

Aus der Klinik für Endokrinologie und Diabetologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Michael Roden
Funktionsbereich Spezielle Endokrinologie
Ärztlicher Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott

**Auswirkungen von Interleukin-18 auf die
Autoimmunthyreoiditis und das Immunsystem im
TAZ10-Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Wiebke Wengert
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Matthias Schott

Zweitgutachter: PD Dr. med. Hubertus Hautzel

Publikationen

Ehlers M., Papewalis C., Stenzel W., Jacobs B., Meyer K. L., Deenen R., Willenberg H. S., Schinner S., Thiel A., Scherbaum W. A., Ullrich E., Zitvogel L., Schott M., 2012, Immunoregulatory Natural Killer Cells Suppress Autoimmunity by Down-Regulating Antigen-Specific CD8+ T cells in Mice, *Endocrinology*, Vol. 153, Nr. 9, S. 4367 - S. 4379

Ehlers M., Thiel A., Papewalis C., Domroese A., Stenzel W., Bernecker C., Haase M., Allelein S., Schinner S., Willenberg H. S., Feldkamp J., Schott M., 2014, Enhanced Iodine Supplementation Alters the Immune Process in a Transgenic Mouse Model for Autoimmune Thyroiditis, *Thyroid*, Vol. 24, Nr. 5, S. 888 - S. 896

Forschungspreise

Verleihung des Karl-Oberdisse-Preis 2015 von der Nordrhein-Westfälischen Gesellschaft für Endokrinologie und Diabetologie für die wissenschaftliche Arbeit „Immunosuppressive effect of IL-18 in murine Thyroid Autoimmunity“

Zusammenfassung

Die Autoimmunthyreoiditis ist die häufigste autoimmune Schilddrüsenerkrankung weltweit und kann in einer manifesten Hypothyreose münden. TAZ10-Mäuse sind transgen verändert und exprimieren auf ihren T-Zellen einen humanen T-Zell-Rezeptor, der ein Thyreoperoxidase-Epitop der Schilddrüse erkennt. Die Mäuse entwickeln eine Autoimmunthyreoiditis mit vergleichbaren Charakteristika und Symptomen wie beim Menschen. Interleukin-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin und spielt bei verschiedenen *T helper 1* (Th1)-vermittelten Autoimmunerkrankungen eine Rolle - unter anderem der Autoimmunthyreoiditis.

Um zu untersuchen, ob und wie die intraperitoneale Behandlung mit Interleukin-18 den Verlauf der Autoimmunthyreoiditis bei TAZ10-Mäusen verändert, wurden ein *Thyroxine Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (Thyroxin-ELISA) und histologische Färbungen der Schilddrüse durchgeführt sowie die relative Schilddrüsengröße und das Gewicht der Mäuse bestimmt. Die Durchflusszytometrie diente zur Erfassung der Auswirkungen von Interleukin-18 auf das Immunsystem.

Der Verlauf der Autoimmunthyreoiditis bei den TAZ10-Mäusen veränderte sich nicht signifikant unter der Behandlung mit Interleukin-18. Es lag eine tendenzielle Zunahme der Thyroxin-Konzentration im Serum der TAZ10-Mäuse unter der Therapie mit Interleukin-18 im Vergleich mit den Kontroll-TAZ10-Tieren vor. Die Behandlung mit Interleukin-18 veränderte nicht die relative Schilddrüsengröße, die histologische Struktur des Schilddrüsengewebes, die T-Zell-Infiltration in die Schilddrüse oder das Gewicht der Mäuse. Als Nebenwirkung der Interleukin-18-Behandlung trat eine Immunsuppression auf: Die Frequenz und Anzahl Dendritischer Zellen, Natürlicher Killerzellen und T-Zellen sanken unter der Therapie mit Interleukin-18. Demnach kann Interleukin-18 sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem runterregulieren.

Obwohl Interleukin-18 sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Verschiebung bewirken kann, ist die Therapie mit Interleukin-18 bei der Autoimmunthyreoiditis bzw. bei anderen Autoimmunerkrankungen nicht empfehlenswert. Ein aktuell nicht abschätzbarer Verlauf und das mögliche Auftreten einer schweren Immunsuppression macht Interleukin-18 als Therapeutikum im Rahmen von Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen unattraktiv. Therapeutisches Potential ist stattdessen zum Beispiel in dem Einsatz von *Interleukin-18 binding protein* oder Interleukin-4 zu erwarten. Auf das Auftreten einer Immunsuppression unter der Therapie mit Interleukin-18 sollte in Zukunft geachtet werden insbesondere bei der Verabreichung hoher Konzentrationen und/oder einer langen Behandlungsdauer.

Summary

Hashimoto's thyroiditis is the most common thyroidal autoimmune disease and can result in hypothyroidism. TAZ10 mice express a human T cell receptor that recognizes epitopes of mouse thyroid peroxidase. Autoimmune thyroiditis in these mice is comparable with human autoimmune thyroiditis. Interleukin-18 is a proinflammatory cytokine and participates in several autoimmune diseases. This dissertation investigates the immunological and physical impact of Interleukin-18 on the disease course in a transgenic mouse model for T helper 1 cell driven autoimmune thyroiditis.

After intraperitoneally administration of Interleukin-18, autoimmune thyroiditis characteristics were analyzed (serum thyroxine levels by an Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA), morphology and lymphocytic infiltration of the thyroid gland by histological staining, size of the thyroid gland and body weight). To investigate the effect of Interleukin-18 on leukocytic alterations, immune cell frequencies of spleen, bone marrow and blood were measured by fluorescein-activated cell sorter (FACS).

The results of FACS analyses detected a downregulation of cells of the innate and adaptive immunity by the treatment with Interleukin-18. The number and frequency of dendritic cells, natural killer cells and T cells (CD8 and CD4) decreased by the treatment at least by trend. Therefore, these results reveal Interleukin-18 as potential immunosuppressor. This immunosuppression did not improve the transgenic mice developing autoimmune thyroiditis. Interleukin-18 did not significantly change the serum thyroxine level, the thyroids morphology respectively the T cell infiltration in the thyroid gland, the thyroid size and the body weight in TAZ10 mice. Only an increase of serum thyroxine level was detected by trend in Interleukin-18 treated mice.

The results indicate that a treatment with Interleukin-18 may not be recommended for autoimmune diseases especially Hashimoto's thyroiditis (risk-benefit analysis). Instead therapeutic potential consists for example in the application of Interleukin-18 binding protein and Interleukin-4. A possible occurrence of an immunosuppression should be minded before and while a treatment with Interleukin-18.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Autoimmunthyreoiditis	1
1.2	Interleukin-18	2
1.3	Interleukin-18 und Autoimmunerkrankungen.....	5
1.4	Interleukin-18 und Autoimmunthyreoiditis.....	7
1.5	TAZ10-Mausmodell	7
2	Ziele der Arbeit.....	9
3	Material und Methoden	10
3.1	Material	10
3.2	Methoden	16
3.2.1	Vorversuch	16
3.2.2	Behandlung der TAZ10-Mäuse mit Interleukin-18	17
4	Ergebnisse.....	25
4.1	Verlauf der Autoimmunthyreoiditis bei TAZ10-Mäusen unter der Behandlung mit Interleukin-18	25
4.1.1	Thyroxin-Konzentrationen in den Seren der TAZ10-Mäuse.....	25
4.1.2	Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse	27
4.1.3	Gewichtsentwicklung der TAZ10-Mäuse.....	29
4.1.4	Veränderungen von T-Zellen der TAZ10-Mäuse.....	30
4.1.5	Veränderungen von Natürlichen Killerzellen der TAZ10-Mäuse	35
4.1.6	Veränderungen von Dendritischen Zellen der TAZ10-Mäuse	37
4.2	Wirkung von Interleukin-18 auf Immunzellen von TAZ10-Mäusen	39
4.2.1	Wirkung von Interleukin-18 auf T-Zellen	39
4.2.2	Wirkung von Interleukin-18 auf Natürliche Killerzellen.....	41
4.2.3	Wirkung von Interleukin-18 auf Dendritische Zellen	42
4.3	Immunsuppression durch Interleukin-18 – Welcher Mechanismus ist verantwortlich?.....	44

4.3.1	Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Immunzellen	45
4.3.2	Wirkung von Interleukin-18 auf die Interleukin-2-Expression in zytotoxischen T-Zellen	49
4.4	Immunsuppression mit zunehmendem Alter der TAZ10-Mäuse	50
4.4.1	T-Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse.....	50
4.4.2	Natürliche Killerzellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse ...	52
4.4.3	Dendritische Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse	55
5	Diskussion	57
5.1	Verlauf der Autoimmunthyreoiditis bei TAZ10-Mäusen unter der Behandlung mit Interleukin-18	57
5.2	Wirkung von Interleukin-18 auf Immunzellen von TAZ10-Mäusen	60
5.3	Immunsuppression durch Interleukin-18 - Welcher Mechanismus ist verantwortlich?	61
5.4	Immunsuppression mit zunehmendem Alter der TAZ10-Mäuse	63
5.5	Selbstkritik.....	64
5.6	Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit	65
6	Ausblick	66
7	Literatur- und Quellenverzeichnis	68

Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildungen	FKS	Fetales Kälberserum
AIT	Autoimmunthyreoiditis	FoxP3	<i>forkhead box protein P3</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse	HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
AS	Aminosäuren	HT	Hashimoto-Thyreoiditis
ATP	Adenosintriphosphat	IFN	Interferon
CD	<i>Cluster of differentiation</i> "Unterscheidungsgruppen"	Ig	Immunglobulin
CD40L	CD40-Ligand, CD154	IGIF	Interferon- γ -induzierender Faktor
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankungen	IKK	I κ B-Kinase-Komplex
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis	IL	Interleukin
c-Kit	Tyrosinkinase Kit, CD117	IL-18BP	<i>Interleukin-18 binding protein</i>
CTL	Zytotoxische T-Zelle	IL-18	Interleukin-18-Bindeprotein
DC	Dendritische Zelle	IL-18R	Interleukin-18-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure	IRAK	IL-1R-assozierte Kinase
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	KG	Körpergewicht
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Fas	Todesrezeptor, CD95		
FasL	Fas-Ligand, CD178		

M. Crohn	Morbus Crohn	TBST	Tris-gepufferte
mRNA	<i>messenger RNA</i>		Salzlösung mit
MS	Multiple Sklerose		Tween 20
MWD	Mittelwertdifferenz	TCR	T-Zell-Rezeptor
MyD88	Myeloischer Differenzierungsfaktor 88	Tg	Thyreoglobulin
NFκB	Nuklear-Faktor κB	Th1/2	T-Helfer-1/2
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle	Th17-Zelle	T-Helferzelle, die Interleukin-17 produziert
NKT-Zelle	Natürliche Killer-T-Zelle	TNF	Tumornekrosefaktor
NOD	<i>non-obese diabetic</i> (-Mausmodell)	TPO	Thyreoperoxidase
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	TRAF6	<i>tumor necrosis factor receptor- associated factor 6</i>
PD-1L	<i>programmed death- 1</i> -Ligand, CD274		Tumornekrose- faktorrezeptor- assoziierter Faktor 6
P2X₇R	P2X ₇ -Rezeptor	TSH	Thyreoidea- stimulierendes Hormon
RA	Rheumatoide Arthritis	T1DM	Diabetes mellitus Typ 1
rmIL	rekombinantes murines Interleukin		
SLE	Systemischer Lupus erythematoses		
STZ	Streptozotocin (-Mausmodell)		
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung		

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Verbrauchsmaterialien.....	10
Tabelle 3.2: Chemikalien.....	11
Tabelle 3.3: Erworbene Puffer und Medien.....	12
Tabelle 3.4: Hergestellte Puffer und Medien.....	12
Tabelle 3.5: Fluorochrome für die Durchflusszytometrie	13
Tabelle 3.6: Antikörper für die Durchflusszytometrie	13
Tabelle 3.7: Antikörper für die Isotyp-Kontrollen	14
Tabelle 3.8: Antikörper für die Immunhistologie	14
Tabelle 3.9: Geräte	15
Tabelle 3.10: Software.....	15
Tabelle 3.11: Antikörper-Schema - c-Kit-Expression auf Natürlichen Killerzellen	16
Tabelle 3.12: Verwendete Antikörper gegen extrazelluläre Oberflächenmoleküle	22
Tabelle 3.13: Verwendete Antikörper gegen extrazelluläre Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine	22
Tabelle 3.14: Antikörper-Schema - Expression von Fas und Fas-Ligand auf Immunzellen	23

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Der physiologische Schilddrüsenregelkreis.....	2
Abb. 1.2: Wirkmechanismus von Interleukin-18	4
Abb. 1.3: Regulation von Interleukin-18	5
Abb. 3.1: Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse.....	18
Abb. 4.1: Thyroxin-Konzentrationen in den Seren der TAZ10-Mäuse.....	26
Abb. 4.2: Relative Schilddrüsengröße der TAZ10-Mäuse	27
Abb. 4.3: Schilddrüsengewebe der TAZ10-Mäuse	28
Abb. 4.4: T-Zellen in den Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse	29
Abb. 4.5: Gewichtsentwicklung der TAZ10-Mäuse.....	29
Abb. 4.6: Thyreoperoxidase-spezifische zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse	31
Abb. 4.7: Aktivierte zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse	32
Abb. 4.8: Interferon- γ enthaltende zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse	33
Abb. 4.9: Thyreoperoxidase-spezifische T-Helferzellen der TAZ10-Mäuse	34

Abb. 4.10: Natürliche Killerzellen der TAZ10-Mäuse	35
Abb. 4.11: Interleukin-18 induziert die c-Kit-Expression auf Natürlichen Killerzellen aus TAZ10-Mäusen <i>in vitro</i>	36
Abb. 4.12 c-Kit positive Natürliche Killerzellen der TAZ10-Mäuse.....	37
Abb. 4.13: Dendritische Zellen der TAZ10-Mäuse.....	38
Abb. 4.14: Wirkung von Interleukin-18 auf T-Zellen	40
Abb. 4.15: Wirkung von Interleukin-18 auf Natürliche Killerzellen	42
Abb. 4.16: Wirkung von Interleukin-18 auf Dendritische Zellen	43
Abb. 4.17: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf zytotoxischen T-Zellen	45
Abb. 4.18: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf T-Helferzellen	46
Abb. 4.19: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Natürlichen Killerzellen.....	47
Abb. 4.20: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Dendritischen Zellen	48
Abb. 4.21: Wirkung von Interleukin-18 auf die Interleukin-2-Expression in zytotoxischen T-Zellen.....	49
Abb. 4.22: Zytotoxische T-Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse	51
Abb. 4.23: T-Helferzellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse	53
Abb. 4.24: Natürliche Killerzellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse	54
Abb. 4.25: Dendritische Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse.....	56

1 Einleitung

1.1 Autoimmunthyreoiditis

Die Autoimmunthyreoiditis (AIT; Synonym wird häufig der Begriff „Hashimoto-Thyreoiditis“ (HT) verwendet) ist die häufigste autoimmune Schilddrüsenerkrankung mit einer Inzidenz von 0,6-3,5 Fällen pro 1000 Personen pro Jahr und einer Prävalenz von 1,3-7,7% (1,2). Inzidenz und Prävalenz der AIT unterscheiden sich regional (3). Frauen leiden häufiger als Männer an AIT und Hypothyreose (Schilddrüsenunterfunktion) (1–3). Mit zunehmendem Alter steigt die Wahrscheinlichkeit (Hazard-Rate) eine AIT zu entwickeln (1). Sowohl eine genetische Prädisposition (4) als auch Umweltfaktoren spielen eine Rolle bei der Entwicklung der AIT. Identifizierte Einflussfaktoren der Umwelt sind unter anderem: Iod (5,6), Selen (7–9), Rauchen (10) und die Hepatitis C-Infektion (11,12). Es besteht eine Assoziation zwischen der AIT und anderen Autoimmunerkrankungen (13,14) wie z.B. dem Diabetes mellitus Typ 1 (15,16), dem Systemischen Lupus erythematoses (17,18) und der Rheumatoiden Arthritis (19,20). Die AIT kann im Rahmen eines Polyglandulären Autoimmunsyndroms auftreten (21).

Die AIT ist gekennzeichnet durch eine Infiltration von Dendritischen Zellen (DC's), B-Zellen, Plasmazellen und T-Zellen in die Schilddrüse (22–24). Die Thyreoperoxidase (TPO) und das Thyreoglobulin (Tg) sind Proteine, die für die Schilddrüsenhormonsynthese essenziell sind. Bei der AIT werden TPO- und/oder Tg-Antikörper gebildet, die entsprechend die Antigene TPO (25) bzw. Tg (26) erkennen. Des Weiteren existieren autoreaktive T-Zellen gegen die Schilddrüsenantigene TPO und Tg (27,28). Die Destruktion der Schilddrüse bei der AIT kann in einer manifesten Hypothyreose münden (29).

Der physiologische Schilddrüsenregelkreis ist in Abb. 1.1 dargestellt. Eine zerstörte Schilddrüse kann weniger Schilddrüsenhormone produzieren und freisetzen. Die fehlende Hemmung der Schilddrüsenhormone auf den Hypothalamus und die Hypophyse führt zu einer reaktiv erhöhten Konzentration an Thyreoidea-stimulierendem Hormon (TSH) im Serum. Die manifeste Hypothyreose wird definiert durch eine über den Referenzbereich erhöhte Serum-Konzentration von TSH und unter den Referenzbereich erniedrigte Serum-Konzentration von Thyroxin (Synonym: Tetraiodthyronin, T₄). Patienten mit Hypothyreose leiden z.B. unter trockener Haut, Kältegefühl, Haarausfall, Konzentrations- und Gedächtnisschwäche, Obstipation, Gewichtszunahme, Stimmveränderungen und Frauen unter Zyklusstörungen wie Menorrhagie, Oligomenorrhö oder Amenorrhö mit sekundärer Infertilität. Befunde, die zusätzlich erhoben werden können, sind z.B. Myxödeme sowie periphere Ödeme,

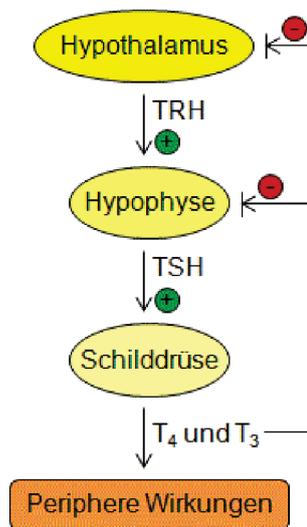


Abb. 1.1: Der physiologische Schilddrüsenregelkreis

Das Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) aus dem Hypothalamus stimuliert die Produktion von Thyreotrope- stimulierendem Hormon (TSH) in der Hypophyse. Das TSH stimuliert die Synthese und Sekretion von den Schilddrüsenhormonen Thyroxin (Synonym: Tetraiodthyronin, T_4) und Triiodthyronin (Synonym: T_3). Die Schilddrüsenhormone selbst hemmen über einen negativen Rückkopplungsmechanismus die Produktion von TRH und TSH und entfalten ihre Wirkungen in der Peripherie.

Bradykardie, abgeschwächte Muskeleigenreflexe und das Karpaltunnelsyndrom. Das Myxödemkoma ist mit den Symptomen der Bewusstseinsintrübung, den Krampfanfällen und den genannten Symptomen der Hypothyreose aufgrund seiner hohen Letalität gefürchtet. Neben der klinischen Symptomatik sind das Vorhandensein von TPO- und/oder Tg-Antikörpern sowie ein echoarmes Schilddrüsengewebe in der Sonographie Diagnosekriterien der AIT. Des Weiteren sind die AIT, Antikörper gegen Tg und ein erhöhter TSH-Spiegel im Serum Risikofaktoren für ein papilläres Schilddrüsenkarzinom (30). Die symptomatische Therapie der AIT bei Hypothyreose besteht in der täglichen, lebenslangen, oralen Einnahme von L-Thyroxin (29,31). Es gibt aktuell weder eine kausale Therapie der AIT noch eine dauerhafte symptomatische Alternativtherapie.

1.2 Interleukin-18

Interleukin-18 und seine Funktionen

Interleukin-18 (IL-18) ist ein proinflammatorisches Zytokin der IL-1-Familie. Das IL-18-Gen ist auf Chromosom 9 der Maus (32) und Chromosom 11 des Menschen (33) lokalisiert. IL-18 wurde von Nakamura *et al.* erstmalig als ein Protein im Serum von Mäusen identifiziert, das die T-Zell-Proliferation sowie die $IFN-\gamma$ -Produktion in T- und NK-Zellen anregen kann (34). Das Protein wurde *Interferon- γ -inducing factor* (IGIF) genannt (34). Neben der T-Zell-Proliferation und erhöhten $IFN-\gamma$ -Produktion verstärkt IGIF die zytotoxische Aktivität von

NK-Zellen (Natürlichen Killerzellen) (35,36). Aufgrund der pleiotropen Effekte von IGIF wurde es in IL-18 umbenannt (35). IL-18 wirkt synergistisch mit IL-12 bezüglich der IFN- γ -Produktion durch T- und B-Zellen (37). Des Weiteren erhöht IL-18 die Produktion von *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und Interleukin-2 (IL-2) durch T-Zellen (38) und die Produktion von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 α (IL-1 α) und Interleukin-6 (IL-6) (39). Die IL-18-Produktion wurde in verschiedenen Zellen detektiert wie Kupffer-Zellen (36), Monozyten (40,41), Makrophagen (36,42), Neutrophilen Granulozyten (43), Dendritischen Zellen (42), Keratinozyten (42,44), Epithelzellen (45,46), Osteoblasten (47) und Schilddrüsenfollikelzellen (48,49).

Vom Vorläuferprotein zum reifen Interleukin-18

Das pro-IL-18 wird als ein Vorläuferprotein aus 192 Aminosäuren (AS) synthetisiert und zu einem reifen, biologisch aktiven Protein aus 157 AS gespalten (36). Es werden ein Caspase-1-abhängiger und ein Caspase-1-unabhängiger Aktivierungsmechanismus unterschieden. Caspase-1 (Synonym: ICE, *Interleukin-1 β converting enzyme*) teilt das 24 kDa pro-IL-18 in ein 6 kDa- und ein 18 kDa-Protein, das dem aktiven IL-18 entspricht und die IFN- γ -Produktion induziert sowie die Zytotoxizität von NK-Zellen erhöht (50,51).

Zu den Caspase-1-unabhängigen Aktivierungsmechanismen, die pro-IL-18 an der gleichen Stelle teilen wie Caspase-1, gehören die Serinproteasen Granzym B (52) und Proteinase 3 (PR3) (46). Meprin- β , Untereinheit der gewebespezifischen Metalloproteinase Meprin, spaltet pro-IL-18 in ein 17 kDa schweres Protein, das in der Lage ist - wie das reife 18 kDa schwere IL-18-Protein (53) - den *nuclear factor κ B* (NF κ B) zu aktivieren (54). Caspase-4 (50) und die humane Mastzell-Chymase (55) teilen pro-IL-18 an jeweils anderer Stelle und führen zu Polypeptiden mit biologisch geringeren Aktivitäten bezüglich der IL-18-Funktionen. Caspase-3 teilt pro-IL-18 sowie das reife IL-18 und generiert Spaltprodukte anderer Größe mit geringerer Aktivität bzw. biologisch inaktiven Formen (50,51).

Initiierung der Interleukin-18-Freisetzung

Der P2X₇-Rezeptor (P2X₇R), ein Adenosintriphosphat-(ATP-)Rezeptor, kann entweder wie ein Kationen-Kanal agieren oder große Poren in die Zellmembran mit resultierender Zelllyse formen (56). ATP wird z.B. von T-Zellen (57) und *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP)-ausgesetzten Monozyten (40) freigesetzt. Die Bindung von extrazellulärem ATP an den P2X₇R resultiert in einer Produktion von aktivem IL-18 (40,58). Die durch ATP vermittelte IL-18-Freisetzung kann durch den Tyrosinkinase-Inhibitor AG126 (41), durch den Kalzium-abhängigen Phospholipase A₂(PLA₂)-Inhibitor AACOCF₃ (40) oder durch oxidiertes

ATP (40) geblockt werden. Makrophagen von *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)-behandelten Mäusen exprimieren Fas und können durch Bindung von Fas-Ligand (FasL) zur Freisetzung von aktivem IL-18 angeregt werden (59).

Wirkungsmechanismus von Interleukin-18

Der IL-18-Rezeptor (IL-18R) ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette. Das biologisch aktive IL-18 bindet auf der Zelloberfläche an einen freien IL-18R α (Synonym: IL-1R-rp1) (60,61). Eine nicht-gebundene IL-18R β -Kette (Synonym: AcPL) (62) dockt an den IL-18R α und zusammen formen sie einen Komplex (63). Der IL-18-Rezeptor-Komplex rekrutiert das Adaptormolekül *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) (64) und als nächstes die *IL-1R-associated kinase* (IRAK) (65,66). IRAK wird phosphoryliert und verbindet sich mit dem *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6) (67). Der weitere Verlauf der IL-18-Signalkaskade ist aktuell noch nicht bekannt. Beim ähnlich verlaufenden IL-1-Signalweg wird vermutet, dass TRAF6 mit der *NF κ B-inducing kinase*

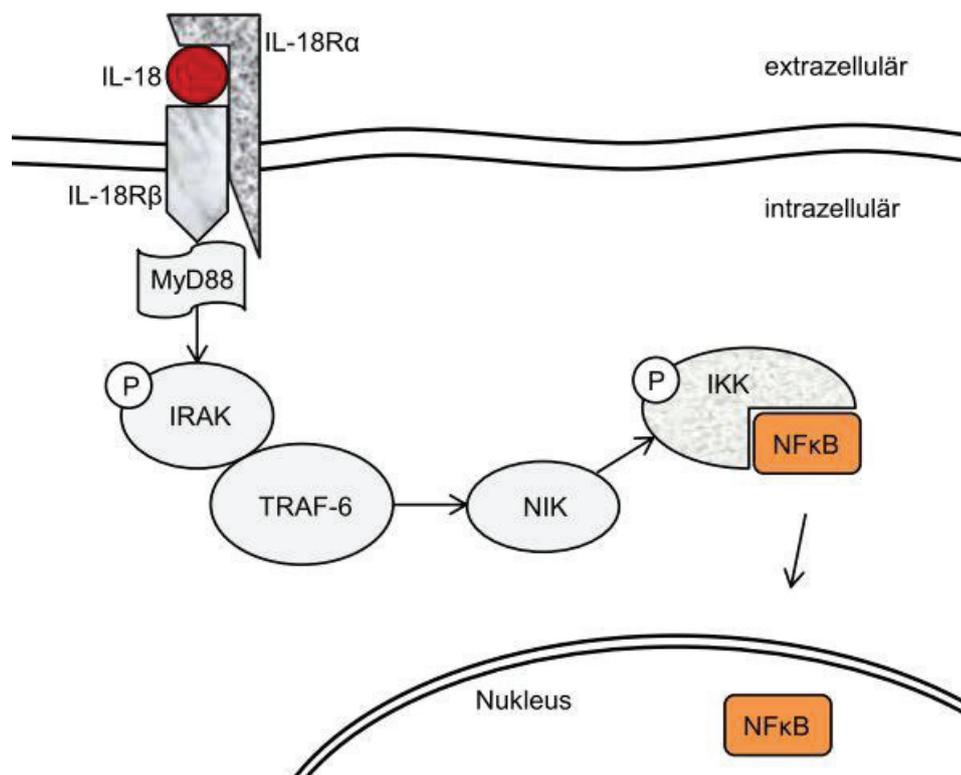


Abb. 1.2: Wirkmechanismus von Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18) bindet an die IL-18-Rezeptor- α -Kette (IL-18R α). Nach Bildung eines Komplexes mit IL-18-Rezeptor β (IL-18R β) wird der *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) rekrutiert. Die *Interleukin-1-Receptor associated kinase* (IRAK) wird phosphoryliert und verbindet sich mit dem *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6). Es wird vermutet, dass TRAF6 mit der *NF κ B-inducing kinase* (NIK) interagiert. NIK kann durch Phosphorylierung der I κ B-Kinase-Komplex-Ketten α und β (IKK α / β) die Freisetzung von *nuclear factor κ B* (NF κ B) bewirken. NF κ B kann in den Nucleus gelangen und dort die Transkription verschiedener Gene veranlassen.

(NIK) interagiert und auf diese Weise an der Freisetzung von NFκB aus dem *IκB-kinase-complex* (IKK) beteiligt ist (68). Fortin *et al.* konnten nachweisen, dass IL-18 die Phosphorylierung von IKKα/β induziert und dies mit der Aktivierung von NFκB einhergeht (43). Der Transkriptionsfaktor NFκB kann so - durch IL-18 aktiviert - in den Nukleus translozieren und die Transkription von Zielgenen initiieren (53) (s. Abb. 1.2).

Abgesehen vom NFκB-Signalweg werden die IL-18-Funktionen auch durch verschiedene MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinase*, MAPK) vermittelt wie die p38 MAP-Kinase (43,69) sowie die MAP-Kinasen p44^{erk-1} und p42^{erk-21} (70). Weitere Faktoren, die an den IL-18-Signalkaskaden beteiligt sind, sind zum Beispiel die *extracellular regulated kinase 1/2* (ERK1/2) (43,71), die *phosphatidylinositol-3-OH kinase* (PI3K) (43), die *TGF-β-activated kinase 1* (TAK1) (65) und die Januskinase *tyrosine kinase 2* (tyk2) (72).

Der Antagonist von Interleukin-18: Das Interleukin-18 binding protein

Das *IL-18 binding protein* (IL-18BP) bindet IL-18 und hemmt dessen biologische Aktivität in Mensch und Maus (73,74). Das unterschiedliche Spleißen der *IL-18BP messenger ribonucleic acid* (IL-18BP-mRNA) erklärt die Existenz von vier Isoformen des Menschen und zwei Isoformen der Maus (75). Die Isoformen besitzen jeweils unterschiedliche Affinitäten bezüglich ihrer Bindung und Neutralisierung von IL-18 (75). IFN-γ induziert die Produktion und Freisetzung von IL-18BP aus diversen Zellen (76). Das IL-18BP wiederum ist in der Lage die IFN-γ-induzierte Wirkung von IL-18 zu blocken (73,74), sodass ein selbstregulierender Feedback-Mechanismus besteht (s. Abb. 1.3).

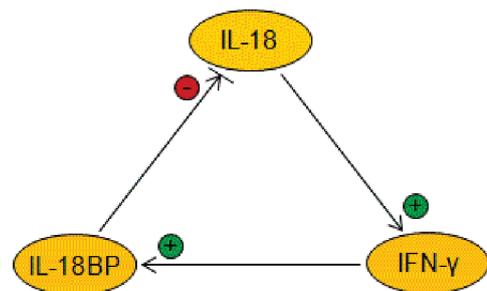


Abb. 1.3: Regulation von Interleukin-18

Interleukin-18 (IL-18) stimuliert die Bildung und Freisetzung von Interferon-γ (IFN-γ). IFN-γ wiederum regt die Produktion und Ausschüttung von *IL-18 binding protein* (IL-18BP) an. Das IL-18BP bindet IL-18 und hemmt dessen biologische Aktivität. Auf diese Weise besteht ein selbstregulierender Feedback-Mechanismus zwischen IL-18, IFN-γ und IL-18BP.

1.3 Interleukin-18 und Autoimmunerkrankungen

IL-18 ist bei verschiedenen T-Helfer-1(Th1)-vermittelten Autoimmunerkrankungen von Bedeutung:

Der Diabetes mellitus Typ 1 (T1DM) resultiert aus einer autoimmun vermittelten Destruktion der Insulin-produzierenden β-Zellen des Pankreas. Patienten mit T1DM haben signifikant

mehr IL-18 im Serum als Gesunde (77–80). Die IL-18-Spiegel im Serum korrelieren mit dem HbA_{1c} (glykosyliertes adultes Hämoglobin; umgangssprachlich: Langzeitblutzucker) (77,78) und den postprandialen Blutglukose-Werten (78). T1DM-Patienten mit diabetischer Ketoazidose haben höhere IL-18-Konzentrationen im Serum als Patienten ohne diabetischer Ketoazidose (79).

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung, die zur Gruppe der Kollagenosen gehört und verschiedene Organe betreffen kann wie z.B. Haut, Herz, Lunge und Niere. Beim SLE bestehen höhere IL-18-Konzentrationen im Serum als bei Gesunden (81,82). Patienten im aktiven Stadium besitzen höhere IL-18-Spiegel als Patienten im stabilen Stadium des SLE (81). Die Höhe von IL-18 im Serum korreliert mit dem *Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index* (SLEDAI) (81,82).

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine Th1-vermittelte systemisch-inflammatorische Erkrankung mit Destruktion synovialer Gelenke. Erhöhte IL-18-Konzentrationen konnten bei Patienten mit RA in Serum, synovialen Gewebe und der Gelenkflüssigkeit nachgewiesen werden (83–85). Die IL-18-Spiegel korrelieren mit der Höhe der Serum-Konzentration von Akute-Phase-Proteinen (CRP, BSG) (83) und der Krankheitsaktivität (84).

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine autoimmune, demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS), bei der die Myelinscheiden von Axonen zunehmend zerstört werden. MS-Patienten haben höhere IL-18-Konzentrationen in Serum und Liquor als Patienten ohne MS (86). Bei MS-Patienten mit aktiven Läsionen liegen höhere IL-18-Spiegel in Serum und Liquor vor als bei MS-Patienten ohne aktive Läsionen in der Magnetresonanztomographie (86).

Der Morbus Crohn (M. Crohn, Crohn's Disease, CD) gehört zu den chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und ist eine Autoimmunerkrankung der Darmschleimhaut. Intestinale Epithelzellen und mononukleäre Zellen der Lamina propria exprimieren mehr IL-18 mRNA bei M. Crohn als bei Colitis ulcerosa und gesunden Kontrollen (87,88). Die Mukosa von Patienten mit M. Crohn beinhaltet mehr aktives IL-18 als die Mukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa wohingegen die Mukosa von Personen ohne CED kein aktives IL-18 besitzt (87,88). Bei M. Crohn liegt mehr IL-18 in betroffenen Arealen als in nicht-betroffenen Arealen vor (87,88).

Die Psoriasis ist eine chronisch-inflammatorische Erkrankung der Haut, die auch andere Organe wie z.B. Gelenke betreffen kann. Patienten mit Psoriasis haben höhere IL-18-Spiegel im

Serum als Gesunde (89). Die Höhe der IL-18-Konzentration korreliert mit dem *Psoriasis Area Severity Index* (PASI) (89). In psoriatischen Läsionen der Haut ist die IL-18-Expression höher als in gesunder Haut (90). Es besteht in progressiven Psoriasis-Läsionen eine höhere Expression von IL-18 als in stabilen Plaques und in gesunder Haut (91).

Wird ein Medikament gefunden, das in den IL-18-Regelkreis eingreift und protektiv bei einer der Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen wirkt, wirkt dieses möglicherweise auch protektiv bei anderen Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen.

1.4 Interleukin-18 und Autoimmunthyreoiditis

Die AIT ist eine Th1-vermittelte autoimmune Schilddrüsenerkrankung (92) mit einem Ungleichgewicht von Zytokinen (92) und Chemokinen (93). Proinflammatorische Zytokine und Chemokine wie IFN- γ (92), IFN- α (94), TNF- α (92) und *C-X-C motif chemokine 10* (CXCL-10) (95) sind erhöht und z.B. der anti-inflammatorische *Transforming growth factor β 1* (TGF- β 1) ist erniedrigt (96). Ein weiteres Zytokin, das in erhöhter Serum-Konzentration bei der AIT vorliegt, ist IL-18 (97). IL-18-mRNA sowie pro-IL-18 werden von humanen Schilddrüsenfollikelzellen sowohl bei Gesunden als auch bei Patienten mit AIT produziert (48,49). Die Expression von IL-18-mRNA im Zytoplasma hyperplastischer und metaplastischer Schilddrüsenfollikelzellen mit Nähe zu lymphozytischen Infiltraten ist bei Patienten mit AIT diffuser und stärker (48,49). TSH stimuliert konzentrationsabhängig die Expression von IL-18-mRNA in FRTL-5-Zellen der thyreoidalen Zelllinie der Fischer-Ratte (48). Kinder mit AIT haben häufiger bestimmte Polymorphismen im IL-18-Gen als Gesunde (98). Zusammenfassend ist IL-18 auch bei der AIT von Bedeutung.

1.5 TAZ10-Mausmodell

Zur Untersuchung der Auswirkungen von IL-18 auf die AIT verwendeten wir TAZ10-Mäuse. TAZ10-Mäuse, entwickelt und beschrieben von Quaratino *et al.* (99), sind transgen verändert und exprimieren einen humanen T-Zell-Rezeptor (TCR) des autoreaktiven humanen T-Zell-Klon 37. Der T-Zell-Klon 37 wurde aus dem Schilddrüsengewebe eines Patienten mit autoimmuner Schilddrüsenerkrankung isoliert und ist spezifisch für das dominante autoantigene TPO₅₃₅₋₅₅₁-Epitop (100,101). Innerhalb dieses Peptids erkennt der T-Zell-Klon 37 das TPO₅₃₆₋₅₄₇-Epitop, das eine Rolle im Prozess der Schilddrüseninflammation beim Menschen spielt (101). Der humane TCR wird auf den T-Helfer- (CD4+; CD - *cluster of differentiation*) und zytotoxischen T-Zellen (CD8+) der TAZ10-Mäuse exprimiert und erkennt

das homologe TPO₅₂₄₋₅₃₅-Epitop der Maus (99). Aufgrund ihres genetischen Hintergrunds (Rag1^{-/-}-Mäuse) produzieren die Mäuse keine Antikörper und entwickeln demnach eine ausschließlich Th1-vermittelte Erkrankung (99). Die TAZ10-Mäuse zeigen spontan histologische, hormonelle und klinische Veränderungen im Sinne einer AIT vergleichbar mit denen beim Menschen: Es kommt zu einer T-Zell-Inflammation der Schilddrüse mit Zerstörung des Schilddrüsengewebes, zu einem reduzierten Thyroxin- und erhöhtem TSH-Spiegel im Serum sowie zu einer Gewichtszunahme als ein Zeichen der manifesten Hypothyreose (99). 50% der TAZ10-Mäuse weisen ab der 12. und fast alle ab der 24. Lebenswoche histologische und hormonelle Zeichen einer AIT auf (99).

2 Ziele der Arbeit

IL-18 ist ein proinflammatorisches Zytokin und spielt bei diversen Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen eine Rolle (77–91) - so auch bei der AIT (48,49,97). Die zentrale Frage - Wie wirkt sich IL-18 *in vivo* auf die AIT aus? - soll im Rahmen dieser Arbeit am Beispiel der TAZ10-Mäuse beantwortet werden.

Um die Frage zu beantworten, wurden TAZ10-Mäuse über 16 bzw. 26 Wochen mit NaCl, 100 ng IL-18 / 20 g Körpergewicht (KG) bzw. 1 µg IL-18 / 20 g KG zweimal pro Woche ab der vierten Lebenswoche intraperitoneal gespritzt. Mausalter und IL-18-Konzentrationen waren anhand von publizierten Daten festgelegt worden (99,102,103).

3 Material und Methoden

3.1 Material

Mäuse

Zur Untersuchung, ob die Gabe von IL-18 den Verlauf einer AIT verändert, wurden TAZ10-Mäuse verwendet. Wir erhielten die Mäuse von Dr. S. Quarantino von der *Cancer Research UK Oncology Unit* der Universität Southampton, England. Der Tierversuch wurde vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, NRW, Deutschland genehmigt (Aktenzeichen: 8.87-50.10.34.08.217).

Weitere Versuche zur Erfassung der immunologischen Sachverhalte wurden mit C57BL/6- und CBA-Mäusen durchgeführt (Ordnungsnummer zur Organentnahme: O96/05), da die TAZ10-Mäuse einen genetischen C57BL/6- und CBA-Hintergrund besitzen (99). Die Zucht der Mäuse erfolgte in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Alle Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter pathogenfreien Bedingungen gehalten und erhielten konventionelles Nager-Futter sowie Trinkwasser *ad libitum*. Die Tiere wurden gemäß der Tierschutzverordnung mittels Kohlenstoffdioxid-Inhalation getötet. Die Organentnahme wurde in einem Sektionsraum der Tierversuchsanlage durchgeführt. Alle Mäuse wurden vorschriftsgemäß entsorgt.

Die Arbeit mit den Mäusen (Behandlung mit NaCl bzw. IL-18, Tötung und Organentnahme) wurde von Dr. Margret Ehlers und in Vertretung von Dr. Annette Thiel durchgeführt.

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.1: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Handelsname	Herkunft
Adhäsive Objektträger	HistoBond®	Marienfeld (Lauda-Königshafen, Deutschland)
Bakteriologische Petrischalen		Nunc (Roskilde, Dänemark)
Cryo-Röhrchen	Cryo.s	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
DAKO Pen		DAKO (Hamburg, Deutschland)
Deckgläser 24x50 mm		Engelbrecht (Edermünde, Deutschland)
Einmal-Insulinspritzen	Omnican® 50	Braun (Melsungen, Deutschland)
Eppendorf-Röhrchen 1,5 ml	Safe-Lock Tubes	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
FACS-Röhrchen	FACS Tubes	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Falcons	Cellstar® Tubes	Greiner Bio-One (Frickenhausen,

Verbrauchsmaterial	Handelsname	Herkunft
		Deutschland)
Gewebeplatten		Nunc (Roskilde, Dänemark)
Gussförmchen	Cryomold Biopsy	Sakura (Zoeterwoude, Niederlande)
Kanülen	Sterican®	Braun (Melsungen, Deutschland)
Pipetten-Spitzen	TipOne	Starlab (Ahrensburg, Deutschland)
Präseparationsfilter (30 µm)		Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Seperations-Säulen	MACS® Separation Columns	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Skalpelle		Feather (Osaka, Japan)
Spritzen	Injekt®	Braun (Melsungen, Deutschland)
Zellsieb (70 µm)		BD (San Jose, USA)

Chemikalien

Tabelle 3.2: Chemikalien

Chemikalie	Herkunft
Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Antibody Diluent with Background Reducing Components	DAKO (Hamburg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA-Lösung) (0,5 M)	Promega (Madison, USA)
Eosin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
FACS Flow	BD Bioscience (San Jose, USA)
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hämatoxylin	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Chlorwasserstoffsäure = Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Kollagenase NB8	Serva (Heidelberg, Deutschland)
<i>Minimum Essential Medium (MEM) Vitamins Solution</i>	life technologies (Paisley, Schottland)
Mouse Free Thyroxine (FT4) ELISA Kit	CUSABIO BIOTECH Co., LTD. (Wuhan, China)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
NK-Isolations-Kit	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Non essential amino acids (NEAA)	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin/Streptomycin	invitrogen™ (Karlsruhe, Deutschland)
ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI	invitrogen™ (Karlsruhe, Deutschland)
Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)

Chemikalie	Herkunft
Recombinant Mouse Interleukin-2	R&D (Minneapolis, USA)
Recombinant Mouse Interleukin-18	MBL (Woburn, USA)
Schweineserum (normal)	DAKO (Hamburg, Deutschland)
Stickstoff flüssig	Linde (Duisburg, Deutschland)
Tissue-Tek-Gefriereinbettmedium; O.C.T	Miles (Elkhart, USA)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20 (Polysorbat 20)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Puffer und Medien

Tabelle 3.3: Erworbene Puffer und Medien

Puffer/Medium	Herkunft
Auto MACS running buffer	Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Cytofix/Cytoperm	BD Bioscience (San Jose, USA)
Erythrocyte-Lysis-Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS) -/- (Zellkultur)	invitrogen™ (Karlsruhe, Deutschland)
PermWash	BD Bioscience (San Jose, USA)
RPMI 1640 + GlutaMax™ (Zellkulturmedium)	invitrogen™ (Karlsruhe, Deutschland)

Tabelle 3.4: Hergestellte Puffer und Medien

Puffer/Medium	Chemikalie	Endkonzentration
PBS-EDTA-Puffer zur Blutentnahme zum Zell-Sort	EDTA (in NaCl)	10 mM
	EDTA (in PBS)	2 mM
R10-Medium	RPMI 1640 mit FKS	10 % Vol.
	Penicillin/Streptomycin	1 % Vol.
	Pyruvat	1 % Vol.
	NEAA	1 % Vol.
TBS, pH 7,6	TRIS	50 mM
	NaCl	300 mM
TBST, pH 7,6	+ Tween 20	0,1 % Vol.
TT-Medium	RPMI 1640 mit FKS	10 % Vol.
	Penicillin/Streptomycin	1 % Vol.
	MEM Vitamins Solution	1 % Vol.

Abkürzungen: PBS - *phosphate buffered saline*, EDTA - Ethylendiamintetraessigsäure, R10-Medium ist ein Nährmedium, RPMI 1640 ist ein Zellkulturmedium, FKS - Fetales Kälberserum, NEAA - *Non essential amino acids*, TBS - *Tris Buffered Saline*; TBST - *TBS with Tween 20*; TRIS - Tris(hydroxymethyl)aminomethan, NaCl - Natriumchlorid, Tween 20 - Polysorbat 20, TT-Medium ist ein Nährmedium, MEM - *Minimum Essential Medium*

Antikörper

Tabelle 3.5: Fluorochrome für die Durchflusszytometrie

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emissionsmaximum	Anregungswellenlänge
FITC	495 nm	519 nm	488 nm
PE	480 nm; 565 nm	578 nm	488 nm; 532 nm
PerCP	482 nm	678 nm	488 nm; 532 nm
PerCP-Cy5.5	482 nm	695 nm	488 nm; 532 nm
APC	650 nm	660 nm	595 nm; 633 nm 635 nm; 647 nm

Abkürzungen: FITC - Fluoresceinisothiocyanat, PE - Phycoerythrin, PerCP - Peridinin Chlorophyll Protein, PerCP-Cy5.5 = Tandemkonjugat aus PerCP und Cyanin-5.5, APC - Allophycocyanin

Tabelle 3.6: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorochrom	Spezies	Isotyp	Klon	Herkunft
CD4	FITC	Ratte	IgG2a	H129.19	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD45	FITC	Ratte	IgG2b	30-F11	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD80	FITC	Hamster	IgG2a	16-10A1	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD107a	FITC	Ratte	IgG2a	1D4B	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
c-Kit (CD117)	FITC	Ratte	IgG2b	2B8	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IFN-γ	FITC	Ratte	IgG1	XMG1.2	eBioscience (San Diego, USA)
Foxp3	FITC	Ratte	IgG2a	FJK-16s	eBioscience (San Diego, USA)
CD4	PE	Ratte	IgG2a	H129.19	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD8	PE	Ratte	IgG2a	53 – 6.7	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD11b	PE	Ratte	IgG2b	M1/70	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD45	PE	Ratte	IgG2b	30-F11	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD86	PE	Ratte	IgG2a	GL1	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
Fas (CD95)	PE	Maus	IgG1	15A7	eBioscience (San Diego, USA)
CD40L (CD154)	PE	Hamster	IgG3	MR1	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
FasL (CD178)	PE	Hamster	IgG	MFL3	eBioscience (San Diego, USA)
PD-1L (CD274)	PE	Ratte	IgG2a	MIH5	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
TCR Vβ1 (human)	PE	Ratte	IgG1	BL37.2	Beckman Coulter (Marseille, Frankreich)
CD25	PerCP-Cy5.5	Ratte	IgG1	PC61	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD45	PerCP	Ratte	IgG2b	30-F11	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD8a	APC	Ratte	IgG2a	53 – 6.7	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)

Antikörper	Fluorochrom	Spezies	Isotyp	Klon	Herkunft
CD11c	APC	Hamster	IgG1	HL3	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD45	APC	Ratte	IgG2b	30-F11	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IL-2	APC	Ratte	IgG2b	JES6-5H4	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IL-17A	APC	Ratte	IgG2a	eBio17B7	eBioscience (San Diego, USA)
NK1.1	APC	Maus	IgG2a	PK136	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)

Abkürzungen: CD - *Cluster of differentiation*, IFN- γ - Interferon- γ , Foxp3 - *forkhead box P3*, TCR- β - T-Zell-Rezeptor β , IL - Interleukin, FITC - Fluoresceinisothiocyanat, PE - Phycoerythrin, PerCP - Peridinin Chlorophyll Protein, PerCP-Cy5.5 = Tandemkonjugat aus PerCP und Cyanin-5.5, APC - Allophycocyanin, IgG - Immunglobulin G

Tabelle 3.7: Antikörper für die Isotyp-Kontrollen

Isotyp	Spezies	Fluorochrom	Klon	Herkunft
IgG1	Ratte	FITC	R3-34	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2	Hamster	FITC	B81-3	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2a	Ratte	FITC	R35-95	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2b	Ratte	FITC	A95-1	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG1	Hamster	PE	G235-2356	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG1	Maus	PE	MOPC-21	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG1	Ratte	PE	R3-34	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2a	Ratte	PE	R35-95	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG3	Hamster	PE	E36-239	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG1	Ratte	PerCP-Cy5.5	A110-1	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2b	Ratte	PerCP	A95-1	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG1	Hamster	APC	G235-2356	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2a	Maus	APC	G155-178	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2a	Ratte	APC	R35-95	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
IgG2b	Ratte	APC	A95-1	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)

Abkürzungen: IgG - Immunglobulin G, FITC - Fluoresceinisothiocyanat, PE - Phycoerythrin, PerCP - Peridinin Chlorophyll Protein, PerCP-Cy5.5 ist ein Tandemkonjugat bestehend aus einem PerCP-Molekül und dem Fluorochrom Cyanin-5.5, APC - Allophycocyanin

Tabelle 3.8: Antikörper für die Immunhistologie

Antikörper	Spezies	Klon	Herkunft
Alexa Fluor® 594 anti-rat IgG	Chicken		invitrogen™ (Eugene, Oregon, USA)
CD4	Ratte	H129.19	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)
CD8a	Ratte	53 – 6.7	BD Pharmingen™ (San Jose, USA)

Abkürzungen: CD: *Cluster of differentiation*, IgG: Immunglobulin G

Geräte und Software

Tabelle 3.9: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Herkunft
Brutschrank	BBD 6220	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Digitalkamera	AxioCam MRc	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Digitalkamera	Casio® EX-Z55	Casio Computer (Hong Kong, China)
Digitalkamera	DXM 1200	Nikon (Zürich, Schweiz)
FACSAria		BD (San Jose, USA)
FACSCalibur		BD (San Jose, USA)
Fluoreszenzmikroskop	Nikon eclipse TE 300	Nikon (Zürich, Schweiz)
Kryostat	Jung Frigocut 2800E	Leica (Burgwedel, Deutschland)
Mikroskop	Leica DMIL	Leica (Burgwedel, Deutschland)
Mikroskop	Leica Zoom 2000	Leica (Burgwedel, Deutschland)
Mikroskop	Zeiss Axioskop	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
pH-Meter	PH 330	WTW (Weilheim, Deutschland)
Plattenphotometer	Sunrise™	TECAN (Crailsheim, Deutschland)
Waage		Drexel (Hannover, Deutschland)
Zentrifuge	Universal 30RF	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge	Zentrifuge Heraeus Biofuge pico	DJB Labcare (Buckinghamshire, England)

Abkürzungen: FACS: *fluorescence-activated cell sorting*

Tabelle 3.10: Software

Anwendung/Gerät	Software	Herkunft
Bildbearbeitung	GIMP 2.8.4	The GIMP Development Team
ELISA	Magellan V4.00	TECAN (Mainz, Deutschland)
FACSAria	DIVA	BD (San Jose, USA)
FACSCalibur	CellQuestPro	BD (San Jose, USA)
Graphenerstellung	PRISM 3	GraphPad (La Jolla, USA)
Fluoreszenzmikroskop	Akt-1	Nikon (Zürich, Schweiz)
Literaturverwaltung	Zotero 3.0.1	Center for History and New Media; George Mason University (Fairfax, USA)
Mikroskop	AxioVision 4.8.1	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Statistische Auswertung	SPSS Statistics 22	IBM Deutschland GmbH (Ehningen, Deutschland)

Abkürzungen: *ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay*, FACS: *fluorescence-activated cell sorting*

3.2 Methoden

3.2.1 Vorversuch: Interleukin-18 induziert die Expression von c-Kit auf Natürlichen Killerzellen aus TAZ10-Mäusen *in vitro*

Zur Klärung der Frage, ob Interleukin-18 die Expression von c-Kit auf NK-Zellen aus TAZ10-Mäusen *in vitro* induziert, wurde wie folgt vorgegangen:

30 TAZ10-Mäuse wurden mittels Kohlenstoffdioxid getötet. Der Bauchraum jeder Maus wurde an der linken Flanke in Rechtsseitenlage eröffnet, das Brustfell durchtrennt, die versorgenden Gefäße der Milz abgetrennt und die jeweilige Milz in ein Eppendorf-Röhrchen mit PBS (*phosphate buffered saline*) überführt. Aufgrund der geplanten Kultivierung war eine sterile Arbeitsweise notwendig. Jeweils 10 Milzen wurden gepoolt, sodass drei Einzelzellsuspensionen hergestellt wurden (s. den Abschnitt „Durchflusszytometrie“-„Herstellung von Einzelzellsuspensionen“). Aus den Einzelzellsuspensionen wurden die NK-Zellen mittels des *NK Cell Isolation Kit mouse* von Miltenyi nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurden die unerwünschten Zellen der Einzelzellsuspension mit den biotinylierten monoklonalen Antikörpern CD4, CD5, CD8a, CD19, Ly-6G und Ter-119 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Anti-Biotin-Antikörper inkubiert, die aufgrund der daran konjugierten *MicroBeads* magnetisch wurden. Die Zellsuspensionen wurden unter der Verwendung von Magnetfeldern auf Separationssäulen gegeben. Die unerwünschten Antikörper-gebundenen Zellen blieben aufgrund des Magnetismus in den Separationssäulen hängen, die NK-Zellen liefen hindurch (Negativselektion). Die isolierten

Tabelle 3.11: Antikörper-Schema - c-Kit-Expression auf Natürlichen Killerzellen

	FITC	PE	APC
Kontrolle 1	-	-	-
Kontrolle 2	c-Kit	-	-
Kontrolle 3	-	CD11b	-
Kontrolle 4	-	-	NK1.1
Proben	c-Kit	CD11b	NK1.1

Die Tabelle stellt die Färbung der Natürlichen Killerzellen mit den jeweiligen Fluoreszenz-tragenden Antikörpern für die Zell-Sortierung und die durchflusszytometrische Messung dar. Abkürzungen: FITC - Fluorescein-Isothiocyanat, PE - Phycoerythrin, APC - Allophycocyanin, c-Kit = CD117, CD: *Cluster of differentiation*

NK-Zellen wurden zentrifugiert (300 x g, 5 min, 4°C) und in TT-Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension mit der höchsten Zellzahl wurden Zellen für die Kontrollen verwendet. Es erfolgte die Färbung der Zellen für die Zell-Sortierung nach dem angegebenen Antikörper-

Schema (s. Tabelle 3.11). Die Zellen wurden in 100 µl TT-Medium mit 0,1 µg Antikörper / 1x10⁶ Zellen für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Färbung wurden die Zellen, gelöst in EDTA-Puffer (Ethyldiamintetraessigsäure), über einen Präseparationsfilter (30 µm)

gegeben, um eine Verstopfung des *fluorescence activated cell sorting*(FACS)-Gerätes durch Zellklumpen zu vermeiden. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zur Zellsortierung auf 2×10^7 Zellen/ml EDTA-Puffer verdünnt. Mittels FACS wurden die lebenden NK1.1⁺ Zellen gemessen (c-Kit negative und positive) sowie die lebenden, NK1.1⁺ und c-Kit⁻ Zellen in ein 10 ml Falcon mit 2 ml R10 sortiert. Die Sortierung wurde am FACSaria mit der Software DIVA in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Hegemann am Institut für Funktionelle Genomforschung der Mikroorganismen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die sortierten c-Kit⁻ NK-Zellen wurden mit rekombinantem murinen IL-2 (rmIL-2) (300 IU/ml) und unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen (0 ng/ml, 0,25 ng/ml, 2,5 ng/ml, 25 ng/ml und 50 ng/ml rmIL-18) in R10-Medium inkubiert. Die Dauer betrug 16 Stunden bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in einer 24-Well-Platte mit flachem Boden im Brutschrank bei 37 °C und 5 %igem CO₂. Die NK-Zellen wurden nach der Inkubation geerntet, nach demselben Antikörper-Schema (c-Kit FITC/CD11b PE/NK1.1 APC) gefärbt und analog zum Vortag gemessen.

3.2.2 Behandlung der TAZ10-Mäuse mit Interleukin-18

Intraperitoneale Gabe von Interleukin-18

Die TAZ10-Mäuse wurden in Kontroll- (Behandlung mit NaCl) bzw. Versuchsgruppen (Behandlung mit rmIL-18) eingeteilt. Jede Gruppe bestand initial aus jeweils 10 TAZ10-Mäusen ($N_{\text{Gesamt}}=60$). Die Behandlungsdauer der intraperitonealen Gabe von NaCl bzw. rmIL-18 in den linken Unterbauch umfasste eine Zeitspanne von 16 bzw. 26 Wochen, beginnend nach Abschluss der 4. Lebenswoche. Jeweils 2 Gruppen wurden mit NaCl bzw. 100 ng bzw. 1 µg rmIL-18 / 20 g KG zweimal wöchentlich behandelt. Demnach ergaben sich insgesamt 6 Mausgruppen (in Klammern dargestellt: Anzahl der Tiere bei Versuchsende): NaCl, 16 Wochen lang (10 Mäuse); 100 ng rmIL-18 / 20 g KG, 16 Wochen lang (10 Mäuse); 1 µg rmIL-18 / 20 g KG, 16 Wochen lang (9 Mäuse); NaCl, 26 Wochen lang (9 Mäuse); 100 ng rmIL-18 / 20 g KG, 26 Wochen lang (9 Mäuse); 1 µg rmIL-18 / 20 g KG, 26 Wochen lang (9 Mäuse).

Organentnahme

Nach 20 bzw. 30 Lebenswochen wurden die TAZ10-Mäuse gemäß Tierschutzverordnung mittels Kohlenstoffdioxid getötet. Anschließend wurde bei jeder Maus das Gewicht dokumentiert. Das Blut der Maus wurde mit einer 2 ml Spritze direkt aus dem Herzen entnommen. Eine Hälfte des Blutes wurde für die Herstellung einer Einzelzellsuspension mit

einer 10 mM EDTA-Lösung vermischt und die andere Hälfte für die Gewinnung des Serums in ein leeres Eppendorf-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Maus eröffnet. Die inguinalen sowie zervikalen Lymphknoten, die Schilddrüse, die Milz und Femur sowie Tibia wurden entnommen und jeweils in Eppendorf-Röhrchen mit PBS getaucht.

Aufbereitung und Verwendung der Organe

Das Vollblut wurde bei (1000 x g, 10 min) zentrifugiert, das Serum abgenommen und für den später folgenden *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (s. Abschnitt „Thyroxin-ELISA“) bei -20 °C eingefroren.

Die Schilddrüse wurde unter dem Binokular vom umliegenden Gewebe freipräpariert und zur



Abb. 3.1: Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse

Dargestellt sind freipräparierte Schilddrüsen der behandelten TAZ10-Mäuse.

Größendokumentation fotografiert (s. Abb. 3.1). Ein Schilddrüsenlappen wurde abgetrennt, in ein Gussförmchen gelegt, dieses mit *Tissue-Tek* gefüllt und in flüssigen Stickstoff gehalten. Die Schilddrüsenlappen wurden so kryokonserviert und bei -20 °C für die histologischen Färbungen aufbewahrt (s. Abschnitt „Histologie“).

Aus der Milz, dem Knochenmark, den Lymphknoten, dem verbliebenen Schilddrüsenlappen sowie dem mit EDTA versetzten Blut wurden Einzelzellsuspensionen für die Durchflusszytometrie hergestellt (s. Abschnitt „Durchflusszytometrie“).

Thyroxin-ELISA

Zur Ermittlung der Thyroxin-Konzentration im Serum der TAZ10-Mäuse wurde ein ELISA durchgeführt. Die Seren wurden aufgetaut und zentrifugiert (1000 x g, 15 min). Zur zusätzlichen Vergleichsmöglichkeit wurde die Thyroxin-Konzentration jeweils von 3 Seren der C57BL/6- bzw. der CBA-Mäuse mitbestimmt. Der ELISA wurde mit dem *Mouse Thyroxine (FT4) ELISA Kit* von Cusabio Biotech co. nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Thyroxinkonzentration wurde durch ein Plattenphotometer von Sunrise™ mittels Messung der Wellenlängen bei 450 nm ermittelt und durch die Software Magellan dargestellt.

Histologie

Anfertigung der Schilddrüsengewebeschnitte

Aus den kryokonservierten Gewebelöcken mit dem jeweiligen Schilddrüsenlappen wurden 7 µm dicke Gewebeschnitte am Kryostaten bei -20 °C angefertigt. Es wurden jeweils 2-3

Schilddrüsengewebeschnitte nebeneinander auf einen adhäsiven Objektträger übertragen und bis zur Färbung erneut bei -20 °C gelagert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) wurden die Gewebeschnitte zur Fixierung für 10 min bei -20 °C in Aceton gestellt und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Objektträger wurden für 1-3 min in Hämatoxylin getaucht und für 20 sek mit Leitungswasser abgespült. Anschließend wurden die Objektträger für 10-15 sek in 200 ml 70%igem Ethanol mit 1 ml 37%igem HCl gestellt und die Gewebeschnitte für 5 min mit Eosin inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser gespült bis kein überschüssiges Eosin mehr vorhanden war. Die mit Hämatoxylin- und Eosin-gefärbten Schilddrüsenschnitte wurden mit dem Axioskop von Zeiss mikroskopiert, mit der Digitalkamera AxioCam fotografiert und mit dem Softwareprogramm AxioVision digitalisiert.

Immunfluoreszenzfärbung

Die indirekte Immunfluoreszenz diente als Nachweismethode für die T-Zell-Infiltration in die Schilddrüse. Dabei wird das Antigen durch den Primärantikörper und dieser durch einen gelabelten/fluoreszierenden spezie-spezifischen Sekundärantikörper gebunden. Die Fluoreszenz des Sekundärantikörpers kann anschließend mittels Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden, sodass Rückschlüsse auf das Antigen gezogen werden können.

Zur Fixierung der Gewebeschnitte auf dem Objektträger wurden diese für 10 min bei -20 °C in Aceton gestellt und bei Raumtemperatur getrocknet. Jeder Gewebeschnitt auf den adhäsiven Objektträgern wurde mit einem DakoPen umrandet. Die Gewebeschnitte wurden dreimal für 5 min mit *Tris Buffered Saline* (TBS-Puffer) und zweimal für 5 min mit TBST-Puffer (*TBS with Tween 20*) gewaschen. In 5%igem Schweineserum wurden die Gewebeschnitte für 1 h bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Dies diente dazu eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Das Schweineserum wurde nach einer Stunde dekantiert. Ein Schnitt auf dem adhäsiven Objektträger diente als Negativ-Kontrolle, die verbliebenen weiteren Schnitte als Proben. Als Positiv-Kontrollen dienten Milzschnitte aus C57BL/6- und TAZ10-Mäusen. Die CD8- bzw. CD4-Antikörper wurden mit *Antibody Diluent with Background Reducing Components* 1:100 verdünnt auf die Probeschnitte gegeben bzw. die Kontrollschnitte wurden ausschließlich mit *Antibody Diluent mit Background Reducing Components* bedeckt. Die Gewebeschnitte inkubierten über Nacht mit dem jeweiligen primären Antikörper bei 4 °C. Nach der Inkubation wurden die Schnitte fünfmal für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper,

chicken-anti rat 594, 1:750 mit *Antibody Diluent with Background Reducing Components* verdünnt, auf alle Gewebeschnitte gegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte dreimal für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Mit Hilfe von *ProLong® Gold antifade*-Reagenz wurden die Gewebeschnitte eingedeckelt und für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet. Das *ProLong® Gold antifade*-Reagenz enthält 4,6-Diamin-2-Phenylindol (DAPI), das DNA bindet und auf diese Weise Zellkerne unter blauer Fluoreszenz unter dem Mikroskop sichtbar macht. Innerhalb von einer Woche wurden die Gewebeschnitte mikroskopiert und fotografiert.

An einem computergestützten Fluoreszenzmikroskop wurden die Oberflächenmoleküle CD8 bzw. CD4 rot fluoreszierend und der Zellkern blau fluoreszierend sichtbar gemacht. CD8 bzw. CD4 positive Zellen wurden als solche definiert, wenn innerhalb der positiven CD8- bzw. CD4-Färbung ein Zellkern klar erkennbar war. Mit einer am Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Digitalkamera von Nikon wurden die positiven Zellen unter 400x Vergrößerung fotografiert und durch die Software Akt-1 digitalisiert. Die zueinander gehörigen Fotografien wurden unter Verwendung von GIMP-Shop als *Overlays* in einem Foto zur Darstellung gebracht.

Durchflusszytometrie

Herstellung von Einzelzellsuspensionen

Um die Frage zu beantworten, wie IL-18 das Immunsystem beeinflusst, wurden durchflusszytometrische Messungen verschiedener immunologischer Zellen aus verschiedenen Organen durchgeführt. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen aus der Milz, den Lymphknoten, dem Knochenmark, der Schilddrüse und dem Blut hergestellt.

Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz bzw. den Lymphknoten

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden jeweils die Milz bzw. die Lymphknoten einer Maus auf einen 70 µm-Filter gegeben, zerdrückt und mit 20 ml PBS in 50 ml Falcons gespült. Die Lösungen wurden zentrifugiert (300 x g, 5 min, 8 °C) und dekantiert. Anschließend wurden die Zellpellets der Milzen bzw. der Lymphknoten in 10 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und 7 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Lösungen erneut zentrifugiert und dekantiert. Die Zellen wurden jeweils mit PBS gewaschen und anschließend in 80 %iges FKS (Fetales Kälberserum) resuspendiert.

Der Einzelzellsuspension jeder Milz wurde jeweils die Hälfte entnommen - diese zentrifugiert, mit 500 µl RPMI 1640-Medium (Zellkulturmedium) und 500 µl 80 %iges FKS

und 20%-DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert und gemischt. Diese Milzzellen wurden bei -80 °C eingefroren.

Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem Knochenmark

Das Knochenmark wurde mittels PBS in einer 5 ml Spritze auf einer Kanüle aus den Röhrenknochen in 50 ml Falcons herausgespült. Analog zu den Milzen bzw. den Lymphknoten wurde die Lösung zentrifugiert, von den Erythrozyten befreit, mit PBS gewaschen und in 80 %iges FKS gelöst.

Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem Schilddrüsenlappen

Die Schilddrüsenlappen wurden jeweils in eine Petrischale gegeben, mit 2 ml Kollagenase versetzt und inkubierten für 10 min bei 37 °C im Brutschrank. Wie die Milzen bzw. Lymphknoten wurden die Schilddrüsenlappen jeweils mit der Spritzenrückseite auf je einem 70 µm-Filter zerdrückt und mit 20 ml PBS in 50 ml Falcons gespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet in 80 %iges FKS gelöst.

Herstellung einer Einzelzellsuspension aus dem EDTA-Blut

Das EDTA-Blut wurde jeweils mit 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer versetzt, inkubiert für 5-10 min bei Raumtemperatur und wurde über einen Präseparationsfilter in ein 50 ml Falcon überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 80 %iges FKS gelöst.

Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie und deren Messung

Die Zellen aller fünf Organe wurden jeweils nach zwei verschiedenen Schemata für die durchflusszytometrische Messung mit Antikörpern gefärbt wie in Tabelle 3.12 und Tabelle 3.13 dargestellt. Die Zellen aus den Lymphknoten wurden aufgrund der zu erwartenden niedrigen Zellzahl ausschließlich nach dem Schema der Tabelle 3.12 gefärbt. Es wurden Antikörper mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen verwendet: FITC (Fluoresceinisothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein) und APC (Allophycocyanin). Jeder Fluoreszenzfarbstoff hat ein bestimmtes Absorptions- und Emissionsspektrum, das durchflusszytometrisch gemessen wird. Die Kopplung des Farbstoffs an den Antikörper und die Bindung des Antikörpers an das Molekül ermöglicht die indirekte Darstellung von Molekülen verschiedener Zellen.

Die in 80 %iges FKS gelösten Zellen aus Milz, Knochenmark, Lymphknoten, Schilddrüse und Blut wurden zur Färbung extrazellulärer Oberflächenmoleküle mit 1 µg Antikörper / 1×10^6 Zellen (Antikörper mit weißem Hintergrund in Tabelle 3.12 und Tabelle 3.13) versetzt

Tabelle 3.12: Verwendete Antikörper gegen extrazelluläre Oberflächenmoleküle

Kontrollen	FITC	PE	PerCP	APC
Kontrolle 1	CD45	ham IgG3	rat IgG2b	rat IgG2a
Kontrolle 2	rat IgG2a	CD45		ham IgG1
Kontrolle 3	rat IgG2b	rat IgG1	CD45	ms IgG2a
Kontrolle 4	ham IgG2	rat IgG2a		CD45

Proben	FITC	PE	PerCP	APC
T-Zellen	CD4	TCR- β (human)	CD45	CD8
Aktivierte CTL	CD107a	CD40L	CD45	CD8
NK-Zellen	c-Kit	PD-1L	CD45	NK1.1
Dendritische Zellen	CD80	CD86	CD45	CD11c

Die Tabelle stellt die Markierung extrazellulärer Oberflächenmoleküle verschiedener Zellreihen durch Antikörper dar.

Abkürzungen: FITC - Fluorescein-Isothiocyanat, PE - Phycoerythrin, PerCP - Peridinin Chlorophyll Protein und APC - Allophycocyanin, CD - *Cluster of Differentiation*, ham - Hamster, rat - Ratte, ms - Maus, IgG - Immunglobulin G, TCR - T-Zell-Rezeptor, CTL - zytotoxische T-Zellen, CD40L - CD40-Ligand = CD154, NK-Zellen - Natürliche Killerzellen, c-Kit = CD117, PD-1L - *programmed death-1*-Ligand = CD274

Tabelle 3.13: Verwendete Antikörper gegen extrazelluläre Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine

Kontrollen	FITC	PE	PerCP	APC
Kontrolle 1	CD45	rat IgG2a	rat IgG2b	CD45
Kontrolle 2	rat IgG1	CD45	rat IgG1	rat IgG2a
Kontrolle 3	rat IgG2a		CD45	rat IgG2b

Proben	FITC	PE	PerCP	APC
T-Zellen	IFN- γ	CD8	CD45	IL-2
T _H 17-Zellen		CD4	CD45	IL-17
T _{reg} -Zellen	FoxP3	CD8	CD25	CD45
T _{reg} -Zellen	FoxP3	CD4	CD25	CD45

Die Tabelle stellt die Markierung extrazellulärer Oberflächenmoleküle und intrazellulärer Proteine (grauer Hintergrund) verschiedener T-Zellen durch Antikörper dar.

Abkürzungen: FITC - Fluorescein-Isothiocyanat, PE - Phycoerythrin, PerCP - Peridinin Chlorophyll Protein und APC - Allophycocyanin, CD - *Cluster of Differentiation*, rat - Ratte, IgG - Immunglobulin G, IFN - Interferon, IL - Interleukin, FoxP3 - *forkhead box P3*, T_H17-Zellen - T-Helferzellen, die Interleukin-17 produzieren, T_{reg}-Zellen - regulatorische T-Zellen; Anmerkung: Der Antikörper CD25 war mit dem Tandemkonjugat PerCP-Cy5.5 gekoppelt genauso wie seine Isotyp-Kontrolle rat IgG1

und gemischt. Für die Kontrollen wurden die Zellen aus der Milz genutzt. Die Einzelzellsuspensionen mit den Antikörpern inkubierten für 15-20 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen, die nach dem Schema der Tabelle 3.13 zusätzlich mit Antikörpern gefärbt wurden, die an intrazelluläre Moleküle binden, wurden

nach der Dekantierung mit 100 µl Cytofix/Cytoperm versetzt und inkubierten für 20 min auf Eis. 2 ml PermWash, 1:10 mit Aqua Dest verdünnt, wurden nach der Inkubation hinzugegeben. Die Zellsuspensionen wurden zentrifugiert und dekantiert. Anschließend wurden 1 µg Antikörper / 1x10⁶ Zellen zur Bindung an intrazelluläre Moleküle nach dem Schema der Tabelle 3.13 (grau hinterlegt) zu den Zellen pipettiert. Die Zellen inkubierten 15-20 min auf Eis. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Jedes Zellpellet wurde zur Messung in PBS resuspendiert. Die Größe und Granularität der Zellen sowie die Absorptions- und Emissionsspektren der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit dem FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt und ausgewertet wurden die Messungen mit dem Software-Programm CellQuestPro. Zur Festlegung der *Gates* und der Grenzen der Populationen/Subpopulationen in einem *Dot Plot* wurden die Kontrollmessungen herangezogen.

Färbung von Fas und Fas-Ligand auf den Immunzellen

Die bei -80 °C eingefrorenen Einzelzellsuspensionen der Milzzellen (s. Abschnitt „Herstellung von Einzelzellsuspensionen“) wurden unter lauwarmem Wasser aufgetaut, mit 5 ml PBS versetzt, zentrifugiert (300 x g, 5 min, 8 °C), dekantiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 300 µl FKS resuspendiert. Die Zellen wurden wie in dem

Tabelle 3.14: Antikörper-Schema - Expression von Fas und Fas-Ligand auf Immunzellen

Kontrollen	FITC	PE	PerCP	APC
Kontrolle 1	CD45	ms IgG1	rat IgG2b	rat IgG2a
Kontrolle 2	rat IgG2a	ham IgG1		ham IgG1
Kontrolle 3	rat IgG2b		CD45	ms IgG2a
Kontrolle 4	ham IgG2			CD45
Proben	FITC	PE	PerCP	APC
T-Zellen	CD4	Fas	CD45	CD8
	CD4	FasL	CD45	CD8
NK-Zellen	c-Kit	Fas	CD45	NK1.1
	c-Kit	FasL	CD45	NK1.1
Dendritische Zellen	CD80	Fas	CD45	CD11c
	CD80	FasL	CD45	CD11c

Die Tabelle stellt die Markierung extrazellulärer Oberflächenmoleküle verschiedener Zellreihen durch Antikörper dar.

Abkürzungen: FITC - Fluorescein-Isothiocyanat, PE - Phycoerythrin, PerCP - Peridinin Chlorophyll Protein und APC - Allophycocyanin, CD - *Cluster of Differentiation*, ham - Hamster, rat - Ratte, ms - Maus, IgG - Immunglobulin G, Fas=CD95, FasL - Fas-Ligand=CD178, NK-Zellen - Natürliche Killerzellen, c-Kit=CD117

Abschnitt „Färbung der Zellen für die Durchflusszytometrie und deren Messung“ nach dem Schema der Tabelle 3.14 gefärbt und am Durchflusszytometer deren Größe, Granularität sowie die Fluoreszenzen der gebundenen Antikörper gemessen.

Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Softwareprogramm „SPSS“ Version 22. Nach Kolmogorov-Smirnov normalverteilte Daten wurden mit Hilfe eines ein- oder mehrfaktoriellen ANOVA (Varianzanalyse) ausgewertet. Post hoc-Analysen wurden nach Bonferroni mit einem korrigierten α -Fehler-Niveau von 0,05 durchgeführt. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden als signifikant erachtet, wenn der p-Wert $p < 0,05$ (*), $p < 0,005$ (**) bzw. $p < 0,0005$ (***) war. Lagen nach Levene keine varianzhomogenen Daten vor, wurde die Signifikanzschranke auf $p < 0,01$ (♦), $p < 0,001$ (♦♦) bzw. $p < 0,0001$ (♦♦♦) gesenkt. Bei nicht normalverteilter Datenlage nach Kolmogorov-Smirnov wurden nichtparametrische Tests durchgeführt. Der H-Test nach Kruskal und Wallis fand Anwendung bei mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Bei vorliegender Signifikanz wurden Mann-Whitney-U-Tests als Post-Hoc-Analysen durchgeführt. Die Signifikanzschranke wurde ermittelt, indem das α -Niveau=0,05 durch die Anzahl der durchgeführten Mann-Whitney-U-Tests geteilt wurde (Bonferroni-Korrektur). Resultate, die kleiner als die ermittelte Signifikanzschranke waren, wurden als signifikant erachtet (◇). Bestanden genau zwei unabhängige Stichproben bei nicht normalverteilter Datenlage wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt mit einer Signifikanzschranke von $p < 0,05$ (◇), $p < 0,005$ (◇◇) und $p < 0,0005$ (◇◇◇). Die graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad PRISM 3.

4 Ergebnisse

4.1 Verlauf der Autoimmunthyreoiditis bei TAZ10-Mäusen unter der Behandlung mit Interleukin-18

Jeweils zwei Gruppen TAZ10-Mäuse wurden mit NaCl bzw. mit 100 ng IL-18 / 20 g KG bzw. mit 1 µg IL-18 / 20 g KG gespritzt. Die Gabe erfolgte intraperitoneal, zweimal wöchentlich, ab der vierten Lebenswoche und für eine Zeitspanne von 16 bzw. 26 Wochen. Es gab insgesamt 6 Mausgruppen: NaCl 16 Wochen lang, 100 ng IL-18 / 20 g KG 16 Wochen lang, 1 µg IL-18 / 20 g KG 16 Wochen lang, NaCl 26 Wochen lang, 100 ng IL-18 / 20 g KG 26 Wochen lang, 1 µg IL-18 / 20 g KG 26 Wochen lang. Aufschluss über die AIT konnte gewonnen werden durch:

- Messung von Thyroxin im Serum (ELISA)
- Erfassung der Schilddrüsengrößen
- Histologische Färbungen der Schilddrüsen
- Gewicht der Mäuse
- Veränderungen von Immunzellen (Durchflusszytometrie)

4.1.1 Thyroxin-Konzentrationen in den Seren der TAZ10-Mäuse

Mit Hilfe eines ELISA wurden die Thyroxin-Konzentrationen in den Seren bestimmt. Die Behandlung mit IL-18 führt tendenziell zu einer höheren Thyroxin-Konzentration im Serum bezogen auf die 20 Wochen alten Tiere.

Die durchschnittliche Konzentration von Thyroxin im Serum betrug bei C57BL/6-Mäusen 10,41 pmol \pm 4,09 pmol (Mittelwert \pm Standardabweichung), bei CBA-Mäusen 9,30 pmol \pm 1,76 pmol, bei 20 Wochen alten TAZ10-Mäusen 6,57 pmol \pm 1,75 pmol und bei 30 Wochen alten TAZ10-Mäusen 9,43 pmol \pm 2,43 pmol. Die mehrfaktorielle Varianzanalyse, $F(1,48)=20,20$, ist mit $p=0,00004$ signifikant. Die Kontrollmäuse C57BL/6 beinhalten signifikant (MWD=3,84, $p=0,04$ (Mittelwertdifferenz, p -Wert)) und die CBA-Mäuse tendenziell (MWD=2,73, $p=0,28$) mehr Thyroxin im Serum als die 20 Wochen alten TAZ10-Mäuse. Die 30 Wochen alten TAZ10-Mäuse beinhalten signifikant (MWD=2,85, $p=0,0002$) mehr Thyroxin im Serum als die 20 Wochen alten TAZ10-Mäuse. Zwischen den 30 Wochen alten TAZ10-Mäusen und den C57BL/6-Mäusen sowie den CBA-Mäusen bestehen keine signifikanten Unterschiede. Nach dem Thyroxin-ELISA zu urteilen ist die Funktionalität der AIT bei den 20 Wochen alten TAZ10-Mäusen gegeben (s. Abb. 4.1 A).

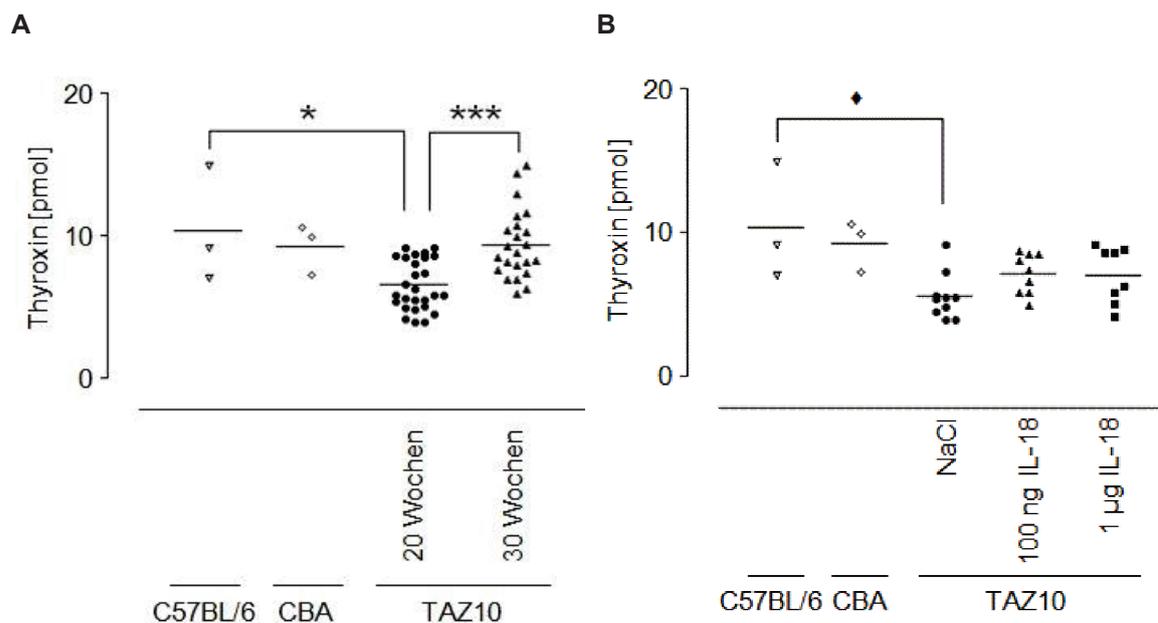


Abb. 4.1: Thyroxin-Konzentrationen in den Seren der TAZ10-Mäuse

Mittels ELISA wurden die Thyroxin-Konzentrationen in den Seren der Mäuse gemessen. Die C57BL/6- sowie die CBA-Mäuse dienen als Kontrollen genauso wie die mit NaCl behandelten TAZ10-Mäuse im Vergleich mit den mit Interleukin-18 (IL-18) behandelten TAZ10-Mäusen. Die 20 Wochen alten TAZ10-Mäuse haben signifikant weniger Thyroxin im Serum als die C57BL/6-Mäuse mit $p=0,04$ (*), tendenziell weniger als die CBA-Mäuse ($p=0,28$) und signifikant weniger als die 30 Wochen alten TAZ10-Mäuse mit $p=0,0002$ (***) (A). Das spricht für die Funktionalität der Autoimmunthyreoiditis im TAZ10-Mausmodell bei den 20 Wochen alten TAZ10-Mäusen. Zwischen den 30 Wochen alten TAZ10-Mäusen und den C57BL/6-Mäusen ($p=1,00$) bzw. den CBA-Mäusen ($p=1,00$) bestehen keine signifikanten Unterschiede. Aufgründdessen bezieht sich die weitere Differenzierung bezüglich der NaCl- vs IL-18-Behandlung ausschließlich auf die 20 Wochen alten Mäuse (B). Die 20 Wochen alten mit NaCl behandelten TAZ10-Mäuse haben signifikant weniger Thyroxin im Serum als die C57BL/6-Mäuse mit $p=0,007$ (*) und tendenziell weniger als die CBA-Mäuse ($p=0,07$). Signifikante Unterschiede zwischen den mit NaCl behandelten Kontroll-TAZ10-Mäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG ($p=0,87$) bzw. den mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten TAZ10-Mäusen ($p=1,00$) bestehen nicht. Die mit IL-18 behandelten Mäuse besitzen tendenziell mehr Thyroxin im Serum als die Kontroll-TAZ10-Mäuse. Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied ($p=1,00$).

Eine getrennte statistische Analyse der 20 Wochen alten Mäuse wurde mittels einfaktoriellem ANOVA durchgeführt. IL-18 verbessert nicht signifikant (aber tendenziell) die AIT der 20 Wochen alten TAZ10-Mäuse. Das Thyroxin im Serum betrug im Durchschnitt bei C57BL/6-Mäusen $10,41 \text{ pmol} \pm 4,09 \text{ pmol}$, bei CBA-Mäusen $9,30 \text{ pmol} \pm 1,76 \text{ pmol}$, bei mit NaCl behandelten TAZ10-Mäusen $5,61 \text{ pmol} \pm 1,58 \text{ pmol}$, bei mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten TAZ10-Mäusen $7,18 \text{ pmol} \pm 1,38 \text{ pmol}$ und bei mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten TAZ10-Mäusen $7,09 \text{ pmol} \pm 1,96 \text{ pmol}$. Aufgrund fehlender Varianzhomogenität wurde die Signifikanzschranke auf $p<0,01$ gesenkt. Die einfaktorielle Varianzanalyse, $F(4,28)=4,67$, ist mit $p=0,005$ signifikant. Die C57BL/6-Mäuse besitzen signifikant (MWD=4,81, $p=0,007$) und die CBA-Mäuse tendenziell (MWD=3,69, $p=0,07$) mehr Thyroxin im Serum als die Kontroll-TAZ-Mäuse. Es besteht kein signifikanter Unterschied

zwischen den C57BL/6-, den CBA- bzw. den Kontroll-TAZ10-Mäusen und den mit IL-18 behandelten Mäusen bzw. zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen (s. Abb. 4.1 B).

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die 20 Wochen alten TAZ10-Mäuse, bei denen die Funktionalität der AIT in Bezug auf die Thyroxin-Konzentration im Serum nachgewiesen werden konnte.

4.1.2 Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse

Schilddrüsengröße der TAZ10-Mäuse

Die relative Schilddrüsengröße (Schilddrüsengröße pro Körpergewicht der Maus) verändert sich nicht unter der Behandlung mit IL-18 bei 20 Wochen alten TAZ10-Mäusen ($F(2,24)=0,59$, $p=0,56$) (s. Abb. 4.2). Die durchschnittliche relative Schilddrüsengröße der TAZ10-Mäuse betrug unter NaCl $0,21 \text{ mm}^2/\text{g} \pm 0,03 \text{ mm}^2/\text{g}$, unter der Gabe von $100 \text{ ng IL-18} / 20 \text{ g KG}$ $0,21 \text{ mm}^2/\text{g} \pm 0,03 \text{ mm}^2/\text{g}$ und unter der Gabe von $1 \mu\text{g IL-18} / 20 \text{ g KG}$ $0,24 \text{ mm}^2/\text{g} \pm 0,09 \text{ mm}^2/\text{g}$.

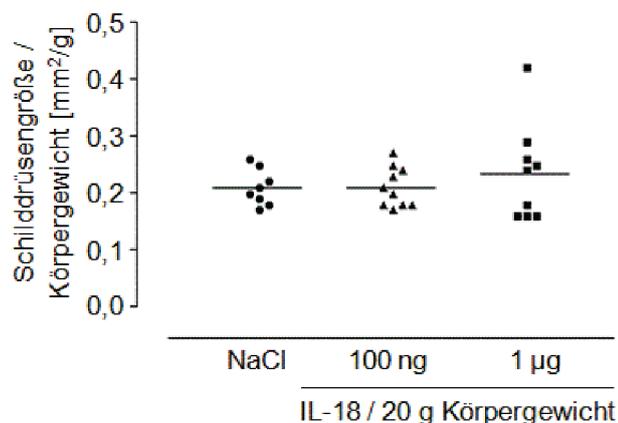


Abb. 4.2: Relative Schilddrüsengröße der TAZ10-Mäuse

Die relative Schilddrüsengröße (Schilddrüsengröße pro Körpergewicht der Maus) verändert sich nicht unter der Behandlung mit Interleukin-18 (IL-18) ($p=0,56$).

Struktur des Schilddrüsenorgans der TAZ10-Mäuse

Das Schilddrüsenorgan ist in allen TAZ10-Mäusen unabhängig von der Behandlung zerstört (s. Abb. 4.3). HE-Färbungen wurden zur Beurteilung der Struktur des Schilddrüsenorgans angefertigt. Die Schilddrüsenfollikel sind unterschiedlich groß, hängen teilweise nicht im Verbund zusammen und enthalten zum Teil kein Kolloid.

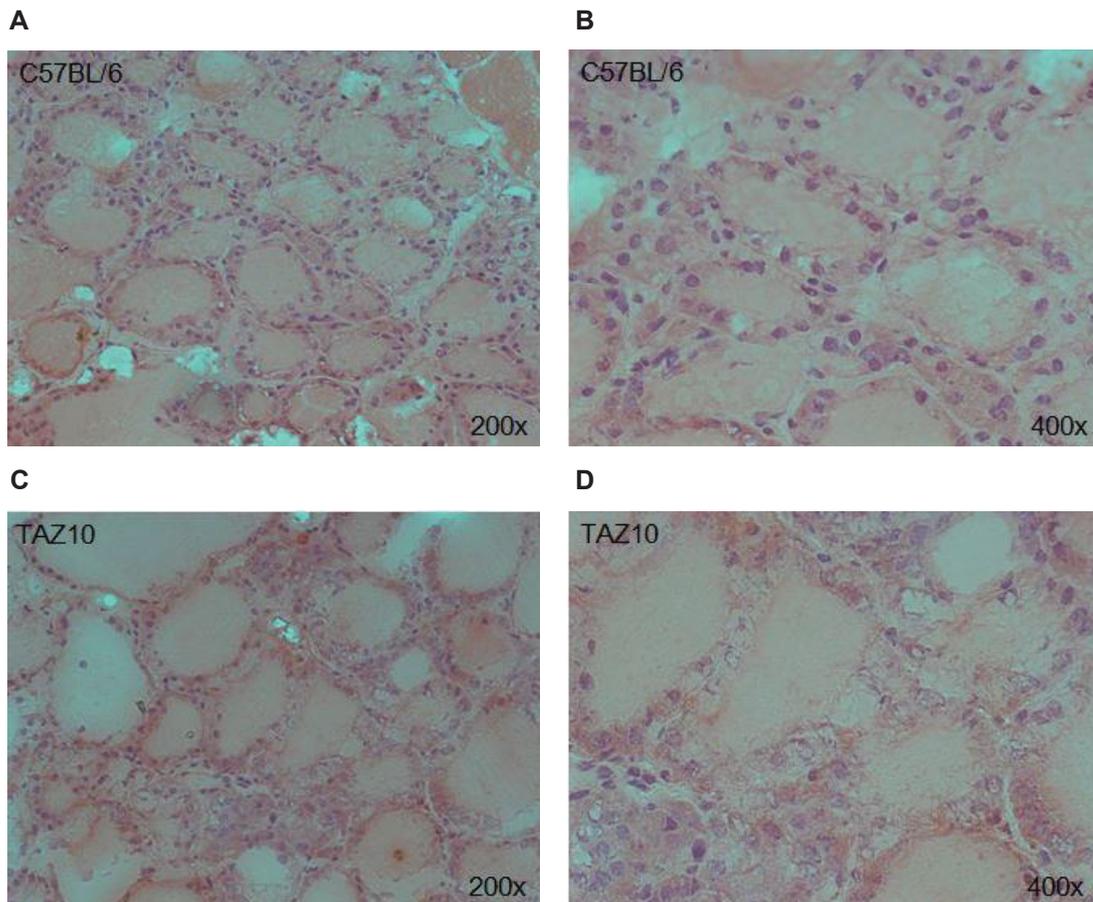


Abb. 4.3: Schilddrüsengewebe der TAZ10-Mäuse

Schilddrüsenschnitte der C57BL/6-Mäuse (A: Vergrößerung 200x; B: Vergrößerung 400x) und der TAZ10-Mäuse (C: Vergrößerung 200x; D: Vergrößerung 400x) wurden mit Hämatoxylin und Eosin (HE) gefärbt. Das Schilddrüsengewebe aller TAZ10-Mäuse ist zerstört unabhängig von der Behandlung mit NaCl oder Interleukin-18 (IL-18). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen.

Infiltration von T-Zellen in das Schilddrüsengewebe der TAZ10-Mäuse unter der Behandlung mit Interleukin-18

T-Zellen konnten im Schilddrüsengewebe der TAZ10-Mäuse nachgewiesen werden (s. Abb. 4.4). Die Anzahl der CTL ($X^2=0,75$, $p=0,69$) und der T-Helferzellen ($X^2=1,48$, $p=0,48$) in den Schilddrüsen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit NaCl und den mit IL-18 behandelten Mäusen.

Die durchschnittliche Anzahl CD8 positiver Zellen in zwei Schilddrüsenschnitten betrug unter NaCl $0,1 \pm 0,3$ Zellen, unter 100 ng IL-18 / 20 g KG $0,2 \pm 0,4$ Zellen und unter 1 μ g IL-18 / 20 g KG $1,1 \pm 2,7$ Zellen. In einem Schilddrüsenschnitt betrug die durchschnittliche Anzahl CD4 positiver Zellen unter der Gabe von NaCl $0,5 \pm 0,9$ Zellen, unter 100 ng IL-18 / 20 g KG $0,3 \pm 1,0$ Zellen und unter 1 μ g IL-18 / 20 g KG $0,9 \pm 1,5$ Zellen.

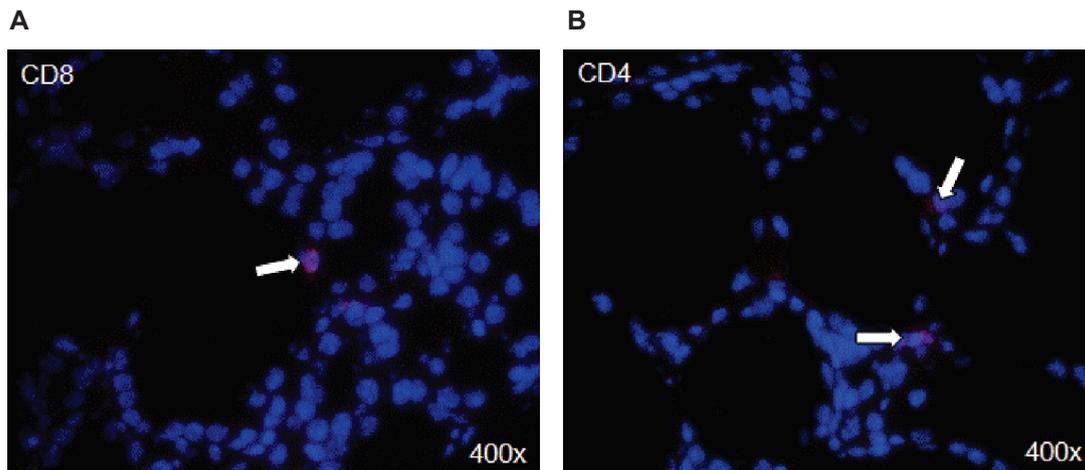


Abb. 4.4: T-Zellen in den Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse

Die Zellkerne sind mit 4,6-Diamidin-2-Phenylindol (DAPI), die Oberflächenmoleküle CD8 bzw. CD4 mit dem jeweiligen Primärantikörper (rat CD8/CD4) sowie dem entsprechenden Sekundärantikörper (chicken anti rat 594) gefärbt. An einem computergestützten Fluoreszenzmikroskop wurden die Oberflächenmoleküle CD8 bzw. CD4 rot fluoreszierend und der Zellkern blau fluoreszierend sichtbar gemacht. CD8 bzw. CD4 positive Zellen wurden als solche definiert, wenn innerhalb der positiven CD8- bzw. CD4-Färbung ein Zellkern klar erkennbar war. Mit einer am Fluoreszenzmikroskop angeschlossenen Digitalkamera wurden die positiven Zellen unter 400x Vergrößerung fotografiert, durch die Software Akt-1 digitalisiert und unter Verwendung von GIMP-Shop als *Overlays* in einem Foto zur Darstellung gebracht. Zytotoxische T-Zellen (A) und T-Helferzellen (B) konnten in der Schilddrüse bei den Kontrolltieren sowie den mit Interleukin-18 (IL-18) therapierten Tieren nachgewiesen werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollmäusen und den mit IL-18 behandelten Mäusen gab es nicht.

4.1.3 Gewichtsentwicklung der TAZ10-Mäuse

Das Körpergewicht der 20 Wochen alten TAZ10-Mäuse bleibt konstant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.5). Das durchschnittliche Körpergewicht der Mäuse betrug unter NaCl

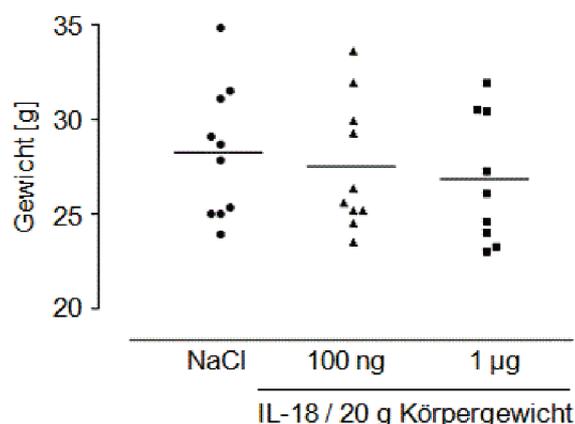


Abb. 4.5: Gewichtsentwicklung der TAZ10-Mäuse

Das Gewicht der Mäuse bleibt konstant unter der Behandlung mit Interleukin-18 (IL-18) im Vergleich mit den Kontrollmäusen ($p=0,67$). Eine tendenzielle Gewichtsreduktion unter der Therapie mit IL-18 konnte beobachtet werden.

28,27 g \pm 3,52 g, unter der Gabe von 100 ng IL-18 / 20 g KG 27,55 g \pm 3,43 g und unter der Gabe von 1 μ g IL-18 / 20 g KG 26,84 g \pm 3,42 g. In der einfaktoriellen Varianzanalyse zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, $F(2,26)=0,41$, $p=0,67$.

4.1.4 Veränderungen von T-Zellen der TAZ10-Mäuse

Thyreoperoxidase-spezifische zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse

Als TPO-spezifische CTL wurden lebende/CD45⁺/CD8⁺/humane TCR- β ⁺ Zellen definiert. Als Frequenz TPO-spezifischer CTL wurde der Anteil der CD8 und TCR- β positiven Zellen an CD45 positiven Zellen bezeichnet.

Die Frequenz TPO-spezifischer CTL in der Milz verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $X^2(2)=7,47$, $p=0,02$. Das nach Bonferroni korrigierte Signifikanzniveau bei den folgenden Mann-Whitney-U-Tests liegt bei $p<0,017$. Die mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG behandelte Gruppe (8,5% \pm 2,2%) hat signifikant weniger TPO-spezifische CTL als die Kontrollgruppe (16,7% \pm 7,4%), $U=10,00$, $z=-2,86$, $p=0,004$. Zwischen den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen (15,6% \pm 8,1%) und den Kontrollmäusen sowie zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Tieren besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.6 A).

Die Anzahl der TPO-spezifischen CTL in der Milz (NaCl: 869,2 \pm 278,8; 100 ng IL-18 / 20 g KG: 768,4 \pm 376,7; 1 μ g IL-18 / 20 g KG: 493,6 \pm 107,4) verändert sich nicht signifikant, $F(2,26)=4,44$, $p=0,02$. Die Signifikanzschranke wurde aufgrund fehlender Varianzhomogenität auf $p<0,01$ gesenkt. Eine Tendenz zur Signifikanz liegt vor. Die mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben tendenziell weniger TPO-spezifische CTL als die Kontrollmäuse (s. Abb. 4.6 B).

Die TPO-spezifischen CTL im Knochenmark nehmen unter der Behandlung mit IL-18 weder signifikant zu noch ab (s. Abb. 4.6 C und D) genauso wenig wie die TPO-spezifischen CTL im Blut (s. Abb. 4.6 E und F).

Aktivierete zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse

Lebende/CD45⁺/CD8⁺/CD107a⁺ Zellen wurden als aktivierete CTL beschrieben. Der Anteil der CD8 und CD107a positiven Zellen an den CD45 positiven Zellen wurde als die Frequenz der aktivierten CTL bezeichnet.

Die Frequenz aktivierter CTL verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,26)=5,33$, $p=0,01$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse (3,1% \pm 1,6%) haben eine tendenziell (MWD=1,55, $p=0,16$) und die mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG therapierten

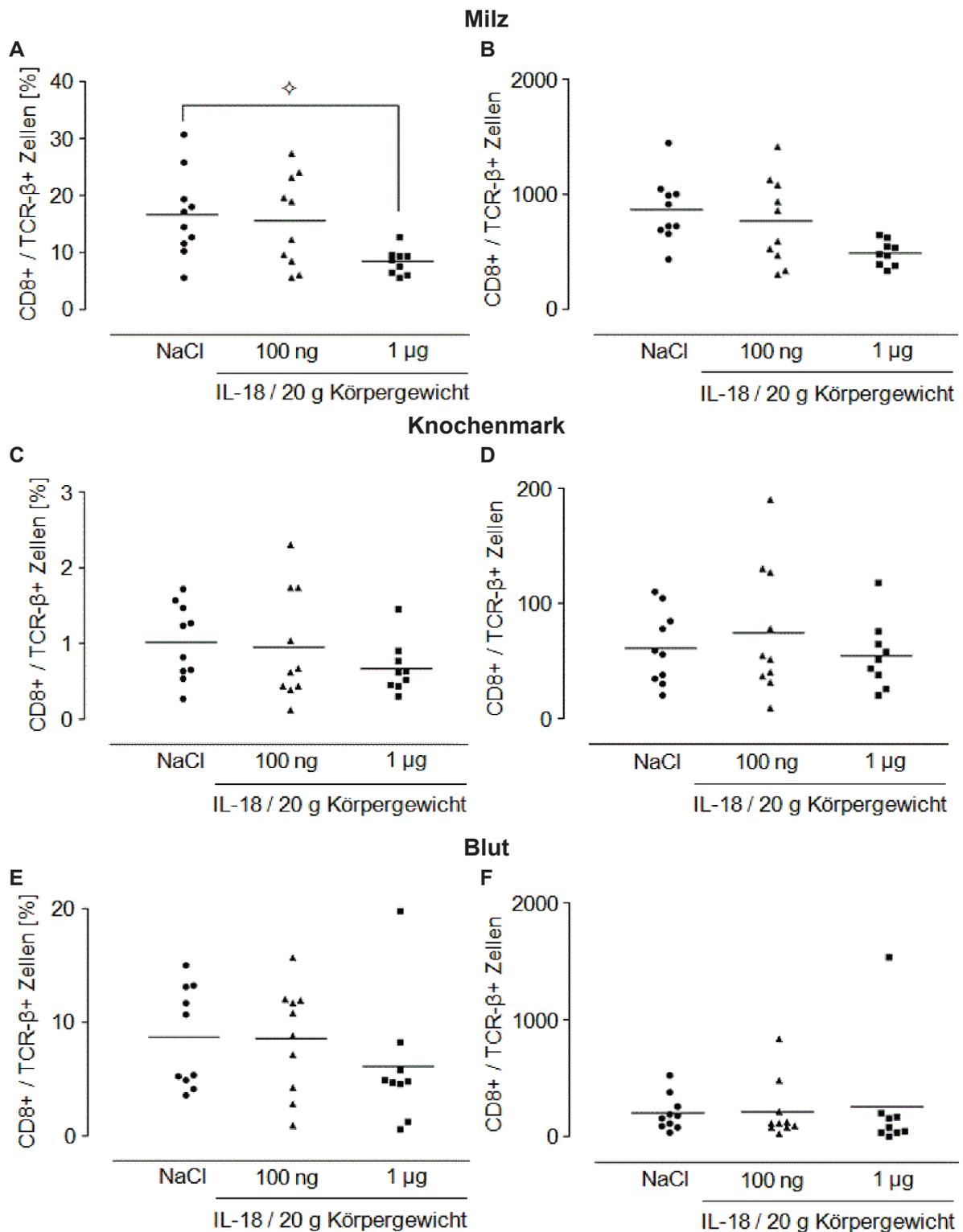


Abb. 4.6: Thyreoperoxidase-spezifische zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse

Die mit 1 μg Interleukin-18 (IL-18) / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäuse besitzen eine niedrigere Frequenz Thyreoperoxidase-(TPO)-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTL) in der Milz als die Kontrollmäuse mit $p=0,004$ (\diamond) (A). Zwischen den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen und den Kontrolltieren ($p=0,82$) bzw. den mit 1 μg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäusen ($p=0,07$) besteht kein signifikanter Unterschied. Die gleichen tendenziellen Veränderungen zeigen sich in Bezug auf die Anzahl der TPO-spezifischen CTL in der Milz ($p=0,02$, Signifikanzschränke $p<0,01$) (B). In Knochenmark (Frequenz TPO-spezifischer CTL: $p=0,37$ (C); Anzahl TPO-spezifischer CTL: $p=0,85$ (D)) und im Blut (Frequenz TPO-spezifischer CTL: $p=0,34$ (E); Anzahl TPO-spezifischer CTL: $p=0,50$ (F)) zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Tiere ($2,2\% \pm 1,3\%$) eine signifikant (MWD=2,53, $p=0,01$) niedrigere Frequenz aktivierter CTL als die Kontrollmäuse ($4,7\% \pm 2,1\%$). Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen therapierten Mausgruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.7 A).

Die Anzahl der aktivierten CTL in der Milz verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,26)=8,48$, $p=0,001$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse (MWD=92,70, $p=0,01$) haben mit $150,6 \pm 67,8$ aktivierten CTL und die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG therapierten (MWD=120,41, $p=0,002$) mit $122,9 \pm 60,7$ aktivierten CTL eine signifikant niedrigere Anzahl aktivierter CTL als die Kontrollmäuse ($243,3 \pm 72,5$). Ein signifikanter Unterschied zwischen den mit verschiedenen IL-18-Konzentrationen therapierten Gruppen besteht nicht (s. Abb. 4.7 B).

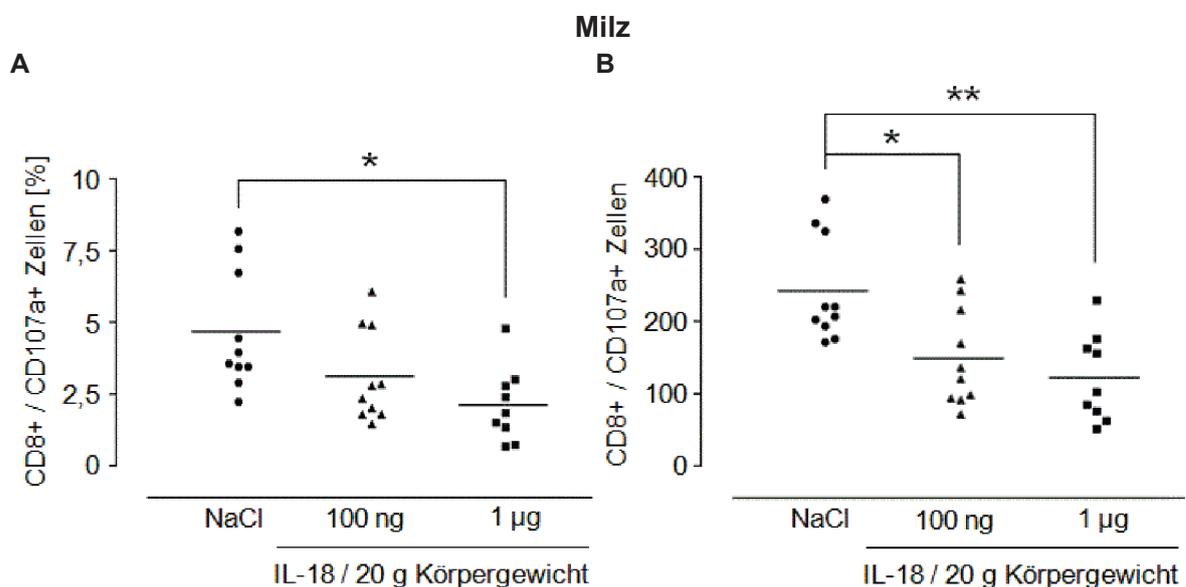


Abb. 4.7: Aktivierte zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse

Die Frequenz aktivierter zytotoxischer T-Zellen (CTL) in der Milz nimmt ab mit zunehmender Interleukin-18-(IL-18-)Konzentration. Bei den mit 1 μg IL-18 / 20 g Körpergewicht (KG) therapierten Mäusen im Vergleich mit Kontrollmäusen ist die Frequenz der aktivierten CTL signifikant niedriger mit $p=0,01$ (*). Zwischen den Kontrollmäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen besteht ein tendenzieller Unterschied ($p=0,16$) (A). Bei Betrachtung der Anzahl der aktivierten CTL haben sowohl die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse mit $p=0,01$ (*) als auch die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse mit $p=0,002$ (**) signifikant weniger aktivierte CTL in der Milz (B). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen (Frequenz: $p=0,67$; Anzahl: $p=1,00$).

Interferon- γ enthaltende zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse

Als IFN- γ enthaltende CTL wurden lebende/CD45⁺/CD8⁺/IFN- γ ⁺ positive Zellen definiert. Der Anteil CD8 und IFN- γ positiver Zellen an CD45 positiven Zellen wurde als Frequenz IFN- γ enthaltender CTL bezeichnet.

Die Frequenz der IFN- γ enthaltenden CTL in der Milz sinkt tendenziell mit zunehmender

IL-18-Konzentration (s. Abb. 4.8 A). Ein signifikanter Unterschied liegt nicht vor ($X^2=2,86$, $p=0,24$). Die Anzahl der CTL in der Milz, die IFN- γ enthalten, sinkt ebenfalls tendenziell ($X^2(2)=4,88$, $p=0,09$) unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.8 B).

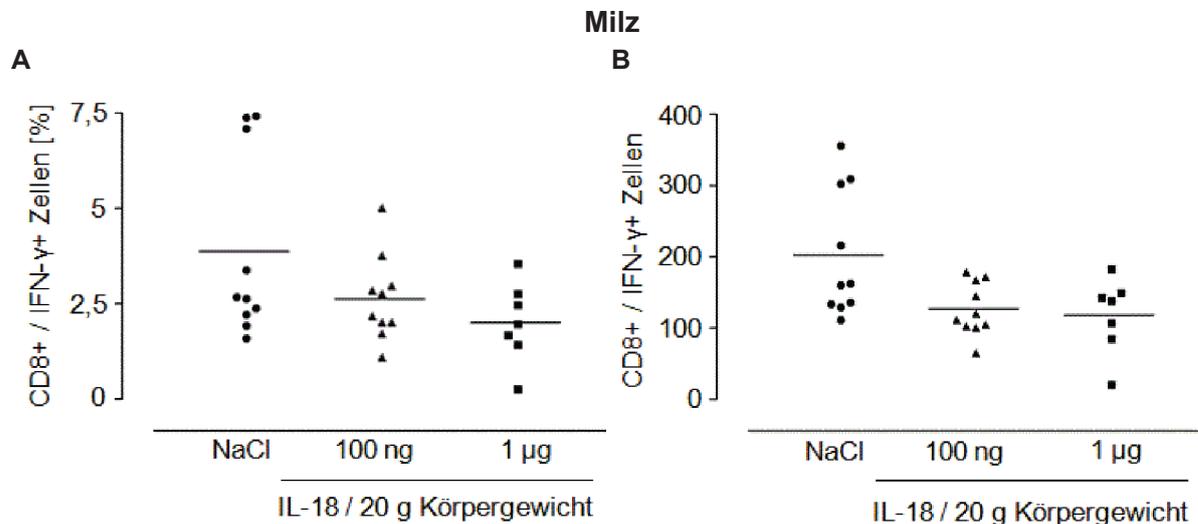


Abb. 4.8: Interferon- γ enthaltende zytotoxische T-Zellen der TAZ10-Mäuse

Frequenz (A) und Anzahl (B) Interferon- γ (IFN- γ) enthaltender zytotoxischer T-Zellen (CTL) in der Milz nehmen von den Kontrollmäusen über die mit 100 ng Interleukin-18 (IL-18) zu den mit 1 μ g IL-18 / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäusen hin tendenziell ab (Frequenz: $p=0,24$; Anzahl: $p=0,09$).

Thyreoperoxidase-spezifische T-Helferzellen der TAZ10-Mäuse

Als TPO-spezifische T-Helferzellen wurden lebende/CD45⁺/CD4⁺/humane TCR- β ⁺ Zellen definiert. Der Anteil der CD4 und TCR- β positiven Zellen an CD45 positiven Zellen wurde als die Frequenz TPO-spezifischer T-Helferzellen benannt.

Die Frequenz der TPO-spezifischen T-Helferzellen in der Milz (NaCl: 16,0% \pm 5,8%; 100 ng IL-18 / 20 g KG: 17,0% \pm 3,4%; 1 μ g IL-18 / 20 g KG: 10,7% \pm 7,4%) verändert sich knapp nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,24)=3,30$, $p=0,054$. Eine tendenzielle Erniedrigung der Frequenz der TPO-spezifischen T-Helferzellen bei den mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen im Vergleich mit den Kontrollmäusen liegt vor (s. Abb. 4.9 A).

Die Anzahl der TPO-spezifischen T-Helferzellen bei den verschiedenen Mausgruppen (NaCl: 845,0 \pm 171,6; 100 ng IL-18 / 20 g KG: 846,5 \pm 107,0; 1 μ g IL-18 / 20 g KG: 591,0 \pm 359,9) in der Milz verändert sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,24)=3,48$, $p=0,047$. Aufgrund fehlender Varianzhomogenität wurde die Signifikanzschranke auf $p<0,01$ herabgesetzt. Die mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben tendenziell weniger TPO-spezifische T-Helferzellen in der Milz als die Kontrollmäuse (s. Abb. 4.9 B).

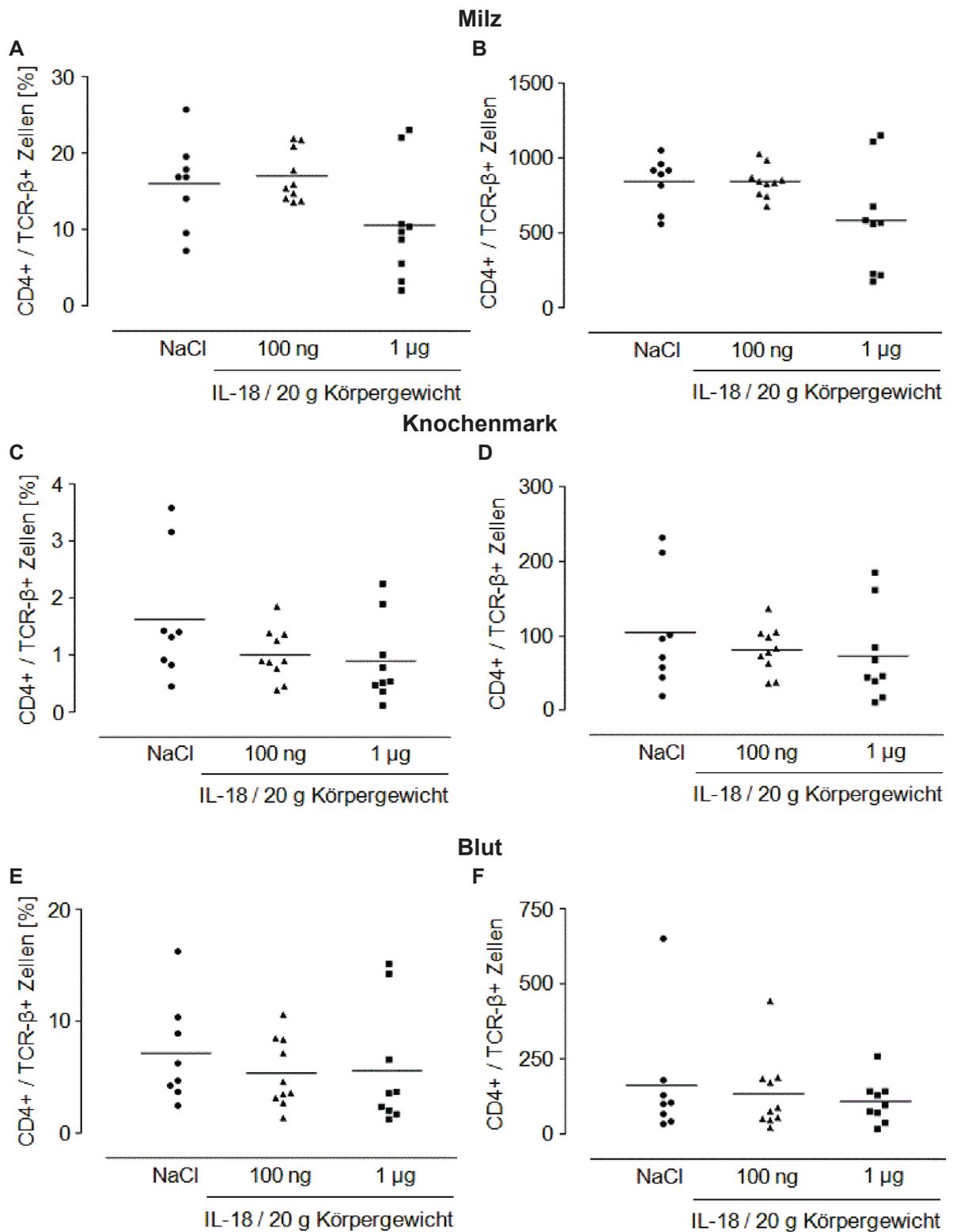


Abb. 4.9: Thyreoperoxidase-spezifische T-Helferzellen der TAZ10-Mäuse

Die mit 1 μg Interleukin-18 (IL-18) / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäuse besitzen tendenziell weniger Thyreoperoxidase-(TPO)-spezifische T-Helferzellen als die Kontrollmäuse in der Milz. Die Frequenz der TPO-spezifischen T-Helferzellen verändert sich tendenziell mit $p=0,054$ (A) und die Anzahl mit $p=0,047$ (B). In Knochenmark (Frequenz: $p=0,17$ (C); Anzahl: $p=0,51$ (D)) und Blut (Frequenz: $p=0,36$ (E); Anzahl: $p=0,98$ (F)) gibt es keine signifikanten Unterschiede.

Die TPO-spezifischen T-Helferzellen in Knochenmark und Blut verändern sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.9 C, D, E und F).

4.1.5 Veränderungen von Natürlichen Killerzellen der TAZ10-Mäuse

Natürliche Killerzellen der TAZ10-Mäuse

Als NK-Zellen wurden lebende/CD45⁺/NK1.1⁺ Zellen definiert. Als Frequenz der NK-Zellen wurde der Anteil der NK1.1 positiven Zellen an den CD45 positiven Zellen bezeichnet.

Die Frequenz der NK-Zellen in der Milz sinkt unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,26)=3,83$, $p=0,04$. Post hoc-Vergleiche: Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($8,5\% \pm 3,5\%$) haben eine tendenziell (MWD=5,49, $p=0,13$) und die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($7,2\% \pm 6,2\%$) eine signifikant (MWD=6,79, $p=0,048$) niedrigere Frequenz an NK-Zellen in der Milz als die Kontrollmäuse ($14,0\% \pm 7,00\%$). Zwischen den mit verschiedenen IL-18-Konzentrationen behandelten Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.10 A).

Die Anzahl der NK-Zellen in der Milz sinkt signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $X^2(2)=8,39$, $p=0,02$. Das nach Bonferroni-korrigierte Signifikanzniveau bei den folgenden Mann-Whitney-U-Tests liegt bei $p<0,017$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelte Gruppe

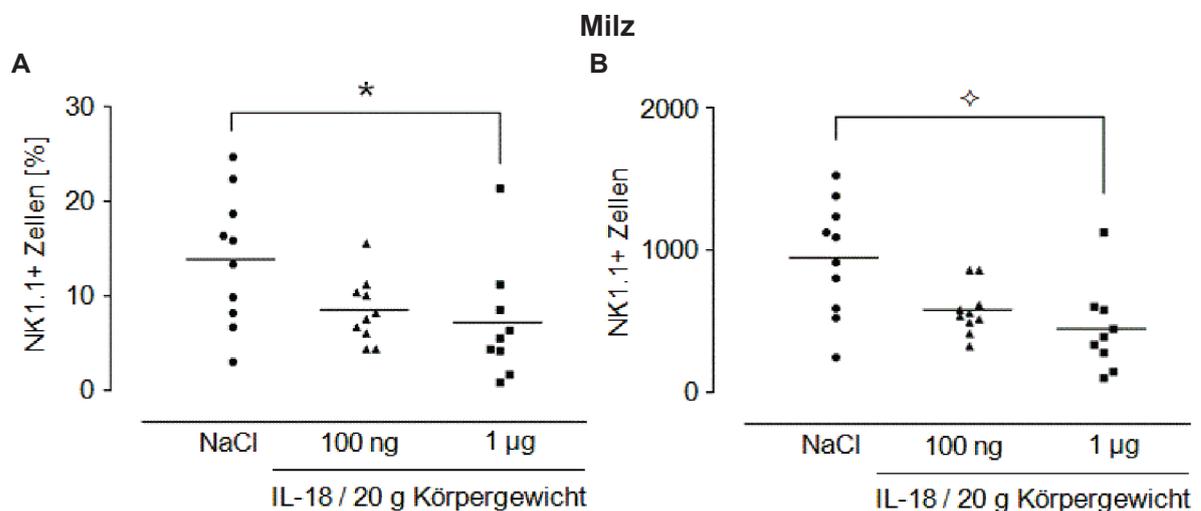


Abb. 4.10: Natürliche Killerzellen der TAZ10-Mäuse

In der Milz besitzen die mit 100 ng Interleukin-18 (IL-18) / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäuse tendenziell ($p=0,13$) und die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse mit $p=0,048$ (*) eine signifikant niedrigere Frequenz an Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) als die Kontrollmäuse (A). Bei Betrachtung der Anzahl der NK-Zellen zeigt sich der gleiche signifikante Unterschied zwischen den Kontrollmäusen und den mit 1 μg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen mit $p=0,014$ (◇) sowie ein tendenzieller Unterschied zwischen den Kontrollmäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen mit $p=0,03$ bei einer Signifikanzschranke von $p=0,017$ (B). Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied (Frequenz: $p=1,00$; Anzahl: $p=0,17$).

(579,7 ± 169,3) hat tendenziell weniger NK-Zellen als die Kontrollgruppe (949,2 ± 404,3), U=21,00, z=-2,19, p=0,03. Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierte Mausgruppe (452,8 ± 306,5) hat signifikant weniger NK-Zellen als die Kontrollgruppe, U=15,00, z=-2,45, p=0,014. Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.10 B).

Die Abnahme der NK-Zellen unter der Behandlung mit 1 µg IL-18 / 20 g KG im Vergleich mit Kontrollgruppe besteht in Knochenmark und Blut nicht (Daten nicht gezeigt).

Expression von c-Kit auf Natürlichen Killerzellen *in vitro*

IL-18 erhöht *in vitro* die Expression von c-Kit auf NK-Zellen, die aus den Milzen von TAZ10-Mäusen isoliert wurden (s. Abb. 4.11).

Lebende/NK1.1⁺ Zellen wurden als NK-Zellen definiert. C-Kit⁻ NK-Zellen wurden nach der Zell-Sortierung mit verschiedenen IL-18-Konzentrationen in Kultur genommen. Die c-Kit-Expression der NK-Zellen wurde nach der Kultivierung erneut gemessen. Die Frequenz der c-Kit⁺ NK-Zellen stieg mit zunehmender IL-18-Konzentration und blieb konstant ab einer Konzentration von 25 ng/ml IL-18 (s. Abb. 4.11).

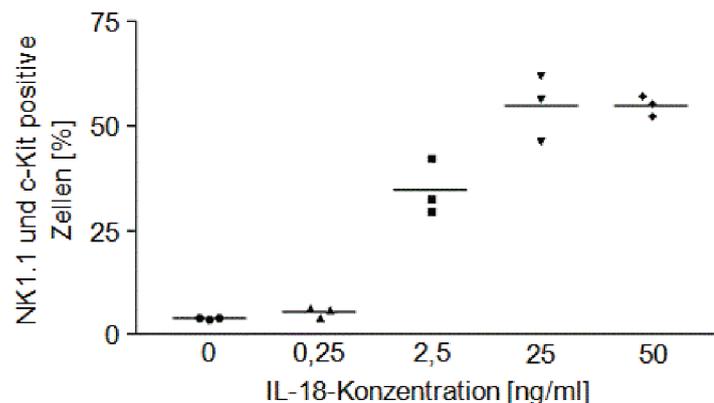


Abb. 4.11: Interleukin-18 induziert die c-Kit-Expression auf Natürlichen Killerzellen aus TAZ10-Mäusen *in vitro*

C-Kit negative Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aus TAZ10-Mäusen wurden mit unterschiedlichen Interleukin-18-(IL-18-)Konzentrationen kultiviert. Mit zunehmender IL-18-Konzentration steigt die c-Kit-Expression auf NK-Zellen und erreicht ein Plateau ab einer Konzentration von 25 ng/ml.

Expression von c-Kit auf Natürlichen Killerzellen der TAZ10-Mäuse *in vivo*

Als c-Kit tragende NK-Zellen wurden lebende/CD45⁺/NK1.1⁺/c-Kit⁺ Zellen gewertet. Die Frequenz c-Kit⁺ NK-Zellen bezeichnete den Anteil NK1.1 und c-Kit positiver Zellen an CD45 positiven Zellen.

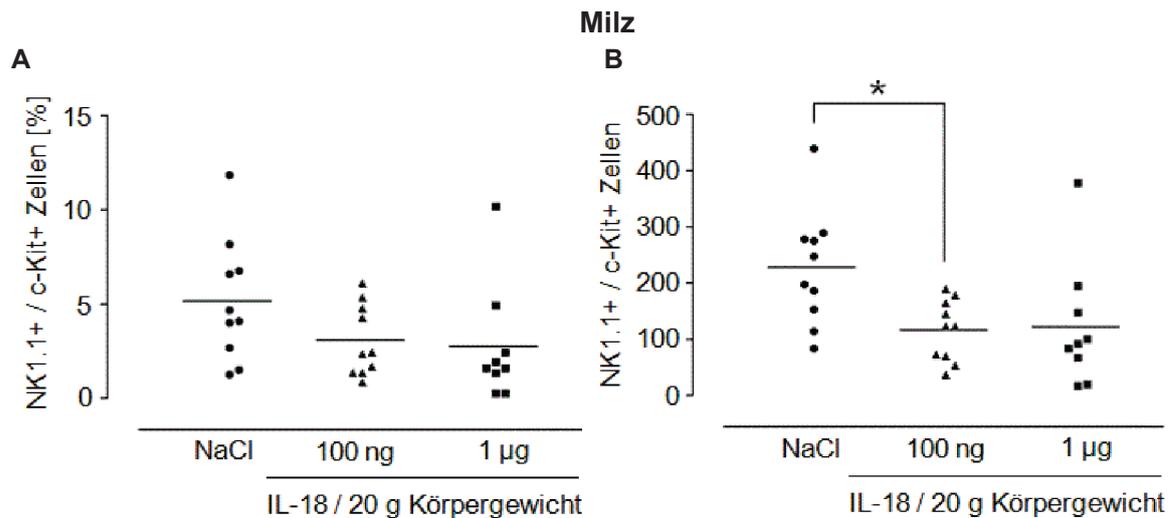


Abb. 4.12 c-Kit positive Natürliche Killerzellen der TAZ10-Mäuse

Die mit Interleukin-18 (IL-18) behandelten Mäuse besitzen tendenziell ($p=0,15$) eine niedrigere Frequenz c-Kit positiver Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) in der Milz als die Kontrollmäuse (A). Die Anzahl der c-Kit positiven NK-Zellen in der Milz ist signifikant niedriger bei den mit 100 ng IL-18 / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäusen, $p=0,04$ (*), und tendenziell niedriger bei den mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäusen, $p=0,06$, im Vergleich mit den Kontrollmäusen. Zwischen den mit IL-18 behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied ($p=1,00$) (B).

Die Frequenz der c-Kit⁺ NK-Zellen in der Milz zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Mausgruppen, $X^2(2)=3,79$, $p=0,15$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG und die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben tendenziell eine niedrigere Frequenz c-Kit⁺ NK-Zellen als die Kontrollmäuse (s. Abb. 4.12 A).

Die durchschnittliche Anzahl c-Kit⁺ NK-Zellen verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,26)=4,49$, $p=0,02$. In den Post hoc-Analysen zeigte sich, dass die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($116,9 \pm 54,8$) signifikant (MWD=111,20, $p=0,04$) und die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($123,8 \pm 111,3$) tendenziell (MWD=104,32, $p=0,06$) weniger c-Kit⁺ NK-Zellen besitzen als die Kontrollmäuse ($228,1 \pm 103,1$). Zwischen den Mausgruppen, die IL-18 erhielten, besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.12 B).

4.1.6 Veränderungen von Dendritischen Zellen der TAZ10-Mäuse

Als DC's wurden lebende/CD45⁺/CD11c⁺ Zellen definiert. Der Anteil der CD11c positiven Zellen an den CD45 positiven Zellen wurde als die Frequenz der DC's benannt.

Die Frequenz der DC's in der Milz verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,26)=6,82$, $p=0,004$. In den Post hoc-Analysen zeigte sich eine tendenzielle Abnahme unter der Behandlung mit 100 ng IL-18 / 20 g KG mit $4,1\% \pm 1,3\%$ (MWD=1,35, $p=0,08$) und eine

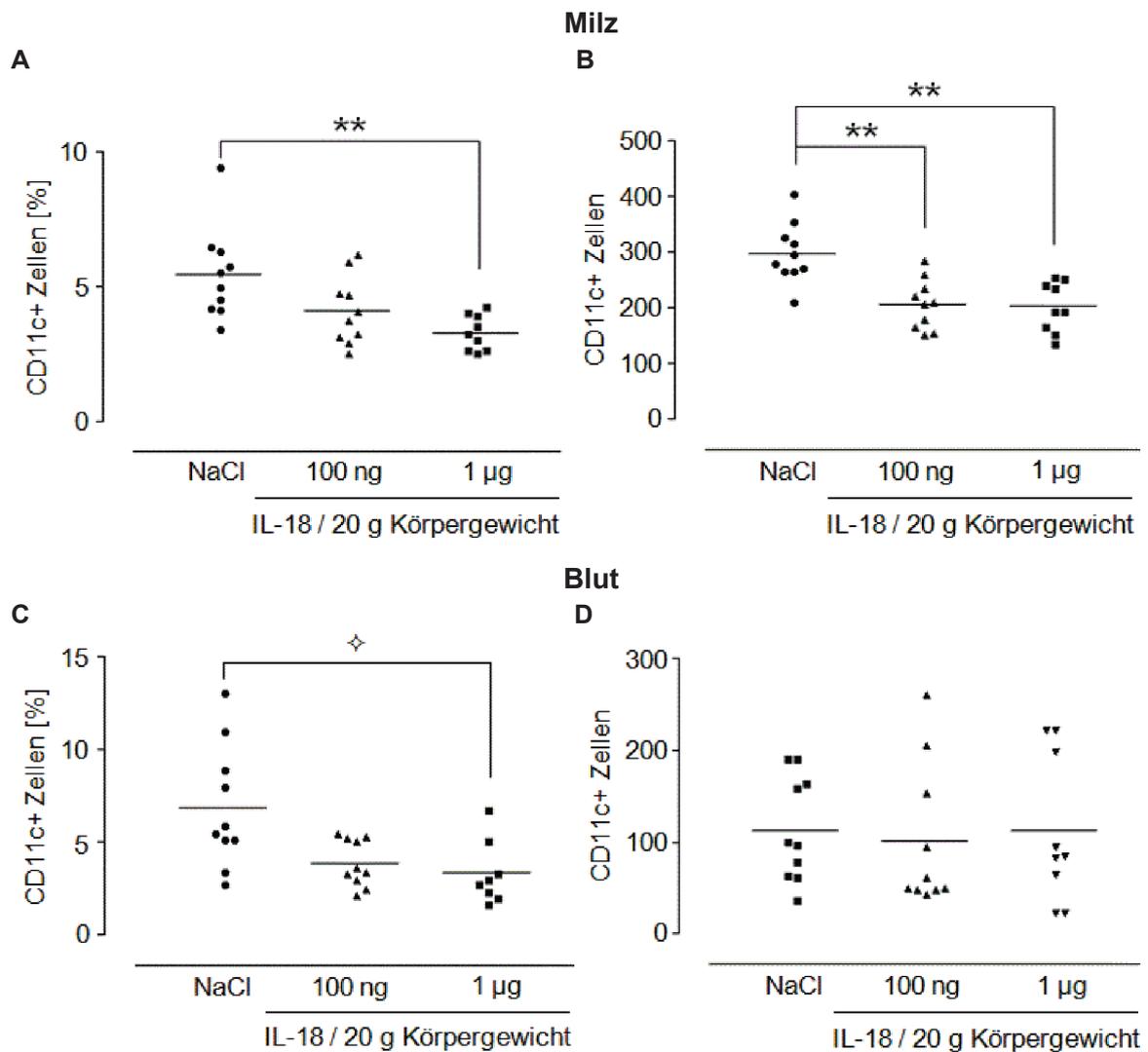


Abb. 4.13: Dendritische Zellen der TAZ10-Mäuse

In der Milz besitzen die mit 100 ng Interleukin-18 (IL-18) / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäuse tendenziell, $p=0,08$, und die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse eine signifikant, $p=0,004$ (**), niedrigere Frequenz Dendritischer Zellen (DC's) als die Kontrollmäuse (A). Eine signifikante Erniedrigung der Anzahl der DC's besteht bei den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Tieren mit $p=0,0008$ (**), bzw. bei den mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten mit $p=0,0006$ (**) im Vergleich mit den Kontrollmäusen (B). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den mit verschiedenen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen (Frequenz: $p=0,55$; Anzahl: $p=1,00$). Im Blut besteht eine signifikante Erniedrigung der DC's bei den mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen mit $p=0,010$ (◇) und eine tendenzielle Erniedrigung bei den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäusen mit $p=0,02$ im Vergleich mit der Kontrollgruppe (Signifikanzschranke $p<0,017$) (C). Kein Unterschied besteht zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen in Bezug auf die Frequenz der DC's ($p=0,21$). Es gibt keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Anzahl der DC's im Blut ($p=0,66$) (D).

signifikante Abnahme der DC's unter 1 µg IL-18 / 20 g KG mit $3,3\% \pm 0,6\%$ (MWD=2,16, $p=0,004$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit $5,5\% \pm 1,7\%$. Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen therapierten Mausgruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied (s. Abb. 4.13 A).

Die Anzahl der DC's in der Milz ändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18,

$F(2,26)=12,35$, $p=0,0002$. Eine signifikante Erniedrigung der DC's besteht unter der Therapie mit 100 ng IL-18 / 20 g KG mit $207,5 \pm 44,9$ DC's (MWD=91,70, $p=0,0008$) sowie unter 1 μg IL-18 / 20 g KG mit $202,9 \pm 45,1$ DC's (MWD=96,31, $p=0,0006$) im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit $299,2 \pm 54,2$ DC's. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den mit verschiedenen IL-18-Konzentrationen therapierten Gruppen (s. Abb. 4.13 B).

Frequenz und Anzahl der DC's im Knochenmark ändern sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (Daten nicht gezeigt).

Die Frequenz der DC's im Blut verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $X^2(2)=9,16$, $p=0,01$. Bei den folgenden Mann-Whitney-U-Tests liegt die Bonferroni-korrigierte Signifikanzschranke bei $p<0,017$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG ($3,9\% \pm 1,3\%$) behandelten Mäuse haben tendenziell, $U=19,00$, $z=-2,34$, $p=0,02$, und die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($3,3\% \pm 1,7\%$) signifikant, $U=11,00$, $z=-2,58$, $p=0,010$, weniger DC's als die Kontrollmäuse ($6,9\% \pm 3,3\%$). Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen therapierten Gruppen (s. Abb. 4.13 C). Die Anzahl der DC's im Blut verändert sich nicht unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.13 D).

4.2 Wirkung von Interleukin-18 auf Immunzellen von TAZ10-Mäusen

Im folgenden Abschnitt sind die Auswirkungen von IL-18 auf das Immunsystem dargestellt. Die signifikanten Unterschiede beziehen sich ausschließlich auf den Faktor „Konzentration“ (NaCl vs. 100 ng IL-18 / 20 g KG vs. 1 μg IL-18 / 20 g KG), statistisch ermittelt durch Anwendung des mehrfaktoriellen ANOVA. Die Daten beinhalten die 20 und 30 Wochen alten Mäuse. Die statistischen Ergebnisse des Faktor „Alter“ sind in dem noch folgenden Abschnitt 4.4 dargestellt. Die Zellen sind als Frequenz bzw. Anzahl entsprechend wie in Abschnitt 4.1 definiert, in dem der Faktor Konzentration ausschließlich in Bezug auf die 20 Wochen alten Mäuse bewertet wurde, um die Zusammenhänge mit der AIT darzustellen. Hier geht es nun ausschließlich um die Auswirkungen von IL-18 auf das Immunsystem.

4.2.1 Wirkung von Interleukin-18 auf T-Zellen

Wirkung von Interleukin-18 auf zytotoxische T-Zellen

Die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben tendenziell weniger CTL in der Milz als die Kontrollmäuse (s. Abb. Abb. 4.14 A und B).

Unter der Behandlung mit IL-18 verändert sich die Frequenz der CTL in der Milz knapp nicht signifikant, $F(2,49)=4,55$, $p=0,02$ bei einer Signifikanzschranke $p<0,01$ aufgrund fehlender

Varianzhomogenität. Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben tendenziell eine niedrigere Frequenz an CTL als die Kontrollmäuse und die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse (s. Abb. 4.14 A).

Die Anzahl der CTL verändert sich in der Milz nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,49)=2,27$, $p=0,11$. Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse besitzen tendenziell weniger CTL als die Kontrollmäuse und die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse (s. Abb. 4.14 B).

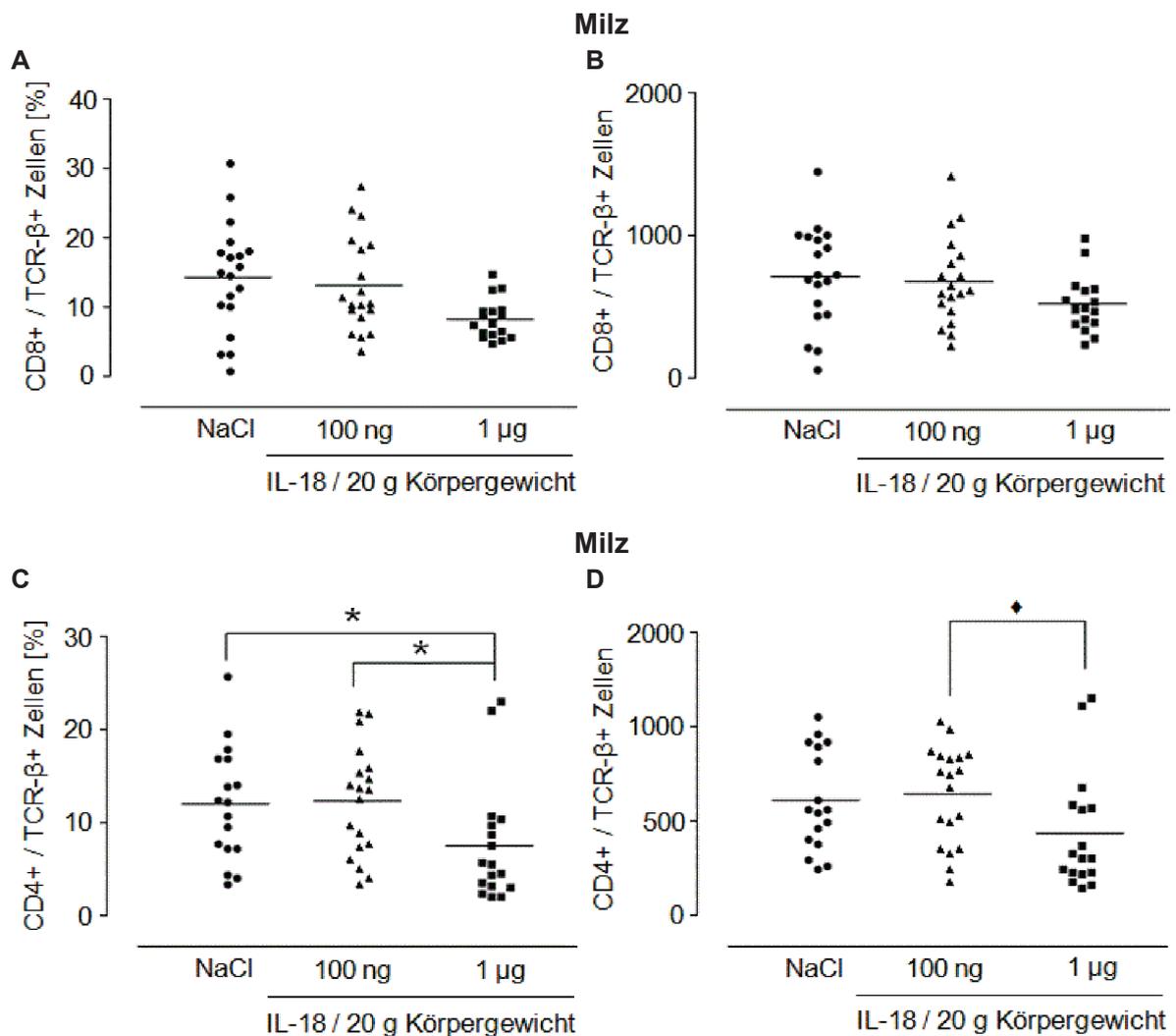


Abb. 4.14: Wirkung von Interleukin-18 auf T-Zellen

Die mit 1 µg Interleukin-18 (IL-18) / 20 g Körpergewicht (KG) therapierten Mäuse besitzen tendenziell eine niedrigere Frequenz und Anzahl an zytotoxischen T-Zellen (CTL) in der Milz im Vergleich mit den Kontrollmäusen. Es kam zu keiner signifikanten Veränderung unter der Behandlung mit IL-18 in Bezug auf die CTL in der Milz (Frequenz: $p=0,02$, Signifikanzschränke $p<0,01$) (A); Anzahl: $p=0,11$) (B). Es liegt eine signifikant geringere Frequenz $p=0,02$ (*) und tendenziell geringere Anzahl ($p=0,03$, Signifikanzschränke $p<0,01$) an T-Helferzellen in der Milz bei den mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäusen im Vergleich mit den Kontrollmäusen vor. Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben im Vergleich mit den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäusen signifikant weniger T-Helferzellen in der Milz sowohl in Bezug auf die Frequenz, $p=0,01$ (*), als auch in Bezug auf die Anzahl, $p=0,007$ (♦) (D). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollmäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen in Bezug auf die T-Helferzellen in der Milz (Frequenz: $p=1,00$; Anzahl: $p=1,00$).

Wirkung von Interleukin-18 auf T-Helferzellen

Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben weniger T-Helferzellen als die Kontrollgruppe und mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse (s. Abb. 4.14 C und D).

Die Frequenz der T-Helferzellen verändert sich signifikant in der Milz unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,47)=6,19$, $p=0,004$. Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($7,6\% \pm 6,3\%$) haben signifikant weniger T-Helferzellen als die Kontrollmäuse ($12,1\% \pm 6,1\%$), $MWD=4,44$, $p=0,02$, und als die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($12,4\% \pm 5,9\%$), $MWD=4,79$, $p=0,01$. Zwischen den Kontrollmäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.14 C).

Signifikant verändert sich die Anzahl der T-Helferzellen in der Milz unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,47)=6,31$, $p=0,004$ (Signifikanzschranke: $p<0,01$, fehlende Varianzhomogenität). Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($437,4 \pm 309,3$) haben tendenziell weniger T-Helferzellen als die Kontrollmäuse ($613,5 \pm 265,6$), $MWD=176,18$, $p=0,03$, und signifikant weniger als die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($644,7 \pm 260,3$), $MWD=207,33$, $p=0,007$. Zwischen den Kontrollmäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.14 D).

4.2.2 Wirkung von Interleukin-18 auf Natürliche Killerzellen

Die NK-Zellen sinken in der Milz unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.15).

Die Frequenz der NK-Zellen in der Milz verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,50)=8,24$, $p=0,0008$ (Signifikanzschranke $p<0,01$, fehlende Varianzhomogenität). Signifikant weniger NK-Zellen haben die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse, $MWD=4,75$, $p=0,008$, und die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse, $MWD=6,00$, $p=0,0008$, im Vergleich mit den Kontrollmäusen ($10,5\% \pm 7,0\%$). Zwischen den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG ($5,7\% \pm 4,1\%$) und den mit 1 µg IL-18 / 20 g KG ($4,5\% \pm 5,2\%$) behandelten Tieren besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.15 A).

Unter der Behandlung mit IL-18 verändert sich signifikant die Anzahl der NK-Zellen in der Milz, $X^2(2)=7,56$, $p=0,02$. Die Signifikanzschranke liegt bei den folgenden Post hoc-Analysen bei $p<0,017$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Tiere ($376,1 \pm 258,2$) haben tendenziell, $U=120,00$, $z=-1,77$, $p=0,08$, und die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($282,1 \pm 276,1$) signifikant, $U=87,00$, $z=-2,55$, $p=0,011$, weniger NK-Zellen in der Milz als die Kontrollmäuse ($648,1 \pm 452,7$). Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.15 B).

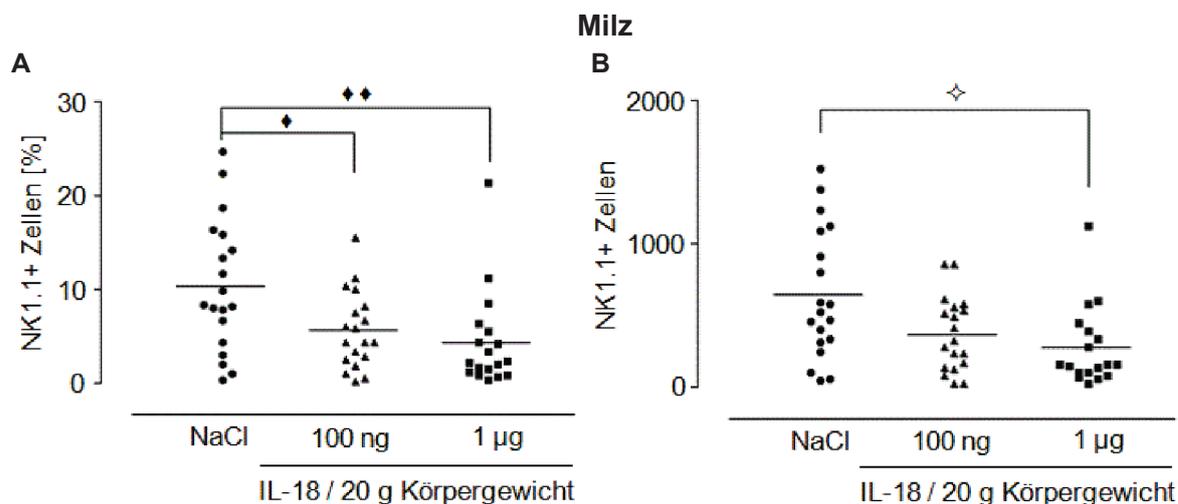


Abb. 4.15: Wirkung von Interleukin-18 auf Natürliche Killerzellen

Die mit 100 ng Interleukin-18 (IL-18) / 20 g Körpergewicht (KG), $p=0,008$ (*), und die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse, $p=0,0008$ (**), besitzen eine signifikant niedrigere Frequenz an Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der Milz als die Kontrollmäuse (A). In Bezug auf die Anzahl der NK-Zellen besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen und den Kontrollmäusen mit $p=0,011$ (◇) (B). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen und den Kontrollmäusen. Eine Tendenz ist zu sehen mit $p=0,08$. Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen bestehen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Frequenz ($p=1,00$) und Anzahl ($p=0,19$) der NK-Zellen in der Milz.

4.2.3 Wirkung von Interleukin-18 auf Dendritische Zellen

Die DC's sinken in der Milz, im Knochenmark und im Blut signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.16).

Die Frequenz der DC's in der Milz verändert sich signifikant unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,50)=14,53$, $p=0,00001$ (Signifikanzschranke $p<0,01$, fehlende Varianzhomogenität). Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($2,9\% \pm 1,7\%$) haben eine signifikant, $MWD=1,76$, $p=0,0002$, geringere Frequenz an DC's in der Milz als die Kontrollmäuse ($4,7\% \pm 1,9\%$). Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($2,6\% \pm 1,0\%$) haben ebenfalls eine signifikant, $MWD=2,08$, $p=0,00002$, niedrigere Frequenz an DC's in der Milz als die Kontrolltiere. Zwischen den mit verschiedenen IL-18-Konzentrationen behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied, $MWD=0,33$, $p=1,00$ (s. Abb. 4.16 A).

Unter der Behandlung mit IL-18 verändert sich signifikant die Anzahl der DC's in der Milz, $F(2,50)=17,59$, $p=0,000002$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($154,00 \pm 74,5$) besitzen signifikant, $MWD=90,58$, $p=0,000004$, weniger DC's in der Milz als die Kontrolltiere ($244,5 \pm 83,4$). Auch die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($162,0 \pm 59,0$) haben signifikant, $MWD=82,53$, $p=0,00003$, weniger DC's in der Milz als die Kontrollmäuse. Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen behandelten Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied, $MWD=8,05$, $p=1,00$ (s. Abb. 4.16 B).

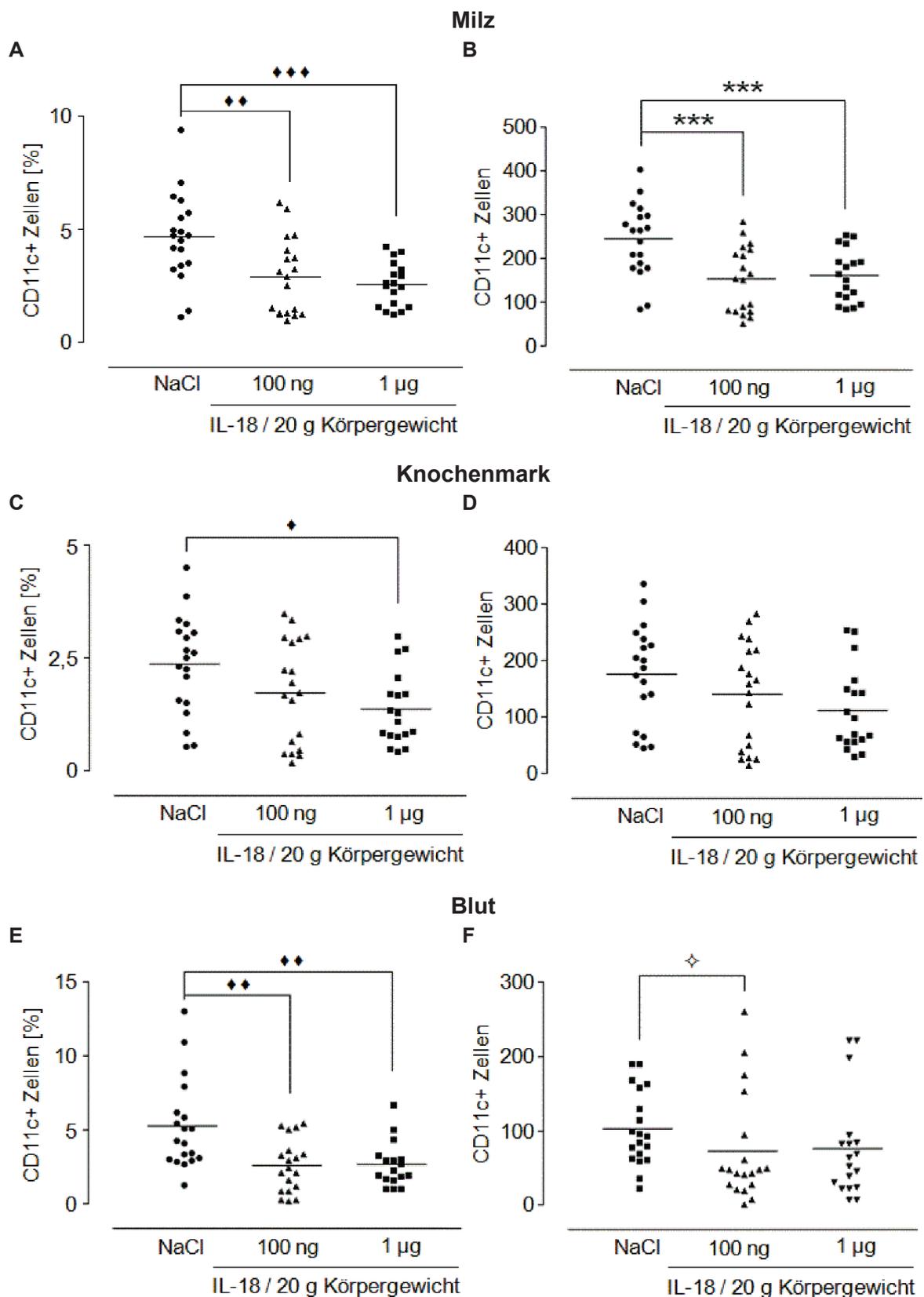


Abb. 4.16: Wirkung von Interleukin-18 auf Dendritische Zellen

In der Milz sinken die Dendritischen Zellen (DC's) signifikant unter der Behandlung mit Interleukin-18 (IL-18) im Vergleich mit der Kontrollgruppe (100 ng IL-18 / 20 g Körpergewicht (KG): Frequenz: $p=0,0002$ (♦♦) (A); Anzahl: $p=0,000004$ (***) (B); 1 µg IL-18 / 20 g KG: Frequenz: $p=0,00002$ (♦♦♦) (A); Anzahl: $p=0,00003$ (***) (B)). Im Knochenmark nehmen tendenziell die DC's mit zunehmender IL-18-Konzentration ab sowohl in Bezug auf Frequenz (C) als auch Anzahl (D). Eine signifikant niedrigere Frequenz an DC's im Knochenmark haben die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse im Vergleich mit den Kontrollmäusen, $p=0,001$ (♦) (C). Im Blut haben die mit IL-18 behandelten Mäuse signifikant weniger DC's im Vergleich mit den Kontrollmäusen (100 ng IL-18 / 20 g KG: Frequenz: $p=0,0002$ (♦♦) (E); Anzahl: $p=0,0167$ (◇) (F); 1 µg IL-18 / 20 g KG: Frequenz: $p=0,0003$ (♦) (E); Anzahl: $p=0,07$, Tendenz (F)).

Im Knochenmark verändert sich die Frequenz der DC's unter der Behandlung mit IL-18, $F(2,50)=7,52$, $p=0,001$ (Signifikanzschränke $p<0,01$, fehlende Varianzhomogenität). Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Tiere ($1,8\% \pm 1,2\%$) haben eine tendenziell, $MWD=0,62$, $p=0,06$, und die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($1,4\% \pm 0,8\%$) eine signifikant, $MWD=0,99$, $p=0,001$, niedrigere Frequenz an DC's im Knochenmark als die Kontrollmäuse ($2,4\% \pm 1,1\%$). Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen therapierten Gruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied, $MWD=0,37$, $p=0,50$ (s. Abb. 4.16 C). Die Anzahl der DC's im Knochenmark ändert sich nicht signifikant (tendenzielle Abnahme) unter der Behandlung mit IL-18, $X^2(2)=4,09$, $p=0,13$ (s. Abb. 4.16 D).

Unter der Behandlung mit IL-18 verändert sich signifikant die Frequenz der DC's im Blut, $F(2,49)=11,96$, $p=0,00006$ (Signifikanzschränke $p<0,01$, fehlende Varianzhomogenität). Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($2,6\% \pm 1,8\%$) besitzen eine signifikant, $MWD=2,66$, $p=0,0002$, geringere Frequenz an DC's im Blut als die Kontrollmäuse ($5,3\% \pm 3,1\%$). Auch die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($2,7\% \pm 1,5\%$) haben eine signifikant, $MWD=2,57$, $p=0,0003$, niedrigere Frequenz an DC's im Blut als die Kontrollmäuse. Zwischen den mit unterschiedlichen IL-18-Konzentrationen therapierten Mausgruppen gibt es keinen signifikanten Unterschied, $MWD=0,08$, $p=1,00$ (s. Abb. 4.16 E).

Im Blut ändert sich die Anzahl der DC's unter der Behandlung mit IL-18 signifikant, $X^2(2)=6,28$, $p=0,04$. Bei den folgenden Post hoc-Analysen liegt die Signifikanzschränke bei $p<0,017$. Die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($72,1 \pm 72,0$) haben signifikant, $U=98,50$, $z=-2,39$, $p=0,01664$, weniger DC's im Blut als die Kontrollmäuse ($102,5 \pm 50,4$). Die mit 1 μg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($76,1 \pm 68,8$) besitzen tendenziell, $U=111,00$, $z=-1,82$, $p=0,07$, weniger DC's im Blut als die Kontrollmäuse. Zwischen den mit verschiedenen IL-18-Konzentrationen behandelten Mausgruppen liegt kein signifikanter Unterschied vor, $U=156,00$, $z=-0,46$, $p=0,65$ (s. Abb. 4.16 F).

4.3 Immunsuppression durch Interleukin-18 – Welcher Mechanismus ist verantwortlich?

Zur Klärung des verantwortlichen Mechanismus für die Immunsuppression bei TAZ10-Mäusen durch IL-18 wurde die Expression vom Todesrezeptor Fas (CD95) und dessen Ligand - Fas-Ligand (FasL, CD178) - auf T-Zellen, NK-Zellen und DC's aus der Milz gemessen. Fas ist ein Rezeptor auf einer Zelle, der die Apoptose dieser Zelle durch Bindung von FasL auslöst. Außerdem wurde die intrazelluläre IL-2-Konzentration in CTL aus der Milz bestimmt. IL-2 ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor.

4.3.1 Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Immunzellen

Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf zytotoxischen T-Zellen

Als Fas-exprimierende CTL wurden lebende/CD45⁺/CD8⁺/Fas⁺ Zellen gewertet. Der Anteil Fas positiver Zellen an CD8 positiven Zellen wurde als die Frequenz Fas-exprimierender CTL definiert. Die Frequenz der Fas-Expression auf CTL verändert sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.17 A). Ebenso verändert sich die Anzahl der Fas-tragenden CTL unter der Behandlung nicht signifikant (s. Abb. 4.17 B).

Als FasL-tragende CTL wurden lebende/CD45⁺/CD8⁺/FasL⁺ Zellen definiert. Die Frequenz FasL-tragender CTL wurde als Anteil FasL positiver Zellen an CD8 positiven Zellen festgelegt. Die Expression von FasL auf CTL ändert sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.17 C und D).

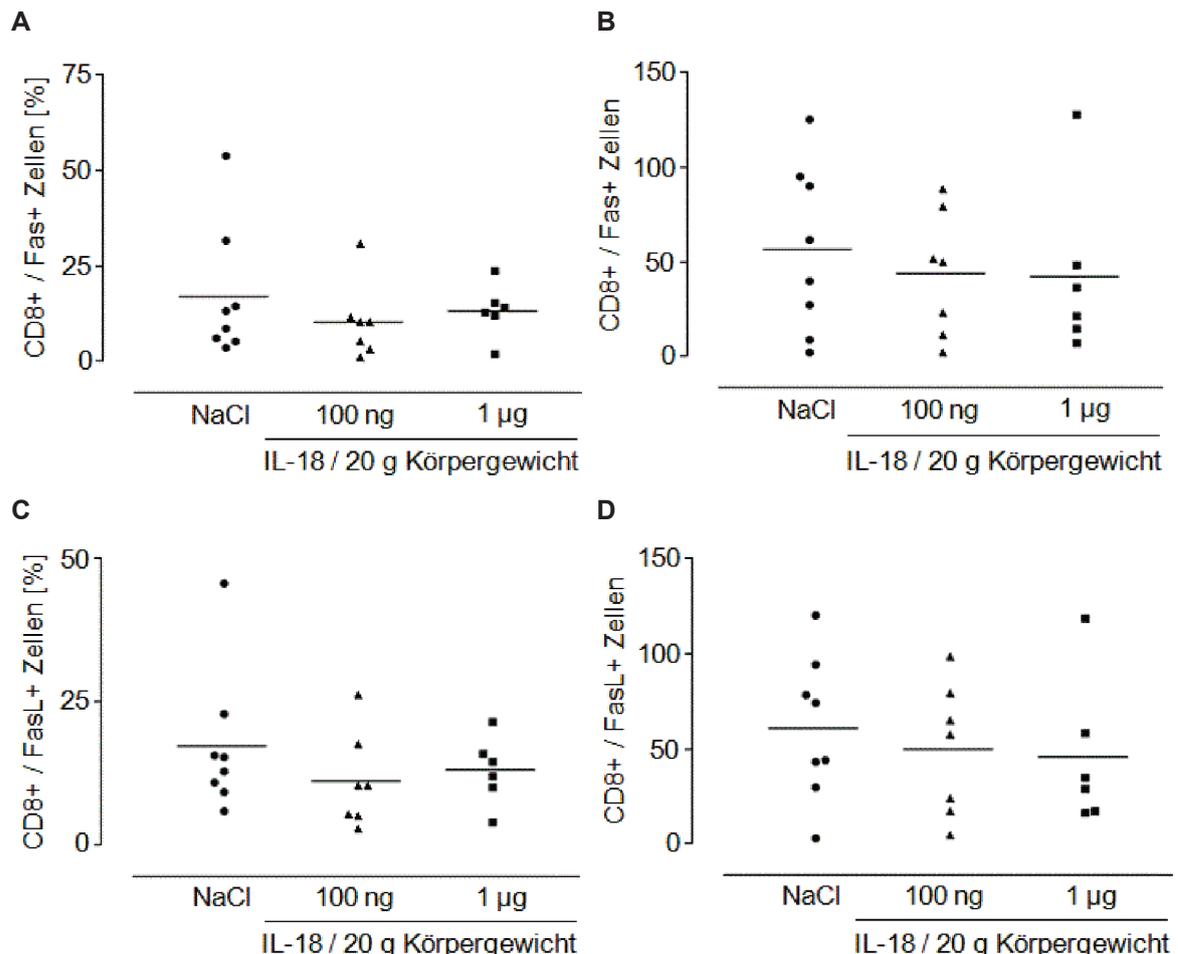


Abb. 4.17: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf zytotoxischen T-Zellen

Die Expression von Fas (Frequenz: $p=0,36$ (A); Anzahl: $p=0,62$ (B)) und Fas-Ligand (FasL) (Frequenz: $p=0,38$ (C); Anzahl: $p=0,65$ (D)) auf zytotoxischen T-Zellen (CTL) verändert sich nicht signifikant unter der Behandlung mit Interleukin-18 (IL-18).

Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf T-Helferzellen

Lebende/CD45⁺/CD4⁺/Fas⁺ Zellen wurden als Fas-exprimierende T-Helferzellen bezeichnet. Die Frequenz Fas-exprimierender T-Helferzellen wurde als Anteil Fas positiver Zellen an CD4 positiven Zellen definiert. Unter der Behandlung mit IL-18 verändert sich die Frequenz der Fas-Expression auf T-Helferzellen, $F(2,15)=4,03$, $p=0,04$. Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($81,1\% \pm 10,5\%$) besitzen tendenziell, $MWD=9,60$, $p=0,09$, mehr Fas-tragende T-Helferzellen als die Kontrollmäuse und signifikant, $MWD=14,55$, $p=0,01$, mehr als die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse (s. Abb. 4.18 A). Zwischen den Kontrollmäusen ($71,5\% \pm 5,1\%$) und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen

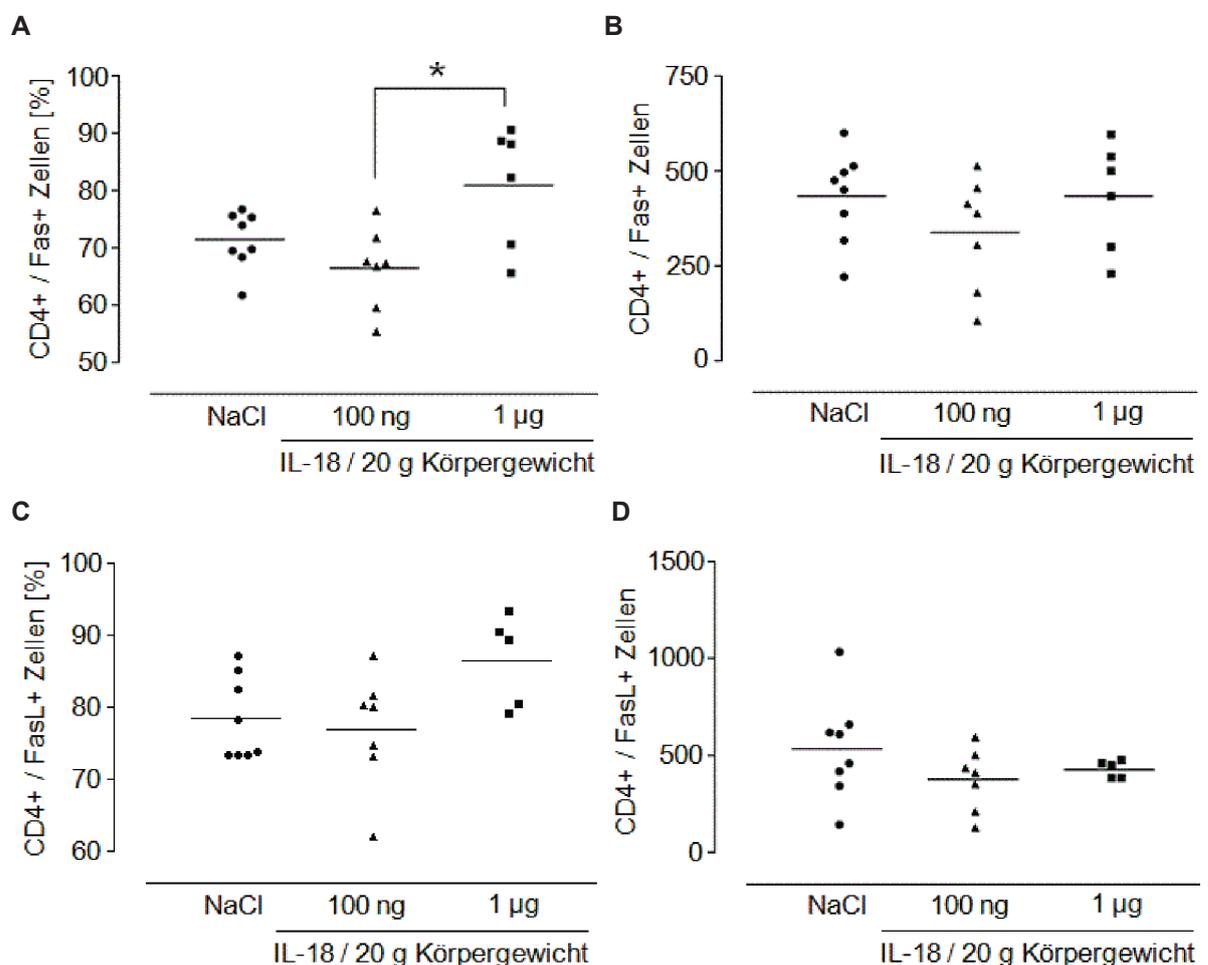


Abb. 4.18: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf T-Helferzellen

Die mit 1 µg Interleukin-18 (IL-18) / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäuse haben eine signifikant höhere Frequenz Fas-exprimierender T-Helferzellen als die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse, $p=0,01$ (*) und tendenziell mehr als die Kontrollmäuse ($p=0,09$) (A). Zwischen den Kontrollmäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied ($p=0,66$). In Bezug auf die Anzahl der Fas-tragenden T-Helferzellen zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,06$) (B). Die gleiche Tendenz liegt vor. Durch die Behandlung mit IL-18 verändert sich weder die Frequenz ($p=0,14$) (C) noch die Anzahl ($p=0,06$) (D) Fas-Ligand (FasL) positiver T-Helferzellen signifikant. Graphisch liegen vergleichbare Veränderungen wie bei der Fas-Expression vor.

(66,6% ± 7,1%) besteht kein signifikanter Unterschied. Bezüglich der Anzahl der Fas-exprimierenden T-Helferzellen zeigt sich keine signifikante Veränderung (Tendenz), $F(2,15)=3,33$, $p=0,06$ (s. Abb. 4.18 B).

Als FasL-tragende T-Helferzellen wurden lebende/CD45⁺/CD4⁺/FasL⁺ Zellen bezeichnet. Der Anteil der FasL positiven Zellen an den CD4 positiven Zellen wurde definiert als die Frequenz der FasL-tragenden T-Helferzellen. Die Expression von FasL auf T-Helferzellen verändert sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.18 C und D).

Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Natürlichen Killerzellen

Als Fas-exprimierende NK-Zellen wurden lebende/CD45⁺/NK1.1⁺/Fas⁺ Zellen definiert. Der Anteil der Fas positiven Zellen an den NK1.1 positiven Zellen wurde als die Frequenz Fas-tragender NK-Zellen bezeichnet. Frequenz und Anzahl der Fas-tragenden NK-Zellen

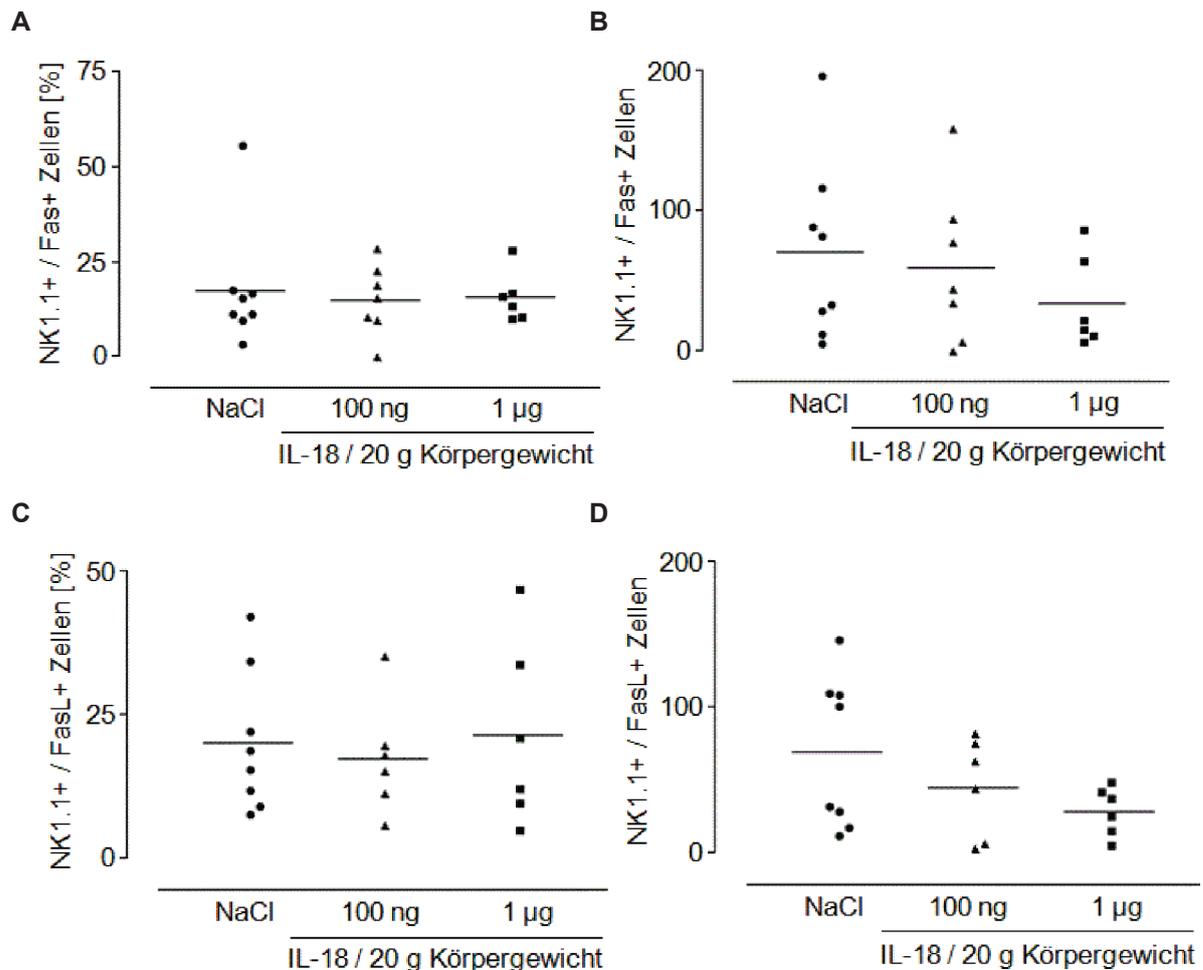


Abb. 4.19: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Natürlichen Killerzellen

Die Expression von Fas bzw. Fas-Ligand (FasL) auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) verändern sich nicht signifikant unter der Behandlung mit Interleukin-18 (IL-18) (Frequenz Fas: $p=0,97$ (A); Anzahl Fas: $p=0,70$ (B); Frequenz FasL: $p=0,90$ (C); Anzahl FasL: $p=0,18$ (D)).

verändern sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.19 A und B).

Lebende/CD45⁺/NK1.1⁺/FasL⁺ Zellen wurden als FasL-tragende NK-Zellen definiert. Die Frequenz FasL-tragender NK-Zellen wurde als der Anteil FasL positiver Zellen an NK1.1 positiven Zellen festgelegt. Unter der Behandlung mit IL-18 ändert sich nicht signifikant die Expression von FasL auf NK-Zellen (s. Abb. 4.19 C und D).

Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Dendritischen Zellen

Als Fas-tragende DC's wurden lebende/CD45⁺/CD11c⁺/Fas⁺ Zellen gewertet. Der Anteil der Fas positiven Zellen an CD11c positiven Zellen wurde als die Frequenz der Fas-

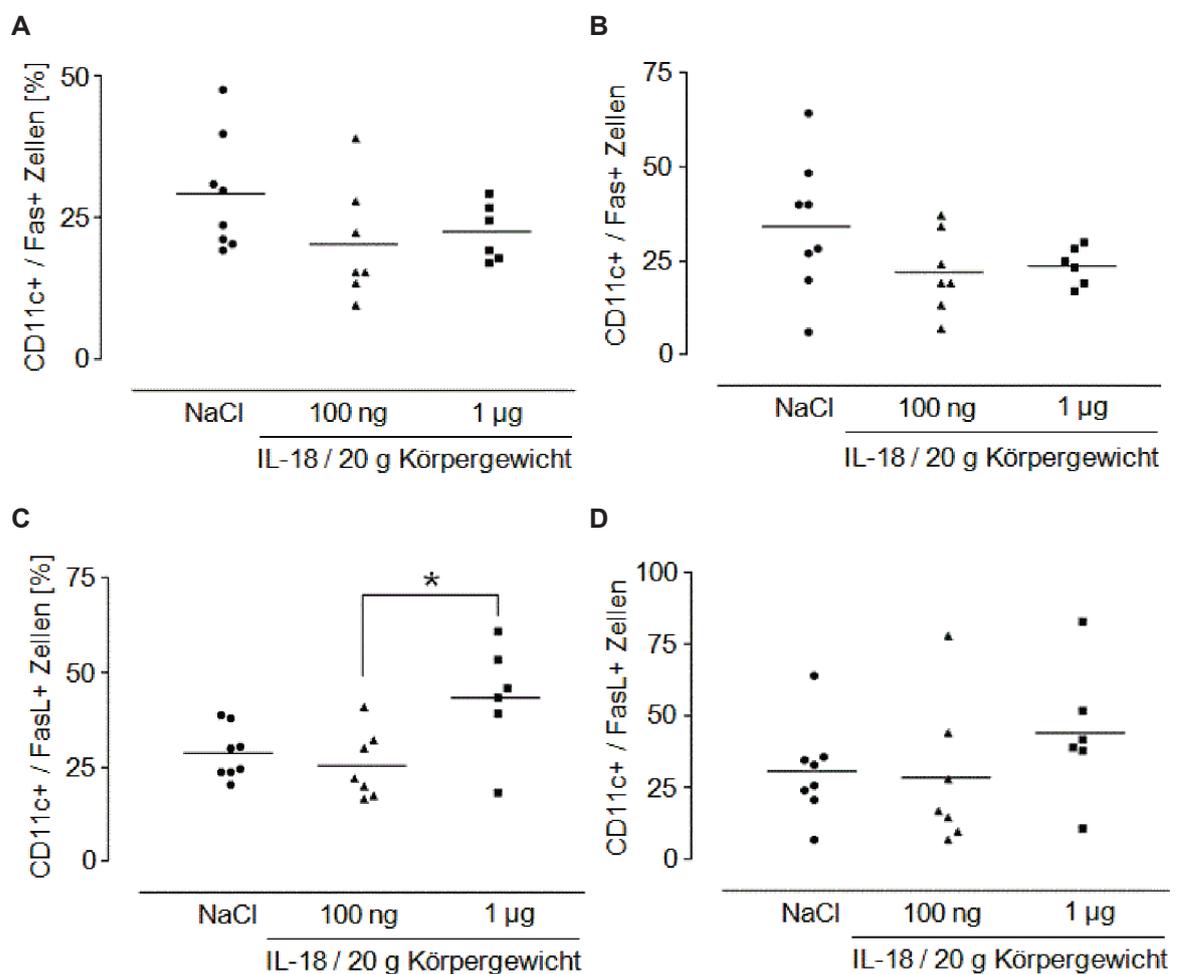


Abb. 4.20: Wirkung von Interleukin-18 auf die Expression von Fas und Fas-Ligand auf Dendritischen Zellen

Auf Dendritischen Zellen (DC's) ändert sich nicht die Expression von Fas unter der Behandlung mit Interleukin-18 (IL-18) (Frequenz: $p=0,15$ (A); Anzahl: $p=0,10$ (B)). Die mit $1 \mu\text{g}$ IL-18 / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäuse exprimieren signifikant häufiger Fas-Ligand (FasL) auf ihren DC's als die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse, $p=0,02$ (*) und tendenziell häufiger als die Kontrollmäuse ($p=0,051$) (C). Zwischen den Kontrollmäusen und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen besteht kein signifikanter Unterschied ($p=1,00$). Bezüglich der Anzahl der FasL-exprimierenden DC's zeigt sich ein vergleichbarer graphischer Verlauf ohne signifikante Unterschiede ($p=0,33$) (D).

exprimierenden DC's definiert. Die Frequenz und die Anzahl der Fas positiven DC's verändern sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.20 A und B). Lebende/CD45⁺/CD11c⁺/FasL⁺ Zellen wurden als FasL-exprimierende DC's definiert. Die Frequenz der FasL-tragenden DC's wurde als Anteil der FasL positiven Zellen an den CD11c positiven Zellen gewertet. Unter der Behandlung mit IL-18 verändert sich signifikant, $F(2,15)=6,74$, $p=0,008$, die Frequenz der Expression von FasL auf DC's. Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse ($43,3\% \pm 14,6\%$) exprimieren tendenziell, $MWD=14,66$, $p=0,051$, häufiger FasL auf DC's als die Kontrollmäuse ($28,6\% \pm 6,8\%$) und signifikant, $MWD=17,87$, $p=0,02$, häufiger als die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse ($25,4\% \pm 9,0\%$). Zwischen der Kontrollgruppe und den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Tieren besteht kein signifikanter Unterschied (s. Abb. 4.20 C). Die Anzahl der FasL positiven DC's ändert sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.20 D).

4.3.2 Wirkung von Interleukin-18 auf die Interleukin-2-Expression in zytotoxischen T-Zellen

Als CTL, die intrazellulär IL-2 enthalten, wurden folgende Zellen definiert: Lebend/CD45⁺/CD8⁺/IL-2⁺. Als Frequenz IL-2 positiver CTL wurde der Anteil der CD8 und IL-2 positiven Zellen an den CD45 positiven Zellen bezeichnet.

Frequenz und Anzahl der intrazellulär IL-2 beinhaltenden CTL ändern sich nicht signifikant unter der Behandlung mit IL-18 (s. Abb. 4.21 A und B). Tendenzuell beinhalten die CTL, die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelt wurden, weniger IL-2 als die Kontrollmäuse.

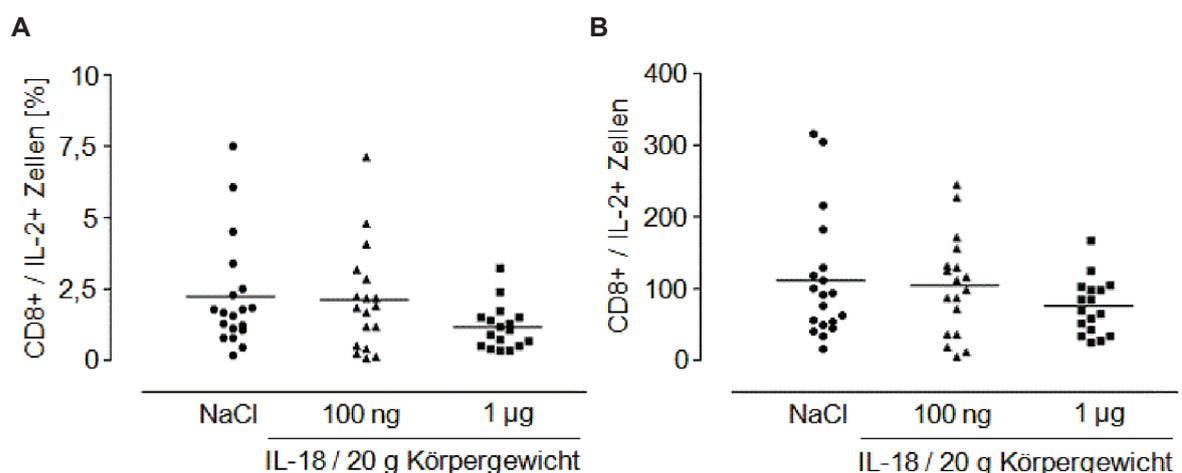


Abb. 4.21: Wirkung von Interleukin-18 auf die Interleukin-2-Expression in zytotoxischen T-Zellen

Die zytotoxischen T-Zellen (CTL), die intrazellulär Interleukin-2 (IL-2) enthalten, nehmen weder signifikant zu noch ab unter der Behandlung mit Interleukin-18 (IL-18) (Frequenz: $p=0,11$ (A); Anzahl: $p=0,37$ (B)). Tendenzuell haben die mit 1 µg IL-18 / 20 g Körpergewicht (KG) behandelten Mäuse weniger IL-2 in ihren CTL als die Kontrollmäuse.

4.4 Immunsuppression mit zunehmendem Alter der TAZ10-Mäuse

Mithilfe des mehrfaktoriellen ANOVA kann statistisch ermittelt werden, auf welche Faktoren der zu sehende Effekt zurückzuführen ist wie z.B. in dieser Arbeit auf die verschiedenen IL-18-Konzentrationen oder das Alter der Mäuse bzw. die Behandlungsdauer mit IL-18. Im folgenden Abschnitt sind die Effekte beschrieben, die auf das Mausalter bzw. die Behandlungsdauer mit IL-18 zurückzuführen sind. Zur Differenzierung wiederum ob Mausalter oder Behandlungsdauer für den Effekt verantwortlich sind, wurden t-Tests bei Normalverteilung bzw. Mann-Whitney-U-Tests bei nicht normalverteilter Datenlage ausschließlich bei den über 16 bzw. 26 Wochen mit NaCl behandelten Kontrolltieren durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Die Resultate deuten darauf hin, dass der Effekt auf das Alter der Mäuse zurückzuführen ist und wird als solcher in den folgenden Abschnitten beschrieben. Lediglich bei den TPO-spezifischen CTL und DC's im Knochenmark konnten die Effekte statistisch weder auf das Alter der Mäuse noch auf die Behandlungsdauer zurückgeführt werden. Keiner der Effekte konnte statistisch auf die Behandlungsdauer zurückgeführt werden.

4.4.1 T-Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Zytotoxische T-Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die TPO-spezifischen CTL nehmen mit dem Alter in der Milz tendenziell ab und in Knochenmark und Blut signifikant zu (s. Abb. 4.22).

Die 30 Wochen alten Mäuse haben tendenziell eine niedrigere Frequenz an TPO-spezifischen CTL in der Milz als die 20 Wochen alten Mäuse. Einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen gibt es nicht, $F(1,49)=4,17$, $p=0,047$, Signifikanzschranke bei $p<0,01$ aufgrund fehlender Varianzhomogenität (s. Abb. 4.22 A). Das Gleiche zeigt sich in Bezug auf die Anzahl der TPO-spezifischen CTL in der Milz. Die 30 Wochen alten Mäuse haben tendenziell weniger TPO-spezifische CTL als die 20 Wochen alten Mäuse, $F(1,49)=3,65$, $p=0,06$. Das Ergebnis ist nicht signifikant bei einer Signifikanzschranke von $p<0,01$ (s. Abb. 4.22 B).

Die 30 Wochen alten Mäuse ($1,3\% \pm 0,9\%$) besitzen eine signifikant höhere Frequenz an TPO-spezifischen CTL im Knochenmark als die 20 Wochen alten Mäuse ($0,9\% \pm 0,6\%$), $F(1,50)=4,42$, $p=0,04$, (s. Abb. 4.22 C). Dies zeigt sich auch bei Betrachtung der Anzahl der TPO-spezifischen CTL im Knochenmark (20 Wochen alte Mäuse: $64,7 \pm 40,9$; 30 Wochen alte Mäuse: $99,7 \pm 66,2$), $U=245,50$, $z=-2,40$, $p=0,02$ (s. Abb. 4.22 D). Bei den TPO-

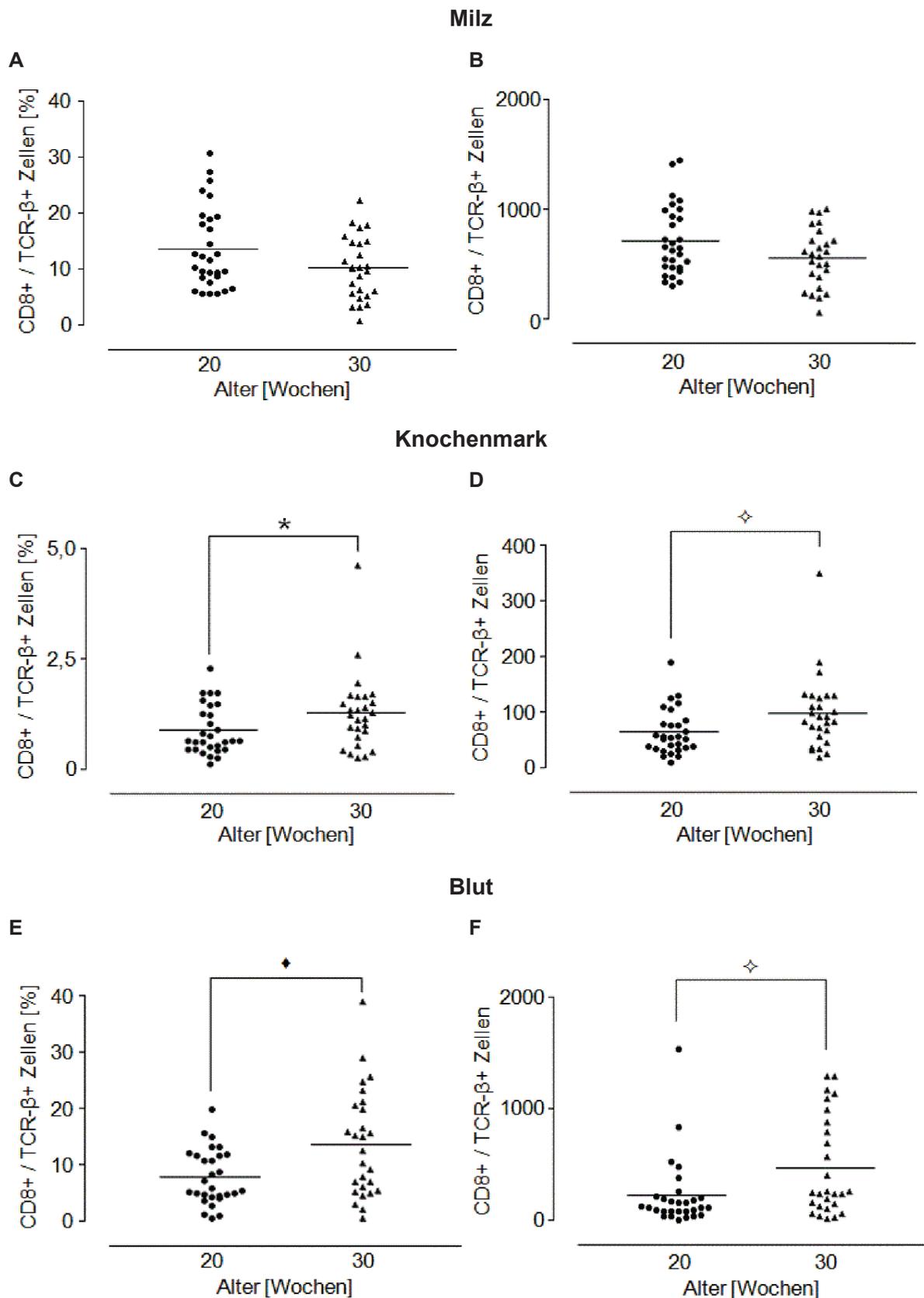


Abb. 4.22: Zytotoxische T-Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die 30 Wochen alten Mäuse besitzen tendenziell ($p=0,047$, Signifikanzschranke $p<0,01$) eine niedrigere Frequenz an Thyreoperoxidase-(TPO)-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL) in der Milz als die 20 Wochen alten Mäuse (A). Die gleiche Tendenz ($p=0,06$) liegt bei Betrachtung der Anzahl vor (B). Im Knochenmark (Frequenz: $p=0,04$ (*) (C); Anzahl: $p=0,02$ (◇) (D)) und im Blut (Frequenz: $p=0,007$ (*) (E); Anzahl: $p=0,01$ (◇) (F)) haben die 30 Wochen alten Mäuse signifikant mehr TPO-spezifische CTL als die 20 Wochen alten Mäuse.

spezifischen CTL im Knochenmark konnten die Effekte statistisch weder auf das Alter noch auf die Behandlungsdauer zurückgeführt werden (Statistische Daten nicht gezeigt).

Die 30 Wochen alten Mäuse ($13,7\% \pm 9,5\%$) haben signifikant mehr TPO-spezifische CTL im Blut als die 20 Wochen alten Mäuse ($7,9\% \pm 4,9\%$), $F(1,50)=8,05$, $p=0,007$, Signifikanzschränke bei $p<0,01$ aufgrund fehlender Varianzhomogenität (s. Abb. 4.22 E). Die Anzahl der TPO-spezifischen CTL im Blut (20 Wochen alte Mäuse: $227,4 \pm 309,9$; 30 Wochen alte Mäuse: $475,3 \pm 439,4$) zeigt den gleichen signifikanten Unterschied, $U=243,00$, $z=-2,44$, $p=0,01$ (s. Abb. 4.22 F).

T-Helferzellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die TPO-spezifischen T-Helferzellen sinken signifikant mit zunehmendem Alter in der Milz ab und bleiben in Knochenmark und Blut konstant (s. Abb. 4.23).

Die Frequenz der TPO-spezifischen T-Helferzellen in der Milz ist bei den 30 Wochen alten Mäusen ($6,8\% \pm 3,5\%$) signifikant, $F(1,47)=38,74$, $p=0,0000001$ niedriger als bei den 20 Wochen alten Mäusen ($14,6\% \pm 6,2\%$) (s. Abb. 4.23 A). Das gleiche signifikante Ergebnis, $F(1,47)=55,38$, $p=0,000000002$ bei einer Signifikanzschränke von $p<0,01$, zeigt sich in Bezug auf die Anzahl der TPO-spezifischen T-Helferzellen (20 Wochen alte Mäuse: $760,9 \pm 258,3$; 30 Wochen alt: $368,1 \pm 146,6$) in der Milz (s. Abb. 4.23 B).

Im Knochenmark verändern sich weder Frequenz noch Anzahl der TPO-spezifischen T-Helferzellen zwischen den 20 Wochen alten und den 30 Wochen alten Mäusen (s. Abb. 4.23 C und D). Genauso verhält es sich mit den TPO-spezifischen T-Helferzellen im Blut (s. Abb. 4.23 E und F).

4.4.2 Natürliche Killerzellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die NK-Zellen nehmen mit zunehmendem Alter signifikant in Milz, Knochenmark und Blut ab (s. Abb. 4.24).

Die 30 Wochen alten Mäuse ($3,4\% \pm 3,6\%$) haben in der Milz eine signifikant, $F(1,50)=25,78$, $p=0,000006$, Signifikanzschränke $p<0,01$, niedrigere Frequenz an NK-Zellen als die 20 Wochen alten Mäuse ($10,0\% \pm 6,3\%$) (s. Abb. 4.24 A). Das gleiche gilt für die Anzahl der NK-Zellen (20 Wochen alte Mäuse: $667,7 \pm 366,7$; 30 Wochen alte Mäuse: $191,6 \pm 151,6$) in der Milz, $U=67,00$, $z=-5,32$, $p=0,0000001$ (s. Abb. 4.24 B).

Im Knochenmark besitzen die 30 Wochen alten Mäuse ($1,3\% \pm 0,6\%$) eine signifikant, $U=216,50$, $z=-2,87$, $p=0,004$, geringere Frequenz an NK-Zellen als die 20 Wochen alten

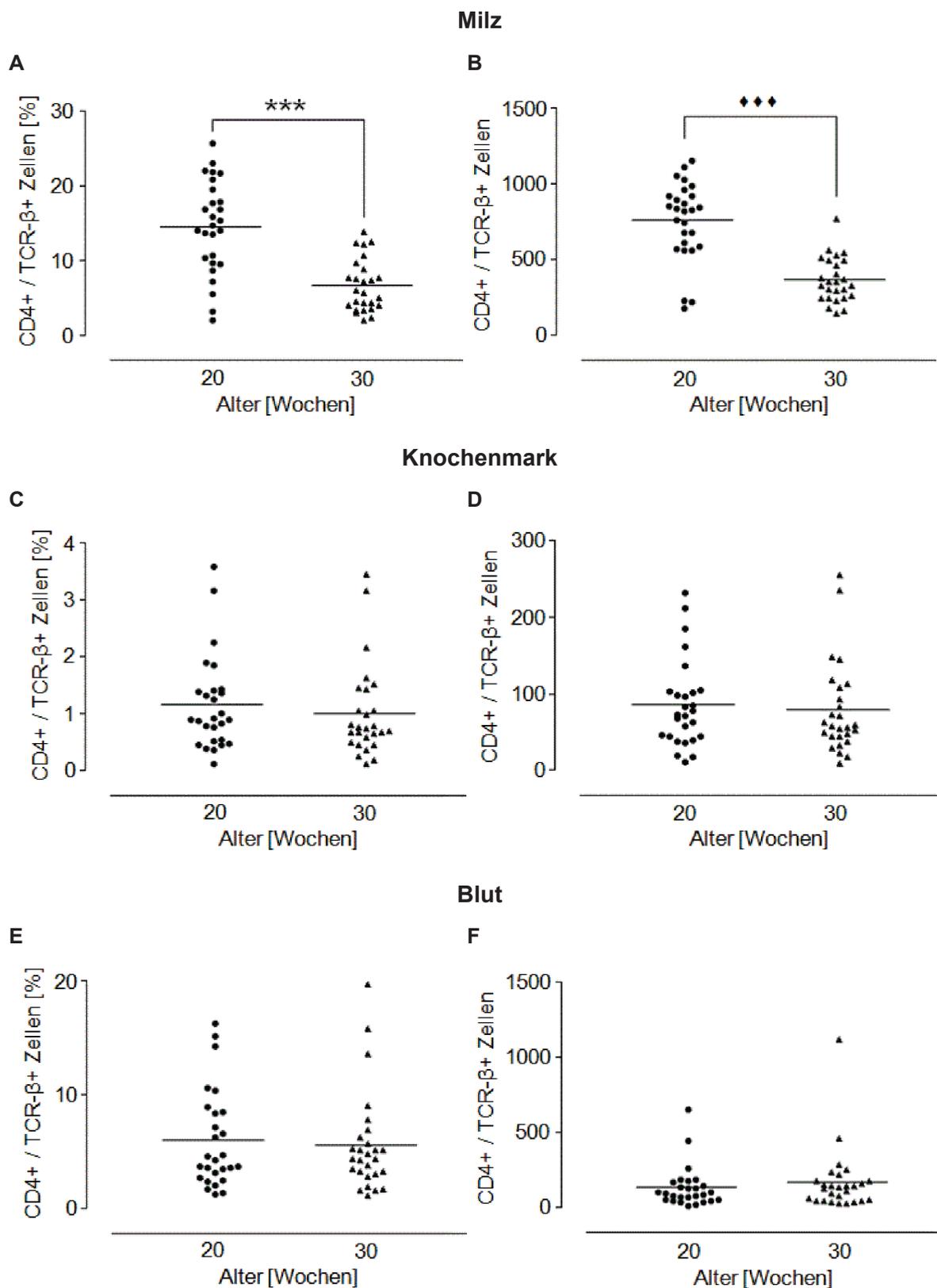


Abb. 4.23: T-Helferzellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die 30 Wochen alten Mäuse besitzen eine signifikant niedrigere Frequenz an Thyreoperoxidase-(TPO-)spezifischen T-Helferzellen in der Milz als die 20 Wochen alten Mäuse mit $p=0,0000001$ (***) (A). Der gleiche signifikante Unterschied besteht in der Milz in Bezug auf die Anzahl der TPO-spezifischen T-Helferzellen mit $p=0,000000002$ (◆◆◆) (B). Im Knochenmark (Frequenz: $p=0,45$ (C); Anzahl: $p=0,52$ (D)) und im Blut (Frequenz: $p=0,81$ (E); Anzahl: $p=0,45$ (F)) bestehen keine signifikanten Unterschiede.

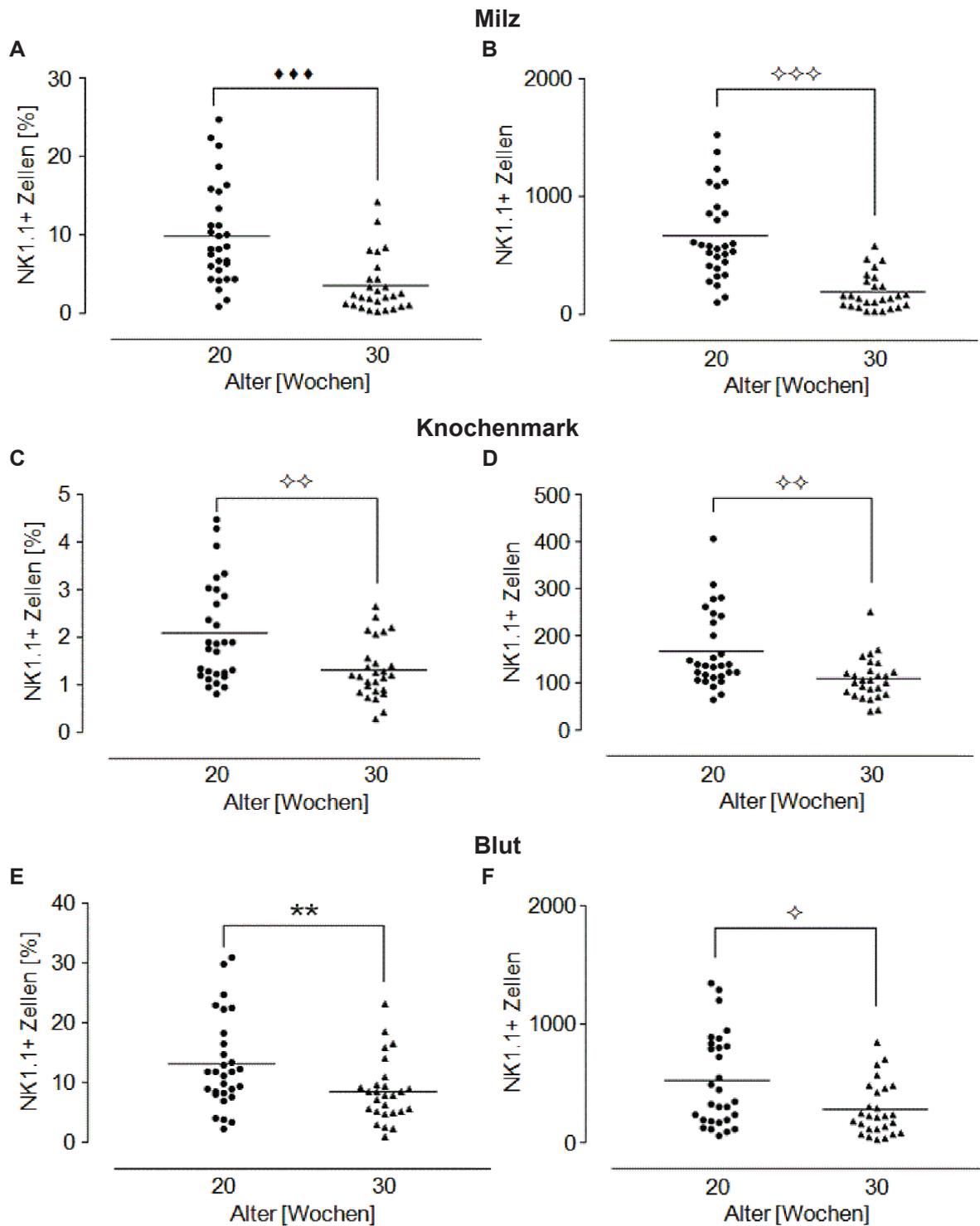


Abb. 4.24: Natürliche Killerzellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die 30 Wochen alten Mäuse besitzen eine signifikant niedrigere Frequenz an Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in der Milz mit $p=0,000006$ (***) (A), im Knochenmark mit $p=0,004$ (◇◇) (C) und im Blut mit $p=0,004$ (**) (E) als die 20 Wochen alten Mäuse. Die Anzahl der NK-Zellen ist bei den 30 Wochen alten Mäusen ebenfalls signifikant geringer in der Milz mit $p=0,0000001$ (◇◇◇) (B), im Knochenmark mit $p=0,002$ (◇◇) (D) und im Blut mit $p=0,01$ (◇) (F) als bei den 20 Wochen alten Mäusen.

Mäuse ($2,1\% \pm 1,1\%$) (s. Abb. 4.24 C). Dieser Unterschied ist bei Betrachtung der Anzahl der NK-Zellen (20 Wochen alte Mäuse: $168,8 \pm 81,1$; 30 Wochen alte Mäuse: $109,6 \pm 44,3$) im Knochenmark ebenfalls signifikant, $U=198,00$, $z=-3,17$, $p=0,002$ (s. Abb. 4.24 D).

Die 30 Wochen alten Mäuse ($8,6\% \pm 5,2\%$) haben im Vergleich mit den 20 Wochen alten Mäusen ($13,1\% \pm 7,6\%$) eine signifikant, $F(1,50)=8,92$, $p=0,004$, niedrigere Frequenz an NK-Zellen im Blut (s. Abb. 4.24 E). Die Anzahl der NK-Zellen (20 Wochen alte Mäuse: $522,2 \pm 388,4$; 30 Wochen alte Mäuse: $285,4 \pm 223,6$) im Blut ist signifikant, $U=240,50$, $z=-2,48$, $p=0,01$, geringer (s. Abb. 4.24 F).

4.4.3 Dendritische Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die 30 Wochen alten Mäuse haben signifikant weniger DC's in Milz, Knochenmark und Blut als die 20 Wochen alten Mäuse (s. Abb. 4.25).

Die 30 Wochen alten Mäuse ($2,4\% \pm 1,5\%$) haben eine signifikant, $F(1,50)=32,46$, $p=0,000001$ (Signifikanzschranke: $p<0,01$), niedrigere Frequenz an DC's in der Milz als die 20 Wochen alten Mäuse ($4,4\% \pm 1,5\%$) (s. Abb. 4.25 A). Die Anzahl der DC's in der Milz (20 Wochen alte Mäuse: $237,7 \pm 65,1$; 30 Wochen alte Mäuse: $133,1 \pm 64,3$) ist ebenfalls signifikant, $F(1,50)=57,17$, $p=0,0000000008$, niedriger (s. Abb. 4.25 B).

Im Knochenmark haben die 30 Wochen alten Mäuse ($1,4\% \pm 1,2\%$) eine signifikant $F(1,50)=17,67$, $p=0,0001$ (Signifikanzschranke: $p<0,01$) geringere Frequenz an DC's als die 20 Wochen alten Mäuse ($2,3\% \pm 0,8\%$) (s. Abb. 4.25 C). Die Anzahl der DC's im Knochenmark ist bei den 30 Wochen alten Mäusen ($109,8 \pm 95,2$) signifikant, $U=199,00$, $z=-3,16$, $p=0,002$, gesunken im Vergleich mit den 20 Wochen alten Mäusen ($175,8 \pm 66,7$) (s. Abb. 4.25 D). Diese signifikanten Unterschiede konnten statistisch nicht eindeutig dem Mausalter oder der Behandlungsdauer zugeordnet werden (Statistische Daten nicht gezeigt).

Im Blut haben die 30 Wochen alten Mäuse ($2,3\% \pm 1,5\%$) eine signifikant, $F(1,49)=23,65$, $p=0,00001$ (Signifikanzschranke: $p<0,01$), niedrigere Frequenz an DC's als die 20 Wochen alten Mäuse ($4,8\% \pm 2,7\%$) (s. Abb. 4.25 E). Die Anzahl der DC's im Blut (20 Wochen alte Mäuse: $108,6 \pm 69,7$; 30 Wochen alte Mäuse: $57,0 \pm 46,7$) ist ebenfalls mit zunehmendem Alter signifikant, $U=201,00$, $z=-3,12$, $p=0,002$, geringer (s. Abb. 4.25 F).

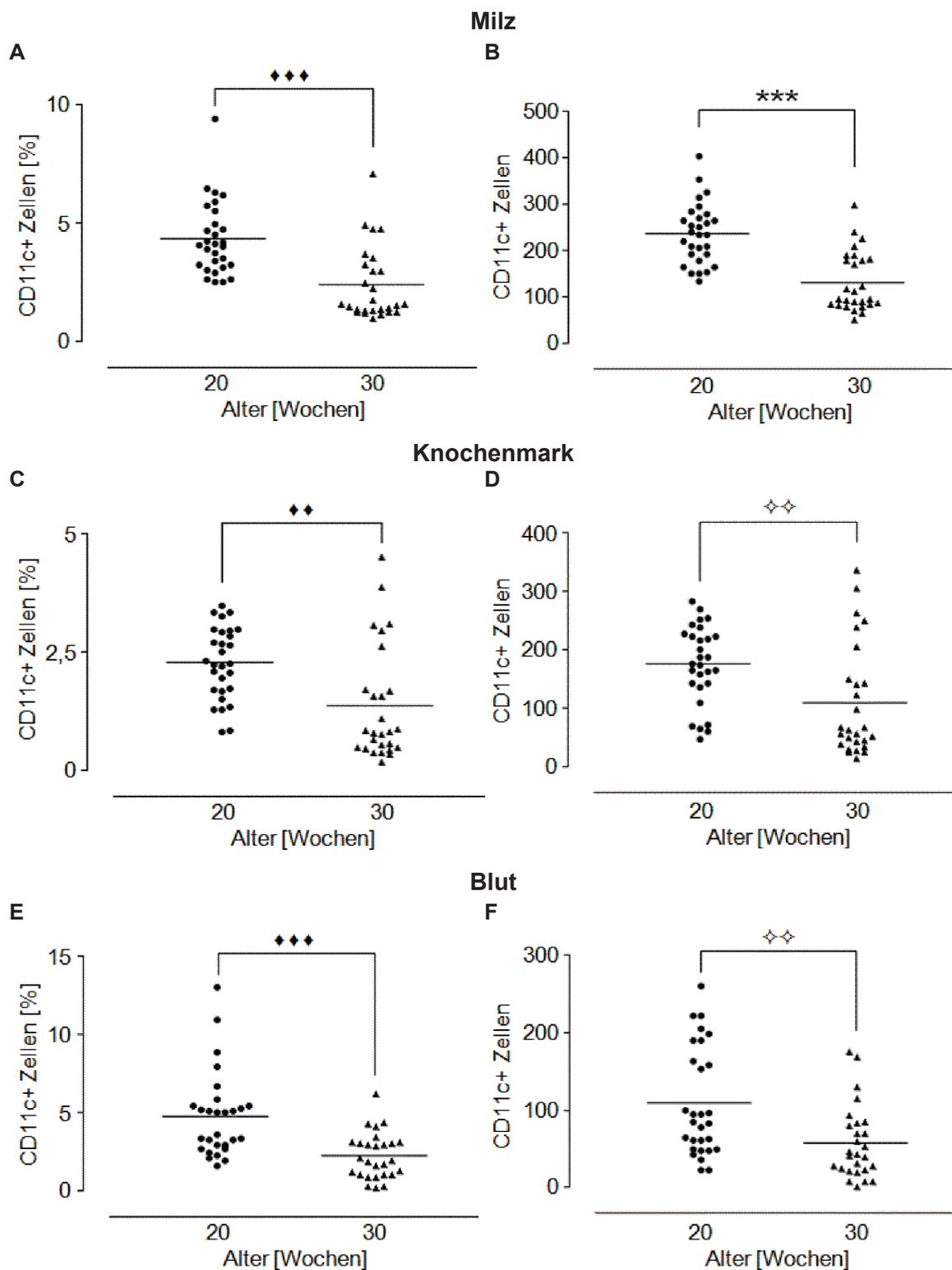


Abb. 4.25: Dendritische Zellen verschiedener Altersklassen der TAZ10-Mäuse

Die 30 Wochen alten Mäuse besitzen eine niedrigere Frequenz an Dendritischen Zellen (DC's) in der Milz mit $p=0,000001$ (◆◆◆) (A), im Knochenmark mit $p=0,00011$ (◆◆) (C) und im Blut mit $p=0,00001$ (◆◆◆) (E) als die 20 Wochen alten Mäuse. In Bezug auf die Anzahl der DC's zeigten sich ebenfalls geringere Zellzahlen bei den 30 Wochen alten im Vergleich mit den 20 Wochen alten Mäusen in der Milz mit $p=0,000000008$ (***) (B), im Knochenmark mit $p=0,002$ (◆◆) (D) und im Blut mit $p=0,002$ (◆◆) (F).

5 Diskussion

5.1 Verlauf der Autoimmunthyreoiditis bei TAZ10-Mäusen unter der Behandlung mit Interleukin-18

Die AIT ist gekennzeichnet durch eine T- und B-Zell-Infiltration in die Schilddrüse (23) mit Destruktion der Schilddrüse und resultierender Hypothyreose (29). Die hier in dieser Arbeit 20 Wochen alten, mit NaCl behandelten TAZ10-Mäuse haben signifikant weniger Thyroxin im Serum als die Wildtyp-C57BL/6-Mäuse. Das Schilddrüsengewebe der TAZ10-Mäuse ist zerstört. Sowohl CTL als auch T-Helferzellen konnten in der Schilddrüse nachgewiesen werden. Die T-Zell-Infiltration in das Schilddrüsengewebe mit Destruktion der Schilddrüse und dem resultierenden erniedrigten Thyroxinspiegel im Serum sprechen für die Funktionalität des TAZ10-Mausmodells.

Im Folgendem werden die Veränderungen der AIT unter der Behandlung mit IL-18 beschrieben. Die 20 Wochen alten, mit IL-18 behandelten TAZ10-Mäuse haben tendenziell mehr Thyroxin im Serum als die mit NaCl behandelten Kontroll-TAZ10-Tiere. Der Unterschied ist nicht signifikant. Die relative Schilddrüsengröße (Schilddrüsengröße in Relation zum Körpergewicht) veränderte sich nicht unter der Behandlung mit IL-18. Die Schilddrüse jeder TAZ10-Maus war zerstört unabhängig davon ob sie mit NaCl oder IL-18 behandelt wurde. Einen signifikanten Unterschied zwischen den Mausgruppen gab es nicht in Bezug auf die T-Zell-Infiltration in die jeweiligen Schilddrüsen. Die mit IL-18 behandelten TAZ10-Mäuse wogen gleich viel wie die mit NaCl therapierten Mäuse. Die Ergebnisse passen zum nicht signifikant veränderten Thyroxin-Spiegel im Serum der mit IL-18 behandelten TAZ10-Mäuse im Vergleich mit den Kontroll-TAZ10-Mäusen. Demnach verändern sich die charakteristischen Merkmale der AIT nicht unter der Behandlung mit 100 ng bzw. 1 µg IL-18 / 20 g KG über 16 Wochen im TAZ10-Mausmodell.

Wie kann dies erklärt werden? Wozu führte die Behandlung mit IL-18 in anderen Mausmodellen? Die intramuskuläre Injektion von 100 µg IL-18-exprimierendem DNA-Plasmid (pCAGGS-IL-18) bei 4 Wochen alten *non-obese diabetic* (NOD)-Mäusen mit Wiederholung im Alter von 6 Wochen führte zu einer höheren Inzidenz der T1DM-Entwicklung (104). Die tägliche Gabe von 0,3 µg IL-18 ab der 10. Lebenswoche für 2 bzw. 3 Wochen hingegen verringerte die Inzidenz der T1DM-Entwicklung bei NOD-Mäusen (105). Dieser Gegensatz kann durch die Doppel-Rolle von IL-18 als ein Regulator von Th1- und Th2-Antworten basierend auf dem Vorliegen des Zytokin-Milieus erklärt werden (106). IL-18 wirkt synergistisch mit IL-12 und induziert die IFN- γ -Produktion bzw. den Th1-*Shift*

(37,106). Eine Th2-Verschiebung - gekennzeichnet durch die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 - kann durch IL-18 alleine bzw. IL-18 und IL-4 zusammen bewirkt werden (106). Rothe *et al.* konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Gabe von IL-18 einen Th2-*Shift in vivo* induziert und so die Th1/Th2-Balance bei NOD-Mäusen wieder hergestellt werden kann (105). Warum verbesserte sich die AIT bei den TAZ10-Mäusen nicht, obwohl eine vergleichbare Konzentration gegeben wurde? Die Entwicklung von T-Zellen zu Th1 oder Th2 ist nicht allein vom Zytokin-Milieu abhängig, sondern auch vom genetischen Hintergrund (106). Milzzellen von C57BL/6- und CBA-Mäusen produzieren kein IL-4 durch Kultivierung mit IL-18 (106). Die TAZ10-Mäuse haben einen C57BL/6- bzw. CBA-Hintergrund (99). Eine mögliche Erklärung ist, dass IL-18 bei den TAZ10-Mäusen aufgrund des genetischen Hintergrunds schlechter oder keinen Th2-*Shift* bewirken kann.

Der nächste Abschnitt befasst sich mit den tendenziellen/fehlenden Veränderungen der AIT bei den TAZ10-Mäusen unter der Behandlung mit IL-18 im Zusammenhang mit den Veränderungen der Immunzellen:

Es ist bekannt, dass CTL Schilddrüsenfollikelzellen lysieren (24). Die aktivierten CTL nehmen unter der Behandlung mit IL-18 ab. Die gleichen Unterschiede wie bei den aktivierten CTL in der Milz zeigen sich tendenziell bei den CTL, die IFN- γ enthalten. IFN- γ ist ein proinflammatorisches Zytokin und an der Destruktion der Schilddrüse beteiligt (107). Die Abnahme der aktivierten und IFN- γ enthaltenden CTL ist eine mögliche Erklärung für die tendenzielle Erhöhung der Thyroxin-Konzentration im Serum der mit 100 ng bzw. 1 μ g IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse im Vergleich mit den Kontroll-Mäusen.

Ein weiterer zu betrachtender Faktor ist die TPO-Spezifität der T-Zellen der TAZ10-Mäuse. Aufgrund der transgenen Veränderung sind alle CTL TPO-spezifisch (99). Im TAZ10-Mausmodell sind die TPO-spezifischen T-Zellen für die Entwicklung der AIT verantwortlich (99). Die Frequenz der TPO-spezifischen CTL in der Milz ist unter der Behandlung mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG signifikant erniedrigt im Vergleich mit den Kontroll-TAZ10-Mäusen. Die TPO-spezifischen T-Helferzellen in der Milz nehmen tendenziell unter der Behandlung mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG im Vergleich mit den Kontroll-TAZ10-Mäusen ab. Diese genannten Unterschiede sind bei den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen im Vergleich mit den Kontrollmäusen nicht zu sehen. Signifikante Unterschiede gibt es in Bezug auf die TPO-spezifischen T-Zellen in Knochenmark und Blut nicht. Das spricht dafür, dass die tendenzielle Zunahme der Thyroxin-Konzentrationen im Serum unter der Behandlung sowohl mit 100 ng als auch mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG eher nicht auf die Abnahme der TPO-spezifischen T-Zellen allgemein zurückzuführen ist, weil diese ausschließlich unter der Therapie mit 1 μ g IL-18 /

20 g KG sinken. Das und die bekannte signifikante Erhöhung von aktivierten T-Zellen (CD8 und CD25 positiv) im peripheren Blut sowie die Erhöhung der IFN- γ -Konzentration im Serum von Patienten mit AIT (92) unterstreicht die These, dass die Abnahme der TPO-spezifischen aktivierten bzw. IFN- γ positiven CTL der TAZ10-Mäuse für die tendenzielle Zunahme der Thyroxin-Konzentration im Serum unter der Behandlung mit IL-18 verantwortlich sind.

Welchen Einfluss haben die NK-Zellen in Bezug auf die AIT? Die Frequenz der NKG2D positiven NK-Zellen korreliert positiv mit der Konzentration der TPO-Antikörper im Serum bei Patienten mit AIT (108). Desweiteren sind die Frequenzen der IFN- γ und CD107a positiven NK-Zellen bei Patienten mit AIT höher als bei Gesunden (108). Das lässt vermuten, dass die aktivierten NK-Zellen bei der AIT eine Rolle spielen (108). In unserer Arbeit sinken Frequenz und Anzahl der NK-Zellen tendenziell unter der Behandlung mit 100 ng IL-18 / 20 g KG und signifikant unter 1 μ g IL-18 / 20 g KG in der Milz im Vergleich mit den Kontroll-Mäusen. Auch die Abnahme der NK-Zellen unter der Behandlung mit IL-18 hat möglicherweise zu der tendenziellen Zunahme der Thyroxin-Konzentration im Serum der mit IL-18 therapierten TAZ10-Mäuse beigetragen.

Abgesehen von den NK-Zellen und vor allem den T-Zellen, sind auch die DC's an der Pathogenese der AIT beteiligt (22,109,110). Die DC's in der Milz sinken sowohl unter der Behandlung mit 100 ng IL-18 / 20 g KG als auch unter der Behandlung mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Im Gegensatz zu den TPO-spezifischen T-Zellen sinkt die Frequenz der DC's unter der Behandlung mit 100 ng IL-18 / 20 g KG tendenziell und unter 1 μ g IL-18 / 20 g KG signifikant im Blut. Die Runterregulation der DC's durch die Behandlung mit IL-18 kann an der tendenziellen Zunahme der Thyroxin-Konzentration im Serum bei den TAZ10-Mäusen beteiligt gewesen sein.

Wie kann die Abnahme der verschiedenen Immunzellen unter der Behandlung mit IL-18 erklärt werden? IL-18 und NK-Zellen korrelieren invers miteinander (111) - das bedeutet je höher die IL-18-Konzentration im Serum, desto niedriger die NK-Zell-Zahl im peripheren Blut. Anders ist die Situation in Bezug auf T-Zellen und DC's. Unsere Arbeitsgruppe konnte *in vitro* nachweisen, dass c-Kit⁻ NK-Zellen von C57BL/6-Mäusen nach Inkubation mit IL-18 konzentrationsabhängig vermehrt c-Kit auf ihrer Oberfläche exprimieren (112). *In vitro* lysieren diese IL-18-stimulierten NK-Zellen aktivierte CTL (112). Nicht nur aktivierte CTL, sondern auch unreife DC's werden durch c-Kit⁺ NK-Zellen *in vitro* getötet (113). Der adoptive Transfer c-Kit⁺ NK-Zellen reduziert *in vivo* die DC's in Milz und Lunge (113). Kann

die Abnahme der T-Zellen und DC's durch eine erhöhte Expression von c-Kit auf NK-Zellen durch die Behandlung der TAZ10-Mäuse mit IL-18 erklärt werden? *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass aus TAZ10-Mäusen isolierte c-Kit⁻ NK-Zellen ebenfalls konzentrationsabhängig vermehrt c-Kit auf ihrer Oberfläche nach Inkubation mit IL-18 exprimieren. Frequenz und Anzahl der c-Kit⁺ NK-Zellen sind *in vivo* hingegen unter der Behandlung mit IL-18 tendenziell erniedrigt. Demnach führte die Behandlung mit IL-18 *in vivo* nicht zu einer erhöhten Expression von c-Kit auf NK-Zellen im TAZ10-Mausmodell, obwohl erhöhte c-Kit-Expressionen auf NK-Zellen durch IL-18 im C57BL/6-Modell (113) sowie im STZ-Mausmodell (112) *in vivo* induziert werden konnten. Woran kann das liegen? Während die Konzentrationen von 1 µg IL-18 (113) bzw. 500 ng IL-18 (112) mit den Konzentrationen, die in dieser Arbeit verwendet wurden (100 ng bzw. 1 µg IL-18), vergleichbar waren, unterscheidet sich die Behandlungsdauer zwischen den Projekten. Bei den C57BL/6-Mäusen betrug die Behandlungsdauer maximal 5 Tage (113) und bei den STZ-Mäusen 8 Tage (112) - wohingegen die TAZ10-Mäuse 16 Wochen lang mit IL-18 gespritzt wurden. Die gesteigerte Expression von c-Kit auf NK-Zellen durch IL-18 ist demnach womöglich nicht nur konzentrationsabhängig sondern auch abhängig von der Behandlungsdauer. Uchida *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass die Produktion von Th1- und Th2-Zytokinen abhängig ist von der Zeitspanne, die zwischen der Behandlung mit IL-18 und der mit α-Galactosylceramide (α-GalCer) - einem Ligand, der NKT-Zellen (Natürliche Killer-T-Zellen) aktiviert - liegt (114). Möglicherweise liegen die Konzentrationen von 100 ng bzw. 1 µg IL-18 / 20 g KG zweimal pro Woche für 16 Wochen nicht in dem Zeitfenster, in dem IL-18 die Expression von c-Kit auf NK-Zellen erhöht. Schlussfolgernd ist die Abnahme der T-Zellen und DC's unter der Behandlung mit IL-18 nicht auf eine Lyse von T-Zellen und DC's durch c-Kit⁺ NK-Zellen zurückzuführen. In den kommenden Abschnitten wird ohne Bezug auf die AIT näher auf die Abnahme der angeborenen und erworbenen Immunzellen durch die Gabe von IL-18 eingegangen.

5.2 Wirkung von Interleukin-18 auf Immunzellen von TAZ10-Mäusen

Die Behandlung mit IL-18 führte zu einer Immunsuppression. Wir verabreichten IL-18 intraperitoneal, zweimal pro Woche, 16 bzw. 26 Wochen lang, ab der 4. Lebenswoche, mit folgenden Konzentrationen: 100 ng IL-18 / 20 g KG und 1 µg IL-18 / 20 g KG. Shibatomi *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit, dass IL-18 und NK-Zellen beim Menschen invers miteinander korrelieren (111). Auch in unserer Arbeit nahmen die NK-Zellen unter der Behandlung mit IL-18 ab. Die NK-Zellen sinken in der Milz unter der Behandlung mit 100 ng IL-18 sowie

1 µg IL-18 / 20 g KG im Vergleich mit der Kontrollgruppe. IL-18 induziert T-Zell-Proliferation *in vitro* (34,36). Die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse haben tendenziell weniger CTL in der Milz als die Kontrollmäuse. Signifikant weniger T-Helferzellen hatten die mit 1 µg IL-18 / 20 g KG therapierten Mäuse. Krishna *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass die chronische Aktivierung der Kinase IKKβ die T-Zell-Funktion und das T-Zell-Überleben beeinträchtigt (115). Da IL-18 die Phosphorylierung von IKKα/β induziert (43), handelt es sich hier um vergleichbare Phänomene. Aber nicht nur die NK- und T-Zellen sind runterreguliert, sondern auch die DC's. Sowohl unter der Behandlung mit 100 ng IL-18 / 20 g KG als auch mit 1 µg IL-18 / 20 g KG sinken die DC's in der Milz, im Knochenmark und im Blut. Die Auswirkungen von IL-18 auf DC's sind in anderen Arbeiten noch nicht untersucht - jedoch wiesen Larghi *et al.* nach, dass eine Akkumulierung von p50, einer Untereinheit von NFκB, die Lebensspanne von DC's verkürzt (116). Da IL-18 über eine Wirkkaskade die Aktivierung von NFκB induziert (43), sind die Ergebnisse konform. p50 induziert die Bax-Expression in DC's - und Bax, ein Cofaktor des Tumorsuppressors p53, scheint an der Induktion des Zelltods der DC's beteiligt zu sein (116). Zusammenfassend können Immunzellen sowohl des erworbenen als auch angeborenen Immunsystems durch IL-18 runterreguliert werden.

5.3 Immunsuppression durch Interleukin-18 - Welcher Mechanismus ist verantwortlich?

Änderte sich die Expression von Fas und/oder FasL auf den Immunzellen und stellt dies eine mögliche Erklärung für die durch IL-18 induzierte Immunsuppression dar? Fas ist ein Rezeptor auf einer Zelle, der durch Bindung seines Liganden - Fas-Ligand (FasL) - die Apoptose dieser Zelle auslöst. Der Fas-FasL-Mechanismus spielt bei dem beeinträchtigten T-Zell-Überleben durch chronische IKKβ-Aktivierung eine Rolle (115). Die Expression von Fas und FasL auf den CTL bzw. die Anzahl der Fas bzw. FasL positiven CTL war durch IL-18 nicht verändert. Die Anzahl der Fas bzw. FasL positiven T-Helferzellen war durch IL-18 ebenfalls nicht verändert. Verändert war folgendes: Die T-Helferzellen der mit 1 µg IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse zeigten eine signifikant höhere Expression von Fas auf ihrer Oberfläche als die mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Tiere und tendenziell als die Kontrolltiere. Die Hochregulation von Fas auf T-Helferzellen unter der Behandlung mit 1 µg IL-18 / 20 g KG ist eine mögliche Erklärung für die Abnahme der T-Helferzellen unter 1 µg IL-18 / 20 g KG, da bei diesen Zellen vermehrt Apoptose über den Fas-FasL-Signalweg induziert worden sein könnte. Im Einklang mit diesem Ergebnis ist, dass die chronische

Aktivierung von IKK β zu einer erhöhten Expression von Fas-mRNA bei T-Helferzellen führte (115). Obwohl Krishna *et al.* in ihrer Arbeit eine vermehrte Expression von FasL-mRNA in den CTL und T-Helferzellen gemessen haben (115), wurde in dieser Arbeit keine vermehrte Expression von FasL auf der Oberfläche der CTL oder T-Helferzellen nachgewiesen.

Eine Erhöhung der FasL-Expression auf dem NK-Zell-Klon LNK5E6 durch IL-18 konnte *in vitro* nachgewiesen werden (117). Die NK-Zellen der TAZ10-Mäuse zeigten keine veränderte Expression von Fas oder FasL unter der Behandlung mit IL-18. Auch die Anzahl der Fas bzw. FasL positiven NK-Zellen blieb unverändert. Es ist möglich, dass IL-18 die Expression von FasL auf NK1.1⁺ NK-Zellen von TAZ10-Mäusen nicht erhöht im Gegensatz zu einer Erhöhung der FasL-Expression auf dem NK-Zell-Klon LNK5E6 (117). Des Weiteren besteht eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse in dem unterschiedlichen Versuchsaufbau (*in vitro* vs. *in vivo*, unterschiedliche Inkubationszeit/Behandlungsdauer usw.).

IL-18 wirkte sich nicht auf die Fas-Expression von DC's oder auf die Anzahl der Fas positiven DC's aus. Die FasL-Expression auf DC's ist signifikant erhöht unter der Behandlung mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG im Vergleich mit den mit 100 ng IL-18 / 20 g KG therapierten Mäusen - und tendenziell erhöht im Vergleich mit den Kontrolltieren. Die Anzahl der FasL-tragenden DC's zeigt die gleiche Tendenz wie die Frequenz. Dadurch könnten die DC's bei den mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG behandelten Mäusen vermehrt Apoptose induziert haben. Dennoch ist es zusammenfassend gesehen unwahrscheinlich, dass die erhöhte Expression von FasL auf DC's für die Runterregulierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems in diesem Maße allein verantwortlich ist. Andere Arbeiten zu dem Thema Expression von Fas bzw. FasL auf DC's unter der Therapie mit IL-18 existieren aktuell nicht.

Zur weiteren Abklärung wie es zur Immunsuppression durch IL-18 kam, wurden Frequenz und Anzahl intrazellulär IL-2 tragender CTL untersucht. IL-2 ist ein T-Zell-Wachstumsfaktor. Krishna *et al.* zeigten, dass die chronische Aktivierung von IKK β zu einer geringeren Produktion von IL-2 durch T-Zellen führt (115). Das T-Zell-Überleben konnte durch die Gabe von IL-2 verbessert werden (115). IL-18 erhöht die Produktion von IL-2 durch T-Zellen und führt dosisabhängig zu einer T-Zell-Proliferation (38). Da die T-Zell-Proliferation durch neutralisierende IL-2-Antikörper gehemmt werden konnte, lässt sich vermuten, dass die T-Zell-Proliferation auf der Produktion von IL-2 durch T-Zellen beruht (38). Da die lebenden/CD45⁺/CD8⁺/IL-2⁺ Zellen unter der Behandlung mit IL-18 im TAZ10-Mausmodell keinen signifikanten Unterschied - wenn auch eine tendenzielle Abnahme in Bezug auf die mit 1 μ g IL-18 / 20 g KG behandelten Mäuse - zeigten, ist die Runterregulierung des

erworbenen Immunsystems am ehesten nicht auf eine geringere IL-2-Bildung durch CTL zurückzuführen.

Schlussfolgernd scheinen noch andere Mechanismen an der Runterregulierung des angeborenen und erworbenen Immunsystems durch IL-18 beteiligt zu sein. IL-18 erhöht z.B. die Perforin-vermittelte zytotoxische Aktivität von NK-Zellen (118) bzw. NK-T-Zellen (119). Die chronische Aktivierung von IKK β beeinträchtigt das T-Zell-Überleben (115) - aber vielleicht nicht nur das, sondern auch das NK-Zell-Überleben oder das Überleben von DC's oder sogar weiterer Immunzellen. IL-18 erhöht möglicherweise über NF κ B/p50 die Expression von Bax in DC's (116) - vielleicht auch in T- und NK-Zellen - und induziert so den Zelltod. Möglicherweise ist die ausgeprägte Reduktion der DC's durch IL-18 auch sekundär für die Abnahme der NK- und T-Zellen verantwortlich. Diese und andere Mechanismen wurden in dieser Arbeit nicht untersucht.

5.4 Immunsuppression mit zunehmendem Alter der TAZ10-Mäuse

Dieser Abschnitt behandelt die scheinbar fehlende Funktionalität der AIT bei den 30 Wochen alten Mäusen. Quaratino *et al.* beschreiben in ihrer Arbeit, dass 50% der TAZ10-Mäuse ab der 12. und fast alle ab der 24. Woche histologische und hormonelle Zeichen einer Hypothyreose aufweisen (99). Nach den Thyroxin-Konzentrationen im Serum unserer TAZ10-Mäuse zu urteilen, liegt bei einem Lebensalter von 30 Wochen keine Hypothyreose vor: Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Thyroxin-Konzentrationen der 30 Wochen alten Mäuse und den Wildtyp-Mäusen. Zudem haben die 30 Wochen alten TAZ10-Mäuse signifikant mehr Thyroxin im Serum als die 20 Wochen alten TAZ10-Mäuse. Das deutet darauf hin, dass die AIT bei den 30 Wochen alten TAZ10-Mäusen nicht mehr aktiv ist, obwohl das Schilddrüsengewebe wie bei den 20 Wochen alten Mäusen histologisch zerstört ist (Fotos nicht gezeigt) und die Schilddrüse mit T-Zellen infiltriert ist (Fotos nicht gezeigt). Die TAZ10-Mäuse scheinen eine AIT zu entwickeln, deren Hormonlage sich im Alter von 30 Wochen wieder normwertig stabilisiert, während die Zerstörung des Schilddrüsengewebes bestehen bleibt. Eine mögliche Erklärung ist die signifikante Abnahme der NK-Zellen in Milz, Knochenmark und Blut, der DC's in Milz und Blut sowie die signifikante Abnahme der TPO-spezifischen T-Helferzellen und die tendenzielle Abnahme der TPO-spezifischen CTL in der Milz der 30 Wochen alten Mäuse im Vergleich mit den 20 Wochen alten Mäusen. Es kommt demnach zu einer ausgeprägten Immunreduktion mit dem Alter. Dagegen spricht die signifikante Zunahme der TPO-spezifischen CTL der 30 Wochen alten Mäuse im Vergleich mit den 20 Wochen alten Mäusen im Blut. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass

die höheren Thyroxin-Konzentrationen im Serum der 30 Wochen alten Mäuse auf eine Fehlmessung zurückzuführen sind, da der ELISA lediglich einmal durchgeführt werden konnte. Unter der Annahme, dass die AIT bei 30 Wochen alten TAZ10-Mäusen tatsächlich nicht mehr aktiv wäre: Das Zeitfenster einer bei fast allen TAZ10-Mäusen hormonell sichtbaren Hypothyreose würde sich auf die 24.-29. Lebenswoche beschränken.

5.5 Selbstkritik

Im folgenden nenne ich Kritikpunkte an meiner eigenen Arbeit:

1. Über die Veränderung der Immunzellen in den Lymphknoten und Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse unter der Behandlung mit IL-18 kann keine Aussage getroffen werden. Die Anzahl der immunologischen Zellen in den Lymphknoten und Schilddrüsen der TAZ10-Mäuse war gering. Bei beiden Organen zeigte sich in der Durchflusszytometrie jeweils eine Population - unabhängig davon, welche fluoreszierenden Antikörper gemessen worden waren. Durch diese Populationen verlief jeweils das *Gate*, das anhand der Isotyp-Kontrollen festgelegt worden war. Eine Auswertung dieser Messungen war nicht möglich. Über das phänotypische Verhalten der Immunzellen in diesen zwei Organen unter der Behandlung mit IL-18 konnte anhand der Durchflusszytometrie keine Aussage getroffen werden.
2. Die Fluoreszenzmessung folgender Antikörper durch das Durchflusszytometer war zu gering für eine Auswertung bzw. ergab keine eindeutige Population/Subpopulation in einem *Gate* des *Dot Plot*: CD40L (CD40-Ligand, CD154), Foxp3 (*forkhead box P3*), CD25, IL-17, PD1-L (*programmed death-1-Ligand*, CD274), CD80 und CD86. Aufgrund des folgenden Zusammenhangs wurden die Antikörper gemessen: Expression von CD40L auf CTL (aktivierte CTL), Foxp3 auf CTL bzw. T-Helferzellen (regulatorische T-Zellen), CD25 auf CTL bzw. T-Helferzellen (regulatorische T-Zellen), IL-17 in T-Helferzellen (Th17-Zellen), PD1-L auf c-Kit⁺ NK-Zellen (PD1-L ist ein Todesrezeptor-Ligand und kann zur Apoptose von Zellen beitragen), CD80 bzw. CD86 auf DC's (CD80 und CD86 sind costimulatorische Signale für die T-Zell-Aktivierung auf antigen-präsentierenden Zellen). Ob sich die aktivierten CTL, an dieser Stelle definiert als CD8 und CD40L positive Zellen, die regulatorischen T-Zellen, die Th17-Zellen, die Expression von PD1-L auf c-Kit⁺ NK-Zellen oder die costimulatorischen Signale CD80 und CD86 auf DC's verändert haben, kann nicht beantwortet werden.

3. Das Serum der TAZ10-Mäuse reichte für die einmalige Durchführung eines ELISA. Wir entschieden uns für den Thyroxin-ELISA, weil er bei Mäusen spezifischer ist als der TSH-ELISA. Der TSH-Spiegel im Serum der TAZ10-Mäuse kann demnach hier nicht beurteilt werden. Da das TSH sensibler auf Veränderungen bei Hypothyreose reagiert, haben wir unter Umständen die Erniedrigung oder Erhöhung des TSH im Sinne einer Verbesserung oder Verschlechterung der Hypothyreose bei der AIT der TAZ10-Mäuse nicht sehen können. Die Thyroxin-Konzentration im Serum der TAZ10-Mäuse unter der Behandlung mit IL-18 nahm tendenziell zu im Vergleich mit den Kontrollmäusen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Unterschied statistisch signifikant gewesen wäre, wäre die Anzahl der Versuchstiere höher gewesen.
4. Bei Patienten mit AIT wurden im Mittel 2,9% TPO-spezifische CTL im Blut gemessen (120). Im Gegensatz dazu sind bei den TAZ10-Mäusen aufgrund der transgenen Veränderung 100% der CTL TPO-spezifisch. Dies lässt vermuten, dass die AIT bei den TAZ10-Mäusen aggressiver verläuft als beim Menschen und somit eine Verbesserung der AIT bei diesen Mäusen schwerer zu erreichen ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Gabe von IL-18 beim Menschen zu einer signifikanten Verbesserung der AIT führen könnte.

5.6 Schlussfolgerungen aus dieser Arbeit

Die Gabe von 100 ng IL-18 bzw. 1 µg IL-18 / 20 g KG zweimal pro Woche ab der 4. Lebenswoche für 16 Wochen veränderte nicht den Verlauf der AIT in TAZ10-Mäusen. Immunzellen sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems sanken unter der Behandlung mit IL-18. Den größten Effekt dabei hatte IL-18 auf die DC's. Schlussfolgernd kann IL-18 in hohen Konzentrationen (100 ng IL-18 / 20 g KG bzw. 1 µg IL-18 / 20 g KG bei TAZ10-Mäusen) und bei langer Gabe (16 bzw. 26 Wochen lang bei TAZ10-Mäusen) eine Immunsuppression hervorrufen. Bei Therapien mit IL-18 sollte auf diese potentielle Nebenwirkung im Rahmen von Kontrolluntersuchungen geachtet werden z.B. durch Anamnese sowie körperliche Untersuchung auf Infektionskrankheiten und regelmäßige kleine bzw. große Blutbilder.

6 Ausblick

Welche neuen therapeutischen Möglichkeiten bietet das Zytokin IL-18 in Bezug auf Th1-vermittelte Autoimmunerkrankungen? Die IL-18-Wirkung kann entweder blockiert werden, um den *Th1-Shift* zu beenden oder das Zytokin-Milieu in Richtung Th1-/Th2-Balance verändert werden.

Im Folgenden nenne ich mögliche Therapieansätze, um die Wirkung von IL-18 zu blockieren und den *Th1-Shift* bei Autoimmunerkrankungen zu stoppen:

Die Bildung von IL-18 bzw. aktivem IL-18 könnte durch P2X₇-Antagonisten (40,41) bzw. Caspase-1-Inhibitoren (50) reduziert werden. Desweiteren könnte eine Neutralisierung von IL-18 die Funktionsausübung dessen hemmen - erstens durch den Einsatz von IL-18-Antikörpern oder zweitens durch den IL-18-Antagonisten, dem IL-18BP. Beim Systemischen Lupus erythematodes z.B. konnte durch Initiierung einer Auto-Antikörper-Bildung gegen IL-18 eine Senkung der Mortalität der Mäuse erreicht werden (121). IL-18BP wurde in Mausmodellen z.B. bei der Rheumatoiden Arthritis (122,123), dem Diabetes mellitus Typ 1 (124) und der Multiplen Sklerose (125) erfolgreich eingesetzt. Außerdem könnte in die Wirkkaskade von IL-18 eingegriffen werden: Therapeutische Angriffspunkte könnten der IL-18R - sowohl IL-18R α (61) als auch IL-18R β (62) -, MyD88 (64) oder IRAK (66,126,127) sein. Da der IL-18R auf Th1- aber nicht auf Th2-Zellen exprimiert wird, können IL-18R-Antikörper die Stimulation der Th1-Zellen durch IL-18 selektiv blockieren (128). Xu *et al.* konnten zeigen, dass anti-IL-18R-Antikörper *in vivo* zu einem *Th2-Shift* führen (128).

Veränderung des Zytokin-Milieus, um die Th1-Th2-Balance bei Autoimmunerkrankungen wieder herzustellen:

IL-18 kann sowohl eine Th1- als auch eine Th2-Antwort basierend auf dem vorliegenden Zytokin-Milieu auslösen (106). IL-18 wirkt synergistisch mit IL-12 und induziert den *Th1-Shift* (106). Demnach stellt die Inhibierung von IL-12 z.B. durch den Einsatz von neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen IL-12 eine weitere Therapiemöglichkeit dar, um den *Th1-Shift* durch den synergistischen Effekt von IL-18 und IL-12 zu stoppen. Der Verlauf der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE, entspricht der Multiplen Sklerose im Tiermodell) verbessert sich bei Affen unter der Behandlung mit anti-IL-12p40-Antikörpern (129,130). Während IL-12 die Expression von IL-18R α auf T-Helferzellen erhöht und so den *Th1-Shift* bewirkt, reguliert IL-4 die Expression vom IL-18R α runter und bewirkt die Differenzierung zu Th2-Zellen (131). Ghoreschi *et al.* konnten zeigen, dass eine Behandlung mit IL-4 eine Th2-Antwort induziert und die Psoriasis bei Menschen verbessert

(132). Eine Behandlung mit IL-4 könnte einen *Th2-Shift* auch bei anderen Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen bewirken und so die Th1-Th2-Homöostase wieder herstellen.

Obwohl IL-18 allein einen *Th2-Shift* bewirken kann - ohne selbst Wirkung auf Th2-Zellen zu haben (106) - ist die Therapie mit IL-18 bei Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen nicht zu empfehlen. IL-18 konnte bei NOD-Mäusen sowohl aggravierende (104) als auch protektive (105) Effekte auf den Verlauf des Diabetes mellitus Typ 1 induzieren. In dieser Arbeit hatte die Behandlung mit IL-18 weder einen aggravierenden noch protektiven Effekt auf den Verlauf der AIT im TAZ10-Mausmodell bei gleichzeitiger Runterregulierung sowohl des angeborenen als auch erworbenen Immunsystems. Ein aktuell nicht abschätzbarer Verlauf der entsprechenden Autoimmunerkrankung und das mögliche Auftreten einer schweren Immunsuppression durch IL-18 macht IL-18 als Therapeutikum im Rahmen von Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen unattraktiv. Hohes therapeutisches Potential ist insbesondere in dem Einsatz von IL-18- oder IL-18R-Antikörpern, IL-18BP, IL-12-Antikörpern oder IL-4 zu erwarten. Bei Betrachtung der oben aufgeführten möglichen therapeutischen Strategien sind diese fünf aktuell am voraussichtlich nebenwirkungsärmsten mit gleichzeitig guter Aussicht auf einen protektiven Effekt bei Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen. Es ist sinnvoll, diese therapeutischen Möglichkeiten im Rahmen von Th1-vermittelten Autoimmunerkrankungen weiter zu verfolgen.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Vanderpump MP, Tunbridge WM, French JM, Appleton D, Bates D, Clark F, u. a. The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clin Endocrinol (Oxf)*. Juli 1995;43(1):55–68.
2. Hollowell JG, Staehling NW, Flanders WD, Hannon WH, Gunter EW, Spencer CA, u. a. Serum TSH, T(4), and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J Clin Endocrinol Metab*. Februar 2002;87(2):489–99.
3. Latina A, Gullo D, Trimarchi F, Benvenga S. Hashimoto's thyroiditis: similar and dissimilar characteristics in neighboring areas. Possible implications for the epidemiology of thyroid cancer. *PLoS ONE*. 2013;8(3):e55450.
4. Hansen PS, Brix TH, Iachine I, Kyvik KO, Hegedüs L. The relative importance of genetic and environmental effects for the early stages of thyroid autoimmunity: a study of healthy Danish twins. *Eur J Endocrinol*. Januar 2006;154(1):29–38.
5. Braverman LE, Ingbar SH, Vagenakis AG, Adams L, Maloof F. Enhanced susceptibility to iodide myxedema in patients with Hashimoto's disease. *J Clin Endocrinol Metab*. April 1971;32(4):515–21.
6. Tajiri J, Higashi K, Morita M, Umeda T, Sato T. Studies of hypothyroidism in patients with high iodine intake. *J Clin Endocrinol Metab*. August 1986;63(2):412–7.
7. Turker O, Kumanlioglu K, Karapolat I, Dogan I. Selenium treatment in autoimmune thyroiditis: 9-month follow-up with variable doses. *J Endocrinol*. Juli 2006;190(1):151–6.
8. Duntas LH, Mantzou E, Koutras DA. Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol*. April 2003;148(4):389–93.
9. Karanikas G, Schuetz M, Kontur S, Duan H, Kommata S, Schoen R, u. a. No immunological benefit of selenium in consecutive patients with autoimmune thyroiditis. *Thyroid*. Januar 2008;18(1):7–12.
10. Carlé A, Bülow Pedersen I, Knudsen N, Perrild H, Ovesen L, Banke Rasmussen L, u. a. Smoking cessation is followed by a sharp but transient rise in the incidence of overt autoimmune hypothyroidism - a population-based, case-control study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. November 2012;77(5):764–72.
11. Blackard JT, Kong L, Huber AK, Tomer Y. Hepatitis C virus infection of a thyroid cell line: implications for pathogenesis of hepatitis C virus and thyroiditis. *Thyroid*. Juli 2013;23(7):863–70.
12. Bartolomé J, Rodríguez-Iñigo E, Quadros P, Vidal S, Pascual-Miguelañez I, Rodríguez-Montes JA, u. a. Detection of hepatitis C virus in thyroid tissue from patients with chronic HCV infection. *J Med Virol*. September 2008;80(9):1588–94.
13. Boelaert K, Newby PR, Simmonds MJ, Holder RL, Carr-Smith JD, Heward JM, u. a. Prevalence and relative risk of other autoimmune diseases in subjects with autoimmune

- thyroid disease. *Am J Med.* Februar 2010;123(2):183.e1-9.
14. Somers EC, Thomas SL, Smeeth L, Hall AJ. Are individuals with an autoimmune disease at higher risk of a second autoimmune disorder? *Am J Epidemiol.* 15. März 2009;169(6):749–55.
 15. Umpierrez GE, Latif KA, Murphy MB, Lambeth HC, Stentz F, Bush A, u. a. Thyroid dysfunction in patients with type 1 diabetes: a longitudinal study. *Diabetes Care.* April 2003;26(4):1181–5.
 16. Kordonouri O, Deiss D, Danne T, Dorow A, Bassir C, Grüters-Kieslich A. Predictivity of thyroid autoantibodies for the development of thyroid disorders in children and adolescents with Type 1 diabetes. *Diabet Med.* Juni 2002;19(6):518–21.
 17. Antonelli A, Fallahi P, Mosca M, Ferrari SM, Ruffilli I, Corti A, u. a. Prevalence of thyroid dysfunctions in systemic lupus erythematosus. *Metab Clin Exp.* Juni 2010;59(6):896–900.
 18. Kumar K, Kole AK, Karmakar PS, Ghosh A. The spectrum of thyroid disorders in systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int.* Januar 2012;32(1):73–8.
 19. Cárdenas Roldán J, Amaya-Amaya J, Castellanos-de la Hoz J, Giraldo-Villamil J, Montoya-Ortiz G, Cruz-Tapias P, u. a. Autoimmune thyroid disease in rheumatoid arthritis: a global perspective. *Arthritis.* 2012;2012:864907.
 20. Atzeni F, Doria A, Ghirardello A, Turiel M, Batticciotto A, Carrabba M, u. a. Anti-thyroid antibodies and thyroid dysfunction in rheumatoid arthritis: prevalence and clinical value. *Autoimmunity.* Februar 2008;41(1):111–5.
 21. Dittmar M, Kahaly GJ. Polyglandular autoimmune syndromes: immunogenetics and long-term follow-up. *J Clin Endocrinol Metab.* Juli 2003;88(7):2983–92.
 22. Armengol MP, Juan M, Lucas-Martín A, Fernández-Figuera MT, Jaraquemada D, Gallart T, u. a. Thyroid autoimmune disease: demonstration of thyroid antigen-specific B cells and recombination-activating gene expression in chemokine-containing active intrathyroidal germinal centers. *Am J Pathol.* September 2001;159(3):861–73.
 23. Amani HK. Histopathologic and immunohistochemical features of Hashimoto thyroiditis. *Indian J Pathol Microbiol.* September 2011;54(3):464–71.
 24. Sugihara S, Fujiwara H, Niimi H, Shearer GM. Self-thyroid epithelial cell (TEC)-reactive CD8+ T cell lines/clones derived from autoimmune thyroiditis lesions. They recognize self-thyroid antigens directly on TEC to exhibit T helper cell 1-type lymphokine production and cytotoxicity against TEC. *J Immunol.* 1. August 1995;155(3):1619–28.
 25. Nielsen CH, Brix TH, Gardas A, Banga JP, Hegedüs L. Epitope recognition patterns of thyroid peroxidase autoantibodies in healthy individuals and patients with Hashimoto's thyroiditis*. *Clin Endocrinol (Oxf).* Oktober 2008;69(4):664–8.
 26. Liu M, Zhao L, Gao Y, Huang Y, Lu G, Guo X. Epitope recognition patterns of thyroglobulin antibody in sera from patients with Hashimoto's thyroiditis on different thyroid functional status. *Clin Exp Immunol.* Dezember 2012;170(3):283–90.
 27. Fisfalen ME, Soliman M, Okamoto Y, Soltani K, DeGroot LJ. Proliferative responses of

- T-cells to thyroid antigens and synthetic thyroid peroxidase peptides in autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* Mai 1995;80(5):1597–604.
28. Ewins DL, Barnett PS, Ratanachaiyavong S, Sharrock C, Lanchbury J, McGregor AM, u. a. Antigen-specific T cell recognition of affinity-purified and recombinant thyroid peroxidase in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol.* Oktober 1992;90(1):93–8.
 29. Garber JR, Cobin RH, Gharib H, Hennessey JV, Klein I, Mechanick JI, u. a. Clinical practice guidelines for hypothyroidism in adults: cosponsored by the American Association of Clinical Endocrinologists and the American Thyroid Association. *Endocr Pract.* Dezember 2012;18(6):988–1028.
 30. Fiore E, Rago T, Latrofa F, Provenzale MA, Piaggi P, Delitala A, u. a. Hashimoto's thyroiditis is associated with papillary thyroid carcinoma: role of TSH and of treatment with L-thyroxine. *Endocr Relat Cancer.* August 2011;18(4):429–37.
 31. Jonklaas J, Bianco AC, Bauer AJ, Burman KD, Cappola AR, Celi FS, u. a. Guidelines for the treatment of hypothyroidism: prepared by the american thyroid association task force on thyroid hormone replacement. *Thyroid.* Dezember 2014;24(12):1670–751.
 32. Rothe H, Jenkins NA, Copeland NG, Kolb H. Active stage of autoimmune diabetes is associated with the expression of a novel cytokine, IGIF, which is located near Idd2. *J Clin Invest.* 1. Februar 1997;99(3):469–74.
 33. Nolan KF, Greaves DR, Waldmann H. The human interleukin 18 gene IL18 maps to 11q22.2-q22.3, closely linked to the DRD2 gene locus and distinct from mapped IDDM loci. *Genomics.* 1. Juli 1998;51(1):161–3.
 34. Nakamura K, Okamura H, Nagata K, Komatsu T, Tamura T. Purification of a factor which provides a costimulatory signal for gamma interferon production. *Infect Immun.* Januar 1993;61(1):64–70.
 35. Ushio S, Namba M, Okura T, Hattori K, Nukada Y, Akita K, u. a. Cloning of the cDNA for human IFN-gamma-inducing factor, expression in *Escherichia coli*, and studies on the biological activities of the protein. *J Immunol.* 1. Juni 1996;156(11):4274–9.
 36. Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, u. a. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature.* 2. November 1995;378(6552):88–91.
 37. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, u. a. IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol.* 1. Oktober 1998;161(7):3400–7.
 38. Micallef MJ, Ohtsuki T, Kohno K, Tanabe F, Ushio S, Namba M, u. a. Interferon-gamma-inducing factor enhances T helper 1 cytokine production by stimulated human T cells: synergism with interleukin-12 for interferon-gamma production. *Eur J Immunol.* Juli 1996;26(7):1647–51.
 39. Netea MG, Kullberg BJ, Verschueren I, Van Der Meer JW. Interleukin-18 induces production of proinflammatory cytokines in mice: no intermediate role for the cytokines of the tumor necrosis factor family and interleukin-1beta. *Eur J Immunol.* Oktober 2000;30(10):3057–60.

40. Piccini A, Carta S, Tassi S, Lasiglié D, Fossati G, Rubartelli A. ATP is released by monocytes stimulated with pathogen-sensing receptor ligands and induces IL-1beta and IL-18 secretion in an autocrine way. *Proc Natl Acad Sci USA*. 10. Juni 2008;105(23):8067–72.
41. Mehta VB, Hart J, Wewers MD. ATP-stimulated release of interleukin (IL)-1beta and IL-18 requires priming by lipopolysaccharide and is independent of caspase-1 cleavage. *J Biol Chem*. 9. Februar 2001;276(6):3820–6.
42. Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Müller G, Yamauchi H, Kurimoto M, u. a. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol*. Oktober 1998;28(10):3231–9.
43. Fortin CF, Ear T, McDonald PP. Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammatory cytokine generation by human neutrophils. *FASEB J*. Januar 2009;23(1):194–203.
44. Stoll S, Müller G, Kurimoto M, Saloga J, Tanimoto T, Yamauchi H, u. a. Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes. *J Immunol*. 1. Juli 1997;159(1):298–302.
45. Takeuchi M, Nishizaki Y, Sano O, Ohta T, Ikeda M, Kurimoto M. Immunohistochemical and immuno-electron-microscopic detection of interferon-gamma-inducing factor („interleukin-18“) in mouse intestinal epithelial cells. *Cell Tissue Res*. September 1997;289(3):499–503.
46. Sugawara S, Uehara A, Nochi T, Yamaguchi T, Ueda H, Sugiyama A, u. a. Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. *J Immunol*. 1. Dezember 2001;167(11):6568–75.
47. Udagawa N, Horwood NJ, Elliott J, Mackay A, Owens J, Okamura H, u. a. Interleukin-18 (interferon-gamma-inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon-gamma to inhibit osteoclast formation. *J Exp Med*. 17. März 1997;185(6):1005–12.
48. Takiyama Y, Miyokawa N, Tokusashi Y, Ito K, Kato S, Kimura S, u. a. Thyroid-stimulating hormone induces interleukin-18 gene expression in FRTL-5 cells: immunohistochemical detection of interleukin-18 in autoimmune thyroid disease. *Thyroid*. November 2002;12(11):935–43.
49. Liu Z, Wang H, Xiao W, Wang C, Liu G, Hong T. Thyrocyte interleukin-18 expression is up-regulated by interferon- γ and may contribute to thyroid destruction in Hashimoto's thyroiditis. *Int J Exp Pathol*. Oktober 2010;91(5):420–5.
50. Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, u. a. Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science*. 10. Januar 1997;275(5297):206–9.
51. Akita K, Ohtsuki T, Nukada Y, Tanimoto T, Namba M, Okura T, u. a. Involvement of caspase-1 and caspase-3 in the production and processing of mature human interleukin 18 in monocytic THP.1 cells. *J Biol Chem*. 17. Oktober 1997;272(42):26595–603.

52. Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, Kitano S, Kakeda M, Akeda T, u. a. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci*. August 2010;59(2):129–35.
53. Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, u. a. Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 19. Mai 1997;234(2):454–7.
54. Banerjee S, Bond JS. Prointerleukin-18 is activated by meprin beta in vitro and in vivo in intestinal inflammation. *J Biol Chem*. 14. November 2008;283(46):31371–7.
55. Omoto Y, Tokime K, Yamanaka K, Habe K, Morioka T, Kurokawa I, u. a. Human mast cell chymase cleaves pro-IL-18 and generates a novel and biologically active IL-18 fragment. *J Immunol*. 15. Dezember 2006;177(12):8315–9.
56. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. 3. Mai 1996;272(5262):735–8.
57. Filippini A, Taffs RE, Sitkovsky MV. Extracellular ATP in T-lymphocyte activation: possible role in effector functions. *Proc Natl Acad Sci USA*. November 1990;87(21):8267–71.
58. Perregaux DG, McNiff P, Laliberte R, Conklyn M, Gabel CA. ATP acts as an agonist to promote stimulus-induced secretion of IL-1 beta and IL-18 in human blood. *J Immunol*. 15. Oktober 2000;165(8):4615–23.
59. Tsutsui H, Kayagaki N, Kuida K, Nakano H, Hayashi N, Takeda K, u. a. Caspase-1-independent, Fas/Fas ligand-mediated IL-18 secretion from macrophages causes acute liver injury in mice. *Immunity*. September 1999;11(3):359–67.
60. Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunikata T, u. a. Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor. *J Biol Chem*. 10. Oktober 1997;272(41):25737–42.
61. Hoshino K, Tsutsui H, Kawai T, Takeda K, Nakanishi K, Takeda Y, u. a. Cutting edge: generation of IL-18 receptor-deficient mice: evidence for IL-1 receptor-related protein as an essential IL-18 binding receptor. *J Immunol*. 1. Mai 1999;162(9):5041–4.
62. Cheung H, Chen N-J, Cao Z, Ono N, Ohashi PS, Yeh W-C. Accessory protein-like is essential for IL-18-mediated signaling. *J Immunol*. 1. Mai 2005;174(9):5351–7.
63. Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE. Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem*. 6. November 1998;273(45):29445–50.
64. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, u. a. Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. Juli 1998;9(1):143–50.
65. Wald D, Commane M, Stark GR, Li X. IRAK and TAK1 are required for IL-18-mediated signaling. *Eur J Immunol*. Dezember 2001;31(12):3747–54.
66. Kanakaraj P, Ngo K, Wu Y, Angulo A, Ghazal P, Harris CA, u. a. Defective interleukin (IL)-18-mediated natural killer and T helper cell type 1 responses in IL-1 receptor-associated kinase (IRAK)-deficient mice. *J Exp Med*. 5. April 1999;189(7):1129–38.

67. Kojima H, Takeuchi M, Ohta T, Nishida Y, Arai N, Ikeda M, u. a. Interleukin-18 activates the IRAK-TRAF6 pathway in mouse EL-4 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 6. März 1998;244(1):183–6.
68. Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature.* 6. Februar 1997;385(6616):540–4.
69. Wyman TH, Dinarello CA, Banerjee A, Gamboni-Robertson F, Hiester AA, England KM, u. a. Physiological levels of interleukin-18 stimulate multiple neutrophil functions through p38 MAP kinase activation. *J Leukoc Biol.* August 2002;72(2):401–9.
70. Kalina U, Kauschat D, Koyama N, Nuernberger H, Ballas K, Koschmieder S, u. a. IL-18 activates STAT3 in the natural killer cell line 92, augments cytotoxic activity, and mediates IFN-gamma production by the stress kinase p38 and by the extracellular regulated kinases p44erk-1 and p42erk-21. *J Immunol.* 1. August 2000;165(3):1307–13.
71. Chandrasekar B, Patel DN, Mummidi S, Kim J, Clark RA, Valente AJ. Interleukin-18 suppresses adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes via a novel signal transduction pathway involving ERK1/2-dependent NFATc4 phosphorylation. *J Biol Chem.* 15. Februar 2008;283(7):4200–9.
72. Shimoda K, Tsutsui H, Aoki K, Kato K, Matsuda T, Numata A, u. a. Partial impairment of interleukin-12 (IL-12) and IL-18 signaling in Tyk2-deficient mice. *Blood.* 15. März 2002;99(6):2094–9.
73. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity.* Januar 1999;10(1):127–36.
74. Aizawa Y, Akita K, Taniai M, Torigoe K, Mori T, Nishida Y, u. a. Cloning and expression of interleukin-18 binding protein. *FEBS Lett.* 26. Februar 1999;445(2–3):338–42.
75. Kim SH, Eisenstein M, Reznikov L, Fantuzzi G, Novick D, Rubinstein M, u. a. Structural requirements of six naturally occurring isoforms of the IL-18 binding protein to inhibit IL-18. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1. Februar 2000;97(3):1190–5.
76. Paulukat J, Bosmann M, Nold M, Garkisch S, Kämpfer H, Frank S, u. a. Expression and release of IL-18 binding protein in response to IFN-gamma. *J Immunol.* 15. Dezember 2001;167(12):7038–43.
77. Katakami N, Kaneto H, Matsuhisa M, Yoshiuchi K, Kato K, Yamamoto K, u. a. Serum interleukin-18 levels are increased and closely associated with various soluble adhesion molecule levels in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care.* Januar 2007;30(1):159–61.
78. Altinova AE, Yetkin I, Akbay E, Bukan N, Arslan M. Serum IL-18 levels in patients with type 1 diabetes: relations to metabolic control and microvascular complications. *Cytokine.* Mai 2008;42(2):217–21.
79. Dong G, Liang L, Fu J, Zou C. Serum interleukin-18 levels are raised in diabetic ketoacidosis in Chinese children with type 1 diabetes mellitus. *Indian Pediatr.* Oktober 2007;44(10):732–6.
80. Kuryliszyn-Moskal A, Dubicki A, Zarzycki W, Zonnenberg A, Górska M. Microvascular abnormalities in capillaroscopy correlate with higher serum IL-18 and sE-selectin levels

- in patients with type 1 diabetes complicated by microangiopathy. *Folia Histochem Cytobiol.* 2011;49(1):104–10.
81. Park MC, Park YB, Lee SK. Elevated interleukin-18 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol.* Juni 2004;23(3):225–9.
 82. Wong CK, Li EK, Ho CY, Lam CW. Elevation of plasma interleukin-18 concentration is correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford).* Oktober 2000;39(10):1078–81.
 83. Yamamura M, Kawashima M, Tani M, Yamauchi H, Tanimoto T, Kurimoto M, u. a. Interferon-gamma-inducing activity of interleukin-18 in the joint with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* Februar 2001;44(2):275–85.
 84. Petrovic-Rackov L, Pejnovic N. Clinical significance of IL-18, IL-15, IL-12 and TNF- α measurement in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* Juli 2006;25(4):448–52.
 85. Shao X-T, Feng L, Gu L-J, Wu L-J, Feng T-T, Yang Y-M, u. a. Expression of interleukin-18, IL-18BP, and IL-18R in serum, synovial fluid, and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med.* September 2009;9(3):215–21.
 86. Losy J, Niezgoda A. IL-18 in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* September 2001;104(3):171–3.
 87. Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Foley E, u. a. IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol.* 1. Juni 1999;162(11):6829–35.
 88. Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, u. a. Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol.* 1. Juli 1999;163(1):143–7.
 89. Gangemi S, Merendino RA, Guarneri F, Minciullo PL, DiLorenzo G, Pacor M, u. a. Serum levels of interleukin-18 and s-ICAM-1 in patients affected by psoriasis: preliminary considerations. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* Januar 2003;17(1):42–6.
 90. Ohta Y, Hamada Y, Katsuoka K. Expression of IL-18 in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* Juli 2001;293(7):334–42.
 91. Companjen A, van der Wel L, van der Fits L, Laman J, Prens E. Elevated interleukin-18 protein expression in early active and progressive plaque-type psoriatic lesions. *Eur Cytokine Netw.* September 2004;15(3):210–6.
 92. Drugarin D, Negru S, Koreck A, Zosin I, Cristea C. The pattern of a T(H)1 cytokine in autoimmune thyroiditis. *Immunol Lett.* 1. Februar 2000;71(2):73–7.
 93. Kemp EH, Metcalfe RA, Smith KA, Woodroffe MN, Watson PF, Weetman AP. Detection and localization of chemokine gene expression in autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* August 2003;59(2):207–13.
 94. Akeno N, Smith EP, Stefan M, Huber AK, Zhang W, Keddache M, u. a. IFN- α mediates the development of autoimmunity both by direct tissue toxicity and through immune cell recruitment mechanisms. *J Immunol.* 15. April 2011;186(8):4693–706.
 95. Antonelli A, Rotondi M, Fallahi P, Romagnani P, Ferrari SM, Paolicchi A, u. a. Increase

- of interferon-gamma inducible alpha chemokine CXCL10 but not beta chemokine CCL2 serum levels in chronic autoimmune thyroiditis. *Eur J Endocrinol*. Februar 2005;152(2):171–7.
96. Vural P, Degirmencioglu S, Erden S, Gelincik A. The relationship between transforming growth factor-beta1, vascular endothelial growth factor, nitric oxide and Hashimoto's thyroiditis. *Int Immunopharmacol*. Februar 2009;9(2):212–5.
 97. Phenekos C, Vryonidou A, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Goula M, Papamichail M. Th1 and Th2 serum cytokine profiles characterize patients with Hashimoto's thyroiditis (Th1) and Graves' disease (Th2). *Neuroimmunomodulation*. 2004;11(4):209–13.
 98. Huang C-Y, Ting W-H, Lo F-S, Wu Y-L, Chang T-Y, Chan H-W, u. a. The IL18 gene and Hashimoto thyroiditis in children. *Hum Immunol*. Januar 2013;74(1):120–4.
 99. Quaratino S, Badami E, Pang YY, Bartok I, Dyson J, Kioussis D, u. a. Degenerate self-reactive human T-cell receptor causes spontaneous autoimmune disease in mice. *Nat Med*. September 2004;10(9):920–6.
 100. Quaratino S, Feldmann M, Dayan CM, Acuto O, Londei M. Human self-reactive T cell clones expressing identical T cell receptor beta chains differ in their ability to recognize a cryptic self-epitope. *J Exp Med*. 1. Februar 1996;183(2):349–58.
 101. Quaratino S, Thorpe CJ, Travers PJ, Londei M. Similar antigenic surfaces, rather than sequence homology, dictate T-cell epitope molecular mimicry. *Proc Natl Acad Sci USA*. 24. Oktober 1995;92(22):10398–402.
 102. Gracie JA, Forsey RJ, Chan WL, Gilmour A, Leung BP, Greer MR, u. a. A proinflammatory role for IL-18 in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*. November 1999;104(10):1393–401.
 103. Cao R, Farnebo J, Kurimoto M, Cao Y. Interleukin-18 acts as an angiogenesis and tumor suppressor. *FASEB J*. Dezember 1999;13(15):2195–202.
 104. Oikawa Y, Shimada A, Kasuga A, Morimoto J, Osaki T, Tahara H, u. a. Systemic administration of IL-18 promotes diabetes development in young nonobese diabetic mice. *J Immunol*. 1. Dezember 2003;171(11):5865–75.
 105. Rothe H, Hausmann A, Casteels K, Okamura H, Kurimoto M, Burkart V, u. a. IL-18 inhibits diabetes development in nonobese diabetic mice by counterregulation of Th1-dependent destructive insulinitis. *J Immunol*. 1. August 1999;163(3):1230–6.
 106. Xu D, Trajkovic V, Hunter D, Leung BP, Schulz K, Gracie JA, u. a. IL-18 induces the differentiation of Th1 or Th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur J Immunol*. November 2000;30(11):3147–56.
 107. Salzano M, Russo E, Postiglione L, Guerra A, Marotta V, Esposito S, u. a. Interferon- γ inhibits integrin-mediated adhesion to fibronectin and survival signaling in thyroid cells. *J Endocrinol*. Dezember 2012;215(3):439–44.
 108. Guo H, Xu B, Yang X, Wang Y, Liu X, Cui C, u. a. A high frequency of peripheral blood NKG2D⁺NK and NKT cells in euthyroid patients with new onset hashimoto's thyroiditis--a pilot study. *Immunol Invest*. 2014;43(4):312–23.

109. Kabel PJ, Voorbij HA, De Haan M, van der Gaag RD, Drexhage HA. Intrathyroidal dendritic cells. *J Clin Endocrinol Metab.* Januar 1988;66(1):199–207.
110. Simons PJ, Delemarre FG, Drexhage HA. A functional and phenotypic study on immune accessory cells isolated from the thyroids of Wistar and autoimmune-prone BB-DP rats. *J Autoimmun.* Dezember 2000;15(4):417–24.
111. Shibatomi K, Ida H, Yamasaki S, Nakashima T, Origuchi T, Kawakami A, u. a. A novel role for interleukin-18 in human natural killer cell death: high serum levels and low natural killer cell numbers in patients with systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum.* April 2001;44(4):884–92.
112. Ehlers M, Papewalis C, Stenzel W, Jacobs B, Meyer KL, Deenen R, u. a. Immunoregulatory natural killer cells suppress autoimmunity by down-regulating antigen-specific CD8⁺ T cells in mice. *Endocrinology.* September 2012;153(9):4367–79.
113. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Coudert JD, Desbois M, u. a. Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res.* 1. Juni 2012;72(11):2757–67.
114. Uchida T, Kinoshita M, Fukasawa M, Habu Y, Shinomiya N, Seki S. IL-18 time-dependently modulates Th1/Th2 cytokine production by ligand-activated NKT cells. *Eur J Immunol.* April 2007;37(4):966–77.
115. Krishna S, Xie D, Gorentla B, Shin J, Gao J, Zhong X-P. Chronic activation of the kinase IKK β impairs T cell function and survival. *J Immunol.* 1. August 2012;189(3):1209–19.
116. Larghi P, Porta C, Riboldi E, Totaro MG, Carraro L, Orabona C, u. a. The p50 subunit of NF- κ B orchestrates dendritic cell lifespan and activation of adaptive immunity. *PLoS ONE.* 2012;7(9):e45279.
117. Tsutsui H, Nakanishi K, Matsui K, Higashino K, Okamura H, Miyazawa Y, u. a. IFN- γ -inducing factor up-regulates Fas ligand-mediated cytotoxic activity of murine natural killer cell clones. *J Immunol.* 1. November 1996;157(9):3967–73.
118. Hyodo Y, Matsui K, Hayashi N, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yamauchi H, u. a. IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol.* 1. Februar 1999;162(3):1662–8.
119. Dao T, Mehal WZ, Crispe IN. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J Immunol.* 1. September 1998;161(5):2217–22.
120. Ehlers M, Thiel A, Bernecker C, Porwol D, Papewalis C, Willenberg HS, u. a. Evidence of a combined cytotoxic thyroglobulin and thyroperoxidase epitope-specific cellular immunity in Hashimoto's thyroiditis. *J Clin Endocrinol Metab.* April 2012;97(4):1347–54.
121. Bossù P, Neumann D, Del Giudice E, Ciaramella A, Gloaguen I, Fantuzzi G, u. a. IL-18 cDNA vaccination protects mice from spontaneous lupus-like autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 25. November 2003;100(24):14181–6.
122. Plater-Zyberk C, Joosten LA, Helsen MM, Sattouet-Roche P, Siegfried C, Alouani S, u. a. Therapeutic effect of neutralizing endogenous IL-18 activity in the collagen-induced

- model of arthritis. *J Clin Invest.* Dezember 2001;108(12):1825–32.
123. Smeets RL, van de Loo F a. J, Arntz OJ, Bennink MB, Joosten L a. B, van den Berg WB. Adenoviral delivery of IL-18 binding protein C ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Gene Ther.* Juni 2003;10(12):1004–11.
 124. Zaccane P, Phillips J, Conget I, Cooke A, Nicoletti F. IL-18 binding protein fusion construct delays the development of diabetes in adoptive transfer and cyclophosphamide-induced diabetes in NOD mouse. *Clin Immunol.* April 2005;115(1):74–9.
 125. Millward JM, Løbner M, Wheeler RD, Owens T. Inflammation in the central nervous system and Th17 responses are inhibited by IFN-gamma-Induced IL-18 binding protein. *J Immunol.* 15. August 2010;185(4):2458–66.
 126. Guo F, Wu S. Antisense IRAK-1 oligonucleotide blocks activation of NF-kappa B and AP-1 induced by IL-18. *Immunopharmacology.* September 2000;49(3):241–6.
 127. Suzuki N, Chen N-J, Millar DG, Suzuki S, Horacek T, Hara H, u. a. IL-1 receptor-associated kinase 4 is essential for IL-18-mediated NK and Th1 cell responses. *J Immunol.* 15. April 2003;170(8):4031–5.
 128. Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, u. a. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med.* 19. Oktober 1998;188(8):1485–92.
 129. Brok HPM, van Meurs M, Blezer E, Schantz A, Peritt D, Treacy G, u. a. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis in common marmosets using an anti-IL-12p40 monoclonal antibody. *J Immunol.* 1. Dezember 2002;169(11):6554–63.
 130. 't Hart BA, Brok HPM, Remarque E, Benson J, Treacy G, Amor S, u. a. Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *J Immunol.* 1. Oktober 2005;175(7):4761–8.
 131. Smeltz RB, Chen J, Hu-Li J, Shevach EM. Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4(+) T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation. Critical downregulatory role of IL-4. *J Exp Med.* 16. Juli 2001;194(2):143–53.
 132. Ghoreschi K, Thomas P, Breit S, Dugas M, Mailhammer R, van Eden W, u. a. Interleukin-4 therapy of psoriasis induces Th2 responses and improves human autoimmune disease. *Nat Med.* Januar 2003;9(1):40–6.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinem Doktorvater **Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Schott**, der mir die Stelle anbot und dieses Projekt für mich auswählte, der immer wieder viele Ideen in den Raum warf, Resultate mit mir diskutierte und - dafür möchte ich mich besonders Bedanken - immer zeitnah für mich da war und mir immer zuverlässig zur Seite stand.

Dr. rer. nat. Margret Ehlers (Laborleiterin der Speziellen Endokrinologie, Universitätsklinikum Düsseldorf), die mich in die Labortechniken einarbeitete, mir mit unzähligen Ratschlägen zur Seite stand, mich motivierte, neue Ideen lieferte und Literatur hervorzauberte. Zwischen Dr. Margret Ehlers und mir entstand eine private Bindung, für die ich mich ganz besonders bedanke.

Roswitha Charko und **Ulla Dötter**, die mir bei der praktischen Arbeit halfen und mir mit Tipps immer zur Seite standen. Ich danke Ihnen, dass sie ein Auge auf mich hatten.

Meiner **Familie** - insbesondere **Klaus Stenzel**, **Martina Götzen**, **Christiane Leiterer**, **Eike Stenzel** und **Maiko Stenzel**. Meiner Oma, **Elsbeth Leiterer**, für das gute Gefühl und das Vertrauen in mich. Und meinem Onkel **Matthias Leiterer**, der für mich in besonderem Maße da ist.

Meinen wunderbaren Freunden **Michael Wolf**, **Eva Liebsch**, **Kim Weber**, **Andreas Schoonhoven**, **Alisa Horch** und **Stefanie Meeßen**, die mich unterstützen, mich zum Lachen bringen und mich jede Woche fantastisch ablenken.

Und vor allem meinem Ehemann, **Marco Wengert**, für die Unterstützung während des Studiums und während der Erstellung meiner Doktorarbeit. Er motivierte mich, gab mir Halt, Durchhaltevermögen und Zeit, nahm mir Druck und innere Anspannung, sorgte für Ausgleich und viele lustige Momente.

Deshalb widme ich diese Arbeit dem Mann an meiner Seite: **Marco Wengert**.