

**The Role of Proinflammatory Cytokines
in Inflammation and Host Defense:
Experimental Models for the Acute Inflammatory Response,
Tuberculosis, and NSAID-Induced Gastrointestinal Toxicity
in Gene-Deficient Mice**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH
for the degree of
DOCTOR OF NATURAL SCIENCES

presented by
Martin Bopst
Dipl.-Biol.
University of Konstanz, Germany

born May 7, 1965
German nationality

accepted on the recommendation of:
Prof. Dr. F. E. Würgler, examiner
Dr. H.-P. Eugster, co-examiner
PD Dr. U. A. Boelsterli, co-examiner

Zusammenfassung

Entzündung wird als genereller protektiver Mechanismus des Körpers betrachtet, der jedoch, wie zum Beispiel bei chronischen entzündlichen Krankheiten (Rheumatische Arthritis und andere) auch pathogen werden kann. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die nähere Untersuchung der regulativen Rolle von Cytokinen, insbesondere von TNF, IL-1 und IL-6 an drei verschiedenen experimentellen Mausmodellen: 1) Akute Entzündung ausgelöst durch Applikation einer mikrobiellen Substanz (LPS = Lipopolysaccharid); 2) experimentelle Tuberkulose und 3) durch Verabreichung eines Medikamentes hervorgerufene Magengeschwüre im Magen-Darmtrakt.

Die wichtigsten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stammen von Experimenten mit Gen-inaktivierten Mäusen der oben genannten Cytokine und können wie folgt zusammengefasst werden:

1 LPS-induzierte akute Entzündung

TNF, IL-1 und IL-6 wurden seit längerem als die primären Mediatoren bei Entzündungen betrachtet. Besonders TNF wird gegenwärtig als zentraler und elementarer Mediator der LPS-induzierten akuten Entzündung diskutiert. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TNF nicht verantwortlich ist für eine generelle Auslösung von inflammatorischen Prozessen, wie beispielsweise Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Unterzucker und verstärkte Produktion der Akutphase-Proteine Haptoglobin und α 1-acid-Glycoprotein. Ebenso wenig sind IL-6 an sich bzw. in Kombination mit TNF, die massgeblichen primären Mediatoren LPS-induzierter akuter Entzündung, wie anhand von Untersuchungen mit IL-6- und IL-6/TNF/LT α -defizienten Mäusen gezeigt wurde. Demzufolge wird vermutet, dass andere, bislang unbekannte Faktoren, von Bedeutung sind.

Im Falle einer gemeinsamen Inaktivierung der Gene für TNF und IL-6 wurde eine Erhöhung der Serumkonzentrationen der Hauptakutphase-Proteine, Serum-Amyloid-A (SAA) und Serum-Amyloid-P (SAP), verhindert. Dieser Befund wurde bei einzelner Inaktivierung der betreffenden Gene nicht beobachtet. TNF und IL-6 könnten demnach, beim Versuch Amyloidose zu verhindern (z.B. bei Rheumatischer Arthritis oder bei Alzheimer), als potentielle therapeutische Ziele dienen.

Zusätzlich konnte ein neuer posttranskriptioneller Mechanismus für SAA und SAP vorgeschlagen werden: Trotz normaler transkriptioneller Aktivierung von SAA und SAP wurden keine erhöhten Proteinkonzentrationen in IL-6/TNF/LT α -defizienten Mäusen als Folge einer LPS-Behandlung gefunden.

2 *Mycobacterium bovis* (BCG)-induzierte experimentelle Tuberkulose

M. bovis ist ein intrazellulärer Makrophagen-Parasit und dementsprechend können Cytokine, die von infizierten Makrophagen produziert werden (z.B. TNF) von grosser Bedeutung für die Pathogenese und die Beseitigung von Bakterien sein. Experimente mit TNF/LT α -defizienten Mäusen und demselben Mausstamm mit wieder eingeführtem murinem LT α , ergaben, dass TNF in diesem Modell absolut notwendig ist für das Überleben der Mäuse, die Rekrutierung von Makrophagen, die Bildung aktiver Granulome und die daraus resultierende Beseitigung der Bakterien. Weiterhin sind Makrophagen von TNF/LT α -defizienten Mäusen in der Lage, erhöhte Konzentrationen Stickoxid (NO) zu bilden, womit ausgeschlossen werden kann, dass dieses allein für die bakterielle Beseitigung verantwortlich ist. Eine denkbare Hypothese wäre, dass Peroxynitrit, das als Reaktionsprodukt von Superoxidanionen mit NO auftreten kann, als alternatives Bakterizid fungiert.

3 Gastrointestinale Schäden ausgelöst durch Indomethacin

Kürzlich veröffentlichte Ergebnisse deuteten auf eine Beteiligung von TNF an der Indomethacin-induzierten Gastropathie bei Ratten hin. Unsere Versuche mit TNF/LT α -defizienten Mäusen ergaben, dass TNF und LT α nicht an der Ulkusetstehung im Magen und Dünndarm sowie der einhergehenden Entzündung beteiligt sind (im Mausmodell nach Applikation dieses Nicht-Steroidalen Antiinflammatorischen Medikamentes).

Zusätzlich ist TNF nicht der primäre Mediator der Anorexie, wie dies kürzlich diskutiert wurde, da TNF/LT α -defiziente Mäuse sowohl im Indomethacin-Modell als auch im, oben erwähnten, LPS-Modell Anorexie entwickeln.

Zusammengefasst zeigen die Daten dieser Arbeit klar, dass ein gegebenes Cytokin - in diesem Fall TNF - verschiedene Aktionen auslösen kann und unterschiedliche Funktionen wahrnimmt, abhängig vom jeweiligen Stimulus und dem experimentellen Modell. Die Arbeit lässt die abschliessende Folgerung zu, dass in Zukunft mehr Wert gelegt werden muss auf die Untersuchung von Cytokinen und anderer Mediatoren in Kombinationen und auf die gemeinsame Inaktivierung von Botenstoffen. Es könnte sich herausstellen, dass dies eine vielversprechende Untersuchungsrichtung ist in bezug auf die Aufklärung neuer Mechanismen und potentieller Ziele für die Entwicklung von Medikamenten.

Summary

Inflammation is a general protective mechanism in the organism, which can also become pathologic as for example in chronic inflammatory diseases (rheumatoid arthritis and others). The objective of this work was to further elucidate the regulatory role of cytokines, in particular TNF, IL-1, and IL-6, in three different experimental mouse models: 1) acute inflammation induced by a microbial agent (LPS = lipopolysaccharide); 2) experimental tuberculosis; and 3) drug-induced gastrointestinal ulceration.

The main findings of the present work derive from the use of mice gene-deficient for the above mentioned cytokines and can be summarized as follows:

1 LPS-induced acute inflammation

TNF, IL-1, and IL-6 were for long considered to be the primary mediators of inflammation. It was recently hypothesized that especially TNF could be the main and crucial mediator of LPS-induced acute inflammation. This work demonstrates that TNF is not responsible for the general induction of responses such as weight loss, anorexia, hypoglycemia, and induction of the acute phase proteins haptoglobin and α 1-acid glycoprotein. Moreover, IL-6 per se or in combination with TNF were not the primary mediators of LPS-induced acute inflammation as demonstrated by studies with IL-6 and IL-6/TNF/LT α deficient mice. Therefore, other yet unknown factors are supposed to be of importance.

Nevertheless, increased serum levels of the major acute phase proteins, serum amyloid A (SAA) and serum amyloid P (SAP), were prevented if the genes for TNF and IL-6 were jointly inactivated. This was not observed when either gene was inactivated per se. TNF and IL-6, hence, might serve as potential targets to suppress amyloidosis associated with rheumatoid arthritis or Alzheimer's disease for example.

Furthermore, the presence of a new posttranscriptional regulatory mechanism for SAA and SAP arises from the present work, since despite normal transcriptional activation, SAA and SAP protein levels were not induced in IL-6/TNF/LT α deficient mice by LPS.

2 *Mycobacterium bovis* (BCG) induced experimental tuberculosis

M. bovis is an intramacrophage parasite and cytokines released from infected macrophages (e.g. TNF) could therefore be of importance for pathogenesis and bacterial clearance. Experiments with TNF/LT α deficient mice and the same mouse strain complemented with murine LT α demonstrated that in this model TNF is an absolute requirement for the survival of mice, the recruitment of macrophages, the formation of active granuloma, and the subsequent clearance of the bacteria. Furthermore, macrophages from TNF deficient mice are capable of induced nitric oxide (NO) production, pointing out that this agent per se is not responsible for the bacterial clearing. Peroxynitrite, which is the reaction product from superoxide anions with NO, might be hypothesized to serve as an alternative bactericidal agent.

3 Indomethacin-induced gastrointestinal ulceration

Previous results suggested an involvement of TNF in indomethacin-induced gastropathy in rats. Our investigations with TNF/LT α deficient mice revealed that TNF and LT α are not involved in the generation of gastric and small intestinal ulcers and the accompanying inflammation in the mouse model after administration of this non-steroidal antiinflammatory drug.

In addition, is TNF not the primary mediator of anorexia as discussed lately, since TNF/LT α deficient mice suffer from anorexia in the indomethacin model as well as in the above mentioned LPS model.

Taken together, the data of the present work clearly demonstrate that a given cytokine - in this case TNF - exerts quite different actions and has diverse functions depending strongly on its inducing agents and the experimental model. This work allows to draw the final conclusion, that in the future more attention has to be paid to investigations of cytokines and other mediators when applied in combinations and to the combined inactivation of messengers. This might turn out to be rather promising in terms of unraveling new mechanisms and potential drug targets.