

---

INHALTSVERZEICHNIS.....	i
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	vi
HERSTELLERVERZEICHNIS.....	viii
TABELLENVERZEICHNIS.....	ix
GRAPHIKVERZEICHNIS.....	x
<b>I. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1. <b>Unspezifische und spezifische Infektabwehr.....</b>	<b>1</b>
2. <b>Mechanismen der angeborenen Infektabwehr.....</b>	<b>2</b>
3. <b><i>Listeria monocytogenes</i> und Listeriose.....</b>	<b>4</b>
4. <b>Murine Listeriose als Modell für die zelluläre Infektabwehr.....</b>	<b>4</b>
5. <b>Listeriose in der SCID Maus.....</b>	<b>9</b>
6. <b>T Zell unabhängige Makrophagenaktivierung in anderen Erregermodellen.....</b>	<b>12</b>
<b>II. ZIELSETZUNG.....</b>	<b>16</b>
<b>III. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>18</b>
1. <b>Medien, Puffer und Lösungen.....</b>	<b>18</b>
1.1 Zellkultur.....	18
1.2 Zellfärbungen.....	19
1.3 Puffer für die Antikörperaufreinigung.....	20
1.4 Puffer für die Durchflußzytometrie.....	20
1.5 Lösungen für den indirekten „sandwich“ ELISA.....	21
1.6 Lösungen für den Stickoxidtest (aNO Bestimmung).....	21
1.7 Lösungen für den MTT-Test.....	22
1.8 Lösungen und Reagenzien für den Nachweis der Genexpression.....	22
1.9 Lösungen für die Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Western-Blots.....	23
1.10 Lösungen für den spezifischen Nachweis von Immunglobulinen auf Dot- und Western-Blots.....	25

---

1.11	Lösungen für die enzymatische Spaltung von Immunglobulinen.....	25
1.12	Medien und Lösungen für die Transkription pro- und eukaryontischer Zellen.....	25
<b>2.</b>	<b>Zytokine.....</b>	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>27</b>
3.1	Funktionelle Experimente.....	27
3.2	Durchflußzytometrie.....	28
3.3	ELISA.....	29
<b>4.</b>	<b>Spezifische Oligonukleotidsequenzen („Primer“).....</b>	<b>30</b>
<b>5.</b>	<b>Plasmide.....</b>	<b>31</b>
<b>6.</b>	<b>Restriktionsenzyme und –puffer.....</b>	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>32</b>
7.1	RAW 264.7 Zellen.....	32
7.2	P3X63Ag8.653 Zellen.....	32
<b>8.</b>	<b>Versuchstiere.....</b>	<b>33</b>
8.1	Mäuse.....	33
8.2	Ratten.....	34
<b>9.</b>	<b>Erreger.....</b>	<b>35</b>
9.1	<i>Listeria monocytogenes</i> ( <i>L. monocytogenes</i> ).....	35
9.2	Hitzegetötete <i>Listeria monocytogenes</i> (hkLm).....	35
9.3	<i>Pneumocystis carinii</i> ( <i>P. carinii</i> ).....	35
<b>10.</b>	<b>Zellkultivierung.....</b>	<b>36</b>
10.1	Kultivierung adhärenter Zellen.....	36
10.2	Kultivierung nicht adhärenter Zellen.....	37
10.3	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung.....	37
10.4	Einfrieren von Zellen.....	37
10.5	Auftauen von Zellen.....	38

---

10.6	Mykoplasmennachweis und –behandlung.....	38
<b>11.</b>	<b>Gewinnung von Zellen aus SCID Mäusen.....</b>	<b>39</b>
11.1	Gewinnung von Gesamtmilzzellen.....	39
11.2	Gewinnung von murinen Knochenmarkkulturmakrophagen.....	40
11.3	Gewinnung von murinen Milzmakrophagen.....	40
11.4	Isolierung von Natürlichen Killer Zellen.....	41
<b>12.</b>	<b><i>In vitro</i> Interaktionen zwischen Makrophagen und NK Zellen der SCID Maus.....</b>	<b>43</b>
12.1	Allgemeine Kultivierungsbedingungen.....	43
12.2	Koinkubationen von Makrophagen und NK Zellen im Zwei-Kammern-System.....	43
12.3	Blockierungsexperimente.....	44
12.4	Neutralisationsexperimente.....	44
<b>13.</b>	<b>Methoden des Nachweises von immunologisch wirksamen Mediatoren.....</b>	<b>44</b>
13.1	Nachweis aus dem Kulturüberstand.....	44
13.2	Nachweis der Genexpression.....	46
<b>14.</b>	<b>Generierung monoklonaler Antikörper.....</b>	<b>48</b>
14.1	Immunisierung.....	48
14.2	Fusion.....	49
14.3	Screeningsystem.....	50
<b>15.</b>	<b>Methoden der Aufreinigung, des Nachweises und der Charakterisierung von Antikörpern.....</b>	<b>50</b>
15.1	Affinitätschromatographie.....	50
15.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
15.3	Western Blot.....	52
15.4	Dot Blot.....	52
15.5	Immunglobulin Subtyp Bestimmung.....	53

<b>16. Präparation von Fab Fragmenten.....</b>	<b>53</b>
16.1 Vorbereitung von Papain.....	53
16.2 Enzymatische Spaltung der Immunglobuline.....	54
<b>17. Transfektion der Zelllinie RAW 264.7 mit F4/80 cDNA.....</b>	<b>54</b>
17.1 Transformation.....	55
17.2 Transfektion.....	56
<b>18. Durchflußzytometrie.....</b>	<b>58</b>
18.1 Probenvorbereitung.....	59
18.2 Geräteeinstellungen.....	59
18.3 Probenmessung.....	60
<b>19. Statistik.....</b>	<b>60</b>
<b>20. Antigenverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>IV. ERGEBNISSE.....</b>	<b>62</b>
<b>1. Erregerinduzierte Wechselwirkungen zwischen Zellen der natürlichen Infektabwehr.....</b>	<b>62</b>
1.1 Zytokinexpression nach <i>in vitro</i> Stimulierung mit <i>L. monocytogenes</i> und <i>P. carinii</i> .....	62
1.2 Nachweis der Funktion löslicher Faktoren bei den Interaktionen zwischen M $\Phi$ und NK Zellen.....	66
1.3 Blockierung von membranständigen Antigenen auf M $\Phi$ während der Aktivierungsphase der natürlichen zellulären Infektabwehr.....	70
1.4 Nachweis der Wirkungsweise des anti-F4/80 Antikörpers.....	72
<b>2. Untersuchung der Funktion des murinen Antigens F4/80.....</b>	<b>87</b>
2.1 Stabile Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit F4/80 cDNA.....	87
2.2 F4/80 Gen-deletierte („Knock-out“) Maus.....	89
<b>3. Expressionsstudien von F4/80 und anderen membranständigen Antigenen während Listeriose in der SCID Maus.....</b>	<b>91</b>
3.1 <i>In vitro</i> Expression.....	91

---

3.2	<i>In vivo</i> Expression.....	93
4.	<b>Produktion weiterer Antikörper mit inhibierender Wirkung auf die Induktion der IFN-<math>\gamma</math>-Bildung.....</b>	<b>98</b>
V.	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>105</b>
1.	<b>Die Induktion von IFN-<math>\gamma</math> während der unspezifischen Phase einer Infektion.....</b>	<b>106</b>
2.	<b>Das murine F4/80 Antigen.....</b>	<b>114</b>
VI.	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>123</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>125</b>
VII.	<b>LITERATUR.....</b>	<b>126</b>
	DANKSAGUNG	
	CURRICULUM VITAE	

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-bis (3-Ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)
AIDS	erworbenes Immundefekt Syndrom (acquired immunodeficiency syndrome)
aNO	anorganische Stickoxide
BCG	Bacille Calmette Guerin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Internationale Einteilung der Zellmarker (cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre (copy) Desoxyribonukleinsäure
CFU	Koloniebildende Einheiten (colony forming units)
CSIF	Zytokinsynthese inhibierender Faktor (cytokine synthesis inhibition factor, IL-10)
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid 5'-Triphosphat
DTT	Dithiotreitol
E	Einheiten
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (enzyme-linked immunosorbant assay)
Fab	Antigen bindendes Fragment
FACS	Durchflußzytometer (fluorescence-activated cell sorter)
Fc	kristallisierendes (crystallizing) Fragment
FcR	Rezeptor für Fc
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötale Kälberserum (hitzeinaktiviert)
FPLC	Flüssigkeitschromatographie (fast protein liquid chromatography)
g	Fallbeschleunigung im Schwerfeld ( $= 9,81 \text{ m/s}^2$ )
G	Umfang (gauge)
GMZ	Gesamtmilzzellen
HBSS	gepufferte Salzlösung nach Hank
HIV	humanes Immundefizienz Virus
hk	hitzegetötet (heat-killed)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
H1	HBSS mit 1 % FKS
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxid Synthase (inducible nitrogen oxide synthase)
(k)bp	(kilo)-Basenpaare
KO-Mäuse	gezielt gendeletrierte Mäuse (knock out)
LB	Luria Broth
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>L. monocytogenes</i>
LPS	Lipopolysaccharid

mAk	monoklonaler Antikörper
mIL	murines Interleukin
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MΦ	Makrophage
mRNA	Boten (messenger) – Ribonukleinsäure (- ribonucleic acid)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5 Diphenyltetrazoliumbromid, Thiazylblau
NKSF	NK Zell stimulierender Faktor (IL-12)
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
<i>P. carinii</i>	<i>Pneumocystis carinii</i>
PCR	Polymerase Ketten Reaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol
PMN	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
PMSF	Phenylmethylsulfoxid
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
R5/R10/R20	RPMI mit 5 %, 10 % oder 20% FKS
R10-I	R10 mit 20 E/ ml IL-2
RT	Reverse Transkriptase
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulfate)
Tab	Tabelle
TAE	Tris-Azid-EDTA
TBS	Tris gepufferte (- buffered) Salzlösung (saline)
TBST	Tris gepufferte (- buffered) Salzlösung (saline) mit 0,05 % Tween 20
TCR	T Zell Rezeptor (T cell receptor)
TE	Tris-EDTA
TH	T Helfer Zelle
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaureat
v	viabel
VEA	very early activation antigen (CD69)
v/ v	Volumen pro Volumen
w/ v	Gewicht pro Volumen
ZVZ	Zentrale Versuchstierzucht des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin

## HERSTELLERVERZEICHNIS

Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland	NEB, Schwalbach, Deutschland
Amicon, Beverly, USA	NEN, Boston, USA
Baxter Dada, Düringen, Schweiz	Neuform, Herrenberg, Deutschland
Bayer, Leverkusen, Deutschland	Novex, Frankfurt/ Main, Deutschland
Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland	Nunc, Naperville, USA
Biometra, Göttingen, Deutschland	Nyral, Ihlenfeld, Schweiz
Bio-Rad, München, Deutschland	Oxoid, Wesel, Deutschland
Braun, Melsungen, Deutschland	PeptoTech, London, England
Cybertech, Berlin, Deutschland	Pharmacia, Freiburg, Deutschland
CytRx, Atlanta, USA	Pharmingen, Hamburg, Deutschland
Dynatech, Denkendorf, Deutschland	Pierce, Oud Beijerland, Niederlande
Eurobio, Raunheim, Deutschland	Qiagen, Hilden, Deutschland
Eurogentec, Seraing, Belgien	Robbins Scientific, Sunnyvale, USA
Falcon, New Jersey, USA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fluka, Deisenhofen, Deutschland	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Gibco, Eggenstein-Leopoldhafen, Deutschland	Serotec, Oxford, England
Greiner, Nürtingen, Deutschland	Serva, Heidelberg, Deutschland
Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland	Sigma, München, Deutschland
Hoechst, Frankfurt/ Main, Deutschland	Sorvall, Newtown, USA
ICN, Meckenheim, Deutschland	ssniff, Soest, Deutschland
Immunokontakt, Frankfurt/ Main, Deutschland	Stratagene, La Jolla, USA
Innogenetics, Ismaning, Deutschland	Techne, Cambridge, England
Invitrogen, Groningen, Niederlande	TIB Molbiol, Berlin, Deutschland
Kodak, Rochester, USA	Uno, Zevenaar, Niederlande
Merck, Darmstadt, Deutschland	Vygon, Lyon, Frankreich
Millipore, Eschborn, Deutschland	Zeiss, Jena, Deutschland
Nalgene, Zaventem, Belgien	Zymed, San Francisco, USA



## TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 1.1:</b>	Merkmale der natürlichen und der spezifischen Immunität.....	3
<b>Tab. 3.1:</b>	Verwendete Zytokine.....	26
<b>Tab. 3.2:</b>	Antikörper für funktionelle Experimente.....	27
<b>Tab. 3.3:</b>	Verwendete Antikörper für die Durchflußzytometrie.....	28
<b>Tab. 3.4:</b>	Verwendete Antikörper für den indirekten „sandwich“ ELISA.....	29
<b>Tab. 3.5:</b>	Verwendete Primer.....	30
<b>Tab. 3.6:</b>	Verwendete Restriktionsendonukleasen.....	32
<b>Tab. 3.7:</b>	In der vorliegenden Arbeit behandelte Zelloberflächenantigene.....	61
<b>Tab. 4.1:</b>	Effekt von $\alpha$ -F4/80 mAk auf die IFN- $\gamma$ Poduktion aufgereinigter, Zytokin-aktiverter, NK Zellen.....	85
<b>Tab. 4.2:</b>	Bindungsverhalten der neu generierten Antikörper mit IFN- $\gamma$ inhibitorischer Wirkung.....	101
<b>Tab. 4.3:</b>	Effekt von mAk 6E1 auf die IFN- $\gamma$ Produktion aufgereinigter NK Zellen.....	103
<b>Tab. 4.4:</b>	Wirkung von mAk 6E1 auf die Produktion von TNF- $\alpha$ und IL-12 von hk <i>Lm</i> -stimulierten Knochenmarkkultur-M $\Phi$ .....	104

## GRAPHIKVERZEICHNIS

<b>Abb. 1.1:</b>	Interaktionen zwischen den Zellen der unspezifischen Abwehr nach einer Stimulierung durch <i>L. monocytogenes</i> .....	11
<b>Abb. 3.1:</b>	pcDNA3 Plasmid (Invitrogen).....	31
<b>Abb. 3.2:</b>	Durchflußzytometrische Überprüfung der Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit F4/80 cDNA.....	58
<b>Abb. 4.1:</b>	Zytokinexpression in GMZ von SCID Mäusen nach <i>in vitro</i> Inkubation mit <i>hkLm</i> und <i>P. carinii</i> .....	64
<b>Abb. 4.2:</b>	Zytokinexpression in isolierten Knochenmarkmakrophagen nach <i>in vitro</i> Inkubation mit <i>hkLm</i> und <i>P. carinii</i> .....	65
<b>Abb. 4.3:</b>	<i>P. carinii</i> und <i>L. monocytogenes</i> induzieren IFN- $\gamma$ in Kokulturen von M $\Phi$ und NK Zellen, jedoch nur ( <i>P. carinii</i> ), bzw. in höheren Konzentrationen ( <i>hkLm</i> , <i>vLm</i> ), wenn der direkte Zellkontakt zwischen M $\Phi$ und NK Zellen nicht unterbunden wurde.....	67
<b>Abb. 4.4:</b>	Inhibierung der IFN- $\gamma$ Produktion durch stimulierte SCID Gesamtmilzzellen in Gegenwart des M $\Phi$ -spezifischen monoklonalen Antikörpers F4/80.....	71
<b>Abb. 4.5:</b>	Abhängigkeit der Wirkung des anti F4/80 mAk vom Zeitpunkt seiner Zugabe zu <i>hkLm</i> -stimulierten SCID GMZ.....	73
<b>Abb. 4.6:</b>	Zeitabhängige Kinetik der IFN- $\gamma$ Freisetzung von SCID GMZ nach Inkubation mit <i>hkLm</i> und anti F4/80 mAk.....	74
<b>Abb. 4.7:</b>	Wirkung von $\alpha$ -F4/80 mAk auf die Produktion von TNF- $\alpha$ und IL-12 von <i>hkLm</i> -stimulierten Knochenmarkkultur- oder Milz-M $\Phi$ .....	76
<b>Abb. 4.8:</b>	Die Zytokinfreisetzung aus <i>hkLm</i> -stimulierten SCID Gesamtmilzzellen wird durch anti F4/80 Antikörper unterschiedlich reguliert.....	78
<b>Abb. 4.9:</b>	Spezifische und unspezifische Wirkungen des mAk F4/80.....	80

---

<b>Abb. 4.10:</b>	Spezifische Modulation der Zytokinsekretion durch Antikörper gegen F4/80 in Abwesenheit von IL-10.....	81
<b>Abb. 4.11:</b>	Spezifische Modulation der Zytokin-Sekretion durch Antikörper gegen F4/80 in Anwesenheit von blockierenden Antikörpern gegen Fc $\gamma$ Rezeptoren.....	83
<b>Abb. 4.12:</b>	Differenzielle Modulierung der Zytokin-mRNA Expression in hk <i>Lm</i> -stimulierten SCID GMZ durch anti-F4/80 mAk.....	86
<b>Abb. 4.13:</b>	<i>Listeria monocytogenes</i> -induzierte IFN- $\gamma$ Produktion von NK Zellen in Anwesenheit von schwach oder stark F4/80 exprimierenden RAW 264.7 Zellen.....	88
<b>Abb. 4.14:</b>	Vergleich der hk <i>Lm</i> -induzierten IFN- $\gamma$ Produktion von Gesamtmilzzellen zwischen F4/80 KO- und Wildtyp Mäusen.....	90
<b>Abb. 4.15:</b>	Expression von F4/80 und MHC-II Antigenen nach <i>in vitro</i> Stimulierung von SCID Gesamtmilzzellen mit hk <i>Lm</i> .....	92
<b>Abb. 4.16:</b>	Anzahl von koloniebildenden Einheiten in der Milz von SCID Mäusen nach Infektion mit viablen <i>L. monocytogenes</i> .....	93
<b>Abb. 4.17:</b>	Expression des F4/80 Antigens in der Milz von SCID Mäusen nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	95
<b>Abb. 4.18:</b>	Expression verschiedener Oberflächenantigene in der Milz von SCID Mäusen nach Infektion mit <i>L. monocytogenes</i> .....	96
<b>Abb. 4.19:</b>	Inhibition der hk <i>Lm</i> -induzierten IFN- $\gamma$ Sekretion durch neu generierte Antikörper gegen murine NK Zellen.....	100
<b>Abb. 4.20:</b>	In Kokulturen von M $\Phi$ und NK Zellen inhibiert mAk 6E1 die IFN- $\gamma$ Produktion durch NK Zellen.....	102