

## A. Inhaltsverzeichnis

<b>A.</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>B.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>VI</b>
<b>C.</b>	<b>HERSTELLERVERZEICHNIS</b>	<b>IX</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die natürliche und die erworbene Immunität</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Komponenten der Immunabwehr</b>	<b>2</b>
1.2.1	Erkennen körperfremder Strukturen durch die natürliche Immunität	2
1.2.2	Erkennen körperfremder Strukturen durch die erworbene Immunität	3
<b>1.3</b>	<b>Kommunikation der Immunzellen</b>	<b>4</b>
1.3.1	Zytokine als Botenstoffe in der Immunantwort	5
<b>1.4</b>	<b>Interferon-<math>\gamma</math> als Schlüsselzytokin bei der Regulation der Immunantwort</b>	<b>6</b>
1.4.1	Induktion der nicht spezifischen, zytotoxischen Immunantwort	7
1.4.2	Regulation der MHC vermittelten Immunantwort	8
1.4.3	IFN- $\gamma$ in der erworbenen Immunantwort	10
1.4.4	Regulation der Leukozyten-Wanderung	11
<b>1.5</b>	<b>Zelluläre Quellen der frühen IFN-<math>\gamma</math> Produktion</b>	<b>11</b>
<b>1.6</b>	<b>NK-Zellen: Effektorzellen der natürlichen Immunantwort</b>	<b>14</b>
<b>1.7</b>	<b>Eigenschaften von IL-15 und IL-2</b>	<b>16</b>
<b>1.8</b>	<b>Verschiedene Oberflächenmarker von NK-Zellen</b>	<b>21</b>
<b>1.9</b>	<b>Infektionsmodell für die Untersuchung der IFN-<math>\gamma</math> Produktion während der natürlichen Immunantwort</b>	<b>23</b>
1.9.1	Der Erreger <i>Listeria monocytogenes</i>	23
1.9.2	Das Tiermodell	24
<b>1.10</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>24</b>

---

---

<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>26</b>
<b>2.1</b>	<b>Versuchstiere und Zelllinien</b>	<b>26</b>
2.1.1	C57BL/6 rag-1 <sup>-/-</sup> Mäuse (RAG-1 Mäuse)	26
2.1.2	C57BL/6 Wildtyp-Mäuse (WT Mäuse)	26
2.1.3	Zelllinien und Hybridome	27
2.1.4	Auftauen der Hybridome und Zelllinien	27
2.1.5	Einfrieren von Hybridomen und Zelllinien	28
2.1.6	Kontrolle der Antikörperproduktion von Hybridomzellen	28
2.1.7	Herstellung von Hybridomüberständen für die Antikörperaufreinigung	29
2.1.8	Aufreinigung der Hybridomüberstände mittels Säulenchromatographie	30
2.1.9	Qualitätskontrolle der gereinigten Antikörper	31
2.1.9.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.1.9.2	Western-Blot	32
2.1.10	Protein-Quantifizierung nach Bradford	33
<b>2.2</b>	<b>Erreger</b>	<b>34</b>
2.2.1	Passage von <i>Listeria monocytogenes</i>	34
2.2.2	Gewinnen von Hitze-inaktivierten <i>Listeria monocytogenes</i>	34
<b>2.3</b>	<b>Infektionen mit <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>34</b>
<b>2.4</b>	<b>Organ-Einzelzellsuspensionen</b>	<b>35</b>
2.4.1	Einzelzellsuspensionen der Milz	35
2.4.2	Einzelzellsuspensionen der Leber	36
2.4.2.1	Infektionskontrollen	36
2.4.3	Inhibition des intrazellulären Vesikeltransportes	37
2.4.4	Erythrozytenlyse und Blockade der Fc-Rezeptoren	37
<b>2.5</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	<b>38</b>
2.5.1	Die direkte und indirekte Markierung von Membranproteinen	40
2.5.1.1	Unterscheiden von lebenden und toten Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	41
2.5.1.2	Detektion von apoptotischen Zellen mit Hilfe von Annexin V	42
2.5.2	Die direkte Markierung von intrazellulären Zytokinen	43
2.5.3	Indirekte Markierung von membranständigen Antigenen durch nicht gekoppelte Antikörper	43
2.5.4	Messung und Analyse der Durchflusszytometrie-Daten	44
2.5.4.1	Eingrenzen der Leukozytenpopulation aufgrund ihrer Größe und Granularität	45
<b>2.6</b>	<b>Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Sandwich-Methode)</b>	<b>47</b>

---

<b>2.7</b>	<b>Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion nach RNA-Extraktion aus Milzzellen</b>	<b>48</b>
<b>2.8</b>	<b>Produktion von IL-2-haltigem Zellkulturüberstand</b>	<b>51</b>
2.8.1	Selektion	52
2.8.2	Produktion des IL-2 Überstandes	52
2.8.3	Bestimmung der biologischen Aktivität von IL-2-haltigen Überständen mittels MTT-Assay	52
<b>2.9</b>	<b>Inhibition der mikrobiell stimulierten IFN-<math>\gamma</math> Produktion von RAG-1 Milzzellen in vitro mittels Antikörper</b>	<b>53</b>
2.9.1	Aufreinigung der Antikörper	53
2.9.2	Stimulation von RAG-1 Milzzellkulturen mit Hitze-inaktivierten Listerien	54
2.9.3	Stimulation von RAG-1 Milzzellkulturen mit vitalen Listerien	54
<b>2.10</b>	<b>Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen</b>	<b>56</b>
2.10.1	Zellkulturmedien und Mediumzusätze	56
2.10.2	Puffer und Lösungen	58
<b>2.11</b>	<b>Antikörper</b>	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>67</b>
<b>3.1</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> produzierende Leukozyten der Milz und der Leber von RAG-1 Mäusen nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>67</b>
3.1.1	IFN- $\gamma$ produzierende Leukozytenpopulationen der Milz	67
3.1.2	IFN- $\gamma$ produzierende Leukozytenpopulationen der Leber	69
<b>3.2</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> produzierende Leukozyten aus der Milz von WT Mäusen nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>72</b>
3.2.1	IFN- $\gamma$ produzierende Zellpopulationen der Milz immunkompetenter C57BL/6 Mäuse	72
<b>3.3</b>	<b>Die Abnahme von Zellpopulationen im Verlauf der Infektion</b>	<b>79</b>
3.3.1	Abnahme der [NK1.1(+)] Zellpopulation bei RAG-1 Mäusen	79
3.3.2	Abnahme von Lymphozytenpopulationen bei WT Mäusen	80
<b>3.4</b>	<b>CD122 Expression und intrazelluläres IFN-<math>\gamma</math> bei murinen NK-Zellen im Verlauf einer Infektion</b>	<b>84</b>
3.4.1	Analyse der NK-Zellen aus der RAG-1 Milz	84
3.4.2	Analyse der [NK1.1(+)] Milzzellen von syngenen WT Mäusen	85

---

<b>3.5</b>	<b>IFN-<math>\gamma</math> Produktion und CD122 Expression bei murinen NK-Zellen in vitro</b>	<b>87</b>
3.5.1	Analyse der NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation mit lebenden <i>Listeria monocytogenes</i> auf Einzelzellniveau	87
3.5.2	Vergleich der Zytokinproduktion von RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation mit Hitze-inaktivierten oder lebenden Listerien mittels ELISA	90
3.5.2.1	Vergleich der IFN- $\gamma$ Produktion	90
3.5.2.2	Vergleich der IL-12 Produktion	92
3.5.3	Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ bei NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation durch Hitze-inaktivierte Listerien und IL-2 oder IL-15	93
3.5.4	Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ bei NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen nach Inkubation mit IL-2 oder IL-15	96
<b>3.6</b>	<b>IL-2 und IL-15 Genexpression bei Milzzellen im Verlauf einer Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>97</b>
3.6.1	Transkription von IL-15 und IL-2 mRNA aus Milzzellen von RAG-1 Mäusen	98
3.6.2	Transkription von IL-15 und IL-2 mRNA aus Milzzellen von WT Mäusen	99
<b>3.7</b>	<b>Einfluss von Brefeldin A bei der Abnahme des CD122 Signals auf der Membranoberfläche von NK-Zellen</b>	<b>100</b>
3.7.1	Analyse von NK-Zellen nach IL-2 oder IL-15 Inkubation ohne Brefeldin A-Zusatz	101
3.7.2	Analyse von NK-Zellen nach IL-2 oder IL-15 Inkubation mit Brefeldin A-Zusatz	102
<b>3.8</b>	<b>Die biologische Wirkung von IL-15 auf in vitro kultivierte NK-Zellen von RAG-1 Mäusen</b>	<b>103</b>
3.8.1	IL-15 und IL-2 sichern das Überleben der NK-Zellen in RAG-1 Milzzellkulturen.	103
3.8.2	Rolle von CD122 für das Überleben in vitro kultivierter NK-Zellen	109
3.8.3	Der Einfluss von IL-15 auf die IL-12 und die IFN- $\gamma$ Produktion bei RAG-1 Milzzellen in vitro	113
3.8.3.1	Die IL-12 und der IFN- $\gamma$ -Produktion in Abhängigkeit von der Konzentration Hitze-inaktivierter Listerien	113
3.8.3.2	Titration der IL-15 Konzentration in vitro	114
3.8.3.2.1	Betrachtung der IL-12 Produktion	115
3.8.3.2.2	Betrachtung der IFN- $\gamma$ Produktion	117
3.8.4	Zusammenfassung : IL-12 und IFN- $\gamma$ Produktion bei RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation durch IL-15 und Hitze-inaktivierte Listerien	119

---

<b>3.9</b>	<b>Inhibition der IFN-<math>\gamma</math> Produktion bei mikrobiell stimulierten RAG-1 Milzzellkulturen durch Antikörper</b>	<b>121</b>
3.9.1	Inhibition der HKL stimulierten IFN- $\gamma$ Produktion von RAG-1 Milzzellen in IL-15 konditioniertem Medium	121
3.9.1.1	Erläuterung der Methode des optimierten Inhibitionsassays	121
3.9.1.2	Auswertung	122
3.9.1.3	Ergebnis	123
3.9.2	Inhibition der VL stimulierten IFN- $\gamma$ Produktion von RAG-1 Milzzellen ohne speziell konditioniertes Kulturmedium	125
3.9.2.1	Erläuterung der Methode	125
3.9.2.2	Auswertung	125
3.9.2.3	Ergebnis	125
3.9.2.4	Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- $\gamma$ bei NK-Zellen auf Einzelzellniveau	127
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>130</b>
<b>4.1</b>	<b>Der zelluläre Ursprung von IFN-<math>\gamma</math> in der frühen Infektabwehr</b>	<b>130</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Abnahme spezieller Lymphozytenpopulationen bei Infektionen mit <i>Listeria monocytogenes</i></b>	<b>135</b>
<b>4.3</b>	<b>Regulation von CD122 auf der Membranoberfläche von NK-Zellen</b>	<b>138</b>
<b>4.4</b>	<b>Die biologische Wirkung von IL-15 und IL-2 auf NK-Zellen</b>	<b>143</b>
<b>4.5</b>	<b>Detektion von IL-15 in biologischen Systemen</b>	<b>151</b>
<b>4.6</b>	<b>Vergleich von vitalen und Hitze-inaktivierten Listerien als mikrobielle Stimulanzen</b>	<b>153</b>
<b>4.7</b>	<b>Die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen durch IL-15 über autokrine Mechanismen</b>	<b>155</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>158</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>162</b>

---