

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II - Großhadern

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

**Die Bedeutung der IL-10-verwandten Zytokine  
IL-22, IL-28A und IL-29 bei intestinaler Entzündung und  
viraler Infektion**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von Florian Beigel

aus Landshut

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.M. Diepolder

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Koletzko

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Rüssmann

Prof. Dr. Dr. M. Jochum

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Stephan Brand

Dekan: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2008

*Meinem Vater*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Vorbemerkungen .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einführung .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1 IL-10-verwandte Zytokine .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Das Zytokin IL-10 .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 IL-10-Rezeptoren .....	5
1.2.2 IL-10-vermittelte Signaltransduktion .....	5
1.2.3 Biologische Funktionen und klinische Anwendungen von IL-10 .....	7
<b>1.3 Das Zytokin IL-22 .....</b>	<b>7</b>
1.3.1 IL-22-Rezeptoren .....	8
1.3.2 IL-22-vermittelte Signaltransduktion .....	9
1.3.3 Biologische Funktionen von IL-22 .....	9
<b>1.4 Die Zytokine IL-28A und IL-29 (IFN-<math>\lambda</math>2 und IFN-<math>\lambda</math>1) .....</b>	<b>10</b>
1.4.1 IFN- $\lambda$ -Rezeptoren .....	11
1.4.2 IFN- $\lambda$ -vermittelte Signaltransduktion .....	11
1.4.3 Biologische Funktionen von IFN- $\lambda$ s .....	13
<b>1.5 Die Bedeutung von IL-10-verwandten Zytokinen bei entzündlichen Prozessen .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Die Bedeutung von IL-10-verwandten Zytokinen bei viraler Infektion .....</b>	<b>15</b>
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>17</b>

---

<b>3 Material .....</b>	<b>18</b>
<b>3.1 Material für zellbiologische Experimente .....</b>	<b>18</b>
3.1.1 Zelllinien .....	18
3.1.2 Cytomegalie-Virenstämme .....	19
3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze .....	19
3.1.4 Material für Immunfluoreszenzexperimente .....	19
<b>3.2 Material für molekularbiologische Experimente .....</b>	<b>20</b>
3.2.1 PCR-Material und PCR-Kits .....	20
3.2.2 Primer .....	20
3.2.2.1 <i>Real time</i> PCR-Primer .....	20
3.2.2.2 PCR-Primer .....	20
<b>3.3 Material für proteinbiochemische Experimente .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Lysepuffer für die Proteinisolation .....	22
3.3.2 Material für <i>Western Blot</i> -Experimente .....	22
<b>3.4 Material für funktionelle Experimente .....</b>	<b>23</b>
3.4.1 Material für Zellproliferationsexperimente .....	23
3.4.2 Material für Apoptoseexperimente .....	23
<b>3.5 Antikörper .....</b>	<b>24</b>
<b>3.6 Sonstige Chemikalien, Lösungen und Kits .....</b>	<b>25</b>
<b>3.7 Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>27</b>
<b>3.8 Geräte .....</b>	<b>27</b>
<b>3.9 Software .....</b>	<b>29</b>
<b>3.10 Material für Mausexperimente .....</b>	<b>29</b>

---

<b>4 Methoden</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1 Allgemeines</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2 Methoden zellbiologischer Experimente</b> .....	<b>30</b>
4.2.1 Zellkulturexperimente .....	30
4.2.1.1 Kultivierung von Zellen .....	30
4.2.1.2 Einfrieren von Zellen .....	31
4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl .....	31
4.2.1.4 Zellstimulation .....	31
4.2.2 Immunfluoreszenzexperimente .....	31
4.2.3 ELISA-Experimente .....	32
<b>4.3 Methoden molekularbiologischer Experimente</b> .....	<b>32</b>
4.3.1 RNA-Isolation aus Zellen .....	32
4.3.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration .....	33
4.3.3 Entfernung von DNA-Kontaminationen aus der RNA-Präparationen .....	33
4.3.4 Reverse Transkriptions-PCR zur Herstellung von cDNA .....	33
4.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	34
4.3.6 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten .....	35
4.3.7 Densitometrie von PCR-Produkten .....	35
4.3.8 Sequenzierung von PCR-Produkten .....	35
4.3.9 Quantitative Polymerasekettenreaktion ( <i>Real-time PCR</i> ) .....	35
<b>4.4 Methoden proteinbiochemischer Experimente</b> .....	<b>36</b>
4.4.1 Proteinisolation aus Säugerzellen .....	36
4.4.2 Konzentrationsmessung von Proteinen .....	36
4.4.3 <i>Western Blot</i> -Experimente .....	37
<b>4.5 Methoden funktioneller Experimente</b> .....	<b>37</b>
4.5.1 Wundheilungsexperimente .....	37
4.5.2 Zellproliferationsexperimente .....	38
4.5.3 Apoptoseexperimente .....	38

<b>4.6 Methoden virologischer Experimente</b> .....	<b>39</b>
4.6.1 Vermehrung von humanen Cytomegalieviren (HCMV) in Fibroblasten .....	39
4.6.2 Bestimmung des HCMV-Titers .....	39
4.6.3 HCMV-Infektion intestinaler Epithelzellen .....	40
4.6.4 Immunfluoreszenz für den Nachweis von <i>immediate early</i> (i. e.) Antigen .....	40
<b>4.7 Mausexperimente</b> .....	<b>41</b>
4.7.1 DSS-induzierte Colitis .....	41
4.7.2 Murine Cytomegalieviren (MCMV)-Infektion .....	41
4.7.3 Tierversuchsethik .....	41
<b>4.8 Biopsiegewinnung</b> .....	<b>41</b>
<b>4.9 Statistische Analysen</b> .....	<b>42</b>
<b>5 Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
<b>5.1 Ergebnisse der Experimente mit IL-22 in intestinalen Epithelzellen</b> .....	<b>43</b>
5.1.1 Expression des IL-22-Rezeptorkomplexes .....	43
5.1.2 Hochregulation von IL-22R1-mRNA durch proinflammatorische Mediatoren .....	44
5.1.3 IL-22-vermittelte Signaltransduktion .....	45
5.1.3.1 Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach IL-22-Stimulation .....	45
5.1.3.2 Übergeordnete Signaltransduktionswege .....	45
5.1.3.3 Aktivierung von STAT1 und STAT3 nach IL-22-Stimulation .....	46
5.1.4 IL-22-vermittelte Genregulation .....	47
5.1.4.1 IL-22-vermittelte Transkriptionsaktivierung von IL-8 und TNF- $\alpha$ .....	47
5.1.4.2 IL-22-vermittelte Transkriptionsaktivierung von SOCS-3 .....	47
5.1.4.3 IL-22-vermittelte Transkriptionsaktivierung von $\beta$ -Defensin-2 .....	48
5.1.5 Biologische Funktionen von IL-22 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	49
5.1.5.1 Erhöhte IL-22-mRNA-Expression in Biopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) <i>in vivo</i> .....	49
5.1.5.2 Erhöhte IL-22-mRNA-Expression im DSS-Colitismodell <i>in vivo</i> .....	53

5.1.5.3 Verstärkte intestinale Epithelzellmigration nach IL-22-Stimulation <i>in vitro</i> .....	54
5.1.5.4 Fehlender Einfluss von IL-22 auf die Fas-Liganden-induzierte Apoptose <i>in vitro</i> ....	55
<b>5.2 Ergebnisse der Experimente mit IL-28A und IL-29 in intestinalen Epithelzellen ....</b>	<b>56</b>
5.2.1 Expression des IL-28A- und IL-29-Rezeptorkomplexes .....	56
5.2.2 IL-28A- und IL-29-vermittelte Signaltransduktion .....	58
5.2.2.1 Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach Stimulation mit IL-28A und IL-29 .....	58
5.2.2.2 Übergeordnete Signaltransduktionswege .....	59
5.2.2.3 Aktivierung von STAT1 nach Stimulation mit IL-28A und IL-29 .....	60
5.2.3 IL-28A- und IL-29-vermittelte Genregulation .....	60
5.2.3.1 IL-28A- und IL-29-vermittelte Transkriptionsaktivierung von IL-8 .....	60
5.2.3.2 IL-28A- und IL-29-vermittelte Transkriptionsaktivierung von SOCS-3 .....	61
5.2.3.3 IL-28A- und IL-29-vermittelte Transkriptionsaktivierung der antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS .....	62
5.2.4 Biologische Funktionen von IL-28A und IL-29 <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	63
5.2.4.1 Reduktion von HCMV-infizierten, <i>immediate early</i> Antigen-positiven Zellen nach Stimulation mit IL-28A und IL-29 <i>in vitro</i> .....	63
5.2.4.2 Hochregulation von IL-28A-mRNA nach MCMV-Infektion im Mauskolon <i>in vivo</i> ..	65
5.2.4.3 Erniedrigte Zellproliferation ohne Beeinflussung der Apoptose nach Stimulation mit IL-28A und IL-29 <i>in vitro</i> .....	66
<b>6 Diskussion .....</b>	<b>67</b>
<b>6.1 Die Bedeutung von IL-22 im Gastrointestinaltrakt .....</b>	<b>67</b>
6.1.1 IL-22: ein proinflammatorisches Zytokin im Gastrointestinaltrakt? .....	67
6.1.2 IL-22-vermittelte Barriere-protective Effekte im Gastrointestinaltrakt .....	75
<b>6.2 Die Bedeutung von IL-28A und IL-29 im Gastrointestinaltrakt .....</b>	<b>77</b>
6.2.1 IL-28A und IL-29: antivirale Zytokine im Gastrointestinaltrakt .....	77
6.2.1 IL-28A- und IL-29-vermittelte antiproliferative Effekte im Gastrointestinaltrakt .....	80



---

<b>7 Klinische Bedeutung und Ausblick .....</b>	<b>83</b>
7.1 IL-22 bei der Therapie von CED .....	83
7.2 IL-28A und IL-29 bei der antiviralen Therapie .....	86
7.3 IL-28A und IL-29 bei der antiproliferativen Tumorthherapie .....	87
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>89</b>
<b>9 Abkürzungen und Begriffe .....</b>	<b>91</b>
<b>10 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>11 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>12 Anhang .....</b>	<b>110</b>
Ehrenwörtliche Erklärung	
Danksagungen	
Curriculum vitae	

## Vorbemerkungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2003 bis Dezember 2005 in den Forschungslaboratorien der Medizinischen Klinik II - Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München (Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke) durchgeführt. Mitbetreut wurde die Arbeit von Herrn PD Dr. med. Stephan Brand.

Bei manchen, im wissenschaftlichen Sprachgebrauch häufig vorkommenden, fremdsprachigen Fachausdrücken wurde aufgrund fehlender deutscher Standardbegriffe auf eine Übersetzung ins Deutsche verzichtet. Dies wurde durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet. Die in dieser Arbeit verwendeten Begriffe IFN- $\lambda$ , IFN- $\lambda$ s und Lambda-Interferone beziehen sich auf IL-28A, IL-28B und IL-29.

Bei den im Rahmen dieser Studie durchgeführten Eingriffen und Maßnahmen an Tieren wurde darauf geachtet, das Leiden der Tiere auf ein Minimum zu reduzieren. Die mit dieser Arbeit verbundenen Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 209.1/211-2531-18/03 genehmigt.

# 1 Einführung

## 1.1 IL-10-verwandte Zytokine

Zytokine stellen eine heterogene Gruppe von körpereigenen Peptiden dar, die vor allem von aktivierten T-Zellen, aber auch von anderen Zelltypen während der natürlichen und spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Je nach Zytokin können sie vielfältige, unter anderem proinflammatorische, antiinflammatorische, immunregulatorische und die Hämatopoese steuernde Funktionen einnehmen. Zudem sind sie für Reparaturmechanismen von Gewebeschäden von Bedeutung und wirken für viele Zellen als Wachstumsfaktor.

Zu den Zytokinen gehören u.a. Monokine, Wachstumsfaktoren (v.a. GM-CSF, G-CSF), chemotaktische Peptide (Chemokine), Interferone (IFN) und Interleukine (IL). Bislang sind 33 verschiedene Interleukine identifiziert worden, die *in vitro* und *in vivo* unterschiedlichste Funktionen ausüben.

Zu den IL-10-verwandten Zytokinen gehören IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 (Mda-7), IL-26 (AK155), IL-28A (IFN- $\lambda$ 2), IL-28B (IFN- $\lambda$ 3) und IL-29 (IFN- $\lambda$ 1). Aufgrund der Sequenzhomologie zu IL-10 und den Interferonen wurde diese IL-10-Familie auch als Klasse-II-Zytokin-Familie bezeichnet [129]. Die genomische Organisation und strukturelle Aspekte, z. B. Aminosäurehomologie von Klasse-II-Zytokinen (Tab.1) und Klasse-II-Zytokin-Rezeptoren (Tab.2) weisen auf gemeinsame Vorläufermoleküle hin.

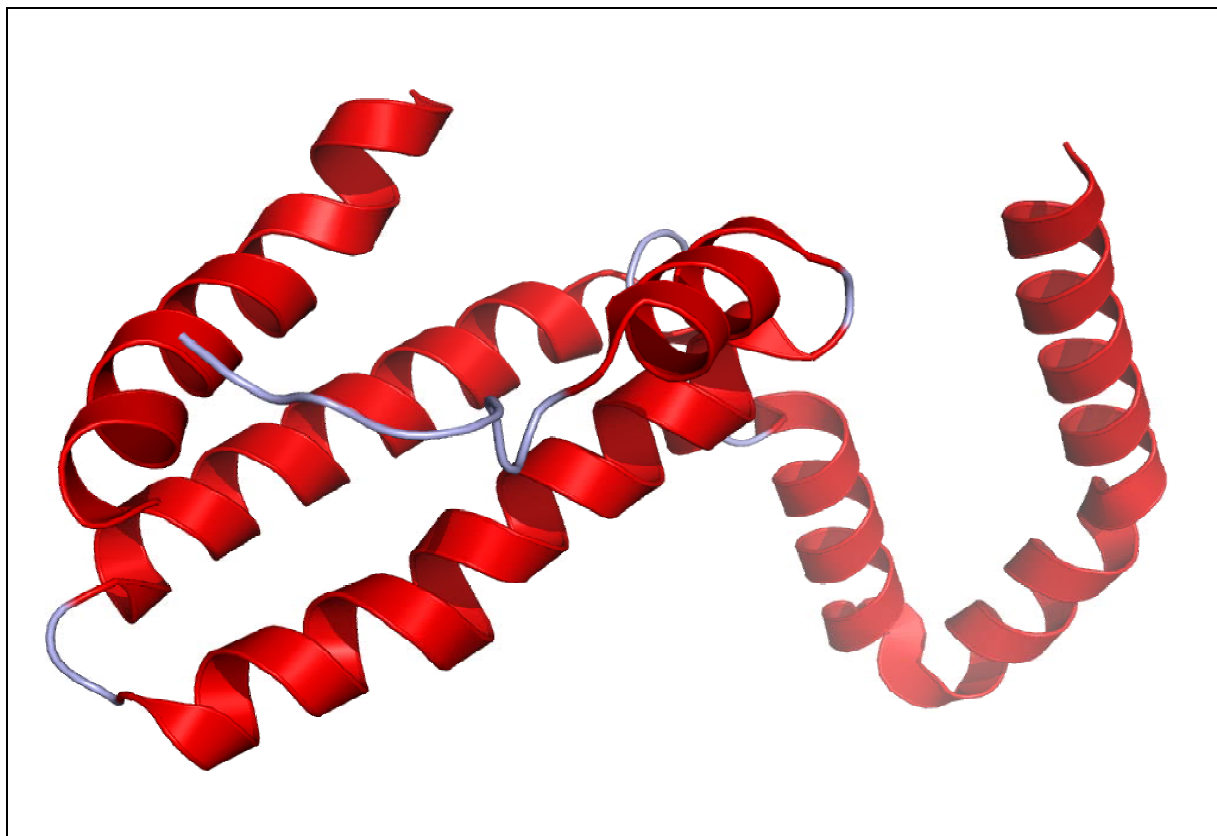
Zytokin	Chromosom	Aminosäurehomologie zu IL-10 in %
IL-10	1q32	100,0
IL-19	1q32	17,8
IL-20	1q32	25,1
IL-22/IL-TIF	12q15	24,7
IL-24/MDA7	1q32	20,9
IL-26/AK 155	12q15	25,0
IFN- $\gamma$	12q15	18,7
IFN- $\alpha$	9p22	20,6
IFN- $\omega$	9p22	18,0
IFN- $\beta$	9p22	20,8
IFN- $\kappa$	9p22	20,9
IFN- $\lambda$ 1/IL-29	19q13	15,5
IFN- $\lambda$ 2/IL-28A	19q13	19,0
IFN- $\lambda$ 3/IL-28B	19q13	17,0

**Tabelle 1:** Klasse-II-Zytokine.

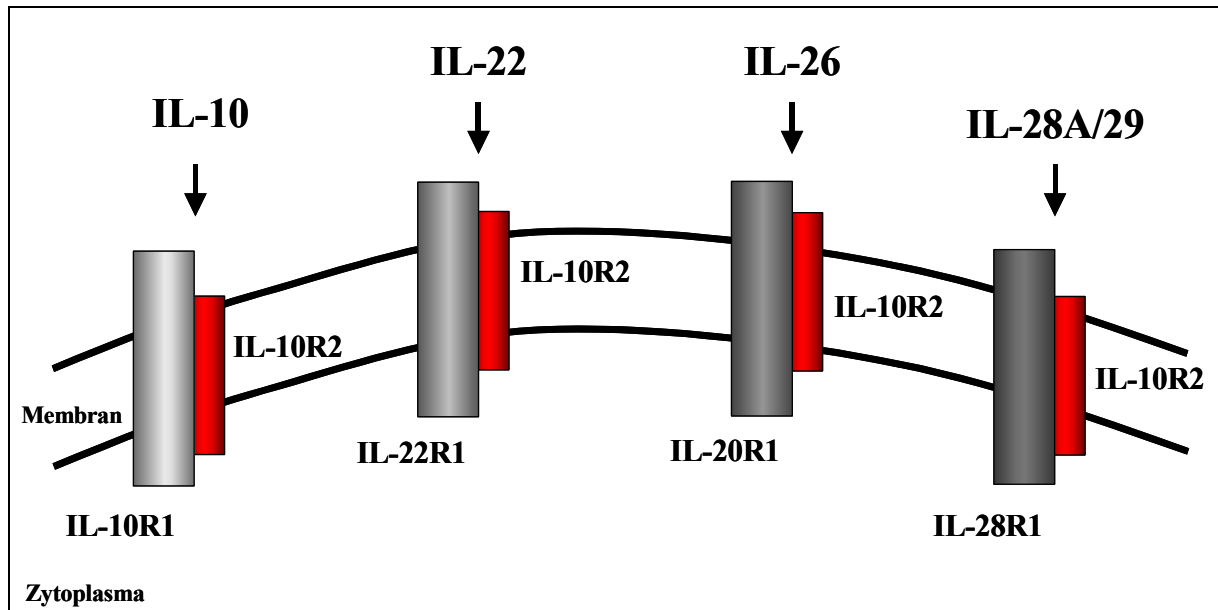
Zytokinrezeptor	Chromosom	Aminosäurehomologie zu IL-10R1 in %
IL-10R1	11q23	100,0
IL-10R2	21q22	22,4
IL-20R1	6q24	24,1
IL-20R2	3q22	22,7
IL-22R1	1p35	26,1
IL-22BP	6q24	25,3
IL-28R1	1p35	23,1
IFN- $\alpha$ R1-n	21q22	19,8
IFN- $\alpha$ R1-c	21q22	17,7
IFN- $\alpha$ R2	21q22	20,9
IFN- $\gamma$ R1	6q22	17,9
IFN- $\gamma$ R2	21q22	24,9

**Tabelle 2:** Klasse-II-Zytokin-Rezeptoren.

Die allgemeine Sekundärstruktur aller Mitglieder der IL-10-Familie ist die  $\alpha$ -Helix (Abb.1). Fünf Zytokine der IL-10 Familie, nämlich IL-22, IL-26, IL-28A, IL-28B und IL-29 benutzen zusammen mit IL-10 die gleiche Rezeptoruntereinheit IL-10R2 (auch IL-10R $\beta$ ) zur Formation des aktiven Rezeptorkomplexes [36] (Abb.2).



**Abbildung 1:** Die Kristallstruktur von IL-10 (Monomer).



**Abbildung 2:** Der IL-10R2-Rezeptor als gemeinsamer Bestandteil des Rezeptorkomplexes für IL-10, IL-22, IL-26 und IFN- $\lambda$ s (IL-28A/B und IL-29).

## 1.2 Das Zytokin IL-10

Die Genstruktur von humanen IL-10 ist wahrscheinlich hochkonserviert, da sie auch in den Fischarten *Fugu rubripes* und *Tetraodon nigroviridis* [102] vier Introns und fünf Exons aufweist. Bislang sind keine *splicing*-Varianten bekannt. IL-10 besteht aus 178 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 18 kDa (Monomer). Anders als murines IL-10 ist humanes IL-10 nicht glykosyliert. IL-10 wurde ursprünglich als *cytokine synthesis inhibitor factor* (CSIF) charakterisiert, welches von einer ConA-stimulierten Th2-Zelle produziert wird und die Synthese von Zytokinen wie IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und GM-CSF hemmt [58]. Ebenso wurden B-Zellen und B-Zell-Lymphomzellen als Quellen für IL-10 identifiziert.

Der Mechanismus der IL-10-vermittelten Unterdrückung der Zytokinproduktion wurde ursprünglich mit der Inhibierung der Antigenpräsentationskapazität von Makrophagen und dendritischen Zellen erklärt [57]. Weitere Untersuchungen ergaben, dass IL-10 auch eine direkte Blockierung der Zytokinproduktion, eine Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und MHC Klasse-II und die Sekretion von Chemokinen bewirkt. Außerdem kann IL-10 die T-Zell-Apoptose verhindern [155] und ist ein potenter Wachstumsfaktor für aktivierte B-Zellen [136].

Im Epstein-Barr-Virusgenom wurde BCRFI [79, 111], ein Homolog von IL-10 entdeckt, welches das Überleben des Virus und das Wachstum von Lymphomen unterhält, woraufhin eine Schlüsselrolle von IL-10 bei der Unterdrückung des Immunsystems angenommen

wurde. Bis heute wurden sechs weitere virale IL-10-Homologe entdeckt, u.a. CMV-IL-10 [91], was auf evolutionäre Vorteile des Virus bei der Replikation durch Immunsuppression des Wirtes hinweist. Die prinzipielle immunsuppressive Funktion von IL-10 ist dadurch gekennzeichnet, dass IL-10-defiziente Mäuse spontan eine Enterocolitis und weitere M. Crohn-ähnliche Symptome entwickeln [92]. Außerdem wurde bei diesen Mäusen eine bessere Heilung von bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen sowie eine Unterdrückung von überschießenden allergischen und asthmatischen Reaktionen beobachtet.

### 1.2.1 IL-10-Rezeptoren

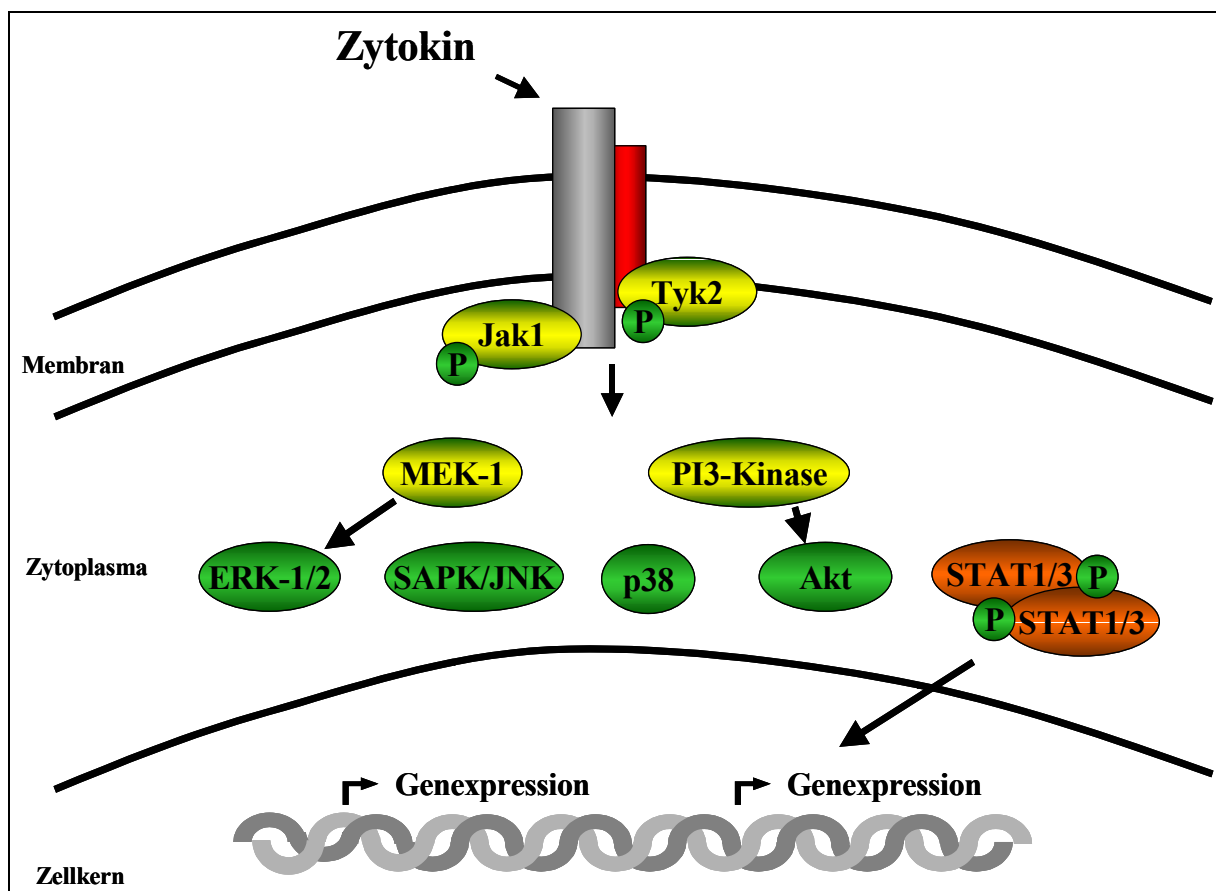
IL-10R1 und IL-10R2 bilden den IL-10-Rezeptorkomplex, der aus vier transmembranen Polypeptiden besteht, wobei zwei Domänen von IL-10R1 den Liganden binden und zwei Domänen von IL-10R2 die Signaltransduktion initiieren [75]. Die beiden Rezeptoren weisen eine hohe Aminosäurehomologie untereinander, wie auch zu anderen Klasse-II-Zytokinrezeptoren auf (siehe Tabelle 2). Bislang sind keine *splicing*-Varianten bekannt. Es wird allerdings angenommen, dass ähnlich wie bei IL-22BP, durch Elimination von Exon 6 und/oder Exon 7 ein löslicher Rezeptor entsteht, welcher physiologische Funktionen wie z.B. Aktivitätsmodulation oder Antagonismus haben könnte.

IL-10R1 umfasst ein 3,6 kb großes mRNA-Transkript und generiert ein ca. 90-110 kDa großes IL-10-Bindungsprotein, wenn es in COS-7-Zellen exprimiert wird. Das IL-10R1-Protein besteht aus 557 Aminosäuren und weist eine ca. 60%ige Homologie zum IL-10R1-Mausprotein auf.

### 1.2.2 IL-10-vermittelte Signaltransduktion

Die Aktivierung des IL-10-Rezeptorkomplexes resultiert nicht nur in der Inhibierung der Synthese verschiedener Zytokine, sondern auch in der Hemmung biologischer Funktionen der Zytokine. Durch Aktivierung des Rezeptorkomplexes durch IL-10 (Abb.3) werden Jak1 (IL-10R1-assoziiert) und Tyk2 (IL-10R2-assoziiert) vermutlich durch *cross*-Phosphorylierung von zwei Tyrosin-Resten der intrazellulären Domänen von IL-10R1 aktiviert [55]. Diese phosphorylierten Tyrosin-Reste führen zur direkten Interaktion von STAT3 mit dem Rezeptorkomplex [162]. Im weiteren Verlauf werden STAT1, STAT3 und STAT5 durch Jak1 und Tyk2 aktiviert, woraufhin sich Homodimere und Heterodimere dieser STAT-Proteine bilden und im Zellkern die Transkription von STAT-abhängigen Genen initiiert wird. Unter diesen Genen ist u.a. SOCS-1, welches der physiologische Inhibitor der IFN- $\gamma$ -

IL-10- und IL-4-vermittelten Signaltransduktion ist. Die Wirkung von SOCS-1 wird dadurch erklärt, dass es die Aktivierungsdomäne der Jak-Kinasen bindet und die Phosphorylierung der Substrate blockiert [173]. Diese SOCS-Aktivierung vermittelt möglicherweise die antiinflammatorischen Eigenschaften von IL-10. Weitere durch IL-10-induzierte Gene sind membranständige Rezeptoren, sekretorische Proteine und Transkriptionsfaktoren. Die Aktivierung der IL-10-induzierten Genexpression ist STAT3-abhängig [94, 156]. IL-10 inhibiert darüber hinaus die Genexpression verschiedener proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  [1] und IL-1 $\beta$ , wobei hier der genaue Mechanismus nicht bekannt ist. Es wird aber auch ein STAT3-abhängiger Mechanismus angenommen [1, 167].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung von Signaltransduktionswegen, die durch Klasse-II-Zytokine aktiviert werden.** Nach Aktivierung des Rezeptorkomplexes durch Bindung des Zytokins werden Jak1 und Tyk2 vermutlich durch *cross*-Phosphorylierung von zwei Tyrosin-Resten der intrazellulären Domänen aktiviert. Diese phosphorylierten Tyrosin-Reste führen zur direkten Interaktion zwischen STAT3 und dem Rezeptorkomplex. Im weiteren Verlauf werden STAT1, STAT3, STAT5 durch Jak1 und Tyk2 aktiviert, woraufhin sich Homodimere und Heterodimere dieser STAT-Proteine bilden und im Zellkern die Transkription von STAT-abhängigen Genen initiiert wird. Über ähnliche Mechanismen werden die MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und p38 als auch die PI-3-Kinase Akt phosphoryliert und somit die Signalkaskade in den Zellkern weitergeleitet.

### 1.2.3 Biologische Funktionen und klinische Anwendungen von IL-10

Aufgrund der potenten antiinflammatorischen und immunsuppressiven Eigenschaften von IL-10 wurde viel Hoffnung in mögliche klinische Anwendungen gesetzt. Da IL-10-defiziente Mäuse eine schwere Enterocolitis entwickeln [92], die durch IL-10-Gabe verhindert werden kann, wurde IL-10 für die Behandlung des M. Crohn in diversen Studien untersucht [13, 51, 74, 142]. Leider konnten nur geringe Ansprechraten verzeichnet werden, vermutlich aufgrund von Polymorphismen im IL-10R1-Gen oder der Instabilität von IL-10 im Organismus. Auch bei der Behandlung der Psoriasis vulgaris konnte nur kurzzeitig klinische Besserung beobachtet werden. Im Gegensatz zum antiinflammatorischen Effekt von IL-10 lieferte die Neutralisation von IL-10 durch IL-10-Antikörper bei der Behandlung des Lupus erythematoses (SLE) erfolgsversprechende Ergebnisse. In ersten klinischen Studien brachte die Applikation von murinen IL-10-Antikörper über drei Wochen eine schnelle und anhaltende Besserung der Symptome bei Patienten mit SLE [7-9].

Ein Problem der langfristigen Gabe von IL-10 bzw. IL-10-Antikörpern ist deren Auswirkung auf das Immunsystem, die durch eine Immundefizienz bei IL-10-Gabe bzw. überschießender Immunreaktion bei IL-10-Antikörpergabe gekennzeichnet ist. Dennoch konnten die bisherigen Forschungsergebnisse das große Potential von IL-10 bzw. IL-10-Antikörpern in der Behandlung von malignen Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten und allergischen Reaktionen aufzeigen.

## 1.3 Das Zytokin IL-22

IL-22 ist ein aus 179 Aminosäuren bestehendes Zytokin und mit 24,7% nur von limitierter Aminosäure-Homologie zu IL-10, wobei die meisten der identischen Aminosäurereste in der C-terminalen Region des Proteins liegen, welche für die Aktivität von IL-10 verantwortlich gemacht wird [42, 45]. Die cDNA für das Maus-Ortholog von IL-10 wurde ursprünglich IL-TIF (*IL-10-related T-cell derived inducible factor*) genannt, da es als Gen identifiziert wurde, das spezifisch von IL-9 in T-Zellen induziert wird [89]. Auf der Basis dieses Maus-Orthologs wurde das humane IL-22 geklont.

Das Gen für IL-22 befindet sich auf dem Chromosom 12q15 und liegt in der Nähe der Gene für IL-26 und IFN- $\gamma$ . Mutationen im hochkonservierten IFN- $\gamma$ -Gen wurden kürzlich mit der Anlage für Asthma bronchiale in Verbindung gebracht [6]. Da auf Chromosom 12 in dieser



Region einige andere Loci für die Veranlagung für Asthma und Atopie beschrieben wurden, könnten auch IL-22 und IL-26 bei diesen Erkrankungen von Bedeutung sein.

IL-22 wird von aktivierten humanen T-Zellen und Mastzellen produziert und ist am stärksten in Thymus und Hirn exprimiert. Nach neuesten Erkenntnissen sind Th17-Zellen die Hauptproduzenten von IL-22 [99]. Interessanterweise existieren in bestimmten Mausstämmen (C57BL/6) zwei IL-22-Gene: IL-22 $\alpha$  und IL-22 $\beta$ . Diese unterscheiden sich nur an drei Aminosäure-Positionen. Bislang ist nicht geklärt, ob das entsprechende Protein funktional ist, da dem IL-22 $\beta$ -Gen bestimmte Promotorelemente fehlen.

### 1.3.1 IL-22-Rezeptoren

Der IL-22-Rezeptorkomplex besteht aus IL-22R1 (auch CRF2-9, *cytokine receptor family class II member 2-9*) und IL-10R2. Es wurde gezeigt, dass beide Rezeptoren unabhängig voneinander den Liganden binden können, was im Gegensatz zu den IL-10- und IFN- $\gamma$ -Rezeptorkomplexen steht, bei denen nur die Untereinheit R1, die auch die STAT-Proteine rekrutiert, den Liganden binden kann [89]. Obwohl IL-10R2 für die Zusammensetzung des funktionellen IL-22-Rezeptorkomplexes notwendig ist, wurde gezeigt, dass dieser Korezeptor IL-22 in der löslichen Phase nicht direkt bindet. Dies wurde dadurch bewiesen, dass durch Inhibierung von IL-10R2 die STAT-Aktivierung in IL-22-sensiblen Zellen nicht unterdrückt wurde. Dies weist daraufhin, dass IL-22 nicht direkt an IL-10R2 bindet, sondern dieser Rezeptor vielmehr für die Rekrutierung von Tyk2 verantwortlich ist [98]. Eine weitere Besonderheit dieses Rezeptorkomplexes besteht darin, dass menschliche Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten die IL-22-spezifische Rezeptoruntereinheit IL-22R1 selbst unter stimulierten Bedingungen nicht exprimieren [123, 169], obwohl IL-10R2 ubiquitär exprimiert wird. Im Gegensatz zu Immunzellen ist IL-22R1 in Geweben wie Lunge, Leber, Pankreas und Niere, nicht aber im Knochenmark, Milz und Thymus nachweisbar [29, 67, 123, 169]. Durch *Northern Blot*-Analyse wurde die Expression von IL-22R1 in vielen Geweben nachgewiesen [89]. Auch diverse Tumorzelllinien exprimieren IL-22R1 mRNA, u.a. Zelllinien aus Kolonkarzinom (SW480, HT-29), Lungenkarzinom (A549), Melanom (G361), Leberkarzinom (HepG2), Nierenzellkarzinom (Caki-1 und TK-10), und Keratinozyten HaCaT. Vor kurzem wurde der lösliche Rezeptor IL-22BP beschrieben [41, 66, 90, 171], welcher keine zytoplasmatischen und transmembranen Domänen aufweist. IL-22BP ist zu 34% mit IL-22R1 identisch, bindet außer IL-22 keine anderen Zytokine der IL-10-Familie und scheint eine höhere Affinität zu IL-22 zu besitzen als der membranständige IL-22-Rezeptorkomplex. IL-22BP inhibiert die von IL-22 induzierte STAT-Aktivierung.

Drei verschiedene *splicing*-Varianten wurden bislang gefunden, wobei unklar bleibt, ob diese die Funktion von IL-22BP unterschiedlich modulieren. Es wurde eine hohe Expression von IL-22BP in vielen verschiedenen Organen wie beispielsweise Plazenta, Brust, Niere und Milz beschrieben. Die hohe Expression von IL-22BP in der Plazenta könnte auf eine Funktion in der normalen Plazentaentwicklung hinweisen. IL-22BP wird ebenfalls von dendritischen Zellen exprimiert [113]. Die Funktion von IL-22BP könnte in der präzisen Regulation und Modulation der Immunantwort von IL-22 im Gewebe liegen. Über die Regulation von IL-22BP ist bislang nichts bekannt, es könnte als natürlicher Antagonist von IL-22 von großem klinischem Interesse sein.

### 1.3.2 IL-22-vermittelte Signaltransduktion

Ähnlich wie bei IL-10 führt die Bindung von IL-22 an dessen Rezeptorkomplex zur Aktivierung von Jak1 und Tyk2 und im folgenden zur Aktivierung von STAT3, zu einem geringeren Anteil auch zur Aktivierung von STAT1 und STAT5. In Leberzellen wurde die Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und p38 nach IL-22-Stimulation beschrieben, was teilweise vom Aktivierungsmuster der IL-10-vermittelten Signalwege in diesen Zellen abwich [98].

### 1.3.3 Biologische Funktionen von IL-22

Bislang wurde gezeigt, dass Stimulation von HepG2-Zellen mit IL-22 die Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie Serumamyloid A,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin und Haptoglobin steigert [45]. Die IL-22-Injektion in Mäuse führte außerdem zur Produktion von Serumamyloid A in der Leber, was auf eine Bedeutung von IL-22 bei Entzündungsprozessen hinweist. Ebenso spielt IL-22 eine protektive Rolle in der ConA-induzierten Leberschädigung und wirkt durch antiapoptotische Effekte als Überlebensfaktor für Hepatozyten. Weitere in Leberzellen durch IL-22 hochregulierte Gene sind verschiedene Chemokine, Interferon-induzierbares Protein-10 (IP-10), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) und IL-8 [45]. In azinären Pankreaszellen führte die Stimulation mit IL-22 zur Produktion von *pancreatitis-associated protein-1*, Osteopontin und anderen Akute-Phase-Proteinen [67].

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass auch die Haut ein wichtiges Zielorgan für IL-22 ist, da in Keratinozyten nach IL-22-Stimulation die  $\beta$ -Defensin-2 und -3 und in Hautbiopsien von Patienten mit T-Zell-vermittelter Dermatitis IL-22-mRNA hochreguliert sind [169].

#### 1.4 Die Zytokine IL-28A und IL-29 (IFN- $\lambda$ 2 und IFN- $\lambda$ 1)

1957 identifizierten Isaacs und Lindenmann eine Substanz, die von Virus exponierten Zellen produziert wurde und diese vor einer Infektion durch das Virus schützte. Sie nannten diese Substanz Interferon [80, 81]. Interferone sind Proteine mit antiviraler Aktivität, die durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli sezerniert werden. Bislang waren zwei Typen von Interferonen bekannt, Typ-I- und Typ-II-Interferone [95]. Zu den Typ-I-Interferonen gehören IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$  und IFN- $\tau$ . Zu den Typ-II-Interferonen zählt nur IFN- $\gamma$ . Vier Interferon-ähnliche Zytokine wurden kürzlich beschrieben: limitin, IL-28A, IL-28B und IL-29 [88, 146], wobei die letzten drei zur neuen Gruppe der Typ-III-Interferone gerechnet und als IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3 und IFN- $\lambda$ 1 bezeichnet werden. Bis auf IFN- $\delta$ , IFN- $\tau$  und limitin wurden alle Interferone beim Menschen gefunden. Typ-I-Interferone (vor allem IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ ) spielen sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven Immunität eine wichtige Rolle, indem sie eine erhöhte Expression der MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse-I induzieren [53] und dadurch die Antigenpräsentation unterstützen. Virale Infektionen führen zur Produktion von Typ-I-Interferonen, die eine Reihe von Genen induzieren, die die Virusreplikation behindern und das lytische Potential von natürlichen Killerzellen (NK) erhöhen. Klinische Anwendung finden die Typ-I-Interferone in der Behandlung vieler Erkrankungen [21]. IFN- $\alpha$  wird u.a. als *first-line*-Therapie bei der Behandlung der akuten und chronischen Hepatitis C-Infektion aber auch bei anderen Erkrankungen, wie z.B. chronischer Hepatitis B, Melanome, Non-Hodkin-Lymphom und Haarzelllymphom eingesetzt [69]. IFN- $\beta$  wird u.a. bei der Behandlung der Multiplen Sklerose verwendet [70].

Trotz der therapeutischen Effektivität der Interferone werden häufig schwere Nebenwirkungen wie Schwäche, Fieber, Knochenmarksschädigung, Gewichtsabnahme und Depression beobachtet [46]. Die Rezeptoren für IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  werden auf allen somatischen Zellen einschließlich hämatopoetischen Zellen wie Lymphozyten und Monozyten exprimiert. Im Gegensatz dazu wurden die Rezeptoren von IL-22, IL-26 und IFN- $\lambda$ s bislang nicht auf hämatopoetischen Vorläuferzellen nachgewiesen, was von großer klinischer Relevanz in bezug auf geringere Nebenwirkungen, wie z.B. Knochenmarksdepression, sein könnte [36].

Die IFN- $\lambda$ -Familie besteht aus den drei Proteinen IFN- $\lambda$ 1 (IL-29), IFN- $\lambda$ 2 (IL-28A), und IFN- $\lambda$ 3 (IL-28B) [88, 146]. Zwei Forschergruppen haben gleichzeitig und unabhängig voneinander diese neue Familie beschrieben, wobei eine der beiden Forschergruppen

aufgrund der antiviralen Aktivität die Proteine als Interferone bezeichnete, während die andere Gruppe sie aufgrund des geteilten Korezeptors IL-10R2 und der Homologie zu IL-10 (11-13% Aminosäurehomologie) den Interleukinen zuordnete. Aktuell werden beide Nomenklaturen in der Literatur parallel geführt. Ein weiterer Hinweis auf die Zugehörigkeit zu den Interleukinen ist die genomische Struktur der Gene, die aus bis zu sechs Exons mit Introns bestehen und nicht, wie für Typ-I-Interferone typisch, aus nur einem Exon. IL-28A, IL-28B und IL-29 liegen zusammen auf dem Chromosom 19q13 und unterscheiden sich damit in der genomischen Lokalisation ebenfalls von den Typ-I-Interferonen, die alle auf dem Chromosom 9 oder 12 liegen. IL-28B wurde durch *BLAST*-Analyse auf dem gleichen Genort wie IL-28A nachgewiesen und hat eine 96%ige Aminosäurehomologie zu IL-28A.

Die IFN- $\lambda$ -Gene werden zusammen mit anderen Typ-I-Interferonen (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) von virusinfizierten Zellen koexprimiert. Obwohl anscheinend jeder Zelltyp nach Virusinfektion IFN- $\lambda$  sezernieren kann, scheinen dendritische Zellen die Hauptproduzenten von IFN- $\lambda$  zu sein [27]. Von Monozyten gewonnene dendritische Zellen exprimieren nach Stimulation mit *toll-like*-Rezeptor-Agonisten wie LPS oder poly (I:C) geringe Mengen IFN- $\lambda$ , wohingegen plasmazytoide dendritische Zellen nach viraler Infektion große Mengen IFN- $\lambda$  produzieren [27, 34].

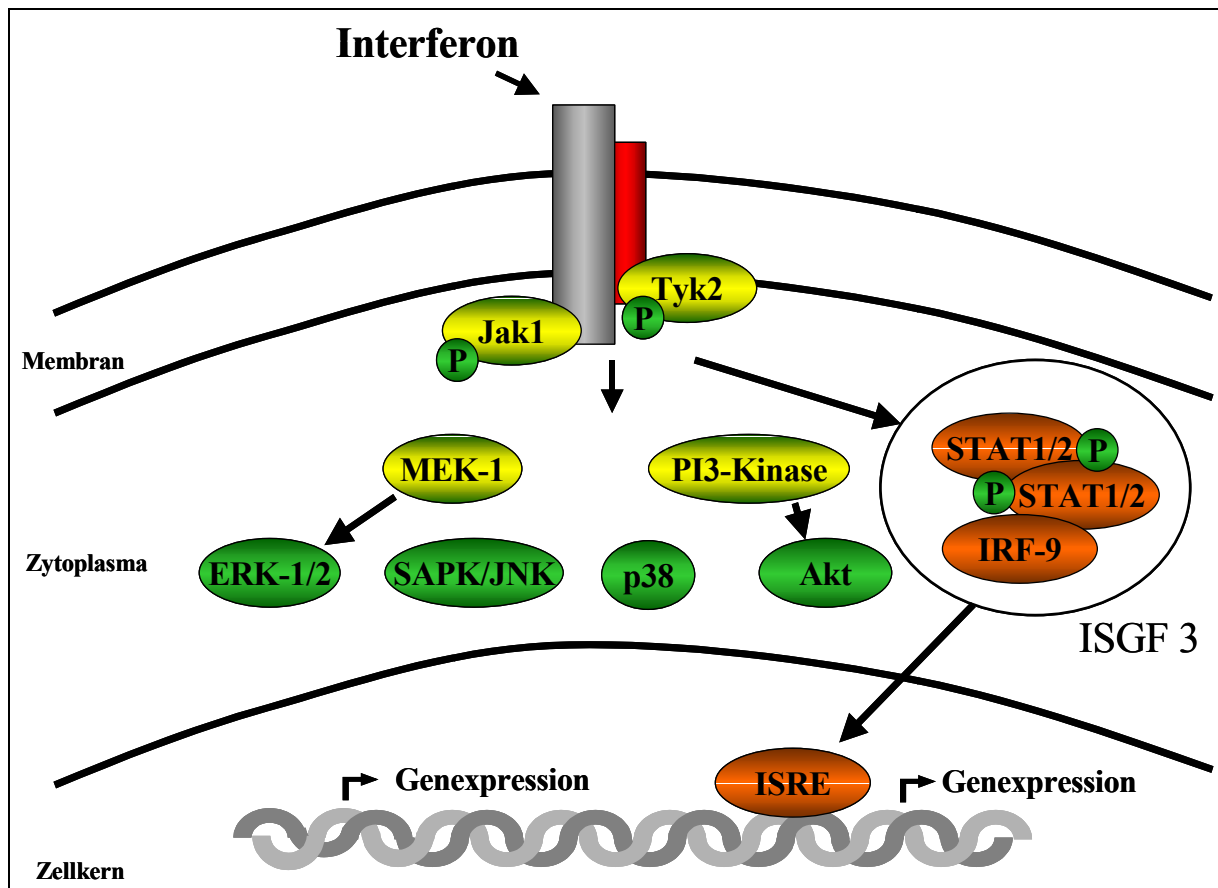
#### 1.4.1 IFN- $\lambda$ -Rezeptoren

Der IFN- $\lambda$ -Rezeptorkomplex besteht aus den Ketten IFN- $\lambda$ R1 (IL-28R1, auch IL-28R $\alpha$  genannt) und IL-10R2 [88, 146]. Es existieren drei verschiedenen Formen von IFN- $\lambda$ R1, welche durch alternatives *Splicing* entstehen. Interessanterweise besteht mit 23% die höchste Aminosäurehomologie von IFN- $\lambda$ R1 zu IL-22BP. Durch *Northern-Blot*-Analyse wurde die Expression von IFN- $\lambda$ R1 bis auf hämatopoetische Zellen in den meisten Geweben gefunden, besonders hoch war diese in Pankreas, Schilddrüse, Skelettmuskel, Prostata und Hoden.

#### 1.4.2 IFN- $\lambda$ -vermittelte Signaltransduktion

Obwohl die Signaltransduktion über die Rezeptoren von IL-10, IL-22 und IL-26 vor allem zur Aktivierung von STAT3 führt, wird bei der Signaltransduktion von IFN- $\lambda$  (Abb.4) hauptsächlich STAT1 und STAT2 aktiviert [37, 88, 146]. Diese STAT-Proteine führen zusammen mit dem Faktor *IFN-regulatory factor-9* (IRF-9 = p48) zur Formation eines Transkriptionsfaktorkomplexes, der *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3) genannt wird [32].

Die Aktivierung dieses Komplexes löst charakteristischerweise die Induktion von Typ-I-Interferon-abhängigen Genen (ISG) aus, unter anderem MxA (*myxovirus resistance-A*), 2',5'-OAS (*oligoadenylatsynthetase*) und PKR (*proteinkinase R*), die wahrscheinlich einen Großteil der antiviralen Aktivitäten induzieren. Ähnlich der Signaltransduktion von IL-22 und IL-26 kann die von IFN- $\lambda$  durch neutralisierende Antikörper gegen IL-10R2 blockiert werden.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung von Signaltransduktionswegen, die durch Interferone aktiviert werden.** Nach Bindung des Interferons am Rezeptorkomplex werden Jak1 und Tyk2 vermutlich durch *cross*-Phosphorylierung von zwei Tyrosin-Resten der intrazellulären Domänen aktiviert. Im weiteren Verlauf werden vor allem STAT1 und STAT2 aktiviert. Diese STAT-Proteine führen zusammen mit einem zusätzlichen Faktor, *IFN-regulatory factor-9* (IRF-9 = p48), zur Formation eines Transkriptionsfaktorkomplexes, der *IFN-stimulated gene factor 3* (ISGF3) genannt wird. Dieser initiiert im Zellkern durch Aktivierung des *IFN-stimulated regulatory element* (ISRE) die Transkription von IFN-abhängigen Genen. Über ähnliche Mechanismen werden die MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und p38 als auch die PI-3-Kinase Akt phosphoryliert und somit die Signalkaskade in den Zellkern weitergeleitet.

### 1.4.3 Biologische Funktionen von IFN- $\lambda$ s

Die Produktion von IFN- $\lambda$ s wurde in mononuklearen Zellen aus peripheren Blut induziert, die zuvor mit doppelsträngiger RNA poly (I:C) behandelt oder mit dem Enzephalomyokarditisvirus (EMCV) infiziert wurden [146]. Die antivirale Aktivität der IFN- $\lambda$ s wurde dadurch nachgewiesen, dass die mit EMCV-infizierten HepG2-Zellen nach 24-stündiger IFN- $\lambda$ -Präinkubation vor der Infektion geschützt waren [146]. Diese Ergebnisse zeigen, dass IFN- $\lambda$ s intrinsische, zelluläre antivirale Aktivitäten aufweisen und auf diese Weise Zellen vor viraler Infektion schützen.

Ähnlich den Typ-I-Interferonen haben IFN- $\lambda$ s auch antiproliferative Eigenschaften. Durch künstlich eingeführte Mutationen in Tyrosinresten (Tyr 343, 517) des IL-28R1-Rezeptors wurde dieser als entscheidend für die antiviralen und antiproliferativen Effekte der IFN- $\lambda$ s identifiziert, da in Zellen mit dieser Mutation die antiviralen und antiproliferativen Effekte aufgehoben waren [43]. Interessanterweise bestand eine große Korrelation zur Aktivierung von STAT2, was darauf hinweisen könnte, dass STAT2 den verantwortlichen Faktor zur Vermittlung der antiviralen und antiproliferativen Effekte darstellt. Allgemein wird angenommen, dass die biologische Aktivität der IFN- $\lambda$ s im Vergleich zu Typ-I-Interferonen etwas geringer ausgeprägt und auf weniger Zelltypen vorhanden ist [108].

### 1.5 Die Bedeutung von IL-10-verwandten Zytokinen bei entzündlichen Prozessen

Für IL-10 sind potente antiinflammatorische Eigenschaften beschrieben worden, die unter anderem durch Inhibierung der IL-1 $\beta$ - und LPS-Produktion hervorgerufen werden. Dies konnte auch *in vivo* gezeigt werden, da Mäuse mit einem Toxischen-Schock-Syndrom durch Gabe von rekombinanten IL-10 gerettet wurden [78]. Außerdem wird endogenes IL-10 durch LPS induziert und trägt zum Schutz vor Endotoxinschäden bei, wohingegen die Blockierung von IL-10 bei Mäusen zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber LPS führte [82]. Diese Effekte scheinen spezifisch für IL-10 zu sein und konnten bei keinem anderem Mitglied der IL-10-Familie nachgewiesen werden.

Die Expression von Interferonen wird auch durch proinflammatorische Stimuli hochreguliert. Deren proinflammatorische Eigenschaften wurden in diversen Zellmodellen gezeigt. Beispielsweise ist IFN- $\gamma$  ein potenter Aktivator von Makrophagen und Monozyten und die Blockierung von IFN- $\gamma$  führte zu einer Erhöhung der Resistenz des endotoxischen Schocks [73]. Bemerkenswerterweise führte diese Blockierung auch zu einer Verbesserung der

intestinalen Entzündung von IL-10-defizienten Mäusen, was auf einen Antagonismus dieser beiden Zytokine hindeutet und darauf hinweist, dass deren Balance für die Homöostase von entzündlichen Prozesse wichtig ist [130].

Viele Virusarten kodieren für IL-10-artige oder lösliche IFN- $\gamma$ -Rezeptorgene, die wahrscheinlich zur Herabsetzung des Immunsystems bei der Virusinfektion beitragen. Die Rolle der Interferone bei entzündlichen Prozessen ist jedoch komplexer. *In vitro*-Effekte von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  auf Monozyten und lymphoide Zellen könnten auf proinflammatorische Funktionen hindeuten, jedoch sind *in vivo* eindeutige antiinflammatorische Eigenschaften, z.B. bei der Behandlung von Multiple Sklerose-Patienten mit IFN- $\beta$  bekannt [70].

T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Immunantwort und werden in zwei Hauptklassen eingeteilt: Th1- und Th2-Zellen [134]. Während Th1-Zellen IFN- $\gamma$  und TNF- $\beta$  produzieren und für eine Vielzahl von zellulären Immunreaktionen verantwortlich sind, produzieren Th2-Zellen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 und sind an der Abwehr extrazellulärer Pathogene und an allergischen Reaktionen beteiligt.

Ursprünglich wurde IL-10 als Th2-abhängiges Zytokin beschrieben, da es die Produktion von IFN- $\gamma$  aus Th2-Zellen der Maus inhibierte [56]. Später wurde gezeigt, dass diese Inhibition der Zytokinproduktion durch T-Zellen indirekt abläuft, vermutlich durch die Inhibition akzessorischer Zellen, was wiederum den antiinflammatorischen Effekt von IL-10 auf aktivierte Makrophagen aufzeigt [58]. Erst kürzlich wurden CD4<sup>+</sup>-regulatorische T-Zellpopulationen beschrieben, die große Mengen an IL-10 produzieren. Von diesen Zellen wird angenommen, dass sie eine wichtige Rolle bei der Toleranz gegenüber endogenen Antigenen spielen [104]. Der Beitrag von IL-10 für die Funktion solcher regulatorischer T-Zellen variiert in Abhängigkeit vom experimentellen Ansatz, aber seine antiinflammatorische Aktivität korrespondiert zur immunsuppressiven Funktion in diesen Zellpopulationen.

Über die Bedeutung der IL-10-verwandten Zytokinen bei entzündlichen Reaktionen, speziell im Gastrointestinaltrakt ist bislang nur wenig bekannt. Es wurde gezeigt, dass durch IL-12 aktivierte Th1-Zellen [168] und nach neuesten Erkenntnissen vor allem Th17-Zellen, nicht aber Th2-Zellen oder regulatorische T-Zellen, die Hauptproduzenten von IL-22 sind [99, 168]. Im Gegensatz dazu wird IL-24 vor allem von Th2-Zellen sezerniert [141]. Für die meisten der IL-10-verwandten Zytokine (IL-19, IL-20, IL-22, IL-24) ist gezeigt worden, dass diese durch LPS induziert werden. Dennoch scheinen die Rezeptoruntereinheiten IL-20R1 und IL-22R1 nicht von Immunzellen wie Monozyten, natürlichen Killerzellen, B-Zellen, T-Zellen und Knochenmarkszellen exprimiert zu werden [168].

Für IL-22 konnte gezeigt werden, dass es die Expression von Akute-Phase-Proteine in der Leber hochreguliert [45], jedoch scheinen in diesem Prozess weitere Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 wichtig zu sein. Dennoch ist dieser Effekt von IL-22 unter bestimmten Bedingungen, in denen IL-22 vermehrt gebildet wird, von Bedeutung. Außerdem ist das Pankreas ein weiteres Organ, in dem IL-22 Akute-Phase-Proteine in großen Mengen freisetzt. [3]. Es ist daher wahrscheinlich, dass IL-22 in Organen, die wie Leber und Pankreas große Mengen von IL-22R1 exprimieren, für die Akute-Phase-Protein-Produktion notwendig ist. In anderen Studien wurde die Haut als ein wichtiger Zielort für die proinflammatorische Aktivität von IL-22 beschrieben. IL-22-transgene Mäuse entwickeln Hauterkrankungen, daher könnte IL-22 bei der Differenzierung und Proliferation von Hautzellen von Bedeutung sein [169].

### **1.6 Die Bedeutung von IL-10-verwandten Zytokinen bei viraler Infektion**

Typ-I-Interferone werden vor allem durch Viren induziert. Während IFN- $\alpha$  speziell von Zellen lymphoiden Ursprungs exprimiert wird, produzieren die meisten Zellarten IFN- $\beta$  [112]. Es wird davon ausgegangen, dass die Induktion von Interferonen durch virale doppelsträngige RNA (dsRNA) erfolgt. Das synthetische Polymer poly (I:C) wird unter experimentellen Bedingungen für die Induktion von Interferonen eingesetzt. Für die IL-10-verwandten Zytokine IL-28A, IL-28B und IL-29 wurde gezeigt, dass diese von humanen mononuklearen Zellen nach Infektion mit EMCV, aber auch durch Behandlung mit poly (I:C) hochreguliert werden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Lambda-Interferone IL-28A, IL-28B und IL-29 und Typ-I-Interferone gemeinsame regulatorische Elemente besitzen [88, 146]. Dennoch sind die Aminosäuresequenzen dieser beiden Interferon-Typen nur wenig homolog. Beispielsweise hat IL-29 nur eine 17%ige Aminosäurehomologie mit IFN- $\alpha$ . Ebenso unterscheiden sich die genomischen Strukturen, da die Lambda-Interferone im Gegensatz zu den Typ-I-Interferonen Introns aufweisen. Außerdem haben die Rezeptorenkomplexe der beiden Gruppen keine gemeinsamen Untereinheiten. Dennoch besitzen Lambda-Interferone ähnliche biologische Eigenschaften wie Typ-I-Interferone. Es wurde nachgewiesen, dass Lambda-Interferone diverse Zelllinien vor dem zytopathogenen Effekt von EMCV oder vesikulären Stomatitisviren (VSV) schützen konnten, was auf eine potente antivirale Aktivität ähnlich der von Typ-I-Interferonen hinweist [88, 146]. Die relative Stärke der antiviralen Antwort und auch der Wirkort der Lambda-Interferone scheint



sich allerdings von denen der Typ-I-Interferone zu unterscheiden [108]. Auch die Rezeptoren der Lambda-Interferone sind im Gegensatz zu den Typ-I-Interferon-Rezeptoren, die fast ubiquitär exprimiert werden, nur auf bestimmten Zellen zu finden. Beispielsweise sind diese nicht auf Leukozyten exprimiert [36]. Dies könnte von großer klinischer Bedeutung sein, da die bei der Behandlung von viralen Infektionen mit Interferonen beobachteten Nebenwirkungen wie Leukopenie, Fieber etc. bei Lambda-Interferon-Therapie möglicherweise nicht auftreten. Weitere Studien müssen hierüber Aufschluss bringen.

Eine Bedeutung von Klasse-II-Zytokinen und deren Rezeptoren bei viraler Infektion zeigt sich dadurch, dass einige Virenarten sich Gene dieser Familie zu Eigen gemacht und umgeändert haben, um die körpereigene Abwehr auszuschalten [86]. Das Vaccinavirusgenom kodiert beispielsweise für einen löslichen Klasse-II-Zytokinrezeptor, der spezifisch für IFN- $\gamma$  [154] und für ein Gen der Immunglobulin-Superfamilie ist, welcher IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  binden und neutralisieren kann.

Die Produktion und Aktivität von IFN- $\gamma$  wird durch IL-10 antagonisiert, wodurch IL-10 indirekt virale Infektionen begünstigt. BCRF1, ein Epstein-Barr-Virusprotein, ist ein IL-10-Virushomolog mit einer 80%igen Aminosäurehomologie zum menschlichen IL-10 [111]. Die Hypothese eines evolutionären Vorteils durch die Expression von Virus-IL-10 wird dadurch bekräftigt, dass einige andere Vertreter der Herpes-Virus-Familie Gene mit einer mehr als 80%igen Homologie zu endogenen IL-10 kodieren, z.B. das Herpes-Virus Papio (HVP), das equine Herpes-Virus Typ2 (EHV2) [132] und das *Orf parapoxovirus* [59]. Weiter entfernt verwandte IL-10-homologe Gene (25-30% Aminosäurehomologie) wurden im Genom des humanen und simianen Cytomegalievirus (HCMV und SCMV) [91] gefunden. Trotz der geringen IL-10-Homologie scheint das CMV-kodierte IL-10 eine hohe IL-10-Rezeptorbindekapazität zu haben.

## 2 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der IL-10-verwandten Zytokine IL-22, IL-28A und IL-29 in intestinalen Zellsystemen *in vitro* und *in vivo*, da bislang wenig über deren Rolle im Gastrointestinaltrakt bekannt ist.

Für IL-22 wurde in anderen Arbeiten bereits die Relevanz dieses Zytokins bei inflammatorischen Prozessen beschrieben. Die Bedeutung von IL-22 bei entzündlichen Prozessen im Gastrointestinaltrakt, insbesondere bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bislang aber unklar.

In ihrer Erstbeschreibung wurden für die Lambda-Interferone IL-28A und IL-29 antivirale Eigenschaften gezeigt, jedoch ist deren Bedeutung im Gastrointestinaltrakt ebenso nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit werden folgende Punkte untersucht:

1. Expression des IL-22-Rezeptorkomplexes und des Lambda-Interferon-Rezeptorkomplexes in intestinalen Epithelzellen.
2. Signaltransduktionswege von IL-22 und Lambda-Interferonen in intestinalen Epithelzellen.
3. IL-22- und Lambda-Interferon-vermittelte Genregulation in intestinalen Epithelzellen.
4. Spezielle biologische Eigenschaften bei intestinaler Entzündung am Beispiel der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen M. Crohn und Colitis ulcerosa und biologische Funktionen wie Zellmigration, Zellproliferation und antivirale Aktivität am Beispiel der CMV-Colitis.

### 3 Material

#### 3.1 Material für zellbiologische Experimente

##### 3.1.1 Zelllinien

Name	Organismus	Spezifität	Bezugsquelle
Caco-2	<i>homo sapiens</i>	kolorektales Adenokarzinom	ATCC, Rockville, USA
DLD-1	<i>homo sapiens</i>	kolorektales Adenokarzinom	ATCC, Rockville, USA
HT-29	<i>homo sapiens</i>	kolorektales Adenokarzinom	ATCC, Rockville, USA
SW480	<i>homo sapiens</i>	kolorektales Adenokarzinom	ATCC, Rockville, USA
HCT116	<i>homo sapiens</i>	kolorektales Karzinom	ATCC, Rockville, USA
T84	<i>homo sapiens</i>	Lungenmetastase eines kolorektalen Karzinoms	ATCC, Rockville, USA
CCL-6=Int-407	<i>homo sapiens</i>	Primäre intestinale Zellen, mit HeLa kontaminiert	ATCC, Rockville, USA
Panc-1	<i>homo sapiens</i>	Epitheloidzelliges Pankreasgangkarzinom	ATCC, Rockville, USA
MIA PaCa-2	<i>homo sapiens</i>	Pankreaskarzinom	ATCC, Rockville, USA
LNCaP	<i>homo sapiens</i>	Supraklavikuläre Lymphknotenmetastase eines Prostatakarzinoms	ATCC, Rockville, USA
HepG2	<i>homo sapiens</i>	Hepatozelluläres Karzinom	ATCC, Rockville, USA
624.38-MEL	<i>homo sapiens</i>	Melanom	ATCC, Rockville, USA
MCF-7	<i>homo sapiens</i>	Epitheliales Adenokarzinom der Brustdrüse	ATCC, Rockville, USA
SK-BR-3	<i>homo sapiens</i>	Epitheliales Adenokarzinom der Brustdrüse	ATCC, Rockville, USA
HFF	<i>homo sapiens</i>	Primäre Vorhautfibroblasten	AG Adler Genzentrum der LMU

**Tabelle 3:** Verwendete Zelllinien.

### 3.1.2 Cytomegalie-Virenstämme

Name	Organismus	Spezifität	Bezugsquelle
VR1814	<i>homo sapiens</i>	Klinischer Wildtyp-Cytomegalievirus	AG Adler Genzentrum der LMU
AD-169	<i>homo sapiens</i>	Cytomegalievirus einer Tonsillektomie	AG Adler Genzentrum der LMU
Towne	<i>homo sapiens</i>	Urin eines Patienten mit kongenitaler Cytomegalievirus - Inklusionskrankheit	AG Adler Genzentrum der LMU
Smith	<i>mus musculus</i>	Murines Cytomegalievirus	AG Adler Genzentrum der LMU

**Tabelle 4:** Verwendete Cytomegalie-Virenstämme.

### 3.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle) Medium	Gibco, Karlsruhe
DMEM/F12 (1:1) (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Ham's F12 Medium mit L-Glutamin und 15 mM HEPES)	Gibco, Karlsruhe
Dulbecco's PBS+CaCl <sub>2</sub> +MgCl <sub>2</sub>	Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco, Karlsruhe
100x PS (10000 U/ml Penicillin 10000 µg/ml Streptomycin)	Gibco, Karlsruhe
Geneticin (G418-Sulfat)	Gibco, Karlsruhe
FCS Gold	PAA, Pasching, Österreich
DMSO	Merck, Darmstadt

### 3.1.4 Material für Immunfluoreszenzexperimente

Fixierungslösung: 3,2% PFA in PBS

Permeabilisierungslösung: 0,5% Triton X-100 in PBS

Blockierlösung: 10% Hasenserum in PBS

PBS-Waschpuffer: 7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.4, 3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl in H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

### 3.2 Material für molekularbiologische Experimente

#### 3.2.1 PCR-Material und PCR-Kits

Roche first strand cDNA synthesis kit	Roche, Mannheim
Taq DNA Polymerase Kit, recombinant	Invitrogen, Karlsruhe
Taq DNA Polymerase, recombinant	Fermentas, St.Leon-Rot
10 mM dNTP Mix	Fermentas, St.Leon-Rot
Turbo DNA-free	Ambion, Huntingdon, UK
RT-Kit Omniscript	Qiagen, Hilden
RT-Kit Sensiscript	Qiagen, Hilden
Quantitect SYBR Green Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen RNeasy kit	Qiagen, Hilden
100 bp Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Ladepuffer 10 x	Invitrogen, Karlsruhe
Nuclease free water	Promega, Madison, USA

#### 3.2.2 Primer

##### 3.2.2.1 Real-time PCR-Primer

hIL-22 forward	5'-gcaggcttgacaagtccaact-3'	MWG, Ebersberg
hIL-22 reverse	5'-gcctccttagccagcatgaa-3'	MWG, Ebersberg
h $\beta$ -actin forward	5'-gccaaccgcgagaagatga-3'	MWG, Ebersberg
h $\beta$ -actin reverse	5'-catcacgatgccagtggta-3'	MWG, Ebersberg
hIL-8 forward	5'-ccaggaagaaccaccgga-3'	MWG, Ebersberg
hIL-8 reverse	5'-gaaatcaggaaggctgccaag-3'	MWG, Ebersberg
hTNF- $\alpha$ forward	5'-ccaggcagtcagatcatcttctc-3'	MWG, Ebersberg
hTNF- $\alpha$ reverse	5'-agctggttatctctcagctccac-3'	MWG, Ebersberg

##### 3.2.2.2 PCR-Primer

hIL-22R forward	5'-ctccacagcggcatagcct-3'	MWG, Ebersberg
hIL-22R reverse	5'-acatgcagctccagctgg-3'	MWG, Ebersberg

hIL-28R forward	5'-acctatTTTgtggcctatcagagct-3'	MWG, Ebersberg
hIL-28R reverse	5'-cggctccacttcaaaaagtaat-3'	MWG, Ebersberg
hIL-10R2 forward	5'-ggctgaatttgcagatgagca-3'	MWG, Ebersberg
hIL-10R2 reverse	5'-gaagaccgaggccatgagg-3'	MWG, Ebersberg
hIL-22BP forward	5'-agggtacaatttcagtcccga-3'	MWG, Ebersberg
hIL-22BP reverse	5'-cggcgtcatgctccattctga-3'	MWG, Ebersberg
hIL-8 forward	5'-atgactccaagctggccgtggct-3'	MWG, Ebersberg
hIL-8 reverse	5'-tctcagccctcttcaaaaacttctc-3'	MWG, Ebersberg
hTNF- $\alpha$ forward	5'-atgagcactgaaagcatg-3'	MWG, Ebersberg
hTNF- $\alpha$ reverse	5'-tcacagggcaatgatccc-3'	MWG, Ebersberg
hBD-2 forward	5'-ccagccatcagccatgagggt-3'	MWG, Ebersberg
hBD-2 reverse	5'-ggagcccttctgaatccgca-3'	MWG, Ebersberg
hSOCS-3 forward	5'-ttctgatccgacagctc-3'	MWG, Ebersberg
hSOCS-3 reverse	5'-tgagagagaagctgccc-3'	MWG, Ebersberg
hGAPDH forward	5'-cggagtcaacggatttggtctat-3'	MWG, Ebersberg
hGAPDH reverse	5'-agccttctccatggtggtgaagac-3'	MWG, Ebersberg
mIL-28R forward	5'-gccctactcctgttctgt-3'	MWG, Ebersberg
mIL-28R reverse	5'-ggacacaccagagccttgat-3'	MWG, Ebersberg
mIL-28 forward	5'-agggtgccatcgagaagaG-3'	MWG, Ebersberg
mIL-28 reverse	5'-gtggtcagggtgagtcatt-3'	MWG, Ebersberg
mLactoferrin forward:	5'-gcctgttccagtctaaaacca-3'	MWG, Ebersberg
mLactoferrin reverse:	5'-gtaagaaaagcgcaggcttc-3'	MWG, Ebersberg
mE-Selectin forward:	5'-accgtcccttggtagt-3'	MWG, Ebersberg
mE-Selectin reverse:	5'-cgttgtaagaaggcacatgg-3'	MWG, Ebersberg
mCXCL2 forward:	5'-cctgccaagggtgacttca-3'	MWG, Ebersberg
mCXCL2 reverse:	5'-gtcagttagccttgctttg-3'	MWG, Ebersberg

mCXCL5 forward:	5'-cctacggtggaagtcatagc-3'	MWG, Ebersberg
mCXCL5 reverse:	5'-ctattgaacactggccgttc-3'	MWG, Ebersberg
mIL-4 forward:	5'-gagtgagctcgtctgtagg-3'	MWG, Ebersberg
mIL-4 reverse:	5'-cagcttatcgatgaatccagg-3'	MWG, Ebersberg
mIL-6 forward:	5'-caaagccagagtccttcagag-3'	MWG, Ebersberg
mIL-6 reverse:	5'-ggatggtccttggtccttagc-3'	MWG, Ebersberg
mIL-17 forward:	5'-caaactgaggccaaggac-3'	MWG, Ebersberg
mIL-17 reverse:	5'-agcttcccagatcacagagg-3'	MWG, Ebersberg
mIL-22 forward:	5'-accttctgaccaaactca-3'	MWG, Ebersberg
mIL-22 reverse:	5'-agcttcttctcgctcagacg-3'	MWG, Ebersberg
mGAPDH forward	5'-cgtcccgtagacaaaatggt-3'	MWG, Ebersberg
mGAPDH reverse	5'-tctccatggtggtgaagaca-3'	MWG, Ebersberg

h=human

m=murin

### 3.3 Material für proteinbiochemische Experimente

#### 3.3.1 Lysepuffer für die Proteinisolation

20 mM Tris-HCl pH 7,4

1% NP-40

150 mM NaCl

2 mM EDTA

2 mM EGTA

2 mM PMSF

400 mM NaVO<sub>3</sub>

4 mM NaF

Proteaseinhibitor-Mix (Complete Protease Inhibitor Cocktail) Roche, Mannheim

#### 3.3.2 Material für *Western Blot*-Experimente

Westernblot-Kammer Novex mini cell Invitrogen, Karlsruhe

NuPage Novex Bis-Tris Gel Invitrogen, Karlsruhe

20x Laufpuffer MES oder MOPS-SDS Invitrogen, Karlsruhe

PVDF-Membran Immobilon-P Millipore, Eschborn

Ladepuffer NuPage LDS Sample Buffer 4 x	Invitrogen, Karlsruhe
Größenmarker MagicMark	Invitrogen, Karlsruhe
Größenmarker MultiMark	Invitrogen, Karlsruhe
20x Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Sponge PAD für Xcell II Blotting	Invitrogen, Karlsruhe
Blotting Grade Blocker Non-fat dry Milk	Biorad, München
ECL Western Blotting Detection Reagents	Amersham, Freiburg
BioMax MR-Röntgenfilm	Kodak, Rochester, USA
Kodak X-Omat AR Film	Kodak, Rochester, USA
TBS: 20 mM TrisHCl pH 7,6, 150 mM NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	
TBS-T-Waschpuffer: 0,1% Tween-20 in TBS	
Blockierpuffer: 5% Magermilchpulver in TBS-T	
Stripping-Puffer: 83 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 % SDS, 0,7 % β-Mercaptoethanol (v/v) in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	

### 3.4 Material für funktionelle Experimente

#### 3.4.1 Material für Zellproliferationsexperimente

PMS: 0,92 mg/ml in PBS	Sigma, Taufkirchen
CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay 2 mg/ml in PBS	Promega, Mannheim

#### 3.4.2 Material für Apoptoseexperimente

Nicolettipuffer: 0,1 % Natriumcitrat, 0,1 % Triton X-100, 50 µg/ml Propidiumiodid	
FACS-Puffer: NaCl, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , KCl, LiCl, NaN <sub>3</sub> , Na <sub>2</sub> EDTA, pH 7,37	



### 3.5 Antikörper

$\alpha$ -phospho-ERK-1/2 (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -phospho-Akt (Ser473)	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -ERK-1/2	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -SAPK/JNK	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -p38	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -Akt	Cell Signaling, Frankfurt
$\alpha$ -Kaninchen, HRP-konjugiert	Amersham, Freiburg
$\alpha$ -phospho-STAT1	BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, USA
$\alpha$ -phospho-STAT3	Upstate Biotechnology, Lake Placid, USA
$\alpha$ -STAT1	Santa Cruz, Heidelberg
$\alpha$ -STAT3	Santa Cruz, Heidelberg
$\alpha$ -HCMV i.e. (immediate-early protein, 72 kDa)	Perkin-Elmer, Boston, USA
$\alpha$ -Maus cy3 i.e. antibody	Sigma, Taufkirchen
$\alpha$ -APO-A1	Sigma, Taufkirchen
$\alpha$ -IL-28R	Imgenex, Sandiego, USA

### 3.6 Sonstige Chemikalien, Lösungen und Kits

$[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$	Perkin Elmer, Boston, USA
Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
BD OptEIA Human IL-8 Elisa Kit II	BD Biosciences, Bedford, USA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Bio-Rad, München
BSA	Sigma, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
DMSO	Fluka, Taufkirchen
DSS (Molekulargewicht 36,100-45,500)	TdB Consultancy Uppsala, Schweden
EDTA	Sigma, Taufkirchen
EGTA	Sigma, Taufkirchen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
FITC	Sigma, Taufkirchen
Flüssigstickstoff	Linde, München
Gelatine (bovine)	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Lipopolysaccharide (LPS)	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Bio-Rad, München
Mowiol	Carl Roth, Karlsruhe

---

Natriumorthovanadat	Sigma, Taufkirchen
Natriumfluorid	Sigma, Taufkirchen
Nonidet-P40 (NP-40)	Roche, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
PMSF	Sigma, Taufkirchen
PD98059	Tocris Cookson, Bristol, UK
rekombinantes humanes IL-22-Protein	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
rekombinantes humanes IL-28A-Protein	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
rekombinantes humanes IL-29-Protein	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
rekombinantes humanes TNF- $\alpha$ -Protein	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
rekombinantes humanes IL-1 $\beta$ -Protein	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SB203580	Tocris, Bristol, UK
SDS	Fisher, Schwerte
SP600125	Tocris, Bristol, UK
Tris	Fisher, Schwerte
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Fluka, Taufkirchen
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
<i>Wortmannin</i>	Tocris, Bristol, UK

### 3.7 Verbrauchsmaterial

Zellkultur-Platten Falcon (6-, 24-Loch)	Becton Dickinson, Heidelberg
96-Loch Zellkultur-Mikrotiterplatten runder Boden	Corning, Corning, USA
Einfrierröhrchen Nunc, (2,5 ml)	Roskilde, Dänemark
Einmalglaspipetten (5/10/25 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger	Marienfeld, Lauda- Königshofen
Deckgläser (18x18 mm, Menzel)	Nunc, Wiesbaden
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2/0,5/1,0/1,5/2,0 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen Falcon (5/10/25/50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturschalen Falcon (3/6/10/15 cm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen Discardit II (5/10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Sterican Gr.18/20	Braun, Melsungen
<b>3.8 Geräte</b>	
Neubauer Zellzählkammer	Brand, Wertheim
Mikroskop	Olympus IX50, Hamburg
Rotorgene RG-3000 Real-time PCR-Cycler	Corbett Research, Sydney, Australien
PCR-Gerät PTC200	Biorad, München
ELISA-Lesegerät	Tecan, Crailsheim

---

Röntgen-Entwickler Agfa Curix 60	Agfa, Köln
Pipetten (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Glashomogenisator ( <i>Douncer</i> )	Sarstedt, Nümbrecht
Ultrazentrifuge	Hettich, Tuttlingen
DNA-Sequenziersystem ABI Prism 3100	Perkin-Elmer, Boston, USA
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Rotanta 63R	Hettich, Tuttlingen
FACS-Gerät Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank	Heraeus, München
Gelelektrophoresekammer Sub Cell GT	Biorad, München
Elektrophoresegeräte Power Pac	Biorad, München
UV-Dokumentationssystem Multi Doc-it	UVP, Upland, USA
Autoklav	Hirayama, Tokyo, Japan
Brutschrank 37°C	Heraeus, München
Einfriergerät	Cryoson, Schöllkrippen
Flüssigstickstofftank	Cryoson, Schöllkrippen
Phasenkontrastmikroskop	Nikon, Tokyo, Japan
Geltrockner	Biorad, München
pH-Meter pH 530	WTW, Weilheim
Photometer UltrospecIII	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Schüttelinkubator (Orbital shaker)	Precision Scientific, VA, USA
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Feinwaage PL200	Mettler-Toledo, Gießen

### 3.9 Software

TINA Version 2.09

Raytest Isotopenmessgeräte  
GmbH, Straubenhardt

### 3.10 Material für Mausexperimente

Mausstamm C57BL/6

Charles River, Sulzfeld

Mausstamm C3H/HeJ

Charles River, Sulzfeld

Macrolon Typ III Käfige

Bayer, Leverkusen

CO<sub>2</sub>-Narkosegerät Vapor19.3  
mit Isoflurane

Dräger, Lübeck

Futter *mouse diet*

Sniff Spezialdiäten GmbH,  
Soest

## **4 Methoden**

### **4.1 Allgemeines**

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Experimente durch dreifaches Wiederholen bestätigt.

### **4.2 Methoden zellbiologischer Experimente**

#### **4.2.1 Zellkulturexperimente**

##### **4.2.1.1 Kultivierung von Zellen**

Die gefrorenen Zellen wurden im 37°C temperierten Wasserbad aufgetaut und sofort in 10 ml frischen und auf 37°C vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen. Anschließend wurde diese Zellmediumsuspension mit 1200 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Mediumsüberstand wurde mit einer Einmalglaspipette abgesaugt und das Zellsediment mit ca. 1 ml frischen, vorgewärmten Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgelöst. Diese Suspension wurde in ca. 10 ml frischen, vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl in verschiedenen Mischungsverhältnissen, je nach gewünschter Dichte, in neue sterile Zellkulturplatten verteilt. Das Wachstum erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre. Je nach Bedarf der Zelllinie wurde jeden 2. bis 3. Tag das Zellkulturmedium mit einer Einmalglaspipette abgesaugt und frisches, vorgewärmtes Zellkulturmedium zugegeben. Bei ca. 70-80%iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellkulturplatte einmal mit ca. 10 ml vorgewärmten PBS gewaschen, um die im Zellkulturmedium vorhandenen Trypsininhibitoren zu entfernen. Anschließend wurden, je nach Zellkulturplattendurchmesser, 1-2 ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen einige Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen vom Zellkulturplattenboden lösten. Die abgelösten Zellen wurden in frischen, vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und in verschiedenen Mischungsverhältnissen, je nach gewünschter Dichte, auf neue sterile Zellkulturplatten verteilt.

##### **4.2.1.2 Einfrieren von Zellen**

Bei ca. 70-80%iger Konfluenz wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellkulturplatte einmal mit PBS gewaschen, um die im Zellkulturmedium vorhandenen Trypsininhibitoren zu entfernen. Anschließend wurden je nach Zellkulturplattendurchmesser 1-2 ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen einige Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert,

bis sich die Zellen vom Zellkulturplattenboden lösten. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml frischen, auf 37°C vorgewärmtem Zellkulturmedium aufgenommen und mit 1200 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Mediumsüberstand wurde mit einer Einmalglaspipette abgesaugt und das Zellsediment in kaltem Einfriermedium (80% FCS, 20% DMSO) resuspendiert. Davon wurde je 1 ml in ein Einfrierröhrchen gegeben und diese sofort auf Eis gestellt. Die Einfrierröhrchen wurden auf -80°C heruntergekühlt und anschließend bei -80°C oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **4.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Zellmediumsuspension wurde 50 µl der Suspension und 150 µl Trypanblau (1:4-Verdünnung) in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. In den vier Großquadraten der Zählkammer wurden jeweils alle vitalen Zellen, die durch das Trypanblau nicht dunkel gefärbt wurden, gezählt. Um die Zellzahl in der Zellmediumsuspension pro ml zu berechnen, wurde der Mittelwert der Zählung mit dem Verdünnungsfaktor 4 und dem Zählkammerfaktor 10.000 multipliziert.

#### **4.2.1.4 Zellstimulation**

Bei ca. 70-80 %iger Zellkonfluenz wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und die Zellen für 12-16 h in FCS-freiem Zellkulturmedium bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Stimulation erfolgte, je nach Versuchsansatz, über unterschiedliche Zeitintervalle und mit verschiedenen Konzentrationen der entsprechenden Stimulanzen.

#### **4.2.2 Immunfluoreszenzexperimente**

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten auf Deckgläsern, die zuvor für 10 min bei RT mit 0,1 %iger Gelatinelösung beschichtet worden waren, kultiviert. Nach ca. 1-2 Tagen Zellwachstum erfolgten drei Waschschrte mit 4°C kalten PBS, um Mediumsrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für 20 min in 3,2% PFA in PBS bei RT fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 4°C kalten PBS wurden die Zellen durch 5-minütige Inkubation bei RT mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nach einem erneuten Waschschrte mit PBS wurden die Zellen für 60 min mit 10% Hasenserum in PBS blockiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die Antikörperinkubation erfolgte für 60 min bei RT in einer feuchten Kammer. Die Antikörper wurden in Blockierlösung verdünnt. Anschließend wurden die Zellen zum Anfärben der Zellkerne für 10 min mit 4 µmol/l Hoechst 33342 inkubiert.



Nach jedem Schritt wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen. Zum Schluss erfolgte ein Waschschriff mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ , um PBS-Salze zu entfernen. Die Deckgläser wurden mit einem Tropfen Mowiol auf einen Objektträger gegeben. Nachdem die Proben getrocknet waren, erfolgte eine Auswertung mittels Fluoreszenz- und konfokaler Lasermikroskopie.

### **4.2.3 ELISA-Experimente**

Die Zellen wurden in Zellkulturplatten bis zu einer Dichte von 70% herangezüchtet. Nach Serumentzug über Nacht wurden 100  $\mu\text{l}$  Medium entnommen (Nullwert). Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit dem jeweiligen Zytokin. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  Medium entnommen und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Messung eingefroren. Für die Messung der IL-8 Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe von IL-8 hergestellt, die parallel zu den Proben gemessen wurde. Es wurden zunächst in eine 96-Loch-Platte, welche mit immobilisiertem IL-8 Antikörper beschichtet war, je 50  $\mu\text{l}$  ELISA-Verdünnungslösung pro Loch gegeben und diese dann mit 100  $\mu\text{l}$  Probe bzw. Standard vermischt. Es erfolgte eine Inkubation für 2 h bei RT. Während dieser Zeit wurde das im Medium befindliche IL-8 von den Antikörpern gebunden. Anschließend wurde 5x mit je 300  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Loch gewaschen. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  fertig gemischter Detektierlösung, die einen biotinylierten IL-8-Antikörper und ein Avidin-HRP-Konjugat enthielt) wurden die Ansätze für 1 h bei RT inkubiert. Nach 7 Waschschriffen (wie oben bereits beschrieben) wurden 100  $\mu\text{l}$  TMB-Lösung addiert und die Platten für 30 min im Dunklen inkubiert. Nach Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  1M Phosphorsäure wurde die Absorption der Proben bei 450 nm gemessen. Anhand der vorher hergestellten IL-8 Verdünnungsreihe konnte eine Standardkurve erstellt und aus dieser die IL-8-Konzentrationen der Proben berechnet werden.

## **4.3 Methoden molekularbiologischer Experimente**

### **4.3.1 RNA-Isolation aus Zellen**

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellkulturplatte einmal mit  $4^\circ\text{C}$  kalten PBS gewaschen. Anschließend wurde je nach Zellkulturplattendurchmesser 1-2 ml Trizol auf die Zellen gegeben, diese mit einem Zellschaber vom Zellkulturplattenboden gelöst und in ein 1,5 ml großes Reaktionsgefäß (Eppendorf-Tube) überführt. Anschließend wurde diese Suspension ca. 6x durch eine 21G-Nadel auf- und abgesaugt. Die homogenisierte Lösung wurde 5 min bei RT inkubiert, um die komplette Dissoziation des Nukleoproteinkomplexes zu gewährleisten.

Nun wurde 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol zugegeben und das Reaktionsgefäß für ca. 15 sec mit der Hand geschüttelt. Nach 2-3 min wurde das Reaktionsgefäß mit 13.000 rpm für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Bei der Zentrifugation entstand ganz unten eine rote Phase, die der Phenol-Chloroform-Phase entspricht, eine Interphase und ein farbloser wässriger Überstand mit der RNA, der in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Es wurden 500 µl Isopropanol pro 1 ml Trizol zugegeben, gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 11.000 rpm für 10 min bei 4°C. Das bei der Zentrifugation entstandene, nun sichtbare RNA-*pellet* wurde 2x mit je 1 ml 75%igen EtOH pro 1 ml Trizol gewaschen. Dazwischen erfolgte jeweils ein Zentrifugationsschritt (7.500 rpm, 5 min, 4°C). Zum Schluß wurde das RNA-*pellet* an der Luft getrocknet, in 30-50 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen und 10 min bei 55-60°C inkubiert. Die RNA wurde bei -80°C gelagert.

#### 4.3.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Mit Hilfe eines Photometers wurde die RNA-Konzentration in einer Lösung bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Bei einer Küvettschichtdicke von 1 cm entspricht ein Wert von 1,0 einer Konzentration von 40 µg/ml RNA. Als Maß für die Reinheit der RNA diene der Quotient aus den optischen Dichten bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm. Für reine RNA liegt er bei etwa 1,8. Niedrigere Werte bedeuten Verunreinigungen mit Proteinen, höhere Werte Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern.

#### 4.3.3 Entfernung von DNA-Kontaminationen aus der RNA-Präparation

Der RNA-Lösung wurden 0,1 Volumenanteil 10x Turbo DNase-Puffer und, je nach Volumen, 1-2 µl Turbo DNase (2 U/µl) zugegeben. Anschließend wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Im nächsten Schritt wurde nochmals 1-2 µl Turbo DNase (2 U/µl) hinzugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nun wurden 0,1 Volumenanteile DNase-Inaktivierungsreagenz hinzugefügt und per Hand vermischt. Nach 2 min Inkubation bei RT wurden die Probe bei 10.000 rpm und 4°C für 1,5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

#### 4.3.4 Reverse Transkriptions-PCR zur Herstellung von cDNA

In einem sterilen Reaktionsgefäß wurde für ein Endvolumen von 20 µl folgende Substanzen auf Eis vermischt:

2 µl	10x Reaktionspuffer	→ Endkonzentration 1x
4 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>	→ Endkonzentration 5 mM

2 µl	dNTP-Mix	→ Endkonzentration 1 mM
2 µl	Oligo-p(dT) <sub>15</sub> Primer	→ Endkonzentration 0,04 A <sub>260</sub> units
1 µl	RNase-Inhibitor	→ Endkonzentration 50 units
0,8 µl	AMV Reverse Transkriptase	→ Endkonzentration ≥ 20 units
1-3µl	RNA	
ad 20µl	steriles Wasser	

Nach kurzem Durchmischen der Probe wurde diese kurz zentrifugiert und erst 10 min bei 25°C und dann für 60 min bei 42°C inkubiert. Danach erfolgte die Denaturierung und somit Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 99°C für 5 min. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

#### 4.3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In einem sterilen Reaktionsgefäß wurde für ein Endvolumen von 20 µl folgende Substanzen auf Eis vermischt:

2 µl	10x Reaktionspuffer	→ Endkonzentration 1x
1 µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>	→ Endkonzentration 2,5 mM
0,4 µl	dNTP	→ Endkonzentration 0,2 mM
0,8 µl	Primermix (forw./rev.)	→ Endkonzentration 0,2 mM
0,2 µl	Taq-DNA Polymerase	
0,5-1 µl	cDNA	
ad 20µl	steriles Wasser	

Nach kurzer Zentrifugation wurde die cDNA in einer PCR-Maschine mit folgenden, je nach Schmelztemperatur der Primer, beispielhaftem Programm vermehrt:

1. Denaturierung	95°C	1 min
2. Denaturierung	95°C	45 sec
3. Primeranlagerung	variabel°C	45 sec
4. Elongation	72°C	45 sec
35-40-fache Wiederholung der Punkte 2-4		
5. Elongation	72°C	7 min
6. Kühlung	15°C	∞

#### 4.3.6 Agarose-Gelelektrophorese von PCR-Produkten

Zur Sichtbarmachung des PCR-Produktes wurden 10 µl der Probe mit 1 µl eines 10x Lade-puffers in die Taschen eines 2%igen Agarosegels, das mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid angereichert war, pipettiert und bei konstanter Spannung von 10 V/cm Gellänge in einer Gelelektrophoresekammer aufgetrennt. Zur Größenkontrolle wurde ein 100 bp Marker mit auf das Gel aufgetragen. Das PCR-Produkt wurde unter einem UV-Dokumentationssystem sichtbar gemacht und digital fotografiert.

#### 4.3.7 Densitometrie von PCR-Produkten

Die Quantifizierung von DNA-Banden in Agarosegelen erfolgte mit Hilfe der TINA-Software, Version 2.09. Bei der Auswertung wurde jeweils auf die GAPDH-Expression oder Aktin-Expression normalisiert.

#### 4.3.8 Sequenzierung von PCR-Produkten

Zur Verifizierung des spezifischen PCR-Produktes wurde dieses sequenziert. Hierfür wurden in einer Sequenzierungsreaktion neben der DNA-Polymerase und dem Nukleotid-Mix zusätzlich fluoreszenzmarkierte Stopnukleotide eingesetzt, bei deren Einbau es zu einem Abbruch der Reaktion an dieser Stelle kommt. Die hierdurch entstandenen fluoreszenzmarkierten Sequenzfragmente unterschiedlicher Länge wurden in einem Sequenziersystem auf einem Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt und mittels Laserlichtanregung dargestellt. Das Auslesen der Rohdaten und die Sequenzanalyse erfolgte mit Hilfe einer speziellen Software (ABI prism Version 3.4.5).

#### 4.3.9 Quantitative Polymerasekettenreaktion (*Real-time PCR*)

Für die quantitative PCR (*Real-time PCR*) wurde cDNA mit Hilfe des QuantiTect SYBR Green PCR Kits vermehrt. In einem sterilen Reaktionsgefäß wurde für ein Endvolumen von 20 µl folgende Substanzen auf Eis vermischt:

cDNA	8 µl (einer 1:20-Verdünnung)	
2x QuantiTect Mix	10 µl	→ Endkonzentration 1x
20 µM Primer	je 0,3 µl	→ Endkonzentration je 0,3 µM
Nuklease-freies Wasser	1,4 µl	

In einem Rotorgene RG-3000-Gerät erfolgte die Vermehrung der cDNA je nach Schmelztemperatur der Primer durch folgendes beispielhaftes Programm:

- |                     |            |  |
|---------------------|------------|--|
| 1. Denaturierung    | 95°C       | 15 min                                       |
| 2. Denaturierung    | 95°C       | 30 sec                                       |
| 3. Primeranlagerung | variabel°C | 30 sec (abhängig von Primer und PCR-Produkt) |
| 4. Elongation       | 72°C       | 30 sec                                       |

40-fache Wiederholung der Punkte 2-4

Die Expression von  $\beta$ -Aktin wurde zur Normalisierung der Genexpression verwendet.

#### **4.4 Methoden proteinbiochemischer Experimente**

##### **4.4.1 Proteinisolation aus Säugerzellen**

Bei ca. 70-80%iger Zellkonfluenz wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, die Zellkulturplatte 3x mit 4°C kaltem PBS gewaschen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden 200-400  $\mu$ l NP-40 Lysepuffer und 2  $\mu$ l PMSF auf die Zellen gegeben und die Zellen mit einem sterilen Zellschaber gelöst. Daraufhin wurde die Lösung in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und ca. 6x durch eine 21G-Nadel auf- und abgesaugt. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte eine Zentrifugationsschritt bei 10.000 rpm für 20 min bei 4°C. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach der Konzentrationsmessung bei -20°C gelagert.

##### **4.4.2 Konzentrationsmessung von Proteinen**

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde mit Hilfe der Bradford-Reagenz bestimmt. Das Prinzip beruht darauf, dass der in der Bradford-Reagenz enthaltene Farbstoff (Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBBG)) verschiedene Absorptionsmaxima zeigt, je nachdem ob er an Protein gebunden ist oder nicht. Die nicht gebundene kationische Form von CBBG zeigt ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, während sich dieses bei der proteingebundenen anionischen Form bei 595 nm befindet. Mit Hilfe einer Standardkurve, welche mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt wurde, konnte so die Proteinkonzentration einer unbekannt Probe spektrophotometrisch bestimmt werden. Für die Standardkurve wurden verschiedene Verdünnungen von BSA hergestellt (0/0,1/0,2/0,5/1/2/5/10 mg/ml). Die Bradfordlösung wurde 1:5 in Wasser verdünnt und 1 ml davon mit 2  $\mu$ l Proteinlösung vermischt, kurz inkubiert und dann im Spektralphotometer in einer Einmalküvette bei 595 nm vermessen.

### 4.4.3 *Western Blot-Experimente*

Zur Visualisierung von zellulären Proteinen wurden in Westernblot-Experimenten eine definierte Konzentration der Protein-Lösung mit einem 4x Ladepuffer gemischt, 10 min bei 72°C erhitzt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung und zusätzlich ein Größenmarker in die Taschen eines vorgefertigten Polyacrylamidgels aufgetragen und in einer mit 1x Laufpuffer befüllten Westernblotkammer bei konstanter Spannung von 110 Volt ca. 1,5 h aufgetrennt. Daraufhin wurden die Proteine vom Polyacrylamidgel auf eine zuvor in Methanol eingeweichte PVDF-Membran übertragen. Für diesen Transfer wurde über 2 h eine Spannung von 25 V angelegt. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurde die PVDF-Membran anschließend für 1 h bei RT in Blockierpuffer inkubiert. Nach zwei kurzen Waschschritten mit TBS-T-Waschpuffer wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:1.000 in 5 % BSA in TBS-T) über Nacht bei 4°C geschwenkt. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper (anti-rabbit Ig, horseradish, Verdünnung 1:5.000 in Blockierpuffer) für 1 h bei RT inkubiert. Es erfolgten drei weiterer Waschschrritte von 5 min mit TBS-T. Zur Detektion der Proteine wurde der ECL-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Proteinbanden wurden durch Autoradiographie mit einem BioMax MR-Film sichtbar gemacht.

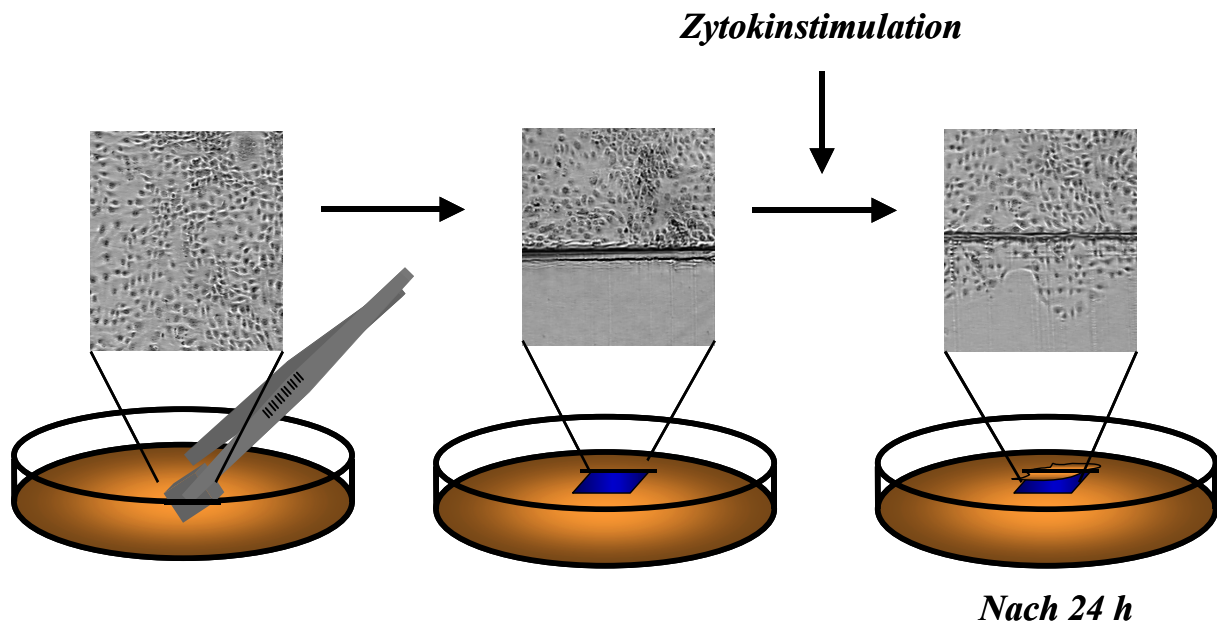
Falls die Membranen für eine weitere Proteindetektion vorgesehen waren, wurden sie kurz in TBS-T gewaschen und dann für 30-40 min bei 56°C mit *stripping*-Puffer behandelt, um bereits gebundene Antikörper zu entfernen. Dann wurde die Membran 3x für jeweils 5 min mit TBS-T gewaschen und für 1 h bei RT in Blockierpuffer geschwenkt. Die weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

## 4.5 Methoden funktioneller Experimente

### 4.5.1 Wundheilungsexperimente

Für die Wundheilungsexperimente (Abb.5) haben sich in Pilotexperimenten SW480-Zellen als am besten geeignet erwiesen, da sie sich durch Wachstum in sog. *monolayern* auszeichnen. Diese wurden in 6-Loch-Platten bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Mit einer sterilen Rasierklinge wurden pro Loch 8 standardisierte Wundflächen generiert. Frei schwimmende Zellen wurden durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Das Kulturmedium mit 10% FCS wurde anschließend gegen ein Kulturmedium mit 1% FCS ausgetauscht und die Zellen mit 10 bzw. 100 ng/ml Zytokin oder Kulturmedium mit 1% FCS

allein stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und die über den Wundrand gewanderten Zellen unter einem Mikroskop ausgezählt. Für jede Gruppe (zytokinstimuliert und mediumstimuliert) wurden drei Löcher ausgezählt, wobei für jedes Loch jeweils 8 unterschiedliche Gesichtsfelder ausgewertet wurden, in denen mehr als 300 Zellen über den Wundrand gewandert waren.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Wundheilungsversuche.** Mit einer sterilen Rasierklinge werden „Wundflächen“ generiert und die Zellen anschließend mit Zytokin oder Kulturmedium mit 1% FCS als Kontrolle stimuliert. Nach 24 h werden die über den Wundrand gewanderten Zellen unter einem Mikroskop ausgezählt.

#### 4.5.3 Zellproliferationsexperimente

5.000 bzw. 10.000 Zellen der Zelllinien HT-29 bzw. HCT116 wurden pro Loch in eine 96-Loch-Platte pipettiert und über Nacht kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 10, 100 oder 1.000 ng/ml Zytokin bzw. zytokinfreiem Medium stimuliert. Nach 48 h wurden 20 µl eines 1:20 Gemisches von PMS und MTS (*CellTiter 96 Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay*) zugegeben und für 1-3 h bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde die Absorption bei 490 nm in einem Photometer gemessen.

#### 4.5.4 Apoptoseexperimente

Für Apoptoseexperimente wurden SW480-Zellen verwendet, da diese im Vergleich zu anderen intestinalen Zelllinien weniger resistent gegen die Fas-Liganden-induzierte Apoptose sind. Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten mit einer Dichte von 200.000 Zellen pro Loch ausgesät. Nach Serumentzug für 12-16 h über Nacht wurden verschiedene Konzentrationen (100 ng/ml

und 500 ng/ml) des Fas-Liganden  $\alpha$ -APO-1 und das zu untersuchende Zytokin in der Konzentrationen von 100 ng/ml zugegeben und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Ablösung der Zellen mit einem sterilen Zellschaber in 4°C kalten PBS. Nach einem Zentrifugationsschritt (2.000 rpm, 5 min) wurde das Zellpellet in 200  $\mu$ l Nicolettipuffer aufgenommen, gemischt und mindestens 4 h bis maximal 4 Tage bei 4°C inkubiert. Die Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen erfolgte per FACS-Analyse.

#### **4.6 Methoden virologischer Experimente**

##### **4.6.1 Vermehrung von humanen Cytomegalieviren (HCMV) in Fibroblasten**

Um eine ausreichend große Menge von HCMV für die Experimente zur Verfügung zu haben, wurden HCMV in Fibroblasten vermehrt. Hierfür wurden präputiale Fibroblast-Zellen (HFF) in 12 cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von ca. 40% kultiviert und anschließend mit dem jeweiligen HCMV-Stamm infiziert. Über ca. 1-2 Wochen wurden die Zellen wie oben beschrieben vermehrt. Wenn die meisten Zellen infiziert waren, was an einer Lochbildung in den Zellkulturschalen zu erkennen war, wurden die Mediumüberstände in sterile 25 ml Röhren überführt und für 10 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Nun wurden diese Überstände in einen sterilen großen Zentrifugationsbecher gesammelt und in einer Ultrazentrifuge bei 12.000 rpm für 3 h zentrifugiert. Das entstandene *pellet* wurde in 2x sterilisierter 9%iger Magermilch aufgenommen und aliquotiert. Die Fibroblast-Zellen wurden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert, in sterile 25 ml Röhren überführt und 5 min bei 1.200 rpm zentrifugiert. Die entstandenen *pellets* wurden in ca. 3 ml Medium aufgenommen und vereint. Nun wurden die Zellen mit Hilfe eines Glashomogenisators (sog. *douncer*) durch ca. 50x Auf- und Ab-Bewegungen aufgeschlossen. Das Medium mit den nun freien HCM-Viren wurde in sterile 25 ml Röhren überführt und 10 min bei 3.500 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den HCMV wurde anschließend mit 1-2 ml 2x sterilisierter 9%iger Magermilch vermischt und aliquotiert.

##### **4.6.2 Bestimmung des HCMV-Titers**

In 24-Loch-Platten wurden HFF-Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert. 100  $\mu$ l der zu bestimmenden HCMV-Verdünnung wurde mit 900  $\mu$ l Zellkulturmedium und 5 % FCS vermischt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von  $10^{-1}$  bis  $10^{-8}$  hergestellt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden 800  $\mu$ l der entsprechenden Virusverdünnungen auf die HFF-Zellen gegeben und für 1 h infiziert. Daraufhin wurde die Virusverdünnung wieder



abgenommen und die Zellen mit 1 ml Zellkulturmedium, das 10 % FCS und  $\alpha$ -CMV-Serum enthält, für 7-14 Tage kultiviert. Nach diesem Zeitraum wurden die infizierten Zellen gefärbt und anhand von Standardkurven die Konzentration bestimmt.

#### 4.6.3 HCMV-Infektion intestinaler Epithelzellen

In Pilotexperimenten wurden die Zelllinien HT-29, Caco-2, SW480, HCT116, T84 und DLD-1 jeweils mit den HCMV-Stämmen VR1814, AD-169 und Towne in verschiedenen Konzentrationen infiziert. Hierbei zeigte sich die höchste Infektionsrate durch den Wildtypvirenstamm VR1814 bei HCT116-Zellen mit einer m.o.i. von 2, die daher für die weiteren Experimente verwendet wurden. Analog zu den Pilotexperimenten wurden HCT116-Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 40% in einer 24-Loch-Platte kultiviert und in FCS-freien Zellkulturmedium mit 10 bzw. 100 ng/ml des entsprechenden Zytokins oder nur mit FCS-freien Zellkulturmedium zur Kontrolle stimuliert. Nach 24 h wurde das Medium in eine andere 24-Loch-Platte überführt und die Zellen mit einem Gemisch aus 100  $\mu$ l CMV-*stock* und 300  $\mu$ l Zellkulturmedium mit 5% FCS (m.o.i. von 2; entspricht  $2 \times 10^6$  pfu) für 2 h bei 37°C im Brutschrank infiziert. Anschließend wurde das Infektionsmedium abgesaugt und das alte Medium aus der zweiten 24-Lochplatte und 0,5 ml frisches Zellkulturmedium mit 10% FCS auf die entsprechenden Zellen gegeben. Nach 72 h erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung auf i. e.-positive Zellen.

#### 4.6.4 Immunfluoreszenz für den Nachweis von *immediate early* (i. e.) Antigen

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Zur Fixierung der Zellen wurde 5 min mit 400  $\mu$ l eines Aceton/Methanol (1:1)-Gemisches bei RT inkubiert. Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen, 250  $\mu$ l einer 1:100 Verdünnung des primären i.e. Antikörpers (PBS/5% FCS) auf die Zellen gegeben und 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nun wurde 3x mit PBS gewaschen, 250  $\mu$ l einer 1:1.000 Verdünnung des sekundären  $\alpha$ -Maus-cy3-Antikörpers (PBS/5% FCS) auf die Zellen gegeben und 45 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zuletzt wurde wieder 3x mit PBS gewaschen und die i.e.-positiven Zellen randomisiert in 5 verschiedenen Gesichtsfeldern mit Hilfe der Fluoreszenz- und konfokalen Lasermikroskopie mit Grünfilter analysiert.

## **4.7 Mausexperimente**

### **4.7.1 DSS-induzierte Colitis**

C57BL/6 und C3H/HeJ Mäuse wurden in Macrolon Typ III-Käfigen bei konstanter Temperatur von 20-22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten und ihnen Wasser und Futter nach Belieben zur Verfügung gestellt. Täglich wurde auf die Sauberkeit der Käfige und den Zustand der Tiere geachtet. Die Käfige wurden mindestens zweimal pro Woche gereinigt und das Streu gewechselt. Bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden wurden Manipulationen an den Tieren immer zur gleichen Zeit durchgeführt. Die experimentelle Colitis wurde durch Hinzufügen von 3% und 4,5% (je nach Mausstamm) DSS zum Trinkwasser der Tiere über 5 Tage induziert. Am Tag 6 wurden die Mäuse nach CO<sub>2</sub>-Narkose liquidiert und das Kolon für die weitere Analyse entnommen. RNA aus der Kolonschleimhaut wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy-kits nach Herstelleranweisung gewonnen.

### **4.7.2 Murine Cytomegalieviren (MCMV)-Infektion**

C57BL/6 wurden analog zu den oben beschriebenen Mausexperimenten gehalten und mit 1x10<sup>6</sup> pfu der MCMV-Linie *Smith* durch intravenöse Applikation infiziert, Kontrollmäusen wurde PBS injiziert. Nach 45 h wurden die Mäuse nach CO<sub>2</sub>-Narkose liquidiert und das Kolon für die weitere Analyse entnommen. RNA aus der Kolonschleimhaut wurde mit Hilfe der Trizol-Reagenz gewonnen.

### **4.7.3 Tierversuchsethik**

Alle Tierversuche wurden von der Tierversuchskommission der Regierung von Oberbayern genehmigt und gemäß den Richtlinien des *National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* durchgeführt.

## **4.8 Biopsiegewinnung**

Biopsien wurden von Patienten mit M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa im Rahmen von Routinekoloskopien mit Hilfe einer Biopsiezange entnommen, sofort in 1 ml Trizol gegeben und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der LMU München genehmigt. Alle Patienten unterzeichneten vor der Probenentnahme eine Einverständniserklärung. Von jedem Patienten wurden 4 Biopsien entnommen, je 2 von makroskopisch entzündetem und 2 von makroskopisch nicht entzündetem Gewebe. In jeder Biopsie wurde die IL-22- und IL-8-mRNA-Expression

bestimmt. Zur genauen Quantifizierung wurden die durchschnittliche IL-22- und IL-8-mRNA-Expression in den zwei entzündeten Mukosabiopsien mit denen der nicht entzündeten Biopsien verglichen. Zur Berechnung des Korrelationskoeffizienten wurde für jeden Patienten die IL-22-mRNA- Expression mit der IL-8-mRNA-Expression korreliert.

#### **4.9 Statistische Analysen**

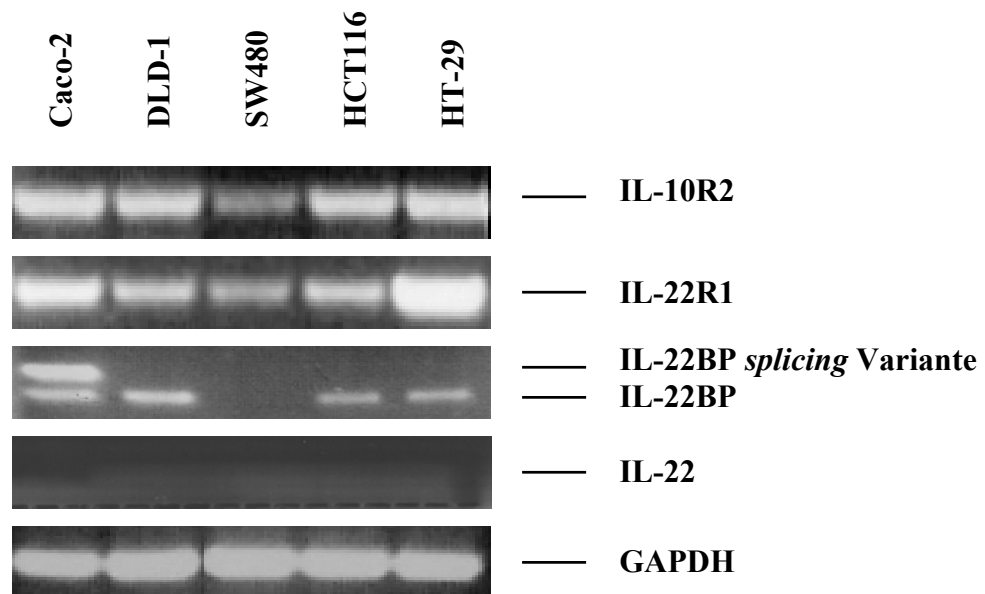
Statistische Analysen wurden mit Hilfe des zweiseitigen Student's t-Test durchgeführt, wobei p-Werte  $< 0,05$  als signifikant angesehen wurden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der Versuche mit IL-22 in intestinalen Epithelzellen

#### 5.1.1 Expression des IL-22-Rezeptorkomplexes

Zur Analyse der intestinalen mRNA-Expression des IL-22-Rezeptorkomplexes wurde die Expression der beiden IL-22-Rezeptoruntereinheiten IL-10R2 und IL-22R1 in den intestinalen Epithelzelllinien Caco-2, DLD-1, SW480, HCT116 und HT-29 untersucht. Durch RT-PCR wurde gezeigt, dass in allen untersuchten Zelllinien die Rezeptoreinheiten IL-10R2 und IL-22R1, nicht jedoch IL-22, exprimiert werden. Darüber hinaus war bis auf SW480 in allen Zelllinien der lösliche Rezeptor IL-22BP nachzuweisen, in Caco-2-Zellen interessanterweise auch eine alternative *splicing*-Variante (Abb.6).



**Abbildung 6:** Expression von IL-10R2- und IL-22R1-mRNA in den intestinalen Epithelzelllinien Caco-2, DLD-1, SW480, HCT116 und HT-29. IL-22BP mRNA ist bis auf SW480 in allen untersuchten Zelllinien exprimiert, in Caco-2-Zellen zusätzlich eine alternative *splicing*-Variante.

### 5.1.2 Hochregulation von IL-22R1-mRNA durch proinflammatorische Mediatoren

Anschließend wurde die mRNA-Regulation der IL-22-Rezeptoruntereinheiten IL-10R2 und IL-22R1 nach Stimulation von HT-29-Zellen mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ), IL-1 $\beta$  (10 ng/ml) und TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) mittels *real-time* PCR analysiert (Abb.7). Obwohl die mRNA-Expression von IL-10R2 nach Stimulation mit den proinflammatorischen Zytokinen unverändert blieb, war eine klare Hochregulation der IL-22R1-mRNA mit einem Maximum bei 2-4 h nach Stimulation zu erkennen.

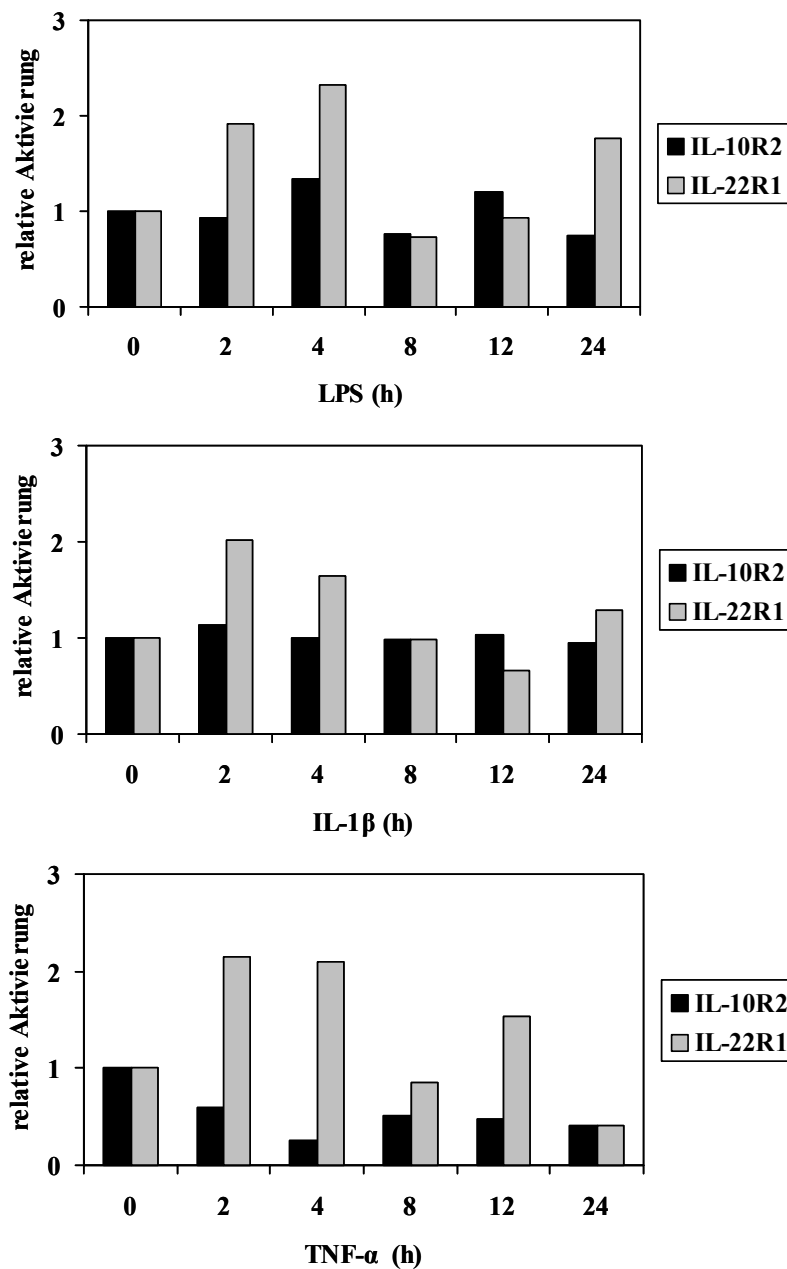
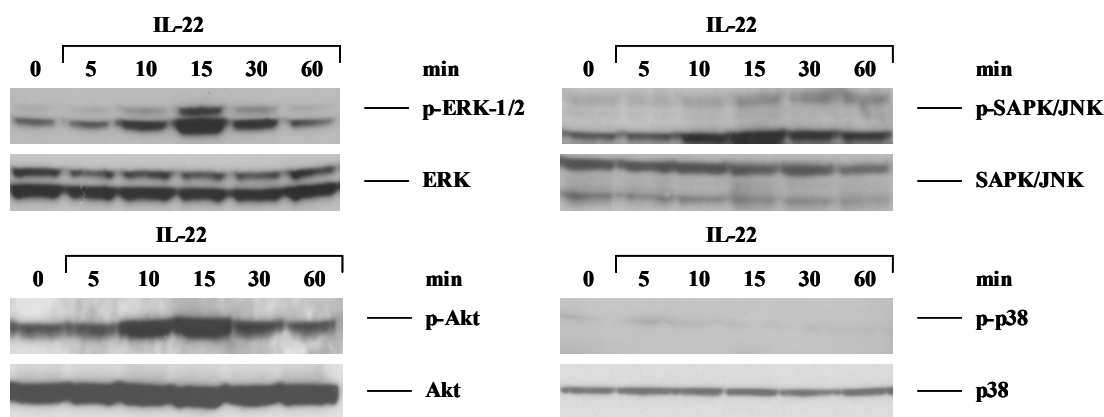


Abbildung 7: Hochregulation der IL-22-spezifischen Rezeptoruntereinheit IL-22R1 nach Stimulation von HT-29-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie LPS. Die mRNA-Expression wurde auf  $\beta$ -Aktin normalisiert.

### 5.1.3 IL-22-vermittelte Signaltransduktion

#### 5.1.3.1 Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach IL-22-Stimulation

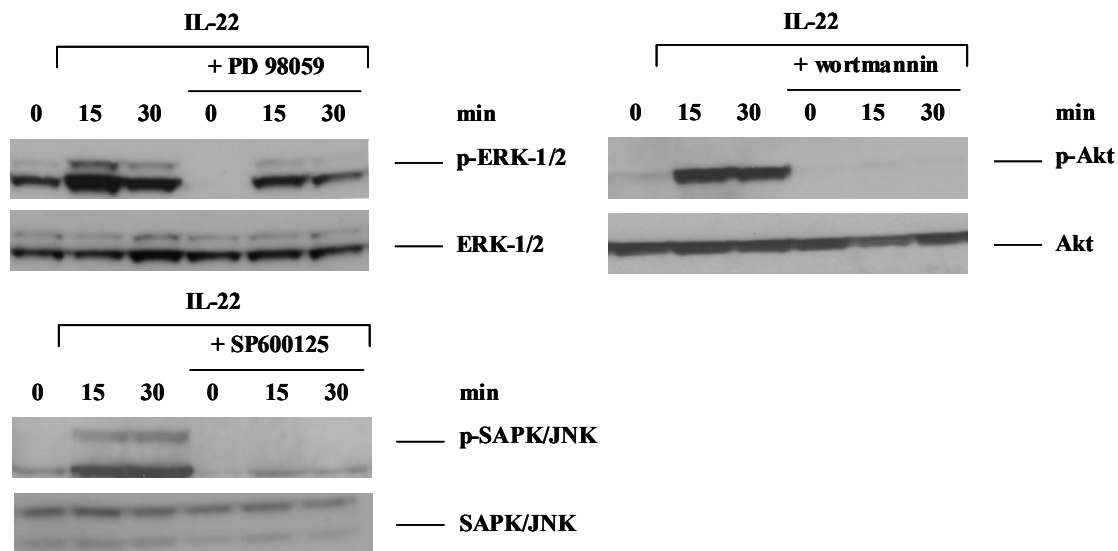
In *Western Blot*-Experimenten wurde die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und p38 nach Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-22 untersucht (Abb.8). Die Stimulation mit 100 ng/ml IL-22 führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK, nicht aber p38. Über das gesamte untersuchte Zeitintervall blieben die nicht-phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen unverändert. Analog dazu zeigte sich eine Phosphorylierung der Akt-Kinase nach Stimulation mit IL-22.



**Abbildung 8: Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt durch Phosphorylierung nach IL-22-Stimulation.** Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-22 führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK, nicht aber p38. Analog dazu zeigte sich eine Phosphorylierung der Akt-Kinase.

#### 5.1.3.2 Übergeordnete Signaltransduktionswege

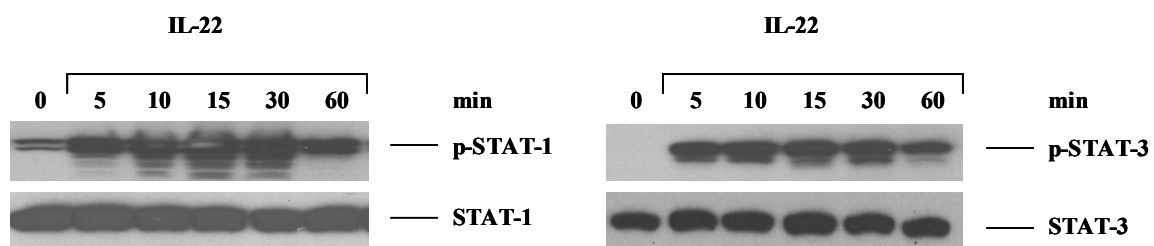
Zur Identifizierung von übergeordneten Signalwegen wurden HT-29-Zellen vor Zytokin-stimulation mit dem spezifischen MEK-1-Inhibitor PD98059 (10  $\mu\text{mol/l}$ ), dem JNK-Inhibitor SP600125 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) und dem PI-3-Inhibitor *Wortmannin* (25  $\mu\text{mol/l}$ ) für 24 h inkubiert. Die durch IL-22 vorgeschriebenen Stimulationseffekte waren durch die Vorbehandlung mit den Inhibitoren deutlich reduziert, was auf die Spezifität der Signalwege hinweist (Abb.9).



**Abbildung 9: Reduktion der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach Präinkubation von HT-29-Zellen mit spezifischen Inhibitoren.** Präinkubation von HT-29-Zellen mit PD98059 (10  $\mu\text{mol/l}$ ), SP600125 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) und *Wortmannin* (25  $\mu\text{mol/l}$ ) 24 h vor Stimulation mit IL-22 führte zu einer Reduktion der zeitabhängigen Phosphorylierung und somit zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt.

### 5.1.3.3 Aktivierung von STAT1 und STAT3 nach IL-22-Stimulation

In *Western Blot*-Experimenten mit STAT1- und STAT3-spezifischen Antikörpern führte die Stimulation mit 100 ng/ml IL-22 zu einer starken Tyrosin-Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 in HT-29-Zellen (Abb.10).

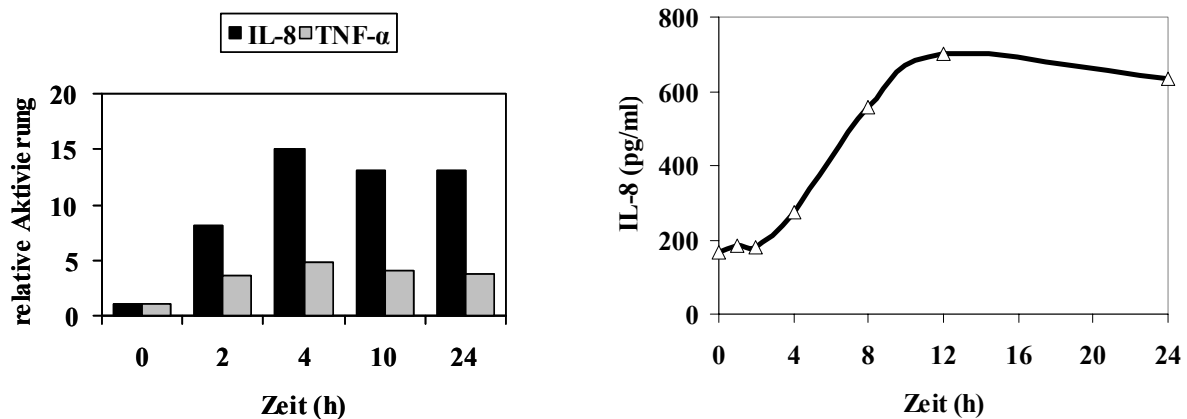


**Abbildung 10: Aktivierung von STAT1 und STAT3 durch IL-22.** Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-22 führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung und somit Aktivierung von STAT1 und STAT3.

### 5.1.4 IL-22-vermittelte Genregulation

#### 5.1.4.1 IL-22-vermittelte Transkriptionsaktivierung von IL-8 und TNF- $\alpha$

Nachdem die Rezeptorexpression und Signaltransduktion in intestinalen Epithelzellen untersucht waren, wurde die Expression von potentiellen Zielgenen analysiert. Mit Hilfe von quantitativer PCR und ELISA wurde eine signifikant erhöhte Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation mit IL-22 gezeigt (Abb.11).

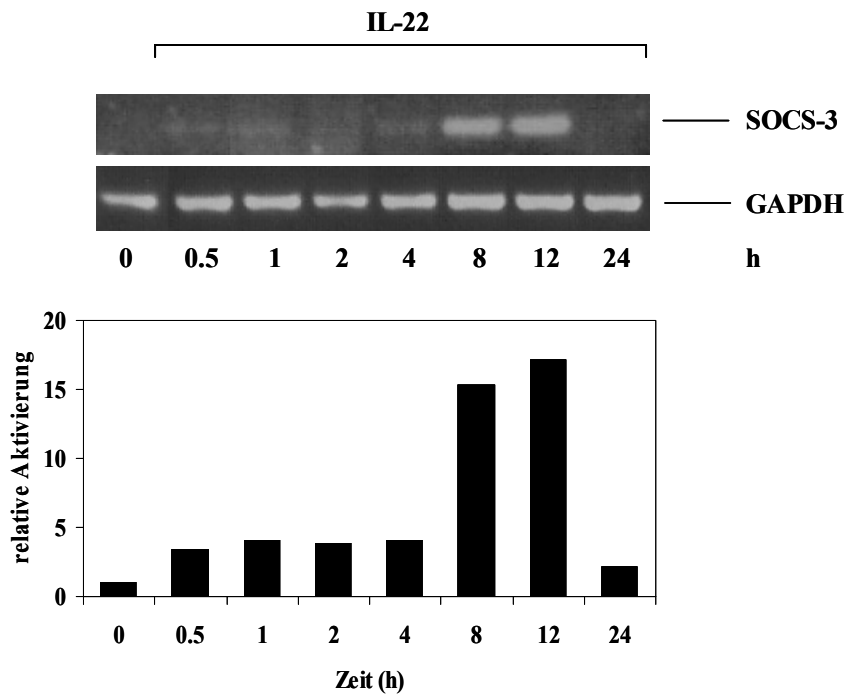


**Abbildung 11: Hochregulation der IL-8- und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression und IL-8-Proteinexpression durch IL-22.** Nach Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-22 war die mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF- $\alpha$  in quantitativen *real-time* PCR-Experimenten hochreguliert. Die Zytokinexpression wurde auf  $\beta$ -Aktin normalisiert. Für IL-8 wurde zusätzlich mittels ELISA die Hochregulation auf Proteinebene mit einem Maximum nach 12 h der IL-22-Stimulation gezeigt.

#### 5.1.4.2 IL-22-vermittelte Transkriptionsaktivierung von SOCS-3

Die Aktivierung von STAT-Proteinen wurde mit einer erhöhten SOCS-3-Expression und SOCS-3-Promotoraktivität assoziiert [10]. Es wurde deshalb die mRNA-Expression von SOCS-3 nach Stimulation von HCT116-Zellen mit IL-22 untersucht. In RT-PCR-Versuchen wurde eine signifikante Hochregulation von SOCS-3-mRNA nach 8 h mit einem Maximum bei 12 h (ca. 16-fache relative SOCS-3-mRNA-Erhöhung) gefunden (Abb.12).

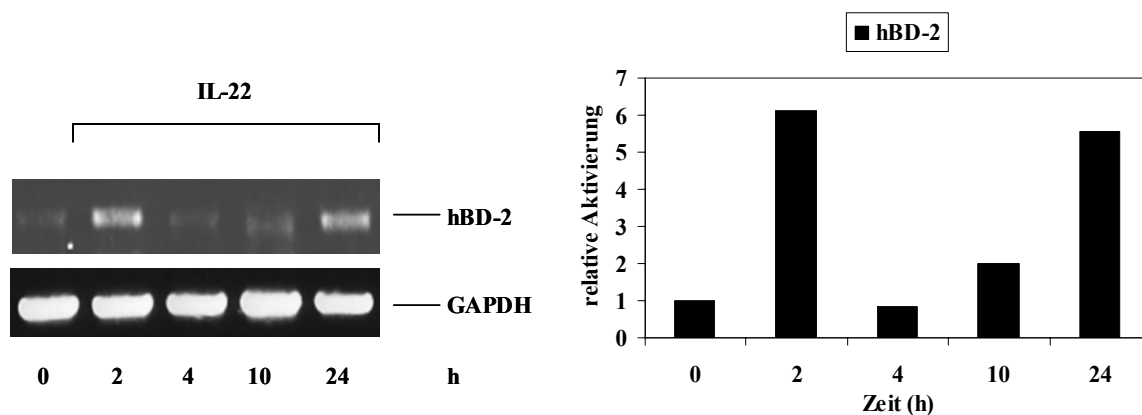




**Abbildung 12: Hochregulation der SOCS-3-mRNA-Expression durch IL-22.** Nach Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-22 war die mRNA-Expression von SOCS-3 in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten hochreguliert. Die mRNA-Expression wurde mittels TINA Software auf die entsprechende GAPDH-Expression normalisiert.

#### 5.1.4.3 IL-22-vermittelte Transkriptionsaktivierung von $\beta$ -Defensin-2

Schließlich wurde noch die mRNA-Expression des Barriere-protectiven  $\beta$ -Defensin-2 nach IL-22-Stimulation mittels RT-PCR semiquantitativ analysiert. Nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-22 zeigte sich nach einem initialen Gipfel bei 2 h ein erneuter Anstieg der  $\beta$ -Defensin-2-mRNA-Konzentration nach 24 h (Abb.13).



**Abbildung 13: Hochregulation der  $\beta$ -Defensin-2-mRNA-Expression durch IL-22.** Nach Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-22 war die mRNA-Expression von  $\beta$ -Defensin-2 in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten hochreguliert. Die mRNA-Expression wurde mittels TINA Software auf GAPDH normalisiert.

### 5.1.5 Biologische Funktionen von IL-22 *in vitro* und *in vivo*

#### 5.1.5.1 Erhöhte IL-22-mRNA-Expression in Biopsien von Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) *in vivo*

Nachdem gezeigt wurde, dass IL-22 die Expression proinflammatorischer Zytokine steigert und die proinflammatorische Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und LPS die mRNA-Expression der IL-22-spezifischen Rezeptoruntereinheit IL-22R1 hochregulieren, wurde in einer *in vivo*-Studie die mRNA-Expression von IL-22 in entzündeten und nicht-entzündeten Dickdarmgewebe von Patienten mit CED zunächst mittels semiquantitativer PCR und anschließend mit Hilfe der quantitativen PCR untersucht. In diesen Experimenten wurden in 80 Biopsien von 20 CED-Patienten (M. Crohn: n=9 und Colitis ulcerosa: n=11) die IL-22-mRNA-Expression von makroskopisch entzündeter Kolonschleimhaut mit der makroskopisch nicht-entzündeter Kolonschleimhaut des gleichen Patienten<sup>1</sup> verglichen (Tab. 5).

Pat. Nr.	Dia- gnose	Aktuelle Medikation	Anatomischer Ort der Biopsieentnahme		IL-22-mRNA- Expression entz. vs. nicht- entz.	IL-8-mRNA- Expression entz. vs. nicht- entz.	Korrelation IL-22 / IL-8
			Nicht- entzündet	entzündet			
1*	MC	AZA, IFX	Coecum*	terminales Ileum*	1,59	4,50	-0,207
2	MC	5-ASA, AZA	Colon descendens	Colon descendens	3,67	11,67	0,926
3	MC	AZA	Coecum	Coecum	1,92	11,08	0,976
4*	MC	5-ASA, Kortiko- steroide	Coecum*	terminales Ileum*	1,50	1,52	0,956
5	MC	keine	Colon descendens	Colon descendens	2,81	1,41	0,977
6*	MC	MTX	Coecum*	terminales Ileum*	13,58	31,12	0,941
7	MC	AZA	Colon transversum	Colon transversum	3,07	2,24	0,994
8*	MC	Kortiko- steroide	Coecum*	terminales Ileum*	1,37	1,45	1,000
9	MC	AZA	Coecum	Coecum	3,35	4,26	1,000
$\bar{x} \pm SA$			<b>M. Crohn</b>		<b>3,65 <math>\pm</math> 1,41</b>	<b>7,69 <math>\pm</math> 3,62</b>	<b>0,840 <math>\pm</math> 0,010</b>

<b>10*</b>	CU	Kortiko- steroid	Sigma*	Rektum*	0,52	6,97	-0,675
<b>11</b>	CU	5-ASA, Budesonid	Colon descendens	Colon descendens	0,97	2,37	-0,199
<b>12</b>	CU	AZA	Rektum	Rektum	0,72	0,94	0,849
<b>13</b>	CU	keine	Colon transversum	Colon transversum	3,25	2,01	1,000
<b>14*</b>	CU	keine	Coecum*	Rektum*	5,74	8,12	0,999
<b>15</b>	CU	AZA, Kortiko- steroid	Coecum	Coecum	1,82	2,64	0,959
<b>16</b>	CU	6-MP	Sigma	Sigma	2,42	5,82	0,912
<b>17</b>	CU	keine	Sigma	Sigma	1,76	3,27	0,527
<b>18*</b>	CU	MTX	Colon transversum*	Colon descendens*	0,98	0,71	0,529
<b>19*</b>	CU	6-MP, 5- ASA, Kortiko- steroid	Coecum*	Colon ascendens *	0,84	0,49	0,860
<b>20*</b>	CU	MTX	Sigma*	Rektum*	1,25	2,44	0,818
<b>d ± SA</b>			<b>Colitis ulcerosa</b>		<b>1,84 ± 0,46</b>	<b>3,25 ± 0,78</b>	<b>0,598 ± 0,165</b>

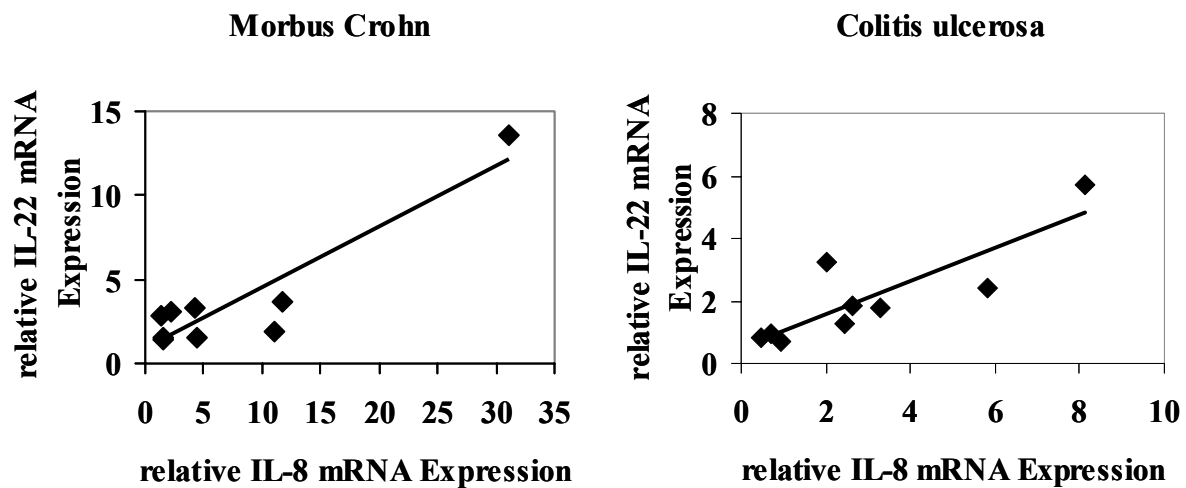
**Tabelle 5: IL-22- und IL-8-mRNA-Expression in entzündeten und nicht-entzündeten Gewebe von Patienten mit aktivem M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa.** Die Expression von IL-22- und IL-8-mRNA von 80 Biopsien von CED-Patienten wurde mittels quantitativer PCR analysiert und auf Aktin normalisiert. Um die Expressionsraten von nicht-entzündeten mit entzündeten Kolonläsionen zu vergleichen, wurde die jeweilige mRNA-Expression in nicht-entzündeten Geweben gleich 1 gesetzt. Die Biopsieentnahme für nicht-entzündetes und entzündetes Gewebe wurde gewöhnlich aus demselben Kolonsegment entnommen. Bei den Patienten, die mit \* gekennzeichnet sind, war dies aufgrund einer schweren Entzündung im gesamten anatomischen Segment nicht möglich. Daher wurden bei diesen Patienten die Biopsien aus dem benachbarten, nicht-entzündeten Kolonabschnitt entnommen. (Abkürzungen: MC=Morbus Crohn, CU=Colitis ulcerosa, AZA=Azathioprin, 5-ASA=5-Aminosalicylsäure, IFX=Infliximab, MTX=Methotrexat, 6-MP=6-Mercaptopurin, <sup>d</sup>= Durchschnittswerte, SA= Standardabweichung)

Bei M. Crohn-Patienten war die IL-8-mRNA-Expression, welche als positiver Entzündungsmarker mitgeführt wurde, in allen entzündeten Kolonschleimhautbiopsien im Vergleich zu nicht-entzündeter Kolonschleimhaut signifikant um 1,4- bis 31-fach erhöht. In ähnlicher Weise war die IL-22-mRNA-Expression in den entzündeten Kolonschleimhautbiopsien im Vergleich zu nicht-entzündeter Kolonschleimhaut signifikant um das 1,4- bis 13,6-fach gesteigert (Tab. 5).

Bei Patienten mit Colitis ulcerosa waren die durchschnittlichen IL-8- und IL-22-mRNA-Konzentrationen in den entzündeten Biopsien im Vergleich zu denen der M. Crohn-Patienten geringer. Während die IL-8-mRNA-Konzentrationen in den entzündeten Läsionen im

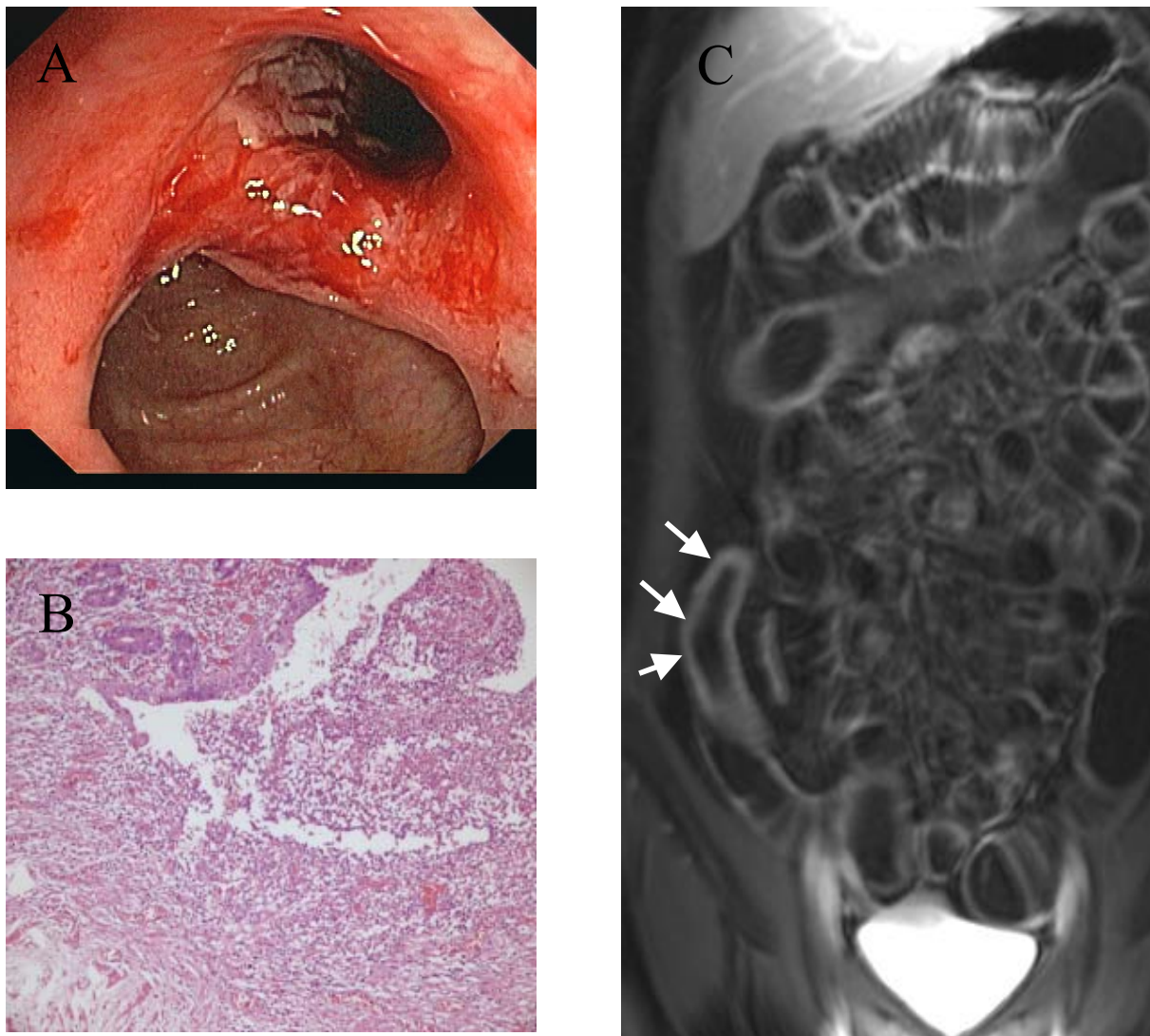
Vergleich zu nicht-entzündeter Kolonschleimhaut signifikant bis zu 8-fach erhöht waren ( $p=0,02$ ), zeigten sich für die IL-22-mRNA-Konzentrationen keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p=0,09$ ). Erstaunlicherweise waren diese bei fünf von elf Patienten sogar herunterreguliert, wobei drei dieser Patienten auch eine niedrige IL-8-mRNA-Expression aufwiesen.

Zusammengefasst war IL-22-mRNA durchschnittlich mehr in entzündeter Dickdarmschleimhaut von M. Crohn-Patienten als in der von Colitis ulcerosa-Patienten exprimiert (3,7-fach zu 18-fach). Die Korrelation der IL-8- zur IL-22-mRNA-Expression war in allen Biopsien der M. Crohn-Patienten hochsignifikant ( $r=0,90$ ), während sie für die Colitis ulcerosa-Patienten im Vergleich niedriger war (0,59) (Abb.14).



**Abbildung 14: Hochregulation von IL-22-mRNA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen.** Die IL-22-mRNA-Expression wurde in Ileum- und Kolonbiopsien mit der IL-8-mRNA-Expression korreliert. Dabei zeigten sich höhere Expressionsraten von IL-22 und auch eine höhere Korrelation mit IL-8 bei M. Crohn-Patienten als bei Patienten mit Colitis ulcerosa. Die höchste mRNA-Expression, sowohl für IL-22 als auch für IL-8, wurde bei einem M. Crohn-Patienten mit schweren Verlauf gefunden.

Interessanterweise wurden die höchsten IL-8- und IL-22-mRNA-Konzentrationen bei einem M. Crohn-Patienten mit sehr schwerem Verlauf gefunden. Abb. 15 zeigt das Endoskopiebild des Patienten mit der stark entzündeten Ileozökalklappe, die histopathologische Aufarbeitung der Biopsie mit massiver Schleimhautulzeration und Leukozyteninfiltration und eine MRT-Enteroklysma (MRT-Sellink) mit dem Bild einer ilealen Stenose.



**Abbildung 15:**

**A: Endoskopisches Bild der Ileocoecalklappe des Patienten mit der höchsten IL-22- und IL-8-mRNA-Expression.** Zu sehen ist eine starke entzündliche Aktivität im Bereich der Ileocoecalklappe mit aphtösen Läsionen.

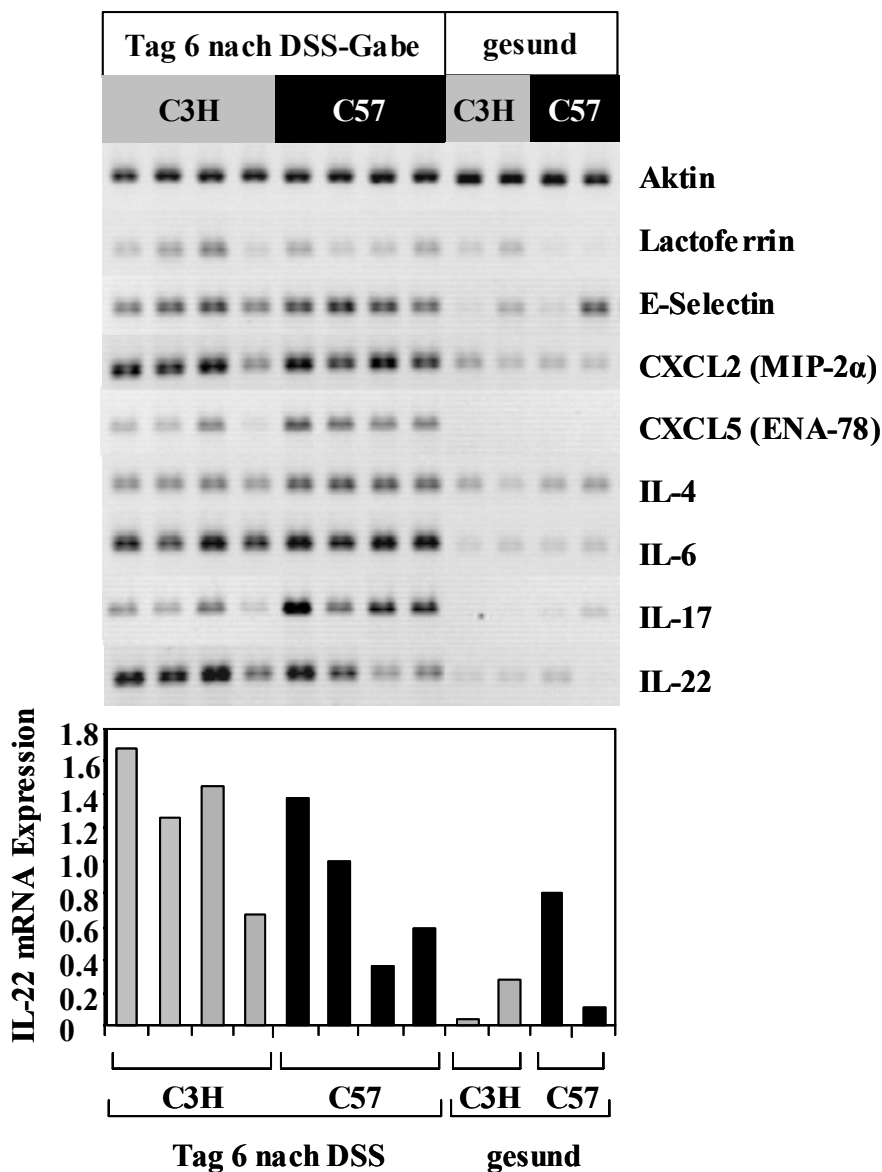
**B: Histopathologische Analyse einer Biopsie aus der entzündeten Läsion.**

HE-Färbung, Vergrößerung 12x. Zu sehen sind Schleimhautulzerationen und eine massive Infiltration mit neutrophilen Granulozyten als Marker der Entzündung.

**C: MRT-Sellink des Patienten.** Zu sehen ist die typische Dreischichtung der Darmwand im Bereich des terminalen Ileums und eine Ilealstenose (Pfeile).

### 5.1.5.2 Erhöhte IL-22-mRNA-Expression im DSS-Colitismodell *in vivo*

In einer weiteren *in vivo*-Studie wurde die IL-22-mRNA-Expression zusammen mit anderen proinflammatorischen Markern am DSS-Colitismodell der Maus untersucht. Nach sechstägiger Behandlung von C3H/HeJ und C57BL/6 Mäusen mit DSS-Wasserzusatz bzw. ohne DSS-Wasserzusatz in der Kontrollgruppe wurden nach RNA-Extraktion RT-PCR-Analysen durchgeführt. Hierbei war die IL-22-mRNA in der DSS-Gruppe zusammen mit anderen proinflammatorischen Genen (Lactoferrin, E-Selectin, MIP-2 $\alpha$ , ENA-78 IL-4, IL-6 und IL-17) signifikant hochreguliert, hingegen in unbehandelten Mäusen fast nicht nachweisbar. Dieser Effekt war bei den C3H/HeJ-Mäusen stärker ausgeprägt als bei C57BL/6-Mäusen (Abb.16).

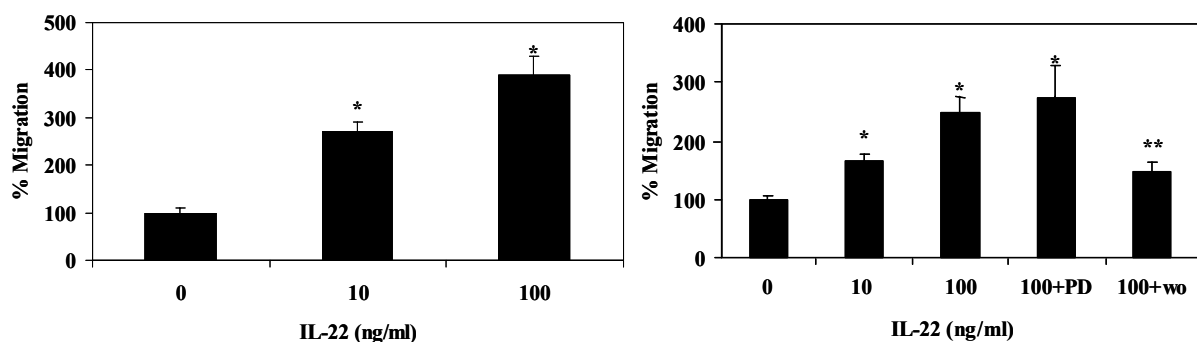


**Abbildung 16: Hochregulation von IL-22-mRNA im DSS-Colitismodell der Maus.** C3H/HeJ und C57BL/6-Mäuse wurden mit 3% oder 4,5% DSS-Zusatz zum Trinkwasser über fünf Tage behandelt. Am Tag 6 wurden, nach RNA-Extraktion, aus Kolongewebe RT-PCR-Analysen durchgeführt. Die PCR für Aktin wurde mit 28 Zyklen, die für alle anderen Gene mit 36 Zyklen, durchgeführt. IL-22-mRNA-Expression wurde mittels TINA-Software auf Aktin normalisiert.

### 5.1.5.3 Verstärkte intestinale Epithelzellmigration nach IL-22-Stimulation *in vitro*

Nachdem die vorangegangenen Experimente dafür sprachen, dass IL-22 eine wichtige Rolle bei intestinaler Entzündung *in vivo* spielt, wurde analysiert, ob IL-22 Einfluss auf die intestinale Wundheilung hat. In diesen *in vitro* durchgeführten Wundheilungsexperimenten zeigte sich 24 h nach IL-22-Stimulation ein hochsignifikanter, dosisabhängiger, ( $p=0,00000002$  für 10 ng/ml und  $p=0,00000006$  für 100 ng/ml IL-22 vs. unstimulierten Kontrollen) bis zu 290%iger Anstieg der Zellmigration und somit ein deutlicher, durch IL-22 induzierter Wundheilungseffekt (Abb.17).

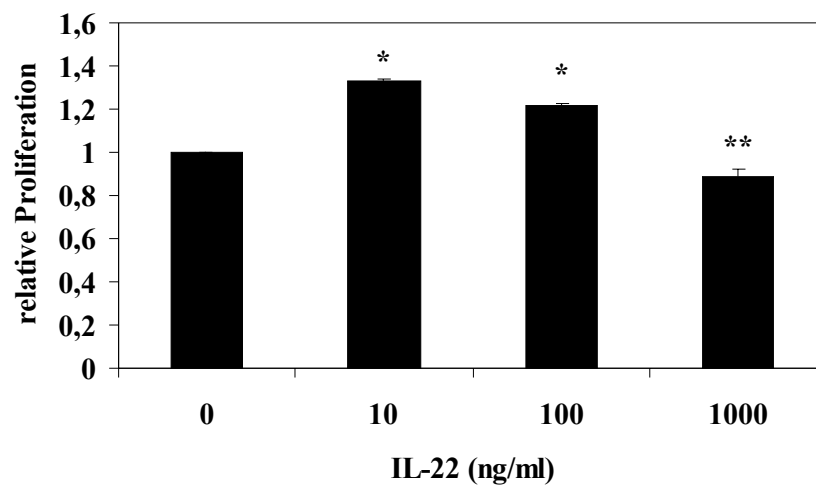
Die Aktivierung von MAP-Kinasen und ebenso Akt wurde in der Literatur in Zusammenhang mit gesteigerter Zellmigration beschrieben [15, 160]. Daher wurden die Wundheilungsexperimente in Anwesenheit des MEK1-Inhibitors PD98059 (10  $\mu\text{mol/l}$ ) und des Akt-Inhibitors *Wortmannin* (25  $\mu\text{mol/l}$ ) wiederholt, um den zugrunde liegenden Signalweg zu identifizieren. Es zeigte sich, dass eine Vorbehandlung der Zellen mit *Wortmannin* die IL-22-vermittelte Zellmigration signifikant ( $p<0,00001$  im Vergleich zu nur mit IL-22-stimulierten Zellen) verminderte, wohingegen die Vorbehandlung der Zellen mit PD98059 die IL-22-vermittelte Zellmigration nicht veränderte ( $p<0,00001$  im Vergleich zu unstimulierten Zellen und  $p=0,19$  zu nur mit IL-22-stimulierten Zellen) (Abb.17).



**Abbildung 17: Verstärkte Migration durch IL-22 ist PI-3-Kinase-abhängig.** Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-22 führte zu einem Anstieg der Zellmigration (\*  $p<0,00001$  gegenüber unstimulierten Kontrollzellen). Dieser Effekt war nach Präinkubation mit dem PI-3-Kinaseinhibitor *Wortmannin* (wo) inhibiert (\*\*  $p<0,002$  gegenüber unstimulierten Kontrollzellen), wohingegen der MEK1-Inhibitor PD98059 (PD) keinen Effekt auf die Migration hatte (\* $p<0,00001$  gegenüber unstimulierten Kontrollzellen).

Zusätzlich wurde untersucht, ob die erhöhte IL-22-vermittelte Zellmigration durch vermehrte Zellproliferation oder verminderten Zelltod zustande kommt, da ERK-1/2-Aktivierung und Akt-Aktivierung in der Literatur damit in Zusammenhang gebracht wurden [39, 60]. In Zellproliferationsexperimenten wurde eine signifikant erhöhte Zellproliferation nach Zellstimulation mit 10 bzw. 100 ng/ml ( $p=0,002$  bzw.  $p=0,001$ ) festgestellt, bei höheren IL-22-

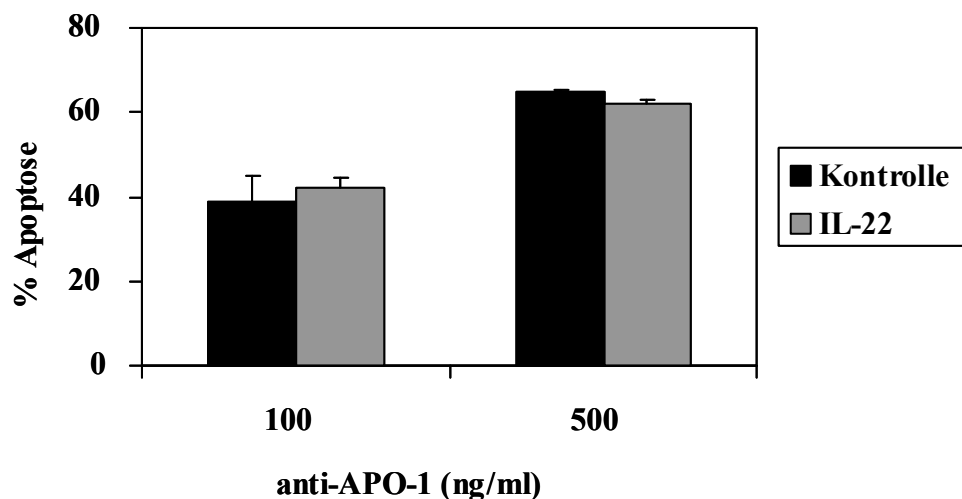
Konzentrationen (1000 ng/ml) allerdings ein signifikant antiproliferativer Effekt ( $p=0,007$ ) (Abb.18).



**Abbildung 18: Effekte von IL-22 auf die Zellproliferation.** Niedrige Konzentrationen von IL-22 führen zu erhöhter Zellproliferation (\* $p<0,005$  gegenüber unstimulierten Kontrollzellen), höhere IL-22-Konzentrationen haben antiproliferative Effekte (\*\* $p=0,007$  gegenüber unstimulierten Kontrollzellen).

#### 5.1.5.4 Fehlender Einfluss von IL-22 auf die Fas-Liganden-induzierte Apoptose *in vitro*

In Fas-Liganden ( $\alpha$ -APO-1) -induzierten Apoptoseversuchen mit anschließender FACS-Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied von apoptotischen, mit IL-22 stimulierten und nicht-stimulierten Zellen (Abb.19).



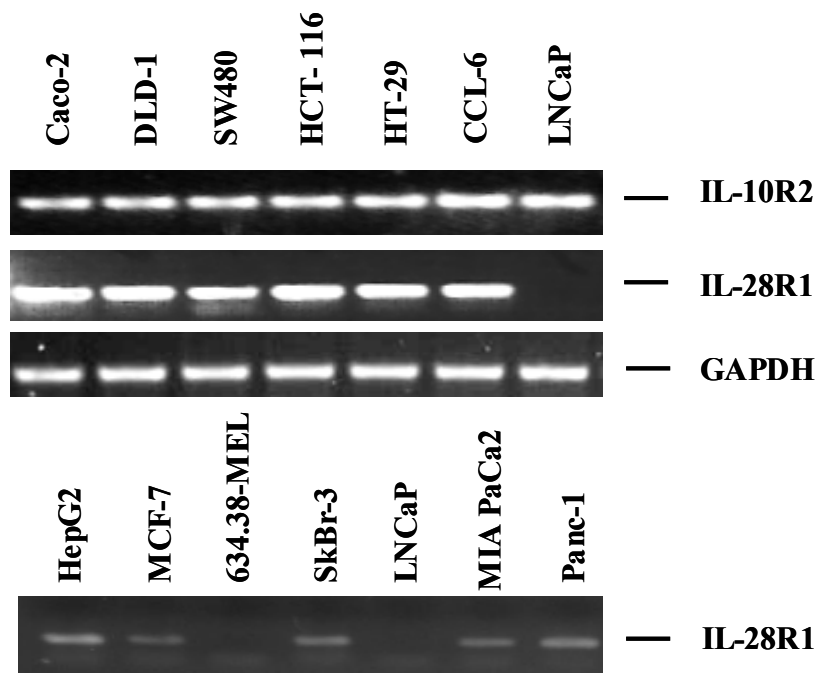
**Abbildung 19: Fehlender Einfluss von IL-22 auf die Fas-Liganden-induzierte Apoptose.**



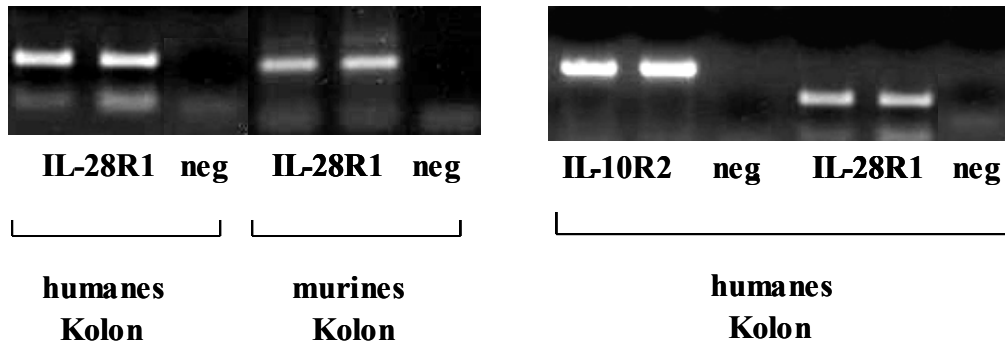
## 5.2 Ergebnisse der Versuche mit IL-28A und IL-29 in intestinalen Epithelzellen

### 5.2.1 Expression des IL-28A- und IL-29-Rezeptorkomplexes

In RT-PCR-Experimenten wurde die mRNA-Expression der für IL-28A/IL-29 funktionalen Rezeptoruntereinheiten IL-10R2 und IL-28R1 analysiert (Abb.20). Es zeigte sich, dass beide Rezeptoren in allen untersuchten intestinalen Epithelzelllinien exprimiert waren. Ebenso wurde mRNA beider Rezeptoren in normalen menschlichen Kolongewebsbiopsien nachgewiesen, die für IL-28R1 auch in murinen Kolongewebe (Abb.21). Zusätzlich wurde die mRNA-Expression der Rezeptoren in diversen anderen nicht-intestinalen Tumorzelllinien (HepG2=Leber, MCF-7=Mamma, 634.38-MEL=Melanom, SkBr-3=Mamma, LNCaP=Prostata, MIA PaCa-2=Pankreas und Panc-1=Pankreas) und auch in der nicht-tumorösen, primären Epithelzelllinie CCL-6 aus humanen fetalen Dünndarm analysiert. Von allen untersuchten Zelllinien zeigten allein LnCaP und 624.38-MEL keine IL-28R1-mRNA-Expression.

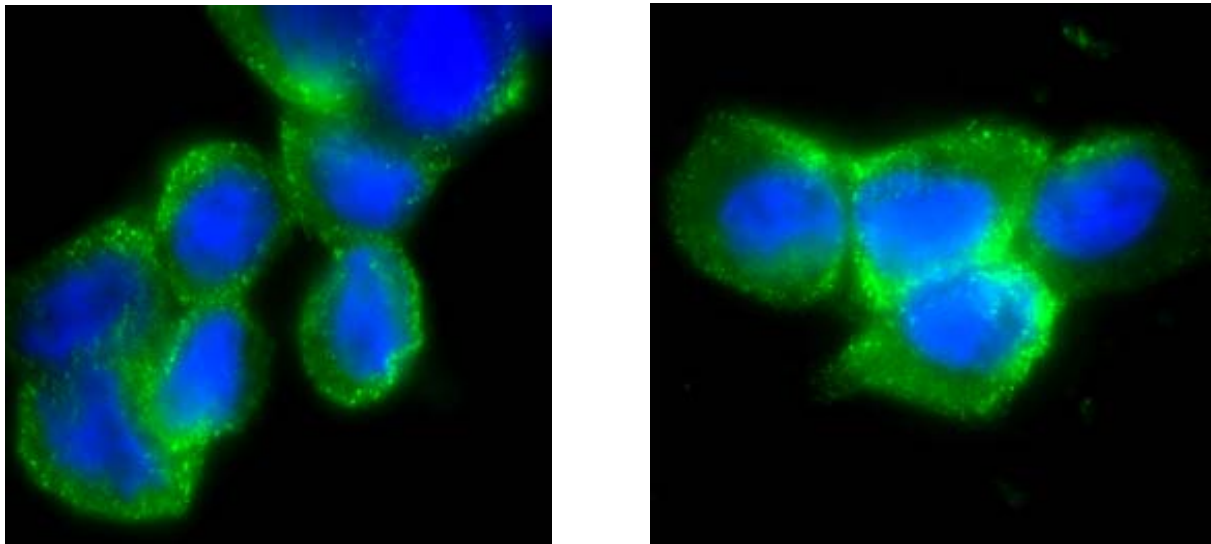


**Abbildung 20: Expression des IFN-Lambda-Rezeptorkomplexes in intestinalen und nicht-intestinalen Epithelzellen.** Als Negativkontrolle für die IL-28R1-Expression wurde die Prostatakarzinomzelllinie LNCaP verwendet, da sie zusammen mit der Melanomzelllinie 634.38-MEL als einzige der untersuchten nicht-intestinalen Epithelzelllinien den IL-28R1-Rezeptor nicht exprimiert.



**Abbildung 21: IL-10R2- und IL-28R1-mRNA-Expression in humanen Kolonbiopsien und IL-28R-mRNA-Expression in murinen Kolongewebe.** Nicht umgeschriebene RNA fungierte als Negativkontrolle (neg).

Darüber hinaus wurde mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers die für IL-28A/IL-29 spezifische Rezeptoruntereinheit IL-28R1 auf der Zelloberfläche von HT-29 Zellen immunhistochemisch nachgewiesen (Abb.22).

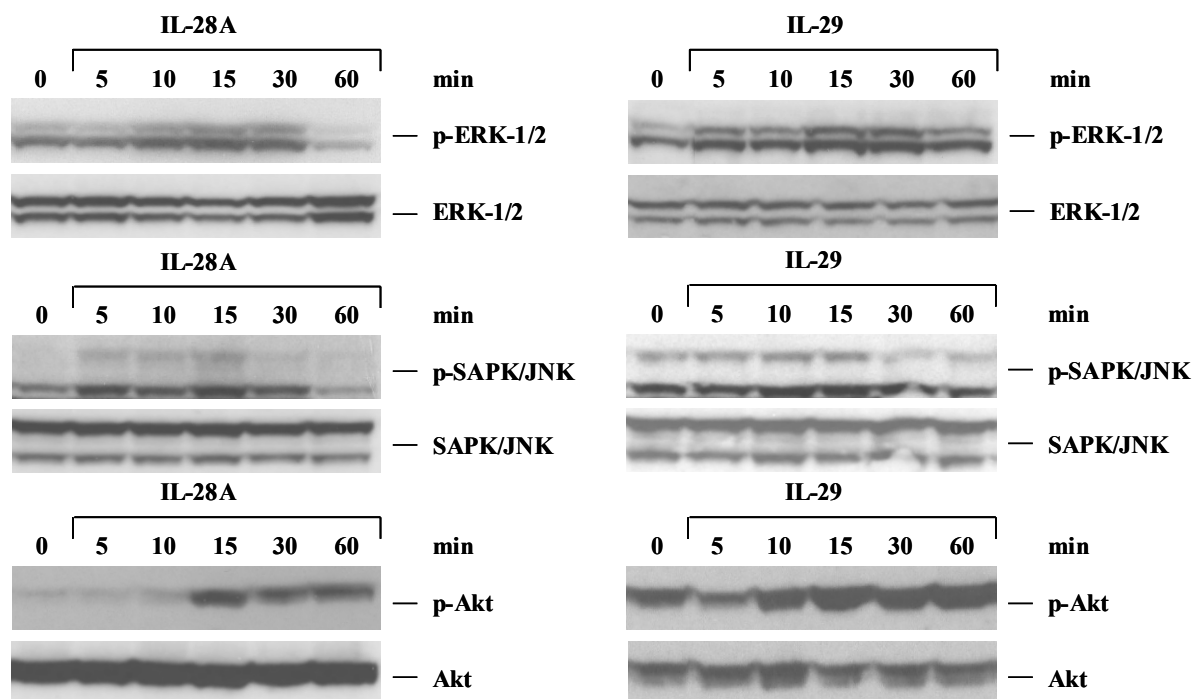


**Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis von IL-28R1 in der intestinalen Epithelzelllinie HT-29** (grün: membrangebundenes IL-28R1, blau: Zellkern).

## 5.2.2 IL-28A- und IL-29-vermittelte Signaltransduktion

### 5.2.2.1 Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach Stimulation mit IL-28A und IL-29

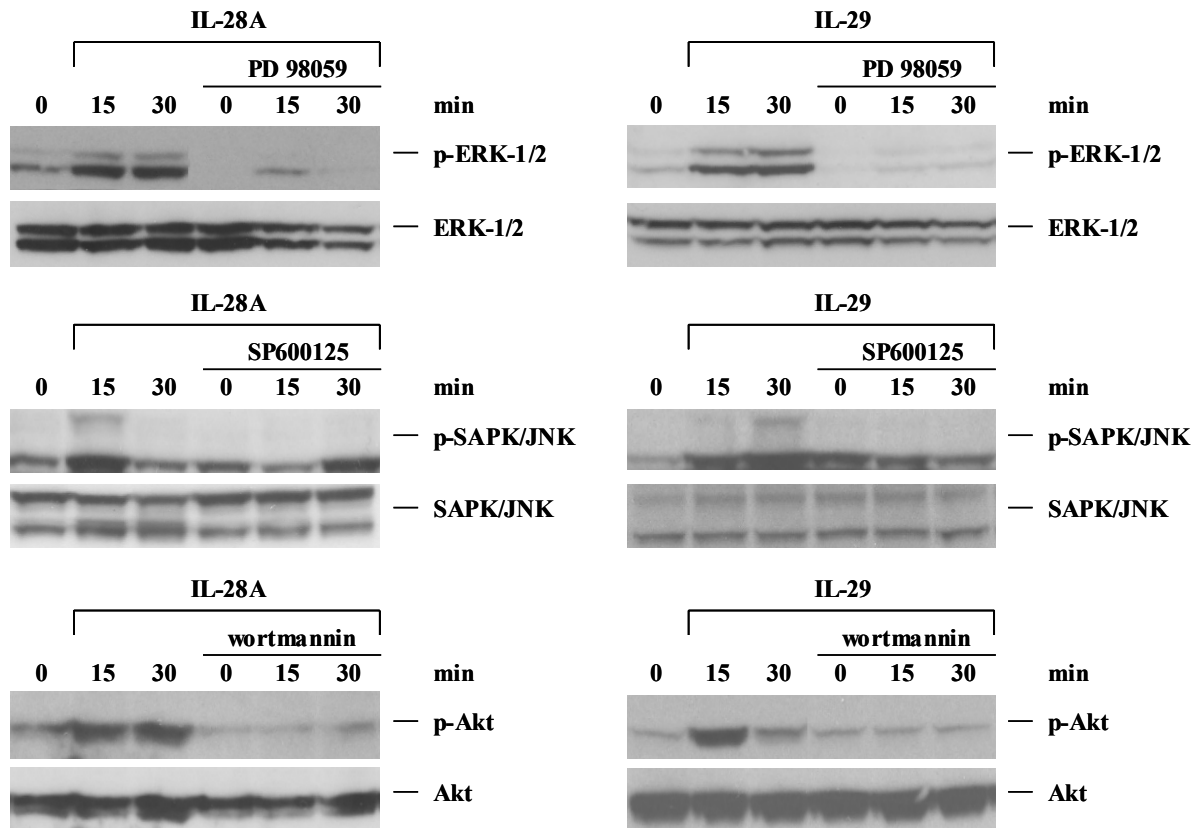
In *Western Blot*-Experimenten zeigte die Stimulation von HT-29 Zellen mit 100 ng/ml IL-28A bzw. IL-29 die Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK, nicht aber von p38. Über das gesamte untersuchte Zeitintervall blieben die nicht-phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen jeweils unverändert. Analog dazu zeigte sich eine Phosphorylierung der PI-3-Kinase Akt (Abb.23).



**Abbildung 23: Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt durch Phosphorylierung nach IL-28A- und IL-29-Stimulation.** Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-28A und IL-29 führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK, nicht aber p38. Analog dazu zeigte sich eine Phosphorylierung der Akt-Kinase.

### 5.2.2.2 Übergeordnete Signaltransduktionswege

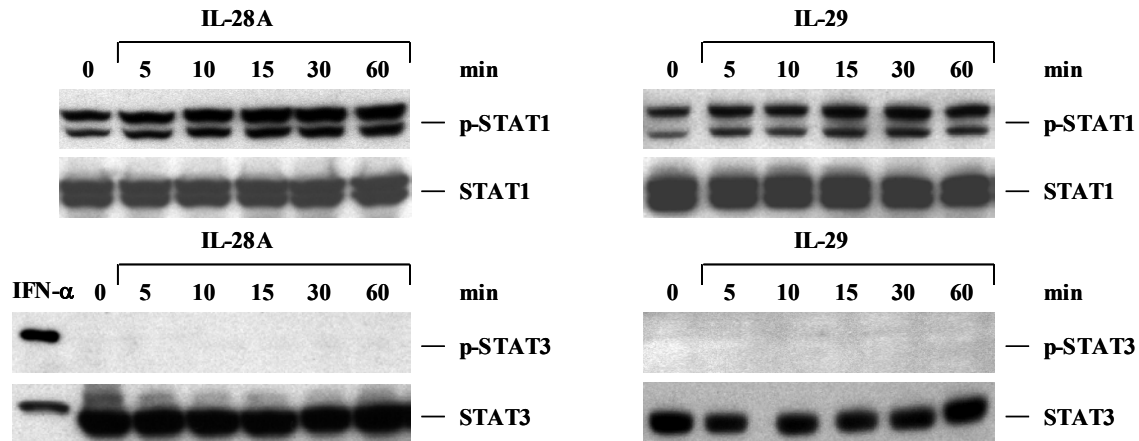
Zur Identifizierung von übergeordneten Signalwegen wurden HT-29-Zellen vor Zytokin-stimulation mit dem spezifischen MEK-1-Inhibitor PD98059 (10  $\mu\text{mol/l}$ ), dem JNK-Inhibitor SP600125 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) und dem PI-3-Inhibitor *Wortmannin* (25  $\mu\text{mol/l}$ ) für 24 h inkubiert. Durch die Vorbehandlung mit den Inhibitoren war die Phosphorylierung deutlich reduziert (Abb.24).



**Abbildung 24: Reduktion der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach Präinkubation mit spezifischen Inhibitoren.** Präinkubation mit dem MEK-1-Inhibitor PD98059 (10  $\mu\text{mol/l}$ ), dem JNK-Inhibitor SP600125 (20  $\mu\text{mol/l}$ ) und dem PI-3 Inhibitor *Wortmannin* (25  $\mu\text{mol/l}$ ) 24 h vor Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-28A und IL-29 führte zu einer Reduktion der zeitabhängigen Phosphorylierung und somit zur verminderten Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt.

### 5.2.2.3 Aktivierung von STAT1 nach Stimulation mit IL-28A und IL-29

Für IL-28A und IL-29 war eine Aktivierung von STAT1, nicht aber von STAT3 zu beobachten. Als Positivkontrolle fungierte IFN- $\alpha$  (Abb.25).

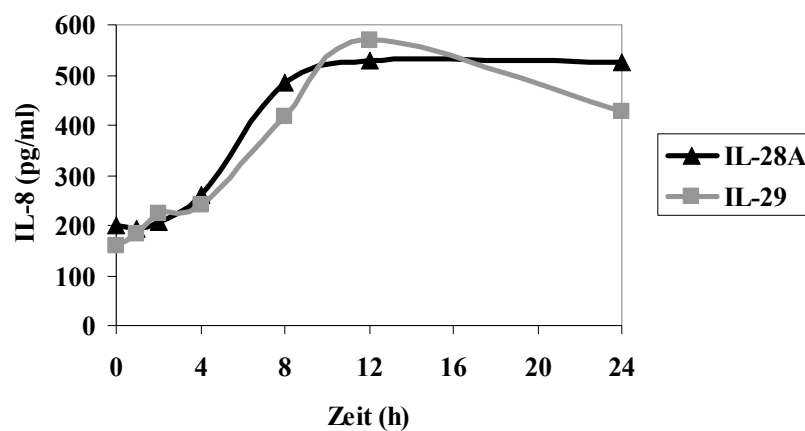


**Abbildung 25: Aktivierung von STAT1 durch IL-28A und IL-29.** Stimulation von HT-29 Zellen mit einer Konzentration von jeweils 100 ng/ml IL-28A und IL-29 führte zu einer zeitabhängigen Phosphorylierung und somit zur Aktivierung von STAT1, nicht aber von STAT3. (Kontrolle:IFN- $\alpha$ )

### 5.2.3 IL-28A- und IL-29-vermittelte Genregulation

#### 5.2.3.1 IL-28A- und IL-29-vermittelte Transkriptionsaktivierung von IL-8

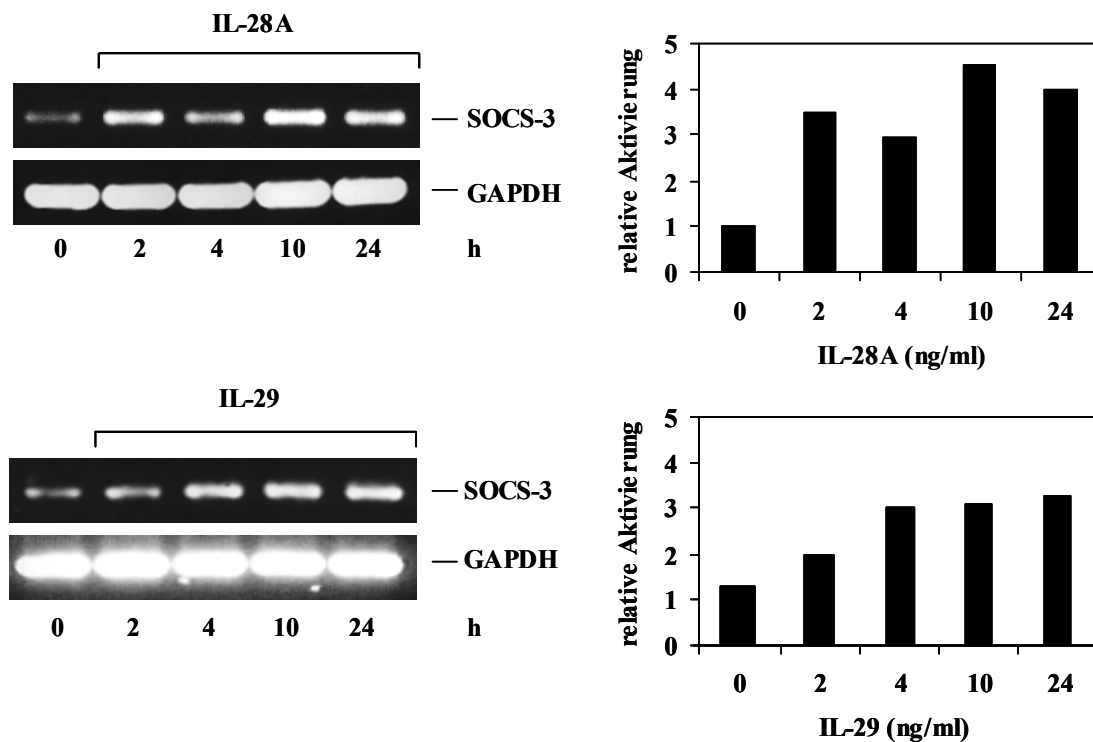
In ELISA-Experimenten führte die Stimulation mit IL-28A bzw. IL-29 zu einer signifikanten Erhöhung der IL-8-Proteinkonzentration in HT-29-Zellen mit einem Maximum (2,6-fach für IL-28A und 3,6-fach für IL-29) bei 12 h Stimulationszeit (Abb.26).



**Abbildung 26: Hochregulation von IL-8-Protein durch IL-28A und IL-29.** Nach Stimulation von HT-29-Zellen mit IL-28A und IL-29 war IL-8 auf Proteinebene hochreguliert. Im ELISA zeigte sich für beide Zytokine ein Maximum der Regulation 12 h nach Stimulationsbeginn.

### 5.2.3.2 IL-28A- und IL-29-vermittelte Transkriptionsaktivierung von SOCS-3

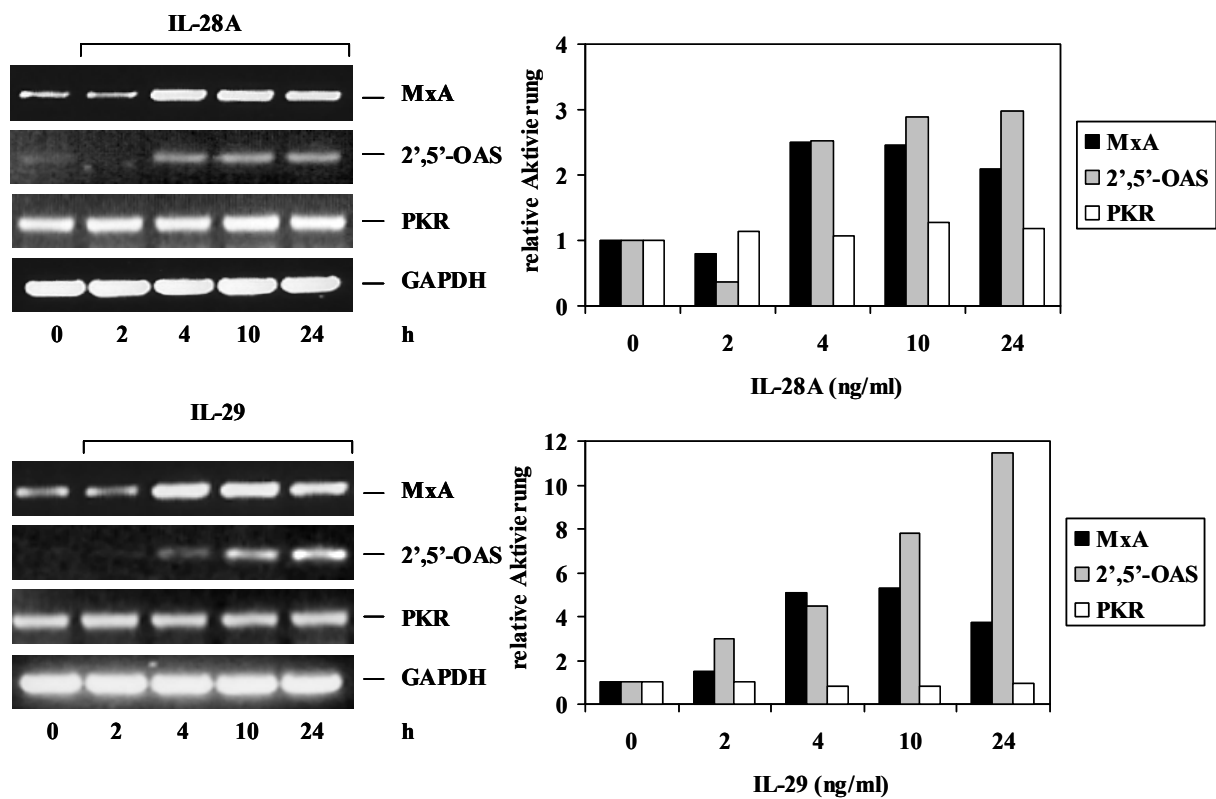
Die Aktivierung von STAT-Proteinen ist in mehreren Arbeiten mit einer erhöhten SOCS-3-Expression und SOCS-3-Promotoraktivität assoziiert worden [10]. Es wurde deshalb die mRNA-Expression von SOCS-3 nach Stimulation von HCT116-Zellen mit IL-28A und IL-29 untersucht. In RT-PCR-Versuchen wurde eine signifikante Hochregulation von SOCS-3-mRNA gefunden: bei IL-28A- und IL-29-Stimulation mit Maxima bei 10 h bzw. 24 h (4-fach für IL-28A und 3-fach für IL-29) (Abb.27).



**Abbildung 27: Hochregulation der SOCS-3-mRNA-Expression durch IL-28A und IL-29.** Nach Stimulation von HCT116-Zellen mit IL-28A und IL-29 war die mRNA-Expression von SOCS-3 in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten hochreguliert. Die mRNA-Expression wurde mittels TINA Software auf GAPDH normalisiert.

### 5.2.3.3 IL-28A- und IL-29-vermittelte Transkriptionsaktivierung der antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS

Die antivirale Aktivität von Typ-I-Interferonen wird unter anderem durch eine STAT-Aktivierung und dadurch bedingte transkriptionale Hochregulation der antiviralen Proteine MxA, 2',5'-OAS und PKR bestimmt. Daher wurde die Regulation dieser Proteine in intestinalen Zellen nach Stimulation mit IL-28A und IL-29 mit Hilfe von RT-PCR-Versuchen analysiert. Die mRNA-Expression von MxA und 2',5'-OAS war nach IL-28A-Stimulation von HCT116-Zellen 2-fach bzw. 3-fach erhöht, nach IL-29-Stimulation, 11-fach bzw. 5-fach erhöht, wohingegen die mRNA-Expression von PKR jeweils unverändert blieb (Abb.28).

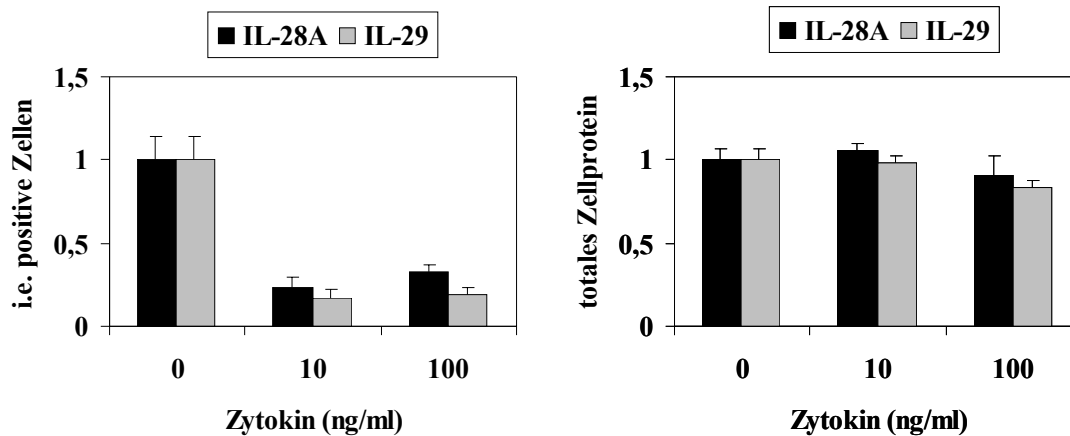


**Abbildung 28: Hochregulation der MxA- und 2',5'-OAS-mRNA-Expression durch IL-28A und IL-29.** Nach Stimulation von HCT116 Zellen mit IL-28A und IL-29 war die mRNA-Expression der antiviralen Proteine MxA und 2',5'-OAS in semiquantitativen RT-PCR-Experimenten hochreguliert. Für PKR fand keine Änderung der Genexpression statt. Die mRNA-Expression wurde mittels TINA Software auf GAPDH normalisiert.

## 5.2.4 Biologische Funktionen von IL-28A und IL-29 *in vitro* und *in vivo*

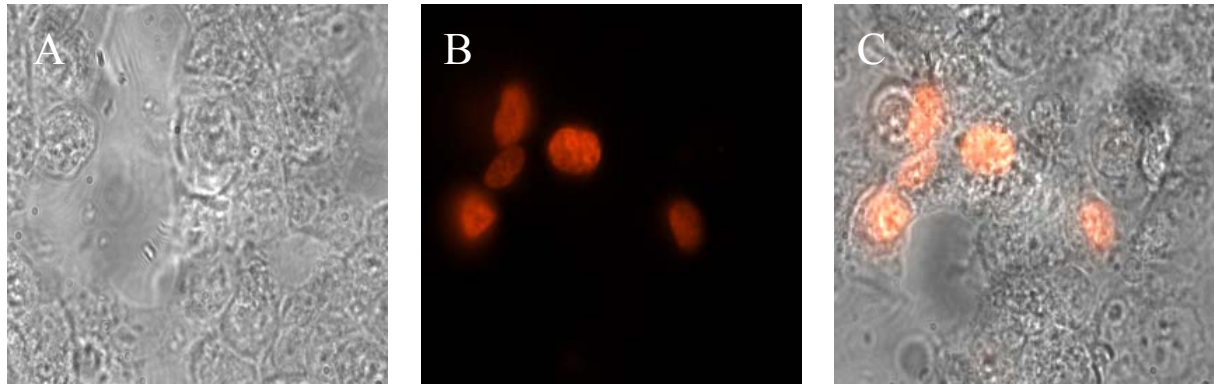
### 5.2.4.1 Reduktion von HCMV-infizierten, *immediate early* Antigen-positiven Zellen nach Stimulation mit IL-28A und IL-29 *in vitro*

Nachdem gezeigt wurde, dass IL-28A und IL-29 antivirale Gene hochregulieren, wurde der Einfluss dieser Zytokine auf die Infektion intestinaler Zellen mit HCMV *in vitro* untersucht. 24 h Inkubation mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml IL-28A und IL-29 vor HCMV-Infektion von HCT116-Zellen führte zu einer signifikant verminderten Anzahl von *immediate-early* (*i.e.*) *protein*-positiven Zellen im Vergleich zu nicht-inkubierten Zellen ( $p < 0,001$  für beide Interleukine) (Abb.29 und Abb. 31). Dieser Effekt war nicht auf einen durch die Interleukine vermittelten Zelluntergang zurückzuführen, was durch Messung der Proteingesamtkonzentration der mit IL-28A- und IL-29-stimulierten HCT116-Zellen gezeigt wurde (Abb.29).

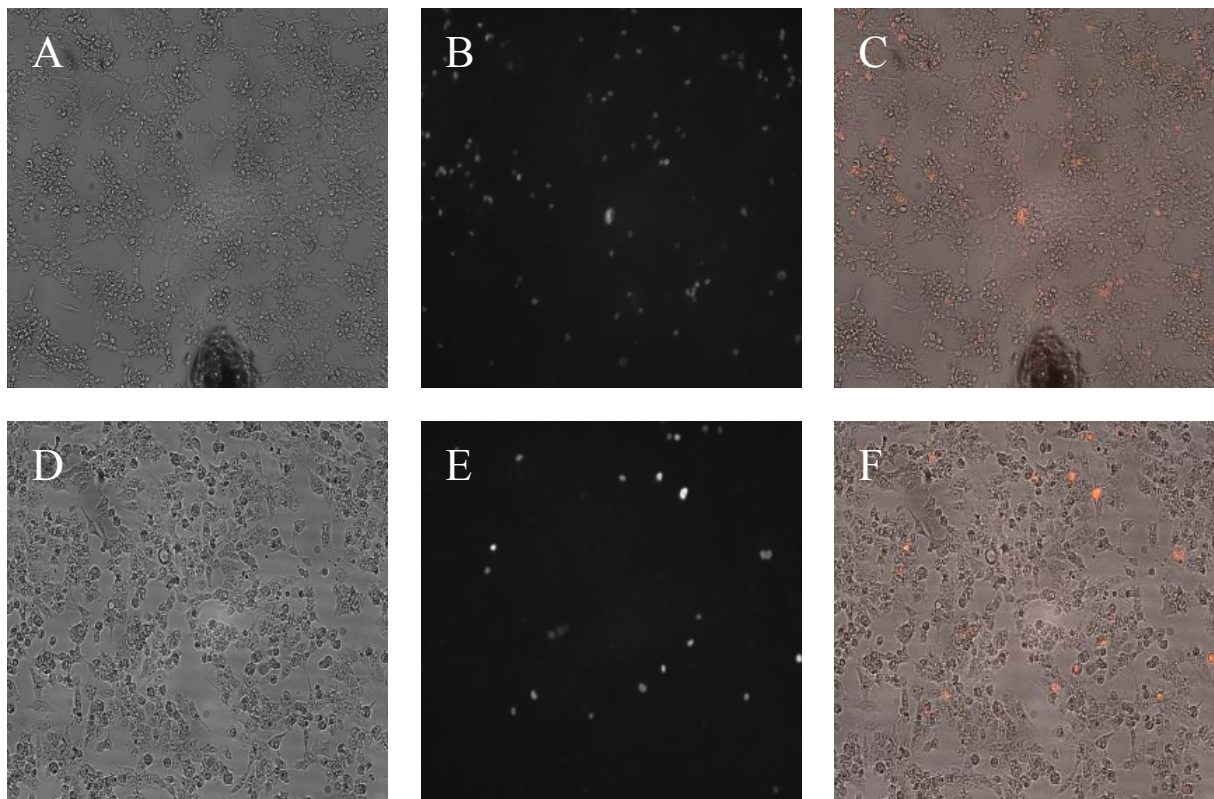


**Abbildung 29: Reduktion von i.e.-positiven Zellen durch IL-28A und IL-29.** Stimulation von HCT116-Zellen mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml IL-28A und IL-29 vor HCMV-Infektion von HCT116-Zellen führte zu einer signifikant verminderten Zahl von *immediate early* (*i.e.*) *protein*-positiven Zellen im Vergleich zu nicht-inkubierten Zellen ( $p < 0,001$  für beide Interleukine). Die Anzahl von *immediate early* (*i.e.*) *protein*-positiven Zellen von unstimulierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Der Effekt war nicht auf einen durch die Interleukine vermittelten Zelluntergang zurückzuführen, was durch Messung der totalen Proteinkonzentration der IL-28A und IL-29-stimulierten HCT116-Zellen mittels *Bradford-Assay* gezeigt wurde. Die Proteinkonzentration von unstimulierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt.





**Abbildung 30: Immunhistochemie von i.e.-positiven HCT116-Zellen.** Vergrößerung 64x. A: Morphologie nicht-infizierter HCT116-Zellen. B: i.e.-positive Zellen im Farbfilter. Der rote Farbstoff entspricht dem i.e.-spezifischen Sekundäntikörper cy-3. C: Überlagerungs (*merge*)-Bild.



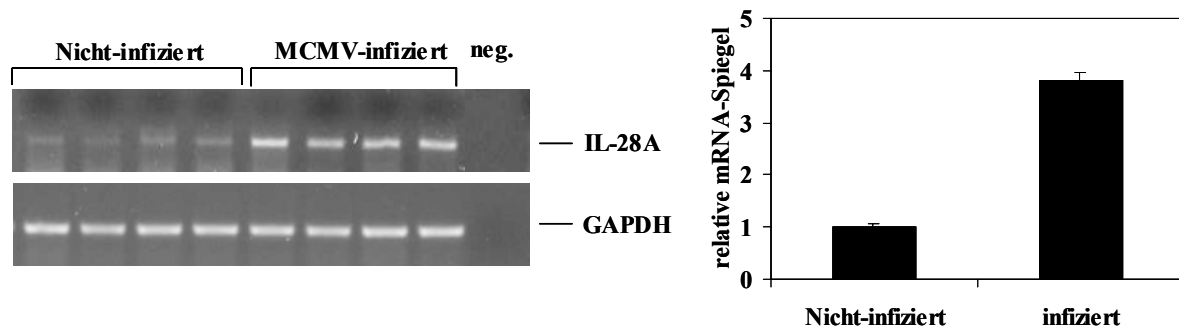
**Abbildung 31:**

**A-C: Immunhistochemie von i.e.-positiven HCT116-Zellen ohne Zytokinpräinkubation.** Vergrößerung 4x. A: Zellen ohne Farbfilter. B: i.e.-positive Zellen im Filter. C: *merge*-Bild. Es wurde ein repräsentatives, randomisiertes Gesichtsfeld ausgewählt.

**D-F: Immunhistochemie von i.e.-positiven HCT116-Zellen nach 24 h Präinkubation mit 100 ng/ml IL-29.** Vergrößerung 4x. D: Zellen ohne Farbfilter. E: i.e.-positive Zellen im Filter. F: *merge*-Bild. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der i.e.-positiven Zellen. Es wurde ein repräsentatives, randomisiertes Gesichtsfeld ausgewählt.

### 5.2.4.2 Hochregulation von IL-28A-mRNA nach MCMV-Infektion im Mauskolon *in vivo*

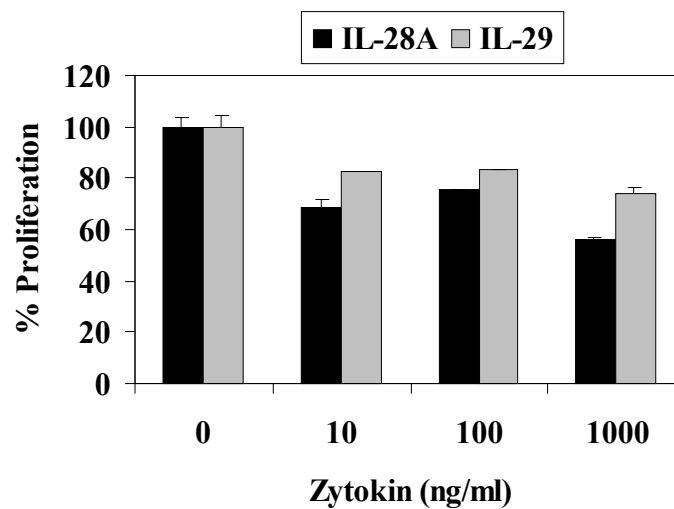
Da in den vorstehenden Experimenten ein antiviraler Effekt von IL-28A und IL-29 in intestinalen Zellen *in vitro* nachweisbar war, wurde die IL-28A-mRNA-Expression nach MCMV-Infektion *in vivo* am Mausmodell untersucht. Aus dem Darm mit MCMV-infizierten C57BL/6-Mäuse und nicht-infizierten Kontrollmäusen wurde RNA extrahiert und mittels RT-PCR-Analyse eine bis zu 3,8-fach höhere IL-28A-mRNA-Konzentration bei den infizierten Mäusen als bei nicht-infizierten Mäusen gefunden (Abb.32).



**Abbildung 32: Erhöhte IL-28A-mRNA-Expression durch MCMV-Infektion *in vivo*.** 45 h nach intravenöser Infektion von C57BL/6-Mäusen mit  $1 \times 10^6$  pfu der MCMV-*smith*-Linie zeigte sich im Kolongewebe eine Hochregulation von IL-28A-mRNA.

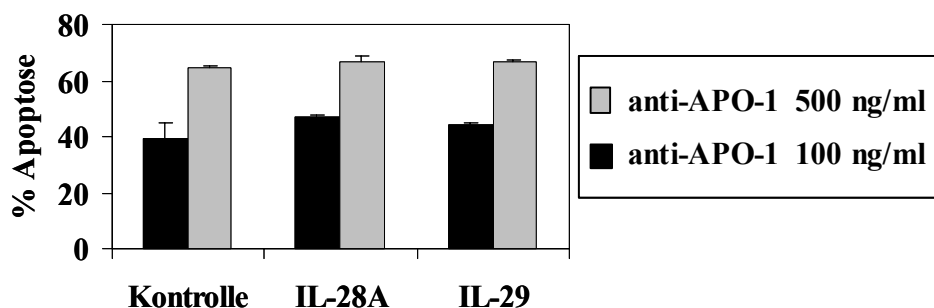
### 5.2.4.3 Erniedrigte Zellproliferation ohne Beeinflussung der Apoptose nach Stimulation mit IL-28A und IL-29 *in vitro*

In Zellproliferationsexperimenten wurde dosisabhängig eine signifikant erniedrigte Zellproliferation nach Zellstimulation mit IL-28A bzw. IL-29 ( $p < 0,005$  bzw.  $p < 0,05$ ) in der intestinalen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 festgestellt (Abb.33). Die antiproliferativen Effekte beider Interleukine zeigten zueinander eine sehr hohe Korrelation ( $r = 0,99$ ).



**Abbildung 33: Effekte von IL-28A und IL-29 auf die Zellproliferation.** Steigende Konzentrationen von IL-28A und IL-29 führten zu einer Reduktion der Zellproliferation von HCT116-Zellen.

In Fas-Liganden ( $\alpha$ -APO-1) -induzierten Apoptoseversuchen mit anschließender FACS-Analyse stellte sich kein signifikanter Unterschied der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen IL-28A- bzw. IL-29-stimulierten und nicht-stimulierten Zellen heraus (Abb.34).



**Abbildung 34: Fehlender Einfluss von IL-28A und IL-29 auf die Fas-Liganden-induzierte Apoptose.**

## 6 Diskussion

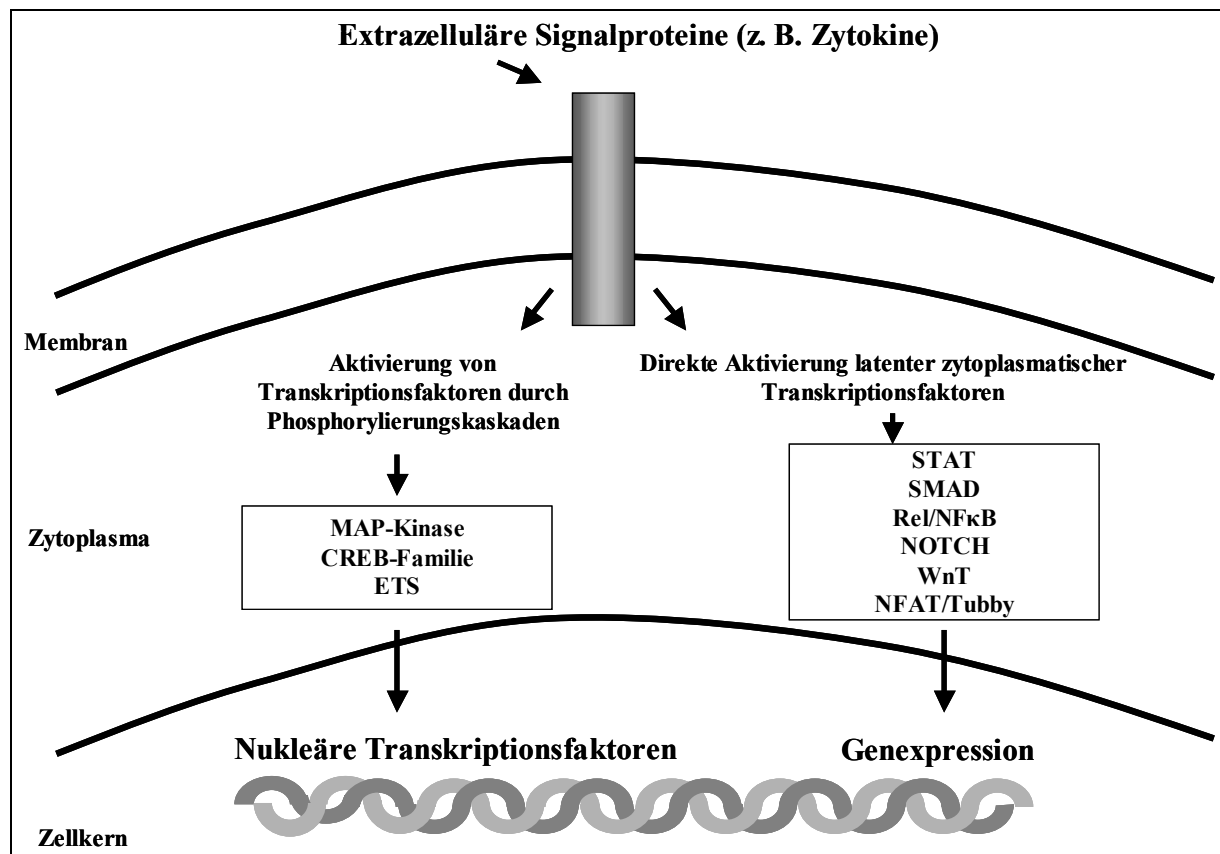
### 6.1 Die Bedeutung von IL-22 im Gastrointestinaltrakt

#### 6.1.1 IL-22: ein proinflammatorisches Zytokin im Gastrointestinaltrakt ?

Da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass der IL-22-spezifische Rezeptor IL-22R1 und ebenso der für die Signalweiterleitung in die Zelle notwendige Rezeptor IL-10R2 in diversen intestinalen Zelllinien (HT-29, DLD-1, Caco-2, SW480 und HCT116), wie auch in Biopsien aus humanen Darmgewebe exprimiert ist, scheint der Gastrointestinaltrakt ein wichtiges Ziel- bzw. Wirkorgan von IL-22 zu sein. Ebenso war ein löslicher Rezeptor, IL-22BP (auch als CRF2-10 bezeichnet), in allen untersuchten Zelllinien exprimiert, in Caco-2-Zellen sogar in einer alternativen *splicing*-Variante. Es handelt sich hierbei um ein sezerniertes, lösliches Protein, welches keine transmembrane und zytoplasmatische Domäne aufweist. Die genaue Funktion dieses Rezeptors ist bislang unklar. Jedoch zeigt die 34%ige Homologie zur extrazellulären Domäne von IL-22R1, dass IL-22BP IL-22 binden kann. Womöglich fungiert IL-22BP als natürlicher Antagonist und moduliert so die Immunantwort. In einer Studie wurde nachgewiesen, dass IL-22BP radioaktiv markiert gelöstes IL-22 bindet und darüber hinaus die Interaktion von IL-22 mit dem membranständigen Rezeptorkomplex inhibiert [90]. Außerdem war die STAT-Aktivierung in IL-22-responsiblen Zellen wie z.B. A549-Zellen durch IL-22BP reduziert. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass proliferative Effekte von IL-22 in BaF3-Zellen nach Zugabe von IL-22BP aufgehoben wurden [171]. Obwohl IL-22BP IL-22 *in vitro* inhibiert, könnte dessen Rolle unter physiologischen Bedingungen *in vivo* eine andere sein. Es wäre denkbar, dass durch die Bindung des löslichen Rezeptors die Zytokinaktion verstärkt wird. Bezüglich der genauen Funktion von IL-22BP in intestinalen Zellen müssen weitere *in vitro*-Versuche Aufschluss bringen.

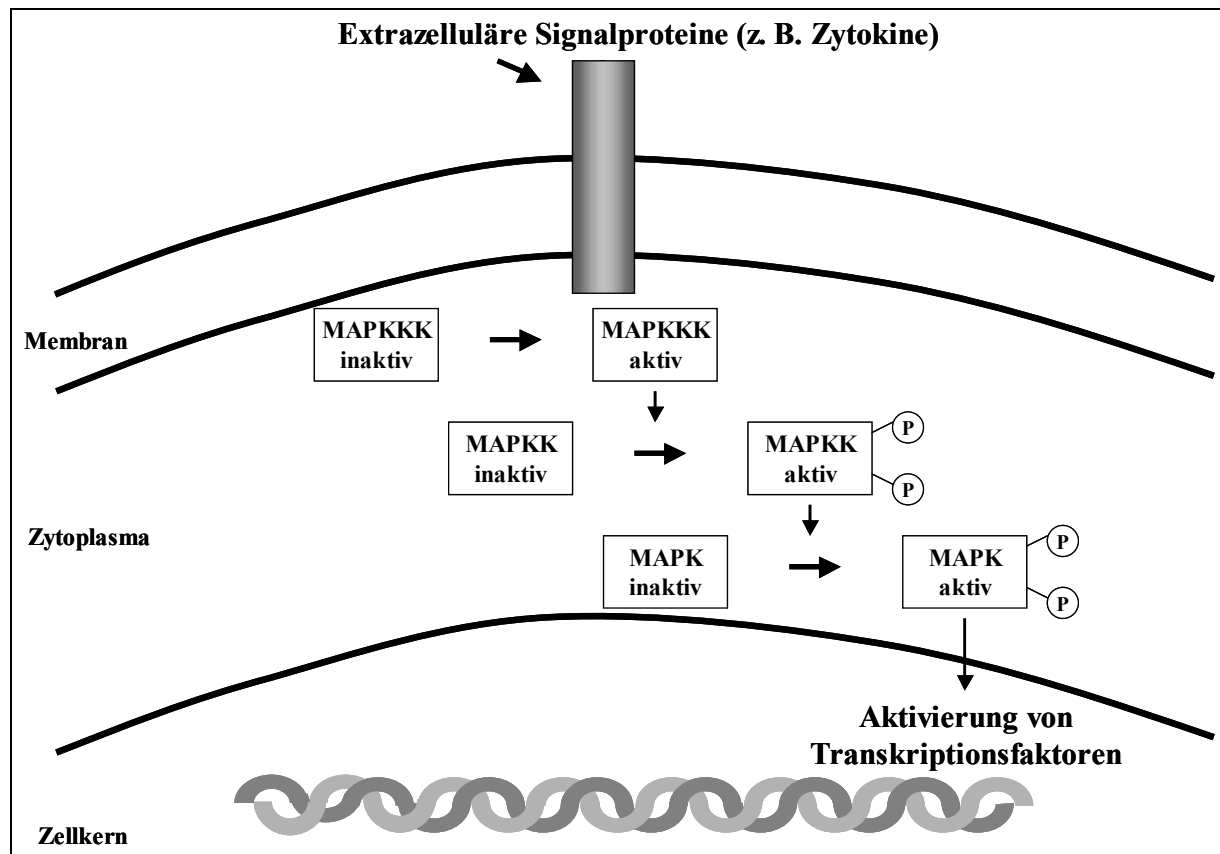
Die Stimulation von intestinalen Epithelzellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS führte in dieser Arbeit zu einer erhöhten mRNA-Expression der IL-22-spezifischen Rezeptoruntereinheit IL-22R1, wohingegen kein Einfluss auf die Expression der ubiquitär auf immunen und nicht-immunen Gewebe vorkommenden Rezeptoruntereinheit IL-10R2 [110] zu beobachten war. Dies und die Tatsache, dass das Gen für IL-22 auf Chromosom 12q liegt, einer Region, in der einige mit CED und Asthma bronchiale assoziierte Gene lokalisiert sind [44], deutet weiterhin auf eine wichtige Funktion von IL-22 bei entzündlichen Prozessen hin.

Die Bindung extrazellulärer Signalproteine an einen spezifischen Rezeptor führt in der Regel zu Veränderungen der Gentranskription innerhalb der Zelle. Dabei sind bislang zwei verschiedene Möglichkeiten der Signaltransduktion bekannt (siehe Abb. 35). Zum einen können Transkriptionsfaktoren durch verschiedene Signalwege direkt, zum anderen indirekt durch sog. Phosphorylierungskaskaden aktiviert werden [23].



**Abbildung 35: Unterschiedliche Arten der Genregulation extrazellulärer Signalproteine.** Links: Intrazelluläre Phosphorylierungskaskaden aktivieren nukleäre Transkriptionsfaktoren. Rechts: Latente zyttoplasmatische Transkriptionsfaktoren werden durch Rezeptor-Liganden-Interaktion direkt aktiviert.

Einer der indirekten Signalwege ist der MAP-Kinase-Signalweg. MAP-Kinasen gehören zu einer evolutionär hochkonservierten Familie von Enzymen, die im menschlichen Organismus unter anderem spezielle zelluläre Prozesse wie Zelldifferenzierung, -proliferation und -tod steuern [93]. Diese zyttoplasmatisch lokalisierten Kinasen werden ihrerseits durch übergeordnete Kinasen, sog. MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK, z.B. MEK) durch Phosphorylierung an Serin/Threonin-Aminosäuren aktiviert (siehe Abb. 36).



**Abbildung 36: Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinasen durch extrazelluläre Signalproteine.** Die Mitglieder dieser Familie aktivieren sich durch Hinzufügen von Phosphatresten an Serin/Threonin-Aminosäuren. (MAPK: MAP-Kinase, MAPKK: MAP-Kinase-Kinase, MAPKKK: MAP-Kinase-Kinase-Kinase).

Drei Hauptgruppen von MAP-Kinasen sind derzeit beim Menschen bekannt: ERK-1/2, SAPK/JNK und p38. Diese werden unter anderem auch bei inflammatorischen Prozessen aktiviert, wodurch Inhibitoren der Kinasen bzw. der übergeordneten Kinasen potentielle antiinflammatorische Therapeutika darstellen.

In der vorliegenden Arbeit führte die Bindung von IL-22 an den funktionellen Rezeptorkomplex IL-22R1/IL-10R2 zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK. Ein ähnliches Signaltransduktionsmuster wurde für IL-22 in Hepatomzellen beschrieben [98].

Präinkubation mit dem MEK-Inhibitor PD98059 reduzierte die IL-22-induzierte Phosphorylierung von ERK-1/2, was darauf hinweist, dass diese Phosphorylierung aus einer MEK-Aktivierung resultiert. Analog hierzu führte die Präinkubation mit dem spezifischen JNK-Inhibitor SP600125 zu einer Abschwächung der JNK-Phosphorylierung. Dennoch war in intestinalen Epithelzellen – im Gegensatz zu den Ergebnissen in Leberzellen – keine Aktivierung von p38 zu beobachten. Dies könnte auf Unterschiede in der Signaltransduktion von IL-22 in verschiedenen Geweben hinweisen.

Speziell beim aktivem M. Crohn wurden erhöhte SAPK/JNK-Phosphorylierungsspiegel nachgewiesen [76]. Es wird angenommen, dass die Produktion von TNF- $\alpha$ , dem zentralen Entzündungsmediator bei CED, über JNK- und/oder p38-Signalwege reguliert wird [76]. Eine Behandlung mit dem synthetischen Guanylhydrazon CNI-1493, welches sowohl SAPK/JNK als auch p38 inhibiert, führte zur klinischen Besserungen mit einer deutlichen Zunahme der Schleimhautheilung bei M. Crohn-Patienten mit moderater bis schwerer Krankheitsaktivität [76]. In dieser Studie wird JNK als das entscheidende Zielmolekül für die antiinflammatorische Wirkung angesehen, da die JNK-Phosphorylierung in LPS-stimulierten peripheren mononuklearen Blutzellen *in vitro* und in Schleimhautentzündungszellen *in vivo* stärker durch CNI-1493 inhibiert wurde als p38 [76]. Damit übereinstimmend konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden, dass der spezifische p38-Inhibitor SB203580 bei Mäusen mit TNBS-induzierter Colitis zu keiner klinischen Besserung führte [157]. Somit könnte die Aktivierung von SAPK/JNK durch IL-22 in intestinalen Epithelzellen auf eine proinflammatorische Wirkung dieses Zytokins hinweisen. Gleiches gilt für die Aktivierung des ERK-1/2-Signalweges, von dem lange angenommen wurde, dass er nur Zellwachstum und Zellproliferation reguliert. ERK-1/2-defiziente Mäuse sind phänotypisch normal und fertil, zeigen aber eine defekte Thymozytenumwandlung und eine reduzierte Expression der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten von T-Zellen. Dies weist daraufhin, dass die ERK-Aktivierung wichtig für die T-Zellaktivierung und somit für die Immunantwort ist.

Die Phosphoinositol-3-Kinasen (PI-3-Kinasen) stellen eine hochkonservierte Familie von Signaltransduktionskinasen dar, die vor allem in der Regulation von Zellproliferation und Zellüberleben beteiligt sind [14]. Durch die PI-3-Kinasen und die nachgeschaltete Akt-Kinase, auch als Protein-Kinase B bezeichnet, werden zelluläre Entzündung, Chemotaxis und Apoptose gesteuert. Außerdem gibt es Hinweise, dass über den PI-3-Kinase/Akt-Signalweg in einer Art negativen *feedback*-Mechanismus proinflammatorische und apoptotische Aktivitäten inhibiert werden. Beispielsweise wurde gezeigt, dass durch den PI-3-Kinase/Akt-Signalweg die Produktion proinflammatorischer Mediatoren in LPS-behandelten Monozyten reduziert war [62]. Ebenso waren in PI-3-Kinase-defizienten Mäusen die Anzahl gastrointestinaler Mastzellen vermindert und die antimikrobielle Abwehr gestört, was auf eine wichtige Rolle dieses Signalwegs bei der Immunantwort hinweist [61].

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass IL-22 den Akt-Signalweg in intestinalen Epithelzellen aktiviert. Somit könnte IL-22 durch Akt-vermittelte, vermehrte Zellregeneration/proliferation bzw. antiinflammatorische Mechanismen eine protektive Rolle im Gastrointestinaltrakt haben.

Ein weiterer Schritt in der Signaltransduktion ist die direkte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (siehe Abb. 35). Zu diesen gehören die STAT-Proteine [31]. Nach Bindung von Zytokinen an den spezifischen Rezeptor kommt es zur Dimerisierung bzw. Oligomerisierung und nachfolgend zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Diese Rezeptormodifikation führt zur Rekrutierung von JAK-Kinasen, die an den Rezeptor binden und spezifische Tyrosinreste phosphorylieren. STAT-Moleküle assoziieren mit dem Rezeptor und werden ihrerseits ein Substrat der JAK-Kinasen und von diesen durch Phosphorylierung aktiviert. Diese aktivierten STAT-Proteine dissoziieren vom Rezeptor und formieren Homo- oder Heterodimere mit anderen STAT-Proteinen. Die gepaarten Moleküle überqueren die Zellkernmembran und binden an DNA-Sequenzen in der Promotorregion von Zielgenen.

Die Stimulation von intestinalen Epithelzellen mit IL-22 führte in dieser Arbeit zu einer Phosphorylierung von STAT1 und STAT3. Dies konnte in anderen Zellsystemen auch nach IL-10-Stimulation gezeigt werden [42]. Ein bekanntes Zielgen des STAT3-Signalwegs ist SOCS-3, dessen Hochregulation nach IL-22-Stimulation in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde. SOCS-Proteine spielen eine wichtige Rolle als negative Regulatoren bei der Zytokinsignaltransduktion, indem sie in einer Art negativen *feedback*-Mechanismus JAK-/STAT-Kinasen hemmen können [10]. Von den bislang bekannten acht verschiedenen SOCS-Proteinen sind SOCS-1 und SOCS-3 am besten charakterisiert. SOCS-mRNA ist in vielen verschiedenen Zelltypen und Geweben wie Pankreas, Leber und auch im Gastrointestinaltrakt exprimiert. Im Gastrointestinaltrakt sind für unterschiedliche Zelltypen diverse SOCS-Effekte beschrieben worden. In Immunzellen scheinen sie inhibitorische Wirkung auf die Entzündungsreaktion auszuüben, in intestinalen Mesenchymzellen inhibieren SOCS-Proteine Zytokine (z.B. IL-6) und Wachstumsfaktoren, über deren Aktivität exzessive Reparaturmechanismen zur Fibrose führen können [30, 118]. In epithelialen Kryptzellen scheinen SOCS-Proteine die hyperproliferative Antwort und damit evtl. Tumorförderung zu inhibieren [4].

Interessanterweise wurde gezeigt, dass STAT3 bei Patienten mit M. Crohn hochreguliert war, nicht aber bei gesunden Probanden [101, 143]. Weiterhin war das durch STAT3 regulierte Protein SOCS-3 ebenfalls nur bei Patienten mit M. Crohn vermehrt nachweisbar. In einem Mauscolitis-Modell zeigten Mäuse mit einem mutierten SOCS-3-Gen (F59D-JAB transgene Mäuse) eine stärkere STAT3-Aktivierung und eine stärkere Colitis als Wildtypmäuse [153]. Diese Daten lassen annehmen, dass eine übermäßige Aktivierung von STAT3 mit der Schwere der Colitis korreliert, und dass SOCS-3 eine negative regulatorische und somit protektive Funktion bei intestinaler Entzündung durch Herunterregulation der STAT3-



Aktivität spielt. In einer weiteren Studie wurden jedoch bei STAT3-defizienten Mäusen eine erhöhte Konzentration von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  und phänotypisch schwere Veränderungen des Verdauungstrakts – ähnlich denen bei M. Crohn – gefunden [165]. Hierfür wurden Mäuse generiert, bei denen es zu einer spezifischen Deletion von STAT3 während der Hämatopoese kam. Den M. Crohn-ähnlichen Phänotyp erklärten die Autoren durch eine pseudoaktive angeborene Immunantwort auf LPS, die das Ergebnis der STAT3-Deletion darstellt [165]. Diese Daten weisen daraufhin, dass STAT3 möglicherweise eine Immuntoleranz gegenüber mikrobiellen Antigenen übermittelt und somit eine große Bedeutung bei der angeborenen Immunantwort hat [165]. Zudem wird ein synergistischer Effekt der MAP-Kinasen und STAT-Signalwege bei der Induktion der Akut-Phase-Reaktion angenommen [35].

Ein wichtiger Regulator der epithelialen Funktion bei entzündlichen Prozessen ist das Zytokin TNF- $\alpha$ , welches bei chronisch entzündlichen Krankheiten wie rheumatoider Arthritis, Spondylarthropathien, Psoriasis vulgaris und CED hochreguliert ist und als zentraler Entzündungsmediator angesehen wird. Die Hauptproduzenten sind aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten. TNF- $\alpha$  aktiviert Leukozyten, induziert Akute-Phase-Proteine und Metalloproteinasen und inhibiert die Apoptose inflammatorischer Zellen. Es wurde gezeigt, dass die Anzahl TNF- $\alpha$ -produzierender Zellen in der *Lamina propria* des Darms von M. Crohn-Patienten erhöht ist [22, 128]. Ebenso ist TNF- $\alpha$  in der Darmmukosa von Patienten mit Colitis ulcerosa hochreguliert [22, 128]. TNF- $\alpha$  induziert auch Änderungen in der epithelialen Funktion, z.B. Permeabilität, Zellzyklus, Nährstoffaufnahme und Genexpression [107, 109]. Zudem werden durch TNF- $\alpha$  viele andere proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und auch IL-8, vermehrt exprimiert.

IL-8 gehört zur Gruppe der Chemokine. Als chemotaktisches Zytokin induziert es die Migration von Immunzellen zu Orten der Entzündung. Für IL-8 wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass dessen Sekretion in intestinalen Epithelzellen unter anderem durch Bakterien, Viren, LPS, diverse Zytokine und Phorbolster erhöht war [48, 49]. Auch bei M. Crohn und Colitis ulcerosa wurde eine Bedeutung von IL-8 beschrieben [48]. IL-22 führte in dieser Arbeit in intestinalen Epithelzellen zu einer Hochregulation der proinflammatorischen Zielgene IL-8 und TNF- $\alpha$ . Hierbei bleibt unklar, ob IL-8 von IL-22 direkt hochreguliert wird oder ob dies indirekt durch TNF- $\alpha$  geschieht. Jedenfalls deuten diese Ergebnisse ebenfalls auf eine wichtige Bedeutung von IL-22 bei entzündlichen Prozessen in Gastrointestinaltrakt hin.

CED wie M. Crohn und Colitis ulcerosa sind in Inzidenz und Prävalenz vor allem in der nördlichen Hemisphäre zunehmende Krankheitsentitäten, deren Pathogenese bis heute unzureichend geklärt ist. Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass eine Autoimmunreaktion der intestinalen Mukosa den Entzündungsprozess initiiert und aufrecht erhält. An Immunreaktionen im menschlichen Organismus sind unter anderem proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , aber auch diverse Interleukine beteiligt. IL-22 gehört zur IL-10-Familie und weist eine ca. 24,7%ige Aminosäurehomologie zu IL-10 auf. IL-10 ist ein regulatorisches Zytokin, welches einerseits die Antigenpräsentation und andererseits die Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8) in Monozyten inhibiert [169]. Außerdem wurde gezeigt, dass IL-10-defiziente Mäuse spontan eine schwere Colitis entwickeln [92]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde IL-10 in mehreren Studien als antiinflammatorische Therapie bei CED untersucht [142, 159]. Allerdings waren die Ergebnisse aufgrund schlechter Verträglichkeit und auch geringer Effizienz nicht ermutigend. Das IL-10-verwandte Zytokin IL-22, das die IL-10R2-Rezeptoruntereinheit mit IL-10 teilt, führte in unserer Arbeit zur Hochregulation proinflammatorischer Zytokine (IL-8, TNF- $\alpha$ ). Um die Rolle von IL-22 bei CED zu charakterisieren, wurde dessen Regulation in Darmbiopsien von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa untersucht, wobei sich zeigte, dass vor allem in Darmbiopsien von M. Crohn-Patienten IL-22-mRNA hochreguliert war. In geringerem Ausmaß ließ sich IL-22-mRNA auch in Darmbiopsien von Patienten mit Colitis ulcerosa nachweisen.

Die Infiltration mit T-Zellen ist ein typisches histopathologisches Kennzeichen bei CED [125, 140]. Eine Polarisierung der T-Zellen zu Th1-Zellen führt zu einer erhöhten IL-22-Expression, wohingegen eine Polarisierung zu Th2-Zellen die IL-22-Expression reduziert [5]. Es wurde gezeigt, dass Th1-Zellen IL-22 sezernieren [67]. Bis heute wird angenommen, dass M. Crohn eine Th1-vermittelte und Colitis ulcerosa eine Th2-vermittelte Immunreaktion darstellen [85, 133, 134]. Dies könnte auch die Erklärung für die von uns gefundenen Unterschiede der IL-22-mRNA-Expression in Darmbiopsien von Patienten mit M. Crohn und Colitis ulcerosa sein. Die Ergebnisse decken sich mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der IL-22 immunhistochemisch in Darmbiopsieschnitten von M. Crohn-Patienten, nicht aber bei Patienten mit Colitis ulcerosa und infektiöser Colitis nachgewiesen wurde [5]. Weiterhin zeigten unsere Ergebnisse im DSS-Colitismodell, dass hierbei IL-22-mRNA in entzündeten Darmabschnitten zusammen mit anderen proentzündlichen Genen (Lactoferrin, E-Selectin, CXCL2, CXCL5, IL-4, IL-6 und IL-17) hochreguliert war. Dies unterstreicht nochmals die Bedeutung von IL-22 bei entzündlichen Prozessen im Darm.

Nach neuesten Erkenntnissen werden aber vor allem Th17-Zellen als Hauptproduzenten von IL-22 angesehen [99]. Th17-Zellen entstehen durch Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-Effektorzellen, wobei hierfür TGF- $\beta$  und IL-6 verantwortlich sind [105]. Th17-Zellen produzieren unter anderem auch IL-17A, IL-17F und IFN- $\gamma$  (siehe Abb. 37). Das Fortbestehen bzw. Überleben der Th17-Zellen wird vor allem durch IL-23 gewährleistet [2]. Auf Th17-Zellen ist der IL-23-Rezeptor exprimiert [116], wobei vor kurzem in zwei Studien ein bestimmter Polymorphismus dieses Rezeptors (R381Q) mit einer Protektion vor M. Crohn assoziiert wurde [38, 40]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass durch IL-23 die Produktion von IL-22 induziert wird [99]. Die neuen Erkenntnisse zu den Th17-Zellen könnten zu einem Umdenken bzgl. der Pathogenese von CED führen und weisen auf eine wichtige Bedeutung von IL-22 bei CED hin. Bis jetzt wurde angenommen, dass vor allem der IL-12-Signalweg eine zentrale Bedeutung bei der Entwicklung der intestinalen Entzündung durch Aktivierung von Th1-Zellen einnimmt. Jedoch scheinen Th17-Zellen eine ebenso wichtige Rolle zu spielen.

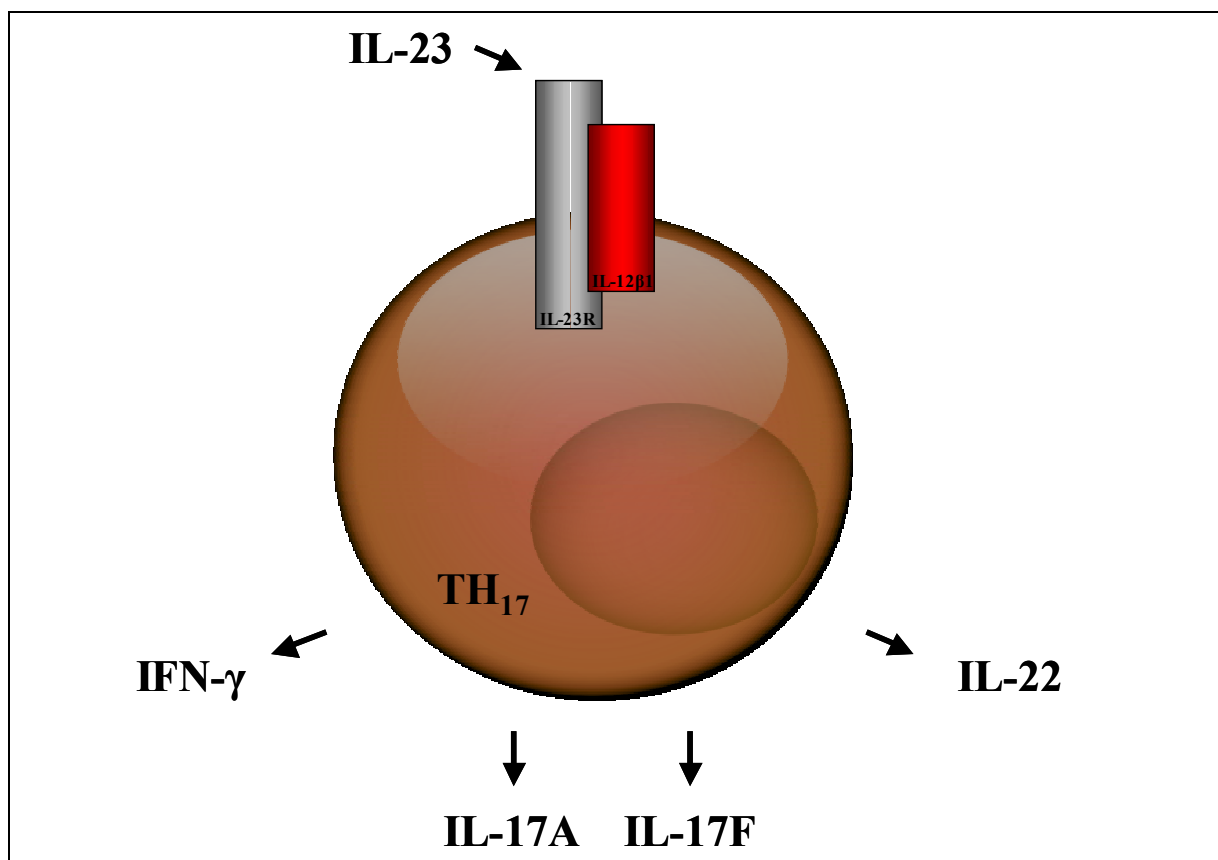


Abbildung 37: Th17-Zellen als Hauptproduzenten von IL-22.

### 6.1.2 IL-22-vermittelte Barriere-protective Effekte im Gastrointestinaltrakt

Eine Reihe von Studien zeigten, dass die Aktivierung von ERK-1/2- und Akt-Kinasen mit erhöhter Zellmigration assoziiert ist [15, 64, 148, 172]. Beide Signalwege wurden in der vorliegenden Arbeit nach IL-22-Stimulation in intestinalen Epithelzellen aktiviert. Ebenso wurde gezeigt, dass IL-22 die intestinale Wundheilung durch verstärkte Zellmigration fördert. Dieser Mechanismus scheint PI-3-Kinase/Akt-abhängig zu sein, da die verstärkte Wundheilung durch vorherige Inkubation mit dem spezifischen PI-3-Inhibitor *Wortmannin*, nicht aber durch Inkubation mit dem ERK-1/2-Inhibitor PD98059 geblockt werden konnte. Grundsätzlich wird beim gesunden Menschen eine zerstörte intestinale Schleimhautbarriere sehr schnell wieder regeneriert. Bei Patienten mit CED ist diese Barriere durch verschiedene Faktoren gestört.

Die IL-22-vermittelte Zellrestitution ist zum Teil durch eine erhöhte Zellproliferation bedingt, wobei interessanterweise nur geringe Konzentrationen von IL-22 (10 ng/ml bzw. 100 ng/ml) die Zellproliferationsraten steigerten, hohe Konzentrationen (1000 ng/ml) hingegen die Zellproliferationsraten verringerten. Diese umgekehrte U-Kurve wurde in ähnlicher Weise bei anderen zellmigrationsfördernden Zytokinen, z.B. bei dem Chemokin CXCL12, beobachtet [19]. Dennoch deuten diese Daten daraufhin, dass IL-22 bei der Restitution der intestinalen Barriere von Bedeutung ist.

Im Gegensatz zu Studien in der hepatischen Tumorzelllinie HepG2, in denen IL-22 die Expression von anti-apoptotischen Genen wie Bcl-2, Bcl-x und Mcl-1 hochregulierte [127], wurde in unseren Experimenten für IL-22 in intestinalen Epithelzellen kein Effekt auf die zelluläre Apoptose nachgewiesen.

Intestinale Bakterien spielen bei der Entwicklung von CED, insbesondere bei genetisch empfänglichen Patienten, eine ganz herausragende Rolle [125, 138]. Mutationen im CARD15/NOD2-Gen, das für die Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne 2 (NOD2) kodiert, führen beispielsweise bei M. Crohn-Patienten zu einem starken Befall des Ileums [144]. Das Protein stellt einen intrazellulären Rezeptor für Muramyl-Dipeptide dar, der in intestinaler Schleimhaut, vor allem in den Panethschen Körnerzellen, exprimiert ist. Diese Zellen führen, nach Bindung von bakteriellen Antigenen an den Rezeptor, zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie Lysozyme, sekretorische Phospholipase A2 und Defensine (Defensine werden in  $\alpha$  und  $\beta$ , 1-6 eingeteilt). Somit tragen sie zur angeborenen Schleimhautimmunität bei [121, 126].  $\beta$ -Defensine bestehen aus ca. 30 positiv geladenen Eiweißbausteinen und wirken wie körpereigene Antibiotika gegen Bakterien, Pilze und auch gegen Viren.  $\beta$ -Defensine sind hauptsächlich in der Haut und in Schleimhautepithelzellen

exprimiert, wo sie eine Barriere gegen mikrobielle Infektionen bilden [97]. Erst kürzlich wurde eine verminderte antimikrobielle Abwehr bei M. Crohn-Patienten mit Ileumbefall nachgewiesen, die durch eine reduzierte  $\alpha$ -Defensinexpression in Panethschen Körnerzellen hervorgerufen wurde [164]. Die verminderte Expression der Defensine, v.a. Defensin-5 und -6, war bei Patienten mit der CARD15/NOD2-Mutation 1007fs (=SNP13) am stärksten ausgeprägt [87]. Ebenso wurde vor kurzem bei Patienten mit M. Crohn eine verringerte  $\beta$ -Defensin-Genkopiezahl beschrieben, von der normalerweise vier Kopien auf Chromosom 8 vorliegen. Diese Verringerung der Kopienzahl war mit einem erniedrigten  $\beta$ -Defensinspiegel und daraus resultierend mit einer reduzierten antibakteriellen Aktivität assoziiert [52]. Für Keratinozyten wurde gezeigt, dass IL-22  $\beta$ -Defensin-2 hochreguliert und eine erhöhte IL-22-Expression in Biopsien entzündeter Haut mit erhöhter  $\beta$ -Defensin-2-Expression assoziiert war [169]. In einer aktuellen Studie wurde beschrieben, dass IL-22 zusammen mit IL-17, welche beide von Th17-Zellen koexprimiert werden (siehe Abb. 37),  $\beta$ -Defensin-2 und anderer antimikrobielle Peptide wie S100A7, S100A8 und S100A9 in primären humanen Keratinozyten hochregulieren [99]. Dies könnte darauf hindeuten, dass im Rahmen eines Abwehrmechanismus durch aktivierte T-Zellen vermehrt IL-22 produziert wird. Dadurch könnte wiederum eine verstärkte  $\beta$ -Defensin-2-Produktion resultieren, wodurch invadierende Pathogene abgetötet würden. Die Arbeitsgruppe um Wehkamp zeigte kürzlich, dass vor allem  $\beta$ -Defensin-2 und nicht  $\beta$ -Defensin-1 in entzündeten Läsionen von Patienten mit CED hochreguliert ist [163]. In unseren Experimenten führte die Stimulation von intestinalen Epithelzellen mit IL-22 zur signifikanten Hochregulation von  $\beta$ -Defensin-2-mRNA. Hierüber könnte IL-22 protektive Eigenschaften bei CED durch Schutz der intestinalen Barriere ausüben.

## 6.2 Die Bedeutung von IL-28A und IL-29 im Gastrointestinaltrakt

### 6.2.1 IL-28A und IL-29: antivirale Zytokine im Gastrointestinaltrakt

In unserer Arbeit wurde gezeigt, dass der INF- $\lambda$ -Rezeptorkomplex, der aus IL-10R2 und IL-28R1 besteht, in intestinalen Epithelzellen exprimiert ist. Für die spezifische Rezeptoruntereinheit IL-28R1 konnte auch die Proteinexpression mittels immunhistochemischer Analysen nachgewiesen werden. In mehreren Studien wurde zudem klar, dass diese Untereinheit im Gegensatz zur ubiquitär exprimierten Untereinheit IL-10R2 ein eingeschränktes Expressionsmuster aufweist. Der IL-28R1-Rezeptor scheint auch nicht auf Leukozyten exprimiert zu sein [36]. Dies könnte darauf hinweisen, dass beispielsweise die Leukopenie, eine häufige Nebenwirkung unter IFN- $\alpha$ -Therapie, bei potentieller therapeutischer Anwendung der Lambda-Interferone nicht oder nur in abgeschwächter Form auftritt. In einer der ersten Studien zu den Lambda-Interferonen wurde beschrieben, dass diese nicht über die beiden für alle Typ-I-Interferone spezifischen heterodimeren Klasse-II-Zytokinrezeptoren IFNAR-1 und -2 ihre antivirale Aktivität ausüben. Eine Blockade der beiden Rezeptoren mittels neutralisierender Antikörper konnte die antivirale Aktivität der Lambda-Interferone nicht inhibiert [146]. Interessanterweise belegte eine weitere Studie, dass die antivirale Aktivität der Lambda-Interferone von bestimmten Tyrosinresten (Tyr 343, 517) im IL-28R1-Rezeptor abhängt. Die Aktivierung von STAT2 ist hierbei jedoch ebenso wichtig [43].

Typ I-Interferone üben ihre antivirale Aktivität durch Interaktion des sog. *IFN-stimulating gene factors 3 (ISGF3)* aus. Dieser besteht aus dem regulatorischen Element p48 (*IFN regulator factor-9=IRF-9*), aktiviertem STAT1 und STAT2, und dem intrazellulären *IFN-stimulated response element (ISRE)* [32, 150]. Im Gegensatz hierzu kommt es nach Bindung von Typ-II-Interferon (IFN- $\gamma$ ) zu einer Aktivierung von STAT1, nicht aber STAT2. Nachfolgend wird durch Homodimerisierung der GAF-AAF-Komplex gebildet, der nach Translation in den Zellkern an das IFN- $\gamma$ -Aktivierungsmolekül GAS bindet und im Folgenden die Genregulation initiiert.

In einer der ersten Studien zu den Lambda-Interferonen wurde beschrieben, dass diese ebenso wie Typ-I-Interferone ISGF3 aktivieren können. Somit sind ähnliche Genexpressionsmuster wie bei Typ-I-Interferonen zu erwarten [146]. Antivirale Gene, die von Typ-I-Interferonen induziert werden, sind unter anderem 2',5'-OAS, MxA und PKR. Das OAS-System ist ein wichtiger antiviraler Transduktionsweg, der in der Spaltung von einzelsträngiger (ss) RNS resultiert [150]. Die MxA-Proteine stören das intrazelluläre *trafficking* des Virus und verhindern somit dessen Replikation [71]. PKR übt multiple Funktionen in der Kontrolle von

Transkription und Translation aus. Darüber hinaus vermittelt PKR wichtige Effekte bei Zellwachstum und Apoptose [145, 150]. In unseren Experimenten führte die Bindung von IL-28A und IL-29 zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2 und SAPK/JNK, nicht aber von p38, was ähnlich dem Aktivierungsmuster von IL-22 in intestinalen Epithelzellen ist. Außerdem wurden durch IL-28A und IL-29 die Akt-Kinase und STAT1-Proteine phosphoryliert. Dieses Aktivierungsmuster stimmt teilweise mit dem von Typ-I-Interferonen überein, da von diesen auch Akt und ERK-1/2-Kinase, nicht aber JNK-Kinasen aktiviert werden [11, 117]. Ob dieser Unterschied andere biologische Funktionen nach sich zieht, ist bislang unklar.

Die Signale von IL-28A und IL-29 resultierten wiederum in einer erhöhten Expression von mRNA der antiviralen Proteine 2',5'-OAS und MxA in intestinalen Epithelzellen. Die Hochregulation von PKR-mRNA konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Trotz funktioneller Gemeinsamkeiten könnte dies auf unterschiedliche Signalwege bei der antiviralen Aktivität hinweisen. Ähnliche Unterschiede sind auch zwischen IFN- $\beta$  und IFN- $\gamma$  bekannt, da PKR nur für die antivirale Aktivität von IFN- $\beta$ , nicht aber von IFN- $\gamma$  wichtig ist [33, 68].

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Phosphorylierung von STAT3 durch IL-28A und IL-29 in intestinalen Epithelzellen festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu aktuellen Daten in Leberzellen, wo wir (bislang unpublizierte Daten) wie auch andere Arbeitsgruppen [37] sowohl STAT3/4 und STAT5-Aktivierung nach Lambda-Interferon-Stimulation gefunden haben. Dieses Aktivierungsmuster ist charakteristisch für die Signalwege von IL-10 und der übrigen IL-10-verwandten Zytokine und zeigt somit die Gruppenzugehörigkeit der Lambda-Interferone auf.

Für Typ-I-Interferone wie für Lambda-Interferone ist bekannt, dass diese *in vitro* die Infektion und Replikation einer Reihe von Virusarten inhibieren können (siehe Tab. 6).

Virus	Virusfamilie	Experimentelles System	Effekt	Referenz
EMCV	<i>Picornaviridae</i>	LN229, Hep G2, MG63, SW480, A549, HT-29	Reduzierte Zytopathie	[88, 108, 146]
VSV	<i>Rhabdoviridae</i>	HaCaT, HT-29, A549	Reduzierte Zytopathie	[88, 108, 146]
HCV	<i>Flaviviridae</i>	Huh-7	Reduktion von HCV-mRNA und HCV-Replikon	[131]
IAV	<i>Orthomyxoviridae</i>	Dendritische Zellen (MD-DCs)	Reduzierte Expression von viralem H3N2	[120]
HBV	<i>Hepadnaviridae</i>	HBV-met Zellen	Reduktion des HBV-DNA-Replikons	[131]

**Tabelle 6: Virusarten, die durch Lambda-Interferone inhibiert werden.**

Da IL-28A und IL-29 die Gentranskription antiviraler Gene hochreguliert, wurde deren Rolle bei intestinaler viraler Infektion anhand eines HCMV-Modells weiter untersucht. HCMV (humanes Cytomegalievirus) ist ein ubiquitär vorkommendes Virus mit einem Durchseuchungstiter von fast 90% in der Bevölkerung. Es stellt eines der Hauptpathogene für Morbidität und Mortalität immunsupprimierter Patienten dar. Die CMV-Colitis tritt auch bei Patienten mit Diabetes mellitus, Niereninsuffizienz und CED auf [77]. Bei AIDS-Patienten ist während einer HCMV-Infektion der Gastrointestinaltrakt häufig betroffen, wobei aber an erster Stelle die Infektion der Retina steht. Im Gastrointestinaltrakt äußert sich eine HCMV-Infektion häufig mit Schleimhauterosionen, Gewebnekrosen, starken lokalen Entzündungsreaktionen und Ulzerationen, die zur Perforation führen können. HCMV-Viren infizieren ein breites Spektrum an gastrointestinalen Zellen, z.B. Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und Fibroblasten, häufig auch intestinale Epithelzellen der Schleimhaut [24, 77]. Klinisch kommt es bei den Patienten zu blutigen Diarrhöen, bioptisch werden intranukleare Einschlusskörperchen (sog. Eulenaugenzellen) gefunden.



In unserer Arbeit inhibierten IL-28A und IL-29 die HCMV-Infektionsrate in intestinalen Epithelzellen, wobei der antivirale Effekt für IL-29 etwas ausgeprägter war. Diese Ergebnisse bestätigen die antiviralen Eigenschaften der Lambda-Interferone auch im Gastrointestinaltrakt. Darüber hinaus war in einem MCMV-Mausmodell *in vivo* bei akuter MCMV-Infektion die IL-28A-mRNA im Intestinum hochreguliert. Dies deutet auf eine wichtige Rolle von IL-28A bei der CMV-Infektion *in vivo* hin. Damit wurde erstmals gezeigt, dass Lambda-Interferone auch durch DNS-Viren induziert werden. Bislang wurde nur eine Induktion durch RNS-Viren in diversen Zelltypen beschrieben (siehe Tabelle 6).

In nur zwei Studien konnte eine antivirale Wirkung der Lambda-Interferone *in vivo* nachgewiesen werden [12, 131]. Inwieweit eine antivirale Funktion von IL-28A und IL-29 auf die intestinale CMV-Infektion *in vivo* ausübt, muss noch genauer untersucht werden. Die Hochregulation bei akuter CMV-Infektion und die *in vitro*-Ergebnisse dieser Arbeit bzgl. HCMV-Infektionsinhibierung legen dies aber nahe.

Dennoch ist der genaue Mechanismus der antiviralen Aktivität der Lambda-Interferone bislang unklar. In diversen Studien wurde die antivirale Aktivität der Lambda-Interferone über die Hochregulation antiviraler Proteine in der Zelle erklärt [43, 88, 108, 146]. Es muss jedoch auch eine immunstimulatorische/regulatorische Wirkung diskutiert werden. Beispielsweise führte IL-29 in dendritischen Zellen zur Hochregulation des Th-1-Zytokins IL-12 [63]. Außerdem werden Monozyten und Makrophagen von IL-29 aktiviert. Nachfolgend wurde dadurch die Produktion von IL-6, IL-8 und IL-10 induziert [84]. Somit könnte IL-29 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der angeborenen unspezifischen Immunantwort spielen. Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen unserer Arbeit, da wir zeigen konnten, dass IL-28A und IL-29 in intestinalen Zellen IL-8 hochreguliert, welches als chemotaktisches Zytokin Immunzellen zu Stellen der Entzündung leitet.

### **6.2.3 IL-28A- und IL-29-vermittelte antiproliferative Effekte im Gastrointestinaltrakt**

Zusätzlich zu den antiviralen Eigenschaften haben IL-28A und IL-29 in intestinalen Epithelzellen in dieser Arbeit auch antiproliferative Effekte gezeigt. Mit steigenden Konzentrationen von IL-28A und IL-29 waren die Proliferationsraten der intestinalen Tumorepithelzelllinien HT-29 und HCT116 erniedrigt. Ähnliche antiproliferative Effekte wurden für diverse Typ-I-Interferone beschrieben [124], wodurch wiederum die evolutionäre und funktionelle Verwandtschaft von IL-28A/29 und Typ-I-Interferonen deutlich wird. Auch in anderen Zellsystemen wurden antiproliferativen Eigenschaften von IL-28A und IL-29 dokumentiert. Dazu gehören unter anderem die T-Zelllymphomzelllinie BW5147. Kürzlich wurde gezeigt,

dass die Stimulation mit Lambda-Interferonen die Proliferation von IL-28R1-transfizierten BW5147-Zellen signifikant verringert. Außerdem wurde der wahrscheinliche Mechanismus für die antiproliferative Wirkung gefunden. Hierfür wurden die Tyrosinreste Tyr 343, Tyr 406 und Tyr 517 selektiv genetisch verändert. Durch Mutation von Tyr 343 und Tyr 517 waren die antiproliferativen Effekte der Lambda-Interferone komplett verschwunden, ebenso der zuvor nachgewiesene antivirale Effekt gegen das Mengovirus [43]. Diese Signale scheinen mit der Aktivierung von STAT2 zu korrelieren, was darauf hinweist, dass dieser Transkriptionsfaktor für die antiviralen und antiproliferativen Effekte verantwortlich ist. Dies wurde bereits für Typ-I-Interferone in STAT2-defizienten Mäusen gezeigt. Dabei konnten Typ-I-Interferone keine antiviralen Effekte mehr vermitteln [122].

In weiteren Studien führte die lokale Überexpression von Lambda-Interferonen zur Hemmung des subkutanen und metastatischen Tumorwachstums. Die hydrodynamische Injektion von Lambda-Interferon-cDNA in Lebermetastasenfoci von Colon-26-Zellen erhöhte die Anzahl natürlicher Killerzellen, welche eine immunologische Tumorzerstörung bewirken [139]. Diese Art der lokalen Immuntherapie weist aber dennoch klinische Limitationen auf: Aufgrund des benötigten Injektionsvolumens und der hohen Injektionsgeschwindigkeit kam es bei Versuchstieren oft zu Herzversagen. Dennoch wurde in dieser Studie beobachtet, dass von den Mäusen, die mit Lambda-Interferon-cDNA behandelt wurden, innerhalb von 24 h nur 13% verstarben, im Vergleich zu 57%, die IFN- $\alpha$ -cDNA erhielten. Diese Daten deuten auf eine geringere Toxizität und somit besserer Verträglichkeit von Lambda-Interferonen hin. In einer weiteren Studie wurden murine B16-Zellen, die mit dem Maus-Ortholog von IL-28A transfiziert wurden, in immunkompetente C57BL/6 Mäuse injiziert. Diese Zellen wurden entweder abgestoßen oder sind im Vergleich zur Injektion von nativen B16-Zellen nur sehr langsam gewachsen [96]. Ebenso inhibierten die mit IL-28A transfizierten Zellen bei gleichzeitiger Injektion mit nativen B16-Zellen deren Wachstum. Diese *in vivo*-Daten unterstreichen ein mögliches Potential der Lambda-Interferone in der Tumorthherapie. Basierend auf diesen Ergebnissen sollten die Lambda-Interferone hierfür weiter evaluiert werden.

Eine Erklärung für die antiproliferativen und antitumorösen Eigenschaften der Lambda-Interferone könnte in der Inhibierung der Tumorangio-genese liegen, da Typ-I-Interferone die Menge an Angiogenesefaktoren in vielen Tumorzellen reduzieren, wie beispielsweise den *basic fibroblast*-Wachstumsfaktor, welcher die Tumorbildung inhibiert [54, 147]. Bislang fehlen jedoch Daten zur Bedeutung der Lambda-Interferone bei Angiogenese. Histologische Untersuchungen der oben erwähnten IL-28A-transfizierten B16-Zellen zeigten jedoch große

Areale mit Tumornekrose und reduzierter Vaskularisierung, was auf antiangiogene Effekte der Lambda-Interferone hinweisen könnte.

Andere Daten weisen auf eine durch Lambda-Interferone verstärkte Apoptose hin, die für die antiproliferativen Effekte ursächlich sein könnten. Versuche in Bon1-Zellen zeigten, dass nach Inkubation mit Lambda-Interferonen sowohl die Caspasen 3/7-, als auch die PARP-Aktivität – welche wichtig für Apoptose sind – hochreguliert waren [174]. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit waren jedoch keine erhöhten Apoptoseraten in humanen Kolonkarzinomzelllinien nach Inkubation mit IL-28A und IL-29 nachweisbar, was auf unterschiedliche biologische Eigenschaften in verschiedenen Geweben hinweisen könnte. In einer weiteren aktuellen Studie wurde belegt, dass die Transfektion von Lambda-Interferon-cDNA in die murine Melanomzelllinie B16 die Expression von MHC Klasse-I und das Zelloberflächenprotein Fas CD95, welches Apoptose induziert, erhöht waren [139]. Zudem führte die Überexpression von Lambda-Interferonen durch Induktion von p21/waf1/cip1 und dephosphoryliertem Rb in diesen Zellen zu einer verminderten Zellproliferation *in vitro* und resultierte in einer erhöhten Caspase 3/7-Aktivität. Dies weist auf eine Apoptoseinduktion zusammen mit Zellzyklusarrest *in vitro* hin. Dennoch scheinen die Mechanismen der Antitumor-Aktivität der Lambda-Interferone andere zu sein als die von Typ-I-Interferonen. In der Studie von Lasfar et al. [96] sprachen primäre Lymphozyten und Makrophagen, die eine wichtige Rolle in der antitumorösen Abwehr spielen, nicht auf Lambda-Interferone an. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Immunzellen nicht das Hauptziel von Lambda-Interferonen sind. Hingegen reagieren fast alle Zellarten auf Typ-I-Interferone. Weitere Untersuchungen müssen hierüber Aufschluss bringen.

## 7 Klinische Bedeutung und Ausblick

### 7.1 IL-22 bei der Therapie von CED

Die Inhibition proinflammatorischer Zytokine, z.B. in Form von monoklonalen Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  (Infliximab, Adalimumab, Certolizumab) oder gegen IL-1R (Anakinra), wird derzeit bei der Therapie von chronisch entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und auch M. Crohn eingesetzt. Vor allem bei schweren Schüben des M. Crohn und bei therapierefraktären Fisteln stellen diese Substanzen, bei unzureichender Wirksamkeit der Standardmedikation, potente Reservemittel dar. Auch bei Colitis ulcerosa sind erste positive Daten über eine TNF- $\alpha$ -Antikörpertherapie bekannt [119, 137]. Ebenso wurde in verschiedenen Studien die Wirksamkeit dieser Medikamente bei extraintestinalen Manifestationen von CED wie Pyoderma gangraenosum, Uveitis, Episcleritis und Arthropathien beschrieben [50, 103].

Trotz hoher Wirksamkeit steht dem eine Fülle an unerwünschten Nebenwirkungen gegenüber. Diese umfassen Störungen der körpereigenen zellulären Immunabwehr mit der Gefahr der Exazerbation opportunistischer Infektionen, insbesondere der Tuberkulose. Außerdem werden unter TNF- $\alpha$ -Antikörpertherapie vermehrt Autoantikörper (sog. ATI, auch antichimäre Antikörper genannt) gebildet, die zum einen anaphylaktische Reaktionen (Infusionsreaktionen) bei erneuter Exposition auslösen, und zum anderen möglicherweise die Entstehung von Autoimmunerkrankungen fördern können. Ein weiteres Problem bei der TNF- $\alpha$ -Antikörpertherapie ist der Wirkverlust, der womöglich aufgrund der ATI-Bildung, des schnellen Auswaschens des Medikaments ohne Einfluss der Immunogenität oder aber durch den Anstieg anderer proinflammatorischer Moleküle zu erklären ist. In der ACCENT 1/3-Studie zeigten 30-50% der Patienten, die alle acht Wochen mit Infliximab behandelt wurden, nach ca. einem Jahr ein fehlendes bzw. vermindertes Ansprechen auf die Therapie [72]. Eine Erhöhung der Dosis sowie die Verkürzung der Applikationsabstände scheinen diesem Problem entgegenzuwirken.

In unserer Arbeit wurden proinflammatorische Eigenschaften von IL-22 in intestinalen Zellsystemen *in vitro* gezeigt und IL-22-mRNA vermehrt in entzündeten Läsionen von M. Crohn-Patienten nachgewiesen. Zusammen mit den Daten anderer Arbeiten, z.B. bezüglich der proinflammatorischen Rolle von IL-22 bei Psoriasis [16] und ARDS [166], macht dies den Einsatz von IL-22-Inhibitoren zu einer möglichen Behandlungsalternative bei M. Crohn. Zudem wird der IL-22-spezifische Rezeptor IL-22R1 nicht von menschlichen Immunzellen wie T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Monozyten exprimiert [123, 169], was ein günstiges Nebenwirkungsprofil von IL-22R-Antikörpern zur Folge haben könnte.

Andererseits wurden in der vorliegenden Arbeit für IL-22 in intestinalen Epithelzellen *in vitro* auch Barriere-schützende Eigenschaften durch SOCS-Aktivierung,  $\beta$ -Defensin-2-Hochregulation und erhöhte Zellmigration gefunden. Dies könnte auf protektive Eigenschaften dieses Zytokins bei der postentzündlichen Wundheilung hinweisen.

In einer bislang nur als *abstract* veröffentlichten Studie wurde beschrieben, dass die Heilung der DSS-induzierten Colitis bei Mäusen durch die Gabe von anti-IL-22-Antikörpern im Vergleich zur Kontrollgruppe verzögert ablief [152]. Zudem wurde gezeigt, dass die Genüberexpression von IL-22 in der *Lamina propria* des Kolons von T-Zell-Rezeptor-*Knockout*-Mäusen zu einer starken Suppression der Colitis führte, was auf protektive Eigenschaften von IL-22 im Intestinum schließen lässt. Ein weiterer Hinweis auf antiinflammatorische Eigenschaften von IL-22 im Gastrointestinaltrakt wird in einer aktuellen Arbeit von Wolk et al. gegeben, in der eine Induktion des LPS-Bindeproteins durch IL-22 gezeigt wurde. Interessanterweise war das LPS-Bindeprotein zusammen mit IL-22 im peripheren Blut von M. Crohn-Patienten und auch im Maus-Colitismodell hochreguliert [170].

In einer weiteren Studie wurde die Induktion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch IL-22 in intestinalen Epithelzellen nachgewiesen [114]. Die immunregulatorische Aktivität von IL-10 basiert zum einen auf der Inhibierung der Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie der Th2-Zell-abhängigen Zytokine IL-4 und IL-5 [149], zum anderen auf der Inhibierung der Antigenpräsentation. IL-10 hemmt außerdem bestimmte inflammatorische Chemokine wie z.B. MIP- $\alpha$ , RANTES, IL-8 und Eotaxin sowie die Expression inflammatorischer Enzyme wie z.B. iNOS (*inducible nitric oxid synthetase*) und COX-2 in Makrophagen [26, 47]. Es wurden auch immunstimulatorische Eigenschaften von IL-10 beschrieben, wie beispielsweise die Hochregulation von MHC Klasse-II-Proteinen auf B-Lymphozyten und die Induktion zytotoxischer T-Zelldifferenzierung. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde IL-10, welches eine 24,7%ige AS-Homologie zu IL-22 aufweist, bereits in diversen Studien an Patienten mit CED getestet. In Maus-Colitismodellen waren die ersten Ergebnisse sehr erfolgversprechend. Ebenso zeigten frühe klinische Studien bei unbehandelten und auch steroidrefraktären M. Crohn-Patienten ein großes therapeutisches Potential von IL-10. In einer der ersten Doppelblindstudien wurde die Sicherheit und Toleranz von rekombinanten IL-10 (Tenovil) bei M. Crohn-Patienten untersucht [28]. In der 12-wöchigen Behandlungszeit war Tenovil sicher und wurde gut toleriert. Leider wurden in den darauffolgenden größeren Studien [51, 142, 158] geringe bzw. keine signifikanten Unterschiede zwischen Placebo- und IL-10-behandelten Patienten gefunden. Eine Steigerung der

IL-10-Dosis erbrachte keine Besserung der Ergebnisse. Auf eine mögliche Ursache hierfür weist eine weitere Studie hin: Bei M. Crohn-Patienten, denen hohe systemische IL-10-Dosen verabreicht wurden, war die (von Neopterin und Phytohämagglutinin) induzierte Serumkonzentration von IFN- $\gamma$  erhöht [158]. Die geringen Ansprechraten könnten auch mit der Pharmakokinetik von IL-10 zu erklären sein. Die Serumhalbwertszeit von IL-10 liegt bei 1,1 bis 2,6 h. Aufgrund dieser Instabilität von IL-10 im Organismus ist es möglicherweise schon eliminiert, ehe es den Wirkort erreicht hat. Um das Problem der systemischen Instabilität und der geringen lokalen Konzentration zu umgehen, wurden einige neue Methoden in Bezug auf die Applikation von IL-10 geprüft. Eine probate Methode, um IL-10, das normalerweise durch die Magensäure zerstört würde, auch oral verfügbar zu machen, ist die Verabreichung von genetisch veränderten IL-10-produzierenden Bakterien, wie z.B. *Lactococcus lactis*. Im Mausmodell, und mittlerweile auch in einer Studie am Patienten, sind erste erfolgversprechende Ergebnisse erzielt worden [18, 151]. Eine weitere Methode ist die Applikation von IL-10-enthaltenden Gelatinemikrosphären, die, rektal eingeführt, zumindest bei Mäusen zu einer signifikanten Besserung der Colitis führten [115]. All diese Ergebnisse zeigen das mögliche therapeutische Potential von IL-10, aber auch die Schwierigkeiten auf, die für eine effektive Zytokintherapie von CED überwunden werden müssen.

Zusammengefasst ist zum jetzigen Zeitpunkt auf der Basis unserer Arbeit und der Ergebnisse anderer Forschergruppen nicht vollständig geklärt, ob IL-22, speziell bei CED, *in vivo* eher IL-10-ähnliche antiinflammatorische oder aber proinflammatorische Eigenschaften hat. Es ist jedoch aufgrund der vorliegenden Daten wahrscheinlich, dass IL-22 Barriere-protektiv wirkt und vor allem beim M. Crohn, und weniger bei der Colitis ulcerosa, eine Rolle spielt. Weitere *in vivo*-Versuche müssen Aufschluss über das Potential von IL-22 bzw. IL-22-Antikörpern bei der Behandlung von CED bringen.

## 7.2 IL-28A und IL-29 bei der antiviralen Therapie

Bei der Behandlung viraler Infektionen steht dem Kliniker heutzutage eine Fülle von potenten Wirksubstanzen zur Verfügung. Darunter finden sich Virostatika, die über verschiedene Wirkmechanismen verfügen. Diese sind unter anderen Hemmstoffe der viralen DNS-Polymerase (z.B. Aciclovir), Neuraminidaseinhibitoren (z.B. Oseltamivir), *uncoating*-Hemmer, die die Freisetzung der fertigen viralen Nukleinsäure in die Wirtszelle verhindern (z.B. Amantadin), Nukleosidanaloga, die intrazellulär zu aktiven Metaboliten phosphoryliert werden und zu einer kompetitiven Hemmung der viralen reversen Transkriptase führen (z.B. Zidovudin), und speziell bei der HIV-Infektion Protease-Inhibitoren, die die Prozessierung der während der viralen Replikation entstandenen Polypeptide unterbinden (z.B. Ritonavir).

Die HCMV-Infektion stellt ein häufiges Problem v.a. bei frisch transplantierten, aber auch anderweitig immunsupprimierten Patienten dar. Zur Behandlung werden die Virostatika Ganciclovir (Cymeven) und Valganciclovir (Valcyte), als Reservetherapeutika Foscarnet (Foscavir) und Cidofovir (Vistide) eingesetzt, die über eine Hemmung der viralen DNA-Polymerase ihre Wirkung entfalten. Dennoch ist der Einsatz dieser Medikamente mit einer Vielzahl von schweren Nebenwirkungen wie Leukopenie, Thrombozytopenie und Nierenfunktionsstörungen verbunden. Außerdem sind natürliche Resistenzen, z.B. bei der Behandlung mit Ganciclovir, ein Problem [83]. Versuchsweise wurden auch Typ-I-Interferone zur CMV-Infektionsbehandlung bei Mäusen mit Erfolg erprobt [17]. Interferone werden bereits seit längerem zur Therapie bestimmter viraler Erkrankungen herangezogen. Sie wirken im Gegensatz zu anderen antiviralen Medikamenten wie z.B. Virostatika wahrscheinlich nicht direkt auf die Viren, sondern induzieren im Wirtszellinneren eine spezifische antivirale und immunmodulatorische Reaktion.

Eines der am häufigsten in der Klinik eingesetzten Interferone ist das Interferon- $\alpha 2$ , das rekombinant, neuerdings auch pegyliert, mit anderen antiviralen Therapeutika (z.B. Peg-Interferon- $\alpha 2$ +Ribavirin) vor allem zur Behandlung bei chronischer Hepatitis B und C eingesetzt wird. Ebenso wird es wegen seiner antiproliferativen und immunmodulatorischen Effekte allein oder auch in Kombination mit anderen etablierten Medikamenten als sog. *biological* bei Haarzelleukämie, chronisch myeloische Leukämie (CML), gastrointestinalen Stromatumoren (GIST), neuroendokrinen Tumoren (NET), kutanen T-Zell-Lymphomen und Kaposisarkom verwendet [21].

Bei der Behandlung mit Interferonen sind schwere Nebenwirkungen wie Leukopenie, Thrombozytopenie, grippeähnliche Symptome, Haarausfall, Autoimmunreaktionen, Leberfunktionsstörungen und Depression beobachtet worden. Die neuen Lambda-Interferone IL-

28A und IL-29 haben in unseren Untersuchungen und anderen Arbeiten [20, 88, 108, 131, 146] potente und den Typ-I-Interferonen ähnliche antivirale Eigenschaften *in vitro* gezeigt, was sie zu möglichen neuen Kandidaten für antivirale Therapeutika macht. Ein entscheidender Vorteil der Lambda-Interferone könnte sein, dass der Lambda-Interferon-spezifische Rezeptor IL-28R1/IFN- $\lambda$ R1 auf bestimmten hämatopoetischen Stammzellen nicht exprimiert wird. Unter Therapie könnte dies, im Vergleich zu Typ-I-Interferonen, zu einem günstigeren Nebenwirkungsprofil führen. Derzeit wird IL-29 in pegylierter Form bereits in einer Phase 1-Studie durch die Firma Zymogenetics Inc., Seattle, USA, für die Therapie der chronischen Hepatitis C getestet.

Eine weitere wichtige Frage ist, ob Viren in der Lage sind auch Resistenzen gegenüber Lambda-Interferone zu entwickeln, wie sie für Typ-I-Interferone bereits beschrieben wurden [86]. So ist beispielsweise bekannt, dass einige Viren ISGF3 antagonisieren können. Dies hätte ebenso Auswirkungen auf die Signaltransduktion und somit die Wirkung der Lambda-Interferone [25]. Speziell bei der aktuellen Standardbehandlung der chronischen Hepatitis C mit Interferon- $\alpha$ 2 plus Ribavirin können nur ca. 20% der Patienten mit Genotyp 2 und 3 und ca. 50% der Patienten mit Genotyp 1 das Virus eliminieren [106]. Die Ursachen der IFN-Resistenzentwicklung scheinen multifaktoriell zu sein, die genauen Mechanismen sind bislang noch unklar. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich in zwei Publikationen zeigen [20, 161], dass eine SOCS-Überexpression in hepatischen Zellen zu einer Hemmung sowohl der durch IFN- $\alpha$ - als auch durch IFN- $\lambda$ -induzierten antiviralen Proteine 2',5'-OAS und MxA führt. Dies könnte ein entscheidender Mechanismus bei der Resistenzentwicklung von virusinfizierten Zellen sein und eine Limitation des Einsatzes von Lambda-Interferonen bei der antiviralen Therapie nach sich ziehen. Weitere *in vivo*-Untersuchungen sind notwendig, um die Effizienz und das Nebenwirkungsprofil der therapeutischen Anwendung der Lambda-Interferone bei viralen Infektionen zu ergründen.

### **7.3 IL-28A und IL-29 bei der antiproliferativen Tumorthherapie**

Ziel einer Tumorthherapie ist es, die Tumorzellzahl zu reduzieren und im besten Fall die Tumorzellen vollständig zu eliminieren. Tumorzellen unterscheiden sich von normalen Körperzellen vor allem durch ungehemmtes Wachstum. Daher ist die Therapie der Wahl bei tumorösen Erkrankungen die Behandlung mit Wachstumshemmern. Dazu zählen die Zytostatika, die relativ unselektiv das Zellwachstum hemmen. Diese Chemotherapie ist mit unerwünschten Wirkungen auf die sich ebenfalls schnell teilenden Körperzellen wie Knochenmarkszellen, Schleimhautzellen des Gastrointestinaltrakts, Haarwurzelzellen und



Keimdrüsen verbunden. Bisher werden je nach Tumorart verschiedene Wirkstoffklassen von Zytostatika eingesetzt, beispielsweise Alkylantien wie Cyclophosphamid (z.B. Endoxan) bei der Behandlung von Leukämien, Antimetabolite wie 5-Fluoruracil (z.B. Fluroblastin) bei der Behandlung von gastrointestinalen Tumoren oder spezielle Antibiotika wie Doxorubicin (z.B. Adriablastin) zur Behandlung des M. Hodgkin. Ergänzt werden diese „klassischen“ Zytostatika von einer immer größer werdenden Zahl neuer Medikamente wie Pflanzenalkaloide (z.B. Vincristin), DNA-Topoisomeraseinhibitoren (z.B. Irinotecan), Enzyme (z.B. L-Asparaginase), Antikörper (z.B. Bevacizumab) und Interferone (z.B. Interferon- $\alpha$ ). Interferon- $\alpha 2$  ist derzeit für die Behandlung von Haarzelleukämie, CML, kutanes T-Zell-Lymphom und Kaposisarkom zugelassen. Es wird angenommen, dass seine Wirkungen auf antiproliferative und immunmodulatorische Eigenschaften zurückzuführen sind. Auch bei anderen soliden Tumorarten wie z.B. beim malignen Melanom wird IFN- $\alpha 2$ , auch in Kombination mit Interleukinen im Rahmen von Studien getestet. Die Therapie mit Interferon- $\alpha$  und IL-2 als Einzel- oder Kombinationstherapie ist hier in der Lage, eine kurzzeitige Remission zu bewirken [100, 135]. Neuere klinische Studien mit einer niedrig dosierten Interferon- $\alpha$ -Therapie zeigten für Patienten mit einem Melanom im Stadium II eine gute Verträglichkeit und auch eine deutlich verlängerte 5-Jahres-Überlebenszeit [65]. Interferon- $\alpha$  bewirkt als adjuvante Therapie sowohl die Verzögerung eines Rezidivs als auch die Verlängerung der krankheitsfreien Zeitintervalle. Beim metastasiertem Melanom kann es bei Verabreichung in Kombination mit einer Chemotherapie die Ansprechraten verbessern. Im Rahmen dieser sog. „Chemoimmuntherapie“ oder „Biochemotherapie“, welche die Kombination von Zytostatika und IFN- $\alpha$  oder IL-2 beinhaltet, können höhere Ansprechraten als bei alleiniger Chemo- oder Immuntherapie erzielt werden [65]. Dennoch werden bei der Behandlung mit Interferon- $\alpha$  die gleichen Nebenwirkungen beobachtet, wie sie schon oben beschrieben wurden. Da in unserer Arbeit gezeigt wurde, dass IL-28A und IL-29 antiproliferativ auf die beiden kolorektalen Tumorzelllinien HT-29 und HCT116 wirken, könnten diese Substanzen ähnlich gute antitumoröse Effekte *in vivo* zeigen und eine Alternative zu Interferon- $\alpha$  darstellen. Auch in anderen Zellsystemen wurden für Lambda-Interferone antiproliferative und antitumoröse Eigenschaften beschrieben, unter anderem in murinen B16 Melanom-Zellen [139], Colon-26-Zellen [139], neuroendokrinen BON1-Zellen [174] und BW5147 Lymphom-Zellen [43]. Zur Verifizierung dieser überwiegend *in vitro* gewonnenen Daten sind weitere *in vivo* Experimente notwendig, um das Potential der Lambda-Interferone in der Tumorthherapie zu detektieren.

## 8 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der IL-10-verwandten Zytokine IL-22, IL-28A und IL-29 in intestinalen Zellen untersucht. Obwohl IL-22, IL-28A und IL-29 strukturelle Ähnlichkeiten besitzen und über die gemeinsame Rezeptoreinheit IL-10R2 die Signale in die Zelle leiten, deuten die Daten dieser und auch anderer Arbeiten darauf hin, dass diese Zytokine *in vivo* sehr unterschiedliche biologische Funktion haben.

In den Experimenten unserer Arbeit wurde gezeigt, dass der IL-22-spezifische Rezeptorkomplex in intestinalen Epithelzellen exprimiert ist und die Bindung von IL-22 an den Rezeptorkomplex zur Hochregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF- $\alpha$  führt. In Kolonbiopsien von CED-Patienten war IL-22-mRNA nachweisbar, bei M. Crohn-Patienten in entzündeten Bereichen sogar deutlich erhöht. Ebenso war IL-22-mRNA zusammen mit proinflammatorischen Genen im Maus-Colitismodell hochreguliert. IL-22 hatte signifikant proliferative und migrationsfördernde Effekte auf intestinale Epithelzellen. Somit spielt IL-22 eine bedeutende Rolle bei inflammatorischen Prozessen und besitzt Barriere-protective Eigenschaften.

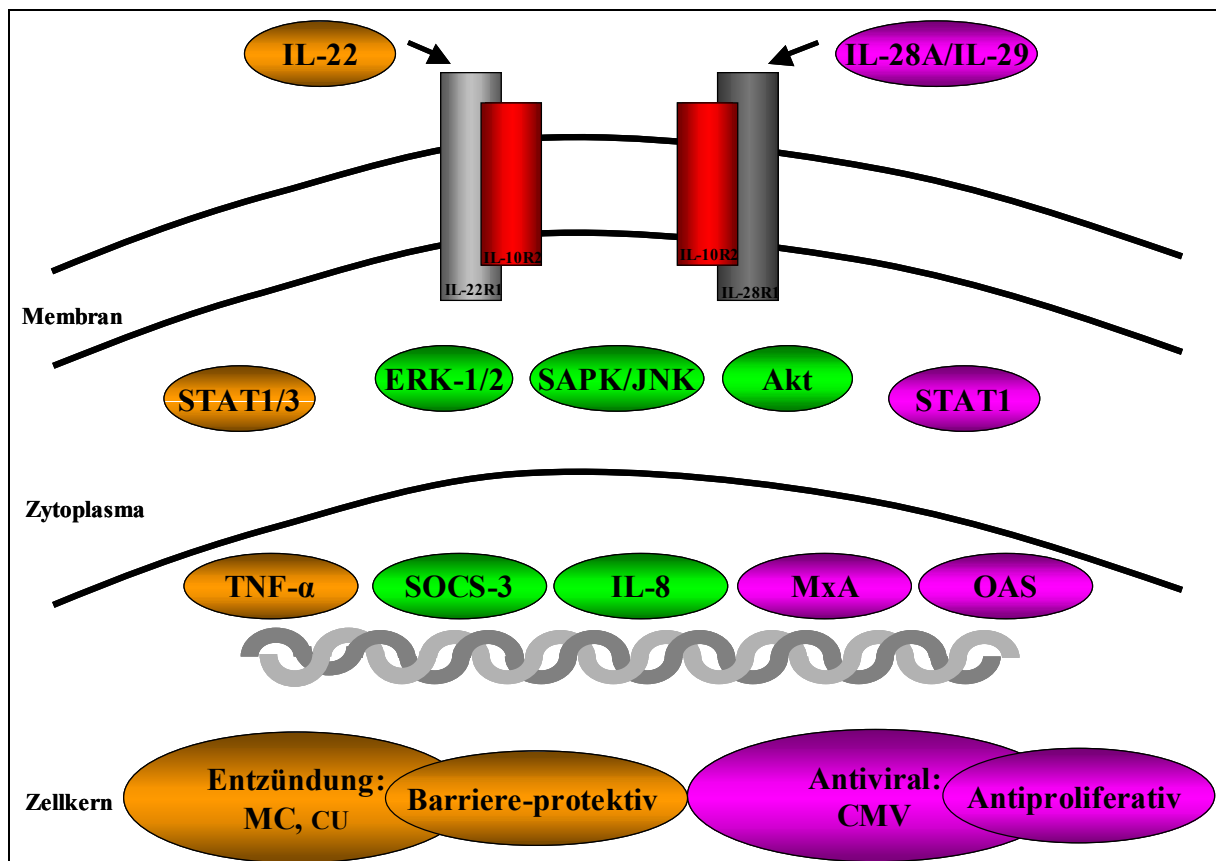
Die Bindung von IL-28A und IL-29 an den funktionellen Rezeptorkomplex führte zu einer Hochregulation der antiviralen Gene 2',5'-OAS und MxA und zu einer signifikanten Reduktion der Infektion intestinaler Epithelzellen mit humanen Cytomegalieviren. Außerdem wurde im Mausmodell erstmals gezeigt, dass IL-28A bei viraler Infektion *in vivo* hochreguliert ist. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe (bislang unveröffentlichte Daten) ergaben, dass IL-28A und IL-29 eine Replikationsreduktion von Hepatitis C-Genomtransfizierten Huh-7-Hepatomzellen bewirkte. Dieser Effekt war ähnlich stark wie für IFN- $\alpha$ . Sowohl IL-28A als auch IL-29 verringerten signifikant die Proliferationsrate von colorektalen Tumorepithelzellen. IL-28A und IL-29 weisen somit antivirale und antiproliferative Eigenschaften vergleichbar denen von Typ-I-Interferonen auf.

Es konnten auch einige Gemeinsamkeiten z.B. im Bereich der Signaltransduktion beobachtet werden. Über die gemeinsame Rezeptoreinheit IL-10R2 wurden sowohl von IL-22 als auch von IL-28A und IL-29 STAT3, die MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und Akt aktiviert, nicht aber p38. STAT1 hingegen wurde nur von IL-22 aktiviert.

Derzeit befindet sich bereits ein IL-22R-Antikörper in präklinischen Tests zur Therapie der Psoriasis vulgaris. Bevor allerdings IL-22 bzw. IL-22-Antikörper bei chronisch entzündlichen Erkrankungen klinisch eingesetzt werden können, müssen noch weitere *in vitro*- und *in vivo*-Studien durchgeführt werden.

Für IL-28A und IL-29 scheint die antivirale Wirkung durch mehrere Studien hinreichend bewiesen, so dass pegyliertes IL-29 bereits in einer Phase I-Studie zur Behandlung der chronischen Hepatitis C evaluiert wird. Allerdings bleibt die Effektivität und das Nebenwirkungsprofil abzuwarten.

In Abbildung 38 sind die von uns erhobenen Daten zur Bedeutung der IL-10-verwandten Zytokine IL-22, IL-28A und IL-29 bei der Siganltransduktion und den daraus resultierenden Funktionen in intestinalen Zellen noch einmal dargestellt.



**Abbildung 38: IL-22- und IL-28A/IL-29-vermittelte Signale und Funktionen in intestinalen Zellen.**  
(Farbkodierung: Orange: IL-22-vermittelt. Grün: IL-22- und IL-28A/IL-29-vermittelt. Lila: IL-28A/IL-29-vermittelt.)

## 9 Abkürzungen und Begriffe

$\infty$	unendlich
%	Prozent
°C	Grad Celsius
$\alpha$ -	anti-
$\mu$	Mikro- ( $10^{-6}$ )
$\gamma^{32}\text{P}$	radioaktiv markierter Phosphor
A	Ampère
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
hBD-2	humanes $\beta$ -defensin-2
bp	Basenpaar(e)
BP	Bindeprotein
bzw.	beziehungsweise
BSA	bovines Serumalbumin
$\text{CaCl}_2$	Kalziumchlorid
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>copy</i> Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
CTP	Cytosintriphosphat
cy-3	Carbocyanin-3
d	Desoxy-
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Dextransodiumsulfat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
ERK-1/2	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase-1/2</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	doppelt destilliertes Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin

JAK	Janus Assoziierte Kinase
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LiCl	Lithiumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar (mol/l)
m	Milli- (10 <sup>-3</sup> )
MAP	Mitogen Aktiviertes Protein
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal to regulated kinase</i>
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
m.o.i.	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure

MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
Na <sub>2</sub> EDTA	Dinatriumethyldiamintetraacetat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaVO <sub>3</sub>	Natriumorthovanadat
NF-κB	<i>Nuclearfactor-κB</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NP-40	Nonidet-P40
OAS	Oligo-Adenylat-Synthetase
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pfu	<i>plaque forming unit(s)</i>
pH	potentia Hydrogenii
PI	Proteaseinhibitor
PI-3	Phosphoinositol 3-Kinase
PKR	<i>dsRNA-Activated Serine/Threonine Protein Kinase</i>

PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulphonylfluoride
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion
SAPK/JNK	<i>Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun-NH2-Terminal Kinase</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sec	Sekunde(n)
Ser	Serin
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
Thr	Threonin
TMB	3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Thymidintriphosphat
Tyk	Tyrosin-Kinase
Tyr	Tyrosin
U	<i>Unit</i> (enzymatische Aktivitätseinheit)



---

V	Volt
vs.	versus
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen x-fach bzw. -mal
x	-fach, -mal

## 10 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

**Tabelle 1:** Klasse-II-Zytokine.

**Tabelle 2:** Klasse-II-Zytokin-Rezeptoren.

**Tabelle 3:** Verwendete Zelllinien.

**Tabelle 4:** Verwendete Cytomegalie-Virenstämme.

**Tabelle 5:** IL-22- und IL-8-mRNA-Expression in entzündeten und nicht-entzündeten Gewebe von Patienten mit aktivem M. Crohn bzw. Colitis ulcerosa.

**Tabelle 6:** Virusarten, die durch Lambda-Interferone inhibiert werden.

**Abbildung 1:** Die Kristallstruktur von IL-10 (Monomer).

**Abbildung 2:** Der IL-10R2-Rezeptor als gemeinsamer Bestandteil des Rezeptorkomplexes für IL-10, IL-22, IL-26 und IFN- $\lambda$ s (IL-28A/B und IL-29).

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung von Signaltransduktionswegen, die durch Klasse-II-Zytokine aktiviert werden.

**Abbildung 4:** Schematische Darstellung von Signaltransduktionswegen, die durch Interferone aktiviert werden.

**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Wundheilungsversuche.

**Abbildung 6:** Expression von IL-10R2- und IL-22R1-mRNA in den intestinalen Epithelzelllinien Caco-2, DLD-1, SW480, HCT116 und HT-29 .

**Abbildung 7:** Hochregulation der IL-22-spezifischen Rezeptoruntereinheit IL-22R1 nach Stimulation von HT-29-Zellen mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie LPS.

**Abbildung 8:** Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt durch Phosphorylierung nach IL-22-Stimulation.

**Abbildung 9:** Reduktion der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach Präinkubation von HT-29-Zellen mit spezifischen Inhibitoren.

**Abbildung 10:** Aktivierung von STAT1 und STAT3 durch IL-22.

**Abbildung 11:** Hochregulation der IL-8- und TNF- $\alpha$ -mRNA-Expression durch IL-22.

**Abbildung 12:** Hochregulation der SOCS-3-mRNA-Expression durch IL-22.

**Abbildung 13:** Hochregulation der  $\beta$ -Defensin-2-mRNA-Expression durch IL-22.

**Abbildung 14:** Hochregulation von IL-22-mRNA bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen.

**Abbildung 15:** A: Endoskopisches Bild der Ileocoecalklappe des Patienten mit der höchsten IL-22- und IL-8-mRNA-Expression. B: Histopathologische Analyse einer Biopsie aus der entzündeten Läsion. C: MRT-Sellink des Patienten.

**Abbildung 16:** Hochregulation von IL-22-mRNA im DSS-Colitismodell der Maus.

**Abbildung 17:** Verstärkte Migration durch IL-22 ist PI-3-Kinase-abhängig.

**Abbildung 18:** Effekte von IL-22 auf die Zellproliferation.

**Abbildung 19:** Fehlender Einfluss von IL-22 auf die Fas-Liganden-induzierte Apoptose.

**Abbildung 20:** Expression des IFN-Lambda-Rezeptorkomplexes in intestinalen und nicht-intestinalen Epithelzellen.

**Abbildung 21:** IL-10R2- und IL-28R-mRNA-Expression in humanen Kolonbiopsien und IL-28R-mRNA-Expression in murinen Kolongewebe.

**Abbildung 22:** Immunhistochemischer Nachweis von IL-28R1 in der intestinalen Epithelzelllinie HT-29 (grün: membrangebundenes IL-28R1, blau: Zellkern).

**Abbildung 23:** Aktivierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt durch Phosphorylierung nach IL-28A- und IL-29-Stimulation.

**Abbildung 24:** Reduktion der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK-1/2, SAPK/JNK und der PI-3-Kinase Akt nach Präinkubation mit spezifischen Inhibitoren.

**Abbildung 25:** Aktivierung von STAT1 durch IL-28A und IL-29.

**Abbildung 26:** Hochregulation von IL-8-Protein durch IL-28A und IL-29.

**Abbildung 27:** Hochregulation der SOCS-3-mRNA-Expression durch IL-28A und IL-29.

**Abbildung 28:** Hochregulation der MxA- und 2',5'-OAS-mRNA-Expression durch IL-28A und IL-29.

**Abbildung 29:** Reduktion von i.e.-positiven Zellen durch IL-28A und IL-29.

**Abbildung 30:** Immunhistochemie von i.e.-positiven HCT116-Zellen.

**Abbildung 31:** A-C: Immunhistochemie von i.e.-positiven HCT116-Zellen ohne Zytokinpräinkubation. D-F: Immunhistochemie von i.e.-positiven HCT116-Zellen nach 24 h Präinkubation mit 100 ng/ml IL-29.

**Abbildung 32:** Erhöhte IL-28A-mRNA-Expression durch MCMV-Infektion *in vivo*.

**Abbildung 33:** Effekte von IL-28A und IL-29 auf die Zellproliferation.

**Abbildung 34:** Fehlender Einfluss von IL-28A und IL-29 auf die Fas-Liganden-induzierte Apoptose.

**Abbildung 35:** Unterschiedliche Arten der Genregulation extrazellulärer Signalproteine.

**Abbildung 36:** Aktivierung der Mitogen-aktivierten Protein (MAP)-Kinasen durch extrazellulärer Signalproteine.

**Abbildung 37:** Th17-Zellen als Hauptproduzenten von IL-22.

**Abbildung 38:** IL-22- und IL-28A/IL-29-vermittelte Signale und Funktionen in intestinalen Zellen.

## 11 Literaturverzeichnis

1. Agace, W.W., et al., Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol* 2000. 30(3): 819-26.
2. Aggarwal, S., et al., Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 2003. 278(3): 1910-4.
3. Aggarwal, S., et al., Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22. *J Interferon Cytokine Res* 2001. 21(12): 1047-53.
4. Alexander, W.S., Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002. 2(6): 410-6.
5. Andoh, A., et al., Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005. 129(3): 969-84.
6. Aoki, M., et al., A novel single-nucleotide substitution, Leu 467 Pro, in the interferon-gamma receptor 1 gene associated with allergic diseases. *Int J Mol Med* 2003. 12(2): 185-91.
7. Asadullah, K., et al., Interleukin 10 treatment of psoriasis: clinical results of a phase 2 trial. *Arch Dermatol* 1999. 135(2): 187-92.
8. Asadullah, K., et al., Interleukin-10: an important immunoregulatory cytokine with major impact on psoriasis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004. 3(2): 185-92.
9. Asadullah, K., et al., IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach. *J Clin Invest* 1998. 101(4): 783-94.
10. Auernhammer, C.J., C. Bousquet, and S. Melmed, Autoregulation of pituitary corticotroph SOCS-3 expression: characterization of the murine SOCS-3 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. 96(12): 6964-9.
11. Barca, O., et al., Interferon beta promotes survival in primary astrocytes through phosphatidylinositol 3-kinase. *J Neuroimmunol* 2003. 139(1-2): 155-9.
12. Bartlett, N.W., et al., Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model. *J Gen Virol* 2005. 86(Pt 6): 1589-96.
13. Bickston, S.J. and F. Cominelli, Recombinant interleukin 10 for the treatment of active Crohn's disease: lessons in biologic therapy. *Gastroenterology* 2000. 119(6): 1781-3.
14. Bommakanti, R.K., S. Vinayak, and W.F. Simonds, Dual Regulation of Akt/Protein Kinase B by Heterotrimeric G Protein Subunits. *J Biol Chem* 2000.
15. Bonacchi, A., et al., Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem* 2001. 276(13): 9945-54.
16. Boniface, K., et al., IL-22 Inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005. 174(6): 3695-702.
17. Bosio, E., et al., Efficacy of low-dose oral use of type I interferon in cytomegalovirus infections in vivo. *J Interferon Cytokine Res* 1999. 19(8): 869-76.
18. Braat, H., et al., A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006. 4(6): 754-9.

19. Brand, S., et al., CXCR4 and CXCL12 are inversely expressed in colorectal cancer cells and modulate cancer cell migration, invasion and MMP-9 activation. *Exp Cell Res* 2005. 310(1): 117-30.
20. Brand, S., et al., SOCS-1 inhibits expression of the antiviral proteins 2',5'-OAS and MxA induced by the novel interferon-lambdas IL-28A and IL-29. *Biochem Biophys Res Commun* 2005. 331(2): 543-8.
21. Brassard, D.L., M.J. Grace, and R.W. Borden, Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol* 2002. 71(4): 565-81.
22. Breese, E.J., et al., Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994. 106(6): 1455-66.
23. Brivanlou, A.H. and J.E. Darnell, Jr., Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 2002. 295(5556): 813-8.
24. Buckner, F.S. and C. Pomeroy, Cytomegalovirus disease of the gastrointestinal tract in patients without AIDS. *Clin Infect Dis* 1993. 17(4): 644-56.
25. Chee, A.V. and B. Roizman, Herpes simplex virus 1 gene products occlude the interferon signaling pathway at multiple sites. *J Virol* 2004. 78(8): 4185-96.
26. Chung, K.F., et al., Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br J Pharmacol* 1999. 127(5): 1145-50.
27. Coccia, E.M., et al., Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004. 34(3): 796-805.
28. Colombel, J.F., et al., Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of Crohn's disease. *Gut* 2001. 49(1): 42-6.
29. Conti, P., et al., IL-10 subfamily members: IL-19, IL-20, IL-22, IL-24 and IL-26. *Immunol Lett* 2003. 88(3): 171-4.
30. Croker, B.A., et al., SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. *Nat Immunol* 2003. 4(6): 540-5.
31. Darnell, J.E., Jr., STATs and gene regulation. *Science* 1997. 277(5332): 1630-5.
32. Darnell, J.E., Jr., I.M. Kerr, and G.R. Stark, Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 1994. 264(5164): 1415-21.
33. Desloges, N., M. Rahaus, and M.H. Wolff, Role of the protein kinase PKR in the inhibition of varicella-zoster virus replication by beta interferon and gamma interferon. *J Gen Virol* 2005. 86(Pt 1): 1-6.
34. Diebold, S.S., et al., Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 2003. 424(6946): 324-8.
35. D'Isanto, M., et al., Prolactin modulates IL-8 production induced by porins or LPS through different signaling mechanisms. *Immunobiology* 2004. 209(7): 523-33.
36. Donnelly, R.P., et al., The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *J Leukoc Biol* 2004. 76(2): 314-21.
37. Doyle, S.E., et al., Interleukin-29 uses a type 1 interferon-like program to promote antiviral responses in human hepatocytes. *Hepatology* 2006. 44(4): 896-906.
38. Dubinsky, M.C., et al., IL-23 receptor (IL-23R) gene protects against pediatric Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007. 13(5): 511-5.

39. Dudek, H., et al., Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt [see comments]. *Science* 1997. 275(5300): 661-5.
40. Duerr, R.H., et al., A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science* 2006. 314(5804): 1461-3.
41. Dumoutier, L., et al., Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22. *J Immunol* 2001. 166(12): 7090-5.
42. Dumoutier, L., J. Louahed, and J.C. Renauld, Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9. *J Immunol* 2000. 164(4): 1814-9.
43. Dumoutier, L., et al., Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. *J Biol Chem* 2004. 279(31): 32269-74.
44. Dumoutier, L., et al., IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes. *Genes Immun* 2000. 1(8): 488-94.
45. Dumoutier, L., et al., Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. 97(18): 10144-9.
46. Dusheiko, G., Side effects of alpha interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1997. 26(3 Suppl 1): 112S-121S.
47. Ebert, E.C., IL-10 enhances IL-2-induced proliferation and cytotoxicity by human intestinal lymphocytes. *Clin Exp Immunol* 2000. 119(3): 426-32.
48. Eckmann, L., et al., Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8 [comment]. *Gastroenterology* 1993. 105(6): 1689-97.
49. Eckmann, L., M.F. Kagnoff, and J. Fierer, Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993. 61(11): 4569-74.
50. El-Shabrawi, Y., H. Mangge, and J. Hermann, Anti-tumour necrosis factor alpha treatment in chronic recurrent inflammation of the anterior segment of the eye in patients resistant to standard immunomodulatory treatment. *Ann Rheum Dis* 2003. 62(12): 1243-4.
51. Fedorak, R.N., et al., Recombinant human interleukin 10 in the treatment of patients with mild to moderately active Crohn's disease. The Interleukin 10 Inflammatory Bowel Disease Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000. 119(6): 1473-82.
52. Fellermann, K., et al., A chromosome 8 gene-cluster polymorphism with low human beta-defensin 2 gene copy number predisposes to Crohn disease of the colon. *Am J Hum Genet* 2006. 79(3): 439-48.
53. Fellous, M., et al., Interferon-dependent induction of mRNA for the major histocompatibility antigens in human fibroblasts and lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982. 79(10): 3082-6.
54. Fidler, I.J., Regulation of neoplastic angiogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001(28): 10-4.
55. Finbloom, D.S. and K.D. Winestock, IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J Immunol* 1995. 155(3): 1079-90.
56. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989. 170(6): 2081-95.

57. Fiorentino, D.F., et al., IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991. 147(11): 3815-22.
58. Fiorentino, D.F., et al., IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991. 146(10): 3444-51.
59. Fleming, S.B., et al., A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol* 1997. 71(6): 4857-61.
60. Fridell, Y.W., et al., Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1996. 16(1): 135-45.
61. Fukao, T., et al., Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in mast cells: new insights from knockout mouse studies. *J Mol Med* 2003. 81(9): 524-35.
62. Fukao, T., et al., Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice. *Nat Immunol* 2002. 3(3): 295-304.
63. Gautier, G., et al., A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med* 2005. 201(9): 1435-46.
64. Graness, A., et al., Protein kinase C and ERK activation are required for TFF-peptide-stimulated bronchial epithelial cell migration and tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 (IL-6) and IL-8 secretion. *J Biol Chem* 2002. 277(21): 18440-6.
65. Grob, J.J., et al., Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. *Lancet* 1998. 351(9120): 1905-10.
66. Gruenberg, B.H., et al., A novel, soluble homologue of the human IL-10 receptor with preferential expression in placenta. *Genes Immun* 2001. 2(6): 329-34.
67. Gurney, A.L., IL-22, a Th1 cytokine that targets the pancreas and select other peripheral tissues. *Int Immunopharmacol* 2004. 4(5): 669-77.
68. Gusella, G.L., et al., Potential requirement of a functional double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) for the tumoricidal activation of macrophages by lipopolysaccharide or IFN-alpha beta, but not IFN-gamma. *J Immunol* 1995. 154(1): 345-54.
69. Gutterman, J.U., Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. 91(4): 1198-205.
70. Hall, G.L., A. Compston, and N.J. Scolding, Beta-interferon and multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 1997. 20(2): 63-7.
71. Haller, O. and G. Kochs, Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic* 2002. 3(10): 710-7.
72. Hanauer, S.B., et al., Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002. 359(9317): 1541-9.
73. Heremans, H., et al., Interferon gamma, a mediator of lethal lipopolysaccharide-induced Shwartzman-like shock reactions in mice. *J Exp Med* 1990. 171(6): 1853-69.
74. Herfarth, H. and J. Scholmerich, IL-10 therapy in Crohn's disease: at the crossroads. Treatment of Crohn's disease with the anti-inflammatory cytokine interleukin 10. *Gut* 2002. 50(2): 146-7.
75. Ho, A.S., et al., A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. 90(23): 11267-71.



76. Hommes, D., et al., Inhibition of stress-activated MAP kinases induces clinical improvement in moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002. 122(1): 7-14.
77. Hommes, D.W., et al., The pathogenicity of cytomegalovirus in inflammatory bowel disease: a systematic review and evidence-based recommendations for future research. *Inflamm Bowel Dis* 2004. 10(3): 245-50.
78. Howard, M., et al., Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993. 177(4): 1205-8.
79. Hsu, D.H., et al., Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* 1990. 250(4982): 830-2.
80. Isaacs, A. and J. Lindenmann, Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957. 147(927): 258-67.
81. Isaacs, A., J. Lindenmann, and R.C. Valentine, Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957. 147(927): 268-73.
82. Ishida, H., et al., Modified immunological status of anti-IL-10 treated mice. *Cell Immunol* 1993. 148(2): 371-84.
83. Jabs, D.A., et al., Incidence of foscarnet resistance and ganciclovir resistance in patients treated for cytomegalovirus retinitis. The Cytomegalovirus Retinitis and Viral Resistance Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1998. 42(9): 2240-4.
84. Jordan, W.J., et al., Modulation of the human cytokine response by interferon lambda-1 (IFN-lambda1/IL-29). *Genes Immun* 2006.
85. Kakazu, T., et al., Type 1 T-helper cell predominance in granulomas of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999. 94(8): 2149-55.
86. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, Jr., Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2002. 2(9): 675-87.
87. Kobayashi, K.S., et al., Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science* 2005. 307(5710): 731-4.
88. Kotenko, S.V., et al., IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003. 4(1): 69-77.
89. Kotenko, S.V., et al., Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes. *J Biol Chem* 2001. 276(4): 2725-32.
90. Kotenko, S.V., et al., Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity. *J Immunol* 2001. 166(12): 7096-103.
91. Kotenko, S.V., et al., Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. 97(4): 1695-700.
92. Kuhn, R., et al., Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993. 75(2): 263-74.
93. Kyriakis, J.M. and J. Avruch, Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 2001. 81(2): 807-69.
94. Lang, R., et al., Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* 2002. 169(5): 2253-63.

95. Langer, J.A., E.C. Cutrone, and S. Kotenko, The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004. 15(1): 33-48.
96. Lasfar, A., et al., Characterization of the mouse IFN-lambda ligand-receptor system: IFN-lambdas exhibit antitumor activity against B16 melanoma. *Cancer Res* 2006. 66(8): 4468-77.
97. Lehrer, R.I. and T. Ganz, Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 2002. 14(1): 96-102.
98. Lejeune, D., et al., Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10. *J Biol Chem* 2002. 277(37): 33676-82.
99. Liang, S.C., et al., Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 2006. 203(10): 2271-9.
100. Lindemann, A., et al., Immunomodulatory effects of ultra-low-dose interleukin-2 in cancer patients: a phase-IB study. *Cancer Immunol Immunother* 1993. 37(5): 307-15.
101. Lovato, P., et al., Constitutive STAT3 activation in intestinal T cells from patients with Crohn's disease. *J Biol Chem* 2003. 278(19): 16777-81.
102. Lutfalla, G., et al., Comparative genomic analysis reveals independent expansion of a lineage-specific gene family in vertebrates: the class II cytokine receptors and their ligands in mammals and fish. *BMC Genomics* 2003. 4(1): 29.
103. Lyons, J.L. and J.T. Rosenbaum, Uveitis associated with inflammatory bowel disease compared with uveitis associated with spondyloarthritis. *Arch Ophthalmol* 1997. 115(1): 61-4.
104. Maloy, K.J. and F. Powrie, Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* 2001. 2(9): 816-22.
105. Mangan, P.R., et al., Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006. 441(7090): 231-4.
106. Manns, M.P., et al., Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001. 358(9286): 958-65.
107. Marano, C.W., et al., Tumor necrosis factor-alpha increases sodium and chloride conductance across the tight junction of CACO-2 BBE, a human intestinal epithelial cell line. *J Membr Biol* 1998. 161(3): 263-74.
108. Meager, A., et al., Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons. *Cytokine* 2005. 31(2): 109-18.
109. Mehran, M., et al., Tumor necrosis factor-alpha inhibits lipid and lipoprotein transport by Caco-2 cells. *Am J Physiol* 1995. 269(6 Pt 1): G953-60.
110. Moore, K.W., et al., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001. 19: 683-765.
111. Moore, K.W., et al., Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 1990. 248(4960): 1230-4.
112. Muller, U., et al., Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994. 264(5167): 1918-21.
113. Nagalakshmi, M.L., et al., Expression patterns of IL-10 ligand and receptor gene families provide leads for biological characterization. *Int Immunopharmacol* 2004. 4(5): 577-92.

114. Nagalakshmi, M.L., et al., Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 2004. 4(5): 679-91.
115. Nakase, H., et al., New cytokine delivery system using gelatin microspheres containing interleukin-10 for experimental inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2002. 301(1): 59-65.
116. Neurath, M.F., IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med* 2007. 13(1): 26-8.
117. Nguyen, K.B., et al., Critical role for STAT4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science* 2002. 297(5589): 2063-6.
118. Niwa, Y., et al., Methylation silencing of SOCS-3 promotes cell growth and migration by enhancing JAK/STAT and FAK signalings in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2005.
119. Ochsenkuhn, T., M. Sackmann, and B. Goke, Infliximab for acute, not steroid-refractory ulcerative colitis: a randomized pilot study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004. 16(11): 1167-71.
120. Osterlund, P., et al., Gene expression and antiviral activity of alpha/beta interferons and interleukin-29 in virus-infected human myeloid dendritic cells. *J Virol* 2005. 79(15): 9608-17.
121. Ouellette, A.J. and C.L. Bevins, Paneth cell defensins and innate immunity of the small bowel. *Inflamm Bowel Dis* 2001. 7(1): 43-50.
122. Park, C., M.J. Lecomte, and C. Schindler, Murine Stat2 is uncharacteristically divergent. *Nucleic Acids Res* 1999. 27(21): 4191-9.
123. Pestka, S., et al., Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol* 2004. 22: 929-79.
124. Pfeffer, L.M., et al., Biological properties of recombinant alpha-interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons. *Cancer Res* 1998. 58(12): 2489-99.
125. Podolsky, D.K., Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002. 347(6): 417-29.
126. Porter, E.M., et al., The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 2002. 59(1): 156-70.
127. Radaeva, S., et al., Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. *Hepatology* 2004. 39(5): 1332-42.
128. Reinecker, H.C., et al., Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993. 94(1): 174-81.
129. Renauld, J.C., Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat Rev Immunol* 2003. 3(8): 667-76.
130. Rennick, D.M., M.M. Fort, and N.J. Davidson, Studies with IL-10<sup>-/-</sup> mice: an overview. *J Leukoc Biol* 1997. 61(4): 389-96.
131. Robek, M.D., B.S. Boyd, and F.V. Chisari, Lambda interferon inhibits hepatitis B and C virus replication. *J Virol* 2005. 79(6): 3851-4.
132. Rode, H.J., et al., The genome of equine herpesvirus type 2 harbors an interleukin 10 (IL10)-like gene. *Virus Genes* 1993. 7(1): 111-6.
133. Romagnani, P., et al., T cells and cytokines in Crohn's disease. *Curr Opin Immunol* 1997. 9(6): 793-9.
134. Romagnani, S., The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 1997. 18(6): 263-6.
135. Rosenberg, S.A., et al., Combination therapy with interleukin-2 and alpha-interferon for the treatment of patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1989. 7(12): 1863-74.

136. Rousset, F., et al., Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992. 89(5): 1890-3.
137. Rutgeerts, P., et al., Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005. 353(23): 2462-76.
138. Sartor, R.B., Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006. 3(7): 390-407.
139. Sato, A., et al., Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J Immunol* 2006. 176(12): 7686-94.
140. Saubermann, L.J., et al., Evidence of T cell receptor beta-chain patterns in inflammatory and noninflammatory bowel disease states. *Am J Physiol* 1999. 276(3 Pt 1): G613-21.
141. Schaefer, G., C. Venkataraman, and U. Schindler, Cutting edge: FISP (IL-4-induced secreted protein), a novel cytokine-like molecule secreted by Th2 cells. *J Immunol* 2001. 166(10): 5859-63.
142. Schreiber, S., et al., Safety and efficacy of recombinant human interleukin 10 in chronic active Crohn's disease. Crohn's Disease IL-10 Cooperative Study Group. *Gastroenterology* 2000. 119(6): 1461-72.
143. Schreiber, S., et al., Activation of signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 in human chronic inflammatory bowel disease. *Gut* 2002. 51(3): 379-85.
144. Seiderer, J., et al., Homozygosity for the CARD15 frameshift mutation 1007fs is predictive of early onset of Crohn's disease with ileal stenosis, entero-enteral fistulas, and frequent need for surgical intervention with high risk of re-stenosis. *Scand J Gastroenterol* 2006. 41(12): 1421-32.
145. Sen, G.C., Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 2001. 55: 255-81.
146. Sheppard, P., et al., IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003. 4(1): 63-8.
147. Singh, R.K., et al., Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995. 92(10): 4562-6.
148. Sotsios, Y., et al., The CXC chemokine stromal cell-derived factor activates a Gi-coupled phosphoinositide 3-kinase in T lymphocytes. *J Immunol* 1999. 163(11): 5954-63.
149. Staples, K.J., et al., Stimulus-specific inhibition of IL-5 by cAMP-elevating agents and IL-10 reveals differential mechanisms of action. *Biochem Biophys Res Commun* 2000. 273(3): 811-5.
150. Stark, G.R., et al., How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998. 67: 227-64.
151. Steidler, L., et al., Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000. 289(5483): 1352-5.
152. Sugimoto, K., et al., Therapeutic approach using interleukin-22 in experimental colitis. *Gastroenterology* 2006. Vol. 130, Suppl.2.
153. Suzuki, A., et al., CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J Exp Med* 2001. 193(4): 471-81.
154. Symons, J.A., A. Alcami, and G.L. Smith, Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. *Cell* 1995. 81(4): 551-60.

155. Taga, K., B. Cherney, and G. Tosato, IL-10 inhibits apoptotic cell death in human T cells starved of IL-2. *Int Immunol* 1993. 5(12): 1599-608.
156. Takeda, K., et al., Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity* 1999. 10(1): 39-49.
157. ten Hove, T., et al., Dichotomous role of inhibition of p38 MAPK with SB 203580 in experimental colitis. *Gut* 2002. 50(4): 507-12.
158. Tilg, H., et al., Treatment of Crohn's disease with recombinant human interleukin 10 induces the proinflammatory cytokine interferon gamma. *Gut* 2002. 50(2): 191-5.
159. van Deventer, S.J., C.O. Elson, and R.N. Fedorak, Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 1997. 113(2): 383-9.
160. Veit, C., et al., Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase is required for glial cell line-derived neurotrophic factor-induced migration and invasion of pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 2004. 64(15): 5291-300.
161. Vlotides, G., et al., SOCS-1 and SOCS-3 inhibit IFN-alpha-induced expression of the antiviral proteins 2,5-OAS and MxA. *Biochem Biophys Res Commun* 2004. 320(3): 1007-14.
162. Weber-Nordt, R.M., et al., Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *J Biol Chem* 1996. 271(44): 27954-61.
163. Wehkamp, J., et al., Human beta-defensin 2 but not beta-defensin 1 is expressed preferentially in colonic mucosa of inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2002. 14(7): 745-52.
164. Wehkamp, J., et al., Reduced Paneth cell alpha-defensins in ileal Crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. 102(50): 18129-34.
165. Welte, T., et al., STAT3 deletion during hematopoiesis causes Crohn's disease-like pathogenesis and lethality: a critical role of STAT3 in innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003. 100(4): 1879-84.
166. Whittington, H.A., et al., Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004. 31(2): 220-6.
167. Williams, L., et al., Signal transducer and activator of transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *J Immunol* 2004. 172(1): 567-76.
168. Wolk, K., et al., Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002. 168(11): 5397-402.
169. Wolk, K., et al., IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004. 21(2): 241-54.
170. Wolk, K., et al., IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: A potential systemic role of IL-22 in Crohn's Disease. *J Immunol* 2007. 178(9): 5973-81.
171. Xu, W., et al., A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98(17): 9511-6.
172. Yap, A.S., Initiation of cell locomotility is a morphogenetic checkpoint in thyroid epithelial cells regulated by ERK and PI3-kinase signals. *Cell Motil Cytoskeleton* 2001. 49(2): 93-103.

173. Yoshikawa, H., et al., SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and shows growth-suppression activity. *Nat Genet* 2001. 28(1): 29-35.
174. Zitzmann, K., et al., Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006. 344(4): 1334-41.

## 12 Anhang

### **Ehrenwörtliche Erklärung:**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Die Bedeutung der IL-10-verwandten Zytokine IL-22, IL-28A und IL-29 bei intestinaler Entzündung und viraler Infektion**

in der Arbeitsgruppe der Medizinischen Klinik und Poliklinik II - Großhadern (Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke) selbständig durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Zitierungen anderer wissenschaftlicher Arbeiten sind unter Angabe der Quelle als solche kenntlich gemacht. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde nach Genehmigung durch den Promotionsausschuss vom 02. Juni 2005 teilweise in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

*Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Jun 3; 331 (2) 543–548.

*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005 Nov; 289 (5) G960-8.

*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006 Apr; 290 (4) G827-38.

München, 31.01.2008

## Danksagungen

### Mein Dank gilt:

Herrn PD Dr. med. Stephan Brand, für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation in seinem Labor durchführen zu können. Ihm danke ich vor allem für die erfahrene Förderung, sein fortwährendes Interesse an meiner Arbeit und seine ständige Gesprächsbereitschaft.

Frau Diplom-Biologin Julia Diegelmann (geb. Dambacher), für ihre fachliche Kompetenz und ihre Hilfe.

Meiner Arbeitsgruppe (Herrn PD Dr. med. Thomas Ochsenkühn, Frau Dr. med. Julia Seiderer-Nack, Frau Dr. med. Cornelia Tillack-Schreiber, Frau Dr. med. Helga-Paula Török, Frau Simone Pfennig, Frau Caroline Wolf, Herrn Dr. med. Torsten Olszak und Herrn Matthias Jürgens), für die gute Zusammenarbeit und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Gerald Spöttl, für die Hilfe bei den STAT-*Western-Blot*-Experimenten.

Frau Dr. rer. nat. Barbara Adler und ihrer Arbeitsgruppe, für ihre Anleitung bei den virologischen Experimenten.

Meiner Familie, für ihre seelische und moralische Unterstützung.

Meiner Freundin Jenny, für ihre kompromisslose Unterstützung.



6. Brand S, Dambacher J, **Beigel F**, Zitzmann K, Olszak T, Steib C, Storr M, Göke B, Diepolder H, Bilzer M, Auernhammer CJ.  
IL-22 mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression.  
*Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 Apr; 292 (4); G1019-28.
7. Dambacher J, **Beigel F**, Seiderer J, Haller D, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S.  
Interleukin-31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is up-regulated in inflammatory bowel disease.  
*Gut.* 2007 Sep; 56(9) 1257-65.
8. Dambacher J, **Beigel F**, Zitzmann K, Heeg MH, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S.  
The role of interleukin-22 in hepatitis C virus infection.  
*Cytokine.* 2008 Jan 10; [Epub ahead of print]
9. Dambacher J, **Beigel F**, Zitzmann K, de Toni E, Göke B, Diepolder HM, Auernhammer CJ, Brand S.  
The role of the novel IL-10 like cytokine IL-26 in intestinal inflammation.  
*Gut.* submitted.

\* geteilte Erstautorenschaft

**Kongressbeiträge/Vorträge:**

1. **Beigel F**, Dambacher J, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Auernhammer C, Göke B, Brand S.  
The novel IL-10 related cytokine IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes the intestinal barrier integrity.  
13<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005. Oral Presentation.  
*Gut* 2005; 54 (Suppl. No.VII): A61.
2. Brand S, **Beigel F**, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Goeke B, Diepolder H, Adler B, Auernhammer C, Dambacher J.  
The Novel Lambda-Interferons IL-28A and IL-29 Mediate Proinflammatory, Antiproliferative, and Antiviral Signals in Intestinal Epithelial Cells.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA.  
Oral Presentation at the Distinguished Late Breaking Abstract Session.  
*Gastroenterology*. 2005 Jul; 129(1): A371.
3. Brand S, Olszak T, Dambacher J, **Beigel F**, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST.  
Intestinal Epithelial Cell Expressed CCR6 Mediates Epithelial Cell Restitution and Cell Proliferation.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. Oral Presentation.  
*Gastroenterology* 2005; 128 (4; Suppl. 2): A142.
4. Brand S, **Beigel F**, Dambacher J, Olszak T, Eichhorst ST, Zitzmann K, Adler B, Göke B, Auernhammer C.  
The novel IL-10 related cytokine IL-22 mediates proinflammatory, antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA. Oral Presentation.  
*Gastroenterology* 2005; 128 (4; Suppl. 2): A18.

5. Dambacher J, **Beigel F**, Zitzmann K, Olszak T, Diepolder H, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S.  
IL-22 induced signaling mediates liver cell regeneration and is abrogated by SOCS-1 overexpression.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 20-25, 2006, Los Angeles, USA. Oral Presentation.  
*Gastroenterology* 2006; 130 (4, Suppl. 2): A752.
6. Dambacher J, **Beigel F**, Zitzmann K, Olszak T, Prüfer T, Steib C, Storr M, Göke B, Diepolder H, Bilzer M, Auernhammer C, Brand S.  
IL-22 mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression.  
14<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany, October 21-25, 2006.  
Oral Presentation.  
*Gut* 2006; 55: (Suppl. VIII): A8.
7. Dambacher J, **Beigel F**, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst S, Otte J, Seiderer J, Diepolder H, Auernhammer C, Ochsenkühn T, Göke B, Brand S.  
The novel IL-10 related cytokine IL-26 is increased in active inflammatory bowel disease and intestinal epithelial cells express the functional IL-26 receptor complex.  
14<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany, October 21-25, 2006.  
Oral Presentation.  
*Gut* 2006; 55: (Suppl. VIII): A31.
8. **Beigel F**, Dambacher J, Storr M, Olszak T, Zitzmann K, Göke B, Auernhammer C, Kaul A, Bartenschlager R, Diepolder H, Brand S.  
The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 inhibit HCV replication in vitro and hepatic IL-28A mRNA expression is increased in HCV and CMV infection in vivo.  
14<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Berlin, Germany, October 21-25, 2006.  
Oral Presentation.  
*Gut* 2006; 55: (Suppl. VIII): A44.

**Kongressbeiträge/Poster:**

1. Brand S, Dambacher J, Olszak T, **Beigel F**, Sisic Z, Eichhorst S, Göke B.  
CXCR4-induzierte Signaltransduktionswege beeinflussen Proliferation und Migration von intestinalen Epithelzellen.  
59. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, September 1-4, 2004, Leipzig, Germany.  
*Z Gastroenterol* 2004;42:840.
2. Brand S, Dambacher J, Olszak T, **Beigel F**, Sisic Z, Eichhorst S, Göke B.  
CXCR4 mediated signals stimulate intestinal epithelial cell migration and cell proliferation.  
12<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Prague, Czech Republic, September 25-29, 2004.  
*Gut* 2004; 53 (Suppl. VI): A132.
3. Brand S, **Beigel F**, Dambacher J, Olszak T, Eichhorst ST, Zitzmann K, Diepolder H, Auernhammer C.  
SOCS-1 Inhibits Expression of the Antiviral Proteins 2,5-OAS and MxA Induced By the Novel Interferon-Lambda's IL-28A and IL-29.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA.  
*Gastroenterology* 2005; 128 (4; Suppl. 2): A751.
4. Brand S, Dambacher J, **Beigel F**, Olszak T, Diebold J, Otte JM, Göke B, Eichhorst ST.  
CXCR4 Mediated Signals Regulate Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA.  
*Gastroenterology* 2005; 128 (4; Suppl. 2): A478.

5. Brand S, **Beigel F**, Dambacher J, Olszak T, Eichhorst ST, Zitzmann K, Auernhammer C, and Diepolder H.  
The Novel Cytokines IL-28A and IL-29 Exhibit Antiproliferative and Antiviral Properties in Liver Cells.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 14-19, 2005, Chicago, USA.  
*Gastroenterology* 2005; 128 (4; Suppl. 2): A751.
6. Dambacher J, **Beigel F**, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Diepolder H, Auernhammer CJ, Göke B, Brand S.  
The novel IL-10 related cytokine IL-22 is increased in active Crohn's disease and induces proinflammatory gene expression and migration of intestinal epithelial cells.  
Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology:  
*Global Goals in Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21<sup>st</sup> Century.*  
Montreal, Canada, September 12-14, 2005.
7. Zitzmann K, Dambacher J, **Beigel F**, Olszak T, Diepolder H, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S.  
IL-22 induced signaling mediates liver cell regeneration and is abrogated by SOCS-1 overexpression.  
Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology:  
*Global Goals in Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21<sup>st</sup> Century.*  
Montreal, Canada, September 12-14, 2005.
8. Dambacher J, Olszak T, **Beigel F**, Diebold J, Otte JM, Eichhorst ST, Göke B, Brand S.  
Intestinal epithelial cell expressed CCR6 mediates epithelial cell restitution and cell proliferation.  
Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology:  
*Global Goals in Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21<sup>st</sup> Century.*  
Montreal, Canada, September 12-14, 2005.

9. Dambacher J, **Beigel F**, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Adler B, Diepolder H, Göke B, Auernhammer CJ, Brand S.  
The novel lambda-interferons IL-28A and IL-29 mediate proinflammatory, antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells.  
Abstract CD of the World Congress of Gastroenterology:  
*Global Goals in Gastroenterology – Expanding Horizons in the 21<sup>st</sup> Century.*  
Montreal, Canada, September 12-14, 2005.
10. Olszak T, Dambacher J, **Beigel F**, Diebold J, Otte JM, Eichhorst ST, Göke B, Brand S.  
CCR6 mediated signals regulate proliferation and migration of colorectal cancer cells.  
13<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005.  
*Gut* 2005; 54 (Suppl. No.VII): A161.
11. Zitzmann K, Dambacher J, **Beigel F**, Olszak T, Diepolder H, Göke B, Auernhammer C, Brand S.  
IL-22 induced signaling mediates liver cell regeneration and is abrogated by SOCS-1 overexpression.  
13<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005.  
*Gut* 2005; 54 (Suppl. No.VII): A211.
12. Dambacher J, **Beigel F**, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Adler B, Diepolder H, Göke B, Auernhammer C, Brand S.  
The novel Lambda-interferons IL-28A and IL-29 have antiviral properties against human Cytomegaly Virus (CMV) in intestinal epithelial cells.  
13<sup>th</sup> United European Gastroenterology Week, Copenhagen, Denmark, October 15-19, 2005.  
*Gut* 2005; 54 (Suppl. No.VII): A142.

13. Brand S, Dambacher J, **Beigel F**, Storr M, Olszak T, Zitzmann K, Göke B, Auernhammer CJ, Kaul A, Bartenschlager R, Diepolder H.  
The novel Lambda-interferons IL-28A and IL-29 inhibit HCV replication in vitro and hepatic IL-28 mRNA expression is increased in HCV and CMV infection in vivo.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 20-25, 2006, Los Angeles, USA.  
*Gastroenterology* 2006; 130 (4, Suppl. 2): A835.
14. Dambacher J, **Beigel F**, Golluscio R, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, Seiderer J, Diepolder H, Auernhammer CJ, Ochsenkühn T, Göke B, Brand S.  
The novel IL-10 related cytokine IL-26 is increased in active inflammatory bowel disease and intestinal epithelial cells express the functional IL-26 receptor complex.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 20-25, 2006, Los Angeles, USA.  
*Gastroenterology* 2006; 130 (4, Suppl. 2): A696.
15. Dambacher J, **Beigel F**, Zitzmann K, Auernhammer CJ, Seiderer J, Ochsenkühn T, Göke B, Brand S.  
Intestinal epithelial cells express the functional receptor complex for the novel cytokine IL-31 and its expression is up-regulated in inflammatory bowel disease.  
Annual Meeting of the American Gastroenterological Association and Digestive Disease Week. May 19-24, 2007, Washington DC, USA.  
Poster of Distinction.  
*Gastroenterology* 2007; 132 (4, Suppl. S1)