transkription sollte in der Regel hier enden und ein Produkt nur mit den EGFP-Primer synthetisiert werden.

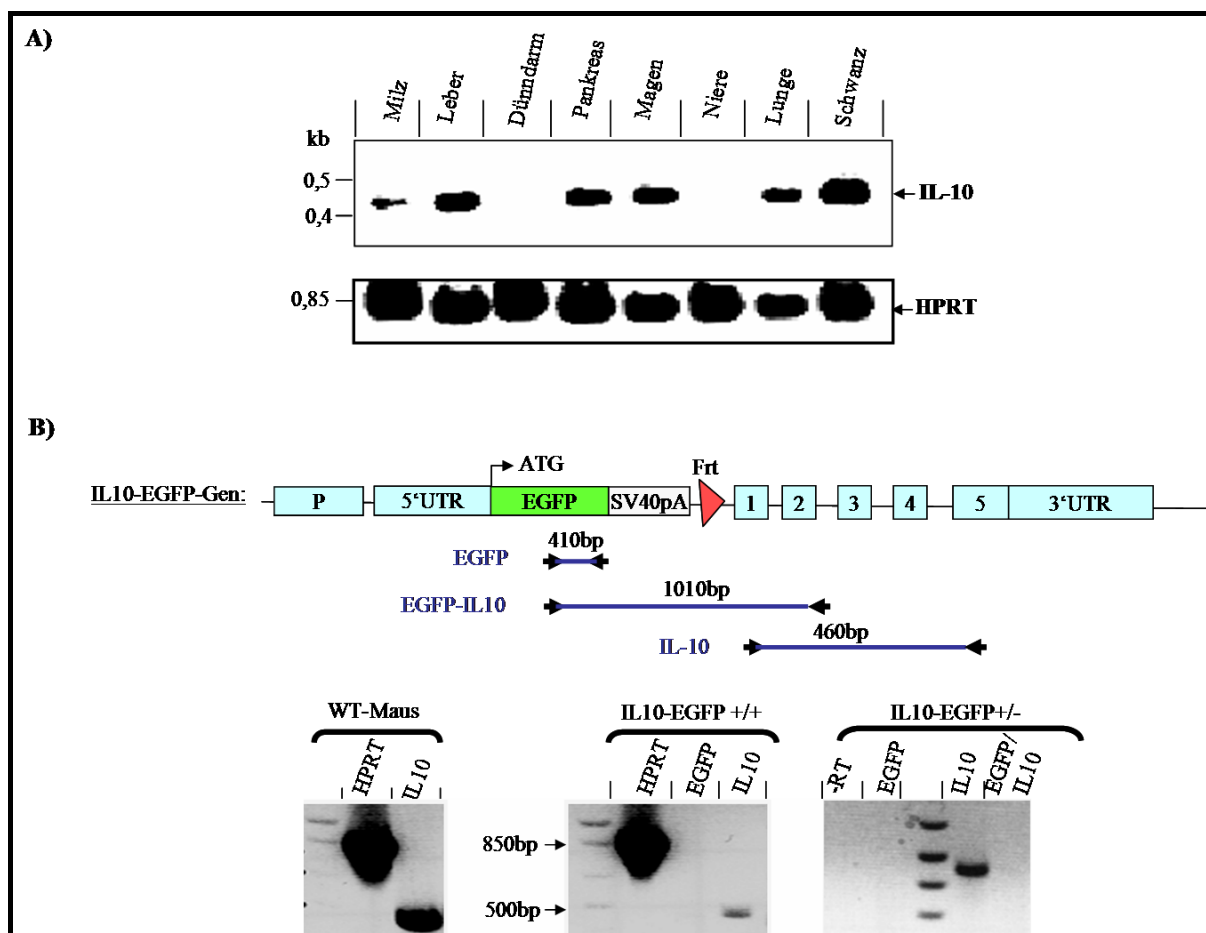


Abbildung 3.6. RT-PCR-Analyse verschiedener Gewebehomogenate von Wildtyp- (-/-), heterozygoten und homozygoten IL10-EGFP (+/-) Mäusen. (A) Gesamt-RNA wurde aus verschiedenen Organen der WT-Mäuse isoliert und cDNA generiert. Die Expression von IL-10 erfolgte mittels einer anschließenden PCR mit den Primern mL10F-RT418 und mL10B-RT418. Als Kontrolle wurde das RT-PCR-Produkt des Transkripts des Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT)-Gens mit den Primern mHPRT-828F1 und mHPRT-828B1 erzeugt. **(B)** Gesamt-RNA wurde aus der Leber von WT-, heterozygoten (+/-) und homozygoten (+/+) Mäusen isoliert und cDNA generiert. Die Expression von EGFP erfolgte mittels einer anschließenden PCR mit den Primern mEGFP-RT418 und mEGFP-RT418. Die Expression von IL-10 erfolgte mittels einer anschließenden PCR mit den Primern mL10F-RT418 und mL10B-RT418. Als Kontrolle wurde das RT-PCR-Produkt des Transkripts des Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT)-Gens mit den Primern mHPRT-828F1 und mHPRT-828B1 erzeugt.

Mäuse isoliert und cDNA daraus generiert. Anschließend erfolgte PCR-Analyse zur Analyse der Expression von IL-10, EGFP und IL10-EGFP-Hybride. Die Lokalisierung der verwendeten Primer ist angegeben.

Die RT-PCR-Analysen aus Leber-mRNA zeigen, dass EGFP weder in heterozygoten (+/-) noch in homozygoten (+/+) IL10-EGFP-Mäusen exprimiert wird (Abbildung 3.6.). Weitere unterschiedliche Kombinationen von Primern, die an diversen Stellen im gesamten EGFP und PolyA-Schwanzbereich hybridisieren, konnte ebenso RT-PCR-Produkte für EGFP erzeugen. Überraschenderweise konnte mit den Primern für den IL-10-Bereich ein PCR-Produkt aus RNA von homozygoten Mäusen, wo beide Allele im IL-10-Lokus aus EGFP-SV40pA-IL10-Sequenz bestehen, synthetisiert werden (Abbildung 3.6.). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass durch einen anormalen Spleißvorgang, die EGFP-Sequenz aus der prä-mRNA entfernt wurde. Die Analysen zur EGFP-Expression wurden in zwei IL10-EGFP-Mauslinien, die aus zwei unabhängigen ES-Klonen hergestellt wurden, durchgeführt. Beide ergaben das gleiche Ergebnis.

3.2. Die IL10-IRES-EGFP-Reportermaus

Um das Problem mit dem Spleißen der fusionierten Reportertranskripte zu umgehen, wurde ein zweites Targeting-Konstrukt konstruiert, in dem alle Exons und Introns von IL-10 und damit auch die Spleißdonor- und -akzeptorstellen unverändert blieben. Hierbei soll die Translation von EGFP über eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) an die von IL-10 gekoppelt werden. Es entsteht eine bicistronische mRNA für IL-10 und EGFP. IRES erlaubt Cap-unabhängige Bindung der Ribosomen und Initiierung der Translation. (siehe Abbildung 3.7.). Ein weiterer Vorteil dieses Konstrukts ist, dass die IL-10-Expression auch bei homozygoten Reporter-Mäusen erhalten bleibt. Es wurde die ca. 600 bp lange IRES des *Encephalomyocarditisvirus* (ECMV) verwendet.

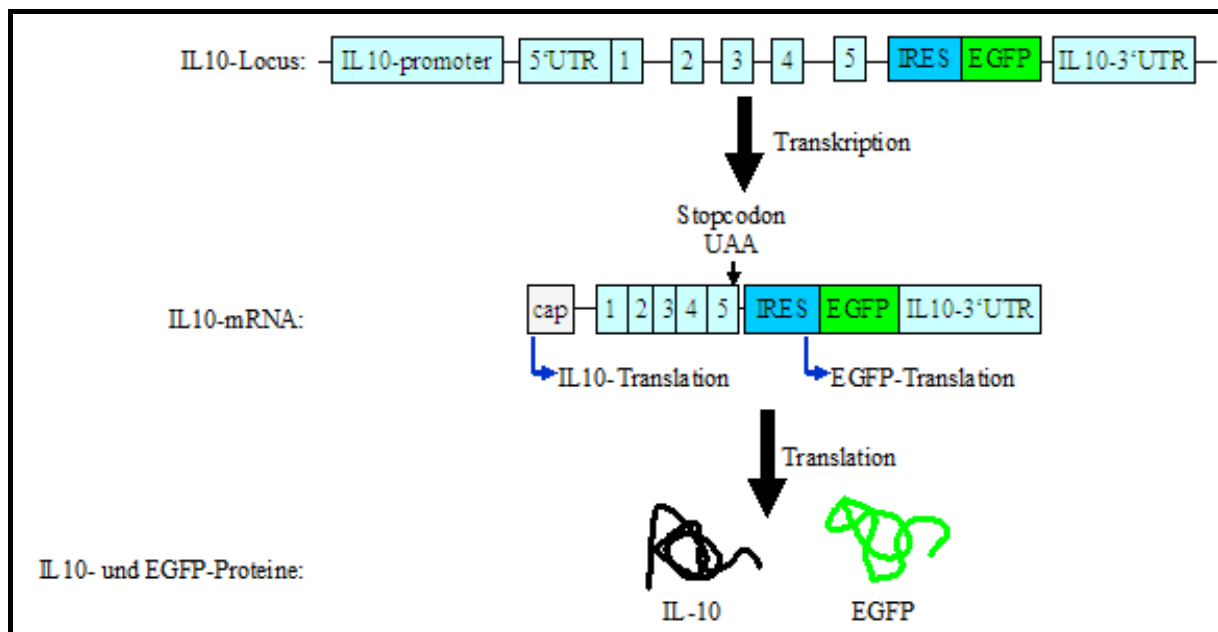


Abbildung 3.7. Schematische Darstellung der Transkription/Translation des IL10-IRES-EGFP-Reportersystems. Herstellung einer IL10-IRES-EGFP-Reportermaus, in der IRES-EGFP-Sequenz hinter dem Stop-Codon und vor der 3' nichttranslatierenden Region eingebaut ist. Nach der Transkription wird eine sogenannte Cap-Struktur (7-Methyl-guanosin) am 5' Ende der mRNA angeheftet. An der Cap-Struktur binden Translation-Initiationsfaktoren, welche die Rekrutierung von Ribosomen und die Translation von IL-10 einleiten. Die Translation des ersten Cistron endet am IL-10-Stopcodon. Die Ribosomen werden auch an die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) rekrutiert und leiten, unabhängig von der Cap-Struktur, die Translation von EGFP ein. Die Kästchen mit den Zahlen 1 bis 5 repräsentieren die 5 Exons von IL-10. 5'UTR und 3'UTR: 5' bzw. 3' nicht-translatierte Region.

3.2.1. Generierung des IL10-IRES-EGFP-Targeting-Konstrukts

Die für die Klonierung eingesetzten Primer sind im Abschnitt 2.1.6. aufgelistet.

Der 7,1 kb lange 5' homologe IL-10-Arm wurde aus dem Vektor pTZ18R10 amplifiziert. Wegen seiner Größe wurde die Klonierung dieses Arms in zwei Schritte durchgeführt. Günstigerweise enthält der 5'-Arm in der Mitte eine *Bam*HI-Schnittstelle. Die beiden

benachbarten Bereiche der *Bam*HI-Schnittstelle wurden getrennt amplifiziert und hintereinander in pBluescript-II-KS kloniert. Der erste ca. 3,5 kb große Teil des 5'-Arms wurde mit den Primern IL10-2,7kb-5'-*Sac*II-F und IL10-3598-*Bam*HI-B aus pTZ18R10 amplifiziert, mit *Sac*II und *Bam*HI verdaut, gereinigt und anschließend in pBluescript-II-KS über *Sac*II und *Bam*HI kloniert. Das so generierte Konstrukt wurde als pBS-3,5kb5'IL10 bezeichnet. Der zweite Teil des 5'-Arms wurde mit den Primern IL10-3599-*Bam*HI-F und IL10E5-*Bam*HI-*Eco*RV-B aus pTZ18R10 amplifiziert, mit *Bam*HI verdaut, gereinigt und anschließend in pBS-3,5kb5'IL10 über *Bam*HI kloniert. Der Vektor wurde als pBS-7,1kb5'IL10 bezeichnet. Der Primer IL10E5-*Bam*HI-*Eco*RV-B wurde mit einer *Eco*RV-Schnittstelle versehen, die zur Entstehung eines weiteren Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) beitragen, und damit die Identifizierung homolog rekombinanter ES-Zellkone erleichtern soll.

Das IRES2-EGFP-SV40pA-Fragment wurde aus dem Vektor pIRES2-EGFP (BD Biosciences Clontech; Catalog #6029-1) mit den Primern IRES2-EGFP-*Sal*I-F und IRES2-EGFP-*Sal*I-B amplifiziert, mit *Sal*I verdaut, gereinigt und anschließend in pBS-7,1kb-5'-IL10 direkt hinter dem IL-10-Stopcodon, über *Sal*I kloniert. Das so generierte Konstrukt wurde als pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-SV40pA bezeichnet. Das SV40-Polyadenylierungssignal wurde zunächst mit einkloniert, weil so zwei wertvolle Schnittstellen, *Not*I und *Af*III, welche die SV40-pA-Sequenz flankieren, für weitere Klonierungen zur Verfügung stehen sollten.

Ein 2,2 kb großer 3'-homologer Arm aus der genomischen 129Sv-Maus-DNA wurde mittels der Primer IL10-3'Arm-*Af*III-F und IL10-3'-Arm2100-*Xho*I-B amplifiziert, mit *Af*III und *Xho*I verdaut, gereinigt und anschließend in pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-SV40pA über *Af*III/*Xho*I kloniert. Das so generierte Konstrukt wurde als pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-SV40pA-2,2kb3'IL10 bezeichnet.

Eine *Lox*P-flankierte Neomycin (Neo)-Kassette aus dem Vektor pEasyFlox wurde mit den Primern LpNeoLp-*Not*I-F und LpNeoLp-*Af*III-B amplifiziert, mit *Not*I und *Af*III verdaut, gereinigt und anschließend in pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-SV40pA-2,2kb3'IL10 über *Not*I/*Af*III, gegen SV40-pA ausgetauscht. Damit war das pBS-IL10-IRES2EGFP-Targeting-Konstrukt vollständig generiert (Abbildung 3.8.).

Das ca. 16 kb große pBS-IL10-IRES2EGFP-Targeting-Konstrukt wurde sequenziert, um die Gen-Sequenz zu überprüfen. Die homologe Integration des Targeting-Konstrukts wurde durch Southernblot Analyse geprüft. Das rekombinante Allel sollte nach *Eco*RI-Verdau und Hybridisierung mit der externen 3'-Probe ein Fragment der Größe 7,6 kb, welches um 0,8 kb größer als das Wildtyp-Fragment (6,8 kb) ist, aufweisen (Abbildung 3.8.). Alternativ können

homolog rekombinante ES-Klone identifiziert werden, wenn sie nach *EcoRV*-Verdau ihrer genomischen DNA und Hybridisierung mit der 5'-Probe ein Fragment der Größe 11,9 kb, welches um 0,9 kb kleiner als das WT-Fragment (12,8 kb) ist, aufweisen (Abbildung 3.8.).

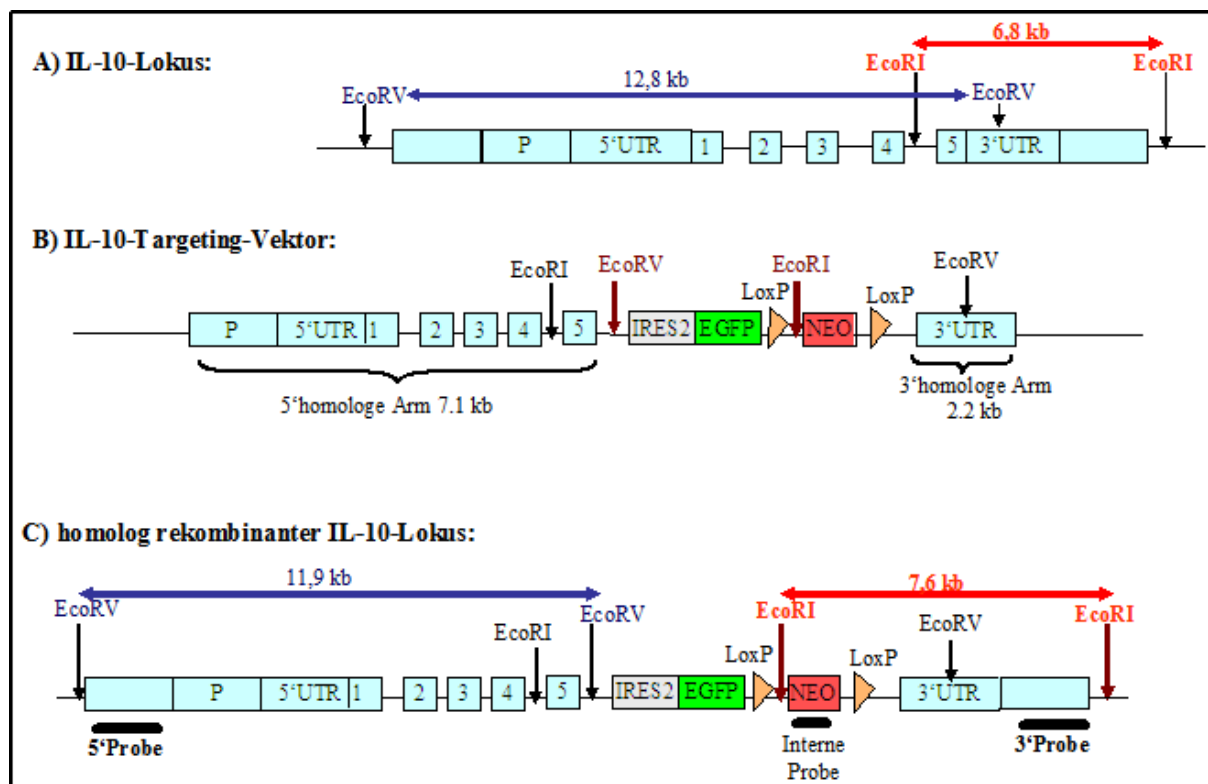


Abbildung 3.8. Gen-Targeting-Strategie zur Herstellung der IL10-IRESEGF-Reportermaus. (A) Organisation des IL-10-Gens der Maus. Die Lokalisierung der Restriktionsstellen, die für Southernblot verwendet werden ist angegeben. (B) IL10-IRESEGF-Targeting-Vektor enthält eine IRES-EGFP-Sequenz, die unmittelbar nach dem IL10-Stopcodon eingebaut ist, eine LoxP-flankierte Neo-Kassette als positiver Selektionsmarker, einen 7,1 kb IL10-5'-Arm und einen 2,2 kb IL10-3'-homologen Arm. (C) Homolog rekombinierter IL-10-Lokus mit Darstellung der für die Charakterisierung der ES-Klone verwendeten Hybridisierungsproben (externe 5'Probe, externe 3'Probe und interne Neo-Probe), sowie der verwendeten *EcoRI*- und *EcoRV*-Restriktionsstellen und der erwarteten Fragmentgrößen (7,6 kb *EcoRI*-Fragment und 11,9 kb *EcoRV*-Fragment für das modifizierte Allel) nach Southernblot-Analyse.

3.2.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-IRESEGF-ES-Zellen

Wie beim ersten Targeting-Konstrukt, wurde das IL10-IRESEGF-Targeting-Konstrukt mit *XhoI* linearisiert und in ES-Zellen (R1-129/sv) durch Elektroporation eingeführt (siehe Abschnitt 2.2.3.3.). 480 G418-resistente ES-Klone wurden isoliert, die DNA gereinigt und mit *EcoRI* verdaut (siehe Abschnitt 2.2.1.13.). Aus 244 ES-Klonen, die mittels Southernblot mit der externen 3'Probe analysiert worden sind, waren vier ES-Klone positiv (Abbildung 3.9.). Eine weitere genomische Integration des IL10-IRESEGF-Targeting-Konstrukts außer im IL-10-Lokus konnte durch Analyse mit der internen Neo-Probe ausgeschlossen werden (Abbildung 3.9.).

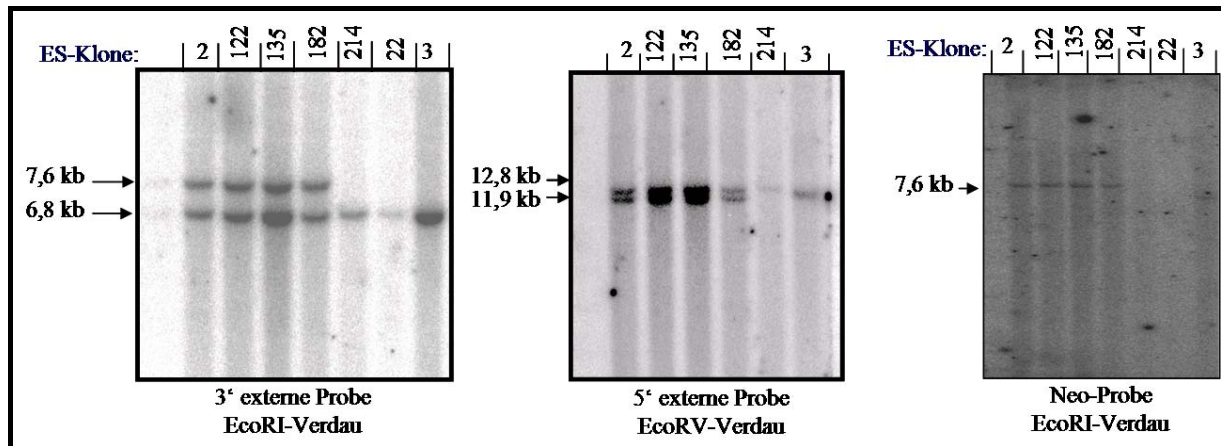


Abbildung 3.9. Darstellung der Southernblot-Analyse einiger IL10/IRESEGFP-ES-Zellklone. DNA wurde mit *EcoRI* (links und rechts) oder *EcoRV* (Mitte) verdaut und in der Southernblot-Analyse mit der externen 3'Probe (links), der externen 5'Probe (Mitte) oder mit der internen Neo-Probe (siehe Lage der Sonde in Abb. 3.8.) hybridisiert. Die positiven Klone zeigen zwei Banden. Die nach oben verschobene Bande entstand durch homolog-rekombinante Integration des IL-10-IRESEGFP-Allels im IL10-Lokus.

3.2.3. Etablierung der IL10-IRESEGFP-Reportermaus

Zwei der positiven ES-Klone wurden in C57Bl/6J-Blastozysten injiziert. Die Blastozysten wurden dann in den Uterus scheinchwangerer CD-1-Mäuse (Albinos) implantiert. Fellchimäre Mäuse unter den Nachkommen wurden untereinander verpaart. Die aus dieser Kreuzung resultierenden braunen Mäuse wurden auf Keimbahneteiligung der rekombinanten ES-Zellen mittels Southernblot (Abbildung 3.10.) und PCR getestet. Für die PCR-Analyse wurden die Primer IL10-6775F / IL10-7150B (für das WT-Allel) und IL10-6775F / pIRES2-786B (für das IL10-IRESEGFP-Allel) eingesetzt.

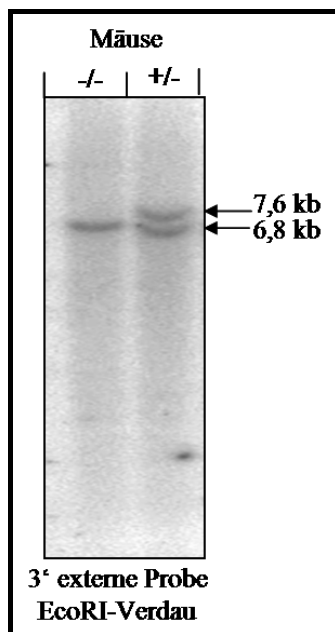


Abbildung 3.10. Analyse genomischer Mausschwanz-DNA der IL10-IRESEGFP-Mauslinie. (A) Genomische Mausschwanz-DNA wurde mit *EcoRI* verdaut und in der Southernblot-Analyse mit der externen

3'Probe hybridisiert. Heterozygote Mäuse zeigen die mit Pfeil gekennzeichneten Fragmentgrößen 6,8 (für WT-Allel) und 7,6 (für IL10-IRESEGFP-Allel).

Um die Neo-Kassette zu eliminieren, wurden zwei für IL10-IRESEGFP positiv getestete männliche Mäuse (aus zwei unabhängigen ES-Klonen stammend) nacheinander mit einem Cre-Weibchen verpaart (Nur ein Cre-Weibchen stand zur Verfügung). Die Deletion der Neo-Kassette wurde mittels PCR mit den Primern IL10-7150B und EGFP1-336F überprüft. Alle Nachkommen aus diesen Verpaarungen, wie auch aus einer weiteren dritten Verpaarung mit derselben Cre-Maus, enthielten jedoch weiterhin die Neo-Kassette. Darüber hinaus waren all diese Nachkommen, wie sich im nachhinein herausstellte, zeugungsunfähig und sahen krank aus (raues Fell, geringe Aktivitäten). Sie starben i.d.R. innerhalb ihres ersten Lebensjahrs. Dies deutet darauf hin, dass die Kreuzung von IL10-IRESEGFP-Mäusen mit der Cre-Deleter-Maus zur Zeugungsunfähigkeit der Nachkommen geführt hat.

Zur Deletion der Neo-Kassette werden deshalb die Kreuzungsversuche mit einer neuen Cre-Deleter-Maus wiederholt. Die Versuche sind noch nicht abgeschlossen.

Aus diesem Grund konnten bisher IL10-Reporter Analysen nur mit wenigen verfügbaren IL10-IRESEGFP-Mäusen durchgeführt werden, die noch die Neo-Kassette enthalten. Die Reportermause werden im folgenden als IL10-IRESEGFP^{neo} bezeichnet. Heterozygote Mäuse werden als IL10-IRESEGFP^{neo}^{+/-} und homozygote Mäuse als IL10-IRESEGFP^{neo}^{+/+} bezeichnet.

3.2.4. Analyse der IL10-IRESEGFP-Reportermaus

Wie im vorherigen Abschnitt dargelegt wurde, konnten Analyse-Studien mit wenigen verfügbaren homo- und heterozygoten IL10-IRESEGFP^{neo}-Mäusen durchgeführt werden, die noch die Neo-Kassette enthalten.

In ihrem allgemeinen Erscheinungsbild lassen sich die transgenen Mäuse nicht von den Wildtyptieren unterscheiden. Hetero- und homozygote Mäuse sind vital und fertil. Ihre Körpergewicht und -größe sowie Fellbeschaffenheit wiesen keine Unterschiede zu Wildtypmäusen auf. Die inneren Organe (Milz, Leber, Magen, Herz, Darm, etc.) der transgenen Mäuse und Wildtyptiere zeigen während der gesamten Lebensdauer keine Unterschiede hinsichtlich Gewicht, Farbe (Zeichen für z.B. Entzündung) oder Größe.

Die Art und Menge der Cytokinantwort ist von entscheidender Bedeutung bei der Immunantwort und spiegelt die Abwehreffizienz der Zellen bzw. der Organismus. Um zu prüfen, ob die Integration der IRESEGFP-Sequenz im 3'UTR des IL-10-Lokus einen Einfluß auf die Cytokinproduktion aktivierter Immunzellen hat, wurden BMDC (aus Knochenmark

differenzierte DCs) mit 100 ng/ml LPS für 24 Stunden behandelt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Menge verschiedener Cytokine im Überstand. Es konnte keinen nennenswerten Unterschied in der Cytokinproduktion zwischen DCs aus WT- und heterozygoten Mäusen festgestellt werden (Abbildung 3.11.). Bestimmt wurde die Produktion von IL-10, IFN γ , IL-12p70, IL-6, MCP-1 und TNF α .

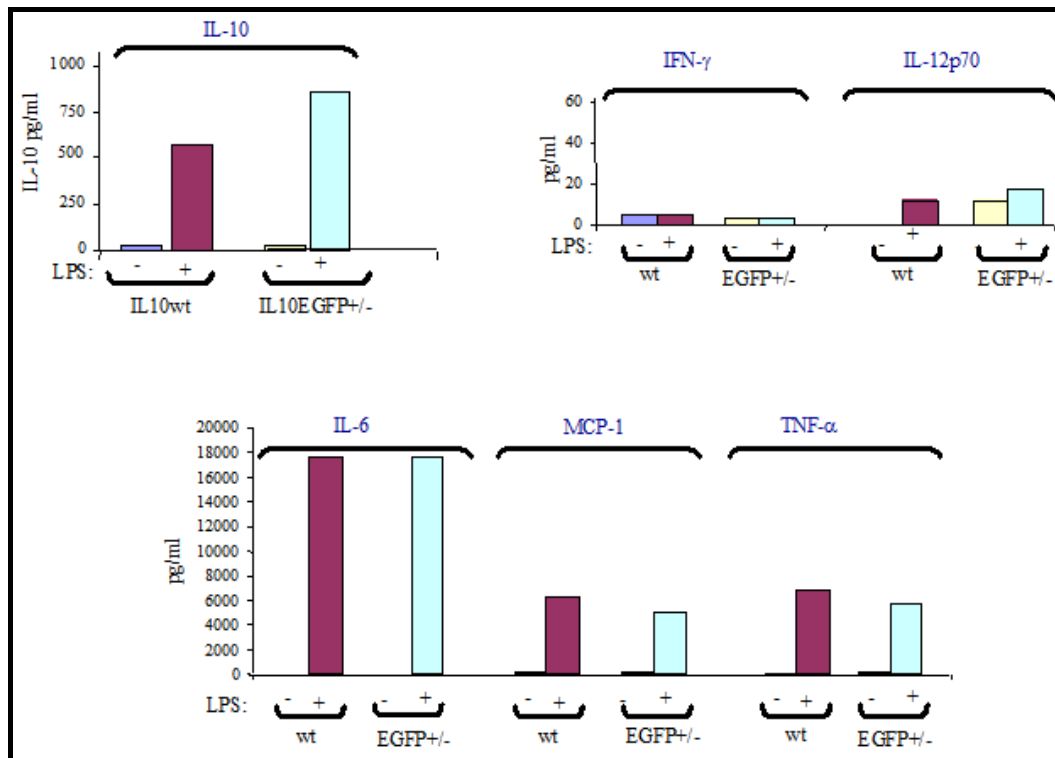


Abbildung 3.11. Vergleich der Cytokinproduktion von DCs von WT- und IL10-IRESEEGFP-Mäusen. BMDCs aus WT-Maus und heterozygoter IL10-IRESEEGFP-Maus wurden mit oder ohne 100 ng/ml LPS stimuliert. Nach 24 h wurden die Überstände abgenommen und IL-10, IL-6, IL-12p70, TNF- α , IFN- γ und MCP-1 mittels CBA-Assay gemessen.

3.2.4.1. Expressionsstudien von EGFP in der IL10-IRESEEGFP-Reportermaus

Um die Transkripte von EGFP zu bestimmen, wurde Gesamt-RNA aus der Leber von heterozygoten (+/-) IL10-IRESEEGFP-Mäusen isoliert und RT-PCR durchgeführt. Abbildung 3.12. zeigt eine eindeutige Expression von EGFP.

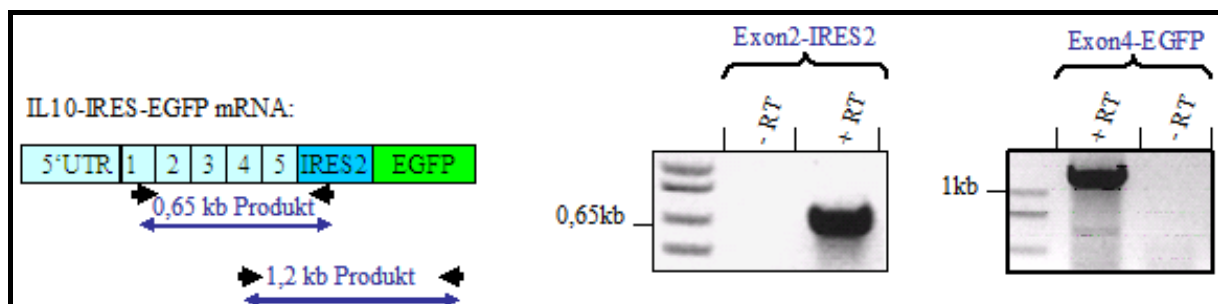
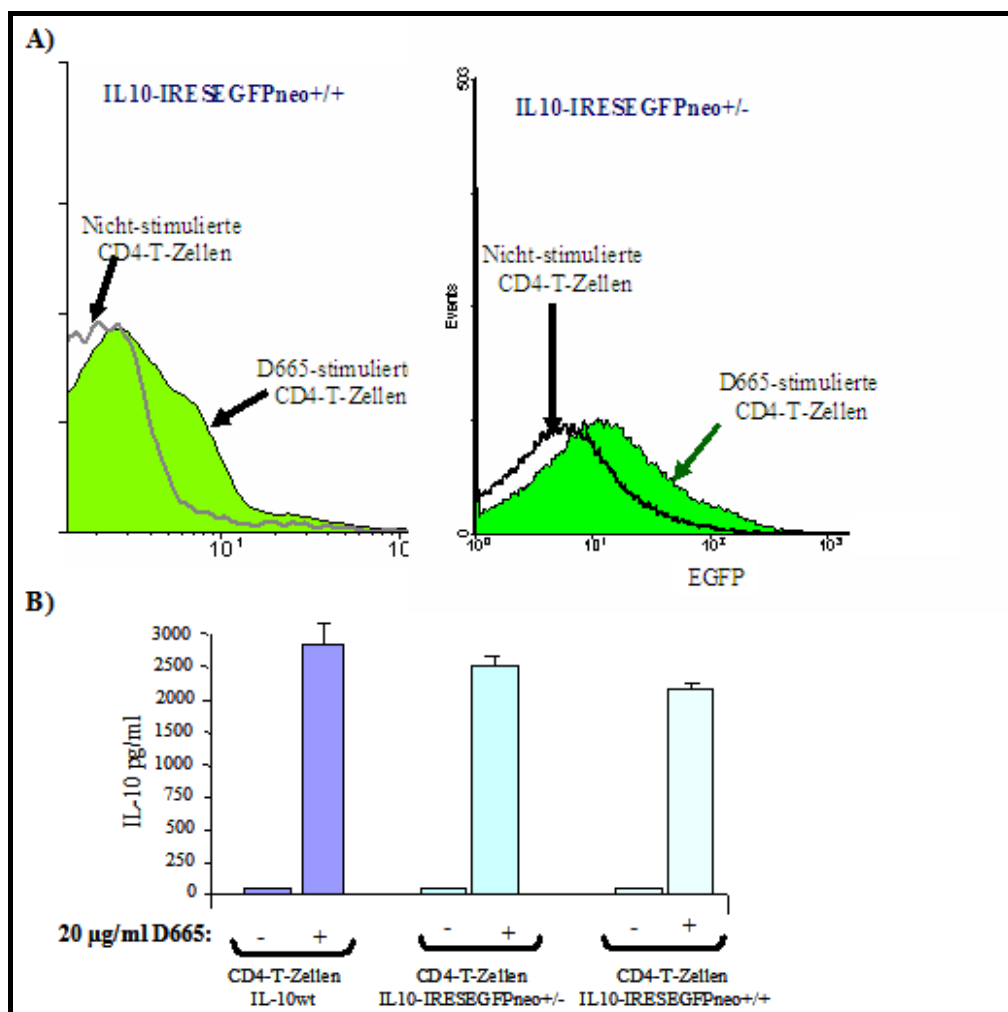


Abbildung 3.12. EGFP wird auf RNA-Ebene in der IL10-IRESEEGFP-Reportermaus exprimiert. Gesamt-RNA wurde aus der Leber von heterozygoter (+/-) IL10-IRESEEGFP-Maus isoliert und cDNA daraus generiert.

Anschließend erfolgte PCR zur Analyse der Expression von IL10-IRES und IL10-EGFP-Hybride. Die Lokalisierung der verwendeten Primer ist angegeben.

Um zu prüfen, ob EGFP-Fluoreszenz im FACS detektierbar ist, wurden CD4-T-Zellen aus der Milz von WT-Mäusen, homo- und heterozygoten IL10-IRES-EGFPneo-Mäusen isoliert und anschließend *in vitro* für 3 Tage mit dem CD28-Antikörper, D665, stimuliert (siehe Abschnitt 2.2.4.4.). CD4-T-Zellen sowohl homozygoter als auch heterozygoter IL10-IRES-EGFP-Mäuse wiesen EGFP-Fluoreszenz im FACS auf (Abbildung 3.13.A). Die EGFP-Fluoreszenz entspricht der IL10-Produktion im Kulturüberstand (CBA-Test) (Abbildung 3.13.B).

Dagegen konnte keine EGFP-Fluoreszenz in DCs und Makrophagen im FACS detektiert werden, welche aus dem Knochenmark von IL10-IRES-EGFPneo^{+/+} Mäusen generiert und 36 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert wurden (Abbildung 3.13.C). Dieses Ergebnis widerspiegelt aber nicht die IL-10-Expression, die eindeutig im Überstand der Zellen gemessen werden konnte (Abbildung 3.13.D).



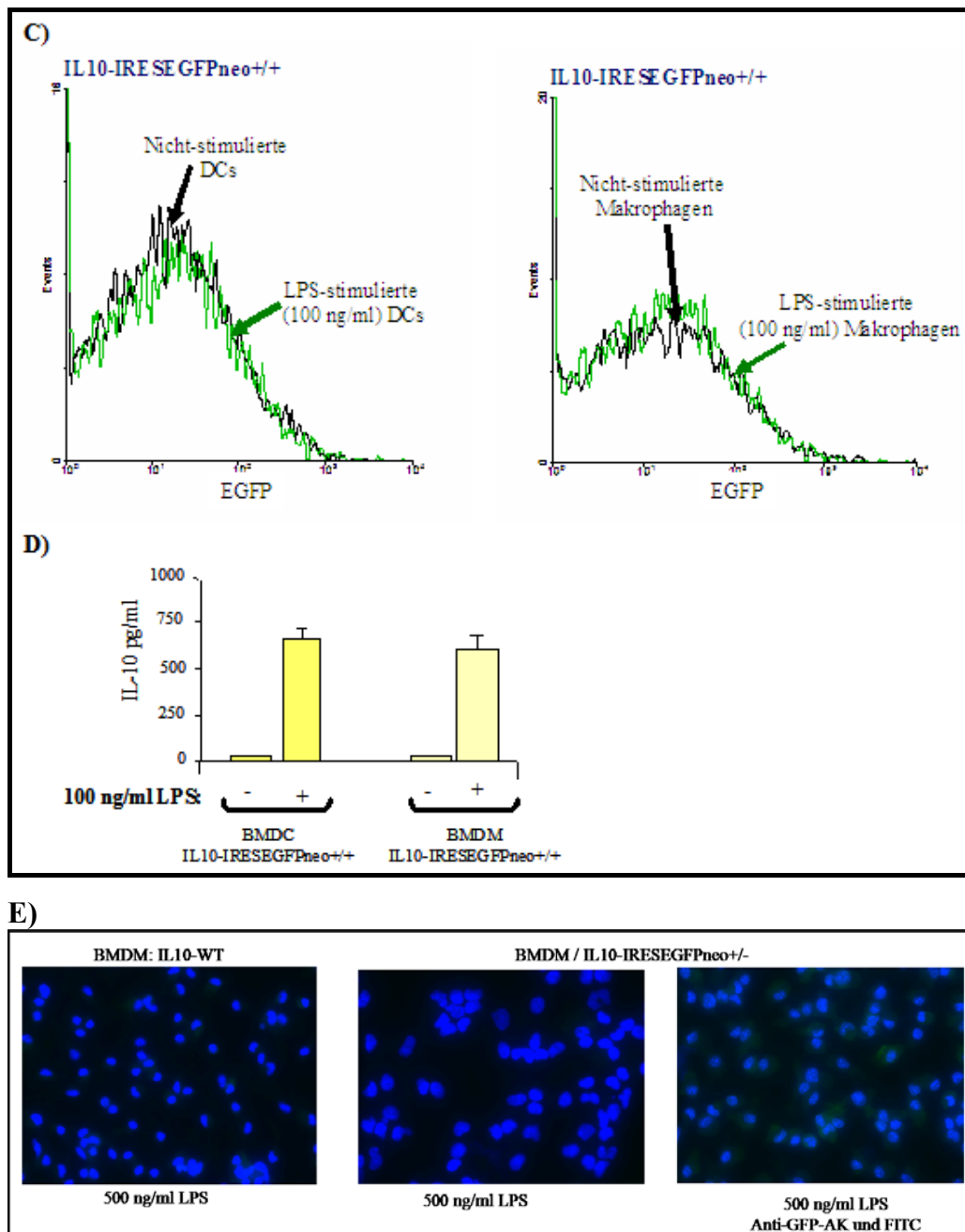


Abbildung 3.13. Analyse der EGFP- und IL10-Expression in verschiedenen Immunzellen. (A) CD4-T-Zellen wurden aus der Milz von WT-Mäusen, heterozygoter (+/-) und homozygoter (+/+) Mäusen isoliert und mit dem Superagonisten Antikörper D665 (20 µg/ml) für 3 Tage stimuliert. Die Zellen wurden anschließend im FACS analysiert. Stimulierte T-Zellen homo- und heterozygoter Mäuse zeigen EGFP-exprimierende Population. (B) Die IL10-Menge wurde in den Überständen der CD4-T-Zellen mittels CBA-Assay bestimmt. (C) BMDCs und BMDM aus homozygoten (+/+) Mäusen wurden mit LPS (100 ng/ml) für 36 h stimuliert. Anschließend wurden die Zellen im FACS auf grüne Fluoreszenz analysiert. (D) Die IL10-Menge in den Überständen der BMDM und BMDCs wurde mittels CBA-Assay bestimmt. (E) WT-BMDM und IL10-IRESEGF-BMDM (+/-) wurden mit 500 ng/ml LPS für 24 h stimuliert. Anschließend erfolgte bei einer Zellprobe (IL10-IRESEGF^{+/-}) eine Immunfärbung mit Anti-GFP-Antikörper und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper. Eine DAPI-Färbung wurde bei allen Zellproben durchgeführt. Eine sehr schwache grüne Fluoreszenz ist nach der Immunfärbung sichtbar.

Eine sehr schwache Detektion der EGFP-Expression in Makrophagen konnte erst nach Stimulation mit größerer LPS-Konzentration (500 ng/ml) für 24 h und zusätzliche

Immunfärbung mit einem Antikörper gegen EGFP und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper erreicht werden (Abbildung 3.13.E).

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass EGFP exprimiert wird, jedoch nicht in ausreichender Menge, um sicher von der Autofluoreszenz der Makrophagen und DCs abzuheben. Damit entgehen vor allem solche granulären Zellen der Erfassung mittels dieses IL10-IRESEGFP-Reportermausmodells, obwohl sie IL-10 produzieren. Damit ist die IL10-IRESEGFP-Reportermaus kaum nutzbar für die IL-10 Expressionsanalyse nach experimentaler Infektion.

3.3. Strategien zur Verbesserung der Reporteraktivität

Die Analyse der IL10-IRES-EGFP-Reportermaus ergab, dass dieses Mausmodell nicht brauchbar ist, um die Expression von IL-10 in verschiedenen Zelltypen mittels EGFP-Reporteraktivität zu analysieren. Die EGFP-Fluoreszenz konnte nur in T-Zellen mittels FACS-Analyse detektiert werden (Abbildung 3.13.). DCs und Makrophagen aus der IL10-IRES-EGFP-Reportermaus, die eindeutig IL-10 produzierten, zeigten keine messbare EGFP-Fluoreszenz (Abbildung 3.13.). Durchschnittlich sind 1×10^5 EGFP-Moleküle nötig, um Fluoreszenz detektieren zu können (Patterson et al. 1997; Niswender et al. 1995). Je stärker die Granularität der Zellen (z.B. bei Makrophagen, DCs, Granulozyten), desto mehr EGFP-Moleküle sind nötig, damit die Reporteraktivität sich von der Autofluoreszenz der Zellen abhebt.

Eine weitere Einschränkung dieser Reportermaus liegt in der Translation von EGFP über die IRES-Sequenz, was zu einer geringeren Translation führt als über Cap-RNA. Deshalb wurden zwei Konstrukte generiert, in denen EGFP Cap- oder IRES-abhängig translatiert wird. Die Konstrukte wurden in HEK 293-Zellen transient transfiziert und die Fluoreszenzintensität im FACS analysiert. Die IRES-abhängige Translation ist um 20-50 % weniger Effizient als die Cap-abhängige Translation (Abbildung 3.14. und Mizuguchi et al. 2000).

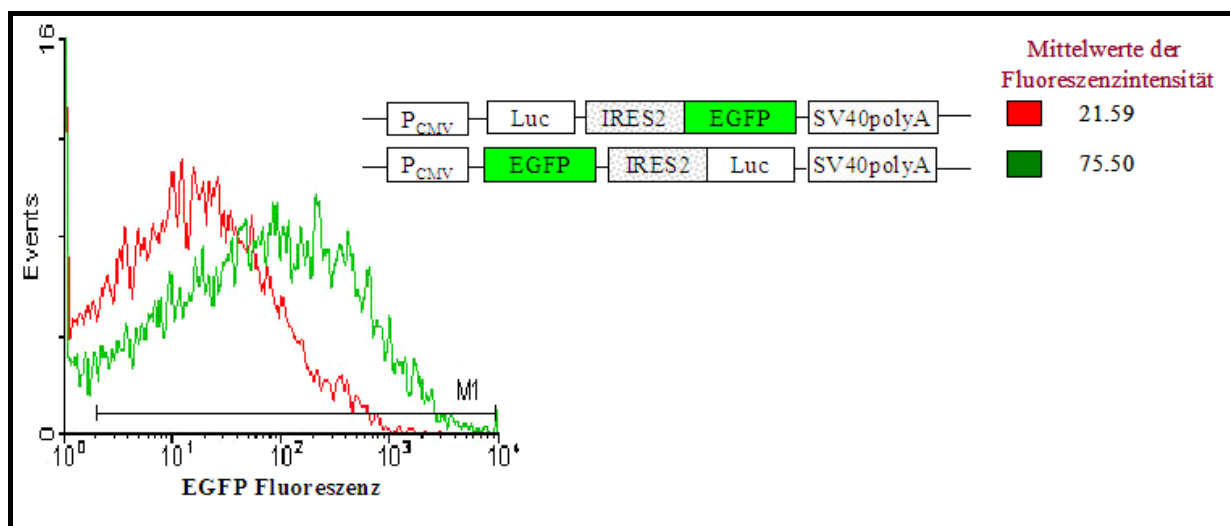


Abbildung 3.14. IRES-abhängige Translation ist weniger effizient als die Cap-abhängige Translation. Zwei Konstrukte wurden generiert, in denen EGFP Cap- oder IRES-abhängig translatiert wird. HEK 293-Zellen wurden mit den Konstrukten transfiziert und die EGFP-Fluoreszenz im FACS verglichen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität wurden mittels FACS-Analyse bestimmt. Luc: Luciferase.

Aus diesen dargelegten Gründen wurde nach Lösungen gesucht, um die Reporteraktivität zu erhöhen. Zwei Strategien sollten deshalb zunächst in Zellkulturen überprüft werden: ein Tandem-Reportersystem, welches als *IRES-vermitteltes polycistronisches Reporter-System*

bezeichnet wird (Abbildung 3.15.) und ein sensitives *Reporterenzym*system, welches ein farbig fluoreszierendes Substrat in Zellen umsetzt.

3.3.1. IRES-vermitteltes polycistronisches Reporter System

Dieses Modell (Abbildung 3.15.) basiert auf Einbau von mehreren IRESEGFP-Sequenzen, wodurch sich die Expression bzw. die Fluoreszenz von EGFP steigern lassen sollte.

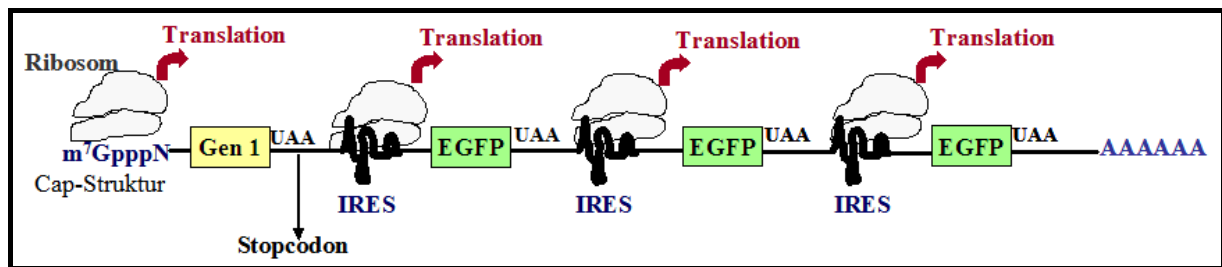


Abbildung 3.15. Schematische Darstellung des IRES-vermittelten polycistronischen Reportersystems. Mehrere EGFP-codierende Sequenzen können IRES-abhängig exprimiert werden. Das Stop Ochre UAA ist stellvertretend für Stopcodons. Die Cap-Struktur besteht aus 7-Methylguanotin(m⁷G)pppN (N steht für jedes Nukleotid; p steht für 5'-5'-Triphosphat-Brücke).

Damit das polycistronische Reportersystem später in einer Reportermaus angewendet werden kann, wurde die Funktionalität und Effizienz dieses Systems zuerst in HEK 293-Zellen getestet. Dafür wurden unterschiedliche Konstrukte entworfen und generiert (Abbildung 3.16.-3.19), welche folgende Fragen beantworten können: **1)** Kann die Ausbeute der Fluoreszenz durch multiple als Tandem fusionierte IRESEGFP-Sequenzen erhöht werden? **2)** Wird die Cap-abhängige Translation durch dahinter geschaltete multiple IRESEGFP-Sequenzen beeinflusst? **3)** Wird die posttranskriptionale Regulation der Genexpression durch multiple IRESEGFP-Sequenzen beeinträchtigt?

3.3.1.1. Generierung von IRES-vermittelten polycistronischen Vektoren

Um zu testen, ob eine Erhöhung der Fluoreszenz durch die Expression von EGFP aus einem IRES-abhängigen multicistronischen Vektor erreicht werden kann, wurden Konstrukte generiert, mit einer, zwei oder drei IRESEGFP-Modulen (Abbildung 3.16.).

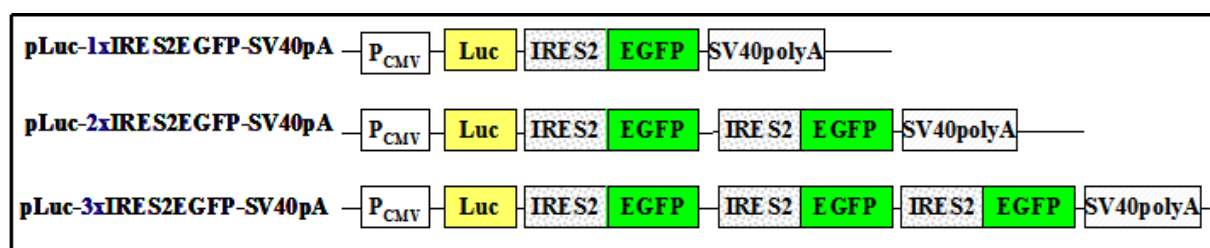


Abbildung 3.16. Schematische Darstellung der generierten pLuc-nx(IHRES-EGFP)-SV40pA-Konstrukte (n = 1, 2 oder 3). *Eco*RI-Schnittstelle und Luc-Probe, die für Southernblot-Analyse verwendet werden, sind

angezeigt. PCMV, cytomegalovirus promoter; Luc, luciferase-Gen; SV40polyA, Simian Virus Polyadenylation site.

Der Ausgang für die Generierung der polycistronischen Konstrukte war der Vektor pIRES2-EGFP (BD Biosciences Clontech, Catalog #6029-1), welcher den Cytomegalovirus-Promoter (PCMV), die IRES von ECMV, eine multiple cloning Stelle (MCS), eine EGFP-codierende Sequenz und das SV40 polyadenylierungssignals (SV40pA) enthält. Die verwendeten Primer zur Generierung der multicistronischen Vektoren sind im Abschnitt 2.1.6. aufgelistet.

Die codierende Sequenz für Luciferase (Luc) wurde aus dem Vektor pGL3-basic (Promega) mit den Primern Luc-*XhoI*-F und Luc-*EcoRI*-B amplifiziert, mit *XhoI* und *EcoRI* verdaut und anschließend in pIRES2-EGFP über *XhoI/EcoRI* kloniert. Dieser so generierte Vektor mit einer IRESEGFP-Sequenz wurde pLuc-1x(IRES2EGFP)-SV40pA genannt.

pLuc-1x(IRES2EGFP)-SV40pA war dann der Ausgangsvektor zur Generierung des Konstrukts pLuc-2x(IRES2EGFP)-SV40pA, welches zwei IRESEGFP-Sequenzen enthält.

Die IRES2EGFP-Sequenz wurde aus pLuc-1x(IRES2EGFP)-SV40pA mit den Primern IRES2-*NotI*-F und EGFP-*EcoRV-NotI*-B amplifiziert, mit *NotI* verdaut und in pLuc-1x(IRES2EGFP)-SV40pA über *NotI* kloniert. Die Insertion der *EcoRV*-Restriktionsschnittstelle erlaubt die Klonierung eines weiteren Fragments hinter der EGFP-Sequenz. pLuc-2x(IRES2EGFP)-SV40pA diente nun als Ausgangsvektor zur Generierung des Konstrukts pLuc-3x(IRES2EGFP)-SV40pA, welches drei IRESEGFP-Sequenzen enthält. Die IRES2EGFP-Sequenz wurde aus pLuc-2x(IRES2EGFP)-SV40pA mit den Primern IRES2-*EcoRV*-F und EGFP-*EcoRV-NotI*-B amplifiziert, mit *EcoRV* verdaut und in pLuc-2x(IRES2EGFP)-SV40pA über *EcoRV* kloniert (Abbildung 3.16).

3.3.1.2. Verbesserung der Reporteraktivität durch IRES-vermittelte polycistronische EGFP-Expression

Die pLuc-nx(IRES2EGFP)-SV40pA-Konstrukte (n = 1, 2 oder 3) wurden mit *AflIII* linearisiert und stabil in HEK 293-Zellen transfiziert.

Um zu überprüfen, wie viele Kopien von jedem Konstrukt ins Genom integriert wurden, wurde die genomische DNA aus den HEK 293-Zelllinien isoliert, mit *EcoRI* verdaut und einer Southernblot-Analyse unterzogen. Für die Hybridisierung wurde eine Luc-Sonde eingesetzt. Die pLuc-nx(IRES2EGFP)-SV40pA-Konstrukte enthalten eine einzige *EcoRI*-Schnittstelle direkt hinter dem Luc-Gen (Abbildung 3.16.). Die Southernblot-Analysen zeigen, dass jeweils eine Kopie von jedem pLuc-nx(IRES2EGFP)-SV40pA-Konstrukt im Genom eingebaut wurde (Abbildung 3.17.A).

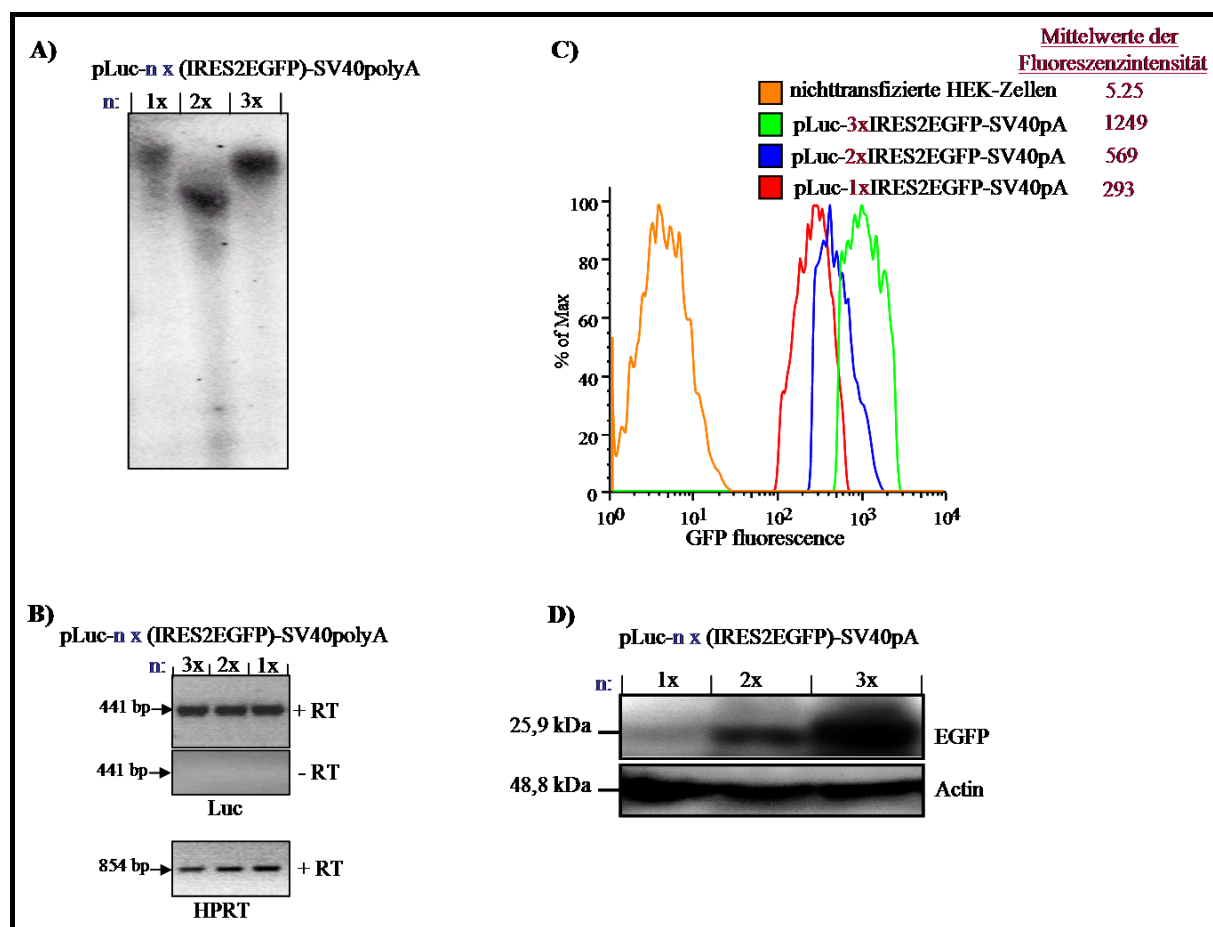


Abbildung 3.17. pLuc-3n(IRES2EGFP)-SV40pA-Konstrukte wurden stabil in HEK 293-Zellen transfiziert. (A) Southernblot-Analyse zeigt die Integration jeweils einer Kopie jedes Konstrukts im Genom der etablierten Zelllinien. (B) Gesamt-RNA wurde aus den drei Zelllinien isoliert und mit Baseline-Zero DNase behandelt, um kontaminierende genomische DNA zu eliminieren. Anschließend wurde die Transkription der multicistronischen Reportergene mittels RT-PCR mit Primern für Luciferase (Luc-Fneu und Luc-Bneu) analysiert. (+RT) und (-RT) weisen auf PCR-Produkte aus der Erststrang-Synthesereaktionen, die mit (+RT) oder ohne (-RT, negative Kontrolle) Reverse Transkriptase durchgeführt worden sind, hin. Als Kontrolle wurde RT-PCR des Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase (HPRT)-Gens mit den Primern HumHPRT-F und HumHPRT-B durchgeführt. (C) Die Fluoreszenzemission von EGFP wurde mittels FACS (BD FACSCanto) analysiert. Gezeigt sind Histogramme der EGFP-positiven Zellen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität sind angegeben. (D) Gleiche Mengen Protein (10-60 µg) der verschiedenen Zelllysaten wurden auf 12% SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot und Anti-GFP-Antikörper bestimmt. Die Immunfärbung gegen Actin ist als Kontrolle dargestellt.

Darüber hinaus zeigen RT-PCR-Analysen, dass kein nennenswerter Unterschied in der Expression der drei Konstrukte auf RNA-Ebene festzustellen ist (Abbildung 3.17.B). Folglich wird die Fluoreszenz-Ausbeute von der Anzahl der IRESEGFP-Sequenzen der jeweiligen Konstrukte und von der Effizienz der IRES-vermittelten Translation der EGFP-Tandems abhängen und nicht von unterschiedlicher genomischer Integrationseffizienz der Konstrukte.

Die FACS-Analysen zeigen eine lineare Steigerung der EGFP-Fluoreszenz (Abbildung 3.17.C). Die ermittelten Fluoreszenz-Mittelwerte zeigen, dass die Fluoreszenz proportional zu

der Anzahl der IRESEGFP-Sequenzen ist. Die EGFP-Westernblot-Analyse von Zelllysaten aus den drei Zelllinien bestätigen die FACS-Ergebnisse (Abbildung 3.17.D).

3.3.1.3. Multiple Tandem-IRESEGFP-Module beeinträchtigen nicht die Cap-abhängige Genexpression

In den generierten polycistronischen Konstrukten (pLuc-nx(IRES2-EGFP)-SV40-pA) wurde die kodierende Sequenz für Luciferase (Luc) direkt hinter dem CMV-Promoter und vor der ersten IRES-Sequenz (Abbildung 3.16.) kloniert, um eine quantitative Analyse der Cap-abhängigen Genexpression durchführen zu können. Falls die IRES-abhängigen Translationen die Cap-abhängige Translation beeinträchtigen sollten, würde die Luciferase-Aktivität umgekehrt proportional zu der Anzahl der IRESEGFP-Wiederholungen sein.

Die Messungen der Luciferase-Aktivität bei gleichen Proteinlysatmengen aus der drei Zelllinien lieferten ähnliche Werte für alle drei Konstrukte (Abbildung 3.18.). Dieses Ergebnis zeigt, dass multiple Tandem-IRESEGFP-Module die Cap-abhängige Expression nicht beeinträchtigen.

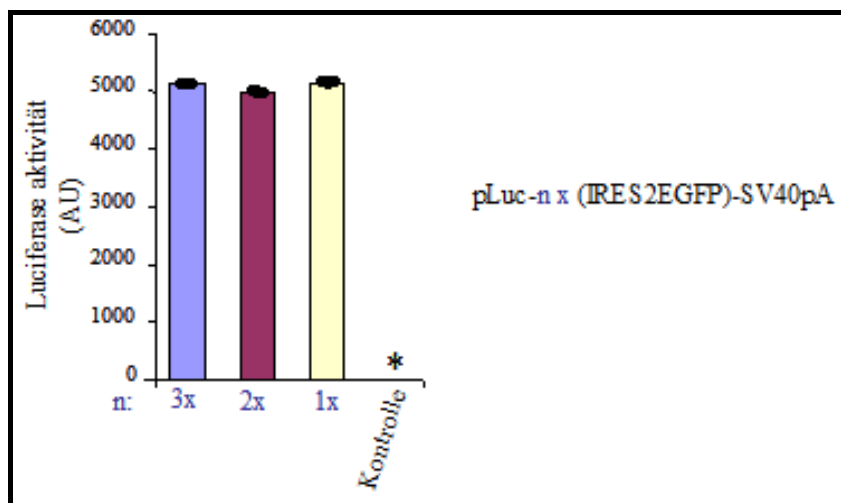


Abbildung 3.18. Cap-abhängige Luciferase-Aktivität. Gleiche Mengen Protein (10-60 µg) der Lysate der verschiedenen pLuc-nx(IRES2EGFP)-SV40pA-exprimierenden Zelllinien (n = 1, 2 oder 3) wurden hergestellt und ihre Luciferase-Aktivität gemessen. Kontrolle: Zelllysat von nicht-transfizierten Zellen. AU: arbitrary units. *: Wert unter 50 AU.

3.3.1.4. Multiple Tandem-IRESEGFP-Module haben keinen Einfluß auf die posttranskriptionale Regulation durch 3'UTR

Die Adenin/Uridin (AU)-reichen Elemente (ARE) sind die best untersuchten Sequenzen in der 3'UTR, welche die Stabilität der mRNA und damit die Expression des entsprechenden Proteins regulieren (Brennan et al. 2001).

Da mehrere exogene IRES-Sequenzen in der 3'UTR eines Gens bzw. Vektors eingebaut wurden, stellt sich die Frage, ob diese die Expressionsregulation durch 3'UTR beeinflussen.

Um das zu testen, wurde die RNA-stabilisierende Sequenz (SV-40polyA) in den pLuc-nx(IRES2-EGFP)-SV40pA-Vektoren durch die Interleukin-10 (IL-10)-3'UTR ausgetauscht (Abbildung 3.19.A). Die IL10-3'UTR begünstigt den Abbau der IL-10-mRNA (Powell et al. 2000). Die 3'UTR von IL-10 wurde wegen ihrer Relevanz für die vorliegende Arbeit (IL10-Reportermäuse) ausgewählt.

Eine 832 bp lange Sequenz, die sich ab dem 6. Basenpaar hinter dem Stopcodon des Maus-IL-10-Gens bis zum 838. Basenpaar erstreckt, und welche die 3'UTR von IL-10 einschließt, wurde aus der genomischen DNA mit den Primern IL10-7118-*Xba*I_F und IL10-832-*Afl*III-*B* amplifiziert und mit *Xba*I und *Afl*III verdaut. Anschließend wurde diese Sequenz in die pLuc-nx(IRES2EGFP)-SV40pA-Vektoren über *Xba*I/*Afl*III, an der Stelle von SV40-pA, kloniert. Wegen des *dam*-Methylierungssystems in DH5 α , welches *Xba*I-Schnittstellen methyliert, und sie damit unzugänglich für das Restriktionsenzym macht, wurden die pLuc-nx(IRES2EGFP)-SV40pA-Konstrukte vor diesem Klonierungsschritt in einem *dam*-negativen *E.coli*-Stamm (ATCC 47045) vermehrt.

Die polycistronischen Konstrukte mit der IL10-3'UTR, pLuc-nx(IRES2EGFP)-IL10-3'UTR (n = 1, 2, oder 3), wurden mit *Afl*III linearisiert und stabil in HEK 293-Zellen transfiziert.

Um zu untersuchen, wie viel Kopien von jedem Konstrukt ins Genom integriert wurden, wurde die genomische DNA aus den HEK 293-Zelllinien isoliert, mit *Eco*RI verdaut und einer Southernblot-Analyse unterzogen. Für die Hybridisierung wurde eine Luc-Sonde eingesetzt. Die Southernblot-Analysen zeigen, dass jeweils eine Kopie von jedem pLuc-nx(IRES2EGFP)-IL10-3'UTR-Konstrukt im Genom integriert wurde (Abbildung 3.19.B). Mögliche Expressionsunterschiede zwischen Konstrukten mit SV40pA und IL10-3'UTR sollten damit von der posttranskriptionalen Regulation durch 3'UTR abhängen.

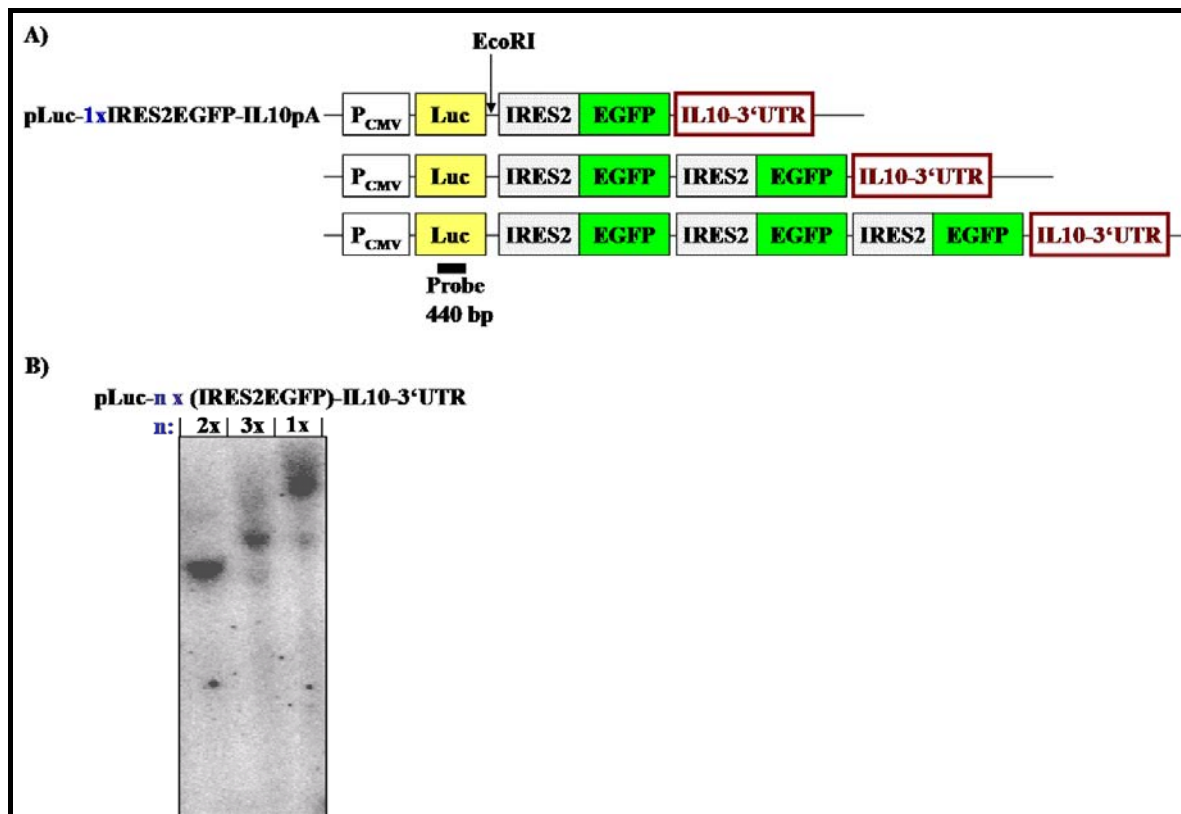


Abbildung 3.19. (A) Schematische Darstellung der generierten pLuc-nx(IRES-EGFP)-IL10-3'UTR-Konstrukte ($n = 1, 2$ oder 3). *EcoRI*-Schnittstelle und Luc-Probe, die für Southernblot-Analyse verwendet werden, sind angezeigt. (B) pLuc-3xn(IRES2EGFP)-IL10-3'UTR-Konstrukte wurden stabil in HEK 293-Zellen transfiziert. Die Southernblot-Analyse zeigt die Integration jeweils einer Kopie jedes Konstrukts im Genom der etablierten Zelllinien. PCMV, Cytomegalovirus Promoter; Luc, Luciferase-Gen; SV40polyA, *Simian-Virus polyadenylation site*.

Die FACS-Analysen der Zelllinien, welche die IL10-3'UTR-enthaltende Konstrukte exprimieren, zeigen niedrigere Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Zelllinien mit den SV40pA (Abbildung 3.20.A). Die Luciferase-Aktivität stellt ein zweites Maß für die Reporteraktivität dar. Der Austausch der SV40pA durch IL10-3'UTR resultiert in mehr als 50% Verlust der Luciferase-Aktivität (Abbildung 3.20.B). Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Powell et al. (2000) überein. Damit wird die posttranskriptionale Regulation mittels 3'UTR nicht durch multiple Tandem-IRES beeinträchtigt.

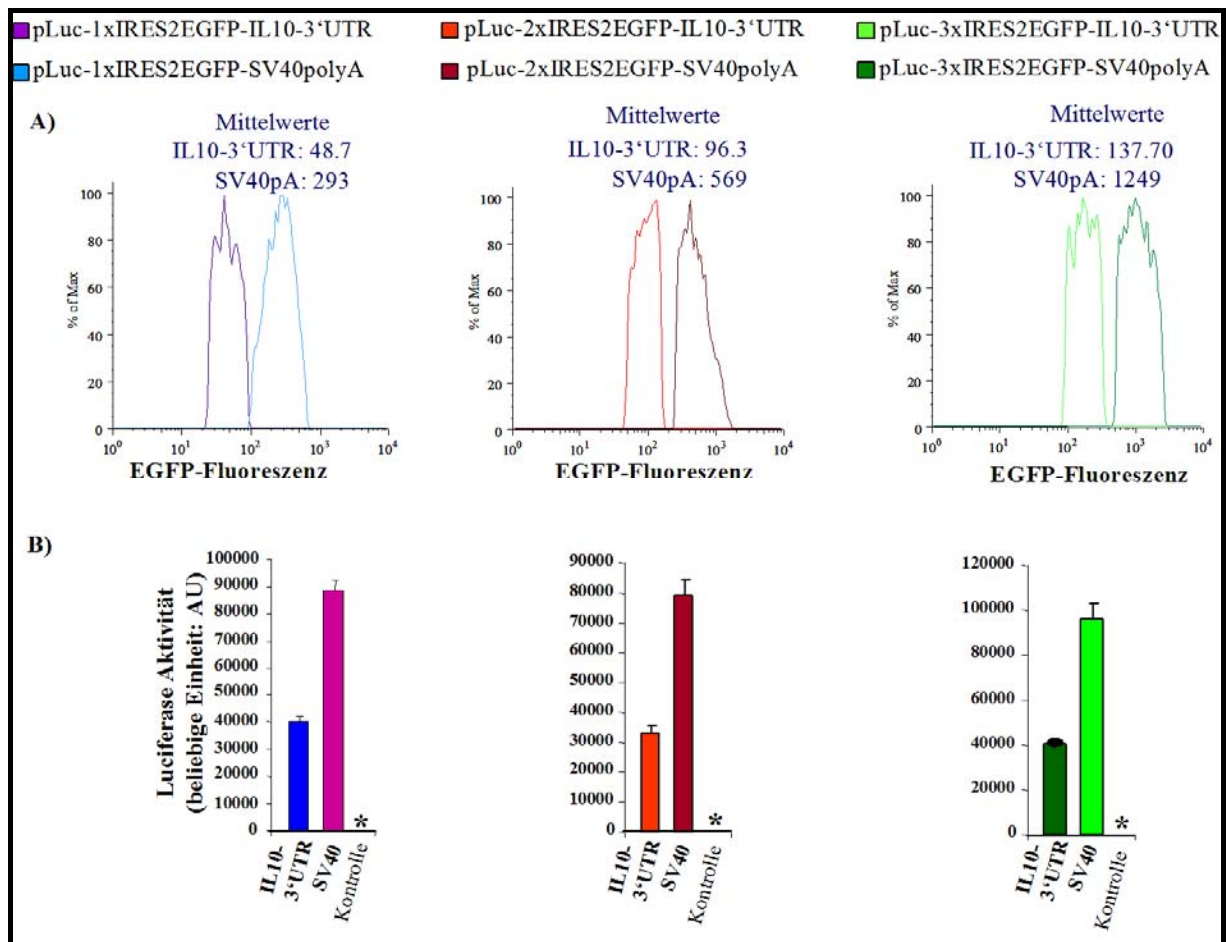


Abbildung 3.20. Vergleich der EGFP-Fluoreszenzintensität zwischen den SV40pA- und IL103'UTR-enthaltenden Konstrukten. (A) Die Fluoreszenzemission von EGFP wurde mittels FACS analysiert. Gezeigt sind Histogramme der EGFP-positiven Zellen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität sind angegeben. (B) Gleiche Mengen Lysate der sechs Zelllinien wurden hergestellt und ihre Luciferase-Aktivität gemessen. Kontrolle: Zellysate von nicht-transfizierten Zellen. AU: arbitrary units. *: Wert unter 50 AU.

3.3.1.5. Die proportionale Erhöhung der Tandem-EGFP-Fluoreszenzintensität ist unabhängig von der posttranskriptionalen Regulation durch 3'UTR

Mit den pLuc-nx(IRES2-EGFP)-SV40-polyA-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzausbeute proportional zur Anzahl der IRESEGFP-Module ist. Es sollte überprüft werden, ob die IL10-3'UTR-enthaltenden Konstrukte sich hinsichtlich der EGFP-Expression gleich verhalten würden wie SV40pA-enthaltende Konstrukte (Abbildung 3.20.).

Die RT-PCR-Analyse zeigt, dass auf RNA-Ebene alle drei pLuc-nx(IRES2EGFP)-IL10-3'UTR-Konstrukte (n=1, 2, oder 3) gleich viel Luc-Transkripte produzieren (Abbildung 3.21.A). Ferner zeigte die Southernblot-Analyse, dass jeweils eine Kopie von jedem Konstrukt ins Genom integriert wurde (Abbildung 3.19.B.) Dementsprechend hängt die Fluoreszenzausbeute von der Anzahl der IRESEGFP-Modulen in den jeweiligen Konstrukten und von der Effizienz der IRES-vermittelten Translation von EGFP ab und nicht von möglicher unterschiedlicher genomischer Integrationseffizienz der Konstrukte.

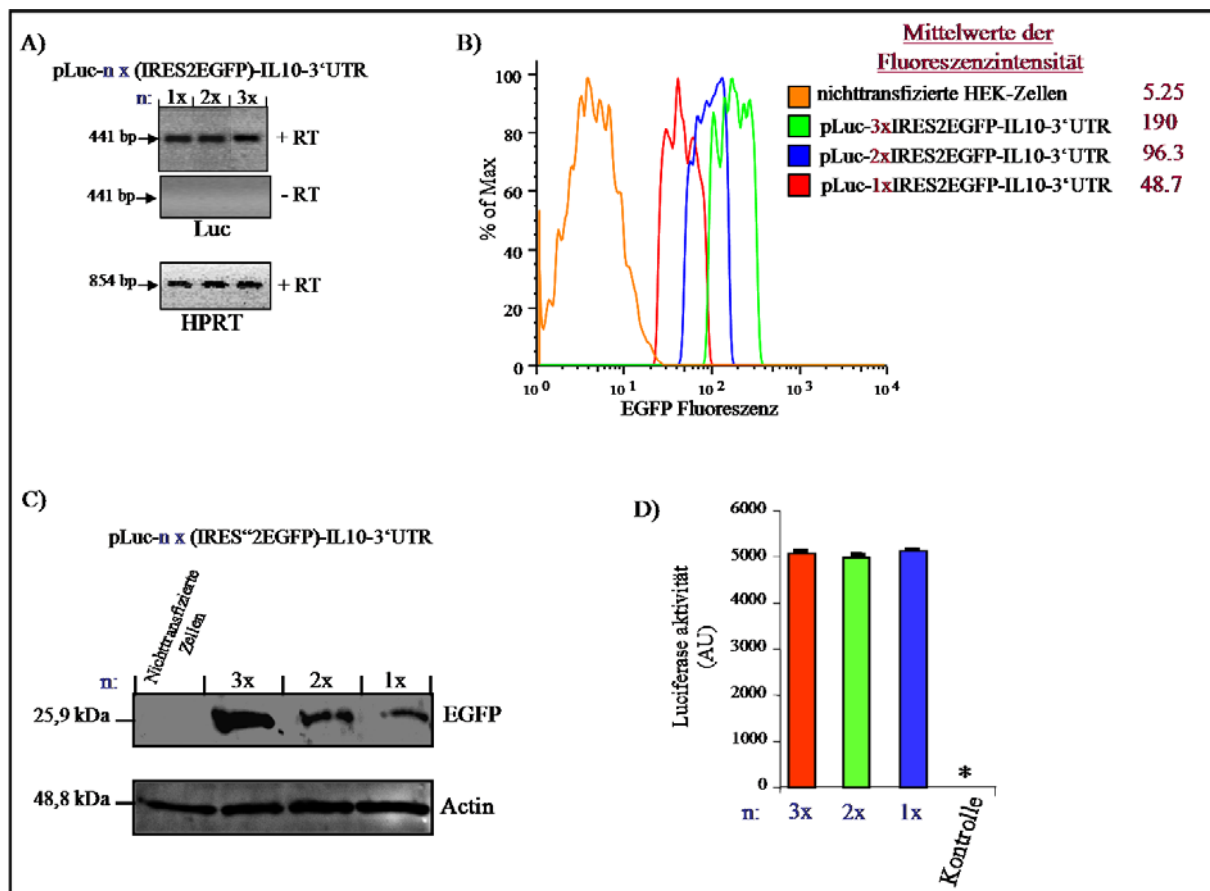


Abbildung 3.21. Expressionsanalyse von EGFP und Luciferase in pLuc-nx(IRES2EGFP)-IL10-3'UTR-exprimierenden Zelllinien (n = 1, 2 oder 3). (A) Gesamt-RNA wurde aus den drei Zelllinien isoliert und mit Baseline-Zero DNase behandelt, um kontaminierende genomische DNA zu eliminieren. Anschließend wurde die Expression der multicistronischen RNAs aus den verschiedenen Konstrukten mittels RT-PCR mit Primer für Luciferase (Luc-Fneu und Luc-Bneu) analysiert. (+RT) und (-RT) weisen auf PCR-Produkte aus der Erststrang-Synthesereaktion, die mit (+RT) oder ohne (-RT, negative Kontrolle) Reverse Transkriptase durchgeführt worden sind, hin. Als Kontrolle wurde RT-PCR-Analyse des HPRT-Gens mit den Primern HumHPRT-F und HumHPRT-B durchgeführt. (B) Die Fluoreszenzemission von EGFP wurde mittels FACS analysiert. Gezeigt sind Histogramme der EGFP-positiven Zellen. Die Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten sind angegeben. (C) Gleiche Proteinmengen der verschiedenen Zelllinienlysate wurden auf 12% SDS-PAGE aufgetrennt und das Expressionsniveau von EGFP mittels Westernblot und Anti-GFP-Antikörper analysiert. Die Immunfärbung gegen Actin ist als Kontrolle dargestellt. (D) Gleiche Proteinmengen der drei Zelllinienlysate wurden hergestellt und ihre Luciferase-Aktivität gemessen. Kontrolle: Zelllysat von nicht-transfizierten Zellen. AU: arbitrary units.*: Wert unter 50 AU.

Die FACS-Analysen der drei Zelllinien, die die multicistronischen Vektoren mit IL10-3'UTR exprimieren, zeigen eine lineare Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz entsprechend der Anzahl der IRESEGFP-Sequenzen (Abbildung 3.21.B). Die Westernblot-Analyse von Zelllysaten aus den drei Zelllinien bestätigt die Erhöhung der EGFP-Expression (Abbildung 3.21.C). Darüber hinaus zeigen die Luciferase-Reporteraktivitäten keinen Unterschied zwischen den drei Zelllinien (Abbildung 3.21.D).

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass unabhängig von der posttranskriptionalen Regulation mittels der 3'UTR, die Erhöhung der EGFP-

Fluoreszenzausbeute proportional zu der Anzahl der IRESEGFP-Sequenzen ist, ohne die Cap-abhängige Genexpression zu beeinträchtigen.

3.3.2. β -Lactamase-Reportersystem

Das IRES-vermittelte polycistronische Reporter-System, wie im vorigen Abschnitt gezeigt werden konnte, ist eine Möglichkeit, um die Reporteraktivität zu erhöhen. Eine andere Möglichkeit besteht in der Verwendung von enzymatisch aktiven Reportern, die farbige fluoreszierende Substrate umsetzen. Für das hier gesteckte Ziel sollte das enzymatische Reporter-gen folgende Voraussetzungen erfüllen. **a)** Das Enzym und sein Substrat dürfen nicht toxisch für Zellen sein. **b)** Das Substrat sollte membrandurchlässig sein, um mit intakten Zellen arbeiten zu können. **c)** Das Produkt der Substratumsetzung sollte hoch polar sein, damit es nicht aus der Zelle diffundiert. **d)** Die enzymatische Aktivität sollte einfach in einzelnen intakten Zellen detektierbar sein.

Als geeignete Enzym/Substrat-Kombination wurde das bakterielle Enzym β -Lactamase (Bla) und das fluoreszierende Substrat CCF2/CCF4 ausgewählt. Obschon β -Lactamase (Bla) als Reporter-gen in Zellen eingesetzt wurde, gibt es bisher kein Mausmodell, in dem β -Lactamase als Reporter-gen benutzt wurde.

β -Lactamase inaktiviert Betalaktam-Antibiotika durch Spaltung des β -Lactam-Ringes (Abbildung 3.22.) (Sykes et al. 1976).

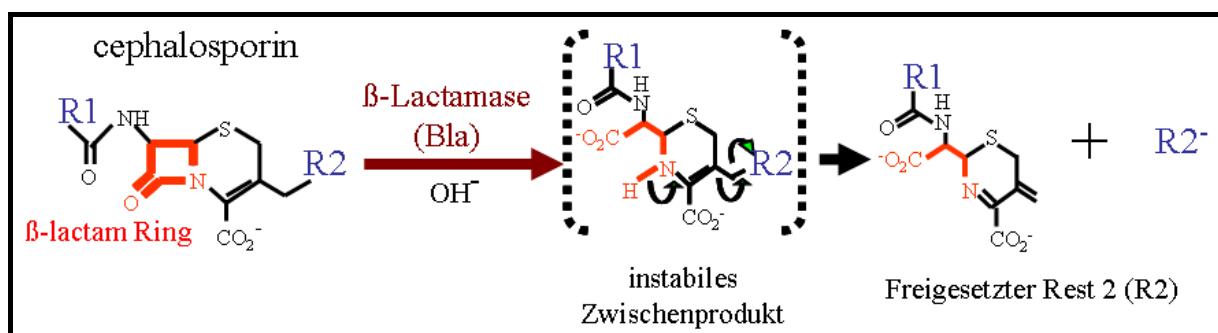


Abbildung 3.22. β -Lactamase (Bla) hydrolysiert die Amidbindung im β -Lactam-Ring (rot gekennzeichnet). Nach spontaner Umlagerungen in ein instabiles Zwischenprodukt entsteht ein Endprodukt, bei dem der Rest 2 (R2) freigesetzt wird.

Die Bedeutung von β -Lactamase als Reporter-gen wurde erst durch die Entwicklung des fluorogenen Substrates CCF2 (Coumarin-Cephalosporin-Fluorescein) realisiert (Zlokarnik et al. 1998). CCF2 als auch die stabilere Version CCF4 sind bei Invitrogen erhältlich. CCF2 bzw. CCF4 besteht aus zwei Fluorophoren (Hydroxycoumarin und Fluorescein), die über ein Cephalosporin-Molekül miteinander verbunden sind (Abbildung 3.23.) und überlappende Emissions/Absorptionsspektren (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer, FRET) aufweisen.

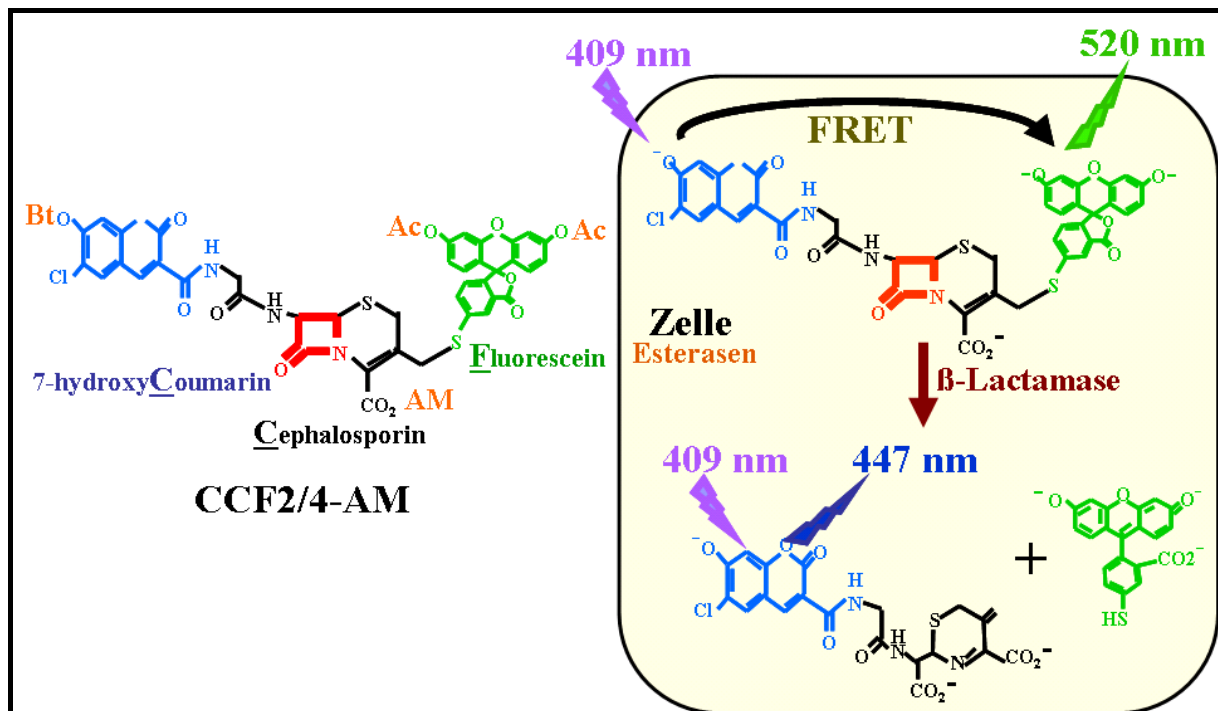


Abbildung 3.23. CCF2-AM bzw. CCF4-AM bestehen aus zwei Fluorophoren: Hydroxycoumarin und Fluorescein, die über ein Cephalosporin-Molekül miteinander verbunden sind. Die Ester-Verbindungen (Ac: Acetyl; Bt: Butyryl; AM: Acetoxymethyl) neutralisieren die Ladungen des Substrats und machen es dadurch membrandurchlässig. Nach der Diffusion ins Zellinnere, katalysieren zytoplasmatische Esterasen die Hydrolyse der Esterbindungen. Wegen seiner nun poly-anionischen Form, wird CCF2/4 in der Zelle zurückgehalten. Im intakten Substrat führt die Anregung von Coumarin (Donor) bei 409 nm zu einem Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) auf Fluorescein (Akzeptor). Dadurch wird Fluorescein angeregt und strahlt grünes Licht aus (detektierbar bei 520 nm). Die β -Lactamase katalysiert die Hydrolyse des Substrats, was zur Trennung vom Donor (Coumarin) und Akzeptor (Fluorescein), und damit zur Unterbrechung des FRET, führt. Die Anregung des Donors (Coumarin) führt dann zur Emission vom blauen Licht (detektierbar bei 447 nm).

Die veresterte Form von CCF2/4 (siehe Abbildung 3.23.), genannt CCF2/4-AM (AM: Acetoxymethyl), ist lipophil und kann somit leicht Zellmembranen passieren. Damit werden schädigende Permeabilisierungsprozeduren der Zellen vermieden. Einmal ins Zellinnere gelangt, werden die vier Esterbindungen des Substrats durch unspezifische zytoplasmatische Esterasen hydrolysiert. Es entstehen negative Ladungen, wodurch die Rückdiffusion von CCF2/4 nach außen verhindert wird. CCF2/4 kann durch Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) sehr einfach, unter dem Mikroskop, Fluoreszenz-Platten-Reader, und im FACS detektiert werden. Im intakten CCF2-Molekül führt die Anregung des kurzwelligen Fluorophors, Coumarin, bei 409 nm zur grünen Fluoreszenzemission aus dem langwelligen Fluorescein (Emission bei 520 nm): Die Photonenemission aus der Anregung von Coumarin wird auf das benachbarte Fluorescein transferiert, die zur Anregung des letzteren führt (Abbildung 3.23.).

β -Lactamase katalysiert die Hydrolyse des CCF2/4-AM-Substrats, was zur Trennung vom Donor (Coumarin) und Akzeptor (Fluorescein) und damit zur Unterbrechung des FRET führt.

Die Anregung des Donors führt dann zur Emission vom blauen Licht direkt aus dem angeregten Coumarin (detektierbar bei 447 nm) (Abbildung 3.23.).

Da das Substrat grün und das Produkt blau fluoreszieren, kann durch die Bildung des Verhältnisses zwischen der blauen Emission bei 447nm und der grünen Emission bei 520nm die Menge des umgesetzten Substrats, unabhängig vom Zelltyp, der Zellgröße, der Zellzahl oder der aufgenommenen Substratmenge, ermittelt werden.

Im Gegensatz zu EGFP, das einige Stunden zur „Reifung“ benötigt bevor man es detektieren kann, kann die Expressionsmenge von β -Lactamase in Echtzeit verfolgt werden. Veränderung im Emissionsverhältnis des Substrats kann schon bei der Expression von 50 β -Lactamase-Molekülen gemessen werden (zum Vergleich, sind mindestens 1×10^5 Moleküle notwendig um EGFP-Expression zu detektieren) (Zlokarnik et al. 1998; Qureshi SA 2007). Darüber hinaus hat β -Lactamase eine Halbwertszeit von ca. 206 Minuten und ähnelt damit der von IL-10 (ca. 60-180 min) (Le T. et al. 1997; Brewer et al. 2003). Dies erlaubt die Durchführung von kinetischen Studien.

3.3.2.1. Testen des β -Lactamase-Reportersystems *in vitro*

TEM-1 β -Lactamase (Bla) ist das Ampicillin-Resistenzgen, das als Selektionsmarker in zahlreichen Plasmiden eingebaut wird. Die TEM-1 β -Lactamase wurde aus dem Plasmid pBR322 mit den Primern Lact-*Bst*XI-F und Lact-*Not*I-B amplifiziert (Abbildung 3.24.). Die Primer wurden so generiert, dass die Sekretionssignalsequenz (ca. 60 Basenpaare lang) von Bla durch die Sequenz ATGGGA (codiert für Methionin und Glycin) ausgetauscht wurde. β -Lactamase wird ohne ihre Signalsequenz im Zytoplasma der Zellen zurückgehalten (Moore et al. 1997). Das PCR-Produkt wurde mit *Bst*XI und *Not*I verdaut, und in pIRES2EGFP-Vektor über die Schnittstellen *Bst*XI/*Not*I, an der Stelle von EGFP kloniert. Das so generierte Konstrukt wurde p1xIRES2-Bla bezeichnet (Abbildung 3.24.). Dieses Konstrukt diente anschließend als Ausgangsvektor zur Generierung des p2xIRES2-Bla-Konstrukts. Die IRES-Bla-Sequenz wurde aus p1xIRES2-Bla mit den Primern IRES2-*Not*I-F und Lact-*Not*I-B amplifiziert, mit *Not*I verdaut und anschließend in pIRES2-Bla über *Not*I kloniert.

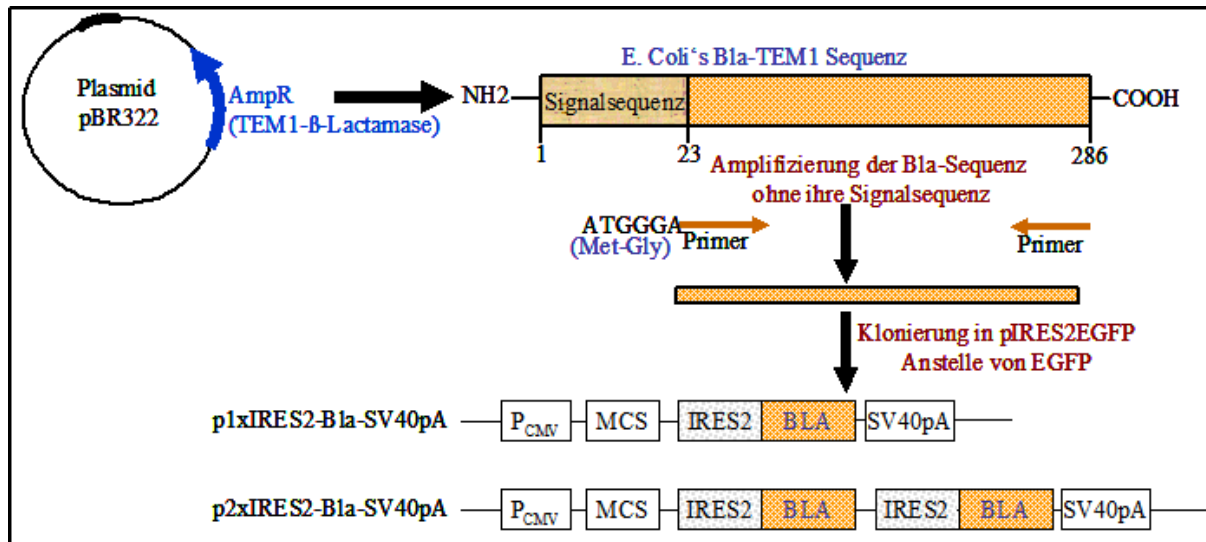


Abbildung 3.24. Die TEM-1 β-Lactamase wurde aus dem Plasmid pBR322 ohne die Sekretionssignalsequenz, welche durch die Sequenz ATGGGA ausgetauscht wurde, amplifiziert und in pIRES2EGFP-Vektor über die Schnittstellen *Bst*XI/*Not*I, gegen EGFP ausgetauscht. Das so generierte Konstrukt wurde p1xIRES2-Bla bezeichnet. Dieses Konstrukt diente als Ausgangsvektor zur Generierung des p2xIRES2-Bla-Konstrukts. Die IRES-Bla-Sequenz wurde aus p1xIRES2-Bla amplifiziert und in p1xIRES2-Bla über *Not*I kloniert.

Die p1xIRES2-Bla- und p2xIRES2-Konstrukte wurden in HEK 293-Zellen transient exprimiert und die β-Lactamase-Aktivität untersucht. Die Zellen wurden mit dem Substrat CCF4-AM für eineinhalb Stunden bei RT beladen, dann gewaschen und mit Formaldehyd fixiert (siehe dazu Methodenteil 2.2.4.7.). Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BX-61) mit dem Anregungsfilter für CCF4 (Anregung bei 409 nm) auf β-Lactamase-Aktivität untersucht (Abbildung 3.25.A). Die β-Lactamase-Aktivität konnte durch blaue Fluoreszenz in den transfizierten Zellen nachgewiesen werden. In einem weiteren unabhängigen Versuch wurden HEK 293-Zellen mit dem p1xIRES2-Bla-Konstrukt transfiziert und im FACS analysiert. Die β-Lactamase-Aktivität konnte auch im FACS detektiert werden (Abbildung 3.25.B).

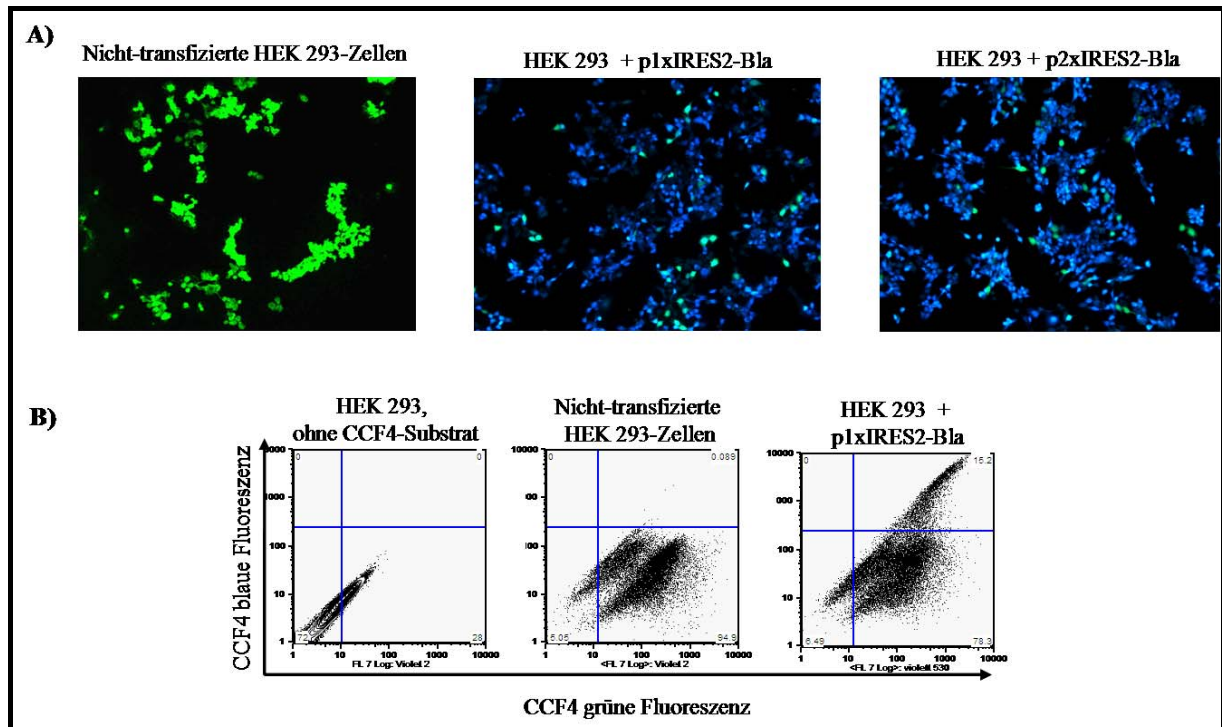


Abbildung 3.25. Test der β -Lactamase-Aktivität in HEK 293-Zellen. Die generierten Reporterkonstrukte p1xIRES-Bla und p2xIRES-Bla wurden in HEK 293-Zellen transient transfiziert. 24h nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem Substrat CCF4-AM für 2 Stunden beladen, anschließend gewaschen und fixiert. Die Reporteraktivität wurde ermittelt: **(A)** im Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 40x) nach Anregung bei 409 nm. Die Umsetzung des Substrats führt zur blauen Fluoreszenz aus dem angeregten Coumarin (detektierbar bei 447 nm). In Abwesenheit von β -Lactamase fluoreszieren die Zellen grün (Emission bei 520 nm). **(B)** Im FACS (CyanADP-LX) konnte blaue Fluoreszenz nur in Zellen, die β -Lactamase exprimieren, detektiert werden. Zellen, die mit dem Substrat nicht beladenen wurden, zeigen keine Fluoreszenz.

3.4. Die IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus

Zur Verbesserung der Reporteraktivität wurden nun zwei Reportersysteme getestet: ein IRES-vermitteltes polycistronisches Reportersystem mit EGFP als Reporter gen (Abschnitt 3.3.1.); und ein enzymatisches Reporter gen, die β -Lactamase, dessen Expression in intakten Zellen mittels FACS und Fluoreszenzmikroskopie mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden kann (Abschnitt 3.3.2.). Im Vergleich zu anderen Zytokinen wie z. B. TNF- α ist die zelluläre Produktion von IL10 relativ schwach. Um mit der Reporter gentechnologie auf zellulärer Ebene mittels Fluoreszenzmesstechniken trotzdem ein IL-10 Expressionssignal zu detektieren, wurden beide Strategien, das polycistronische und das enzymatische Reportersystem kombiniert, und eine IL10- β -Lactamase-Reportermaus hergestellt, in der die β -Lactamase aus einem bi-cistronischen Reportersystem exprimiert wird (Abbildung 3.26.).

3.4.1. Generierung des IL10-2xIRES-Bla-Targeting-Konstrukts

Alle für die Klonierung eingesetzten Primer sind im Abschnitt 2.1.6. aufgelistet.

Zur Generierung des IL10-2xIRES-Bla-Targeting-Konstrukts wurde die in Abbildung 3.26. dargestellte und im folgenden beschriebene Klonierungsstrategie durchgeführt.

Als Basis für Klonierung diente das Konstrukt pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-SV40pA-2,2kb3'IL10 (Abschnitt 3.2.1. und Abbildung 3.26.).

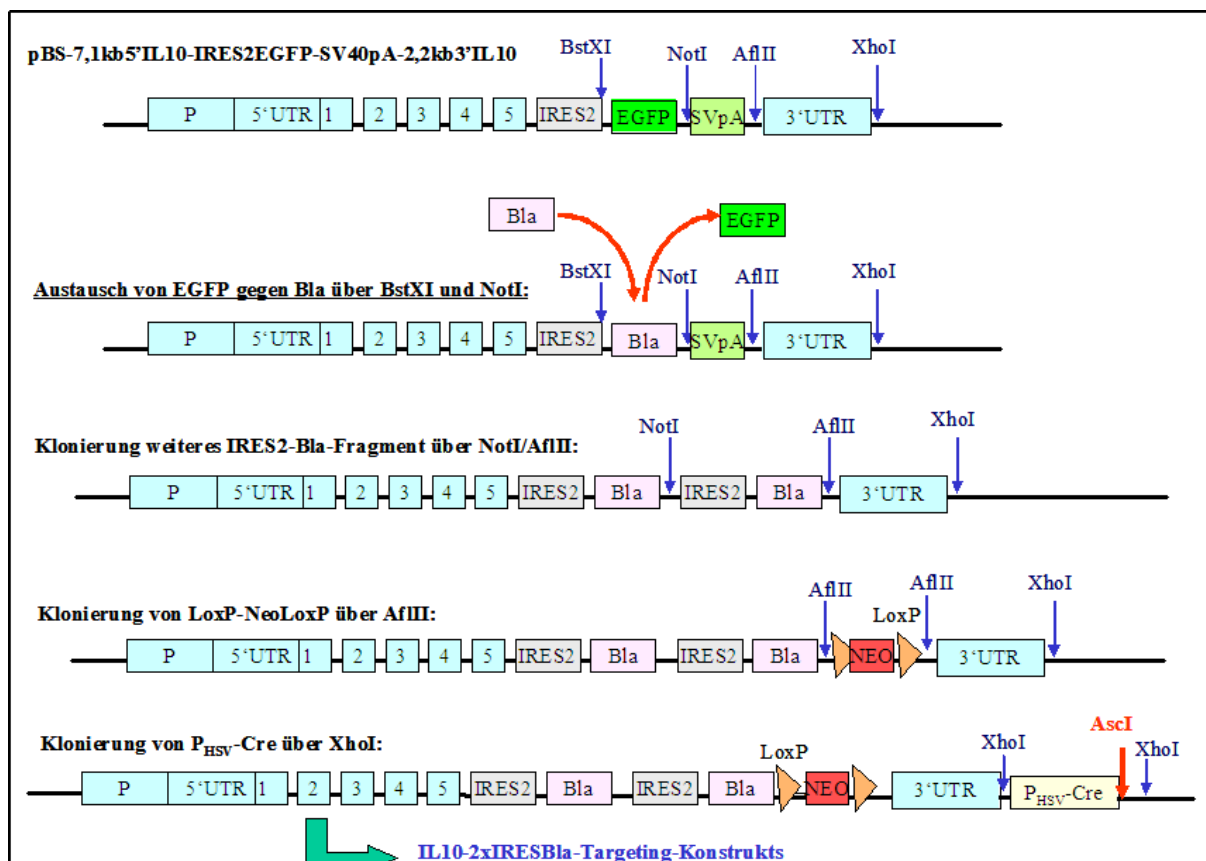


Abbildung 3.26. Klonierungsstrategie zur Herstellung des IL10-2xIRESBla-Targeting-Konstrukts. Siehe weitere Details im Text (Abschnitt 3.4.1.).

Die TEM-1 β -Lactamase (ohne ihr Sekretionssignal) wurde aus dem Vektor p1xIRES2-Bla (Abschnitt 3.3.2.1. und Abbildung 3.24.) mit den Primern Lact-*Bst*XI-F und Lact-*Not*I-B amplifiziert, mit *Bst*XI und *Not*I verdaut und in pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-SV40pA-2,2kb3'IL10, anstelle von EGFP kloniert. Das daraus resultierende Konstrukt wurde als pBS-7,1kb5'IL10-IRES2Bla-SV40pA-2,2kb3'IL10 bezeichnet.

Im nächsten Schritt wurde die IRES-Bla-Sequenz aus p1xIRES2-Bla mit den Primern IRES2-*Not*I-F und Lact-*Af*III-B amplifiziert, mit *Not*I und *Af*III verdaut und anschließend in pBS-7,1kb5'IL10-IRES2Bla-SV40pA-2,2kb3'IL10 über *Not*I/*Af*III, anstelle von SV40pA kloniert. Das resultierende Zwischenkonstrukt wurde pBS-7,1kb5'IL10-2xIRES2Bla-2,2kb3'IL10 genannt.

Eine LoxP-flankierte Neomycin-Kassette wurde aus dem Vektor pEasyFloX mit den Primern LpNeoLp-*Af*III-F und LpNeoLp-*Af*III-B amplifiziert, mit *Af*III verdaut, gereinigt und anschließend in pBS-7,1kb5'IL10-2xIRES2Bla-2,2kb3'IL10 über *Af*III kloniert. Der resultierende Vektor wurde pBS-7,1kb5'IL10-2xIRES2Bla-Neo-2,2kb3'IL10 genannt. Das IL10-2xIRESBla-Targeting-Konstrukt war damit fertig gestellt. Das Konstrukt wurde für die Elektroporation mit *Xho*I linearisiert.

Um den Anteil homolog rekombinanter ES-Klone zu erhöhen, wurde eine neue Strategie entwickelt. Eine Cre-Rekombinase (Cre)-Kassette unter dem HSV-Promoter wurde als negativer Selektionsmarker hinter dem 3'Arm des Targeting-Vektors eingebaut. Die Neo-Kassette verleiht den embryonalen Stammzellen (ES)-Zellen, die das Targeting-Konstrukt aufgenommen haben, Resistenz gegen Geneticin (G418). G418 ist ein Antibiotikum, das die Proteinsynthese in Säugerzellen durch Störung der ribosomalen Funktion blockiert. Wenn das Targeting-Konstrukt per homologe Rekombination gegen die Wildtyp-IL-10-Sequenz ausgetauscht wird, führt das zur Deletion der Cre-Kassette. Wird dagegen das Konstrukt irgendwo im Genom über nicht-homologe Rekombination eingebaut, so wird in der Regel das Konstrukt samt der Cre-Kassette integriert. Cre wird somit exprimiert, schneidet die zwischen LoxP gelegene Sequenz (in diesem Fall die Neo-Kassette) heraus. Die ES-Zellen sind infolgedessen nicht mehr in der Lage in G418-Medium zu wachsen. Weil die Cre-Rekombinase von den transfizierten Zellen selbst synthetisiert wird und keine Substratzugabe von Außen nötig ist, wird der Targeting-Vektor, welcher die Cre-Kassette als negativen Selektionsmarker enthält, als „**autoselektiver**“-Targeting-Vektor benannt.

Die Cre-Kassette wurde zuerst in das pBluescript umklontiert. Die Cre-Kassette wurde dafür aus dem Vektor pIC-Cre (Gu, H. et al., 1993) mit *Hind*III und *Xho*I rausgeschnitten und in

pBluescript-II-KS über *HindIII/XhoI* kloniert. Der entstandene Vektor wurde als pBS-Cre bezeichnet. Die Integrität der Sequenz wurde durch Sequenzierung geprüft. Anschließend wurde die Cre-Kassette aus pBS-Cre mit den Primern pBSupMCS-*XhoI-AscI* und pBSdownMCS-*XhoI* amplifiziert, mit *XhoI* verdaut und in pBS-7,1kb5'IL10-2xIRES2Bla-Neo-2,2kb3'IL10 über *XhoI* kloniert. Über diesen Klonierungsschritt wurde eine *AscI*-Schnittstelle im Anschluß der Cre-Kassette integriert. *AscI* erlaubt die Linearisierung dieses Targeting-Konstrukts für die Elektroporation.

Das ca. 19 kb große IL10-2xIRESBla „autoselektive“-Targeting-Konstrukt war damit fertig gestellt (siehe Abbildung 3.26.).

Die Integrität der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Die homologe Integration des Targeting-Konstrukts kann nach *EcoRI*-Verdau und Hybridisierung mit der externen 3'-Probe überprüft werden. Homolog rekombinante ES-Klone sollen ein *EcoRI*-Fragment der Größe 7,6 kb, welches um 0,8 kb größer als das Wildtyp-Fragment (6,8 kb) ist, aufweisen (Abbildung 3.27.).

3.4.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-2xIRES-Bla-ES-Zellen

Um die Effizienz der Cre-Kassette als negativen Selektionsmarker zu überprüfen, wurden beide Konstrukte, das *XhoI*-linearisierte IL10-2xIRESBla-Targeting-Konstrukt und das *AscI*-linearisierte IL10-2xIRESBla „autoselektive“-Targeting-Konstrukt, welches die Cre-Kassette enthält, unter den gleichen Bedingungen einzeln in den ES-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Jeweils 240 G418-resistente ES-Klone von jeder Transfektion wurden isoliert, deren DNA gereinigt und mit *EcoRI* verdaut (siehe Abschnitt 2.2.1.13.). Anschließend wurden Southernblot-Hybridisierungen mit der externen 3'Probe durchgeführt. Aus den ES-Klonen, die mit IL10-2xIRESBla-Targeting-Konstrukt transfiziert waren, wurden 3 positive Klone erhalten. Bei den ES-Zellen, die mit dem „autoselektiven“-Targeting-Vektor transfiziert wurden, waren 7 ES-Klone positiv. Mit dem „autoselektiven“-Targeting-Vektor konnte damit die Ausbeute an homolog rekombinanten ES-Klonen um das 2-fache erhöht werden.

In der Abbildung 3.28. sind das Targeting-Konstrukt, die Lage der externen 3'Probe und der internen Neo-Probe, die verwendeten *EcoRI*-Restriktionsstellen, der erwarteten Fragmentgrößen und die Ergebnisse der Southernblot-Analyse einiger ES-Klone gezeigt.

Eine weitere genomische Integration des IL10-2xIRESBla-Targeting-Konstrukts, außer im IL-10-Lokus, konnte durch Analyse mit der internen Neo-Probe ausgeschlossen werden (Abbildung 3.27.).

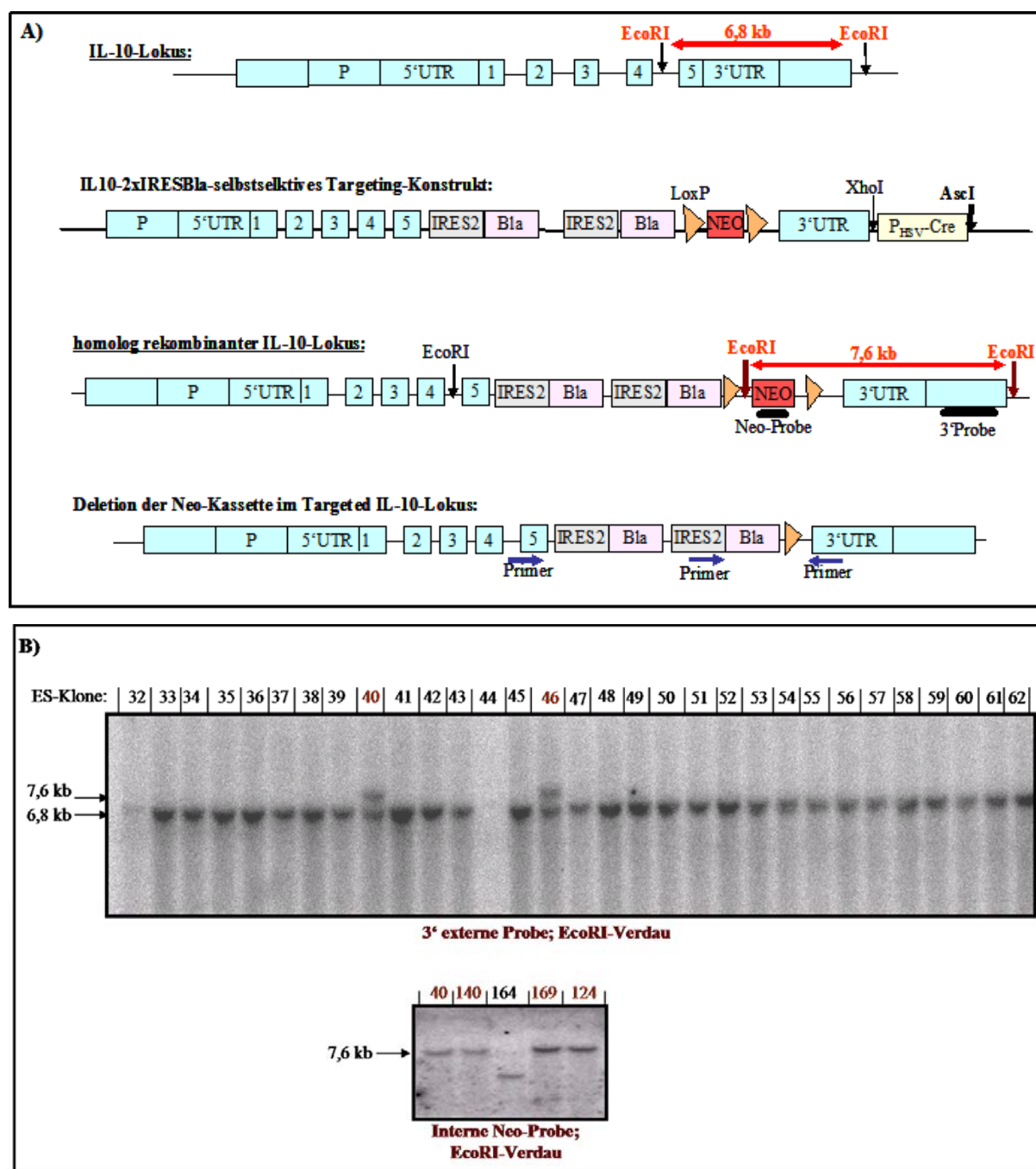


Abbildung 3.27. (A) Gen-Targeting-Strategie zur Herstellung der IL10-2xIRESBla-Reportermaus. Die Organisation des IL-10-Gens der Maus, mit Angabe der Lokalisierung der Restriktionsstellen, die für Southernblot-Analyse verwendet wurden, ist dargestellt. Der IL10-2xIRESBla-Targeting-Vektor bestehend aus einem 7,1 kb IL10-5'-IL10-Arm gefolgt von zwei IRES-Bla-Sequenzen, die unmittelbar nach dem Stopcodon von IL-10 eingebaut sind, einer LoxP-flankierten Neo-Kassette als positiver Selektionsmarker, einem 2,2 kb IL10-3'-homologen Arm und einer Cre-Kassette als negativen Selektionsmarker. Homolog rekombinierter IL-10-Lokus mit Darstellung der für die Charakterisierung der ES-Klone verwendeten Hybridisierungsproben (externe 3'Probe und interne Neo-Probe), sowie der verwendeten *EcoRI*-Restriktionsstellen und der erwarteten Fragmentgrößen (7,6 kb *EcoRI*-Fragment für das modifizierte Allel) nach Southernblot-Analyse. Die Deletion der Neomycin-Kassette nach der Verpaarung der IL10-2xIRESBla-Neo-Mäuse mit Cre-Deleter-Mäusen. **(B) Darstellung der Southernblot-Analyse einiger ES-Zellklone.** DNA wurde mit *EcoRI* verdaut und in der Southernblot-Analyse mit der externen 3'Probe (oberer Blot) oder mit der internen Neo-Probe (unterer Blot) hybridisiert. Die positiven Klone zeigen zwei Banden. Die nach oben verschobene Bande (bei 7,6 kb) entstand durch homolog-rekombinante Integration des IL-10-2xIRESBla-Allels im IL10-Lokus.

3.4.3. Etablierung der IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus

Vier positive ES-Klone wurden in C57Bl/6J-Blastozysten injiziert. Die Blastozysten wurden dann in den Uterus scheinchwangerer CD-1-Mäuse (Albinos) implantiert. Über 15 chimäre Mäuse sind daraus hervorgegangen. Zwei männliche Fellchimären (aus zwei unabhängigen ES-Klonen) wurden direkt mit C57Bl/6J-Cre-Deleter-Weibchen verpaart. Für die PCR-Genotypisierung der IL10-IRESBla-Mäuse wurden die Primer pIRES2-1020F / Bla-80B und IL10-6775F / IL10-7150B eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.6.). Die Deletion der Neo-Kassette wurde mit den Primern Bla-555F und IL10-7150B geprüft. Bei erfolgreicher Neo-Deletion wurde mit diesen Primern ein PCR-Produkt der Größe 290 bp amplifiziert. Bei einigen Nachkommen der F1-Generation konnte die Keimbahnübertragung des Bla-Reportergens bei gleichzeitiger Deletion der Neo-Kassette festgestellt werden. Diese Mäuse waren der Ausgang für die Etablierung und Züchtung der IL10-2xIRESBla-Reportermaus. Im Folgenden wird diese Reportermaus, der Einfachheit halber, als *IL10-IRESBla-Reportermaus* bezeichnet.

3.4.4. Analyse der IL10-IRESBla-Reportermaus

In ihrem allgemeinen Erscheinungsbild lassen sich die IL10-IRESBla-Reportermäuse nicht von den Wildtyptieren unterscheiden. Sie sind vital und fertil. Ihr Körpergewicht und -größe sowie Fellbeschaffenheit wiesen keine Auffälligkeiten auf. Die Innereien (Milz, Leber, Magen, Herz, Darm, etc.) der transgenen Mäuse und Wildtyptiere zeigen keine Unterschiede, weder bezüglich des Gewichts noch der Größe.

FACS-Analysen der Zellfrequenzen des adaptiven Immunsystems in Zellsuspensionen aus Milz und Thymus zeigten keinen Unterschied in der Anzahl der B-Zellen, CD4- und CD8-T-Zellen, die jeweils mit anti-B220, anti-CD4 und anti-CD8 angefärbt worden sind (Abbildung 3.28.).

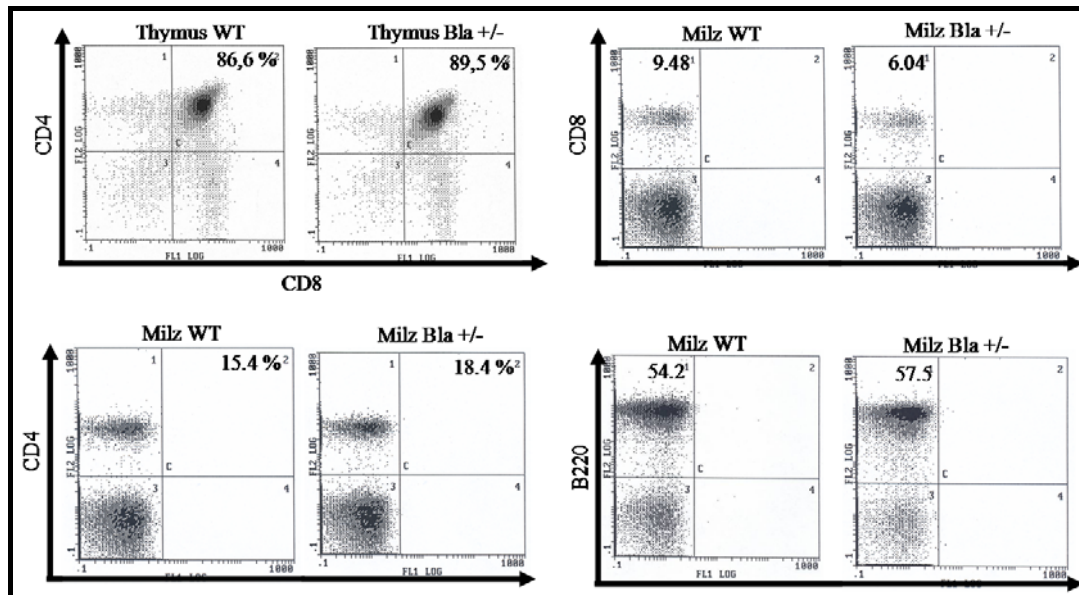


Abbildung 3.28. Analyse einiger Parameter des adaptiven Immunsystems. Einzelzellsuspensionen wurden aus Milz und Thymus von WT-Mäusen und heterozygoten (+/-) IL10-IRESBla-Reportermäusen präpariert, mit FITC- oder PE-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker angefärbt und im FACS analysiert. Die Prozentanteile der verschiedenen Zellpopulationen sind in ihren jeweiligen Quadranten angegeben. Die FACS-Analyse ist repräsentativ für Mausgruppen (N = 4). Die heterozygoten IL10-IRESBla-Reportermäuse zeigen normale Anzahl der CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen und B-Zellen in der Milz und Thymus.

Die Stimulierung von BMDC (aus Knochenmark differenzierte DCs) aus WT-Mäusen und heterozygoten IL10-IRESBla-Mäusen mit 300 ng/ml LPS (TLR4-Agonist) oder 9 µg/ml LcrV (TLR2-Agonist) für 14 Stunden resultierte in vergleichbaren Produktionsmengen von IL-10, KC, IL-6 und TNFα (Abbildung 3.29.).

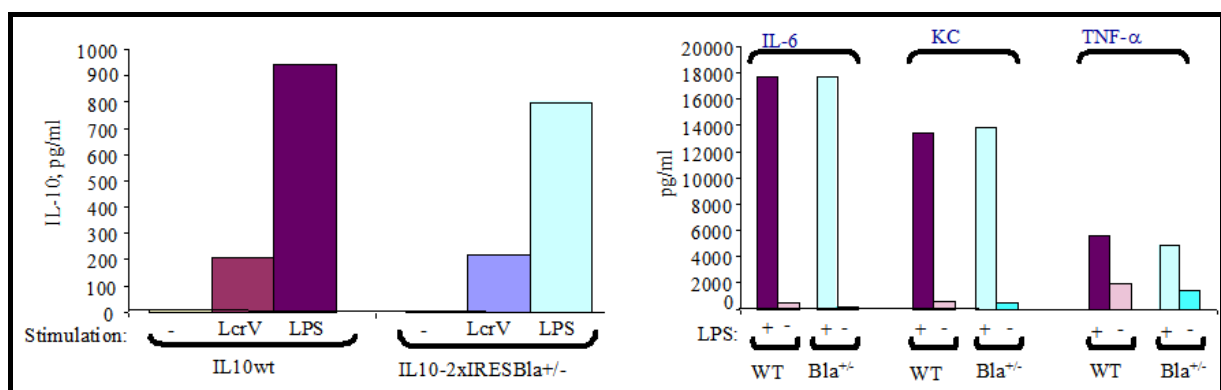


Abbildung 3.29. Vergleich der Cytokinproduktion in DCs von WT- und IL10-IRESBla-Mäusen. BMDCs aus WT-Mäusen und heterozygote IL10-IRESBla-Mäusen wurden nicht (-), mit 300 ng/ml LPS oder 9 µg/ml LcrV stimuliert. Nach 14 h wurden die Überstände abgenommen und IL-10, IL-6, TNF-α und KC mittels CBA-Assay gemessen. BMDCs aus der heterozygoten IL10-IRESBla-Reportermouse zeigen normale Zytokinproduktion.

Auch infektionsbiologisch zeigten WT-Mäuse und heterozygote IL10-IRESBla-Mäuse keinen Unterschied, wie sich am Beispiel der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* zeigte (Abbildung 3.30.).

Zwei Vierergruppen aus WT- und heterozygoten IL10-IRESBla-Mäusen wurden durch intraperitoneale Injektion von 4×10^4 *Yersinia enterocolitica* (WAC-pYV) infiziert. Milz und Leber wurden 5 Tage später entnommen, in PBS homogenisiert und Verdünnungsreihen davon auf *Yersinia*-selektivem CIN-Agar (BD Biosciences) ausplattiert. Nach ca. 36 h Inkubation bei 27 °C wurde die CFU ermittelt. Die Keimzahlen in Milz und Leber infizierter WT-Mäuse und IL10-IRESBla-Reportermäuse waren vergleichbar (Abbildung 3.30.).

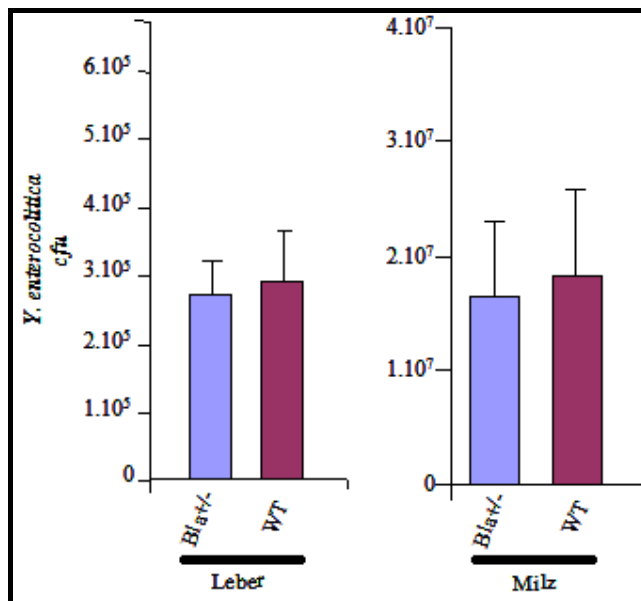


Abbildung 3.30. Keimzahlen in Milz und Leber von *Y. enterocolitica* (WAC-pYV) infizierten WT-Mäusen und heterozygoten IL10-IRESBla-Reportermäusen. Zwei Vierergruppen aus WT- und heterozygoten IL10-IRESBla-Mäusen wurden durch intraperitoneale Injektion von 4×10^4 WAC-pYV infiziert. Milz und Leber wurden 5 Tage später isoliert, in PBS homogenisiert und Verdünnungsreihen davon auf *Yersinia*-selektivem CIN- Agar ausplattiert. Nach ca. 36 h Inkubation bei 27 °C wurde die CFU ermittelt. Die Mittelwerte aus den Mausgruppen sind dargestellt. IL10-IRESBla-Mäuse zeigen gleiche Anfälligkeit für *Yersinia*-Infektion wie WT-Mäuse.

3.4.4.1. Bla-Reporteraktivität ist in DCs und Makrophagen detektierbar

Um zu testen, ob die IL10-IRESBla-Reportermäuse für den Nachweis der IL-10-Induktion auf zellulärer Ebene verwendbar ist, wurden Knochenmarkszellen aus WT- und IL10-IRESBla-Mäusen isoliert und *in vitro* zu Makrophagen differenziert. Diese BMDM wurden mit LPS, LcrV oder Zymosan für 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Bla-Substrat CCF4-AM behandelt und unter dem Fluoreszenz-Mikroskop durch Anregung bei 409 nm, untersucht. WT-Makrophagen zeigten erwartungsgemäß grüne Fluoreszenz, da sie keine Bla exprimieren und infolgedessen das Substrat nicht umsetzen können. Darüber hinaus zeigt dieses Ergebnis, dass kaum bzw. sehr schwache spontane Spaltung des Substrats stattgefunden hat. BMDM aus IL10-IRESBla-Reportermäusen zeigten dagegen mit LPS oder LcrV Stimulation blaue Fluoreszenz (Abbildung 3.31.), was die Expression und Aktivität von

Bla demonstriert. Die LPS-Stimulierung führte im Vergleich zu den anderen Stimuli zu mehr blauen Zellen, mit stärkerer Fluoreszenz.

Die Tatsache, dass die Reporteraktivität sogar visuell mit dem Fluoreszenz-Mikroskop detektierbar ist, spricht für die hohe Sensitivität der IL10-IRESBla-Reportermaus. Zum Vergleich konnte keine bzw. erst nach zusätzlicher Immunfärbung von EGFP eine sehr schwache Fluoreszenz in Makrophagen von IL10-IRES-EGFP-Reporteremäusen detektiert werden (Abbildung 3.13.E).

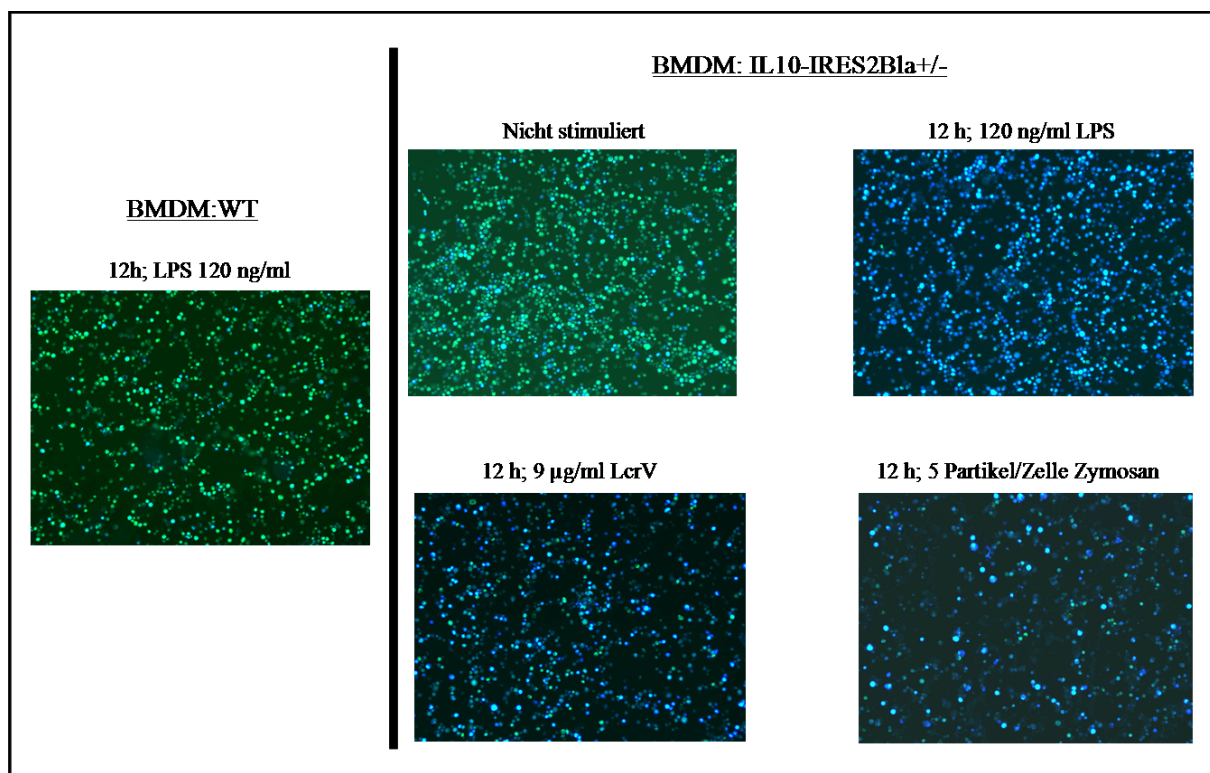


Abbildung 3.31. Bla-Reporteraktivität ist hocheffizient in Makrophagen detektierbar. BMDM aus WT-Mäusen und heterozygoter IL10-IRESBla-Mäusen (Bla^{+/-}) wurden mit 120 ng/ml LPS, 9 µg/ml LcrV, oder Zymosan (5 Partikel/Zelle) für 12h stimuliert. Anschließend wurden die Zellüberstände abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und mit dem Bla-Substrat CCF4-AM für zwei Stunden inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 3,7% Formaldehyd fixiert und erneut gewaschen. Die blau-grüne Fluoreszenz wurde mittels Fluoreszenz-Mikrophotographie durch Anregung bei 409 nm dokumentiert (Vergrößerung 40x).

Als nächstes wurde untersucht, ob die IL-10-Reporteraktivität auch in DCs detektiert werden kann. BMDCs von WT- und IL10-IRESBla-Mäusen wurden mit 100 ng/ml LPS, 6 µg/ml LcrV oder Zymosan (5 Partikel/Zelle) für 12 Stunden stimuliert. Die Zellen wurden anschließend mit dem Bla-Substrat CCF4-AM beladen (siehe Methodenteil), gewaschen, fixiert und anschließend im FACS (CyanADP-LX) untersucht (Abbildung 3.32.A). Bla-Reporteraktivität konnte im FACS detektiert werden. Vergleichbar mit den

Fluoreszenzmikroskop-Ergebnissen von Makrophagen (Abbildung 3.31.), zeigte LPS auch bei DCs den stärksten IL-10-Bla- stimulierenden Effekt.

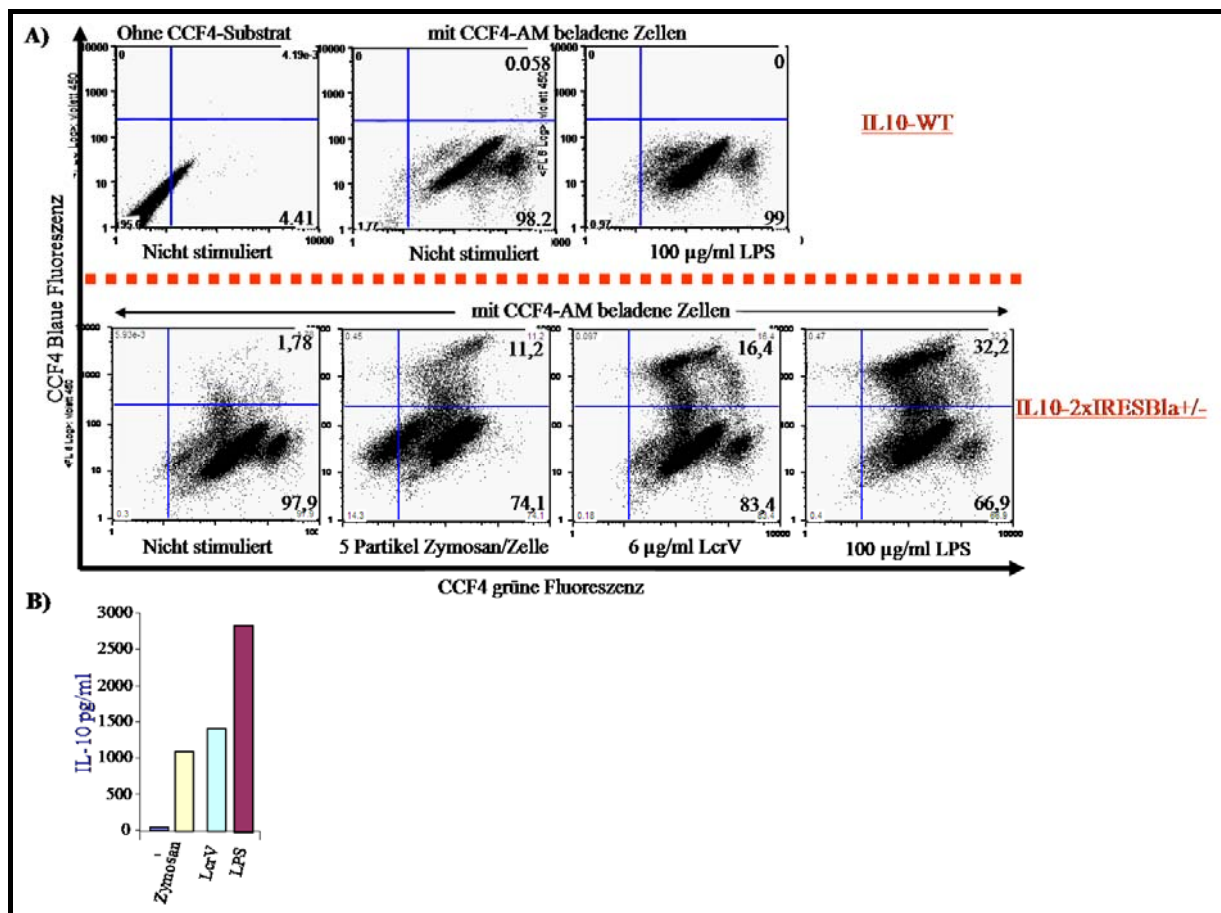


Abbildung 3.32. Bla-Reporteraktivität ist hocheffizient in DCs detektierbar. BMDCs aus WT-Maus und heterozygoter IL10-IRESBla-Maus (Bla+/-) wurden mit LPS, LcrV oder Zymosan für 12h stimuliert. (A) Die Zellüberstände wurden für IL-10 Bestimmungen aufgehoben und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit CCF4-AM für zwei Stunden inkubiert. Nach dem Waschen und Fixieren wurden die Zellen im FACS durch Anregung bei 409 nm analysiert. (B) Die IL-10-Konzentration wurde in den Zellüberständen mittels CBA-Assay bestimmt.

Um zu überprüfen, ob die gemessene Bla-Reporteraktivität mit der Expression von IL-10 korreliert, wurde die IL-10-Konzentration in den Kultur-Überständen der stimulierten DCs mittels CBA-Assay (Abschnitt 2.2.4.6.) bestimmt. Im Einklang mit der Bla-Aktivität zeigen LPS-stimulierte Zellen die höchste IL10-Konzentration (Abbildung 3.32.B). Die Bla-Reporteraktivität korreliert mit der IL10-Sekretion.

Auch in DCs zeigt sich die effizientere Bla-Reporteraktivität. Bei BMDCs aus IL10-IRESGFP-Reporterermäusen, die gleichermaßen mit 100 ng/ml LPS stimuliert wurden, konnte keine EGFP-Reporteraktivität mittels FACS detektiert werden (Abbildung 3.13.C).

Nichtstimulierte BMDM und BMDCs aus IL10-IRESBla-Mäusen emittierten nur grüne Fluoreszenz (Abbildungen 3.31. und 3.32.A). Dies zeigt, dass trotz ihrer hohen Sensitivität, die IL10-IRESBla-Reportermaus keine unspezifische Reporteraktivität aufzeigt.

3.4.4.2. Die IL10-IRESBla-Reportermaus ermöglicht kinetische IL-10-Expressionsanalysen

Wie im Abschnitt 3.3.2. beschrieben wurde, hat β -Lactamase eine Halbwertszeit von ca. 206 Minuten und ähnelt damit der von IL-10 (ca. 60-180 min) (Le et al. 1997; Brewer et al. 2003). Diese Eigenschaft zusammen mit der hoch sensitiven Bla-Reporteraktivität sind optimale Voraussetzungen, welche kinetische und Echtzeitexpressionsanalysen mit dem IL10-IRESBla-Reportersystem erlauben. Um dies zu überprüfen, wurden BMDCs aus IL10-IRESBla-Reportermaus mit LPS für unterschiedliche Zeiten stimuliert und die Bla-Aktivität im FACS analysiert.

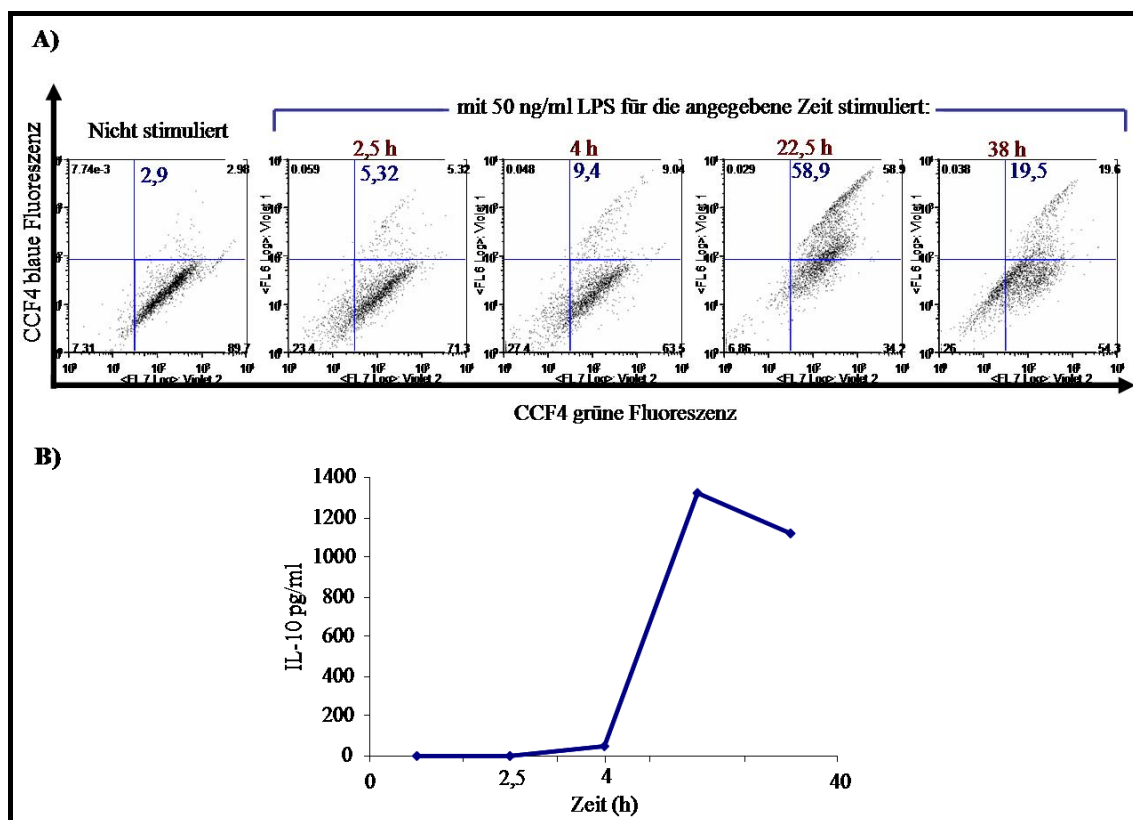


Abbildung 3.33. IL10-IRESBla-Reportermaus ermöglicht kinetische IL-10-Expressionsanalysen. (A) BMDCs aus heterozygoter IL10-IRESBla-Maus (Bla^{+/-}) wurden mit 50 ng/ml LPS für die angegebene Dauer stimuliert. Die Zellen wurden dann mit CCF4-AM für 2 h beladen und anschließend im FACS analysiert. (B) Die IL-10-Konzentration wurde in den abgenommenen Zellüberständen mittels CBA-Assay bestimmt.

Abbildung 3.33.A zeigt, dass mit zunehmender LPS-Stimulationsdauer die Intensität Bla-exprimierender Zellen zunimmt. Nach 38 Stunden stieg die Bla-Expression bzw. Aktivität wieder ab. Die gemessenen IL-10-Konzentrationen in den Kulturüberständen der stimulierten DCs korrelieren mit der Bla-Aktivität (FACS-Ergebnisse) (Abbildung 3.33.B).

3.4.4.3. Identifizierung von IL10-produzierenden Zellen *ex vivo*

Um zu überprüfen, ob die Bla-Aktivität nach Infektionen von Mäusen nachweisbar ist, und die Identifizierung von IL-10-produzierenden Zellen *ex vivo* möglich wäre, wurden zwei WT-Mäuse und drei heterozygote IL10-IRESBla-Reporter-mäuse mit *Yersinia enterocolitica* (WAC-pYV) infiziert. Drei Tage nach der intraperitonealen Inokulation der Mäuse mit 6×10^4 *Y. enterocolitica*, wurde die Milz entnommen und daraus Zellsuspension, wie im Methodenteil (Abschnitt 2.2.4.2.) beschrieben präpariert. Die Zellen wurden umgehend mit CCF4-AM für zwei Stunden beladen (siehe Abschnitt 2.2.4.7.). Anschließend erfolgte die Immunfärbung der Zelloberflächenmarker (Abschnitt 2.2.4.8.) von CD4-T-Zellen (Anti-CD4-AK), CD8-T-Zellen (Anti-CD8-AK), NK-Zellen (Anti-NK1.1-AK), DCs (Anti-CD11c-AK), B-Zellen (Anti-CD45R-AK), Granulozyten (Anti-Ly6G)-AK) und Makrophagen (Anti-F4/80-AK). Die Zellen wurden dann fixiert und im FACS analysiert. Als Kontrolle dienten Milzzellsuspensionen aus zwei nicht infizierten IL10-IRESBla-Reporter-mäusen.

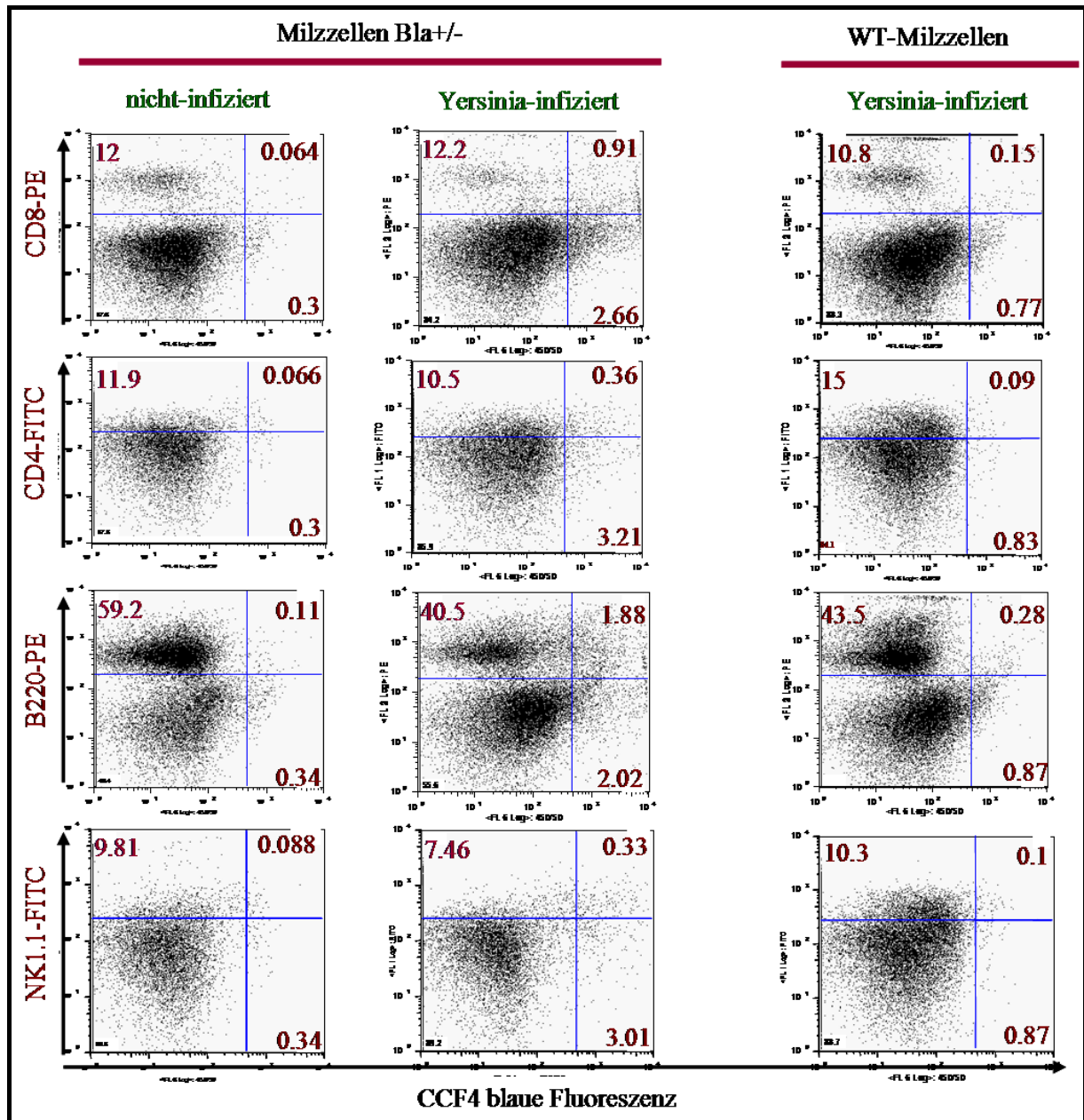


Abbildung 3.34. (1. Teil; siehe 2. Teil auf der nächsten Seite). Identifizierung von IL-10-produzierenden Zellen *ex vivo*. WT-Mäuse und IL10-IRESBla-Mäuse wurden intraperitoneal mit 6×10^4 *Y. enterocolitica* (WAC-pYV) infiziert. Drei Tage später wurden Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen daraus präpariert. Die Zellen wurden mit CCF4-AM für 2 h beladen, anschließend mit FITC-, TexasRed- oder PE-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker angefärbt und im FACS analysiert. Die Prozentanteile der verschiedenen Bla-positiven Zellpopulationen sind in ihren jeweiligen Quadranten angegeben. Die FACS-Analyse ist repräsentativ für drei IL10-Bla-Reportermäuse und zwei WT-Mäuse.

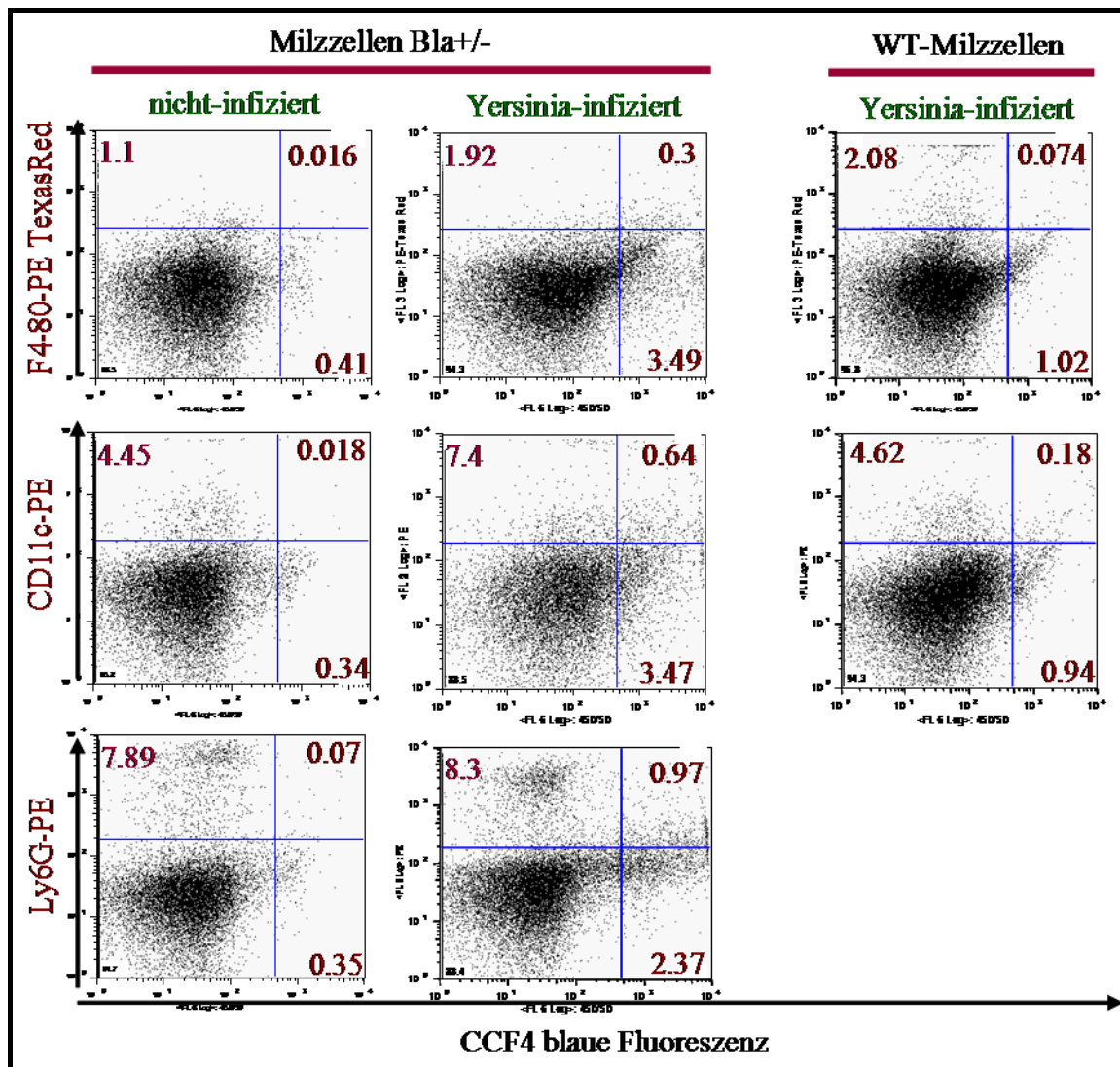


Abbildung 3.34. (2. Teil). Siehe Legende auf der vorherigen Seite (Teil 1 der Abbildung).

Die FACS-Analysen zeigen eindeutige β -Lactamase-Aktivität in den Milzzellen aus infizierten IL10-IRESBla-Reporterermäusen ohne Re-Stimulation *in vitro* (Abbildung 3.34.). Weder in den Milzzellen aus den nicht-infizierten IL10-IRESBla-Reporterermäusen, noch in denen aus den infizierten WT-Mäusen konnten relevante β -Lactamase-Aktivitäten detektiert werden (Abbildung 3.34.). Die gemessenen Bla-Aktivitäten sind damit auf infektionsbedingte Induktion der IL-10-Expression zurückzuführen.

Interessanterweise stellte sich heraus, dass alle untersuchten Immunzellen der Milz Bla-Aktivität, und damit IL-10-Expression, aufweisen. Die mittleren Prozentsätze der Bla-positiven Zelltypen aus drei IL10-IRESBla-Reporterermäusen, drei Tage nach ihrer intraperitonealen Infektion mit 6×10^4 *Y. enterocolitica* (WAC-pYV), sind in der Tabelle 3.1. aufgelistet.

	Prozentsatz aus allen Bla-positiven Milzzellen	Prozentsatz innerhalb der eigenen Gesamt Zelltyppopulation
CD8 ⁺ T-Zellen	18 % ± 4	5,6 % ± 1,4 (aller CD8 ⁺ T-Zellen)
CD4 ⁺ T-Zellen	5 % ± 2	2,4 % ± 0,4 (aller CD4 ⁺ T-Zellen)
B 220 ⁺ B-Zellen	41 % ± 5	4 % ± 1 (aller B220 ⁺ B-Zellen)
F4/80 ⁺ Makrophagen	6 % ± 0,5	10 % ± 2 (aller F4/80 ⁺ Makrophagen)
Ly6G ⁺ PMNs	17 % ± 2,5	8 % ± 1,5 (aller Ly6G ⁺ PMNs)
CD11c ⁺ Zellen (DCs)	9 % ± 2,3	5 % ± 2,1 (aller CD11c ⁺ Zellen)
NK 1.1 ⁺ NK-Zellen	5 % ± 2	3 % ± 0,8 (aller NK1.1 ⁺ NK-Zellen)

Tabelle 3.1. WT-Mäuse (2 Mäuse) und IL10-IRESBla-Mäuse (3 Mäuse) wurden intraperitoneal mit 6×10^4 *Y. enterocolitica* (WAC-pYV) infiziert. Drei Tage später wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen daraus präpariert. Die Zellen wurden mit CCF4-AM für 2 h beladen, anschließend mit FITC-, TexasRed- oder PE-gekoppelten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker angefärbt und im FACS analysiert (siehe Abbildung 3.34.). Die mittleren Prozentanteile der verschiedenen Bla-positiven Zellpopulationen aus 3 infizierten IL10-IRESBla-Mäusen sind angegeben.

ca. 3,4 bis 3,8 % aller Milzzellen sind Bla-Positiv. Dabei machen B220⁺B-Zellen ca. 40% dieser Bla-positiven Zellen aus. Die CD8-T-Zellen und Granulozyten sind mit Anteilen von jeweils ca. 18% und 17% vertreten. Betrachtet man die Anzahl der positiven Zellen innerhalb einer Zelltyp-Population, so sind ca. 10% aller Makrophagen Bla-positiv und stellen damit den größten Anteil aktivierter Zellen innerhalb einer Zelltyppopulation dar. Dann folgen Granulozyten mit 8% und CD8-T-Zellen mit ca. 5,6%. Interessanterweise sind nur ca. 4% aller B-Zellen (B220⁺) Bla-positiv.

3.5. IL10-3xIRESEGFP-Reportermausmodell

Im Abschnitt 3.3.1. wurde das IRES-vermittelte polycistronische Reportersystem mit EGFP als Reporter gen erfolgreich *in vitro* getestet. Um die Effizienz und Anwendungsmöglichkeit dieses Systems *in vivo* zu überprüfen, sollte eine Reportermaus mit einem polycistronischen IRESEGFP-Targeting-Konstrukt generiert werden. Mit dieser Reportermaus könnte erstmalig eine detaillierte Analyse über die Expressionskinetik eines IRES-vermittelten polycistronischen Reportersystems *in vivo* durchgeführt und die in Kapitel 3.3.1. gestellten Fragen unter *in vivo* Bedingungen beantwortet werden: **1)** kann die Ausbeute der Fluoreszenz durch multiple hintereinander fusionierte IRESEGFP-Sequenzen wesentlich erhöht werden? **2)** Wird die Cap-abhängige Translation durch dahinter geschaltete multiple IRESEGFP-Sequenzen beeinflusst? **3)** Wird die posttranskriptionale Regulation der Genexpression durch multiple IRESEGFP-Sequenzen beeinträchtigt?

3.5.1. Generierung des IL10-3xIRESEGFP-Targeting-Konstrukts

Als Basis für die Generierung des IL10-3xIRESEGFP-Targeting-Konstrukts diente das Konstrukt pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-Neo-2,2kb3'IL10 (Abschnitt 3.2.1.).

Eine IRESEGFP-IRESEGFP-Sequenz (2xIRESEGFP) wurde aus dem Vektor pLuc-3xIRESEGFP-Konstrukt (siehe Abbildung 3.16.) durch Endonuklease-Verdau mit *NotI* isoliert und in pBS-7,1kb5'IL10-IRES2EGFP-Neo-2,2kb3'IL10 über *NotI*-Schnittstelle umkloniert. Das generierte Konstrukt wurde als pBS-7,1kb5'IL10-3xIRES2EGFP-Neo-2,2kb3'IL10 bezeichnet.

Um den Anteil homolog rekombinanter ES-Klone zu erhöhen, wurde die Cre-vermittelte negative Selektion verwendet (autoselektiver Targeting-Vektor). Die Cre-Kassette wurde aus pBS-Cre mit den Primern pBSupMCS-*XhoI*-*AscI* und pBSdownMCS-*XhoI* amplifiziert, mit *XhoI* verdaut und in pBS-7,1kb5'IL10-3xIRES2EGFP-Neo-2,2kb3'IL10 über *XhoI* kloniert. Mit diesem Klonierungsschritt wurde eine *AscI*-Schnittstelle im Anschluß der Cre-Kassette integriert. *AscI* erlaubt die Linearisierung dieses Targeting-Konstrukts für die Elektroporation. Das ca. 21 kb große IL10-3xIRESEGFP „autoselektive“-Targeting-Konstrukt war damit fertig gestellt (siehe Abbildung 3.35.).

Die Integrität der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Die homologe Integration des Targeting-Konstrukts kann durch *EcoRI*-Verdau und Hybridisierung mit der externen 3'-Probe überprüft werden. Homolog rekombinante ES-Klone sollten ein *EcoRI*-Fragment der

Größe 7,6 kb, welches um 0,8 kb größer als das Wildtyp-Fragment (6,8 kb) ist, aufweisen (Abbildung 3.35.).

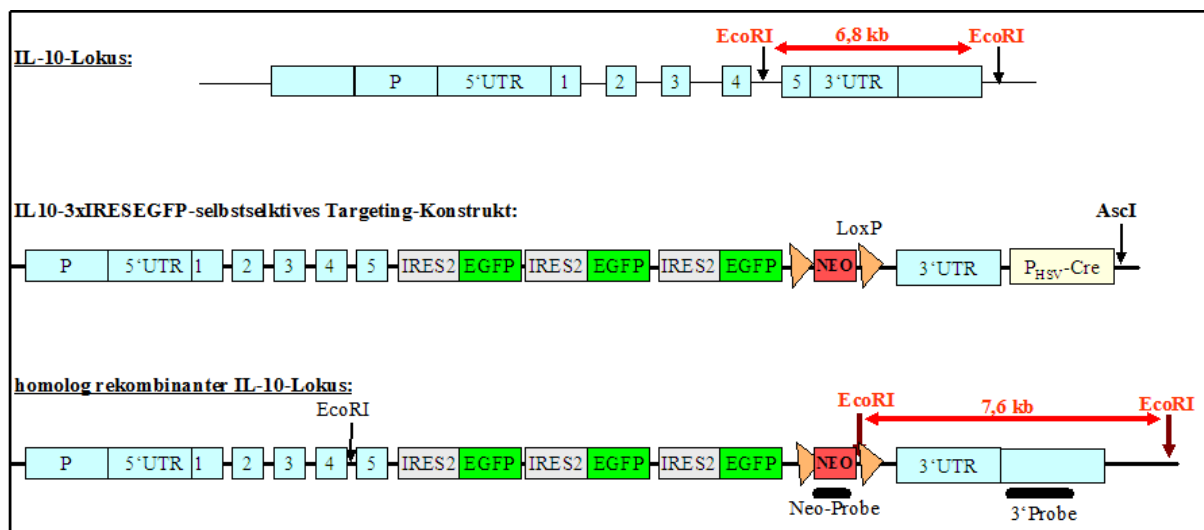


Abbildung 3.35. Gen-Targeting-Strategie zur Herstellung der IL10-3xIRESEEGFP-Reportermaus. Dargestellt sind die Organisation des IL-10-Mausgens, mit Angabe der Lokalisierung der Restriktionsstellen, die für Southernblot-Analyse verwendet werden. Der IL10-3xIRESEEGFP-Targeting-Vektor besteht aus einem 7,1 kb IL10-5'-IL10-Arm gefolgt von drei IRES-EGFP-Sequenzen, die unmittelbar nach dem Stopcodon von IL-10 eingebaut sind, einer LoxP-flankierten Neo-Kassette als positiver Selektionsmarker, einem 2,2 kb IL10-3'-homologen Arm und einer Cre-Kassette als negativen Selektionsmarker. Homolog rekombinierter IL-10-Lokus mit Darstellung der für die Charakterisierung der ES-Klone verwendeten Hybridisierungsproben (externe 3'Probe und interne Neo-Probe), sowie der verwendeten EcoRI-Restriktionsstellen und der erwarteten Fragmentgrößen (7,6 kb EcoRI-Fragment für das modifizierte Allel) nach Southernblot-Analyse.

3.5.2. Generierung homolog rekombinanter IL10-3xIRESEEGFP-ES-Klone

Das IL10-3xIRESEEGFP „autoselektive“-Targeting-Konstrukt wurde mit AscI verdaut, gereinigt und in den ES-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. 240 G418-resistente ES-Klone wurden isoliert, deren DNA gereinigt und mit *EcoRI* verdaut (siehe Methodenteil, Abschnitt 2.2.1.13.). Anschließend wurden mittels Southernblot-Hybridisierungen und der externen 3'Probe 6 positive ES-Klone identifiziert.

In der Abbildung 3.36. sind Southernblot-Analysen einiger ES-Klone gezeigt.

Eine weitere genomische Integration des IL10-2xIRESBla-Targeting-Konstrukts, außerhalb im IL-10-Lokus konnte durch Analyse mit der internen Neo-Probe ausgeschlossen werden (Abbildung 3.36.).

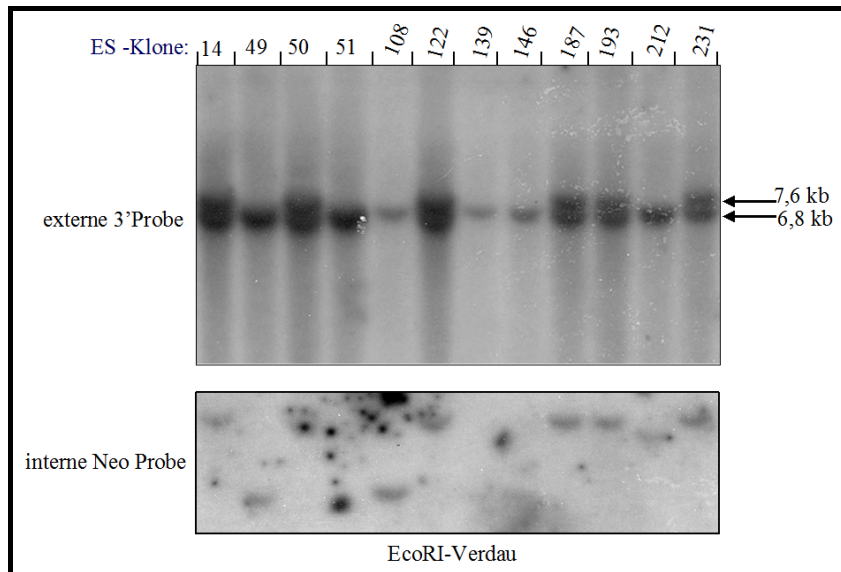


Abbildung 3.36. Darstellung der Southernblot-Ergebnisse einiger ES-Zellklone. DNA wurde mit EcoRI verdaut und in der Southernblot-Analyse mit der externen 3'Probe (oberer Blot) oder mit der internen Neo-Probe (unterer Blot) hybridisiert. Die positiven Klone zeigen zwei Banden. Die nach oben verschobene Bande (bei 7,6 kb) entstand durch homolog-rekombinante Integration des IL-10-3xIRESEGF-Allels im IL10-Lokus.

3.5.3. Generierung von IL10-3IRESEGF chimäre Mäuse

Zwei positive ES-Klone wurden in C57Bl/6J-Blastozysten injiziert. Die Blastozysten wurden dann in den Uterus scheinchwangerer CD-1-Mäuse (Albinos) implantiert. Kürzlich wurden chimäre Mäuse geboren. Diese werden demnächst direkt mit C57Bl/6J-Cre-Deleter-Mäusen verpaart, um bei gleichzeitiger Deletion der Neo-Kassette die Keimbahnübertragung der Reportergens feststellen zu können.

4. Diskussion

Der Schutz gegen Krankheitserreger erfordert die Aktivierung von Entzündungsreaktionen und die Mobilisierung verschiedener Immunzellen, welche einer Ausbreitung der Erreger im Körper entgegenwirken und ihre Eliminierung herbeiführen.

Das komplexe Immunsystem stellt aber eine große Herausforderung für den eigenen Körper dar. Einerseits soll es stark genug aktiviert werden, um eine effektive Abwehr zu erzielen, andererseits darf die Immunantwort nicht überreagieren und dem eigenen Körper Schaden zufügen. Die toxischen Aktivitäten der Zellen und ihre freigesetzten Entzündungsmediatoren (Radikale, Proteasen, Cytokine etc.) wirken auch destruktiv auf das Gewebe. Unkontrollierte Entzündungen können die Entwicklung diverser Krankheiten, wie Krebs, Arteriosklerose, Asthma, Arthritis und Psoriasis initiieren (Krishnamoorthy et al. 2006; Asquith et al. 2007).

Um überschießende Immunreaktionen zu verhindern, muss eine Immunregulation aktiv werden, die einerseits die Entzündungsreaktion gegen Erreger zeitlich und örtlich eingrenzt, und andererseits eine Immunreaktion gegen körpereigene oder harmlose Antigene verhindert. Zu den molekularen Regulatoren, über die das Immunsystem dies bewerkstelligt, gehören die anti-inflammatorischen Cytokine.

Das Cytokin Interleukin-10 (IL-10) ist eines der wichtigsten Immunsuppressoren, das die Inflammation limitiert und für eine ausgewogene nichtpathologische Immunantwort sorgt.

IL-10 inhibiert u.a. die Produktion von starken proinflammatorischen Cytokinen wie TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und MIP (Moore et al. 2001). Darüber hinaus inhibiert IL-10 die Aktivierung von Makrophagen und inhibiert die Expression von MHC-II und costimulierenden Molekülen (Moore et al. 2001, Redpath et al. 2001).

Es ist zwar bekannt, dass verschiedene Zelltypen IL-10 produzieren können (Moore et al. 2001), allerdings ist noch weitgehend unklar, welche dieser diversen Zellen während einer Immunantwort *in vivo* die wichtigsten IL-10-Produzenten sind. Die Identifizierung der IL-10-produzierenden Zellen in Abhängigkeit vom Gewebetyp und der Art des infizierenden Erregers bzw. Art des Stresses ist eine wichtige Voraussetzung, um an ein besseres Verständnis der zellulären Regulationsmechanismen der Immunantwort zu gelangen. Dieses Verständnis ist wiederum eine Voraussetzung, um therapeutische Mittel zur Modulation der IL-10-Expression und Eindämmung pathologischer Immunantworten entwickeln zu können.

Wegen der schnellen Sekretion von IL-10 und seiner kurzen Halbwertszeit ist es jedoch schwierig die IL-10-produzierenden Zellen *in vivo* zu bestimmen. Das Ziel dieser Arbeit war

daher eine IL10-Reportermaus zu etablieren, in welcher die IL-10-produzierenden Zellen detektiert werden.

4.1. Die IL10-EGFP-Mauslinie

Bei der IL10-EGFP-Mauslinie wurde eine EGFP-kodierende Sequenz unmittelbar nach der 5'UTR und vor dem Start-Codon des Exons 1 im IL-10-Lokus eingebaut (Abschnitt 3.1.). Ein Stop-Codon am Ende der EGFP-kodierenden Sequenz sollte dafür sorgen, dass die Translation von EGFP hier endet und kein EGFP-IL-10-Fusionsprotein entsteht. Zusätzlich wurde ein Polyadenylierungssignal (pA) aus dem Simianvirus (SV) 40 zwischen der EGFP-Sequenz und dem Exon1 von IL-10 eingebaut, um einerseits die Transkription hier zu beenden und andererseits die Expression von EGFP zu stabilisieren (Abbildung 3.1.). Da hiermit die IL-10-Expression unterbunden wird, sollte nur mit heterozygoten IL10-EGFP-Mäusen gearbeitet werden, um die IL-10-Expression durch ein intaktes Allel weiterzusichern. Die IL10-EGFP-Mauslinie wurde generiert und analysiert.

4.1.1. Fehlen der EGFP-Expression aufgrund anomales Spleißens

Keine EGFP-Expression konnte nach Stimulation *in vivo* oder *in vitro*, weder im Westernblot, noch in der Fluoreszenzmikroskopie oder im FACS nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1.4.1.). RT-PCR-Analysen lieferten schließlich den Grund für das Fehlen der EGFP-Expression (siehe Abbildung 3.6.). Durch einen unerwarteten, anomalen Spleißvorgang wurde die EGFP-Sequenz entfernt. IL-10 konnte erstaunlicherweise, wenn auch schwach, doch deutlich auf RNA-Ebene detektiert werden. Die IL-10-codierende Sequenz liegt hinter einem Polyadenylierungssignal des Simianvirus 40 (SV40pA) am 3'-Ende der EGFP-Sequenz (siehe Abbildung 3.1.). Die Transkription sollte an diesem PolyA-Signal abgebrochen werden. Dass dennoch IL-10-mRNA synthetisiert wurde, deutet darauf hin, dass EGFP samt dem Polyadenylierungssignal durch Spleißen aus der prä-mRNA entfernt wurde.

Die generierte IL10-mRNA kodiert aber nicht für ein funktionelles Protein, da kein IL-10 in aktivierten Zellen aus homozygoten IL10-EGFP-Mäusen gemessen werden konnte. Darüber hinaus entwickelten die homozygoten Mäuse, ähnlich den IL-10-defizienten Mäusen (Kühn et al. 1993), spontan eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, die sich vom Duodenum bis zum Rektum erstreckte und wiesen ein reduziertes Gewicht (altersabhängig bis zu 35%) und eine kürzere Lebensdauer im Vergleich zu WT-Mäusen auf.

Essentielle Signale zum Spleißen eines Introns aus einer prä-mRNA beinhalten Cis-Elemente an der 5'Spleißstelle, an der 3'Spleißstelle und eine Verzweigungsstelle im Intron (Lewin 1998; Knippers 2001).

Die Analyse der möglichen (IL10-5'UTR-EGFP-SV40pA-IL10)-prä-mRNA-Sequenz mittels Bioinformatik (wie <http://cbs.dtu.dk/services/NetGene2>) zeigen in der Tat mindestens eine sehr wahrscheinliche 5'Spleiß-Stelle in der klonierungsbedingt integrierten Sequenz zwischen der 5'UTR von IL-10 und der codierenden Sequenz von EGFP (Abbildung 4.1.). Dieser potentielle Spleiß-Donor entspricht der idealen Konsensus-Sequenz **AG:GURAGU** für Säuger-Spleiß-Donor (R: Purinnukleotid; (:) bedeutet Übergang von Exon zu Intron) (Lewin 1998; Knippers 2001).

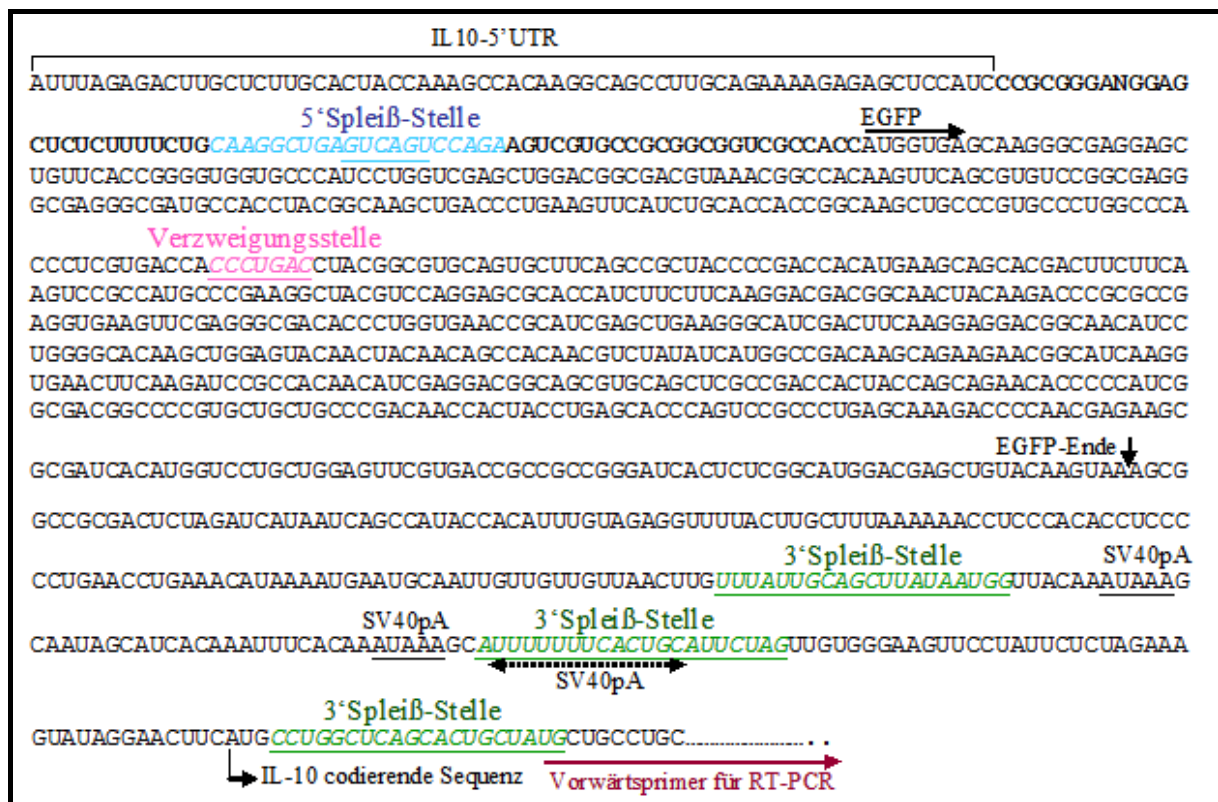


Abbildung 4.1. Putative Spleißstellen in der IL10-EGFP-prä-mRNA aus der IL10-EGFP-Mauslinie. Eine klonierungsbedingt integrierte Sequenz (fett markiert) zwischen der 5'UTR von IL-10 und der codierenden Sequenz von EGFP enthält mindestens eine hoch potentielle 5'-Spleißstelle (hellblau markiert und unterstrichen). Eine potente Verzweigungsstelle ist rosa markiert. Die 3'Spleißstellen sind grün markiert. Der für die RT-PCR von IL-10 verwendete Vorwärtsprimer ist dunkelrot markiert. Er überlappt teilweise mit der putativen 3'Spleißstelle. Anfang und Ende der EGFP-codierenden Sequenz ist angegeben. IL10-5'UTR: 5'-nichttranslatierbare Region von IL-10. N: Nukleotid konnte mittels Sequenzierung nicht eindeutig ermittelt werden. SV40pA: Polyadenylierungssignale des Simianvirus 40.

Als Spleiß-Akzeptor könnte eine der drei identifizierten putativen 3'Spleiß-Stellen, zwei im langen PolyA-Schwanz und eine direkt hinter dem IL10-Startcodon, dienen. Diese Stellen weisen große Homologie zur Konsensus-Sequenz der Säuger-3'Spleißstelle

$Y \geq_{11} NYAG:G/A$ (Y: Pyrimidinnukleotid; N: beliebiges Nukleotid; (:)) bedeutet Übergang von Intron zu Exon; / steht für „oder“ auf (Lewin 1998; Knippers 2001). Eine weitere im IL10-Sequenzbereich liegende 3'Spleißstelle, welche für diesen Spleißvorgang verwendet werden könnte, kann ausgeschlossen werden, da das RT-PCR-Produkt von IL10 mit einem 5'Primer (Vorwärtsprimer), der im Anfang vom Exon 1 hybridisiert (Abbildung 4.1.), generiert wurde. Eine putative für das Spleißen nötige Verzweigungsstelle konnte auch identifiziert werden (Abbildung 4.1.). Sie entspricht der idealen Konsensus-Sequenz **YNYURAC** (Y: Pyrimidinnukleotid; N: beliebiger Nukleotid; R: Purinnukleotid). Damit wären alle nötigen Sequenzmerkmale für einen Spleißvorgang erfüllt.

Diese potentiellen Spleißstellen würden auch erklären, warum keine RT-PCR-Produkte mit allen möglichen Kombinationen von Primern, die an diversen Stellen im gesamten EGFP und PolyA-Schwanzbereich hybridisieren, generiert werden konnten. Das gesamte EGFP-SV40pA-Fragment wurde aus der prä-mRNA durch Spleißen entfernt.

In weiterführenden Studien könnte durch die Klonierung und Sequenzierung der gespleißten IL10-(EGFP)-cDNA geprüft werden, ob sie der Sequenz entspräche, der den Spleißvorgang hervorruft. Weiterhin könnten Genexpressionsvektoren, die ein mit den putativen Spleißstellen flankiertes Reportergen enthalten, in Zelllinien exprimiert werden, um so die Spleißkompetenz der mutmaßlichen Spleiß-Donor und -Akzeptor herauszufinden.

Die IL-10-codierende Sequenz liegt hinter einem Polyadenylierungssignal (SV40pA) (siehe Abbildung 3.1. und 4.1.). Die Transkription sollte in der Regel an diesem PolyA-Signal abgebrochen und infolgedessen kein IL-10-mRNA synthetisiert werden.

Die Generierung von IL-10-mRNA deutet aber darauf hin, dass das SV40polyA ignoriert und alternativ das IL10-PolyA-Signal verwendet wurde. Solche Phänomene sind bekannt für zahlreiche Gene, welche für mehrere mRNA-Varianten codieren. Dabei werden die RNA-Varianten nicht nur durch alternatives Spleißen, sondern auch durch alternative Polyadenylierung generiert (Edwalds-Gilbert et al. 1997). Spleißen und Polyadenylierung sind gekoppelte Prozesse, die schon während der Transkription ablaufen und einander beeinflussen (Proudfoot et al. 2002). Veränderungen im Spleißen beeinflussen oft die Polyadenylierung und umgekehrt (Niwa and Berget 1991; Nestic and Maquat 1994; Cooke et al. 1999). Beispielsweise enthält das Gen für die schwere Kette des Immunglobulins M (IgM) eine PolyA-Stelle in einem Intron, welche in unterschiedlichen Stadien der B-Zell-Entwicklung benutzt werden kann, und somit zur Expression alternativer mRNA-Varianten führt (Edwalds- Gilbert and Milcarek 1995; Takagaki et al. 1996; Bruce et al. 2003).

Das unerwartet auftretende Spleißen in der IL10-EGFP-Mauslinie macht deutlich, dass beim Entwurf bzw. vor dem Einsatz der Targeting-Konstrukte, diese auf mögliche restriktive Strukturen, wie neue Spleißstellen, Spleiß-Enhancer (etc.), zum Beispiel mittels entsprechender bioinformatischer DNA-Programme zu analysieren.

4.2. Die IL10-IRESEGFP-Mauslinie

Um Probleme mit Spleißen zu umgehen, wurde eine zweite Reportermaus generiert, in der eine IRES-EGFP-Sequenz unmittelbar hinter dem Stopcodon von IL-10 und vor der 3'-UTR integriert wurde. Mit dieser genomischen Konstellation sind die kritische 5'-UTR, alle Exons und Introns, und damit auch die Spleißdonor- und -akzeptorstellen von IL-10 unverändert geblieben. IRES erlaubt Cap-unabhängige Initiierung der Translation (siehe Abbildung 3.7. und 3.8.).

4.2.1. EGFP kann nicht in allen Zelltypen detektiert werden

Die RT-PCR-Analyse zeigt eine eindeutige Expression von EGFP bzw. IL10-EGFP-Hybrid-Transkripte (siehe Abbildung 3.12.).

Die EGFP-Fluoreszenz konnte nur in T-Zellen nach *in vitro* Stimulation mit dem Superagonisten D665, detektiert werden (siehe Abbildung 3.13.). Mehrere Versuche zur Detektion der Expression von EGFP in anderen Zellen, wie DCs, Makrophagen (Abbildung 3.13.) oder B-Zellen (Daten nicht gezeigt) nach Stimulation *in vivo* (durch *Yersinia*-Infektion) und/oder *in vitro* (LPS-Stimulation) schlugen fehl. Da bei den stimulierten Zellen IL-10 gemessen werden konnte, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die EGFP-Detektion in diesem Reportermausmodell nicht ausreicht, um als Indikator für die IL-10-Expression zu dienen. Damit können in diesem Reportermausmodell nicht alle IL-10-exprimierenden Zelltypen durch EGFP-Fluoreszenz detektiert werden.

In einem analogen IL10-Reportermausmodell, genannt *tiger* (interleukin-ten ires gfp-enhanced reporter), welches kürzlich publiziert wurde, konnte auch keine EGFP-Fluoreszenz in DCs, Makrophagen oder B-Zellen, sogar nicht einmal nach drei Stimulationsrunden mit je 100 ng LPS *ex vivo*, gemessen werden (Kamanaka et al. 2006). Nach *in vitro* Stimulation konnte eine sehr schwache EGFP-Fluoreszenz in kleinen Populationen von BMDCs und BMDM der *tiger*-Maus im FACS detektiert werden. Wobei die Autoren die BMDCs mit 50 µg/ml Zymosan und 2 ng/ml TGF-β, und die BMDM mit 500 ng/ml LPS und 2500 U/ml IL-4, also unter nichtphysiologischen starken Induktionsbedingungen, stimulieren mussten.

In einem weiteren IL10-EYFP-Reportermausmodell, welches analog zu der in dieser Arbeit hergestellten nicht funktionellen ersten IL10-EGFP-Reportermauslinie ist, sind die Autoren nicht auf die Expression von EYFP in irgend einem anderen Zelltyp als in T-Zellen eingegangen (Calado et al. 2006), was darauf hindeutet, dass sie ebenfalls nur in den T-Zellen EYFP-Expression detektieren konnten.

Diese „Ineffizienz“ der IL10-EGFP/EYFP-Reportermause hat mehrere Gründe, die im Folgenden diskutiert werden:

(1) Schätzungsweise $0,1 \mu\text{M}$ EGFP-Konzentration, entspricht 1×10^5 gefaltete reife EGFP-Moleküle pro Zelle, die notwendig sind, um gegen die Autofluoreszenz der Zellen spezifisch detektiert zu werden (Patterson et al. 1997; Niswender et al. 1995). Diese Größenordnung kann bei starker Granularität und größerem Zellvolumen noch höher liegen. Als nicht-enzymatisches Reportergen kann jedes EGFP-Molekül nur ein Fluorophor bilden. Hierin liegt der limitierende Faktor von EGFP als Reportergen. Die nötige Mindestanzahl der EGFP-Moleküle, um Fluoreszenz zu detektieren, ist damit stark von der Beschaffenheit der Zellen, wie ihrer Größe und Granularität, und von der Stärke des Promoters, unter dem EGFP exprimiert werden soll, abhängig.

(2) IL-10 wird unter einem sehr schwachen Promoter exprimiert (Tone et al. 2000) und die mRNA von IL-10 ist sehr instabil (Powell et al. 2000). Darüber hinaus wird IL-10 nicht in allen Zelltypen gleich hoch induziert. Beispielsweise DCs und Makrophagen zeigen im Allgemeinen schwächere IL-10-Expression als T-Zellen (Abbildungen 3.13. und 3.15.; sowie Siewe et al. 2006; Kamanaka et al. 2006; Samarasinghe et al. 2006). Dies könnte an unterschiedlichen zelltypspezifischen Regulationsmechanismen der IL-10-Expression, welche u.a. Chromatin-Umorganisation beinhaltet, liegen (Jones et al. 2005; Saraiva et al. 2005; Zhang et al. 2006; Im et al. 2004). Ferner weisen myeloide Zellen wegen ihrer ausgeprägten Granularität sehr starke Autofluoreszenz auf. Die Kombination einer schwachen IL-10-Induktion und einer starken Autofluoreszenz stellen eine große Herausforderung für nichtenzymatische Reportergene wie EGFP dar. Aus diesem Grund entgehen schwach exprimierende oder granuläre Zellen der Erfassung mittels der IL10-EGFP-Reportermausmodelle.

(3) Eine weitere Einschränkung der IL10-IRES-EGFP-Reportermaus liegt in der Translation von EGFP über die IRES-Sequenz. Die IRES-abhängige Translation ist um 20-50 % weniger effizient als die Cap-abhängige Translation (Abbildung 3.14. und Kaufman et al. 1991; Dirks et al. 1993; Houdebine et al. 1999; Mizuguchi et al. 2000).

(4) Im Unterschied zu transgenen Mäusen, in deren Genome mehrere Kopien eines Transgens mittels Retroviren oder Mikroinjektion integriert werden, sind im Genom von Knock-in-Mäusen, die mittels Gen-Targeting generiert werden, nur eine oder zwei Kopien integriert. Die IRES- bzw. Promoterabhängig reduzierte Expression kann damit nicht durch hohe Kopienzahl des Transgens kompensiert werden.

Die ersten beiden Punkte erklären, warum in den IL10-EGFP-Mäusen Reporteraktivität nur in T-Zellen detektiert werden kann. Mittels der in Abbildung 4.2. dargestellten allgemein bekannten Gleichung kann die Anzahl der IL-10-Moleküle, nach Stimulation der Zellen abgeschätzt werden. Stark aktivierte T-Zellen produzieren bis zur 10-fachen Menge an IL-10 im Vergleich zu Makrophagen oder DCs. Ausgehend von einer 5000 pg/ml IL-10-Konzentration im Kulturüberstand von 1×10^6 T-Zellen, werden durchschnittlich ca. $1,6 \times 10^5$ IL-10-Moleküle pro T-Zelle exprimiert. Bei einer IL-10-Konzentration von 500 pg/ml im Überstand von 1×10^6 Makrophagen oder DCs, läge die durchschnittlich IL-10-Molekülanzahl in jeder Zelle bei ca. $1,6 \times 10^4$. Bedenkt man, dass EGFP IRES-abhängig exprimiert wird und möglicherweise nicht alle EGFP-Moleküle ihren reifen Zustand erreichen, so muß davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der EGFP-Moleküle in einer Zelle um ca. 20-50% niedriger liegt als die von IL-10.

	Gemessene IL-10-Menge im Zellüberstand (g)		Molekulargewicht von IL-10 (g/Mol)		Avogadro-Zahl (Moleküle/Mol)		Moleküle Zellzahl = IL-10-Moleküle/Zelle	
DCs oder Makrophagen:	500×10^{-12} g		18750,5 g / Mol		$6,023 \times 10^{23}$	$\frac{1,6 \times 10^{10}}{10^6}$		$= 1,6 \times 10^4$ IL-10-Moleküle/Zelle
T-Zellen:	5000×10^{-12} g		18750,5 g / Mol		$6,023 \times 10^{23}$	$\frac{1,6 \times 10^9}{10^6}$		$= 1,6 \times 10^5$ IL-10-Moleküle/Zelle

Abbildung 4.2. Abschätzung der Anzahl der IL-10-Molekülanzahlen in aktivierten T-Zellen, DCs und Makrophagen. Molekulargewicht (MG) von Maus-IL-10 beträgt 18750,5 Dalton. Ausgehend von der gemessenen IL-10-Menge im Überstand von jeweils 1×10^6 Zellen (500 pg/ml für DCs und Marophagen bzw. 5000 pg/ml für T-Zellen) wurde die Molekülanzahl in einem ml bestimmt und der Einfachheit halber durch die Zellzahl geteilt. Es wurde nicht berücksichtigt, dass nicht alle Zellen gleich oder überhaupt IL-10 produzieren.

An diesem Beispiel zeigt sich, dass die Anzahl der EGFP-Moleküle in aktivierten Makrophagen oder DCs mit ca. 1×10^4 deutlich unter der nötigen Grenze von 1×10^5 liegen würde, und infolgedessen kaum Fluoreszenz detektiert werden könnte.

Bei den T-Zellen läge die Anzahl bei ca. 1×10^5 EGFP-Molekülen (Abbildung 4.2.) und damit innerhalb der Größenordnung des Fluoreszenznachweises. Da die T-Zellen klein sind, über

einen sehr geringes Cytoplasma verfügen und kaum Autofluoreszenz aufweisen, könnten auch weniger als 10^5 EGFP-Moleküle für detektierbare Fluoreszenz ausreichen.

Wenn abschließend zu den oben dargelegten Gründen noch die Tatsache hinzugefügt wird, dass *in vivo* die Zellen oft einer viel schwächeren Stimulation unterzogen werden, als das *in vitro* der Fall ist, so dürfte die IL10-IRES-EGFP-Reportermaus kein brauchbares Modell zur Identifizierung der IL-10-exprimierenden Zellen *in vivo/ex vivo* sein.

4.3. Verbesserung der Reporteraktivität

Aufgrund der ineffizienten Reporteraktivität der IL10-IRES-EGFP-Reportermaus, der einer unzureichende Expressionsmenge von EGFP-Molekülen zugrunde liegt, wurde zunächst *in vitro* getestet, inwieweit virale interne Ribosomen-Eintrittsstellen (IRESs) genutzt werden können, z.B. um mittels eines IRES-vermittelten polycistronischen Reporter-Systems (siehe Abbildung 3.15) die Expression von EGFP zu vervielfachen und damit die Reporteraktivität zu erhöhen, ohne dabei die Expressionsregulation zu beeinflussen.

4.3.1. IRES-vermitteltes polycistronisches Reporter System

In der vorliegenden Arbeit wurde ein IRES-vermitteltes polycistronisches Reporter-System etabliert, das eine signifikante Erhöhung der Reporteraktivität von EGFP herbeiführen kann. Di-, tri- und tetracistronische Vektoren wurden generiert, die ein Luciferase (Luc)-Gen Cap-abhängig und jeweils ein, zwei oder drei EGFP-Gene IRES-abhängig exprimieren (siehe Abbildung 3.16.). Die Westernblot- und FACS-Analysen zeigten eine Erhöhung der Expression bzw. der Fluoreszenz von EGFP, welche proportional zu der Anzahl der IRES-EGFP-Sequenzen war. Auf diese Weise kann die IRES-bedingt schwächere Expression durch den Einbau von mehreren IRES-EGFP-Sequenzen kompensiert werden. Ferner deutet die proportionale Erhöhung der EGFP-Fluoreszenz daraufhin, dass alle drei Cistrons, die hinter IRES-Sequenzen kloniert sind, gleichmäßig translatiert werden und keine gegenseitige signifikante Beeinflussung der IRES-vermittelten Translationsprozesse stattfindet. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Expression von di- und tricistronischen Vektoren festgestellt (Zhu et al. 1999; Li J. et al. 2007). Deshalb kann angenommen werden, dass die Translationsprozesse an den verschiedenen IRES-Elementen auf einer polycistronischen mRNA unabhängig voneinander erfolgen.

Die Cap-abhängige Translation wird durch die Rekrutierung der Ribosomen zum 5'-Ende der mRNA mittels der eukaryotischen Translation-Initiationsfaktoren (eIF)4E, eIF4A und eIF4G initiiert. Die Translationsinitiation der meisten IRES-enthaltenden RNAs, wie ECMV-mRNA,

benötigt, abgesehen von eIF4E, dieselben kanonischen eIFs wie bei der Cap-mRNA (Pestova et al. 1996). Es wird vermutet, dass EMCV-mRNAs mit den zellulären Cap-mRNAs um die Rekrutierung von eIF4G konkurrieren (Svitkin et al. 2005). Dies lässt die Frage aufkommen, ob multiple Tandem-IRES in einer multicistronischen RNA die Cap-abhängige Translation beeinträchtigen können. Darüber hinaus ist die Effizienz der Cap-abhängigen Translation von der Interaktion zwischen dem PolyA-Bindeprotein (PABP) und dem eIF4G abhängig. PABP lagert sich auf dem PolyA der mRNA an. Bei der Interaktion von PABP mit eIF4G wird die mRNA zirkuliert (Tarun et al. 1996; Le H. et al. 1997; Imataka et al. 1998; Wells et al. 1998). Die Integration mehrerer IRES-EGFP-Sequenzen könnte eine sterische Hinderung für die Interaktion zwischen PABP und eIF4G und infolgedessen eine verminderte Effizienz der Cap-abhängigen Translation herbeiführen.

In einem Reportermausmodell, in dem eine IRES-Luc-IRES-EGFP-Kassette in der 3'-UTR vom endogenen Transkriptionsfaktor Forkhead Box P3 (Foxp3)-Gen integriert wurde, wurde eine verminderte Expression des Cap-abhängig translatierten Foxp3-Gens festgestellt (Wan et al. 2007). Die Autoren vermuteten, dass vier Adenin/Uridin (AU)-reiche Elemente (ARE), die im Gegenstrang vom Luc-Gen verteilt sind, eine Destabilisierung der mRNA und damit verminderte Foxp3-Expression herbeiführten. Dagegen, macht es unter den experimentellen Bedingungen in dieser Arbeit keinen Unterschied ob eine, zwei oder drei IRES-EGFP-Kassetten stromabwärts vom Luc-Gen integriert wurden, die Cap-abhängige Expression von Luciferase blieb konstant. Demzufolge kann man folgern, dass multiple Tandem-IRES nicht die Cap-abhängige Translation beeinträchtigen. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen berichteten Hennecke et al., dass Cap-abhängige Translation aus bicistronischer mRNA vergleichbar zu monocistronischer Expression war (Hennecke et al. 2001). Nichtsdestoweniger bleibt zu prüfen, ob dies auch für alle Zelltypen und vor allem für Zellen unter Stressbedingungen gilt, welche die Verfügbarkeit von eIF4E für die Cap-abhängige Translation beeinträchtigen (Richter et al. 2005; Svitkin et al. 2005).

Posttranskriptionale Prozesse spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Genexpression (Hazelrigg T. 1998; Moore MJ.2005). Sie beeinflussen die Stabilität und/oder die Translationseffizienz der mRNA durch die Bindung von heterogenen nuklearen Ribonucleoproteinen (hnRNPs) an spezifische RNA-Sequenzen, welche meist in der 3'-UTR lokalisiert sind (Blaxall et al. 2002; Bevilacqua et al. 2003; Chen et al. 2004). Die Adenin/Uridin (AU)-reichen Elemente (ARE) sind die am besten charakterisierten RNA-Sequenzen in der 3'-UTR (Chen et al. 1995). Sie binden diverse Proteine, die zur Stabilisierung der mRNA, wie HuR, oder zu deren schnellen Degradation, wie AUF1 und

Tristetraprolin, führen (Malter et al. 1989; Wilusz et al. 2001; Brennan et al. 2001). Durch die Integration mehrerer IRES-Sequenzen im 3'-UTR-Bereich könnte diese posttranskriptionale Regulation durch 3'UTR beeinträchtigt werden, besonders deshalb weil IRESs einerseits Ribosomen und diverse Proteine binden, und andererseits mit dem PolyA teilweise gemeinsame Bindungsproteine rekrutieren kann wie das Polypyridin tract-Bindungsprotein (PTB) (Martinez-Salas 1999; Martinez-Salas et al. 2001; Stoneley et al. 2004). Aus diesem Grund wurde der Einfluß von multiplen IRES-Sequenzen auf die 3'UTR-vermittelte posttranskriptionale Regulation untersucht. Hierfür wurden die Reporteraktivitäten von polycistronischen Konstrukten pLuc-nx(IRES2-EGFP), welche als PolyA eine RNA-stabilisierende (SV-40polyA) oder -destabilisierende Sequenz von IL-10 (IL10-3'UTR) enthielten, miteinander verglichen. Unabhängig davon, ob eine, zwei oder drei IRES-EGFP-Kassetten stromaufwärts integriert waren, behielt die IL10-3'UTR ihre Fähigkeit, die Expression von EGFP und Luciferase zu reduzieren. Die posttranskriptionale Regulation mittels 3'UTR wird damit nicht durch multiple Tandem-IRES beeinträchtigt.

Das IRES-vermittelte polycistronische Reporter-System kann damit helfen, die Reporteraktivität zu erhöhen, ohne signifikante Beeinträchtigung der Cap-abhängigen Translation oder der allgemeinen Expressionsregulation zu verursachen. Es erfüllt damit wichtige Voraussetzungen, um im Mausmodell eingesetzt werden zu können.

Um die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse *in vivo* zu testen, wurde ein IRES-vermittelter polycistronischer Reporter-Vektor für IL-10 (IL10-3xIRESEGFP) generiert und mittels homologer Rekombination ins Genom von ES-Zellen integriert (siehe Abschnitt 3.5.). Chimäre Mäuse aus diesen rekombinanten ES-Zellen sind kürzlich geboren worden. Die IL10-3xIRESEGFP-Reportermause, die aus den chimären Mäusen etabliert werden, sollen in weiterführenden Studien umfassend untersucht werden. Dabei soll geklärt werden, ob mit einem IRES-vermittelten polycistronischen Reportersystem die EGFP-Fluoreszenz sich auch *in vivo* erhöhen ließe, ohne dabei die Cap-abhängige Translation oder die posttranskriptionale Regulation signifikant zu beeinflussen. Ferner können dann mithilfe der IL10-3xIRESEGFP-Reportermaus *in vivo* Vergleichstudien zur Cap- und IRES-abhängigen Expression in unterschiedlichen Zelltypen und unter verschiedenen Stress- und Stimulationsbedingungen durchgeführt werden.

4.4. Die IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus

Während jedes EGFP-Molekül nur einen Fluorophor bildet, kann jedes Enzymmolekül viele fluorogene Substrat-Moleküle umsetzen und damit Fluorophore in großem Maßstab erzeugen.

Es wurde hier das Enzym β -Lactamase (Bla) als Reporter ausgewählt. Die Reporteraktivität kann schon bei 50 β -Lactamase-Molekülen detektiert werden (Zlokarnik et al. 1998; Qureshi SA 2007). Darüber hinaus kann die Bla-Reporteraktivität in intakten Zellen, sowohl mittels FACS, im Fluoreszenzmikroskop als auch im Fluoreszenz-Platten-Reader gemessen werden. Im Kapitel 3.3.2. wurden die β -Lactamase und ihr CCF4-Substrat eingehend beschrieben. Um bei dem sehr schwachen IL-10-Promoter eine höchstmögliche Reportersensitivität *in vivo* erreichen zu können, wurden das polycistronische Reportersystem mit der β -Lactamase als Reporter gen kombiniert und eine IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus generiert (siehe Targeting-Konstrukt in Abbildungen 3.26. und 3.27.).

4.4.1. Die IL10-2xIRES-Bla-Maus: Ein hoch sensitives Reportersystem

Die hohe Sensitivität der IL10-Bla-Maus konnte durch die sensitive Detektion der Bla-Reporteraktivität in stark granulären Zellen, wie DCs und Makrophagen, unter Beweis gestellt werden. Die blaue Fluoreszenz, welche durch die von β -Lactamase katalysierte Spaltung des CCF4-Substrats entsteht, konnte sowohl im FACS als auch im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden (siehe Abb. 3.31. und 3.32.). Darüber hinaus konnte die Bla-Reporteraktivität in weiteren Immunzellen, wie B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen, PMNs, und nach *in vivo* Stimulation, detektiert werden (siehe Abb. 3.34). Dabei waren keine mehrfachen Stimulationsrunden oder Restimulation *in vitro* nötig. Die Bla-Reporteraktivität war stets proportional zu der im Zellüberstand gemessenen IL-10-Menge. Dagegen konnte in BMDM und BMDCs aus der IL10-IRESEGFP-Reportermausen (die in dieser Arbeit etabliert wurde und die aus Kamanaka et al. 2006) keine Fluoreszenz unter den gleichen Stimulationsbedingungen detektiert werden. In der Tabelle 4.1. ist die zelltypabhängige Reportersensitivität der im Rahmen dieser Arbeit generierten sowie der publizierten IL-10-Reportermause zusammengefasst.

Stimulation	IL10-2xIRESBla-Maus (diese Arbeit)		IL10-IRESEGFP-Maus (diese Arbeit)		IL10-IRESEGFP-Maus (Kamanaka et al. 2006)		IL10-EYFP-Maus (Calado et al. 2006)	
	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
T-Zellen	+++++	+++++	++	+	++	++	++	Keine Angaben
B-Zellen	Nicht getestet	+++++	-	-	-	-	Keine Angaben	Keine Angaben
Makrophagen	+++++	+++++	-	-	+/-	-	Keine Angaben	Keine Angaben
PMNs	Nicht getestet	+++++	-	-	-	-	Keine Angaben	Keine Angaben
DCs	+++++	+++++	-	-	+/-	-	Keine Angaben	Keine Angaben
NK-Zellen	Nicht getestet	+++++	-	-	Keine Angaben	-	Keine Angaben	Keine Angaben

Tabelle 4.1. Die zelltypabhängige Reporteraktivität in verschiedenen IL10-Reportermausen. Mit (+) soll nur semiquantitativ die Höhe der Reporteraktivität nach *in vitro* oder *in vivo* Stimulation der aufgeführten Zelltypen dargestellt werden. (+/-): schwaches Signal. (-): konnte keine Reporteraktivität detektiert werden. Die angegebene Reporteraktivität richtet sich nach der Art der Stimulation. Je stärker und länger sie sein musste, um Signale zu bekommen, desto schwächer wurde die Reportersensitivität eingestuft.

Ferner konnte die Bla-Reporteraktivität unter physiologisch-ähnlichen Stimulationsbedingungen und in Echtzeit gemessen werden. Beispielsweise liegt die LPS-Konzentration im Serum von Patienten mit septischem Schock zwischen 30 und 150 ng/ml (Zweigner et al. 2001) und in weniger dramatischen Fällen sogar deutlich darunter (Huhtinen et al. 2002; Pussinen et al. 2004). Darüber hinaus beginnt die Synthese von IL-10 schon in der frühen Phase der Zellstimulation und ist im Zellüberstand schon ab 3-4 Stunden messbar (eigene Versuche; und Nemeth et al. 2005; Du Z. et al. 2006). Seine Halbwertszeit liegt bei ca. 60-180 min (Le T. et al. 1997; Kishore et al. 1999; Brewer et al. 2003). Analog zu diesen IL-10-Eigenschaften verfügt die β -Lactamase über eine Halbwertszeit von ca. 206 Minuten (Zlokarnik et al. 1998; Qureshi SA 2007) und ist direkt nach ihrer Synthese aktiv. Sie stellt damit ein optimales Reportersystem für kinetische und Echtzeit-Studien dar. Dementsprechend konnte die Bla-Reporteraktivität in Makrophagen und DCs schon ab vier Stunden nach Stimulation mit 50-100 ng/ml LPS gemessen werden (kleinere LPS-Konzentrationen wurden noch nicht getestet) und erreichte ihr Maximum nach 24 h, um danach wieder abzufallen (Abbildung 3.33.). Dagegen mussten Kamanaka et al. BMDM aus der *tiger*-Maus (IL10-IRESEGFP-Reportermaus) mit 500 ng/ml und 2500 U IL-4/ml für 24 Stunden induzieren, um ein schwaches Signal im FACS messen zu können. Dies unterstreicht die schwache Sensitivität der IL10-EGFP-Reportermause. Außerdem weist EGFP eine Halbwertszeit von ca. 26 Stunden auf (Li X. et al. 1998) und fluoresziert erst wenn die Bildung der Fluorophore abgeschlossen ist und sich ausreichend Moleküle akkumuliert

haben. Nach der Synthese von EGFP dauert die Entstehung der Fluorophore weitere 1,5 bis 4 Stunden (Nishiuchi et al. 1998; Zimmer M. 2002). Dementsprechend konnte bei den IL10-IRESEGFP-Mäusen die Reporteraktivität frühestens 24 h nach der Stimulation detektiert werden. Damit ist die IL10-EGFP-Reportermaus wenig geeignet für kinetische oder Echtzeitstudien.

4.4.2. Folgerungen der IL10-Bla-Maus für andere Reportermäuse

EGFP wurde zur Herstellung mehrerer Reportermäuse eingesetzt (Maggi et al. 2004). Aufgrund seiner Autofluoreszenz und der Möglichkeit, seine Expression in intakten und lebenden Zellen zu detektieren, ist EGFP ein attraktives Reporter-gen.

Wegen der dargelegten Vergleichsstudien zwischen der IL10-EGFP- und der IL10-Bla-Reportermaus, wo die Ineffizienz der ersteren Reportermaus gezeigt wurde, stellt sich eine wesentliche Frage: Wie sind die experimentellen Ergebnisse aus den EGFP-Reportermäusen zu bewerten?

Bei Reportermäusen, in denen ein schwach exprimiertes Gen analysiert werden soll, ist davon auszugehen, dass nicht alle aktivierten Zellen durch EGFP-Fluoreszenz markiert und identifiziert werden können. Die EGFP-Reportermaus wird kein vollständiges zelluläres Expressionsprofil produzieren. Dies muss bei den Interpretationen der erzielten Ergebnisse aus solchen Reportermäusen berücksichtigt werden. Im Gegensatz zu den IL10-Bla-Reportermäusen, die nach der Infektion mit *Yersinia enterocolitica* IL-10-Expression in unterschiedlichen Immunzellen zeigen (siehe Abbildung 3.34.), wurden beispielsweise mithilfe von IL4- und IL10-EGFP-Reportermäusen nur T-Zell-Populationen als entsprechende Cytokinproduzenten während diverser Infektionen identifiziert (Naramura et al. 1998; Im W et al. 2005; Mohrs K et al. 2005; Kamanaka et al. 2006). Allerdings wird IL-4 auch von anderen Zellen, wie Basophilen, Eosinophilen und Mastzellen, produziert (Brown et al. 1997). In diesen granulären Zellen kann jedoch keine EGFP-Reporteraktivität detektiert werden. Eine mögliche physiologische Relevanz dieser Zellen als Quellen für IL-4 bei Immunantworten kann damit mithilfe der IL4-EGFP-Reportermäuse nicht erkannt werden.

Das gleiche gilt für IL10-EGFP-Reportermäuse. IL-10 wird von diversen Zelltypen, einschließlich Makrophagen, DCs, B-Zellen, T-Zellen, PMNs, Mastzellen etc., produziert (Moore et al. 2001). Infektionsversuche an IL10-IRESEGFP-Reportermäusen haben dagegen wieder nur T-Zell-Subpopulationen als IL10-Produzenten während der Infektion mit *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* oder *Salmonella typhimurium* detektiert (Kamanaka et al. 2006; Jankovic et al. 2007). Der Beitrag auch anderer IL-10-produzierenden Zellen bei

Infektionen konnte jedoch in verschiedenen Arbeiten dargelegt werden. Beispielsweise spielen IL-10-produzierenden Makrophagen oder B-Zellen wichtige Rollen bei den Immunantworten u.a. gegen *Salmonellen*- und *Listerien*-Infektionen (Song et al. 1994; Tripp et al. 1995; Fleming et al. 1996; Uchiya et al. 2004; Lingnau et al. 2007). Ferner resultiert die spezifische Inaktivierung des IL-10-Gens in Makrophagen und Neutrophilen in eine erhöhte Anfälligkeit der Mäuse für systemische LPS-Gabe (Siewe et al. 2006).

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wird vorgeschlagen bei der Generierung von Reporterstäuben β -Lactamase als Reporter gen für schwach exprimierte Gene einzusetzen.

Ein weiterer Aspekt, welcher mittels EGFP-Reporterstäube nicht eindeutig aufgeklärt werden kann, ist das allelische Expressionsverhalten des angesteuerten Gens. Mithilfe der IL10- und IL4-Reporterstäube wurde eine monoallelische Expression des entsprechenden Cytokins in bestimmten CD4-T-Zell-Subpopulationen gezeigt (Hu-Li et al. 2001; Calado et al. 2006). Dagegen stellten Kamanaka et al. (2006) fest, dass IL-10 gleichmäßig von beiden Allelen in den T-Zellen exprimiert wird. Zur Charakterisierung der Aktivität beider Allele des Cytokins wurden heterozygote Reporterstäube eingesetzt. Nach einer zusätzlichen intrazellulären Immunfärbung gegen das Cytokin, konnte anhand der detektierten Fluoreszenz in den einzelnen Zellen bestimmt werden, welches Allel aktiv war. Allerdings wegen ihrer stark voneinander abweichenden Halbwertszeit und Stabilität kann es keine gute zeitliche Überlappung zwischen der Expression von EGFP und IL-10 bzw. IL-4 geben. Wenn man dazu berücksichtigt, dass EGFP nur bei starker Expression detektierbar ist, so sind die Aussagen über die allelische Expression, die ohnehin diskrepant sind, sehr fragwürdig. Die EGFP-Reporterstäube sind für solche Fragestellung nicht geeignet. Dagegen stellt die IL10-Bla-Reporterstäube, da sie Expressionsstudien in Echtzeit erlaubt, ein besseres Modell für solche Fragestellungen dar. In weiterführenden Studien soll mithilfe der IL10-Bla-Reporterstäube das allelische Expressionsverhalten von IL-10 analysiert werden.

4.4.3. Hypothese: Autokrine IL10-abhängige Regulation

Infektionsversuche mit *Yersinia enterocolitica* an IL10-Bla-Reporterstäuben wurden in dieser Arbeit durchgeführt. Drei Tage nach einer intraperitonealen Infektion konnte überraschenderweise in allen untersuchten Immunzellen der Milz (CD4-T-Zellen, CD8-T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und PMNs) eindeutige Bla-Reporteraktivität gemessen werden. Weitere detaillierte Versuche sind nötig, um die physiologische Relevanz jeder dieser IL-10-produzierenden Zellen interpretieren zu können. Nichtsdestoweniger wird hier ein Modell vorgeschlagen, um eine Erklärung für die

Infektions-bedingt ubiquitäre Expression von IL-10 zu finden. Diese Hypothese soll in weiterführenden Studien geprüft werden.

Da in nicht-infizierten Mäusen keine Bla-Aktivität gemessen werden konnte, ist davon auszugehen, dass die IL-10-Expression erst nach der Stimulation der Zellen einsetzte. Dabei könnte die Aktivierung der Zellen über direkten oder indirekten (z.B. mittels PAMPs) Kontakt mit den *Yersinien* stattgefunden haben. Dies deutet darauf hin, dass die IL-10-Synthese ein Bestandteil der Immunantwort aller aktivierten Zellen ist, und dass diese Zellen selbst ihre inflammatorische Aktivität regulieren können. IL-10 müßte damit autokrin wirken. Dementsprechend wird ein Regulationsprozess, bezeichnet als **autokrine IL10-abhängige Regulation** vorgeschlagen (Abbildung 4.3.).

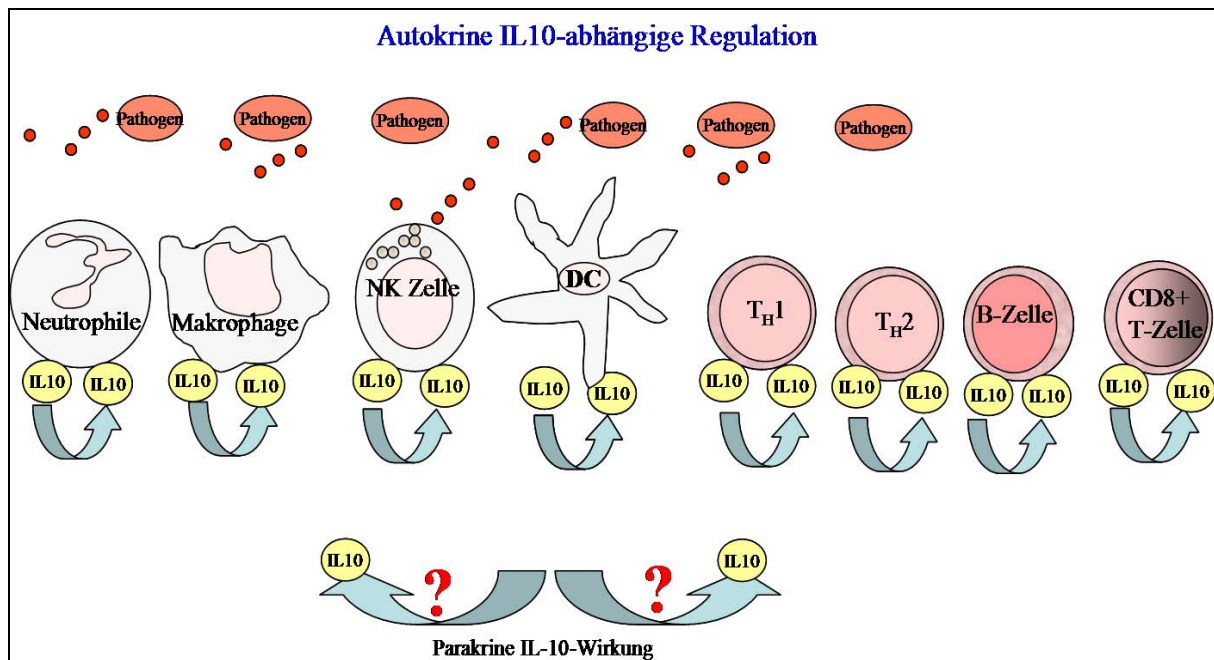


Abbildung 4.3. Autokrine IL10-abhängige Regulation. Die Aktivierung der Immunzellen beinhaltet stets die Expression von IL-10, welches autokrin wirkt, um die Immunantwort zu kontrollieren. Auf die parakrine Wirkung von IL-10 wird hier nicht eingegangen.

Auf der Basis dieser Hypothese lässt sich, soweit die Regulation IL-10-restriktiv ist und nicht über einen anderen Suppressor abläuft, folgendes folgern: **(1)** In der Regel würden die aktivsten Effektorzellen am stärksten IL-10 produzieren. **(2)** Pathologische Immunantworten würden dann durch die Effektorzellen initiiert, wenn diese nicht genügend oder gar kein IL-10 exprimieren. **(3)** Eine effektive Immunantwort fällt aus, wenn die Effektorzellen übermäßiges IL-10 exprimieren.

Diese Hypothese kann am besten anhand der IL-10-produzierenden T-Helfer-CD4-Zellen des Typus 1 (T_H1), welche als starke Effektorzellen gelten, unterstützt werden. Es wurde lange

vermutet, dass T_H1 -Zellen selbst kein IL-10 exprimieren. Ihre Suppression erfolge hauptsächlich durch parakrine IL-10-Wirkung, welches u.a. von T_H2 -Zellen produziert wird (Fiorentino et al. 1989; Janeway et al. 2002). Kürzlich wurde berichtet, dass T_H1 -Zellen, die eine wichtige Rolle bei Infektionen mit den parasitären Protozoen, *Leishmania major* und *Toxoplasma gondii*, und bei der Initiierung pathologischer Immunantworten spielen, sich selbst durch die Produktion von IL-10 kontrollieren (Jankovic et al. 2007; Anderson et al. 2007; Nylen et al. 2007). Unausgewogene IL-10-Produktion durch die T_H1 -Effektorzellen führt zu einer Immunsuppression, die in chronische *L. major*-Infektion resultiert. Bei *T. gondii*-Infektion ist das IL-10 von T_H1 -Zellen notwendig, um letale Entzündungsreaktionen zu inhibieren. Es scheint, dass es einen generellen Mechanismus gibt, nachdem IFN- γ -produzierende protektive T-Zellen gleichzeitig auch IL-10 produzieren (Trinchieri G. 2001). Ein weiteres Beispiel der Autoregulation aktivierter Immunzellen stellen die Mastzellen dar. Mastzellen spielen eine entscheidende Rolle bei pathologischen Immunantworten, welche zu Allergien führen. Vor kurzem wurde jedoch berichtet, dass ausgerechnet die IL-10-produzierenden Mastzellen den pathologischen Immunantworten entgegenwirken können (Grimbaldeston et al. 2007).

Ein weiterer Beleg für eine autokrine Wirkung von IL-10 liefern die Versuche an Mäusen mit spezifischer Inaktivierung von IL-10 in T-Zellen oder Makrophagen und Neutrophilen. Obwohl die umgebenden Zellen weiterhin IL-10 produzierten, welches parakrin hätte wirken können, wiesen die IL-10-defizienten Zelltypen eine pathologisch wirkende Hyperaktivität auf (Roers et al. 2004; Siewe et al. 2006). Die autokrine IL-10-Wirkung würde wiederum die Phänotypen bei diesen IL10-zellspezifisch defizienten Mäusen erklären. Eine 1996 publizierte Arbeit von Fleming et al. könnte sogar einen möglichen Mechanismus für autokrine IL-10-Wirkung aufgedeckt haben. Sie berichteten, dass Makrophagen Zelloberflächegebundenes IL-10 exprimieren, welches ihre bakterizide Wirkung reguliert (Fleming et al. 1996).

Ferner würde eine autokrine Wirkungsweise von IL-10 erklären, weshalb im Gegensatz zu diversen anderen Cytokinen, deren Expression auf wenige Zelltypen beschränkt ist und IL-10 von allen Immunzellen produziert wird (Moore et al. 2001).

Das Modell der „autokrine IL10-abhängigen Regulation“ hätte eine richtungweisende Konsequenz für die Erforschung der pathologischen Immunantworten und der daraus resultierenden Krankheiten, sowie für die Art der IL-10-Therapien. So könnte versucht werden, die pathologisch wirkenden Effektorzellen zur IL-10-Expression anzuregen. Die bloße Anhebung der IL-10-Konzentration bei Patienten z.B. durch die Verabreichung rekombinant hergestelltem IL-10 oder genetisch veränderter Bakterien, die IL-10 produzieren

und absondern, konnte aus diesem Grund zu keinem nennenswerten Erfolg führen (Madsen K. 2002; Asadullah et al. 2003; Zhou X, et al. 2005).

5. Zusammenfassung

Das Cytokin Interleukin-10 (IL-10) ist eines der wichtigsten Immunsuppressoren, das die Inflammation limitiert und für eine ausgewogene nichtpathologische Immunantwort sorgt. Um die IL-10-produzierenden Zellen *in vivo* bzw. *ex vivo* zu identifizieren und IL-10-Genregulation zu analysieren, wurde eine IL-10-IRES-EGFP-Reportermaus etabliert. Mit diesem Reportermausmodell konnte EGFP-Expression nur in T-Zellen detektiert werden. Um eine höhere Reportersensitivität zu erreichen, wurden mehrere Reporterkonstrukte generiert und im Zellkultursystem getestet. Mittels IRES-vermittelter polycistronischer Reportervektoren wurde festgestellt, dass die Reporteraktivität proportional zu der Anzahl der IRES-EGFP-Sequenzen ansteigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Cap-abhängige Translation und die posttranskriptionale Regulation mittels der 3'-nichttranslatierten Region (3'-UTR) nicht durch multiple IRES-EGFP-Sequenzen beeinträchtigt werden. Um die Reproduzierbarkeit der erzielten Ergebnisse in einem transgenen Mausmodell zu testen, wurde ein polycistronischer Reporter-Targeting-vektor, IL10-3xIRES-EGFP, generiert und mittels homologer Rekombination ins Genom von Maus-ES-Zellen integriert. Die IL10-3xIRES-EGFP-Reportermaus, die aus den bereits geborenen chimären Mäusen etabliert wird, sollen in weiterführenden Studien umfassend untersucht werden.

Um bei dem sehr schwachen IL-10-Promoter eine nachweisbare Reporteraktivität *in vivo/ex vivo* zu erzielen, wurde in einem zweiten Ansatz das polycistronische Reportersystem mit dem β -Lactamase-Gen verwendet und eine IL10-2xIRES-Bla-Reportermaus (IL10-Bla-Maus) generiert. Mit dieser Reportermaus konnte die Reporteraktivität wesentlich verbessert werden. Es konnte unter physiologischen Bedingungen die Bla-Reporteraktivität in DCs, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, NK-Zellen und PMNs, *in vitro* und *ex vivo* detektiert werden. Außerdem ermöglicht die IL10-Bla-Reportermaus kinetische Echtzeitexpressionsstudien.

Im Unterschied zu IL10-EGFP-Reportermaus, konnte bei im *Yersinia*-Infektionsmodell mit der IL10-Bla-Maus Reporteraktivität in verschiedenen Zelltypen *ex vivo* detektiert werden. Auf der Basis dieser Ergebnisse wurde ein Modell zum zellulären Expressionsprofil von IL-10, bezeichnet als *autokrine IL10-abhängige Regulation*, vorgeschlagen und die IL-10-Expressionsdaten in diesem Kontext diskutiert.

6. Abstract

The cytokine Interleukin-10 (IL-10) is one of the most important immune suppressors which limits inflammation and enables a balanced nonpathogenic immune response. In order to identify IL-10-producing cells *in vivo* and *ex vivo*, respectively, an IL10-IRES-EGFP-Reporter mouse was established. In this reporter mouse model EGFP-flourescence was only detectable in T cells. In order to achieve higher reporter sensitivity, several reporter constructs were generated and tested in cell culture system. Using IRES-mediated polycistronic reporter vectors it was shown, that reporter activity increases proportional to the number of IRES-EGFP-repeats. In addition it was shown that multiple IRES-EGFP-sequences did neither influence Cap-dependent translation nor posttranscriptional regulation by 3'-untranslated region (3'-UTR). To test the functionality of this IRES-mediated polycistronic reporter system in a transgenic mouse model, a targeting polycistronic reporter vector, IL10-3xIRES-EGFP, was generated. This vector was integrated into the genome of the mouse embryonic stem cells (ES) by homologous recombination. The IL10-3xIRES-EGFP-reporter mouse which will be established from already born chimeras will be investigated in further studies.

To overcome the limits of reporter detection by the weak IL-10 promoter in a second approach we established a polycistronic reporter targeting vector by using β -lactamase as reporter gene to generate an IL10-2xIRES-Bla-reporter mouse (IL10-Bla-mouse). This IL10-Bla-reporter mouse showed a strongly improved reporter activity. Under physiological conditions Bla-reporter activity could be detected in DCs, macrophages, B cells, T cells, NK cells and PMNs, *in vitro* and *ex vivo*. In addition the IL10-Bla-reporter mouse enables kinetic and real time expression studies.

In contrast to the IL10-EGFP-reporter mice, Bla-reporter activity could be detected by *in vivo* infection studies in various cell types of the IL10-Bla-reporter mouse.

On the basis of these results a model for the cellular expression profile of IL-10, called *autocrine IL-10-dependent Regulation*, was suggested and the obtained IL-10-Reporter results were discussed in this context.

7. Literaturverzeichnis

Afford SC, Pongracz J, Stockley RA, Crocker J, Burnett D. 1992. **The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils.** *J. Biol. Chem.* 267:21612–6.

Akdis CA, Joss A, Akdis M, Faith A, Blaser K. 2000. **A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding.** *FASEB J.* 14(12):1666-8.

Alferink J, Lieberam I, Reindl W, Behrens A, Weiß S, Hüser N, Gerauer K, Ross R, Reske-Kunz AB, Ahmad-Nejad P, Wagner H, Förster I. 2003. **Compartmentalized Production of CCL17 In Vivo: Strong Inducibility in Peripheral Dendritic Cells Contrasts Selective Absence from the Spleen.** *J. Exp. Med.* 197:5 (3), 585–599

Algermissen B, Hermes B, Feldmann-Boeddeker I, Bauer F, Henz BM. 1999. **Mast cell chymase and tryptase during tissue turnover: analysis on in vitro mitogenesis of fibroblasts and keratinocytes and alterations in cutaneous scars.** *Exp Dermatol.* 8(3):193-8.

Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. 1998. **IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages.** *Eur. J. Immunol.* 28:359–69.

Anderson CF, Oukka M, Kuchroo VJ, Sacks D. 2007. **CD4+CD25–Foxp3– Th1 cells are the source of IL-10–mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis.** *J. Exp. Med.* 204 (2):285–297

Anderson SL, Carton JM, Lou J, Xing L, Rubin BY. 1999. **Interferoninduced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus.** *Virology.* 256:8–14.

Annacker O, Asseman C, Read S, Powrie F. 2003. **Interleukin-10 in the regulation of T cell-induced colitis.** *J Autoimmun.* 20(4):277-9.

Asadullah K, Docke WD, Sabat R, Ebeling M, Volk HD, Sterry W. 1999. **Interleukin-10 in dermatology.** *Hautarzt.* Jan;50(1):12-9.

Asadullah K, Sterry W, Volk HD. 2003. **Interleukin-10 therapy-review of a new approach.** *Pharmacol Rev.* 55(2):241-69.

Asquith DL, McInnes IB. 2007. **Emerging cytokine targets in rheumatoid arthritis.** *Curr Opin Rheumatol.* 19(3):246-51.

Atreya R, Mudter J, Finotto S, Müllberg J, Jostock T, Wirtz S, Schütz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. 2000. **Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against**

apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. Nat Med. 6(5):583-8.

Attal J, Theron MC, Houdebine LM. 1999. **The optimal use of IRES (internal ribosome entry site) in expression vectors.** Genet Anal. 3-5:161-5.

Audet J, Miller CL, Rose-John S, Piret JM, Eaves CJ. 2001. **Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic cells.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:1757-62.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. 2005. **Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease.** Cancer Cell. 7:211-17.

Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF. 2004. **TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling.** Immunity 21:491-501.

Beebe AM, Cuab DJ, De-Waal Malefyt R. 2002. **The role of interleukin-10 in autoimmune disease: systemic lupus erythematosus (SLE) and multiple sclerosis (MS).** Cytokine & Growth Factor Reviews. 13:403-412

Bekpen C, Hunn JP, Rohde C, Parvanova I, Guethlein L, Dunn DM, Glowalla E, Leptin M, and Howard JC. 2005. **The interferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: Loss of the cell-autonomous resistance mechanism in the human lineage.** Genome Biology. 6:R92.1-18.

Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HW. 2000. **Role of Stat3 in Lipopolysaccharide-Induced IL-10 Gene Expression.** J. Immunol. 165:1612-17.

Berg DJ, Leach MW, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Davidson NJ, Rennick D. 1995. **Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses.** J Exp Med. 182(1):99-108.

Berkman N, John M, Roesems G, Jose PJ, Barnes PJ, Chung KF. 1995. **Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages.** J. Immunol. 155:4412-18.

Berlato C, Kinjyo I, Gatto L, Yoshimura a, Bazzoni F. 2002. **Involvement of suppressor of cytokine signaling-3 as a mediator of the inhibitory effects of IL-10 on lipopolysaccharide induced macrophage activation.** J Immunol. 168(12):6404-11.

Bevilacqua A, Ceriani MC, Capaccioli S, Nicolini A. 2003. **Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs.** J Cell Physiol. 3:356-72.

Blaxall BC, Pende A, Wu SC, Port JD. 2002. **Correlation between intrinsic mRNA stability and the affinity of AUF1 (hnRNP D) and HuR for A+U-rich mRNAs.** Mol Cell Biochem. 1-2:1-11.

- Bolivar F., Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW. 1977. **Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system.** *Gene* 2:95–113.
- Bradding, P, Walls AF, Holgate ST. 2006. **The role of the mast cell in the pathophysiology of asthma.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 117:1277–84.
- Brennan CM, Steitz JA. 2001. **HuR and mRNA stability.** *Cell Mol Life Sci*. 2:266-77.
- Brenner S, Prösch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzer C. 2003. **cAMP-induced Interleukin-10 Promoter Activation Depends on CCAAT/Enhancer-binding Protein Expression and Monocytic Differentiation.** *J Biol Chem*. 278(8):5597-604.
- Brewer G, Sacconi S, Sarkar S, Lewis A, Pestka S. 2003. **Increased interleukin-10 mRNA stability in melanoma cells is associated with decreased levels of A + U-rich element binding factor AUF1.** *J Interferon Cytokine Res*. 23(10):553-64.
- Brightbill HD, Plevy SE, Modlin RL, Smale ST. 2000. **A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages.** *J Immunol*. 164(4):1940-51.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Arturo Zychlinsky A. 2004. **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** *Science* 303: 1532–1535.
- Brown MA, Hural J. 1997. **Functions of IL-4 and control of its expression.** *Crit. Rev. Immunol*. 17, 1–32.
- Brubaker RR. 2003. **Interleukin-10 and Inhibition of Innate Immunity to Yersiniae: Roles of Yops and LcrV (V Antigen).** *Infection and Immunity*. 71(7):3673–81.
- Bruce SR, Dingle RW, Peterson, M.L. 2003. **B-cell and plasma-cell splicing differences: A potential role in regulated immunoglobulin RNA processing.** *RNA* 9: 1264–1273.
- Bundoc VG, Keane-Myers A. 2007. **IL-10 confers protection from mast cell degranulation in a mouse model of allergic conjunctivitis.** *Experimental Eye Research*. 85:575-579.
- Burdin N, Van Kooten C, Galibert L, Abrams JS, Wijdenes J, Banchereau J, Rousset F. 1995. **Endogenous IL-6 and IL-10 contribute to the differentiation of CD40-activated human B lymphocytes.** *J. Immunol*. 154:2533–44.
- Burge CB, Tuschl T, Sharp PA. 1999. **Splicing of precursors to mRNAs by the spliceosomes.** In *The RNA world* (eds. R.F. Gesteland et al.), pp. 525–560. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Calado DP, Paixao T, Holmberg D, Haury M. 2006. **Stochastic Monoallelic Expression of IL-10 in T Cells.** *The Journal of Immunology*. 177: 5358–5364.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, 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(9):3666-70.

- Caughey GH. 2007. **Mast cell tryptases and chymases in inflammation and host defense.** *Immunol Rev*;217:141–154.
- Chapple DS, Mason DJ, Joannou CL, Odell EW, Gant V, Evans RW. 1998. **Structure-function relationship of antibacterial synthetic peptides homologous to a helical surface region on human lactoferrin against Escherichia coli serotype O111.** *Infect Immun.* 66(6):2434-40.
- Chen CY, Shyu AB. 1995. **AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation.** *Trends Biochem Sci.* 11:465-70.
- Chen CY, Xu N, Zhu W, Shyu AB. 2004. **Functional dissection of hnRNP D suggests that nuclear import is required before hnRNP D can modulate mRNA turnover in the cytoplasm.** *RNA.* 4:669-80.
- Chen M, Huang L, Shabier Z, Wang J. 2007. **Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets.** *Molecular Immunology.* 44: 2558–2565
- Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD, Oppenheim JJ. 1996. **Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils.** *J. Biol. Chem.* 271(6):2935–40
- Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS. 2002. **Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines.** *Stem Cells.* 2:139-45.
- Clarke CJ, Hales A, Hunt A, Foxwell BM. 1998. **IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity.** *Eur. J. Immunol.* 28:1719–26.
- Cline J, Braman JC, Hogrefe HH. 1996. **PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases.** *Nucleic Acids Res.* 24(18):3546-51.
- Collazo CM, Yap GS, Sempowski GD, Lusby KC, Tessarollo L, Woude GF, Sher A, Taylor GA. 2001. **Inactivation of LRG-47 and IRG-47 reveals a family of interferon gamma-inducible genes with essential, pathogen-specific roles in resistance to infection.** *J Exp Med.* 194(2):181-8.
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. 2004. **Plasmacytoid dendritic cells in immunity.** *Nature Immunol.* 5, 1219–1226.
- Cooke C, Hans H, Alwine JC. 1999. **Utilization of splicing elements and polyadenylation signal elements in the coupling of polyadenylation and last-intron removal.** *Mol. Cell. Biol.* 19: 4971–4979.
- Coussens LM & Werb Z. 2002. **Inflammation and cancer.** *Nature.* 420:860–67.

- Daftarian PM, Kumar A, Kryworuchko M, Diaz-Mitoma F. 1996. **IL-10 production is enhanced in human T cells by IL-12 and IL-6 and in monocytes by tumor necrosis factor-alpha.** *J Immunol.* 157(1):12-20.
- De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. 1991a. **Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.** *J Exp Med.* 174(5):1209-20.
- De Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. 1991b. **Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.** *J Exp Med.* 174(4):915-24.
- Dever TE, Glynias J, Merrick WC. 1987. **GTP-binding domain: three consensus sequence elements with distinct spacing.** *Proc. Natl Acad. Sci.* 84:1814–1818.
- Dickensheets HL, Donnelly RP. 1997a. **IFN-gamma and IL-10 inhibit induction of IL-1 receptor type I and type II gene expression by IL-4 and IL-13 in human monocytes.** *J. Immunol.* 159:6226–33.
- Dickensheets HL, Freeman SL, Smith MF, Donnelly RP. 1997b. **Interleukin-10 upregulates tumor necrosis factor receptor type-II (p75) gene expression in endotoxin-stimulated human monocytes.** *Blood.* 90:4162–71.
- Ding YQL, Zamarin D, Kotenko SV, Pestka S, Moore KW, Bromberg JS. 2001. **Differential IL-10R1 expression plays a critical role in IL-10-mediated immune regulation.** *J Immunol.* 167(12):6884-92.
- Dirks W, Wirth M, Hauser H. 1993. **Dicistronic transcription units for gene expression in mammalian cells.** *Gene.* 2:247-9.
- Doherty DE, Downey GP, Worthen GS, Haslett C, Henson PM. 1988. **Monocyte retention and migration in pulmonary inflammation. Requirement for neutrophils.** *Lab Invest.* 59(2):200-13.
- Donnelly Rp, D. H., Finbloom Ds. 1999. **The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes.** *J Interferon Cytokine Res.* 19 (6):563-73.
- Du Z, Kelly E, Mecklenbrauker I, Agle L, Herrero C, Paik P, Ivashkiv LB. 2006. **Selective Regulation of IL-10 Signaling and Function by Zymosan.** *The Journal of Immunology.* 176: 4785–4792.
- Echtenacher B, Mannel DN, Hultner L. 1996. **Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis.** *Nature.* 381:75–7
- Edwalds-Gilbert G. and Milcarek C. 1995. **Regulation of poly(A) site use during mouse B-cell development involves a change in the binding of a general polyadenylation factor in a B-cell stage-specific manner.** *Mol. Cell. Biol.* 15: 6420–6429.

- Edwalds-Gilbert G, Veraldi KL, Milcarek C. 1997. **Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: Means to an end?** *Nucleic Acids Res.* 25: 2547–2561.
- Ehret Gb, Schindler U, Horvath Cm, Fritz S, Nabholz M, Bucher P. 2001. **DNA binding specificity of different STAT proteins. Comparison of in vitro specificity with natural target sites.** *J Biol Chem.* 279(9):6675-88.
- Faurschou M, Borregaard N. 2003. **Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation.** *Microbes Infect.* 14:1317-27.
- Feng CG, Collazo-Custodio CM, Eckhaus M, Hieny S, Belkaid Y, Elkins K, Jankovic D, Taylor GA, Sher A. 2004. **Mice deficient in LRG-47 display increased susceptibility to mycobacterial infection associated with the induction of lymphopenia.** *J Immunol.* 172(2):1163-8.
- Fillatreau S, Sweenie CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. 2002. **B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10.** *Nat Immunol.* 3:944–950.
- Finbloom, D.S. and Winestock, K.D. 1995. **IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes.** *J Immunol.* 155(3):1079-90.
- Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. 1989. **Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.** *J. Exp. Med.* 170:2081–95.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, MooreKW, O'Garra A. 1991. **IL-10 acts on the antigenpresenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.** *J. Immunol.* 146:3444–51
- Fleming SD, Priscilla A. Campbell PA. 1996. **Macrophages Have Cell Surface IL-10 That Regulates Macrophage Bactericidal Activity.** *The Journal of Immunology.* 156:1143-1 150.
- Fleming SB, McCaughan CA, Andrews AE, Nash AD, Mercer AA. 1997. **A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus.** *J. Virol.* 71:4857–61.
- Forman HJ and Martine Torres M. 2002. **Reactive Oxygen Species and Cell Signaling Respiratory Burst in Macrophage Signaling.** *Am J Respir Crit Care Med.* 166: 4–8.
- Friedl P, Gunzer M. 2001. **Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model.** *Trends Immunol.* 22(4):187-91.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. **Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps.** *The Journal of Cell Biology.* 176: 2 (15): 231–241.
- Fussenegger M, Bailey JE, Hauser H, Mueller PP. 1999. **Genetic optimization of recombinant glycoprotein production by mammalian cells.** *Trends Biotechnol.* 1:35-42.

- Gallardo HF, Tan C, Sadelain M. 1997. **The internal ribosomal entry site of the encephalomyocarditis virus enables reliable coexpression of two transgenes in human primary T lymphocytes.** *Gene Ther.* 10:1115-9.
- Ganz T, Selsted ME, Szklarek D, Harwig SS, Daher K, Bainton DF, Lehrer RI. 1985. **Defensins: Natural peptide antibiotics of human neutrophils.** *J Clin Invest.* 76(4):1427-35.
- Ganz T, Gabayan V, Liao HI, Liu L, Oren A, Graf T, Cole AM. 2003. **Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan.** *Blood.* 101:2388-92.
- Gauzzi Mc, V. L., Mckendry R, Mogensen Ke, Fellous M, Pellegrini S. 1996. **Interferon- α dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase.** *J Biol Chem,* v.271, n.34, p.20494-500.
- Gibbs VC, Pennica D. 1997. **CRF2-4: isolation of cDNA clones encoding the human and mouse proteins.** *Gene* 186:97-101
- Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. 2002. **The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition.** *Mol Cell.* 10(5):1033-43.
- Graham C, Richter SC, McClean S, O’Kane E, Flatt PR, Shaw C. 2006. **Histamine-releasing and antimicrobial peptides from the skin secretions of the dusky gopher frog, *Rana sevosia*.** *Peptides.* 27:1313-1319.
- Grassi-Kassisse DM, Ribeiro-DaSilva G. 1992. **Canatoxin triggers histamine secretion from rat peritoneal mast cells.** *Agents Actions.* 37:204-209.
- Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. 1989a. **Gamma interferon induces different keratinocyte cellular patterns of expression of HLA-DR and DQ and intercellular adhesion molecule-I (ICAM-I) antigens.** *British Journal of Dermatology.* 120:1-8.
- Griffiths CE, Voorhees JJ, Nickoloff BJ. 1989b. **Characterization of intercellular adhesion molecule-1 and HLA-DR expression in normal and inflamed skin: modulation by recombinant gamma interferon and tumor necrosis factor.** *J Am Acad Dermatol.* 20(4):617-29.
- Grimbaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ. 2007. **Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B.** *Nature Immunology.* 8:1095-1104.
- Gu H, Zou YR, Rajewsky K. 1993. **Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting.** *Cell.* 73:1155-64.
- Haan SHU, Hassiepen U, Schaper F, Schneider-Mergener J, Wollmer a, Heinrich Pc, Grotzinger J. 1999. **Characterization and binding specificity of the monomeric STAT3-SH2 domain.** *J Biol Chem.* 274:1342-8.

- Haller O, Kochs G. 2002. **Interferon-induced Mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity.** *Traffic*. 3:710–717.
- Hamid Q, Tulic MK, Liu MC, Moqbel R. 2003a. **Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 111:5–17.
- Hamid Q. 2003b. **Inflammatory cells, cytokine and chemokine expression in asthma immunocytochemistry and in situ hybridization.** *J Allergy Clin Immunol*. 111(4):902-3.
- Hamilton BJ, Genin A, Cron RQ, Rigby WF. 2003. **Delineation of a novel pathway that regulates CD154 (CD40 ligand) expression.** *Mol Cell Biol*. 23(2):510-25. Erratum in: *Mol Cell Biol*. 2003 Sep;23(17):6338.
- Hart PH, Hunt EK, Bonder CS, Watson CJ, Finlay-Jones JJ. 1996. **Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10.** *J. Immunol*. 157:3672–80.
- Hazelrigg T. 1998. **The destinies and destinations of RNAs.** *Cell*. 4:451-60.
- Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ. 1975. **Effect of tumour necrosis factor on cultured human melanoma cells.** *Nature*. 258(5537):731-2.
- Hennecke M, Kwissa M, Metzger K, Oumard A, Kröger A, Schirmbeck R, Reimann J, Hauser H. 2001. **Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs.** *Nucleic Acids Res*. 16:3327-34.
- Henry SC, Daniell X, Indaram M, Whitesides JF, Sempowski GD, Howell D, Oliver T, Taylor GA. 2007. **Impaired Macrophage Function Underscores Susceptibility to Salmonella in Mice Lacking Irgm1 (LRG-47).** *The Journal of Immunology*. 179: 6963–6972.
- Horvath Cm, W. Z., Darnell Je Jr. 1995. **A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain.** *Genes Dev*. 9(8). 984-94.
- Houdebine LM, Attal J. 1999. **Internal ribosome entry sites (IRESs): reality and use.** *Transgenic Res*. 3:157-77.
- Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. 1993. **Interleukin 10 Protects Mice from Lethal Endotoxemia.** *J. Exp. Med*. 177:1205-8.
- Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, Dang MN, Vieira P, de Vries J, Spits H, Mosmann TR, Moore KW. 1990. **Expression of IL-10 activity by Epstein–Barr virus protein BCRF1.** *Science*. 250:830–2.
- Hu-Li J, Christophe Pannetier KC, Guo L, Lohning M, Gu H, Watson C, Assenmacher M, Radbruch A, Paul WE. 2001. **Regulation of Expression of IL-4 Alleles: Analysis Using a Chimeric GFP/IL-4 Gene Particular polymorphic forms of the IL-4Ra chain.** *Immunity*. 14:1–11.

- Huhtinen M, Repo H, Laasila K, Jansson S-E, Kautiainen H, Karma A, Leirisalo-Repo M. 2002. **Systemic inflammation and innate immune response in patients with previous anterior uveitis.** Br J Ophthalmol. 86:412–417
- Hunter, John. 1794. **A treatise on the blood, inflammation, and gun-shot wounds.** London: John Richardson Printer. Deutsche Übersetzung: „**Versuche über das Blut, die Entzündung und die Schusswunden**“ von Ernst Benjamin Gottlieb Hebenstreit (2 volumes, Leipzig 1797-1800).
- Im SH, Hueber A, Monticelli S, Kang KH, Rao A. 2004. **Chromatin-level Regulation of the IL10 Gene in T Cells.** JBC. 279 (45),5: 46818–46825.
- Im W, Kim H, Yun D, SY, Park SH, Locksley RM, Hong S. 2005. **Cytokine Reporter Mouse System for Screening Novel IL12/23 p40-inducing Compounds.** Molecules And Cells 20: 288-296.
- Imataka H, Gradi A. and Sonenberg N. 1998. **A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)- binding protein and functions in poly(A)-dependent translation.** EMBO J., 17, 7480–7489.
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. 1990. **High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids,** Gene 96, 23-8.
- Iovine NM, Elsbach P, Weiss J. 1997. **An opsonic function of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein depends on both its N- and C-terminal domains.** Proc Natl Acad Sci U S A. 94(20):10973-8
- Isaacs A. and Lindenmann J. 1957. **Virus interference. I. The interferon.** Proc R Soc London Ser B. 147: p. 258-67.
- Ito S, Sakatsume M, Dickensheets H, Vazquez N, Donnelly Rp, Larner Ac, Finbloom Ds. 1999. **Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma-induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1.** Blood. 93(5):1456-63.
- Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, Horvath CM, Ronai Z. 2001. **Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription.** Mol Cell. 3:517-28.
- Jaiswal AI, Croft M. 1997. **CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cells: implications for development of the primary T and B cell response.** J Immunol. 1;159(5):2282-91.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002. **Immunologie.** Spektrum Akademischer Verlag.
- Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJH, Duke GM, Palmenberg AC and Wimmer E. 1988. **A Segment of the 5' Nontranslated Region of Encephalomyocarditis Virus RNA Directs Internal Entry of Ribosomes during In Vitro Translation.** Journal of Virology. 62: 2636-2643.

- Jankovic D, Kullberg MC, Feng CG, Goldszmid RS, Collazo CM, Wilson M, Wynn TA, Kamanaka M, Flavell RA, Sher A. 2007. **Conventional T-bet⁺Foxp3⁻ Th1 cells are the major source of hostprotective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection.** *J. Exp. Med.* 204:273–283.
- Jenkins JK, Malyak M, Arend WP. 1994. **The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils.** *Lymphokine. Cytokine Res.* 13:47–54.
- Jones EA, Flavell RA. 2005. **Distal Enhancer Elements Transcribe Intergenic RNA in the IL-10 Family Gene Cluster.** *The Journal of Immunology.* 175: 7437–7446.
- Jones SA. 2005. **Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6.** *J Immunol.* 175: 3463–8.
- Joyce DA, Steer JH. 1996. **IL-4, IL-10 and IFN-gamma have distinct, but interacting, effects on differentiation-induced changes in TNF-alpha and TNF receptor release by cultured human monocytes.** *Cytokine.* 8:49–57.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, De-Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. 2001. **Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.** *J. Exp. Med.* 194: 863–869.
- Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galan JE, Harhaj E, Flavell RA. 2006. **Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse.** *Immunity.* 25(6):941-52.
- Kaplanski G, Marin V, Montero-Julian F, Mantovani A, Farnier C. 2003. **IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation.** *Trends Immunol.* 24, 25–29.
- Kaufman RJ, Davies MV, Wasley LC, Michnick D. 1991. **Improved vectors for stable expression of foreign genes in mammalian cells by use of the untranslated leader sequence from EMC virus.** *Nucleic Acids Res.* 16:4485-90.
- Kearley J, Barker JE, Robinson DS, Lloyd CM. 2005. **Resolution of allergeninduced airway inflammation and hyperreactivity by transfer of allergen-specific CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo: role of IL-10.** *J. Exp. Med.* 202:1539–1547.
- Kim JM, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Khan TA, Moore KW. 1992. **Structure of the mouse interleukin-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes.** *J. Immunol.* 148:3618–23.
- Kim KS, Lee TH, Suk K, Cha HS, Koh EM, Yagita H, Lee MS. 2002. **Soluble Fas ligand-susceptible "memory" cells in mice but not in human: potential role of soluble Fas ligand in deletion of auto-reactive cells.** *Autoimmunity.* 35, 15-20.
- Kishimoto T. 2005. **Interleukin-6: From Basic Science to Medicine-40 Years in Immunology.** *Annu. Rev. Immunol.* 23:1–21.

- Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA. 1999. **Cutting Edge: Clustered AU-Rich Elements Are the Target of IL-10-Mediated mRNA Destabilization in Mouse Macrophages**. *Journal of Immunology*. 162: 2457–2461.
- Knappe A, Hör S, Wittmann S, Fickenscher H. 2000. **Induction of a novel homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri**. *J. Virol.* 74:3881–7.
- Knippers, Rolf. 2001. **Molekulare Genetik**. Georg Thieme Verlag.
- Kochs G, Haener M, Aebi U, Haller O. 2002a. **Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers**. *J. Biol. Chem.* 277:14172–76
- Kochs G, Janzen C, Hohenberg H, Haller O. 2002b. **Antivirally active MxA protein sequesters La Crosse virus nucleocapsid protein into perinuclear complexes**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:3153–58.
- Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. 1999. **Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo**. *J. Immunol.* 163:1537–44.
- Kotenko SV, Krause CD, Izotova LS, Pollack BP, Wu W, Pestka S. 1997. **Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex**. *EMBO J.* 16:5894–5903.
- Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, Mirochnitchenko OV, Pestka S. 2000. **Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10)**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:1695–1700.
- Kougias P, Chai H, Lin PH, Yao Q, Lumsden AB, Chen C. 2005. **Defensins and cathelicidins: neutrophil peptides with roles in inflammation, hyperlipidemia and atherosclerosis**. *J Cell Mol Med.* 9(1):3-10.
- Kovalovich K, Li W, DeAngelis R, Greenbaum LE, Ciliberto G, Taub R. 2001. **Interleukin-6 protects against Fas-mediated death by establishing a critical level of anti-apoptotic hepatic proteins FLIP, Bcl-2, and Bcl-xL**. *J Biol Chem.* 276(28):26605-13.
- Krishnamoorthy S, Honn KV. 2006. **Inflammation and disease progression**. *Cancer Metastasis Rev.* 25:481–91.
- Kühn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. 1993. **Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis**. *Cell* 75:263–74
- Lalani I, Bhol K, Ahmed AR. 1997. **Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity**. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 79(6):469-83.
- Lang R, Pauleau AL, Parganas E, Takahashi Y, Mages J, Ihle JN, Rutschman R, Murray PJ. 2003. **SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling**. *Nat Immunol.* 4:546-50.

- Le H, Tanguay RL, Balasta ML, Wei CC, Browning KS, Metz AM, Goss DJ and Gallie DR. 1997. **Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity.** *J. Biol. Chem.*, 272, 16247–16255.
- Le T, Leung L, Carroll WL, Schibler KR. 1997. **Regulation of interleukin-10 gene expression: possible mechanisms accounting for its upregulation and for maturational differences in its expression by blood mononuclear cells.** *Blood*. 89(11):4112-9.
- Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. 2001. **Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution.** *Nat Immunol*. 2:612-61.
- Lewin, Benjamin. 1998. **Molekularbiologie der Gene.** Spektrum Akademischer Verlag.
- Li J, Menzel C, Meier D, Zhang C, Dubel S, Jostock T. 2007. **A comparative study of different vector designs for the mammalian expression of recombinant IgG antibodies.** *J Immunol Methods*. 1-2:113-24.
- Li X, Zhao X, Fang Y, Jiang X, Duong T, Fan C, Huang CC, Kain SJ. 1998. **Generation of destabilized green fluorescent protein as a transcription reporter.** *Biol. Chem.*, 273, 34970-34975.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002a. **Inflammation and atherosclerosis.** *Circulation*. 105:1135–43.
- Libby P. 2002b. **Inflammation in atherosclerosis.** *Nature*. 420(6917):868-74.
- Libby P. 2002c. **Atherosclerosis: the new view.** *Sci Am*. 286(5):46-55.
- Lin CH and Hünig T. 2003. **Efficient expansion of regulatory T cells in vitro and in vivo with a CD28 superagonist.** *J. Immunol*. 33:626–38.
- Linderholm M, Ahlm C, Settergren B, Waage A, Tarnvik A. 1996. **Elevated plasma levels of tumor necrosis factor (TNF)-alpha, soluble TNF receptors, interleukin (IL)-6, and IL-10 in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome.** *J. Infect. Dis*. 173:38–43.
- Lingnau M, Höflich C, Volka HD, Sabata R, Döcke WD. 2007. **Interleukin-10 enhances the CD14-dependent phagocytosis of bacteria and apoptotic cells by human monocytes.** *Human Immunology*. 68, 730–738.
- Liu YW, Ho AS, De Waal Malefyt R, Moore KW. 1994. **Expression cloning and characterization of a human IL-10 receptor.** *J Immunol*. 152(4):1821-9.
- Liu YW, Chen CC, Tseng HP, Chang WC. 2006. **Lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of interleukin-10 is mediated by MAPK- and NF-κB-induced CCAAT/enhancer-binding protein δ in mouse macrophages.** *Cellular Signalling*. 18:1492–1500.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Wijdenes J, et al. 1993. **Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus.** *Eur Cytokine Netw*. 4:421–7.

- Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, et al. 1994. **In vivo production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus: a potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity.** *Arthritis Rheum.* 37:1647–55.
- Llorente L, Zou W, Levy Y, et al. 1995. **Role of interleukin-10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus.** *J Exp Med.* 181:839–44.
- Llorente L, Richaud-Patin Y, Couderc J, et al. 1997. **Dysregulation of interleukin-10 production in relatives of patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum.* 40:1429–35.
- Lockridge KM, Zhou SS, Kravitz RH, Johnson JL, Sawai ET, Blewett EL, Barry PA. 2000. **Primate cytomegaloviruses encode and express an IL-10-like protein.** *Virology.* 268:272–80.
- Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. 1992. **Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor.** *Cytokine.* 4:96–100.
- Luster AD, Tager AM. 2004. **T-cell trafficking in asthma: Lipid mediators grease the way.** *Nature Reviews Immunology.* 4:711–24.
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. 1999. **An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.** *J Immunol Methods.* 223(1):7-92..
- Ma W, Lim W, Gee K, Aucoin S, Nandan D, Kozlowski M, Diaz-Mitoma F, Kumar A. 2001. **The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages.** *J Biol Chem.* 276(17):13664-74.
- MacEwan DJ. 2002. **TNF ligands and receptors: a matter of life and death.** *British Journal of Pharmacology.* 135, 855 -875.
- Mackiewicz A, Schooltink H, Heinrich PC, Rose-John S. 1992. **Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins.** *J. Immunol.* 149:2021–27
- MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. 2003. **Immune control of tuberculosis by IFN- γ -inducible LRG-47.** *Science* 302, 654–659.
- Madsen K. 2002. **Combining T cells and IL-10: a new therapy for Crohn's disease?** *Gastroenterology.* 123(6):2140-4.
- Maggi A, Ottobrini L, Biserni A, Lucignani G, Ciana P. 2004. **Techniques: Reporter mice – a new way to look at drug action.** *Trends in Pharmacological Sciences.* 25(6):337-342.
- Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. 1996. **Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF- α .** *Nature.* 381:77–80.

- Malbec O, Daron M. 2007. **The mast cell IgG receptors and their roles in tissue inflammation.** Immunological Reviews. 217: 206–221
- Malter JS. 1989. **Identification of an AUUUA-specific messenger RNA binding protein.** Science. 4930:664-6.
- Marfaing-Koka A, Maravic M, Humbert M, Galanaud P, Emilie D. 1996. **Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes.** Int. Immunol. 8:1587–94.
- Martens S, Sabel K, Lange R, Uthaiiah R, Wolf E, Howard JC. 2004. **Mechanisms Regulating the Positioning of Mouse p47 Resistance GTPases LRG-47 and IIGP1 on Cellular Membranes: Retargeting to Plasma Membrane Induced by Phagocytosis.** The Journal of Immunology. 173: 2594–2606.
- Martens S and Howard J. 2006. **The Interferon-Inducible GTPases.** Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:559–89.
- Martinez-Salas E. 1999. **Internal ribosome entry site biology and its use in expression vectors.** Curr Opin Biotechnol. 5:458-64.
- Martinez-Salas E, Ramos R, Lafuente E, Lopez de Quinto S. 2001. **Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements.** J Gen Virol. 5:973-84.
- Matsunaga Y, Terada T. 2000. **Mast cell subpopulations in chronic inflammatory hepatobiliary diseases.** Liver. 20(2):152-6.
- Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen KJ, Rose-John S. 2003. **Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE).** J. Biol. Chem. 278(40):38829–39.
- McDevitt H, Munson S, Ettinger R, Wu A. 2002. **Multiple roles for tumor necrosis factor- α and lymphotoxin α/β in immunity and autoimmunity.** Arthritis Res. 4 (suppl 3):141-152.
- Meager, Tony. 1998. **The Molecular Biology of Cytokines.** Molecular Medical Science Series. John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester. ISBN 0-471-98272-5.
- Melnicoff MJ, Horan PK, Morahan PS. 1989. **Kinetics of changes in peritoneal-cell populations following acute inflammation.** Cell. Immunol. 118:178–91.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, Carver-Moore K, DuBois RN, Clark R, Aguet M, Schreiber RD. 1996. **Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway.** Cell .84:431–42.
- Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. 2007. **Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation.** Immunological Reviews. 17: 304–328

- Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. 2000. **IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.** *Mol. Ther.* 1:376-382.
- Mocellin S, Marincola FM, Young HA. 2005. **Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint.** *J Leukoc Biol.* 78: 1043–1051.
- Mohrs K, Wakil AE, Killeen N, Locksley RM, Mohrs M. 2005. **A Two-Step Process for Cytokine Production Revealed by IL-4 Dual-Reporter Mice.** *Immunity.* 23: 419–429.
- Mohrs M, Shinkai K, Mohrs K, Locksley RM. 2001. **Analysis of Type 2 Immunity In Vivo with a Bicistronic IL-4 Reporter.** *Immunity.* 15: 303–311.
- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR. 1990. **Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein Barr virus gene BCRF1.** *Science* 248:1230–34
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. 2001. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.** *Annu Rev Immunol.* 19:683-765.
- Moore MJ. 2005. **From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs.** *Science.* 5740:1514-8.
- Mountford PS, Smith AG. 1995. **Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis.** *Trends Genet.* 5:179-84.
- Mülhardt C. 2000. **Der Experimentator: Molekularbiologie.** Spektrum Akademischer Verlag.
- Müllberg J, Althoff K, Jostock T, Rosejohn S. 2000. **The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology.** *Eur. Cyt. Netw.* 11:27–38.
- Naka T, Nishimoto N, Kishimoto T. 2002. **The paradigm of IL-6: from basic science to medicine.** *Arthritis Res.* 4 (suppl 3):233-242.
- Naramura M, Hu R-J, Gu H. 1998. **Mice with a Fluorescent Marker for Interleukin 2 Gene Activation.** *Immunity.* 9, 209–216.
- Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, And Kishimoto T. 1993. **Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membraneanchored gp130.** *Blood* 82, 1120–1126.
- Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H., Koishihara Y, Yancopoulos GD. Narimatsu M, Maeda H, Itoh S, Atsumi T, Ohtani T, Nishida K, Itoh M, Kamimura D, Park SJ, Mizuno K, Miyazaki J, Hibi M, Ishihara K, Nakajima K, Hirano T. 2001. **Tissue-specific autoregulation of the stat3 gene and its role in interleukin-6-induced survival signals in T cells.** *Mol Cell Biol.* 19:6615-25
- Nathan C. 2002. **Points of control in inflammation.** *Nature:* 6917:846-52.

- Nemeth ZH, Lutz CS, Csoka B, Deitch EA, Leibovich SJ, Gause WC, Tone M, Pacher P, Vizi ES, Hasko G. 2005. **Adenosine Augments IL-10 Production by Macrophages through an A2B Receptor-Mediated Posttranscriptional Mechanism.** *The Journal of Immunology.* 175: 8260–8270.
- Nesic D and Maquat LE. 1994. **Upstream introns influence the efficiency of final intron removal and RNA 3'-end formation.** *Genes & Dev.* 8: 363–375.
- Nevo Y, Nelson N. 2006. **The NRAMP family of metal-ion transporters.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 1763:609–620
- Nishiuchi YIT, Nishio H, Bodi J, Kimura T, Tsuji FI, Sakakiara S. 1998. **Chemical synthesis of the precursor molecule of the Aequorea green fluorescent protein, subsequent folding, and development of fluorescence.** *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 95, 13549-13554.
- Niswender K, Blackman S, Rohde L, Magnuson M, Piston D. 1995. **Quantitative imaging of green fluorescent protein in cultured cells: comparison of microscopic techniques, use in fusion proteins and detection limits.** *J. Microsc.* 180, 109–116.
- Niwa M. and Berget SM. 1991. **Mutation of the AAUAAA polyadenylation signal depresses in vitro splicing of proximal but not distal introns.** *Genes & Dev.* 5: 2086–2095.
- Nylen S, Sacks D. 2007. **Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis.** *Trends Immunol.* doi:10.1016/j.it.
- O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui ALF. 1998. **IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signalling mechanisms: evidence for stat3- dependent and - independent pathways.** *EMBO J.* 17:1006–18.
- Ooi CE, Weiss J, Elsbach P, Frangione B, Mannion B. 1987. **A 25-kDa NH2-terminal fragment carries all the antibacterial activities of the human neutrophil 60-kDa bactericidal/permeability-increasing protein.** *J Biol Chem.* 262(31):14891-4.
- Opal SM and DePalo VA. 2000. **Anti-Inflammatory Cytokines.** *Chest.* 117:1162-72.
- Patterson GH, Knobel SM, Sharif WD, Kain SR, Piston DW. 1997. **Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy.** *Biophys. J.* 73:2782–90.
- Pelletier J, Sonenberg N. 1988. **Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA.** *Nature.* 334:320-5.
- Pestova TV, Hellen CU, Shatsky IN. 1996. **Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosomal entry.** *Mol Cell Biol.* 12:6859-69.
- Peters M, Schirmacher P, Goldschmitt J, Odenthal M, Peschel C, Fattori E, Ciliberto G, Dienes HP, Meyer zum Büschenfelde KH, Rose-John S. 1997. **Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in interleukin (IL)-6-sIL-6R double transgenic mice.** *J Exp Med.* 185(4):755-66.

- Platzer C, Döcke W, Volk H, Prösch S. 2000. **Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells.** *J. Neuroimmunol.* 105:31–8.
- Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N ; Dormont D; Gras G. 2005. **Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation.** *Clinical and Experimental Immunology.* 142:481–489.
- Powell MJ, Thompson SA, Tone Y, Waldmann H, Tone M. 2000. **Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region.** *J Immunol.* 1:292-6
- Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. 2002. **Integrating mRNA processing with transcription.** *Cell* 108: 501–512.
- Pussinen PJ, Vilkuna-Rautiainen T, Alftan G, Palosuo T, Jauhiainen M, Sundvall J, Vesanen M, Mattila K, Asikainen S. 2004. **Severe Periodontitis Enhances Macrophage Activation via Increased Serum Lipopolysaccharide.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:2174-2180.
- Quattrocchi E, Dallman MJ, Dhillon AP, Quaglia A, Bagnato G, Feldmann M, Murine M. 2001. **IL-10 Gene Transfer Inhibits Established Collagen-Induced Arthritis and Reduces Adenovirus-Mediated Inflammatory Responses in Mouse Liver.** *The Journal of Immunology.* 166: 5970–5978.
- Qureshi SA. 2007. **Beta-lactamase: an ideal reporter system for monitoring gene expression in live eukaryotic cells.** *Biotechniques.* 42(1):91-6
- Rajasingh J, Bord E, Luedemann C, Asai J, Hamada H, Thorne T, Qin G, Goukassian D, Zhu Y, Losordo DW, Kishore R. 2006. **IL-10-induced TNF-alpha mRNA destabilization is mediated via IL-10 suppression of p38 MAP kinase activation and inhibition of HuR expression.** *FASEB J.* 12:2112-4.
- Read S, Powrie F. 2001. **CD4(+) regulatory T cells.** *Curr Opin Immunol.* 13(6):644-9.
- Reaves TA, Chin AC, Charles A Parkos CA. 2005. **Neutrophil transepithelial migration: role of toll-like receptors in mucosal inflammation.** *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 100(Suppl.I): 191-198.
- Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. 2001. **Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens.** *Trends Microbiol.* 86-92. Review.
- Reid BG, Flynn GC. 1997. **Chromophore formation in green fluorescent protein.** *Biochemistry,* 36, 6786-6791.
- Reinhardt RL, Hong S, Kang SJ, Wang Z, Locksley RM. 2006. **Visualization of IL-12/23p40 In Vivo Reveals Immunostimulatory Dendritic Cell Migrants that Promote Th1 Differentiation.** *The Journal of Immunology.* 177: 1618-1627.
- Richaud-Patin Y, Alcocer-Varela J, Llorente L. 1995. **High levels of Th2 cytokine gene expression in systemic lupus erythematosus.** *Rev Invest Clin.* 47:267–72.

- Richter JD, Sonenberg N. 2005. **Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins.** Nature. 7025:477-80.
- Riley Jk, T. K., Akira S, Schreiber Rd. 1999. **Interleukin-10 receptor signaling through the JAKSTAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action.** J Biol Chem:274 (23).16513-21.
- Rode HJ, Janssen W, Rösen-Wolff A, Bugert JJ, Thein P, Becker Y, Darai G. 1993. **The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene.** Virus Genes. 7(1):111-6.
- Roers A, Siewe L, Strittmatter E, Deckert M, Schluter D, Stenzel W, Gruber AD, Krieg T, Rajewsky K, Muller W. 2004. **T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation.** J. Exp. Med. 200:1289–1297.
- Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. 1997. **Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment.** Immunity. 3:315-25.
- Ross R. 1999a. **Atherosclerosis: An inflammatory disease.** New England Journal of Medicine. 340:115–26.
- Ross R. 1999b. **Atherosclerosis is an inflammatory disease.** Am Heart J. 138:S419-20.
- Rose-John S. 2002. **gp130 stimulation and the maintenance of stem cells.** Trends Biotechnol. 20:417–9.
- Rose-John S. 2003. **Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors.** Acta Biochim. Pol. 50:603–11.
- Rossi DL, Vicari AP, Franz-Bacon K, McClanahan TK, Zlotnik A. 1997. **Identification through bioinformatics of two new macrophage proinflammatory human chemokines MIP-3 α and MIP-3 β .** J. Immunol. 158:1033–36.
- Rousset F, Garcia E, Defrance T, Peronne C, Hsu D-H, Kastelein R, Moore KW, Banchereau J. 1992. **IL-10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1890–93.
- Ryan GB, Majno G. 1977. **Acute inflammation.** Am. J. Pathol. 86:185–274.
- Sala A, Folco G. 2001. **Neutrophils, endothelial cells, and cysteinyl leukotrienes: a new approach to neutrophil-dependent inflammation?** Biochem Biophys Res Commun. 25;283(5):1003-6.
- Samarasinghe R, Tailor P, Tamura T, Kaisho T, Akira S, Ozato K. 2006. **Induction of an Anti-Inflammatory Cytokine, IL-10, in Dendritic Cells After Toll-like Receptor Signaling.** Journal of Interferon & Cytokine Research. 26:893–900

- Santiago HC, Feng CG, Bafica A, Roffe E, Arantes RM, Cheever A, Taylor G, Vieira LQ, Aliberti J, Gazzinelli RT, Sher A. 2005. **Mice deficient in LRG-47 display enhanced susceptibility to Trypanosoma cruzi infection associated with defective hemopoiesis and intracellular control of parasite growth.** J Immunol. 175(12):8165-72.
- Saraiva MJ, Christensen R, Tsytsykova AV, Goldfeld AE, Ley SC, Kioussis D, O'Garra A. 2005. **Identification of a macrophage-specific chromatin signature in the IL-10 locus.** J. Immunol. 175:1041–1046.
- Sasse JHU, Schwartz C, Schniertshauer U, Heesel B, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Heinrich Pc, Horn F. 1997. **Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization.** Mol Cell Biol. 17(8):4677-86.
- Sayed BA, Brown MA. 2007. **Mast cells as modulators of T-cell responses.** Immunological Reviews. 217: 53–64
- Schaefer TsSL, Park Ok, Nathans D. 1997. **Functional differences between Stat3alpha and Stat3beta.** Mol Cell Biol, v.17, n.9, p.5307-16.
- Schandene L, Alonso-Vega C, Willems F, Gerard C, Delvaux A, Velu T, Devos R, de Boer M, Goldman M. 1994. **B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10.** J. Immunol. 152:4368–74.
- Schon MP, Boehncke WH. 2005. **Psoriasis.** New England Journal of Medicine, 352:1899–1912.
- Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS, Jr. 1999. **Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding.** J. Biol. Chem. 274:31868–74
- Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. 2004. **Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.** J Leukoc Biol. 75(2):163-89.
- Schwab JM and Serhan CN. 2006. **Lipoxins and new lipid mediators in the resolution of Inflammation.** Current Opinion in Pharmacology. 6:414–420.
- Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, HancockREW. 2002. **The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune response.** J. Immunol. 169:3883–91.
- Segal AW. 2005. **How neutrophils kill microbes.** Annu Rev Immunol. 23:197-223.
- Serhan CN. 2007. **Resolution Phase of Inflammation: Novel Endogenous Anti-Inflammatory and Proresolving Lipid Mediators and Pathways.** Annu. Rev. Immunol. 25:101–37.
- Sewnath ME, Olszyna DP, Birjmohun R, ten Kate FJ, Gouma DJ, van Der Poll T. 2001. **IL-10-deficient mice demonstrate multiple organ failure and increased mortality during Escherichia coli peritonitis despite an accelerated bacterial clearance.** J Immunol. 166(10):6323-31.

- Shanley TP, Vasi N, Denenberg A. 2000. **Regulation of Chemokine expression by IL-10 in lung inflammation.** *Cytokine* 12: 1054–64.
- Shelby RD, Hahn KM, Sullivan KF. 1996. **Dynamic elastic behavior of alpha-satellite DNA domains visualized in situ in living human cells.** *J. Cell Biol.* 135:545–57
- Siewe L, Bollati-Fogolin M, Wickenhauser C, Krieg T, Müller W and Roers A. 2006. **Interleukin-10 derived from macrophages and/or neutrophils regulates the inflammatory response to LPS but not the response to CpG DNA.** *Eur. J. Immunol.* 36:1-8.
- Sing A, Roggenkamp A, Geiger AM, Heesemann J. 2002a. **Yersinia enterocolitica evasion of the host innate immune response by V antigen-induced IL-10 production of macrophages is abrogated in IL-10-deficient mice.** *J Immunol.* 1;168(3):1315-21.
- Sing A, Rost D, Tvardovskaia N, Roggenkamp A, Wiedemann A, Kirschning CJ, Aepfelbacher M, Heesemann J. 2002b. **Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression.** *J Exp Med.* 21;196(8):1017-24.
- Song F, Matsuzaki G, Mitsuyama M, Nomoto K. 1994. **The Role of B cells in Vivo Induction of IFN-g-Producing CD4+ T Cells Specific to Listeria monocytogens: Positive and IL-10-Mediated Negative Regulation.** *Cellular Immunology.* 157: 403-414.
- Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryneck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. 2000. **Treatment of murine colitis by Lactococcus lactis secreting interleukin-10.** *Science.* 25;289(5483):1352-5.
- Steinmann RM, Cohn Z. 1973. **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice.** *The Journal of Experimental Medicine,* 1973, 137: 1142–1162.
- Stoll, G and Bendszus M. 2006. **Inflammation and atherosclerosis: Novel insights into plaque formation and destabilization.** *Stroke.* 37:1923–32.
- Stoneley M, Willis AE. 2004. **Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression.** *Oncogene* 18:3200-7.
- Svitkin YV, Herdy B, Costa-Mattioli M, Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. 2005. **Eukaryotic translation initiation factor 4E availability controls the switch between cap-dependent and internal ribosomal entry site-mediated translation.** *Mol Cell Biol.* 23:10556-65.
- Sykes RB, Matthew M. 1976. **The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics.** *J Antimicrob Chemother.* 2(2):115-57.
- Taga K, Mostowski H, Tosato G. 1993. **Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth.** *Blood.* 81:2964–71.
- Taga T, Hibi M, Hirata Y, Yamasaki K, Yasukawa K, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. 1989. **Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.** *Cell.* 58:573–81.

- Taga T, Kishimoto T. 1993. **Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membraneanchored gp130.** *Blood*. 82:1120–6.
- Takada K, Ohno N, Yadomae T. 1994. **Binding of lysozyme to lipopolysaccharide suppresses tumor necrosis factor production in vivo.** *Infect Immun*. 62(4):1171-5.
- Takagaki Y, Seipelt RL, Peterson ML, Manley, J.L. 1996. **The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation.** *Cell* 87: 941–952.
- Talts JF, Brakebusch C, Fässler R. 1999. **Integrin Gene Targeting.** *Methods in Molecular Biology*. 129:153-187.
- Tannenbaum S, Oertel H, Henderson W, Kaliner M. 1980. **The biological activity of mast cell granules I. Elicitation of inflammatory responses in rat skin.** *J Immunol*. 125: 325–35.
- Tarun SZ, Jr. and Sachs AB. 1996. **Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G.** *EMBO J.*, 15, 7168–7177.
- Taylor GA, Stauber R, Rulong S, Hudson E, Pei V, et al. 1997. **The inducibly expressed GTPase localizes to the endoplasmic reticulum, independently of GTP binding.** *J. Biol. Chem*. 272:10639–45
- Taylor GA, Carl G. Feng CG, Alan Sher A. 2004. **p47 Gtpases: Regulators Of Immunity To Intracellular Pathogens.** *Nature Reviews Immunology*. 4:100-109
- Taylor GA. 2007. **Irg Proteins: Key Mediators of Interferon-Regulated Host Resistance to Intracellular Pathogens.** *Cellular Microbiology*. 9(5), 1099–1107
- Teague TK, Marrack P, Kappler JW, Vella AT. 1997. **IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis.** *J Immunol*. 158(12):5791-6.
- Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. 1989. **Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils.** *J Clin Invest*. 84(6):2017-20.
- Theoharides TC, Kempuraj D, Tagen M, Conti P, Kalogeromiro D. 2007. **Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation.** *Immunological Reviews*. 217: 65–78.
- Tone M, Mark J. Powell, Yukiko Tone, Sara A. J. Thompson, and Herman Waldmann. 2000. **IL-10 Gene Expression Is Controlled by the Transcription Factors Sp1 and Sp3.** *The Journal of Immunology*. 165: 286–291.
- Townsend, A. & von Bodmer, H. 1989. **Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes.** *Annu. Rev. Immunol*. 7, 601-624.
- Tripp CS, Beckerman KP, Unanue ER. 1995. **Immune Complexes Inhibit Antimicrobial Responses through Interleukin-10 Production Effects in Severe Combined Immunodeficient Mice during Listeria Infection.** *J. Clin. Invest*. 95:1628-1634

- Trinchieri G. 2001. **Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection.** *J. Exp. Med.* 194:F53–F57.
- Tripal P, Bauer M, Naschberger E, Mörtinger T, Hohenadl C, Cornali E, Thureau M, Stürzl M. 2007. **Unique Features Of Different Members Of The Human Guanylate-Binding Protein Family.** *Journal of interferon & cytokine research* 27:44–52.
- Tsien RY. 1998. **The green fluorescent protein.** *Annu Rev Biochem.* 67:509-44.
- Uchiya k, Groisman EA, Nikai T. 2004. **Involvement of Salmonella Pathogenicity Island 2 in the Up-Regulation of Interleukin-10 Expression in Macrophages: Role of Protein Kinase A Signal Pathway.** *Infection and Immunity.* 1964–1973
- Urban CF, Reichard U, Brinkmann V, Zychlinsky A. 2006. **Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms.** *Cell. Microbiol.* 8:668–676.
- Van den Biggelaar AHJ, van Ree R, Rodrigues LC, Lell B, Deelder AM, Kremsner PG, Yazdanbakhsh M. 2000. **Decreased atopy in children infected with Schistosoma haematobium: a role for parasite-induced interleukin-10.** *Lancet* 356, 1723–1727
- van der Sluijs KF, van Elden L.J. R., Nijhuis M, Schuurman R, Pater JM, Florquin S, Goldman M, Jansen HM, Lutter R and van der Poll T. 2004. **IL-10 Is an Important Mediator of the Enhanced Susceptibility to Pneumococcal Pneumonia after Influenza Infection.** *The Journal of Immunology.* 172: 7603–7609.
- Van Montfrans C, Rodriguez Pena MS, Pronk I, Ten Kate FJ, Te Velde AA, Van Deventer SJ. 2002a. **Prevention of colitis by interleukin 10-transduced T lymphocytes in the SCID mice transfer model.** *Gastroenterology.* 123(6):1865-76.
- Van Montfrans C, Hooijberg E, Rodriguez Pena MS, De Jong EC, Spits H, Te Velde AA, Van Deventer SJ. 2002b. **Generation of regulatory gut-homing human T lymphocytes using ex vivo interleukin 10 gene transfer.** *Gastroenterology.* 123(6):1877-88
- Vieira P, de Waal-Malefyt R, Dang MN, Johnson KE, Kastelein R, Fiorentino DF, deVries JE, Roncarolo MG, Mosmann TR, Moore KW. 1991. **Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(4):1172-76.
- Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, Parry S, Williams RO, Maini R.N, Feldmann M. 1996. **Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis.** *Arthritis Rheum.* 39:495.
- Wan YY, Flavell RA. 2007. **Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression.** *Nature.* 7129:766-70.
- Wang XP, Schunck M, Kallen KJ, Trautwein C, Rose-John S, Proksch E. 2004. **The interleukin-6 cytokine system regulates epidermal permeability barrier repair in wild-type and IL-6-deficient mice.** *J. Invest. Dermatol.* 123:124–31.

- Ward CM, Stern PL. **The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse embryonic stem cells.** *Stem Cells* (2002) 5:472-5.
- Weber-Nordt RM, Riley JK, Greenlund AC, Moore KW, Darnell JE, Schreiber RD. 1996. **Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced tyrosine phosphorylated docking sites in the IL-10 receptor intracellular domain.** *J. Biol. Chem.* 271:27954–61.
- Wehinger J, Gouilleux F, Groner B, Finke J, Mertelsmann R, Weber-Nordt RM. 1996. **IL-10 induces DNA binding activity of three STAT proteins (Stat1, Stat3, and Stat5) and their distinct combinatorial assembly in the promoters of selected genes.** *FEBS Letters.* 394:365-70.
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD and Sachs AB. 1998. **Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors.** *Mol. Cell*, 2, 135–140.
- Wenzel SE. 2003a. **The role of leukotrienes in asthma.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 69:145–55.
- Wenzel SE, Balzar S, Cundall M, Chu HW. 2003b. **Subepithelial basement membrane immunoreactivity for matrix metalloproteinase 9: association with asthma severity, neutrophilic inflammation, and wound repair.** *J Allergy Clin Immunol.* 111(6):1345-52.
- Wiederkehr-Adam MEP, Muller K, Bieck E, Gombert Fo, Ottl J, Graff P, Grossmuller F, Heim Mh. 2003. **Characterization of phosphopeptide motifs specific for the src homology 2 (SH2) domains of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and STAT3.** *J Biol Chem.*18.
- Willems F, Marchant A, Delville JP, Gerard C, Delvaux A, Velu T, de Boer M, Goldman M. 1994. **Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes.** *Eur. J. Immunol.* 24:1007–9.
- Wilusz CJ, Wormington M, Peltz SW. 2001. **The cap-to-tail guide to mRNA turnover.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(4):237-46.
- Wiseman H And Halliwell B. 1996. **Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species : role in inflammatory disease and progression to cancer.** *Biochem. J.* 313:17-29.
- Zhang X, Justin P. Edwards, and David M. Mosser. 2006. **Dynamic and Transient Remodeling of the Macrophage IL-10 Promoter during Transcription.** *The Journal of Immunology.* 177: 1282–1288.
- Xu XSY, Hoey T. 1996. **Cooperative DNA binding and sequence-selective recognition conferred by the STAT amino-terminal domain.** *Science.* 273(5276):794-7.
- Yang D, Chen Q, Chertov O, Oppenheim JJ. 2000. **Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells.** *J. Leukocyte Biol.* 68:9–14.
- Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. 2004. **Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense.** *Annu Rev Immunol.* 22:181-215.

- Yang De, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, Oppenheim JJ, Chertov O. 2000. **LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells.** *J. Exp. Med.* 192(7):1069–74.
- Yopp AC, Randolph GJ, Bromberg JS. 2003. **Leukotrienes, sphingolipids, and leukocyte trafficking.** *J Immunol.* 171(1):5-10.
- Yu X, Zhan X, D'Costa J, Tanavde VM, Ye Z, Peng T, Malehorn MT, Yang X, Civin CI, Cheng L. 2003. **Lentiviral vectors with two independent internal promoters transfer high-level expression of multiple transgenes to human hematopoietic stem-progenitor cells.** *Mol. Ther.* 7(6):827-838.
- Zal T, Volkman A, Stockinger B. 1994. **Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne self-antigen.** *J Exp Med.* 180(6):2089-99.
- Zdanov A, Schalk-Hihi C, Gustchina A, Tsang M, Weatherbee J, Wlodawer A. 1995. **Crystal structure of interleukin-10 reveals the functional dimer with an unexpected topological similarity to interferon.** *Structure* 3:591–601.
- Zdanov A, Schalk-Hihi C, Wlodawer A. 1996. **Crystal structure of human interleukin- 10 at 1.6 Å resolution and a model of a complex with its soluble receptor.** *Protein Science.* 5: 1955-62.
- Zemann B, Schwaerzler C, Griot-Wenk M, Nefzger M, Mayer P, Schneider H, de Weck A, Carballido JM, Liehl E. 2003. **Oral administration of specific antigens to allergy-prone infant dogs induces IL-10 and TGF- β expression and prevents allergy in adult life.** *J Allergy Clin Immunol.* 111:1069-75.
- Zerrahn J, Ulrich E, Schaible UE, Brinkmann V, Gühlich U, Kaufmann SHE. 2002. **The IFN-Inducible Golgi- and Endoplasmic Reticulum-Associated 47-kDa GTPase IIGP Is Transiently Expressed During Listeriosis.** *The Journal of Immunology.* 168: 3428–3436.
- Zhou X, Schmidtke P, Zepp F, Meyer CU. 2005. **Boosting interleukin-10 production: therapeutic effects and mechanisms.** *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord.* (4):465-75.
- Zhu J, Musco ML, Grace MJ. 1999. **Three-color flow cytometry analysis of tricistronic expression of eBFP, eGFP, and eYFP using EMCV-IRES linkages.** *Cytometry.* 1:51-9.
- Ziai MR, Russek S, Wang HC, Beer B, Blume AJ. 1990. **Mast cell degranulating peptide: a multifunctional neurotoxin.** *J Pharm Pharmacol.* 42:457–461.
- Zimmer M. 2002. **Green Fluorescent Protein (GFP): Applications, Structure, and Related Photophysical Behavior.** *Chemical Reviews.* Vol. 102 (3):759-781.
- Zlokarnik G, Negulescu PA, Knapp TE, Mere L, Burres N, Feng L, Whitney M, Roemer K, Tsien RY. 1998. **Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter.** *Science.* 2;279(5347):84-8.

Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. 2001. **High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes.** Blood. 98:3800-3808.

8. Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren (amino acid)
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampecillin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-triphosphat
Bla	β -Lactamase
BLP	bakterielles Lipoprotein (= Pam3Cys)
BMDCs	Bone marrow derived dendritic cells
BMDM	Bone marrow derived Macropages
bp	Basenpaar
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
CCF4-AM	<u>C</u> oumarin- <u>C</u> ephalosporin- <u>F</u> luorescein (4)- <u>A</u> cetoxymethyl
cDNA	complementary DNA
CFU	<i>colony forming units</i>
CMV	Cytomegalovirus
DAP	Diaminopimelinsäure
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECMV	encephalomyocarditis virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EF	Embryonale Fibroblasten
EGFP	<i>enhanced Green-fluorescent protein</i>
Erk	extracellular signal-regulated kinase
ES	Embryonale Stammzellen
EtOH	Ethanol (Äthanol)

FACS	Fluorescence activated cell sorting (fluoreszenzaktivierter Zellsorter)
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	<i>Green-fluorescent protein</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
h	hour (Stunde)
HEK 293	<i>human embryonic kidney cells 293</i>
HEPES	(N-2[Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)
HSV	Herpes simplex Virus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IL-1Ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
I κ B	Inhibitor von NF- κ B
i.p.	intraperitoneal
IPTG	Isopropylthiogalactosid
IRAK	IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle (internal ribosome entry site)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LBP	LPS-Bindungsprotein
LcrV	low calcium response V
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucine-rich repeats
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCS	multi cloning site
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>

MDP	Muramyldipeptid
Min	Minute
MMTV	<i>mouse mammary tumour virus</i>
MOI	multiplicity of infection
MyD88	<i>myeloid differentiation factor-88</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i>
Nod	<i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGE	Prostaglandin E
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
p.o.	peroral
PPM	<i>proteose peptone- elicited macrophages</i>
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
RICK	<i>RIP-like CARD-containing domain</i>
RIP2	<i>receptor interacting protein 2</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
STAT	"signal transducer and activator of transcription"
TAE	Trisacetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris -gepufferte Salzlösung

TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TGF- β	<i>transforming growth factor-β</i>
TIR	Toll/IL-1-Rezeptor
TK	Thymidin-Kinase
TNF	Tumornekrose-Faktor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
ÜN	über Nacht
UTR	untranslated region (nichttranslatierbare Region)
WT	Wild-Typ

9. Danksagung

Als erstes möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Vergabe des interessanten Themas und für sein beständiges Interesse und Engagement an dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich ihm dafür, dass er mir wissenschaftliche Freiräume gelassen hat, um eigene Ideen umzusetzen. Ohne seine große Unterstützung und Hilfsbereitschaft, hätte ich diese Arbeit nicht in dieser Form anfertigen können.

Professor Jonathan C. Howard danke ich für die Übernahme der Verantwortung als Doktorvater dieser Arbeit, für sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für seine großartige Unterstützung, die maßgeblich nicht nur zum Gelingen dieser Arbeit, sondern auch zur Entwicklung meiner bisherigen wissenschaftlichen Laufbahn beigetragen hat.

Die ES-Zellkultur habe ich in der Abteilung von Prof. Dr. Reinhard Fässler in Max Planck Institut, Martinsried, durchgeführt. Der Blastozysten-Transfer in Scheinschwangere Mäuse wurde von einer Service-Einheit des Max-Planck-Institutes für Biochemie, Martinsried, durchgeführt. Ich möchte Prof. Reinhard Fässler für die fruchtbare Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft und Anregungen danken.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Dr. Joe Dramiga für seine große Hilfsbereitschaft, für sein großes Interesse an meine Arbeit und für die interessanten wissenschaftlichen Diskussionen. Ganz besonderes danke ich ihm für die große Unterstützung beim Korrekturlesen und beim Drucken dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Markus Moser für seine große Hilfsbereitschaft bei der ES-Zellkultur und bei der Organisation der Blastozysten-Injektion.

Frau Monika Krämer danke ich für ihre Hilfe in vielen Verwaltungs-Angelegenheiten.

Mein Dank gilt auch Dr. Matthias Schiemann an der TU München für die kompetente Hilfe am FACS-Gerät.

Den Mitarbeitern im Tierhaus des Max von Pettenkofer Instituts danke ich für die Betreuung und Zucht der Reportermause, sowie für die Durchführung der Mausschwanz-Biopsien.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des MvP, die durch Hilfsbereitschaft zum guten Arbeitsklima beigetragen haben.

Ein besonderer Dank gilt meinem Freund Said für seine unermüdliche Hilfsbereitschaft, die mir eine große Stütze in den schwierigen Phasen während dieser Arbeit war. Mein Dank gilt auch der Anja fürs Korrekturlesen.

Dr. Fouad Ouziad möchte ich für das Korrekturlesen, für seine Anregungen und für die schönen Plauderstündchen beim Tee-Trinken danken, die eine willkommene Abwechslung vom ermüdenden Zusammenschreiben waren. Mein herzlicher Dank gilt auch seiner Frau Viola Stauf für das Korrekturlesen.

Dr. Cemalettin Bekpen danke ich für die Anregungen und die lebhaften wissenschaftlichen Diskussionen, die trotz der geografischen Trennung fortbestehen.

Ich möchte mich bei meinen lieben Eltern für ihre Unterstützung herzlich bedanken.

10. Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Jonathan C. Howard betreut worden.

Köln, 10.01.2008

Teilpublikationen:

Bouabe H, Fässler R, Heesemann J (2008). Improvement of Reporter Activity by IRES-mediated Polycistronic Reporter System. *Nucleic Acids Research*. Mar;36(5):e28.

Erfindungsmeldung:

Eine Erfindungsmeldung der **IL10-2xIRESBLA-Reportermaus** wurde unter dem Aktenzeichen IIIB8/1126/07 bei der Bayerische Patentallianz Ende September eingereicht.

11. Lebenslauf

Name: Hicham Bouabe
Geburtsort: Kenitra, Marokko

Schulbildung

1975-1980 Grundschule/Kenitra
1981-1988 Gymnasium/Kenitra
1988 Abitur (Baccalauréat sciences experimentales)

Leistungssport:

1987-1997: Leistungssport (Leichtathletik)

Vorbereitende Kurse:

Aug. 1989-Dez. 1989: Deutschkurs, Goethe Institut, Rabat

Jan. 1990- Jan. 1991: Studienkolleg/Deutschkurs, Universität zu Köln.

Studium:

April 2002: Diplom in Biologie (Fachrichtung Genetik)
Universität zu Köln, Abteilung Prof. Jonathan C. Howard
Thema der Diplomarbeit: „Charakterisierung der asymmetrischen
Funktionalität der Nukleotidbindedomänen des ABC-Transporters
TAP“

Seit 15.1.2003: Promotion am Max von Pettenkofer Institut, München, unter der
Leitung von Prof. Dr. Dr. Jürgen Heesemann und unter der Betreuung
von Prof. Dr. Jonathan C. Howard am Institut für Genetik der
Universität zu Köln

Köln, 10.01.2008