

Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Aus dem Institut für Infektionsmedizin
Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Hahn

**Analyse der zytotoxischen Aktivität von naiven residenten
Peritonealzellen gegen listerieninfizierte Hepatozyten**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

vorgelegt von: Daniel Haschtmann

aus : Anklam

Referent : Prof. Dr. M. Mielke

Korreferent: Prof. Dr. R. Stahlmann

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 12.12.2003

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	DIE ABWEHR VON INFektionSERREGERN DURCH DEN INFIZIERTEN WIRT	1
1.2	DAS MODELL DER MURINEN LISTERIOSE	3
1.2.1	ZYTOTOXISCHE WIRTSREAKTIONEN IM VERLAUF DER LISTERIOSE	4
1.3	FRAGESTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	9
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	10
2.1	TIERE	10
2.2	PERITONEALLEUKOZYTEN NAIVER MÄUSE	10
2.2.1	GEWINNUNG NAIVER RESIDENTER PERITONEALLEUKOZYTEN	10
2.2.2	FRAKTIONIERUNG DER PERITONEALLEUKOZYTEN	11
2.2.3	ZYTOLOGIE	12
2.3	BAKTERIEN	13
2.3.1	DIE LISTERIA MONOCYTOGENES ACTA ⁻ MUTANTE	13
2.3.2	ANZUCHT DER BAKTERIEN	13
2.3.3	ZELLZAHLBESTIMMUNG	14
2.4	HEPATOZYTEN	15
2.4.1	ZELLINIE	15
2.4.2	ZELLKULTUR	15
2.4.3	KRYOKONSERVIERUNG UND REKULTIVIERUNG DER HEPATOZYTEN	16
2.4.4	ZELLZÄHLUNG MIT DER NEUBAUER-ZÄHLKAMMER	16
2.4.5	KULTUR DER HEPATOZYTEN IN MIKROTITERPLATTEN	17
2.4.6	INFEKTION DER HEPATOZYTENMONOLAYER	17
2.4.7	STIMULIERUNG DER ZELLKULTUREN MIT LIPOPOLYSACCHARID	18
2.4.8	FÄRBUNG UND FIXIERUNG DER ZELLKULTUREN	18
2.5	IMMUNMODULATOREN	19
2.5.1	ANTIKÖRPER	19
2.5.2	NO-SYNTHASEHEMMER	20
2.5.3	INTERFERON GAMMA	21
2.6	QUANTIFIZIERUNG DER LÄSIONEN (PLAQUES) IN MONOLAYERN	22
2.6.1	FOTODOKUMENTATION DER MONOLAYER	22
2.6.2	DIGITALISIERUNG	22
2.6.3	COMPUTERGESTÜTZTE BILDANALYSE	22
2.7	ANALYSE DER ZELLKULTURÜBERSTÄNDE	23

2.7.1	STICKSTOFFMONOXIDNACHWEIS	23
2.7.2	ZY TOKINNACHWEIS	24
2.8	STATISTIK	26
2.9	GENEHMIGUNGEN	26
2.9.1	TIERSCHUTZ	26
2.9.2	GENTECHNIK	26
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>27</u>
3.1	ETABLIERUNG DES VERSUCHSANSATZES	27
3.2	ANALYSE DER ZYTOTOXISCHEN AKTIVITÄT NAIVER RESIDENTER PERITONEALZELLEN	33
3.2.1	DIE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT NAIVER RESIDENTER PERITONEALZELLEN GEGEN LISTERIENINFIZIERTE HEPATOZYTEN BERUHT AUF DER ADHÄRENTEN ZELLFRAKTION	33
3.2.2	TNF- α IST <i>NICHT</i> ESSENTIELL FÜR DIE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT	36
3.2.3	IFN- γ STEIGERT DIE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT	37
3.2.4	IFN- γ -STIMULIERTE PERITONEALZELLEN PRODUZIEREN STICKSTOFFMONOXID IN KOKULTUR MIT LISTERIENINFIZIERTEN HEPATOZYTEN	38
3.2.5	DIE IFN- γ -INDUZIERTER NO-PRODUKTION IST DURCH AMINOGUANIDIN HEMMBAR	39
3.2.6	DIE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT IST VON DER NO-KONZENTRATION DISSOZIIERBAR	40
3.2.7	EFFEKTE VON LIPOPOLYSACCHARID	42
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>45</u>
4.1	PLAQUEINDEX ALS MAB FÜR DIE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT VON PERITONEALZELLEN	45
4.2	DIE ZYTOTOXISCH AKTIVE ZELLPOPULATION	48
4.3	EFFEKTORMECHANISMEN VON MAKROPHAGEN	51
4.3.1	DIE ROLLE VON IFN- γ	51
4.3.2	DIE ROLLE VON TNF- α	53
4.3.3	DIE ROLLE VON NO	55
4.3.4	DIE ROLLE VON LPS	57
4.4	DIE BEDEUTUNG DER BEFUNDE FÜR DAS VERSTÄNDNIS DER ABWEHRMECHANISMEN IN DER MURINEN LISTERIOSE <i>IN VIVO</i>	58
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>61</u>

6 LITERATUR **63**

DANKSAGUNG **83**

LEBENS LAUF **85**

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Helmut Hahn bedanken, der mir die Durchführung dieser Arbeit an seinem Institut ermöglichte.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Mielke, der mir nicht nur dieses spannende Thema anvertraute, sondern mich auch während des ganzen Zeitraums trotz seines beruflichen Positionswechsels mit großem Einsatz betreute. Unsere Zusammenarbeit war angenehm und produktiv. Ganz besonders dankbar bin ich ihm für das Vertrauen und den großen experimentellen Handlungsspielraum, was mir die Möglichkeit ließ, auch eigene Ideen zu verfolgen. Die fachlichen Diskussionen waren immer wieder von großem Nutzen, auch indem sie mir neue Impulse für weitere Untersuchungen gaben.

Des weiteren danke ich sehr Herrn Dr. Klaus Miksits, der mich in Fragen der digitalen Quantifizierung der Ergebnisse maßgeblich unterstützte. Auch seine freundlichen Anregungen bezüglich der grafischen Gestaltung, statistischen Absicherung der Ergebnisse, der Fehleranalyse sowie die interessanten mikrobiologischen Dialoge waren von unschätzbarem Wert.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Oliver Liesenfeld bedanken, der mich oftmals in wissenschaftlichen und organisatorischen Fragen unterstützte.

Vor allem die intensive Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente und das Erlernen neuer Methoden verdanke ich den technischen Assistentinnen und hier an erster Stelle Frau Solvy Wolke sowie Frau Uschi Rüschenndorf und Frau Antje Finke. Sie waren mir nicht nur eine große Hilfe, sondern prägten auch das entspannte, freundliche Klima in der Arbeitsgruppe.

Herrn Prof. Zeichhardt und Frau Hennig aus dem Institut für Virologie der Freien Universität Berlin danke ich für die Unterstützung beim Anfertigen der Fotografien.

Darüber hinaus danke ich den Angestellten des Tierstalls, der Nährbodenzentrale und allen anderen nicht namentlich genannten institutionellen Mitarbeitern für die Bereitstellung der Forschungsobjekte und Arbeitsmittel.

Danksagung

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie danken, meinen Eltern Frau Karin von Möllendorff und Herrn Dietrich Schlenzka sowie Herrn Michael von Möllendorff, nicht nur für ihre finanzielle Unterstützung meines Studiums. Meinem Bruder Marco Haschtmann danke ich für das Lesen der Korrekturen.

Ohne sie wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen.

Lebenslauf

Persönliche Daten	Geburtsdatum:	9. August 1973
	Geburtsort:	Anklam
Hochschulreife	05/1993	am Beethoven-Gymnasium Berlin
Wehrdienst	07/1993–06/1994	Sanitätsbataillon Hamburg-Harburg, Panzerartilleriebataillon Lehnitz/ Brandenburg
Universitätsausbildung	WS 1994/95	Immatrikulation für Medizin an der Freien Universität Berlin
	12/1998	US amerikanisches Staatsexamen USMLE step I
	05/2001	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Famulaturen	03/1997	Innere Medizin; St. Marien Krankenhaus, Berlin
	03/1998	Chirurgie; Praxis für Chirurgie, Unfallchirurgie und Sportmedizin, Berlin
	08/1998	Orthopädie; Cleveland Clinic Foundation, Orthopaedic Surgery -Spine Section, Cleveland / Ohio, USA
	03/1999	Orthopädie; Orthopädische Spezialklinik Sairaala Orton, Helsinki, Finnland
Praktisches Jahr	04/2000–07/2000	Innere Medizin; UKBF, FU-Berlin
	08/2000–11/2000	Chirurgie; Montreal General Hospital, McGill University, Montreal / Kanada
	12/2000–03/2001	Orthopädie; Charité, HU-Berlin
Arzt im Praktikum	10/2001–12/2001	AG Biologische Chirurgie
	01/2002–03/2002	Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Wissenschaftlicher Mitarbeiter / Assistent	Seit 4/2002	Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Berlin, den 12.12.2003

Daniel Haschtmann