

# 1 Einleitung

Die Betrachtung von Effektor- und Regulationsmechanismen in der frühen Phase der Infektabwehr stellt das Thema dieser Arbeit dar. Mit welchen Mitteln schafft es das Immunsystem, in sehr kurzer Zeit mikrobielle Erreger an einer Ausbreitung und einer Vermehrung zu hindern? Eine wichtige Rolle bei der Koordination der Immunantwort spielen die Zytokine. Zytokine sind glykosilierte Peptide, die als lokal wirkende Signalstoffe zwischen den Zellen des Immunsystems, aber auch zwischen anderen Körperzellen wirken. Ein zentrales Schlüsselzytokin für die Regulations- und Effektormechanismen der Immunantwort ist IFN- $\gamma$ .

Die vorliegende Arbeit thematisiert am Beispiel der murinen Listeriose die Suche nach dem zellulären Ursprung von IFN- $\gamma$  und zeigt Mechanismen auf, welche die Produktion dieses für die Immunantwort essentiellen Zytokins beeinflussen. Im Fokus der hier dargestellten Untersuchungen steht die IFN- $\gamma$  Produktion in den ersten Stunden der Immunantwort sowie mögliche Regulationsmechanismen der frühen IFN- $\gamma$  Produktion.

## 1.1 Die natürliche und die erworbene Immunität

Das Immunsystem trägt gemeinsam mit dem Nervensystem und dem endokrinen System zu der Homöostase eines Organismus bei. Homöostase bezeichnet die Reaktionen, durch die ein Organismus aktiv einen Zustand aufrechterhält, in dem alle Körperfunktionen optimal ausgeführt werden können. Das Immunsystem hält die Integrität des Organismus aufrecht und schützt so vor Infektionen.

In Säugern sind die einzelnen Komponenten des Immunsystems über den gesamten Organismus verteilt, bilden aber funktionell eine Einheit. Diese bestehen aus verschiedenen Zellpopulationen und löslichen Faktoren in unterschiedlichen Organen wie dem Blut, der Leber, der Milz, den Lymphknoten, dem Thymus und dem Knochenmark. Im Verlauf der Evolution haben sich hier zwei Systeme entwickelt, die eng miteinander verflochten sind: das phylogenetisch ältere, natürliche Immunsystem und das erworbene Immunsystem. Die Reaktionen der natürlichen Immunität sind für den Schutz in der Frühphase einer Infektion verantwortlich. Viele eingedrungene Pathogene werden durch die Effektormechanismen der natürlichen Immunität ohne weitere Alarmierung weiterer Komponenten des Immunsystems eliminiert. Reichen diese Effektormechanismen für eine Kontrolle nicht mehr aus, z.B. bei hohen Erregerlasten, so werden die Erreger zum einen weiter attackiert und dezimiert, zum anderen an einer Ausbreitung im Organismus gehindert. Eine Kontrolle über die Erreger bis

---

hin zu einer vollständigen Eliminierung wird aber dann nur mit Hilfe der Mechanismen der erworbenen Immunantwort erreicht. Der funktionelle Unterschied dieser beiden Systeme besteht in der Art seiner Komponenten, mit der sie körperfremde Strukturen von Erregern erkennen.

## **1.2 Komponenten der Immunabwehr**

Das natürliche und das erworbene Immunsystem bauen jeweils auf speziellen zellulären und löslichen (humoralen) Komponenten auf. Die humoralen Komponenten des natürlichen Immunsystems werden durch die in der Leber gebildeten Akut-Phase-Proteine und das Komplementsystem gebildet. Das Komplementsystem besteht aus einer Gruppe von Proenzymen im Serum, die sich an die eingedrungenen Pathogene anheften und sich hierbei kaskadenartig selbst aktivieren, was letztendlich zu einer Lyse der Zielobjekte führt. Die zellulären Komponenten des natürlichen Immunsystems rekrutieren sich aus unterschiedlichen Zellpopulationen, die im Knochenmark aus Vorläuferzellen gebildet werden und sich über den Organismus verteilen. Hierzu gehören die phagozytierenden Effektorzellen, wie neutrophile Granulozyten, Monozyten, Makrophagen (MΦ) und dendritische Zellen (DC), und nicht-phagozytierende Effektorzellen, wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

Die zellulären Komponenten des erworbenen Immunsystems werden durch spezielle Lymphozytenpopulationen, die T-Zellen und die B-Zellen, gebildet. Auch hier stammen die Vorläuferzellen aus dem Knochenmark. Während die B-Zellen im Knochenmark ausdifferenzieren, reift ein großer Anteil der T-Zellen in einem speziellen Organ, dem Thymus, heran, nach dem sie auch benannt worden sind. Die humoralen Komponenten der erworbenen Immunität werden durch die sezernierten B-Zellrezeptoren, die Immunglobuline, gebildet.

### **1.2.1 Erkennen körperfremder Strukturen durch die natürliche Immunität**

Nachdem die Erreger die physikalischen Barrieren des Organismus wie die Haut oder die Schleimhäute, durchdrungen haben, erfolgt ein erster Kontakt des Eindringlings mit gewebeständigen Phagozyten z.B. MΦ. Die Reaktion erfolgt über eine in Relation zu der Vielfalt körperfremder Strukturen begrenzte Anzahl von Rezeptoren. Diese Rezeptoren erkennen einige wenige konservierte Strukturen, die für eine ganze Gruppe von Mikroorganismen charakteristisch sind. Diese Strukturen (engl.: *pathogen associated*

---

*molecular patterns*, PAMP) werden nur von diesen Mikroorganismen ausgebildet, nicht aber von dem Wirtsorganismus selbst. Sie sind nicht selten essentiell für das Überleben oder die Pathogenität der entsprechenden Mikroorganismen. Beispiele für diese Strukturen sind Lipopolysaccharid (LPS, Zellwandbestandteil gramnegativer Bakterien), Peptidoglycan, Lipoteichonsäure (jeweils Zellwandbestandteile von grampositiven Bakterien), Mannose (dieser Zucker ist ein häufiger Vertreter der Kohlenhydrate auf der Oberfläche vieler Pathogene), bakterielle DNA, doppelsträngige RNA (Bestandteil vieler Viren) und Glycan (Bestandteil der Zellwände von Pilzen). Die Rezeptoren, die diese Strukturen erkennen (engl.: *pattern recognition receptors*, PRR), sind von einer Generation auf die Nächste vererbbar und werden auf unterschiedlichen Immunzellen mit identischer Spezifität exprimiert. Über die Funktion können diese Rezeptoren wie folgt unterteilt werden:

Sezernierte Rezeptoren: z.B. das Akut-Phase-Protein *mannan-binding lectine*: es bindet an speziellen Kohlenhydratstrukturen und initiiert auf diese Weise die Komplementkaskade.

Endozytische Rezeptoren: z.B. membranständige Rezeptoren auf Phagozyten, wie der Mannoserezeptor, welche die Phagozytose und Antigenprozessierung einleiten.

Signaltransduzierende Rezeptoren: z.B. Toll-like Rezeptoren (abgekürzt TLR), sie aktivieren unterschiedliche Immungene, u.a. Zytokingene (Medzhitov und Janeway, 2000).

Die Reaktionen der natürlichen Immunität erfolgen nach Kontakt mit dem Erreger ohne Verzögerung und damit ohne Verlust wertvoller Zeit. Eine Proliferationsphase oder Aktivierungsphase im Vorfeld einer Reaktion der Komponenten auf den Erreger ist nicht erforderlich. Hierdurch sind die Komponenten der natürlichen Infektabwehr in der Lage, eingedrungene Pathogene schnell zu dezimieren und die Infektion lokal einzugrenzen.

### **1.2.2 Erkennen körperfremder Strukturen durch die erworbene Immunität**

Die Komponenten der erworbenen Immunität folgen einer anderen Strategie, Eindringlinge wirksam zu bekämpfen. Bevor eine Infektion stattfindet, bilden die zellulären Komponenten eine Vielzahl von Rezeptoren gegen mögliche Strukturen von Pathogenen aus. Während bei der natürlichen Immunität nur einige hundert Rezeptoren ausgebildet werden, die über die Keimbahn kodiert sind, sind es bei den T-Zellen ca.  $10^{18}$  und bei den B-Zellen ca.  $10^{14}$  mögliche Rezeptoren (Medzhitov und Janeway, 2000). Diese Vielfalt wird durch einen Prozess der somatischen Rekombination von T-Zellen und B-Zellen ermöglicht. Während der Reifung dieser Lymphozyten werden unterschiedliche Gensegmente auf der chromosomalen

DNA zufällig umgeordnet. Diese Umordnung wird von einem Enzymkomplex durchgeführt, der nach den unterschiedlichen Gensegment-Typen V(D)J-Rekombinase genannt wird. RAG-1- und RAG-2-Proteine sind essentielle Bestandteile dieses Enzymkomplexes. Beide Proteine sind gemeinsam für die Initiation und die Kontrolle der Umlagerung der chromosomalen DNA notwendig und können auch nicht durch andere Proteinkomponenten ersetzt werden (Janeway et al., 2002)

Durch die Erkennung ihres spezifischen Antigens werden bei einer Infektion nur die für die Infektabwehr relevanten T-Zell- und B-Zellklone zu einer Proliferation angeregt. Dieser Prozess der klonalen Selektion dauert ca. 3 bis 5 Tage, bis genügend antigenspezifische Klone selektiert und in Effektorzellen ausdifferenziert sind (Medzhitov und Janeway, 2000). Die erworbene Immunabwehr ist dann in der Lage, die Erreger wirksam zu bekämpfen und diese auch aus dem Organismus zu entfernen. Nach dem Abklingen sind die antigenspezifischen Immunzellen der erworbenen Immunantwort in der Lage, ein Immungedächtnis auszubilden, welches bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen eine schnellere Aktivierung dieser spezifischen Immunzellen und eine effektivere Immunantwort ermöglicht. Das in der Lebensspanne des Organismus durch Antigenkontakte ausgebildete Immungedächtnis ist nicht vererbbar. Die klonale Selektion antigenspezifischer T-Zell- und B-Zellklone und die daraus folgende Ausbildung eines Immungedächtnisses muss von jedem Individuum erneut nach Kontakt mit Erregern durchlaufen werden.

### **1.3 Kommunikation der Immunzellen**

Die erste Reaktion des Organismus gegen eindringende mikrobielle Erreger ist die Ausbildung einer Entzündung. Eine Entzündung ist die Antwort des Organismus auf eine Verletzung, die von chemischen oder physikalischen Einflüssen, sowie durch mikrobielle Stimuli verursacht worden ist. Charakteristika einer Entzündung sind die Wanderung von unterschiedlichen Immunzellpopulationen an den Entzündungsort, die Veränderung der Permeabilität der lokalen Gefäße und die lokale Sekretion von verschiedenen löslichen Faktoren, unter anderem Zytokinen.

Mikrobielle Erreger werden aufgrund ihrer charakteristischen Strukturen durch die *pattern recognition receptors* erkannt (vergl. 1.2.1). Somit können, charakteristisch für den jeweiligen Erreger, Zytokine induziert werden. Diese Peptidmediatoren initiieren die vaskulären und zellulären Entzündungsreaktionen und regulieren den nachfolgenden Ablauf der natürlichen und erworbenen Immunantwort. Zytokine spielen bei der Übertragung von Informationen während der Immunantwort neben der direkten Zell-Zell Interaktion eine entscheidende Rolle.

---

---

### 1.3.1 Zytokine als Botenstoffe in der Immunantwort

Zytokine sind in der Regel glykosilierte Polypeptide mit einer Molekülmasse unter 30 kDa. Sie wirken als Monomere, Homooligomere oder Heterooligomere. Ein wichtiges Charakteristikum von Zytokinen ist, dass sie in geringen Konzentrationen nur von Zellen produziert werden, die direkt an einer Immunreaktion beteiligt sind. Sowohl die Glykopeptide als auch die mRNA werden schnell durch extrazelluläre, Protein verdauende Enzyme oder intrazelluläre, RNA-spaltende Enzyme abgebaut. Somit sind Zytokine sehr kurzlebig, was ihren Aktionsradius einschränkt. Um eine gewünschte Wirkung auf eine spezielle Zielzelle zu vermitteln, ist eine räumliche Nähe zu der Zielzelle erforderlich. Dies erklärt, warum Zytokine in erster Linie lokal wirken. Zytokine übertragen ihre Information durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zielzelle. Diese Rezeptoren werden auf unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert, wodurch ein Zytokin auf verschiedene Zellpopulationen einwirken kann (Pleiotropie). Durch die räumliche Nähe und die Kurzlebigkeit des Zytokins bleibt jedoch die spezifische Wirkung auf die Zielzelle erhalten.

Nach der Sekretion können Zytokine sowohl über einen autokrinen Mechanismus auf die Zytokin-produzierende Zelle selbst einwirken als auch über einen parakrinen Mechanismus auf die Zellen in der unmittelbaren Umgebung. Bei einigen Zytokinen wird auch ein juxtakriner Mechanismus diskutiert. Hier bleiben die Zytokine auf der Membran der Zelle verankert, die sie produziert hat und wirken über Zell-Zell Interaktionen auf die Zielzellen ein.

Wachstumsfaktoren und einige wenige Zytokine, z.B. die Fiebermediatoren (Netea et al., 2000) können analog den Hormonen auch endokrin wirken, d. h. sie werden über den Blutkreislauf oder über das Lymphsystem zu ihren Zielzellen transportiert.

Unterschiedliche Zytokine können die gleiche biologische Wirkung auf ihre Zielzellen vermitteln, man spricht hier von einem redundanten Signal. Diese Eigenschaft macht die Übertragung von Informationen durch Zytokine sehr fehlertolerant. In dieser Eigenschaft grenzen sich Zytokine von den Hormonen ab. Die biologische Wirkung eines Hormons im Organismus kann nicht durch ein anderes körpereigenes Hormon ersetzt werden.

Die Interferone sind eine Gruppe von Zytokinen, die zuerst als Substanzen mit antiviralen Eigenschaften beschrieben worden sind (Isaacs et al., 1957). Aufgrund von strukturellen Merkmalen und unterschiedlichen Rezeptorspezifitäten werden sie in Typ I Interferone und Typ II Interferon unterteilt. Die wichtigsten Vertreter der Typ I Interferone sind IFN- $\alpha$  (Leukozyten-Interferon) und IFN- $\beta$  (Fibroblasten-Interferon). Es werden derzeit mehr als 10

IFN- $\alpha$  Gene bei Nagern und mehr als 15 beim Menschen unterschieden, aber nur ein IFN- $\beta$ -Gen. Das Typ II Interferon hat nur einen Vertreter, das Interferon gamma (IFN- $\gamma$ , Immuninterferon). und damit ist es nur durch ein IFN- $\gamma$ -Gen kodiert. Interferonen gemeinsam ist die antiproliferative und antivirale Wirkung auf die Zielzellen, in den immunmodulatorischen Funktionen unterscheiden sich die Typ I Interferone und das IFN- $\gamma$  (Ibelgauf's cope: Cytokine Online Pathfinder Encyclopaedia; Bogdan, 2000).

### 1.4 Interferon- $\gamma$ als Schlüsselzytokin bei der Regulation der Immunantwort

Sowohl für die Komponenten der natürlichen Immunantwort als auch für die Komponenten der erworbenen Immunantwort nimmt IFN- $\gamma$  eine Schlüsselrolle bei der Koordination von Immunreaktionen im Verlauf von bakteriellen und viralen Infektionen ein. Eine Reihe taxonomisch unterschiedlicher Erreger sind in der Lage, intrazellulär im Phagosom oder im Zytosol von verschiedenen Zellpopulationen, u.a. M $\Phi$  zu persistieren und sich dort zu vermehren (vergl. Tab. 1).

Tab.: 1 Beispiele für intrazelluläre Infekterreger	
Pathogen	Spezies
<i>Listeria monocytogenes</i> (Kiderlen et al., 1984; Thäle und Kiderlen, 2005)	grampositive Bakterien
<i>Burkholderia pseudomallei</i> (Myagi et al., 1997; Lertmemongkolchai et al., 2001)	gramnegative Bakterien
<i>Toxoplasma gondii</i> (Gazzinelli et al., 1993; Wang et al., 2004)	Protozoa
<i>Leishmania major</i> (Varkila et al., 1993; Tabbara et al., 2005)	Protozoa
<i>Mykobakterium Tuberculosis</i> ) (Flynn et al., 1993; Salgame, 2005)	Mykobakterien
<i>Mykobakterium bovis</i> Bacillus Calmette Gurérin (O'Donnel et al., 1999)	Mykobakterien
Vaccinia Virus (Huang et al., 1993; Xu et al. 2004)	Viren

Auf diese Weise sind die Erreger maskiert und entziehen sich der Immunabwehr durch die humoralen Komponenten der Immunantwort, z.B. durch Antikörper. Eine effektive Abwehr dieser Erreger ist nur mit Hilfe der zellulären Komponenten des Immunsystems möglich. Um die Anzahl der Erreger möglichst gering zu halten, müssen die mikrobiziden

Effektormechanismen der MΦ durch das frühe Vorhandensein von IFN- $\gamma$  aktiviert werden. Eine Beeinträchtigung des Immunsystems in der Fähigkeit, IFN- $\gamma$  zu produzieren oder auf IFN- $\gamma$  zu reagieren, resultiert in einer erhöhten Anfälligkeit gegen diese Pathogene (vergl. Tab. 1). IFN- $\gamma$  defiziente und IFN- $\gamma$ -Rezeptor defiziente Mäuse bilden erst einen normalen Phänotyp aus, bei einer Infektion zeigt sich jedoch eine drastisch erhöhte Anfälligkeit gegenüber mikrobiellen Erregern wie *Listeria monocytogenes* (Huang et al., 1993). Diese Beobachtungen zeigen, dass die durch IFN- $\gamma$  induzierten Reaktionen im Gegensatz zu denen anderer Zytokine nicht redundant sind. Hierdurch wird der Stellenwert dieses Zytokins für die Ausbildung einer effektiven Immunantwort unterstrichen.

Die biologische Wirkung von IFN- $\gamma$  ist vielfältig und umspannt die Koordination und Induktion vieler Reaktionen der angeborenen und erworbenen Immunantwort.

#### **1.4.1 Induktion der nicht spezifischen, zytotoxischen Immunantwort**

Durch IFN- $\gamma$  aktivierte MΦ zeigen eine verstärkte rezeptorvermittelte Phagozytose. Eine der wichtigsten Funktionen von IFN- $\gamma$  ist die Induktion von mikrobiziden Effektorfunktionen bei MΦ und neutrophilen Granulozyten. IFN- $\gamma$  induziert das NADPH-abhängige Phagozyten-Oxidase-System (NADPH-Oxidase-System) und die Bildung des Enzyms Stickoxid-Synthase 2 (NOS 2, iNOS).

Durch die NADPH-Oxidase werden Superoxid-Anionen ( $O_2^-$ ) gebildet (*respiratory burst*) und in das Phagosom eingeschleust. Dort reagieren die Superoxid-Anionen mit dem Inhalt der Phagosomen zu unterschiedlichen toxischen Intermediaten (*reactive oxygen intermediates*, abgekürzt ROI), z.B. Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal und hypochlorige Säure. Die Exozytose dieser Intermediate ist ein wichtiger Mechanismus, um extrazelluläre Erreger anzugreifen. Aber dieser Mechanismus verursacht auch Gewebeschädigungen (z.B. Endothel), eine erhöhte Permeabilität der Gefäße, sowie verstärktes Absterben von Zellen.

NO-Synthasen bilden durch NADPH-abhängige Umsetzung von L-Arginin zu L-Citrullin Stickoxide (NO). Drei NO-Synthasen sind bekannt. Die NOS 1 und NOS 3 werden konstitutiv in der Zelle exprimiert, produzieren aber nur geringe NO-Mengen, z.B. für die Zell-Zell Kommunikation bei Endothel- und Nervenzellen (Farrar und Schreiber, 1993). IFN- $\gamma$  induziert die Synthese der NOS 2 (auch induzierbare NO-Synthase, iNOS). Dieses Enzym ist in der Lage, große Mengen NO und damit NO-Intermediate (*reactive nitrogen intermediates*, RNI) zu produzieren. Desweiteren wird durch IFN- $\gamma$  auch eine verstärkte Synthese von Enzymen induziert, die Ausgangsprodukte und Cofaktoren für die NO-Synthese zur

---

Verfügung stellen (Argeninosuccinat-Synthase für die Darstellung von L-Arginin, GTP-Cyclohydroxylase für die Tetrahydrobiopterin-Produktion). Die IFN- $\gamma$  induzierte NO Produktion ist der wesentliche Mechanismus bei der Abwehr von intrazellulären Erregern in M $\Phi$ .

Die Induktion der RNI Produktion dauert länger als die ROI Bildung. Während ROI eine Stunde nach Aktivierung messbar sind, treten RNI erst 24 h nach Aktivierung der M $\Phi$  auf. Sind beide Systeme parallel aktiv, wird das Spektrum der mikrobiziden toxischen Intermediate durch Reaktionen der Produkte untereinander erweitert. Die Bedeutung dieser mikrobiziden Effektormechanismen wird bei der Betrachtung von Mäusen mit einem genetischen Defekt in der NADPH-Oxidase oder der iNOS sichtbar. Diese Tiere sind hochgradig anfällig gegen mikrobielle Erreger.

Der hier aufgezeigte Mechanismus über die Produktion von RNI beruht im Wesentlichen auf Beobachtungen aus dem murinen System. Die physiologische Bedeutung dieses Mechanismus im humanen System ist noch nicht endgültig geklärt (MacMicking et al., 1997, Mestas und Hughes, 2004)

IFN- $\gamma$  verstärkt die Synthese von verschiedenen Komponenten des Komplementsystems durch Monozyten / M $\Phi$  und Fibroblasten (z.B. C2, C4 und Faktor B). Auch werden die Komplementrezeptoren auf M $\Phi$  heraufreguliert. Auf diese Weise werden die humoralen Komponenten der natürlichen Infektabwehr durch die Einwirkung von IFN- $\gamma$  verstärkt.

#### **1.4.2 Regulation der MHC vermittelten Immunantwort**

Bei Brandopfern während des 2. Weltkrieges sind Abstoßungsreaktionen bei Hauttransplantationen beobachtet worden. Transplantationsexperimente an Mäusen haben gezeigt, dass sich die Gewebekompatibilität über genetische Unterschiede in einer gewissen Region definiert. Diese Region ist als Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: *major histocompatibility complex*, MHC) bezeichnet worden (Janeway et al., 2002).

MHC Moleküle sind membranständige Glykoproteine, die den Immunstatus von Zellen anzeigen. Es gibt zwei Klassen von MHC Molekülen MHC I und MHC II. Beide Klassen haben grundlegende, strukturelle Gemeinsamkeiten, z.B. eine spaltenbildende, extrazelluläre Domäne, über die der Umgebung Peptide präsentiert werden. Der Unterschied liegt in den Kompartimenten, aus denen diese Peptide stammen.



Die MHC I Moleküle präsentieren Peptide, die von den Proteasomen im Zytosol der Zelle gebildet werden. Die Proteasomen der mit Viren oder intrazellulären Erreger infizierten Zellen verarbeiten auch körperfremde Peptide. Diese werden zusammen mit dem MHC I Molekül auf der Zellmembran präsentiert. Auf diese Weise werden diese Zellen von den Immunzellen als infiziert erkannt.

MHC II Moleküle präsentieren Peptide, die von internalisiertem Material aus den Phagosomen stammen. Hierdurch wird vor allem T-Helferzellen angezeigt, dass die Integrität des Organismus durch körperfremdes Protein gestört ist.

MHC I und MHC II Moleküle sind auf unterschiedlichen Zellpopulationen exprimiert. MHC I Moleküle sind nahezu auf allen Zellpopulationen des Organismus unterschiedlich stark exprimiert, da jede Zelle potentiell infiziert werden kann und sich damit ihr Immunstatus ändert. Demgegenüber sind MHC II Moleküle nur auf Effektorzellen exprimiert, die auf externe Erreger reagieren. Hierzu gehören in erster Linie die Antigen-präsentierenden Zellen wie Monozyten, M $\Phi$ , DC und B-Zellen (Janeway et al., 2002)

Sowohl durch IFN- $\gamma$ , als auch durch IFN- $\alpha$  /  $\beta$  werden verstärkt MHC-I-Peptid-Komplexe auf Körperzellen exprimiert. Auf diese Weise werden die infizierten Zellen durch die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zellen und durch Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptor der zytotoxischen [CD8(+)] T-Zellen besser erkannt und schneller eliminiert.

IFN- $\gamma$  induziert die Bildung von speziellen Proteasom-Untereinheiten. Hierdurch werden Immunproteasome gebildet, die für eine MHC I Beladung optimierte Peptide produzieren. Desweiteren wird die Anzahl der Proteasome im Zytosol durch IFN- $\gamma$  erhöht. Somit kann eine höhere Anzahl von Peptiden für die Beladung bereitgestellt werden (Schroder et al., 2004). Die MHC I vermittelte Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger wird durch diese Mechanismen insgesamt verbessert.

IFN- $\gamma$  ist als einziges Interferon in der Lage, Funktionen in Zusammenhang mit der Antigenpräsentation über die MHC II Moleküle zu regulieren. Durch den Einfluss von IFN- $\gamma$  werden verstärkt die Proteinbausteine, aus denen die MHC II Moleküle zusammengesetzt sind, produziert. Auch werden verstärkt MHC II Moleküle auf der Zellmembran von Monozyten, M $\Phi$  (Bancroft et al., 1986) und DC exprimiert; bei den B-Zellen jedoch wird die MHC II Expression herabreguliert (Farrar und Schreiber, 1993). Auch werden verstärkt costimulatorische Moleküle, u.a. die B7 Moleküle (CD80, CD86) und CD40, exprimiert. Die von diesen Molekülen vermittelten Signale sind essentiell für die Aktivierung von

antigenspezifischen T-Zellen. Verschiedene, für die Bildung von Peptiden im Phagosom notwendige Enzyme werden ebenfalls durch IFN- $\gamma$  verstärkt produziert (Schroder et al., 2004). Diese Mechanismen führen insgesamt zu einer optimierten, MHC II vermittelten Präsentation von erregerspezifischen Peptiden, was zu einer verbesserten Proliferation und Ausdifferenzierung von antigenspezifischen [CD4(+)] T-Helferzellen führt.

### **1.4.3 IFN- $\gamma$ in der erworbenen Immunantwort**

Mossmann und Mitarbeiter haben die Polarisierung von T-Helferzellpopulationen und die damit verbundenen Unterschiede in der Regulation der Immunantwort aufgezeigt (Mosmann et al, 1986). Speziell im murinen System ist zu beobachten, dass durch unterschiedliche Erreger T-Helferzellen (Th-Zellen) aktiviert werden, typische Zytokinprofile auszubilden (Mestas und Hughes, 2004). Man spricht in diesem Zusammenhang von einer Typ-1 oder Typ-2 regulierten Immunantwort. Th1-Zellen unterstützen die Typ-1 regulierte Infektabwehr, die auf der zellulären Immunantwort basiert. Dies ist der wesentliche Mechanismus in der Abwehr gegen Viren und intrazelluläre Bakterien, gegen entartete, körpereigene Zellen, bei der Ausbildung von hypersensitiven Hautreaktionen (*delayed type hypersensitivity*) und bei der Bildung von Entzündungen. Die Th1-Zellen produzieren die für die zelluläre Immunantwort charakteristischen Zytokine IL-2 und IFN- $\gamma$ . Th2-Zellen unterstützen die Typ-2 regulierte Infektabwehr. Diese basiert im Wesentlichen auf der Produktion von Antikörpern (humorale Immunantwort). Dieser Mechanismus wird bei der Abwehr von größeren extrazellulären Parasiten, z.B. Helminthen aktiv. Die Th2-Zellen sezernieren bei einer Typ-2 Immunantwort typische Zytokine wie IL-4, IL-10 und IL-13. Bei der Ausbildung von Immuntoleranz z.B. gegenüber dem Fetus während einer Schwangerschaft oder gegenüber dem Spenderorgan nach einer Transplantation ist nur die Typ-2 Immunantwort aktiv (Kidd, 2003).

Durch ihre charakteristischen Zytokinprofile regulieren sich diese beiden Reaktionsmechanismen gegenseitig herunter und schließen auf diese Weise eine parallele Reaktion aus. IFN- $\gamma$  dirigiert eine Immunantwort in Richtung einer Th1 vermittelten, zellulären Infektabwehr. Es unterdrückt die Proliferation von Th2-Zellen und damit die Produktion von Th2 generierten Zytokinen. Stattdessen wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen z.B. IL-12 (Yoshida et al., 1994), unterstützt, somit auch die Ausbildung von Entzündungsreaktionen.

IFN- $\gamma$  unterstützt die Ausbildung von opsonisierenden Antikörpern des Types Immunglobulin G2a bei der B-Zell-Reifung. Auch wird die Expression von Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf den

mononuklearen Phagozyten heraufreguliert. Hierdurch wird der Mechanismus der Antikörper abhängigen, zellvermittelten Zytotoxizität verstärkt (*antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC).

#### **1.4.4 Regulation der Leukozyten-Wanderung**

IFN- $\gamma$  reguliert die am Entzündungsherd gelegenen Interaktionen der Leukozyten mit dem Endothelgewebe. Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) werden auf den Endothelzellen heraufreguliert und Chemokine (IP-10, MCP-1, MIG, MIP-1 $\alpha/\beta$ , Rantes) werden sezerniert. Durch diesen Prozess werden Immunzellen zu dem Entzündungsherd geleitet. NO und IFN- $\gamma$ , die am Entzündungsherd entstehen, verursachen eine Verminderung des Gefäßtonus der Blutgefäße und eine Verminderung des Zusammenhaltes der Endothelzellen (Dilatation). Damit verringert sich die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes in Bereich des Entzündungsherdes und die Blutgefäße werden durchlässig. Leukozyten, die durch das spezielle Zytokin- und Chemokinmilieu Oberflächenmoleküle wie Selektine und Integrine exprimiert haben, binden an membranständige Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen und wandern in das Gewebe zu dem Entzündungsherd (Diapedese).

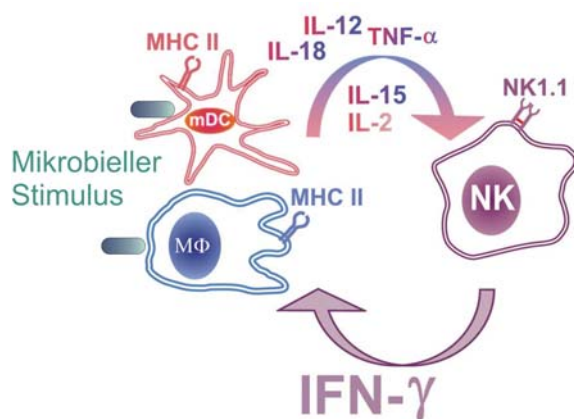
### **1.5 Zelluläre Quellen der frühen IFN- $\gamma$ Produktion**

In der Literatur wird die zelluläre Quelle von IFN- $\gamma$  während der natürlichen Immunantwort kontrovers diskutiert. T-Zellen sind, historisch gesehen, die erste Zellpopulation, bei der eine IFN- $\gamma$  Produktion nach Aktivierung gezeigt worden ist (Havel et al., 1982).

Bancroft und Mitarbeiter haben dann erstmals einen T-Zell-unabhängigen Weg der frühen IFN- $\gamma$  Produktion aufgezeigt (Bancroft et al., 1986, 1987 und 1991). Durch Experimente mit T-Zell- und B-Zell-defizienten Mäusen haben sie dargelegt, dass die frühe IFN- $\gamma$  Produktion von einem mikrobiellen Stimulus und dem Vorhandensein von DC / M $\Phi$  und NK-Zellen abhängt. Auf der Grundlage dieser Experimente ist das klassische bzw. parakrine Modell der frühen IFN- $\gamma$  Produktion erstellt worden. Hierbei werden M $\Phi$  und DC über die PRR durch mikrobielle Erreger aktiviert, proinflammatorische Zytokine zu produzieren (vergl. Abb. 1). Neben den Zytokinen IL-12, IL-15, IL-18 und TNF- $\alpha$ , die sowohl von M $\Phi$  (Doherty et al., 1996, Fehniger und Caligiuri, 2001) als auch von DC produziert werden (Mattei et al., 2001), sind DC auch in Lage, sehr schnell nach einer mikrobiellen Stimulation IL-2 zu produzieren (Granucci et al., 2001). Unter 1.7 werden die Zytokine IL-2 und IL-15 sowie deren Rezeptoren ausführlich betrachtet.

Die durch proinflammatorische Zytokine und über Zell-Zell Interaktionen aktivierten NK-Zellen werden selbst zu immunmodulatorischen Effektorzellen. Sie produzieren ebenfalls Zytokine. Ein für die Regulation der weiteren Immunantwort essentielles Zytokin ist hierbei IFN- $\gamma$ . Dieses frühe IFN- $\gamma$  wirkt wiederum immunmodulatorisch auf M $\Phi$  und DC. Es verstärkt unter anderem die Sekretion von den proinflammatorischen Zytokinen (Flesch et al., 1995; Ma et al., 1996) und entfaltet die unter 1.4 beschriebenen biologischen Wirkungen (Bancroft et al., 1987; Unanue, 1997; Fehniger und Caligiuri, 2001; Granucci et al., 2004).

**Abb. 9 Klassisches Modell der frühen IFN- $\gamma$  Produktion (Parakrines Stimmulationsmodell)**



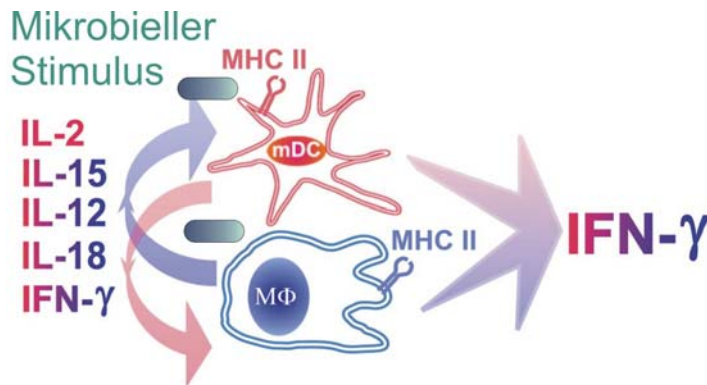
Über einen mikrobiellen Stimulus z.B. *Listeria monocytogenes*, werden M $\Phi$  und DC aktiviert. Sie produzieren Zytokine, u.a. IL-12, IL-18, die wiederum NK-Zellen über Rezeptoren auf deren Oberfläche aktivieren, ihrerseits Zytokine zu produzieren. Ein für die Immunantwort essentielles Zytokin ist hierbei IFN- $\gamma$ , das wiederum immunmodulatorisch auf die Antigen-präsentierenden Zellen einwirkt. (Bancroft et al., 1987; Unanue, 1997; Fehniger und Caligiuri, 2001; Granucci et al., 2004)

Aufgrund von in vitro Beobachtungen durch Stimulation mit IL-12 und IL-18 haben verschiedene Autoren gezeigt, dass M $\Phi$  (Puddu et al., 1997; Munder et al., 1998), DC (Ohteki et al., 1999; Fukao et al., 2000; Hochrein et al., 2000) und B-Zellen (Yoshimoto et al., 1997) ebenfalls als IFN- $\gamma$  Produzenten im Verlauf einer Infektion in Frage kommen könnten (Frucht et al., 2001; Ohteki, 2002). Die Autoren stellen als Schlussfolgerung ein Modell für die frühe IFN- $\gamma$  Produktion vor, bei dem M $\Phi$  und DC durch autokrine Stimulation die wesentliche Quelle für IFN- $\gamma$  in der natürlichen Infektabwehr darstellen.

M $\Phi$  und DC werden demnach durch einen mikrobiellen Stimulus über die PRR aktiviert und produzieren proinflammatorische Zytokine u.a. IL-12, IL-18 und IL-15 (Ohteki et al., 2001). Diese M $\Phi$  und DC werden dann durch IL-12, IL-15 und IL-18 über einen autokrinen Mechanismus aktiviert, IFN- $\gamma$  zu produzieren. Gleichzeitig aktivieren sie ruhende M $\Phi$  und DC in der Umgebung zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. Die Kombination von IL-12, IL-18 und IFN- $\gamma$  führt zu einer effektiveren Aktivierung von ruhenden M $\Phi$  und

DC und damit zu einer verstärkten Produktion von IFN- $\gamma$ . (Fukao et al., 2000; Frucht et al., 2001).

**Abb. 10 Autokrines Stimulationsmodell der frühen IFN- $\gamma$ Produktion**



Mikrobiell aktivierte Makrophagen (MΦ) und Dendritische Zellen (DC) produzieren unter anderem die Zytokine IL-12 und IL-18. Die Kombination dieser Zytokine stimuliert die MΦ und DC über einen autokrinen Mechanismus zur Produktion von IFN- $\gamma$ . Auch werden in der Nähe befindliche ruhende MΦ und DC durch die Kombination von IL-12, IL-18 und IFN- $\gamma$  aktiviert und zur Produktion von IFN- $\gamma$  stimuliert. Nach den Aussagen verschiedener Autoren (unter anderem Frucht et al., 2001; Ohteki, 2002) spielt der hier dargestellte autokrine Mechanismus eine wesentliche Rolle bei der Erreger stimulierten Produktion von IFN- $\gamma$  während der natürlichen Immunantwort

Eine schwierige Aufgabe des Immunsystems ist es, eine effektive Immunabwehr gegen einen eingedrungenen Erreger zu entwickeln und zu verhindern, dass eine systemische Entzündungsreaktion dem Organismus schweren Schaden zufügt. Daher wird die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen strikt reguliert, was im Folgenden am Beispiel von IL-12 kurz dargelegt wird. Tripp und Mitarbeiter haben gezeigt, dass IL-12 ein notwendiger Faktor für die mikrobiell induzierte IFN- $\gamma$  Produktion *in vitro* ist (Tripp et al., 1993). Bei einer primären Infektion von B- und T-Zell defizienten Mäusen sowie immunkompetenten Mäusen mit *Listeria monocytogenes* ist die endogene IL-12 Produktion für die Abwehr des Erregers absolut notwendig (Tripp et al., 1994). Jedoch in hohen Konzentrationen ist IL-12 ein toxischer Faktor, der auch letal wirken kann (Cousens et al., 1999; Leonard et al., 1997). Die Produktion von proinflammatorischem IL-12 wird daher unter anderem durch antiinflammatorische Zytokine wie Interleukin 10 (IL-10) und *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ ;) reguliert. IL-10 inhibiert die IL-12 Produktion auf der Ebene der Transkription, während TGF- $\beta$  die Stabilität der IL-12 mRNA (IL-12 p40 mRNA) reduziert (Ma, 2001).

---

TGF- $\beta$  und IL-10 regulieren unter anderem auch die iNOS-Synthase in M $\Phi$  herunter und inhibieren auf diese Weise eine weitere NO-Produktion (MacMicking et al., 1997; Gazzinelli et al., 1992). Damit werden die M $\Phi$  als zytotoxische Effektorzellen inhibiert, was stärkere Gewebeschädigungen durch RNI und ROI verhindert.

## 1.6 NK-Zellen: Effektorzellen der natürlichen Immunantwort

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind unter 1.2 als zelluläre Komponenten der natürlichen Immunität vorgestellt worden. Ihre wesentlichen Effektorfunktionen sind das Abtöten von als fremd, entartet oder infiziert erkannten Zellen sowie die Regulation der Immunantwort durch die Produktion von Zytokinen. In den frühen 1970-iger Jahren sind NK-Zellen als zytotoxische Lymphozyten identifiziert worden, die in der Lage waren, spontan, ohne vorherige Stimulation, Tumorzellen abzutöten (Kiessling et al., 1975a) Diese Eigenschaft der natürlichen Zytotoxizität (*natural killings*) gab dieser Zellpopulation auch ihren Namen.

Ljunggren und Kärre haben erstmals gezeigt, dass die spontane Zytotoxizität der NK-Zellen durch MHC I auf der Oberfläche der Zielzellen inhibiert wird. Diese Beobachtung führte zu der Aufstellung der *missing self* - Hypothese im Zusammenhang mit der spontanen Zytotoxizität der NK-Zellen (Ljunggren und Kärre, 1990). Hierbei exprimieren reife NK-Zellen auf ihrer Membranoberfläche aktivierende und inhibierende Rezeptoren (z.B. bei murinen NK-Zellen CD94-NKG- und Ly 49-Rezeptoren), wobei die Expression dieser Rezeptortypen stochastisch über die NK-Zellpopulation verteilt ist. Die zytotoxische Effektorfunktion jeder NK-Zelle wird durch die Summe der über die Rezeptorbindungen in die Zelle transduzierten, aktivierenden und inhibierenden Signale ausgelöst oder inhibiert. Ein wichtiger Ligand für die inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren ist hierbei der mit Selbst-Peptiden beladene MHC-I Komplex (Carayannopoulos und Yokoyama, 2004).

Die Stimulation von NK-Zellen über membranständige Zytokinrezeptoren führt zu einer Produktion von Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , GM-CSF, und TNF- $\alpha$  und Chemokinen wie ATAC, MIG und MIP-1 $\alpha$  (Dorner et al., 2004). Zu den NK-Zell-aktivierenden Zytokinen gehören sowohl von M $\Phi$  und DC produziertes IL-12, IL-18, IL-15, sowie von DC produziertes IL-2 (vergl. 1.5), als auch Typ I Interferone (vergl. 1.4). Die Effekte der Zytokine auf die NK-Zellen sind differentiell reguliert. Typ I Interferone aktivieren über den Transkriptionsfaktor STAT1 die NK-Zytotoxizität. Das proinflammatorische Zytokin IL-12 aktiviert über STAT4 abhängige Signalwege die IFN- $\gamma$  Produktion. Hierbei inhibieren die STAT1-abhängigen Signalwege die STAT4-abhängige Signaltransduktion (Nguyen et al., 2000; Nguyen et al.,

2002). Dies zeigt die Komplexität der NK-Zellregulation auf. In dieser Arbeit wurden nur die immunmodulatorischen Eigenschaften der NK-Zellen als IFN- $\gamma$  Produzenten betrachtet.

NK-Zellen exprimieren im Gegensatz zu T-Zellen und B-Zellen keine auf Genrekombination beruhenden antigenspezifischen Rezeptoren wie den T-Zellrezeptor oder den B-Zellrezeptor (Kim et al., 2000). Aus diesem Grund entwickeln sich NK-Zellen auch in genetisch defizienten *knock out* Mäusen normal, deren Mechanismen für die somatische Genrekombination defekt sind, z.B. bei der *scid*<sup>-/-</sup> und der *rag*<sup>-/-</sup> Mutation (Dorshkind et al., 1985; Mombaerts et al., 1992, vergl. 1.2.2).

Die Entwicklung der NK-Zellen ist im murinen System relativ gut charakterisiert. Sie findet im Knochenmark aus pluripotenten Vorläuferzellen statt (*common lymphocyte progenitor*, CLP). Diese Vorläuferzelle ist auch der Ursprung für die T-Zellen und B-Zellen, nicht aber für die Entwicklungslinie der myeloiden Zellen (Kondo et al., 1997). Die CLP differenziert zu einer Vorläuferzelle für NK-Zellen und T-Zellen (*T/NK progenitor*, T/NKP). Der NK1.1 Marker (s.u.) wird von diesen Vorläuferzellen im fetalen Thymus und im fetalen Blut schon exprimiert, während diese Vorläuferzellen in der fetalen Leber diesen Marker nicht exprimieren. Die T/NKP sind in adulten Geweben noch nicht nachgewiesen worden. Sie differenzieren weiter zu NK-Vorläuferzellen (*NK progenitor*, NKP) aus. Diese exprimieren sowohl im Fetus als auch bei adulten Tieren die IL-2/IL-15 Rezeptor  $\beta$  Kette (CD122) auf der Oberfläche und bilden den Ursprung für NK-Zellen und die NK-T-Zellen (Rosmaraki et al., 2001). CD122 bildet zusammen mit der IL-15 $\alpha$ -Kette und einer gemeinsamen gamma Kette (*common  $\gamma$  chain*, CD132) den *high affinity* IL-15 Rezeptor (s.u.). Die Expression von CD122 auf der Oberfläche der NKP zeigt an, dass diese Zellen sensitiv für IL-15 und für IL-2 sind. Im folgenden wird auf diese beiden Zytokine, deren Rezeptoren und deren Bedeutung für die frühe IFN- $\gamma$  Produktion eingegangen

## 1.7 Eigenschaften von IL-15 und IL-2

IL-2 und IL-15 gehören aufgrund ihrer Proteinstruktur zu der Familie der *four-helix-bundle* Zytokine (vergl. Abb. 3). Sie weisen aber auf der DNA-Ebene und in der Abfolge der Aminosäuren (Primärstruktur der Proteine) keine Homologien auf. Erst die Sekundär- und Tertiärstruktur weisen gleiche strukturelle Merkmale auf, die es beiden Zytokinen ermöglicht, an Einheiten des gleichen Rezeptors zu binden und somit in vitro eine hohe Redundanz zu zeigen (Giri et al., 1994; Carson et al., 1994)

---

Beide Zytokine binden mit gleicher Affinität ( $K_a \approx 10^9 \text{ M}^{-1}$ ; Fehniger, 2001) an die  $\beta$ -Kette (CD122; Bamford et al., 1994; Grabstein et al., 1994) und die  $\gamma$ -Kette (CD132; Lin, 1995) des IL-2/IL-15-Rezeptors. Diese beiden Rezeptorketten übertragen die Signale in die Zelle. CD132 ist neben den IL-2 und IL-15 Rezeptoren auch Bestandteil anderer Rezeptoren und definiert so eine Unterfamilie der Hematopoietin-Rezeptoren (Perera, 2000). Hierzu gehören auch die Rezeptoren für IL-4, IL-7, IL-9 und IL-21. Aber nur von den Zytokinen IL-2 und IL-15 ist bekannt, dass sie auch die  $\beta$ -Kette CD122 teilen.

Durch die Bindung von IL-2 werden die zytoplasmatischen Bereiche der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten CD122 und CD132 auf der Membran von NK-Zellen und T-Zellen in räumliche Nähe gebracht. Beide Untereinheiten weisen keine eigene katalytische Aktivität auf. Eine Reihe von Protein-Tyrosinkinasen, unter anderen die Janus Kinasen JAK-3 und JAK-1 (Johnston et al., 1994; Witthuhn et al., 1994), sind in der Lage, mit den zytoplasmatischen Domänen von CD132 und CD122 nach der Bindung von IL-2 zu interagieren, die Signale in die Zelle weiterzuleiten und so die Zellproliferation, Inhibition von Apoptose (z.B. über Bcl-2 Proteine) und die Proteinsynthese weiterer Gene zu aktivieren. Die JAK Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren STAT3 (*signal transducers and activators of transcription*) und STAT5 sowie deren Translokation in den Zellkern (Lin, 1995; Ellery und Nichols, 2002). Für die Signaltransduktion von IL-15 konnten identische Resultate aufgezeigt werden (Lin et al., 1995).

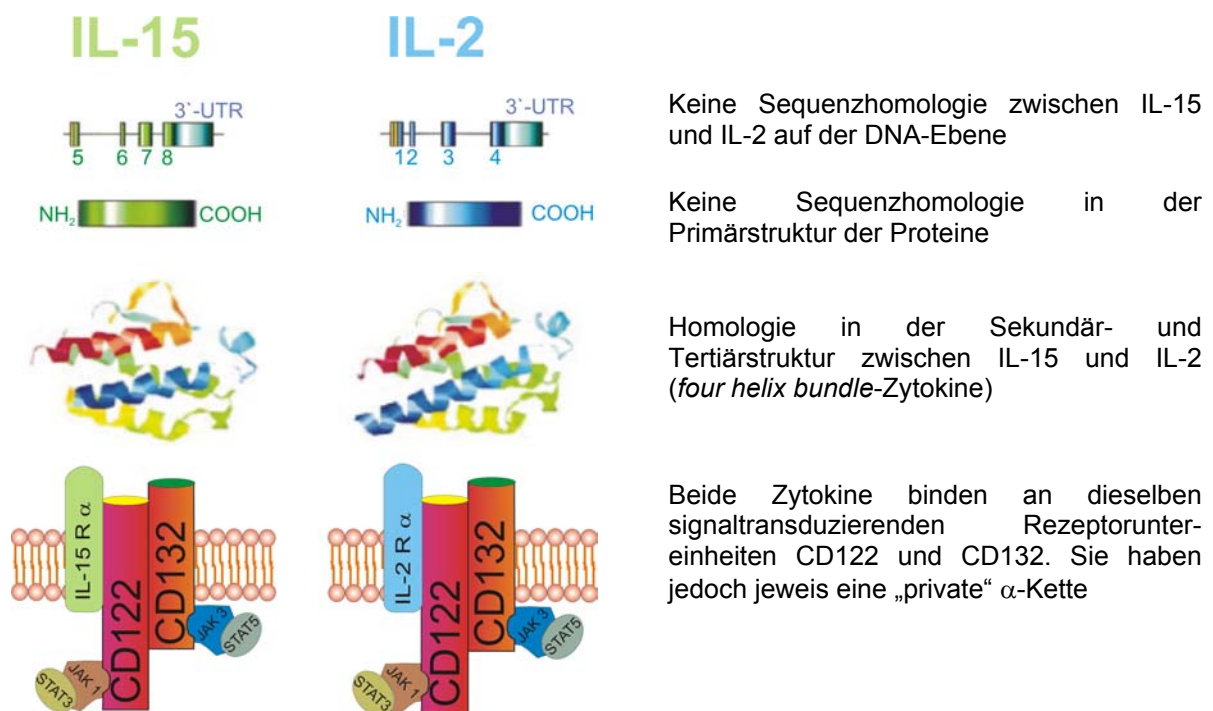
Für beide Zytokine konnte jeweils eine zytokinspezifische, „private“  $\alpha$ -Kette isoliert werden. IL-2 bindet an die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (IL-2 R $\alpha$ , CD25) allein ( $K_a = 10^8 \text{ M}^{-1}$ , Fehniger und Caligiuri, 2001) nur mit geringer Affinität, sie bildet aber im Komplex mit CD122 und CD133 den *high affinity* Rezeptor für IL-2 ( $K_a = 10^{11} \text{ M}^{-1}$ ; Fehniger und Caligiuri, 2001). Giri und Mitarbeiter haben ebenfalls eine private  $\alpha$ -Kette für IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) identifiziert (Giri et al., 1995). IL-15 bindet mit hoher Affinität an IL-15R $\alpha$  ( $K_a > 10^{11} \text{ M}^{-1}$ , Fehniger und Caligiuri, 2001), auch hier bildet sie gemeinsam mit CD122 und CD132 den *high affinity* Rezeptor für IL-15.

Beide Proteinketten sind in ihrer Struktur ähnlich aufgebaut, aber sie unterscheiden sich in ihrem zytoplasmatischen Teil. Der zytoplasmatische Teil von CD25 besteht nur aus 11 Aminosäuren, der zytoplasmatische Teil von IL-15R $\alpha$  besteht aus 37 Aminosäuren. Beide Ketten zeigen keine bekannten, für eine Signaltransduktion relevanten Bindungs- oder Phosphorylierungsmotive. So konnten auch keine Unterschiede bei der IL-15 induzierten



Proliferation zwischen dem normalen IL15R $\alpha$  und einer IL-15R $\alpha$  ohne zytoplasmatischen Aminosäurerest gezeigt werden (Anderson et al., 1995). Demgegenüber haben Bulanova und Mitarbeiter am Modell einer lymphoblastoiden B-Zelllinie (Rajii) gezeigt, dass eine Signaltransduktion über IL15R $\alpha$  unter Beteiligung einer Tyrosinkinase (Syk-Kinase) stattfinden kann (Bulanova et al., 2001). Es wurde allerdings auch berichtet, dass die B-Zellfunktionen in IL-15R $\alpha$  defizienten Mäusen normal reguliert sind (Lodolche et al., 2002).

**Abb. 11** Gemeinsamkeiten von IL-2 u. IL15 und deren Rezeptoren



IL-2 und IL-15 sind auf unterschiedlichen Chromosomen im Genom mit einer unterschiedlichen Intron-Exonstruktur codiert. Die Aminosäuresequenz der beiden Zytokine weist wenig Homologie auf. Sie bilden aber eine ähnliche Tertiärstruktur aus, die eine Bindung an dieselben signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten CD122 und CD132 ermöglicht. Beide hochaffinen Rezeptoren haben jedoch eine spezielle, „private“  $\alpha$ -Kette (verändert nach Fehniger und Caligiuri, 2001)

Tagaya und Mitarbeiter konnten auf Mastzelllinien eine CD122 unabhängige Variante des IL-15 Rezeptors identifizieren, die aber für die vorliegende Arbeit keine Relevanz hat (Tagaya et al., 1996; Bulanova et al., 2003).

Murine NK-Zellen verlieren in Kultur schnell ihre Funktionalität. Hepert und Mitarbeiter haben gezeigt, dass sowohl IL-2 als auch IL-15 in gleicher Weise die Vitalität von NK-Zellen der Milz von B6C3F1 Mäusen nach 18 h einer in vitro Kultur verstärken können. Jedoch

waren beide Zytokine auch in der höchsten Konzentration nicht in Lage, die Populationsstärke der Ausgangspopulation (NK-Zellpopulation ohne in vitro Inkubation) über die Inkubationszeit zu erhalten (Hepert und Pruetz, 2001).

Es ist gezeigt worden, dass beide Zytokine, IL-2 und IL-15, in Lymphozyten die Bildung von Proteinen induzieren, die diese so vor Apoptose schützen, (Armant et al., 1995; Carson et al., 1997). Die Mitglieder dieser antiapoptotisch wirkenden Proteinfamilie sind Bcl-2 (Minagawa et al., 2002), Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, A1. Diese Proteine blockieren in verschiedenen Zelltypen, unter anderem NK-Zellen, die Apoptose. Durch diese Eigenschaft wird diesen Proteinen auch eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren zugeschrieben. Es gibt aber auch Mitglieder dieser Proteinfamilie, die proapoptotisch wirken wie Bad, Bak, Bax und Bcl-X<sub>s</sub>. Die Interaktion zwischen den antiapoptotischen den proapoptotischen Mitgliedern dieser Proteinfamilie scheint hier eine Rolle in ihrer Funktion zu spielen, ein genauer Mechanismus ist aber nicht bekannt ([www.bdbiosciense.com](http://www.bdbiosciense.com), *Apoptosis* ). Unterschiede zwischen IL-2 und IL-15 in Bezug auf den Erhalt der Vitalität von murinen NK-Zellen sind nicht aufgezeigt worden

Obwohl IL-2 und IL-15 an dieselben Rezeptoruntereinheiten binden, konnten auch deutliche Unterschiede zwischen diesen beiden Zytokinen herausgearbeitet werden, die eine Redundanz in vivo unwahrscheinlich erscheinen lassen.

IL-15 defiziente Mäuse zeigen eine erhebliche Reduktion bei der CD8(+) *memory* T-Zell Population, der NK-T-Zell-Population, sowohl im Thymus als auch in der Peripherie, und auch bei Subpopulationen der sich außerhalb des Thymus entwickelnden intraepithelialen Lymphozyten ([ $\gamma\delta$ TCR(+)] intraepitheliale Lymphozyten, [ $\gamma\delta$ TCR(+)] IEL). Sie weisen jedoch keine NK-Zellen mehr auf. Diese Beobachtung zeigt die essentielle Rolle von IL-15 bei Entwicklung speziell der NK-Zellpopulation (Kennedy et al., 2000). Williams und Mitarbeiter unterstreichen die Bedeutung von IL-15 für die Entwicklung von NK-Zellen. Sie haben gezeigt, dass mit Hilfe eines speziellen IL-15-haltigen Zellkulturmediums aus frühen Vorläuferzellen des Knochenmarks in vitro zytotoxische NK-Zellen ausdifferenziert werden können (Williams et al., 1997 ; Williams et al., 1999). Die Entwicklung von NK-Zellen bei IL-2 defizienten Mäusen verläuft dagegen normal (Kundig et al., 1993). Dies zeigt, dass IL-2 für die NK-Zell-Entwicklung in vivo keine Rolle spielt.

Demgegenüber zeigen IL-2 defiziente Mäuse eine starke Vergrößerung der peripheren lymphoiden Organe. Diese geht mit einer polyklonalen Expansion von T-Zellen und B-Zellen einher, welche durch das Fehlen des IL-2 vermittelten *activation induced cell death* (AICD) ausgelöst wird. Durch diesen Mechanismus werden T-Zellen eliminiert, die auf

Selbst-Antigene reagieren. Auch aktivierte und proliferierende [CD4(+)] T-Zellen exprimieren nach einer erneuten Stimulation über den T-Zellrezeptor Rezeptoren aus der TNF-Rezeptorfamilie (z.B. FAS-Ligand) auf ihrer Oberfläche, über die Apoptose ausgelöst wird (Waldmann et al., 2001). IL-15 verhindert dagegen AICD und verlängert das Überleben der Lymphozyten (Marks-Konczalik et al., 2000).

IL-2 wird vornehmlich von aktivierten T-Zellen produziert und auf der Ebene Transkription und der Stabilisierung der mRNA reguliert. Demgegenüber ist die IL-15 mRNA weit verbreitet (Grabstein et al., 1994). Northern Blot Analysen zeigen IL-15 mRNA u.a. in der Plazenta, Skelettmuskel, Niere, Lunge, Herzmuskel, in Fibroblasten und Epithelzellen. Trotz der anscheinend großen Verbreitung von IL-15 haben Bamford und Mitarbeiter beobachtet, dass bei in vitro durch IFN- $\gamma$  / LPS aktivierten Monozyten große Mengen IL-15 mRNA nachweisbar ist, jedoch konnten Sie im Kulturüberstand kein sezerniertes IL-15 Protein über einen ELISA oder Bioassay nachweisen (Bamford et al., 1996). Die Autoren haben gezeigt, dass die IL-15 Produktion auf der Ebene der Transkription über eine nicht translatierte Sequenz (5'UTR, untranslated region) und auf der Ebene des Proteins über verschiedene Signalpeptide (Tagaya et al., 1997) sowie über den Carboxy-Terminus des reifen Proteins restriktiv reguliert wird (Bamford et al., 1998). Über diese Regulationsmechanismen hinaus wurden für die Signaltransduktion von IL-15 in Abgrenzung zu IL-2 juxtakine Mechanismen über membranassoziertes IL-15 gezeigt (Musso et al., 1999; Dubois et al., 2002; Sandau et al., 2004).

IL-2 und IL-15 scheinen in vivo unterschiedliche biologische Funktionen auszuüben. Bei in vitro Modellen in Bezug auf murinen NK-Zellen wurden Unterschiede zwischen diesen beiden Zytokine bisher wenig beachtet.

In der Literatur wird sowohl für IL-2 als auch für IL-15 ein starkes proinflammatorisches Potential zur Regulation der frühen IFN- $\gamma$  Produktion beschrieben (vergl. 1.5).

Frühe Arbeiten haben gezeigt, dass NK-Zellen in vitro durch IL-2 (bzw. in Kombination mit IL-12) zu einer IFN- $\gamma$  Produktion aktiviert werden können (Trinchieri et al., 1984).

IL-2 ist als ein Zytokin beschrieben, das klassischer Weise von T-Zellen produziert wird und diese in vivo und in vitro zur Differenzierung und zur Proliferation anregt. Da IL-2 als typischer T-Zell-Faktor erst in der Effektorphase der erworbenen Immunität auftreten kann, ist für dieses Zytokin mit der Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion während der natürlichen

Immunität nicht in Verbindung gebracht worden. Die immunmodulatorische Phase der NK-Zellen ist in der Effektorphase der erworbenen Immunität schon vorüber (Biron et al., 1999).

Die Arbeiten von Granucci und Mitarbeitern haben jedoch gezeigt, dass [CD8 $\alpha$ (+)] DC nach einer mikrobiellen Stimulation durch *Escherichia coli* Bakterien früh aktiviert werden können, IL-2 sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Proteinebene zu produzieren. Aus diesen Beobachtungen ist die Hypothese aufgestellt worden, dass DC generiertes IL-2 an der Regulation der frühen IFN- $\gamma$  Produktion bei einer mikrobiell stimulierten Infektabwehr beteiligt ist. In darauffolgenden Arbeiten haben die Autoren, berichtet dass bei einem Zell-Zell Kontakt zwischen DC und NK-Zellen diese zu einer IFN- $\gamma$  Produktion aktiviert werden. Sie schließen aus diesen in vitro Beobachtungen, dass von DC endogen produziertes IL-2 ein essentielles Zytokin für Aktivierung von NK-Zellen ist (Granucci et al., 2004, Foti et al., 2004).

Monozyten, M $\Phi$ , und auch DC produzieren nach mikrobieller Stimulation IL-15 (Doherty et al., 1996; Mattei et al., 2001). Carson und Mitarbeiter haben gezeigt, dass humane Monozyten nach einer mikrobiellen Stimulation in vitro IL-15 produzieren und dieses endogen produzierte IL-15 für die Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK-Zellen essentiell ist (Carson et al., 1994). Avice und Mitarbeiter haben die Synergieeffekte von endogenem IL-12 und endogenem IL-15 bei der Produktion von IFN- $\gamma$  aufgezeigt (Avice et al., 1998).

In verschiedenen Infektionsmodellen sind für ein breites Spektrum an Infektionserregern Hinweise gezeigt worden, dass IL-15 als proinflammatorisches Zytokin bei der Abwehr dieser Erreger eine wichtige Rolle spielt. Beispiele für diese Infektionserreger sind *Mykobakterium bovis* (Bacillus Calmette Guerin, BCG), *Toxoplasma gondii* (Doherty et al., 1996), *Candida albicans*, *Escherichia coli* (Tran et al., 2003) *Salmonella choleraesuis* (Hirose et al., 1999); *Listeria monocytogenes* (Liu et al., 2000), *Herpes simplex virus* (Tsunobuchi et al., 2000). Bei der Immunabwehr stimuliert IL-15 in Synergie mit anderen proinflammatorischen Zytokinen, NK-Zellen NK-T Zellen und T-Zellen zu einer Produktion von frühem IFN- $\gamma$  (Yoshikai und Nishimura, 2000). Bei der Infektionen von Wildtyp-Mäusen mit einer letalen Dosis fakultativ intrazellulärer, grampositiver *Listeria monocytogenes* ist von IL-15-überexprimierenden Mäusen berichtet worden, dass diese Tiere die Infektionsdosis kontrollieren konnten (Yajima et al., 2001).

---

Die Frage, welches der beiden Zytokine *in vitro* und *in vivo* bei einer Infektion mit einem Erreger wesentlich an der Regulation der frühen IFN- $\gamma$  Produktion beteiligt ist, bleibt kontrovers diskutiert.

Verschiedene Autoren haben berichtet, dass IL-15 über die autokrine Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen in der Lage ist, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, z.B. IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  (Alleva et al., 1997), aber auch IL-12 und IFN- $\gamma$  (Ohteki et al., 2001, Ohteki, 2002) zu regulieren. Ohteki und Mitarbeiter behaupten, dass die Interaktion von IL-15 mit dem IL-2/IL-15 Rezeptorkomponenten auf Antigen-präsentierenden Zellen nach einer mikrobiellen Stimulation eine kritische Funktion für deren Aktivierung hat. Sie begründen Ihre Annahme u.a. damit, dass DC und M $\Phi$  von IL-15 defizienten Mäusen nach bakterieller Stimulation im Vergleich zu dem Wildtyp weniger IL-12, IFN- $\gamma$  und NO produzieren (Ohteki et al., 2001[CT123]). Die IFN- $\gamma$  abhängige Expression von MHC II und dem costimulatorischen Molekül CD40 ist bei den M $\Phi$  der IL-15 defizienten Mäuse ebenfalls gering. Die IFN- $\gamma$  Produktion der DC von IL-2 defizienten Mäusen ist jedoch normal (Ohteki, 2002).

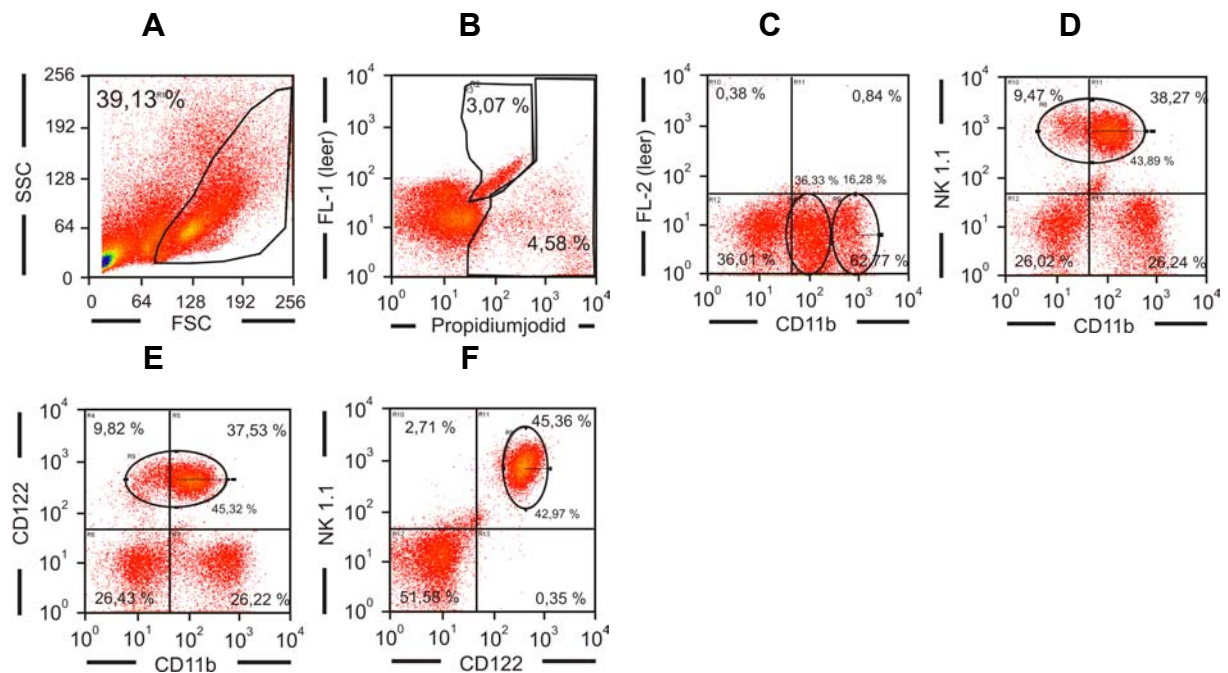
Frühe Arbeiten berichteten auch für IL-2 eine costimulatorische Wirkung auf murine Makrophagen in Verbindung mit IFN- $\gamma$  (Belosevic, 1990).

## **1.8 Verschiedene Oberflächenmarker von NK-Zellen**

NK-Zellen von verschiedenen Mausstämmen, unter anderem von der C57BL/6-Linie, tragen ein spezielles Oberflächenprotein, das NK1.1-Antigen (Glimcher et al., 1977). Koo und Peppard stellten 1984 einen Antikörper gegen dieses Oberflächenprotein vor (Koo und Peppard, 1984). Seit dieser Zeit hat sich dieser Antikörper als bester serologischer Marker für murine NK-Zellen etabliert. Dieser Marker allein definiert in WT Mäusen auch noch eine Subpopulation von speziellen T-Zell-Rezeptor [CD3(+)] exprimierenden NK1.1 (+) Zellen, die sog. NK-T-Zellen [CD3(+)/NK1.1(+)]. Murine NK-Zellen von verschiedenen Mausstämmen werden als [CD3(-)/NK1.1(+)] Zellpopulation beschrieben.

Weiterhin ist die Integrin- $\alpha$ -Kette CD11b auf der Membran einer Teilpopulation von NK-Zellen nachweisbar. NK-Zellen zeigen nach ihrer Aktivierung z.B. durch virale Bestandteile, eine verstärkte Expression von CD11b auf der Oberfläche (Kim et al., 2002).

**Abb. 12 Oberflächenmarker von NK-Zellen aus der RAG-1 Milz**



Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD122, NK1.1, CD11b markiert (C bis F). Diese Zellen wurden lebend im Durchflusszytometer mit einer Propidiumjodid (PJ)-Gegenfärbung analysiert. Zelltrümmer und degenerierte Zellen wurden über die Granularität (SSC) und die Größe (FSC) der gemessenen Events ausgeschlossen (A). Weiterhin wurden autofluoreszente Zellen und tote Zellen [PJ (+)] von der Analyse ausgeschlossen (B).

## 1.9 Infektionsmodell für die Untersuchung der IFN- $\gamma$ Produktion während der natürlichen Immunantwort

### 1.9.1 Der Erreger *Listeria monocytogenes*

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das Experimentelle Modell der murinen Listeriose gewählt. Dieses Modell geht auf G. B. Mackaness aus dem Jahre 1962 zurück, der in seinen grundlegenden Arbeiten die Bedeutung der zellulären Immunität für die Abwehr von Infektionen mit intrazellulären Erregern etablierte (Mackaness, 1962). Die protektive Rolle der zellulären Immunität bei der murinen Listeriose zeigt auf, dass Erkenntnisse aus diesem Modell auch auf andere intrazelluläre Erreger übertragbar sind (North und Conlan, 1998).

*Listeria monocytogenes* ist ein gram-positives fakultativ intrazelluläres Bakterium, das in der Natur weit verbreitet vorkommt. Von den sieben Arten der Gattung *Listeria* ist nur *L. monocytogenes* humanpathogen, während *L. ivanovii* und *L. monocytogenes* eine Listeriose in Tieren verursachen. *L. monocytogenes* stellt für gesunde Menschen keine Bedrohung dar (Hof

und Roccourt, 1992, Internetseite des Robert Koch-Institutes, 2003). Bei immunsupprimierten Personen kann dieser Erreger jedoch das Krankheitsbild der Listeriose hervorrufen. Die Folgen sind gekennzeichnet durch Sepsis, Enzephalitis und Meningitis und bei Schwangeren kann es zum Abort bzw. zu einer schweren Infektion des Neugeborenen führen. Die Mortalität liegt trotz Behandlung bei 20 bis 30 Prozent.

*L. monocytogenes* durchläuft im Wirt einen intrazellulären Infektionszyklus, für den mehrere Virulenzfaktoren verantwortlich sind. Die in den Wirt eingedrungenen Bakterien werden hauptsächlich durch MΦ über Phagozytose aufgenommen, können aber auch aktiv über die Virulenzfaktoren Internalin A bzw. B (InlA, InlB) in nicht-phagozytierende Zellen (z.B. Hepatozyten) eindringen. Aus der parasitären Vakuole entweichen sie in das Zytosol. Dafür sind das Hämolysin Listeriolysin O (LLO) sowie eine Phospholipase (PIPLC, Phosphatidylinositol-Phospholipase C) verantwortlich. Die Bakterien teilen sich im Zytosol. Für eine gerichtete Fortbewegung in diesem Kompartiment rekrutieren sie mit Hilfe des Virulenzfaktors ActA das Aktin der Wirtszelle, das in typischer Kometenschweif-artiger Form polymerisiert. Sie bilden Ausstülpungen der Zellmembran, die von benachbarten Zellen durch Abschnürung internalisiert werden. Dort sind die Listerien zunächst von einer Doppelmembran umschlossen, die mit Hilfe einer Lecithinase lysiert wird. Daraufhin beginnt der Infektionszyklus von neuem (North und Conlan, 1998).

### **1.9.2 Das Tiermodell**

Diese Arbeit thematisiert die Mechanismen der frühen Infektabwehr und somit in erster Linie die Interaktionen der zellulären Komponenten der natürlichen Immunität. Für das Studium dieser Interaktionen wurden vorrangig Tiere gewählt, die aufgrund einer homozygoten Mutation im *rag-1* Gen keine somatische Rekombination der Gensegmente, welche die Grundlage für den T-Zell-Rezeptor und den B-Zell-Rezeptor bilden, durchführen können. Die Entwicklung der T-Zellen und B-Zellen endet schon auf einer sehr frühen Stufe und damit sind sie im Phänotyp über die klassischen Marker (z.B. CD3 oder CD19) nicht mehr nachweisbar. Diese Tiere weisen im Vergleich mit syngenen Wildtyp-Mäusen sehr kleine Milzen und keine erkennbaren Lymphknoten auf. (Mombaerts et al., 1992). Die Entwicklung von NK-Zellen ist jedoch bei diesen T- und B-Zell defizienten Mäusen nicht beeinträchtigt (Dorshkind et al., 1985).

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere wurden auf der genetischen Grundlage des C57 BL/6 Mausstammes gewählt. Die NK-Zellen dieses Mausstammes exprimieren das NK1.1 Antigen konstitutiv auf der Membranoberfläche (Glimcher et al., 1977).

---

Für die Kontrolle der mit immundefizienten Tieren gewonnenen Ergebnisse wurden syngene, immunkompetente Wildtyp-Mäuse verwendet.

## 1.10 Ziele der Arbeit

Das Zytokin Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) ist bei der Abwehr von mikrobiellen Infekterregern sowohl im Verlauf der angeborenen als auch der erworbenen Immunantwort von zentraler Bedeutung. Der zelluläre Ursprung von IFN- $\gamma$  während der natürlichen Immunantwort wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Ein zentrales Thema dieser Arbeit ist die Frage nach der wesentlichen zellulären Quelle von IFN- $\gamma$  in der frühen Phase der Infektabwehr während einer primären, bakteriellen Infektion. Das Modell der murinen Listeriose soll auf diese Problemstellung hin optimiert werden. Hierzu sollen T- und B-Zell-defiziente C57BL/6 rag-1<sup>-/-</sup> Mäuse (RAG-1 Mäuse) mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* infiziert werden. In einer frühen Phase einer primären, systemischen Infektion sollen die Milzzellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Einzelzellniveau analysiert werden. Hierzu sollen die einzelnen Leukozytenpopulationen mit Hilfe geeigneter Marker identifiziert und auf die Expression von intrazellulärem IFN- $\gamma$  hin untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen dann auf syngene, immunkompetente C57BL/6-Mäuse ausgeweitet werden.

Die Regulation der frühen IFN- $\gamma$  Produktion ist abhängig von der Produktion verschiedener, proinflammatorischer Zytokinen nach einer mikrobiellen Stimulation. Sowohl für IL-2 als auch IL-15 ist in der Literatur beschrieben worden, dass sie früh nach einer bakteriellen Infektion produziert werden und dass sie eine wichtige Rolle bei der Regulation der frühen IFN- $\gamma$  Produktion einnehmen. IL-2 ist jedoch eher als Faktor bekannt, der von antigenspezifisch aktivierten T-Zellen produziert wird und somit erst zu einem späteren Zeitpunkt im Rahmen der erworbenen Immunantwort in Erscheinung tritt. Ein in vitro Modell soll Hinweise aufzeigen, welches dieser beiden Zytokine die Regulation der mikrobiell stimulierten, frühen IFN- $\gamma$  Produktion wesentlich beeinflusst. Hierzu sollen T- und B-Zell-defiziente RAG-1 Milzzellkulturen mit Hitze-inaktivierten oder vitalen Listerien zu einer IFN- $\gamma$  Produktion aktiviert werden. Durch Depletion von endogen produziertem IL-2 oder IL-15 mit Hilfe von spezifischen Antikörpern lässt sich dann der Einfluss dieser beiden Zytokine auf die mikrobiell induzierte IFN- $\gamma$  Produktion der RAG-1 Milzzellen untersuchen.

Für IL-2 und IL-15 konnten in vitro weitgehende Übereinstimmungen in ihren biologischen Eigenschaften aufgezeigt werden, da sie die signaltransduzierenden Komponenten eines

---



gemeinsamen Rezeptors nutzen. Allerdings gibt es Hinweise dafür, dass Sie unterschiedliche Funktionen im Organismus ausüben. So werden beide Zytokine unterschiedlich reguliert und zeigen unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung von NK-Zellen *in vivo*.

Sowohl für IL-2 als auch für IL-15 ist beschrieben worden, dass sie die Vitalität von murinen NK-Zellen *in vitro* erhalten können. Ein Vergleich dieser beiden Zytokine in der Wirkung auf die Vitalität von NK-Zellen aus der RAG-1 Milz soll aufzeigen, in wie weit sich die biologischen Eigenschaften *in vitro* überschneiden.

Verschiedene Autoren haben berichtet, dass IL-15 über eine autokrine Stimulation in der Lage ist, die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, unter anderem IL-12, zu regulieren. Mit Hilfe von mikrobiell stimulierten RAG-1 Milzzellen soll *in vitro* der Einfluss von IL-15 auf die IFN- $\gamma$  Produktion und die IL-12 Produktion vergleichend näher untersucht werden.