
3 Ergebnisse

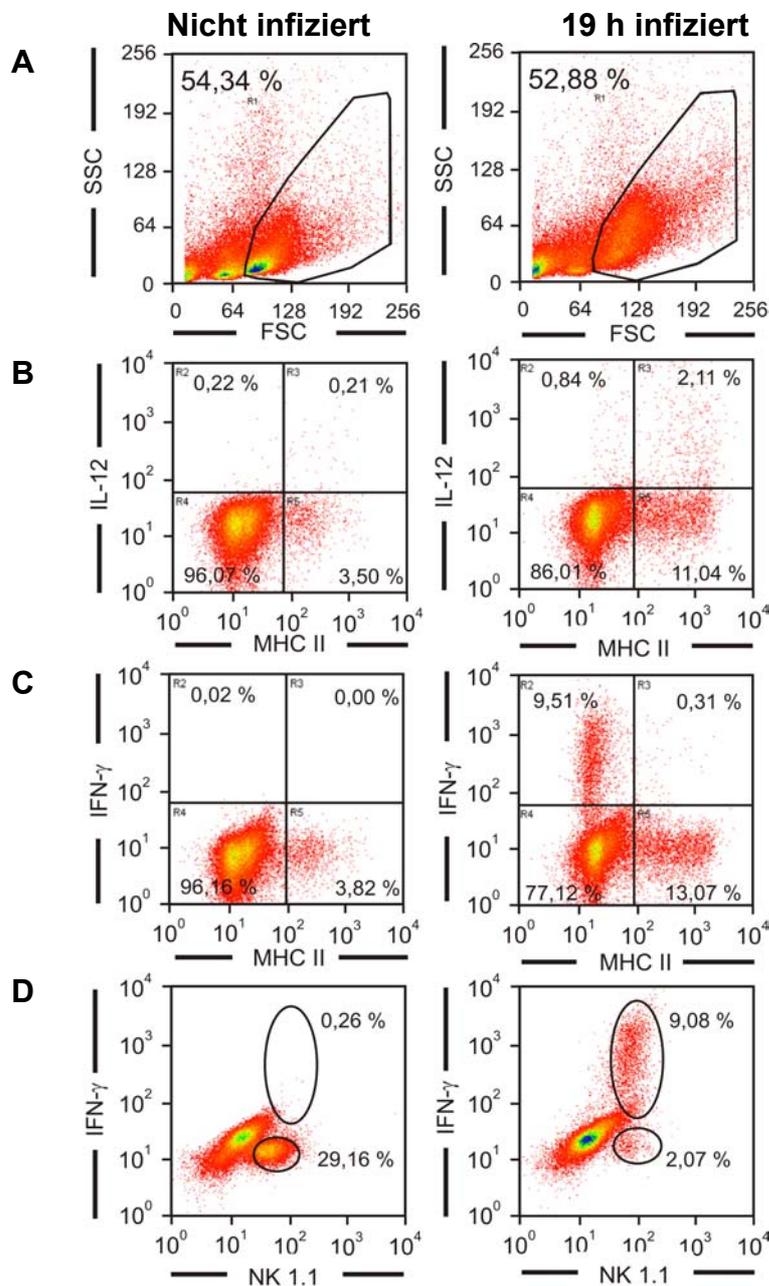
3.1 IFN- γ produzierende Leukozyten der Milz und der Leber von RAG-1 Mäusen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

3.1.1 IFN- γ produzierende Leukozytenpopulationen der Milz

C57BL/6 *rag-1*^{-/-} Mäuse (RAG-1 Mäuse) sind aufgrund ihres genetischen Defizits nicht in der Lage, auf Genrekombination beruhende Rezeptoren auszubilden. Daher wird die Reifung von T- und B-Zellen in einem sehr frühen Stadium der Entwicklung unterbrochen, so dass bei diesen Tieren Lymphozyten mit den typischen Markern CD3 (T-Zellen) und CD19 (B-Zellen) nicht nachgewiesen werden können. Bei RAG-1 Mäusen setzt sich die [MHC II(+)] Zellpopulation der Milz nur aus Monozyten / M Φ und DC zusammen.

Die Daten der durchflusszytometrischen Analyse der Milzzellen von RAG-1 Mäusen zeigten, dass die [MHC II(+)] Zellpopulation bei infizierten Tieren im Vergleich zu denen von nicht infizierten Tieren zunahm (Abb. 9B und Abb. 9C: von ca. 3,8 % auf ca. 13 %). IL-12 ist in der Literatur als ein Schlüsselzytokin für die mikrobiell induzierte IFN- γ Produktion der natürlichen Immunantwort beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die [MHC II(+)] Zellpopulation die wesentliche Quelle für ein intrazelluläres IL-12 Signal bei den Milzzellen infizierter RAG-1 Mäusen war (Abb. 9B). Eine Analyse der [MHC II(+)] Zellpopulationen der Milz zeigte, dass diese bei infizierten RAG-1 Mäusen kein intrazelluläres Signal für IFN- γ coexprimierten (Abb. 9C). Demgegenüber zeigte die Analyse der [NK1.1(+)] Zellpopulation (NK-Zellen) eine sehr deutliche Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals (Abb. 9D).

Abb. 16 IFN- γ Produktion bei Milzzellen *L. monocytogenes* infizierter RAG-1 Mäuse

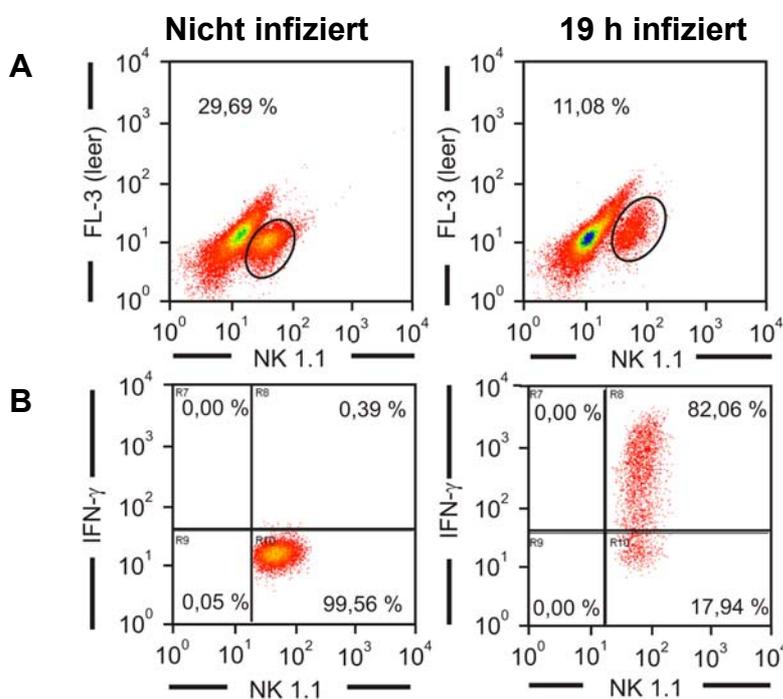


RAG-1 Mäuse wurden infiziert, Kontrolltiere wurden nicht behandelt (nicht infiziert). Nach 19 h p.i. wurden die Tiere getötet. Die Milzzellen wurden in Anwesenheit von BFA und Gentamicin 4 h in vitro inkubiert, nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen bzw. Zelltrümmer wurden aufgrund der Größe (*forward scatter*, FSC) und Granularität (*side scatter*, SSC) aus der Betrachtung ausgeschlossen (A). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von MHC II und intrazellulärem IL-12 (B), MHC II und intrazellulärem IFN- γ (C) sowie NK1.1 und intrazellulärem IFN- γ (D) hin untersucht. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die Analyse von drei infizierten Tieren.

Die Aussagen von Koyasu und Coautoren (vergl. 1.5.), wonach M Φ , vor allem aber DC neben der Produktion von IL-12 auch über autokrine Stimulationsmechanismen IFN- γ produzieren, konnten bei den Infektionsexperimenten von RAG-1 Mäusen mit *Listeria monocytogenes* (VL) nicht bestätigt werden. Eine Analyse der [NK1.1(+)] Milzzellpopulation zeigte, dass bei infizierten RAG-1 Mäusen im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen

ein hoher Prozentsatz dieser Zellpopulation nach 19 h p.i. ein intrazelluläres Signal für IFN- γ exprimierte (Abb. 10B: in dem dargestellten Experiment exprimieren ca. 82 % der NK-Zellen ein intrazelluläres Signal für IFN- γ). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die [NK1.1(+)] Zellpopulation bei den infizierten Tieren gegenüber den nicht infizierten Kontrolltieren um ca. 50 % abnahm (Abb. 10A: in den dargestellten Experiment von ca. 30 % bei nicht infizierten auf ca. 11 % infizierten RAG-1 Mäusen nach 19 h p.i, vergl. 3.3).

Abb. 17 IFN- γ Produktion der [NK1.1(+)] Milzzellen



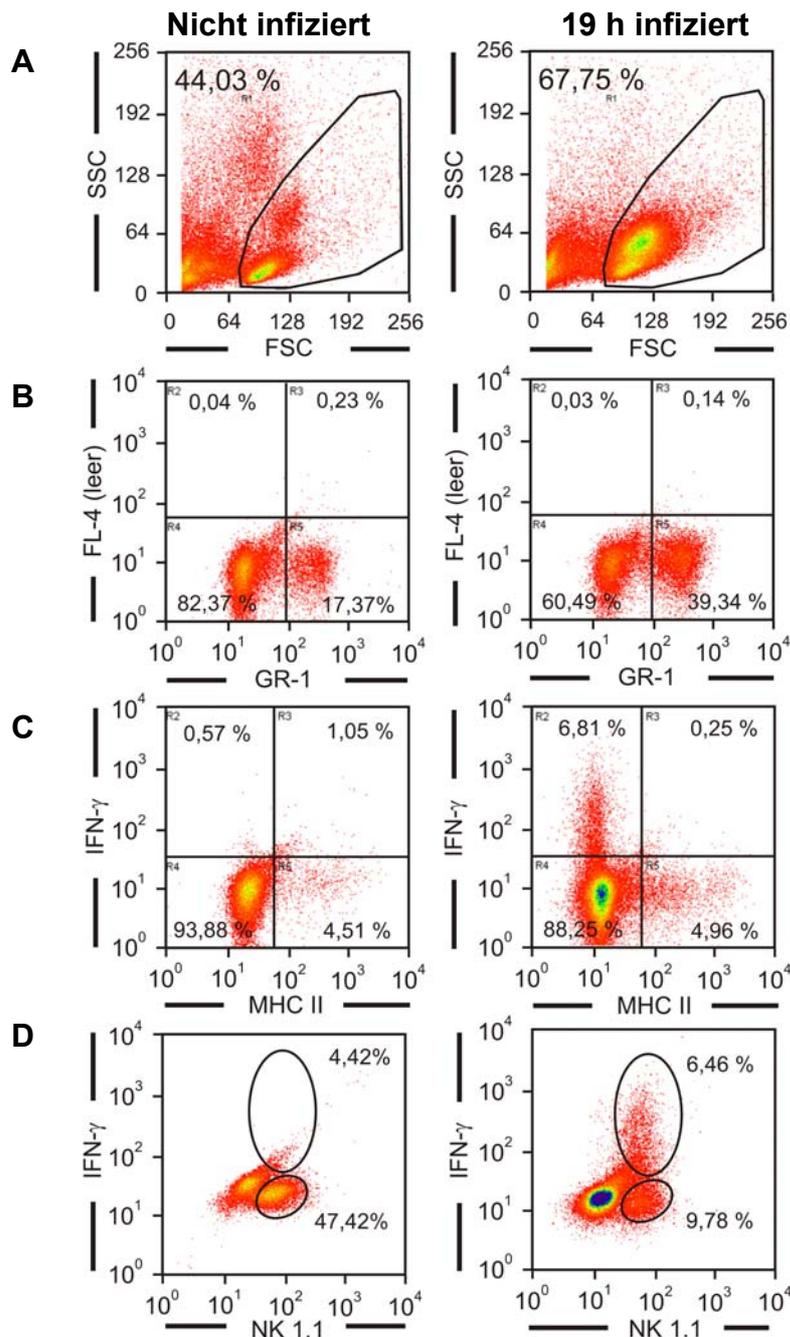
RAG-1 Mäuse wurden infiziert; Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 19h wurden die Tiere getötet und die Leukozyten der Milz wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen bzw. Zelltrümmer wurden aufgrund der Größe und Granularität aus der Betrachtung ausgeschlossen (vergl. Abb. 9A). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von NK1.1 ausgewählt (A) und auf ein intrazelluläres IFN- γ Signal hin untersucht (B)

3.1.2 IFN- γ produzierende Leukozytenpopulationen der Leber

Die durchflusszytometrische Analyse der Leberzellen zeigte, dass die als Leukozyten eingegrenzten Messereignisse bei den infizierten RAG-1 Leberzellen im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren deutlich zugenommen hatten (Abb. 11A). Eine Analyse der [GR-1(+)] Zellpopulation zeigte, dass analog zu dem generellen Anwachsen der betrachteten Leukozytenpopulationen eine deutliche Zunahme der [GR-1(+)] Zellpopulation beobachtet werden konnte (Abb. 11B: von ca. 17 % bei nicht infizierten auf ca. 39 % bei 19 h infizierten RAG-1 Mäusen). GR-1 ist ein Protein, das auf vor allem auf der Membran von polymorphkernigen, neutrophilen Granulozyten exprimiert wird (Hestdal et al. 1991; Fleming et al., 1993).

Bei der Analyse der Leukozyten aus der Leber der infizierten RAG-1 Mäuse konnte ebenfalls keine Coexpression der [MHC II(+)] Zellpopulation mit einem intrazellulären IFN- γ Signal festgestellt werden (Abb. 11C). Allerdings wurde gezeigt, dass die [NK1.1(+)] Zellpopulation das intrazelluläre Signal für IFN- γ coexprimierte (Abb. 11D).

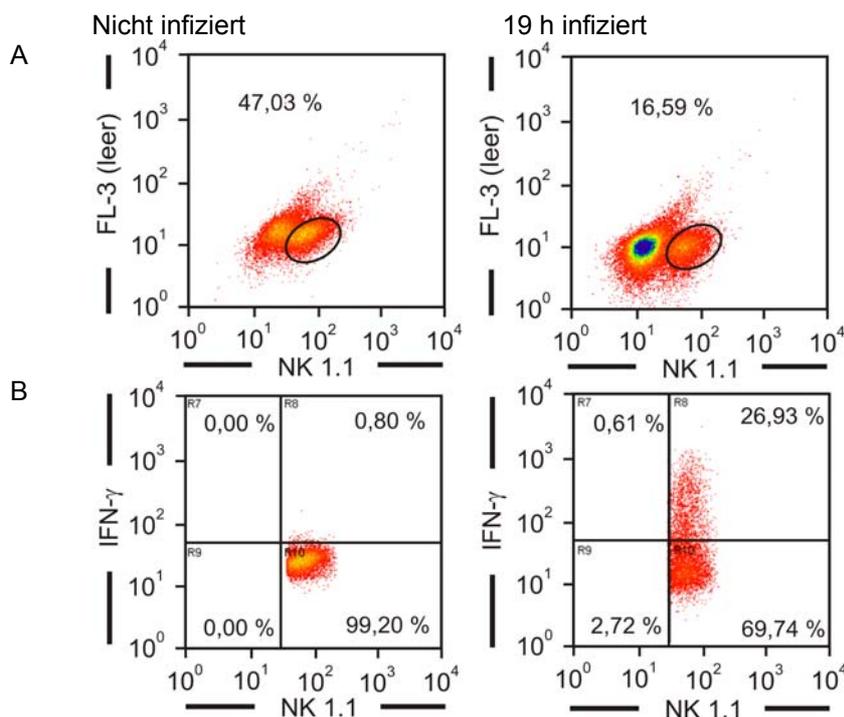
Abb. 18 IFN- γ Produktion bei Leberzellen *L. monocytogenes* infizierter RAG-1 Mäuse



RAG-1 Mäuse wurden infiziert; Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 19h wurden die Tiere getötet. Die aufgereinigten Leberzellen wurden in Anwesenheit von BFA und Gentamicin 4h in vitro inkubiert, nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen (A). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von GR-1 (B), die Expression von MHCII und intrazellulärem IFN- γ (C) und die Expression von NK1.1 und intrazellulärem IFN- γ hin untersucht. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die Analyse von drei infizierten Tieren.

Die [NK1.1(+)] Zellpopulation war bei den infizierten Tieren im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren stark reduziert. Diese Beobachtung bestätigte analoge Beobachtungen, die bei den [NK1.1(+)] Zellpopulationen der Milz gezeigt wurden. (Abb. 12A: in dem dargestellten Experiment von ca. 47 % [NK1.1(+)] Zellen bei nicht infizierten RAG-1 Mäusen auf ca. 17 % bei 19 h infizierten RAG-1 Mäusen, vergl. Abb. 10A).

Abb. 19 IFN- γ Produktion der [NK1.1(+)] Leberzellen



RAG-1 Mäuse wurden infiziert; Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 19h wurden die Tiere geopfert. Die Milzzellen wurden in Anwesenheit von BFA und Gentamicin 4h in vitro inkubiert, nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden aufgrund der Größe und Granularität aus der Betrachtung ausgeschlossen (vergl. Abb. 11A). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von NK1.1 ausgewählt (A) und auf ein intrazelluläres IFN- γ Signal hin untersucht (B).

3.2 IFN- γ produzierende Leukozyten aus der Milz von WT Mäusen nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*

3.2.1 IFN- γ produzierende Zellpopulationen der Milz immunkompetenter C57BL/6 Mäuse

WT Mäuse haben funktionelle T-Zellen [CD3(+)] und funktionelle B-Zellen [MHC II(+)/CD19(+)]. Diese Zellpopulationen sind bei der Untersuchung der möglichen Quellen von IFN- γ während der frühen Immunantwort in die Betrachtung mit einzubeziehen. Die [CD3(+)] Zellpopulation bildet bei WT Mäusen eine Subpopulation mit den [NK1.1(+)] Zellen aus, den NK-T-Zellen [CD3(+)/NK1.1(+)].

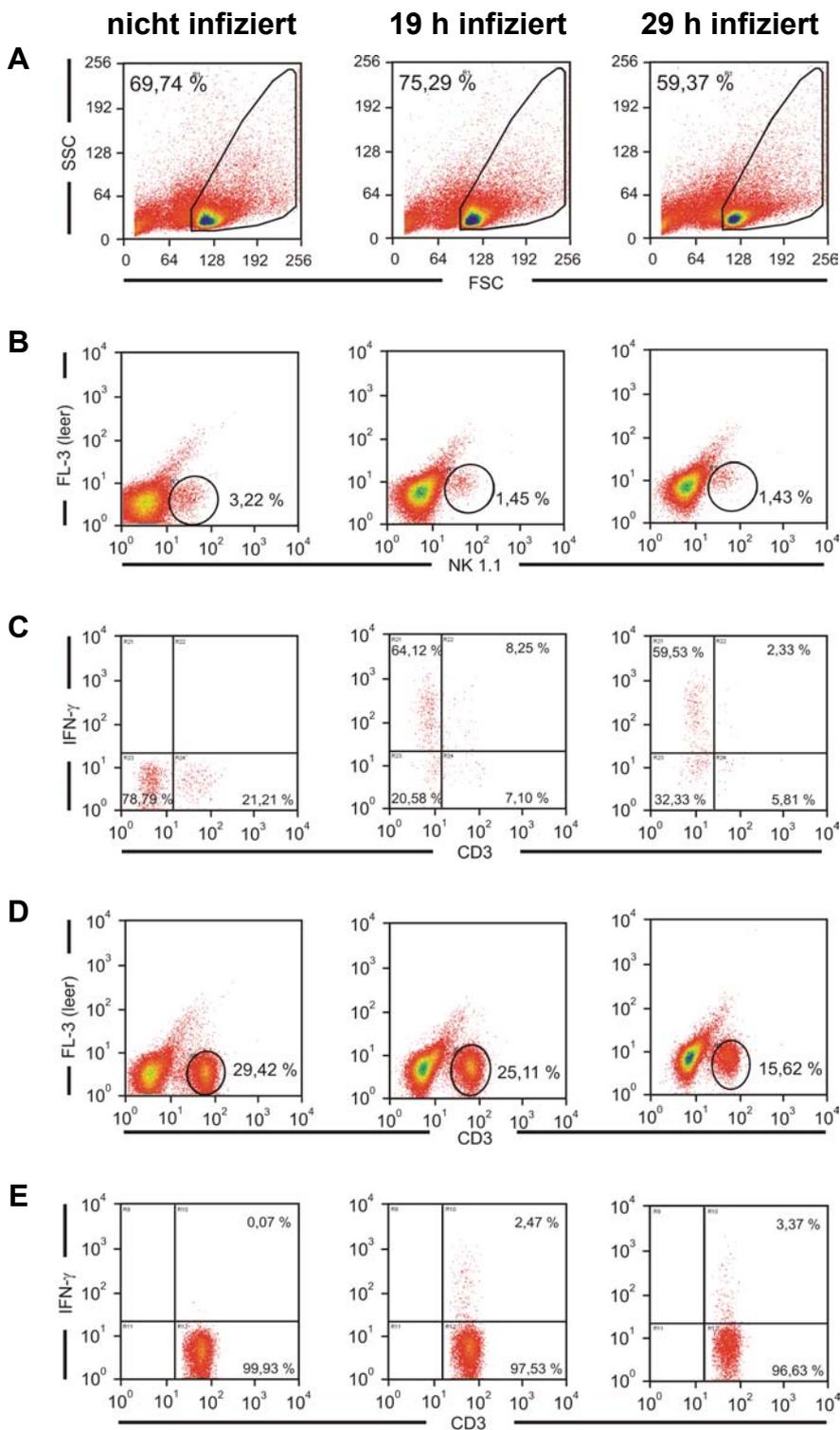
WT Mäuse wurden intravenös mit VL infiziert und 9 h, 19 h und 29 h später getötet, die Kontrolltiere wurden nicht behandelt (im Folgenden als nicht infiziert bezeichnet). Nach einer Brefeldin A-Inkubation und der Erythrozytenlyse wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen extrazelluläre und intrazelluläre Proteine markiert.

Die Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals war nach 9 h p.i. noch nicht nachweisbar (Daten nicht dargestellt). Nach 19 h p.i. war bei der [NK1.1(+)] Zellpopulation ein starkes, intrazelluläres Signal für IFN- γ detektierbar (Abb. 13C). Die [NK1.1(+)] Zellpopulation teilte sich in eine [NK1.1(+)/CD3(-)] Zellpopulation und eine kleinere [NK1.1(+)/CD3(+)] Zellpopulation auf. Sowohl die NK-Zellen [NK1.1(+)/CD3(-)] als auch die NK-T-Zellen [NK1.1(+)/CD3(+)] zeigten ein intrazelluläres Signal für IFN- γ zu diesem Zeitpunkt der Infektion; in dem dargestellten Experiment exprimierten ca. 64 % der NK-Zellen und ca. 8 % der NK-T-Zellen ein intrazelluläres IFN- γ Signal nach 19 h p.i. (Abb. 13C). Dies bestätigte die Beobachtungen, die bei den infizierten RAG-1 Mäusen dargestellt wurden (vergl. Abb. 9D) und zeigten, dass vor allem NK-Zellen nach 19 h p.i. intrazelluläres IFN- γ exprimieren. Das intrazelluläre IFN- γ Signal der [NK1.1(+)/CD3(+)] Zellpopulation war zu diesem Zeitpunkt der Infektion deutlich erkennbar, hatte aber im Vergleich zu dem IFN- γ -Signal der [NK1.1(+)/CD3(-)] einen geringen Anteil an dem Gesamt-IFN- γ Signal (Abb. 13C, vergl. Abb. 23). Nach 29 h p.i. war immer noch ein starkes intrazelluläres IFN- γ Signal bei ca. 60 % der [NK1.1(+)/CD3(-)] Zellpopulation erkennbar. Die [NK1.1(+)/CD3(+)] Zellpopulation war zu diesem Zeitpunkt schwer detektierbar. In dem dargestellten Beispielperiment exprimierten nur noch ca. 3 % der NK-T-Zellen ein intrazelluläres Signal für IFN- γ (Abb. 13C, vergl. Abb. 23).

Die [CD3(+)] Milzzellpopulation exprimiert ebenfalls ein intrazelluläres IFN- γ - Signal nach 19 h und 29 h p.i. (Abb. 13E), aber dieses Signal wurde nur von ca. 2 % bis 3 % der [CD3(+)] Zellpopulation exprimiert.

Die Abbildung 13B zeigte, dass die [NK1.1(+)] Zellpopulation der nicht infizierten Kontrolltiere deutlich größer war, als die [NK1.1(+)] Zellpopulation der über 19 h und 29 h infizierten Tiere. Analog den Beobachtungen, die bei den RAG-1 Mäusen gemacht wurden, wurde auch bei den infizierten WT Mäusen eine Abnahme der [NK1.1(+)] Zellpopulationen im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen innerhalb der ersten 19 h p.i. gezeigt (Abb. 13B vergl. Abb. 17). Ein ähnliches Phänomen zeigte die [CD3(+)] Zellpopulation (Abb. 13D). Auch hier war eine deutliche Abnahme der Populationsstärke bei den [CD3(+)] Milzzellen der infizierten Tiere nach 19 h p.i. gegenüber der [CD3(+)] Population der nicht infizierten Kontrolltiere zu beobachten. In dem dargestellten Experiment betrug der Anteil der [CD3(+)] Zellen bei nicht infizierten WT Mäusen ca. 29 % um nach 19 h p.i. nur noch 25 %. Die [CD3(+)]-Zellpopulation war nach 29 h p.i. noch weiter reduziert, hier betrug der Anteil an den erfassten Leukozyten nur noch ca. 16 % (Abb. 13D).

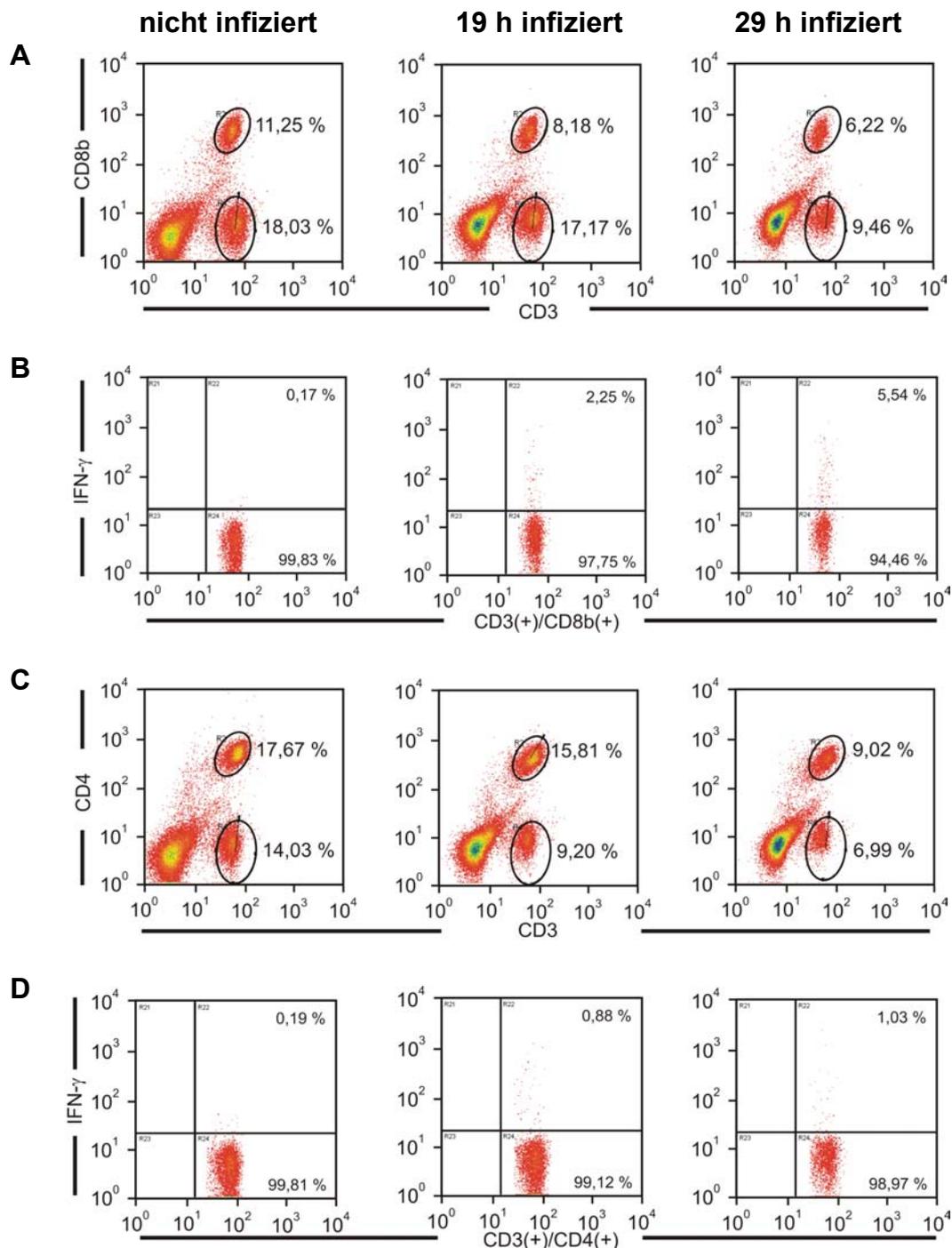
Abb. 20 IFN- γ Produktion von NK Zellen, NK-T-Zellen und T-Zellen in der Milz



WT Mäuse wurden infiziert, Kontrolliere wurden nicht infiziert. Nach 19 h und 29 h p.i. wurden Tiere geopfert. Die Milzzellen wurden in Anwesenheit von BFA und Gentamicin 4 h in vitro inkubiert und nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Zelltrümmer und degenerierte Zellen wurden aufgrund ihrer Größe und Granularität von einer Betrachtung ausgeschlossen (A). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von NK.1.1 (B) und CD3 (D) selektiert. Die [NK1.1(+)] Leukozytenpopulation (C) und die [CD3(+)] Leukozytenpopulation (E) wurden auf die Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals hin untersucht. Für jeden Zeitpunkt sind die dargestellten Daten repräsentativ für die Analyse von drei infizierten Tieren.

Bei den [CD3(+)] T-Zellen sind in der Milz [CD3(+)/CD8(+)] zytotoxische T-Zellen und [CD3(+)/CD4(+)] T-Helferzellen die dominierenden Subpopulationen. Beide Zellpopulationen waren ebenfalls nach 19 h p.i. und nach 29 h p.i. im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen reduziert. Der Anteil der [CD3(+)/CD8b(+)] Zellpopulation an den erfassten Leukozyten betrug in dem dargestellten Experiment bei nicht infizierten WT Mäusen ca. 11 %. Nach 19 h p.i. betrug dieser 8 % und nach 29 h p.i. nur noch ca. 6 % (Abb. 14A). Der Anteil der [CD3(+)/CD4(+)] Zellpopulationen betrug bei den nicht infizierten WT Mäusen ca. 18 %, nach 19 h p.i. 16 % und nach 29 h p.i. nur noch 9 % (Abb. 14C). Diese Daten bestätigten den in Abbildung 13D gezeigten Effekt, dass diese Zellpopulationen innerhalb der ersten 29 h einer Infektion um ca. 50 % abnahmen.

Nach 19 h und 29 h p.i. exprimierten sowohl [CD3(+)/CD8b(+)] als auch [CD3(+)/CD4(+)] Zellpopulationen ein intrazelluläres Signal für IFN- γ . Der Anteil der [CD3(+)/CD8b(+)] Zellen, die ein intrazelluläres IFN- γ Signal exprimierten stieg von ca. 2 % nach 19 h p.i. auf ca. 5 % nach 29 h p.i. in den dargestellten Experiment (Abb.14B). Der Anteil der IFN- γ exprimierenden [CD3(+)/CD4(+)] Zellen betrug nach 19 h ca. 0,9 % und nach 29 h ca. 1 %, blieb also annähernd konstant (Abb. 14 D).

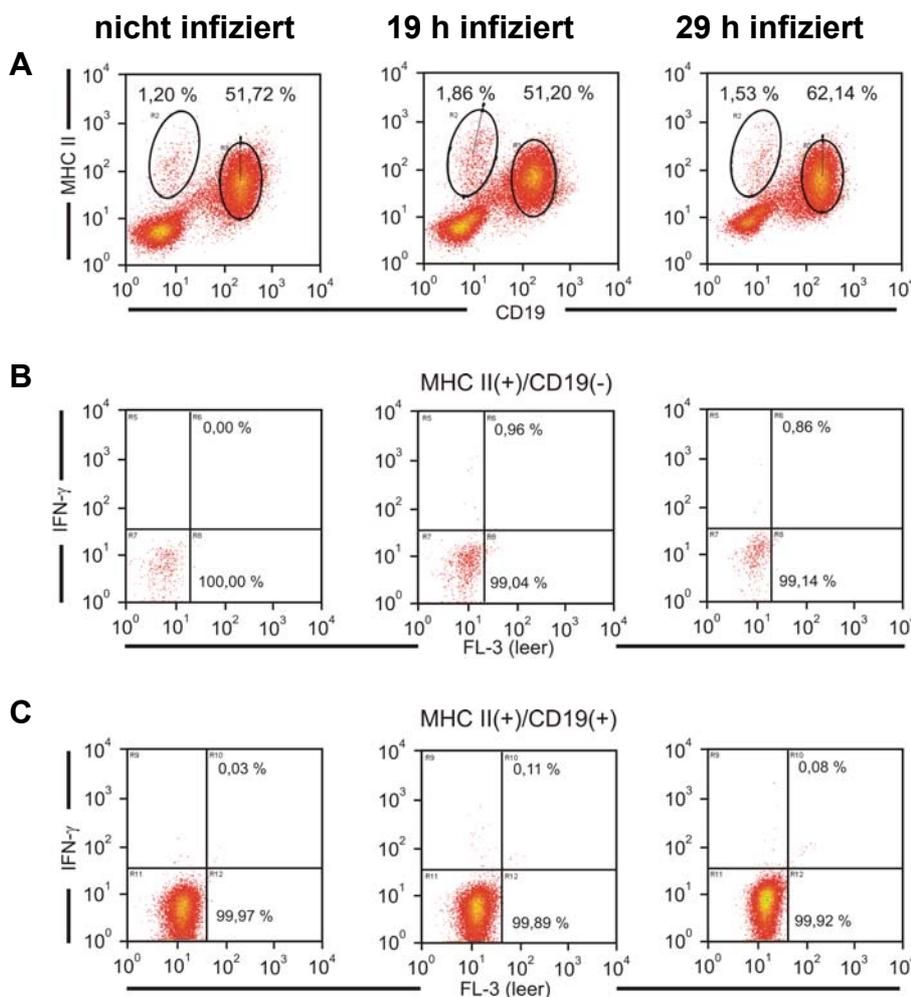
Abb. 21 IFN- γ Produktion von [CD8b(+)]-T-Zellen und [CD4(+)]-T-Zellen in der Milz

WT Mäuse wurden i.v. mit $5,0 \times 10^6$ cfu VL infiziert, Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 19 h und 29 h wurden Tiere getötet. Die Milzzellen wurden in Anwesenheit von BFA und Gentamicin 4 h in vitro inkubiert und nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Zelltrümmer und degenerierte Zellen wurden aufgrund ihrer Größe und Granularität von einer Betrachtung ausgeschlossen (vergl. Abb. 13A). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von CD3 und CD8b (A), sowie CD3 und CD4 (C) selektiert. Die [CD3(+)/CD8b(+)] (B) und die [CD3(+)/CD4(+)] Leukozytenpopulation wurde dann auf die Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals hin untersucht.

[MHC II(+)] Zellpopulationen unterteilen sich bei immunkompetenten WT Mäusen in eine [MHC II(+)/CD19(+)] Zellpopulation, die B-Zellen, und in eine [MHC II(+)/CD19(-)] Zellpopulationen, die Monozyten, M Φ , und DC. Sowohl die [MHC II(+)/CD19(+)] als auch [MHC II(+)/CD19(-)] zeigten keine deutlichen, mit den Signalen der [NK1.1(+)] oder der [CD3(+)] Zellpopulationen vergleichbaren, intrazellulären IFN- γ Signale.

Eine Abnahme der [MHC II(+)/CD19(-)] oder der [MHC II(+)/CD19(+)] Zellpopulation bei den infizierten Tieren im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen wurde nicht gemessen (Abb. 15A). Da die Populationen der T-Zellen und NK-Zellen innerhalb von 29 h p.i. abnahmen, sich also die Zusammensetzung der betrachteten Milzzellpopulationen innerhalb dieses Infektionszeitraumes verschob, erschien die [MHC II(+)/CD19(+)] Zellpopulation nach 29 h p.i. relativ zu den anderen Zellpopulationen vergrößert (vergleiche Abb. 15A).

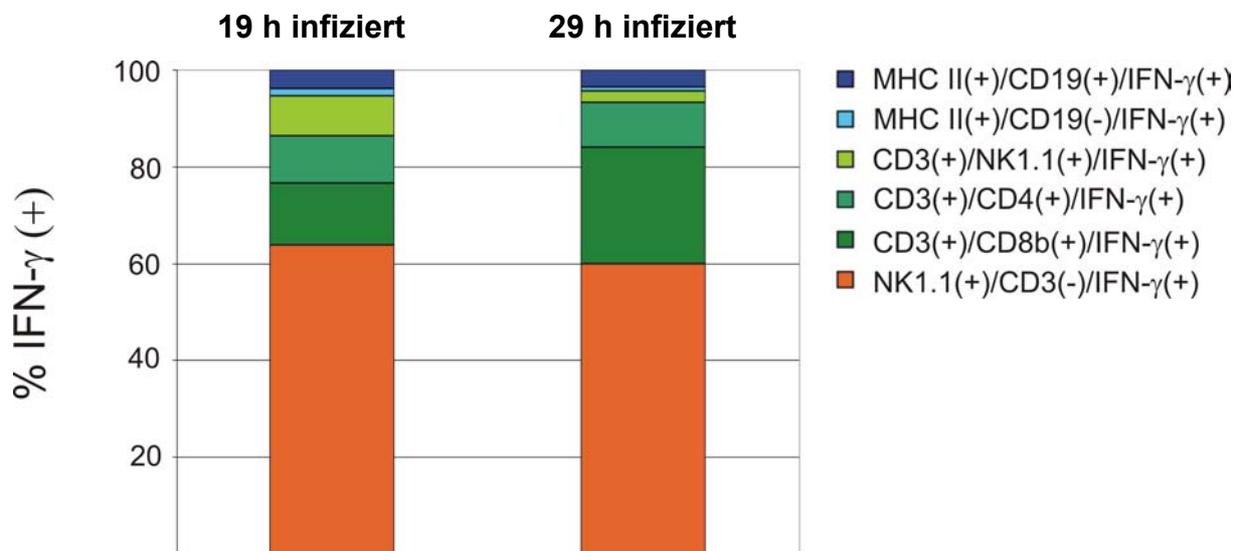
Abb. 22 IFN- γ -Produktion von DC / M Φ / Monozyten und B-Zellen aus der Milz



WT Mäuse wurden i.v. mit VL infiziert, Kontrolltiere wurden nicht infiziert. Nach 19 h und 29 h wurden die Tiere getötet. Die Milzzellen wurden in Anwesenheit von BFA und Gentamicin 4 h in vitro inkubiert, nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Zelltrümmer und degenerierte Zellen wurden aufgrund ihrer Größe und Granularität von einer Betrachtung ausgeschlossen (vergl. Abb. 13A). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von MHC II und CD19 selektioniert (A). Die [MHC II(+)/CD19(-)] Monozyten, M Φ und DC (B) sowie die [MHC II(+)/CD19(+)] B-Zellen wurden auf ein intrazelluläres IFN- γ Signal hin untersucht.

Die Gewichtung der intrazellulär IFN- γ exprimierenden Zellpopulationen nach 19 h und nach 29 h p.i. wurde gegenübergestellt (Abb. 16). Deutlich dominierend an dem Gesamt IFN- γ -Signal war der Anteil der [NK1.1(+)/CD3(-)] Zellpopulation. Demgegenüber war der Anteil der [MHC II(+)] Zellpopulationen an der IFN- γ Produktion zu den Zeitpunkten 19 h p.i. und 29 h p.i. vernachlässigbar gering. Der Anteil der IFN- γ exprimierenden [CD3(+)/CD8b(+)] T-Zellen an dem Gesamt IFN- γ Signal nahm 29 h p.i. im Vergleich zu 19 h p.i. zu. Der Anteil der [CD3(+)/CD4(+)/IFN- γ (+)] Zellpopulation schien über den betrachteten Infektionszeitraum hinweg konstant zu bleiben. Der Anteil der NK-T-Zellen an dem Gesamt-IFN- γ Signal nahm nach 29 h p.i. bis zur Detektionsgrenze ab.

Abb. 23 Anteil der Zellpopulationen an der IFN- γ Produktion nach 19 h und 29 h p.i.



WT Mäuse wurden i.v. mit 5×10^6 VL infiziert. Nach 19 h und 29 h wurden über die Oberflächenmarker MHC II, CD19, CD3, NK1.1, CD8b und CD4 die unterschiedlichen Leukozytenpopulationen der Milz selektioniert und auf ein intrazelluläres IFN- γ Signal hin analysiert. Die einzelne IFN- γ Signale zu den Zeitpunkten 19 h p.i. und 29 h p.i. wurden summiert und gleich 100 % gesetzt. Hiernach wurde der Anteil der einzelnen Zellpopulationen an dem Gesamt-IFN- γ bestimmt. Für jeden Zeitpunkt sind die dargestellten Daten repräsentativ für die Analyse von drei infizierten Tieren.

3.3 Die Abnahme von Zellpopulationen im Verlauf der Infektion

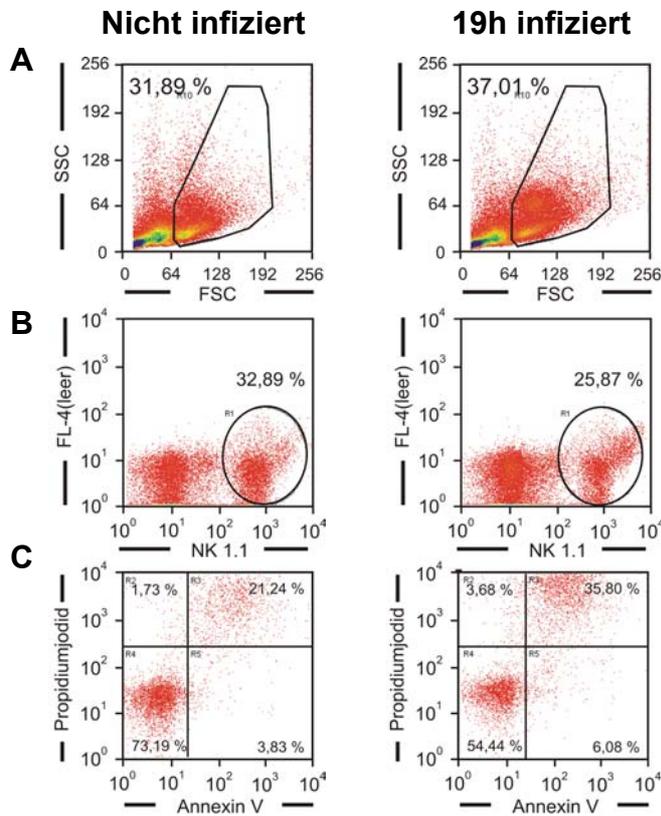
In Abschnitt 3.1 ist dargestellt worden, dass die [NK1.1(+)] Zellpopulation der Milz und der Leber von RAG-1 Mäusen nach 19 h p.i. um ca. 50 % abnahm. Bei syngenen WT Mäusen wurde ebenfalls nach 19 h p.i. eine Abnahme der [NK1.1(+)] Zellpopulationen und [CD3(+)] Zellpopulation der Milz beobachtet, jedoch keine Änderung bei der [MHC II(+)/CD19(+)] Zellpopulation.

In den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, ob diese Abnahme von verschiedenen Subpopulationen der Milz über die verschiedenen Zeitpunkte einer Infektion hinweg auch bei Analyse von lebend im Durchflusszytometer analysierten Zellen (vergl. 2.5.1) bestätigt werden kann. Durch eine Markierung der Zellen mit Annexin V wurde untersucht, ob die einzelnen Leukozytenpopulationen Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche exprimierten (vergl. 2.5.1.2). Die Gegenfärbung der Zellen mit Propidiumjodid (PJ) machte eine Unterscheidung zwischen lebendigen [PJ(-)] und toten [PJ(+)] Zellen möglich. (vergl. 2.5.1.1).

3.3.1 Abnahme der [NK1.1(+)] Zellpopulation bei RAG-1 Mäusen

Die Analyse von [NK1.1(+)] Zellen mit einer Doppelmarkierung von Annexin V und PJ bei Milzzellen von RAG-1 Mäusen zeigte, dass schon ein relativ hoher Anteil der [NK1.1(+)] Milzzellen bei den nicht infizierten RAG-1 Mäusen nach der Aufarbeitung sowohl [Annexin V(+)] als auch [PJ(+)] war. Die [Annexin V(+)/PJ(+)] Teilpopulation diskriminierte sowohl durch Nekrose abgestorbene NK-Zellen als auch NK-Zellen in einem späten Apoptosestadium.

In dem dargestellten Experiment konnte allerdings gezeigt werden, dass der Anteil der lebenden NK-Zellen [Annexin V(-)/PJ(-)] von ca. 73 % bei den nicht infizierten Tieren auf ca. 54 % nach 19 h p.i. abnahm. Die NK-Zellpopulation, welche Marker für das frühen Apoptosestadium [Annexin V(+)/PJ(-)] exprimierten, stieg nur in sehr geringem Maß an (von ca. 4 % bei nicht infizierten Tieren auf ca. 6 % bei den infizierten Tieren, vergl. Abb. 17C). Die [Annexin V(+)/PJ(+)] Teilpopulation war mit ca. 36 % nach 19 h p.i. gegenüber den nicht infizierten Kontrollen mit ca. 25 % p.i. deutlich erhöht (Abb. 17 C). Diese Experimente ergaben deutliche Hinweise, dass im Zuge einer Infektion mit VL große Teile der NK-Zellpopulation nach 19 h abgestorben waren. Eine Aussage über den Mechanismus, Apoptose oder Nekrose, konnte jedoch zu diesem Zeitpunkt der Infektion aus diesen Daten nicht abgeleitet werden.

Abb. 24 Annexin V und PJ -Markierung von NK-Zellen aus der RAG-1 Milz

RAG-1 Mäuse wurden mit VL infiziert, Kontrolltiere wurden nicht infiziert. Nach 19 h p.i. wurden die Tiere getötet, die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert, wobei Zelltrümmer und degenerierte Zellen wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen wurden (A). Die NK1.1(+) Zellen wurden aus den eingegrenzten Leukozyten selektiert (B) auf die Expression von Annexin V und die Sensitivität gegenüber PJ hin analysiert (C).

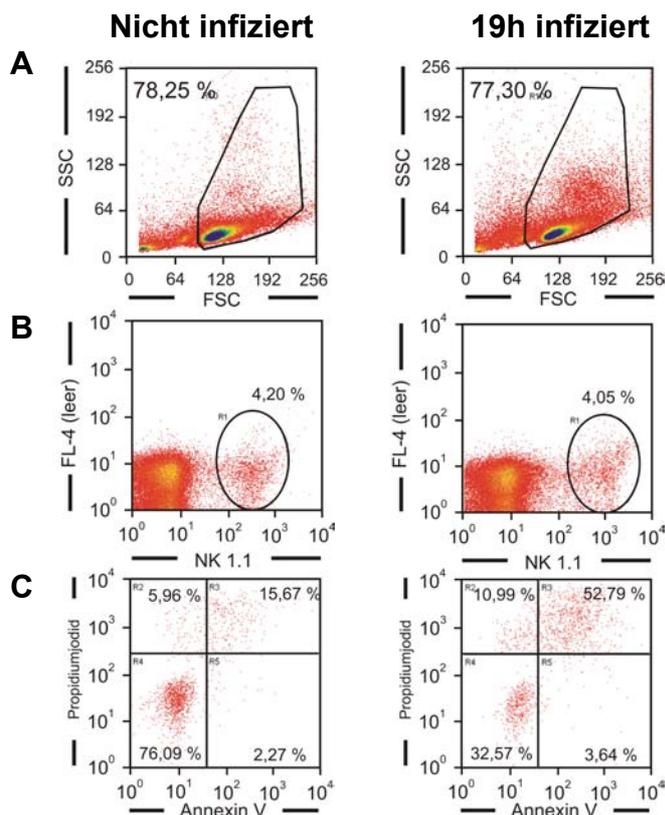
3.3.2 Abnahme von Lymphozytenpopulationen bei WT Mäusen

WT Mäuse wurden mit VL intravenös infiziert. Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 9 h, 19 h und 29 h p.i. wurden die Tiere getötet. Die Zellen der Milz wurden als Einzelzellsuspension aufgearbeitet, und die Leukozyten der Milz wurden mit Antikörpern gegen die Oberflächenmarker NK1.1, CD4, CD8b und CD19, sowie dem Apoptosemarker Annexin V markiert. Anschließend wurden die Zellen lebend im Durchflusszytometer mit einer PJ-Gegenfärbung analysiert.

Auch bei den [NK1.1(+)] Zellpopulationen aus der Milz von nicht infizierten WT Mäusen konnte gezeigt werden, dass direkt nach der Aufarbeitung ein hoher Anteil sowohl [Annexin V(+)] als auch [PJ(+)] war (Abb. 18, Reihe C). Dieses Ergebnis bestätigte die Beobachtungen, die bei den [NK1.1(+)] Zellen der RAG-1 Mäuse dargestellt wurden (vergl. Abb. 24 Reihe C).

Bei den WT Mäusen nahm der Anteil der lebendigen NK-Zellen [Annexin V(-)/PJ(-)] nach 19 h p.i. stark ab. In dem dargestellten Experiment konnten bei nicht infizierten Tieren 76 % lebende NK-Zellen nachgewiesen werden, bei infizierten Tieren waren es noch ca. 33 % (Abb. 18C). Dementsprechend stieg der Anteil der [Annexin V(+)/PJ(+)] NK-Zellen an, in dem dargestellten Experiment von ca. 16 % auf ca. 53 % nach 19h p.i. Auch diese Ergebnisse bestätigten die unter 3.3.1 dargestellten Hinweise, dass die NK-Zellpopulation im Verlauf der Infektion abgestorben war. Ein Anstieg der NK-Zellen, die Marker für das frühe Apoptosestadium exprimierten [NK1.1(+)/Annexin V(+)/PJ(-)], war jedoch bei den infizierten Tieren im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrolltieren nur sehr gering. Diese Beobachtung konnte ebenfalls bei den infizierten RAG-1 Mäusen gezeigt werden. Auch bei den WT Mäusen konnten somit keine Hinweise auf Apoptose gezeigt werden.

Abb. 25 Annexin V und PJ-Markierung von NK-Zellen aus der Milz von WT Mäusen



WT Mäuse wurden mit VL infiziert. Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 19 h p.i. wurden die Tiere getötet, die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert, wobei Zelltrümmer und degenerierte Zellen über die Größe und Granularität ausgeschlossen wurden (A). Die NK1.1(+) Zellen wurden aus den eingegrenzten Leukozyten selektiert (B) auf die Expression von Annexin V und die Sensitivität gegenüber PJ hin analysiert (C).

Die in Abschnitt 3.2 in Bezug auf die IFN- γ Produktion analysierten Subpopulationen der Milz wurden zu verschiedenen Zeitpunkten auf die Expression von Phosphatidylserin auf der Membranoberfläche und auf die Anfärbbarkeit mit PJ hin untersucht (Abb. 19). Der Anteil

der eingegrenzten Leukozyten war zu allen betrachteten Zeitpunkten der Infektion annähernd gleich.

Der Anteil der lebenden NK1.1(+) Zellen [Annexin V (-)/PJ(-)] nahm schon nach 9 h p.i. leicht ab. Nach 19 h p.i. war der Anteil schon um ca. 60 % im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen reduziert (von ca. $\{2,7 \pm 0,3\}$ % bei den nicht infizierten Kontrollen auf ca. $\{1,1 \pm 0,4\}$ % nach 19 h p.i.). Demgegenüber konnte ein kontinuierlicher Anstieg der PJ(+), toten [NK1.1(+)] Zellen bis 29 h p.i. dargestellt werden. Hierbei war der Anteil der Zellen, die Marker für frühe Apoptosestadien [Annexin V (+)/PJ(-)] exprimierten, zu allen betrachteten Zeitpunkten der Infektion nur sehr gering (Abb. 19A). Dies lässt eher das Einwirken von Nekrose bei NK-Zellen vermuten.

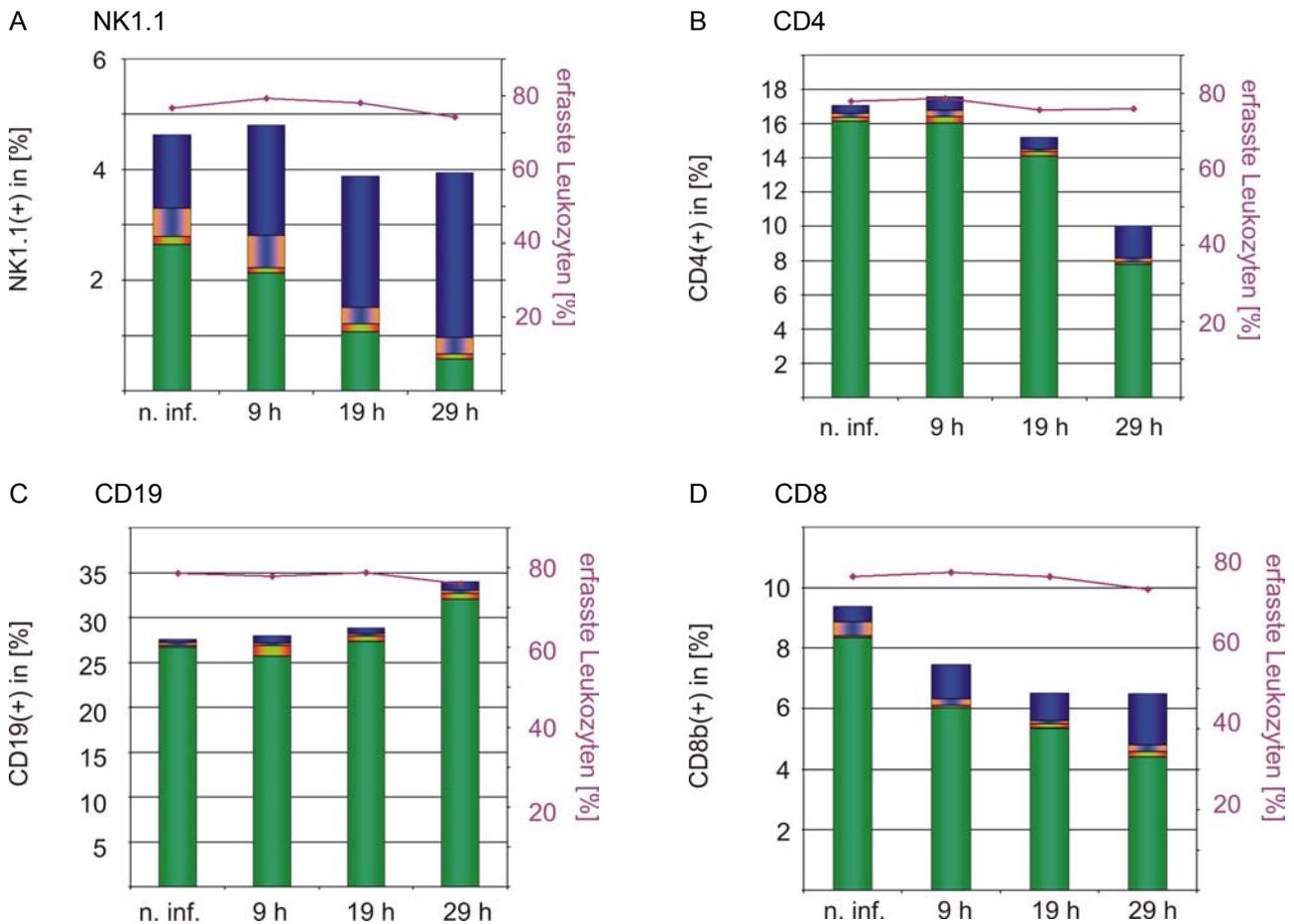
Der Anteil der [CD4(+)/Annexin V (-)/PJ(-)] Zellpopulation (im Wesentlichen lebende CD4(+) T-Helferzellen) nahm nach 19 h p.i. leicht ab und zeigte nach 29 h p.i. eine Reduktion von ca. 50 % verglichen mit den nicht infizierten Kontrollen (von ca. $\{16,1 \pm 1,1\}$ % bei den nicht infizierten Kontrollen auf ca. $\{7,8 \pm 1,0\}$ % nach 29 h p.i.). Es konnten keine Hinweise auf ein verstärktes Absterben [PJ(+)] oder auf eine verstärkte Apoptose [Annexin V (+)/PJ(-)] gefunden werden (Abb. 19B).

Der Anteil der lebenden [CD8b(+)/Annexin V (-)/PJ(-)] Zellpopulation erschien schon nach 9 h p.i. deutlich reduziert, dieser Trend setzte sich bis 29 h p.i. fort. Hier konnte ein 50 %-ige Reduktion der Zellpopulation im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen gemessen werden (von ca. $\{8,3 \pm 0,7\}$ % bei den nicht infizierten Kontrollen auf ca. $\{4,4 \pm 0,5\}$ % nach 29 h p.i.). Der Anteil der [Annexin V(+)/PI(-)]-Zellpopulation war zu allen betrachteten Zeitpunkten der Infektion sehr gering und zeigte keine Hinweise auf Apoptose bei dieser Zellpopulation (Abb. 19D). Ein Hinweis auf ein verstärktes Absterben [PJ(+)] konnte ebenfalls nicht gezeigt werden.

Die [CD19(+)/Annexin(-)/PJ(-)] Zellpopulation (lebende B-Zellen) zeigte im Gegensatz zu den vorher betrachteten Zellpopulationen nach 19 h p.i. eine leichte Zunahme, die sich nach 29 h p.i. noch verstärkte. Hier waren nur wenige Zellen mit PJ anfärbbar. Im Vergleich mit dem PJ-sensitiven Anteil der T-Zellen und NK-Zellen war der Anteil der B-Zellen deutlich geringer (Abb. 19; vergl. A, B und D mit C). Diese Analysen mit vitalen Milzzellen bestätigten die Beobachtungen der intrazellulären Analysen, dass die [MHC II(+)/CD19(+)] Zellpopulation der infizierten WT Mäuse im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen nicht abnahm (3.2.1, Abb. 22).

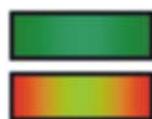
Die in Abb. 19 dargestellten Daten zeigten, dass die B-Zellen der Milz von der Infektion mit VL nicht in dem Maß beeinflusst worden waren, wie die NK-Zellen und die T-Zellpopulationen. Sowohl bei NK-Zellen als auch bei den T-Zellen konnten mittels Annexin V Markierung keine Hinweise auf Einwirkungen von Apoptose dargestellt werden.

Abb. 26 Analyse von WT Milzzellen auf Apoptosemarker im Verlauf einer Listerieninfektion

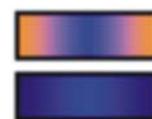


WT Mäuse wurden mit VL infiziert, Kontrollen wurden nicht infiziert (n. inf.). Nach 9 h, 19 h und 29 h wurden Tiere getötet. Die Zellen der Milz wurden mit charakteristischen Oberflächenmarkern NK1.1 (A), CD4 (B); CD19 (C) und CD8b (D) sowie Annexin V und PI markiert. Dann wurden die markierten Zellen lebend im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte der zu den einzelnen Zeitpunkten durchgeführten Messungen. Auf der rechten y-Achse sind die eingegrenzten Leukozyten bezogen auf alle gespeicherten Messereignisse zu den einzelnen Zeitpunkten 0 h, 9 h 19 h und 29 h bezeichnet. Auf der linken y-Achse wurden die als positiv für den entsprechende Marker erfassten Messereignisse bezogen auf die erfassten Leukozyten betrachtet (vergl. 2.5.4.1). Die positiven Messereignisse für die einzelnen Marker (A,B,C,D) teilen sich auf in

[Annexin V(-) / PI (-)]
vitale Zellen
[Annexin V(+) / PI(-)]
frühes Apoptosestadium



[Annexin V(-) / PI(+)]
Nekrose
[Annexin V(+) / PI(+)]
späte Apoptose
/Nekrose



3.4 CD122 Expression und intrazelluläres IFN- γ bei murinen NK-Zellen im Verlauf einer Infektion

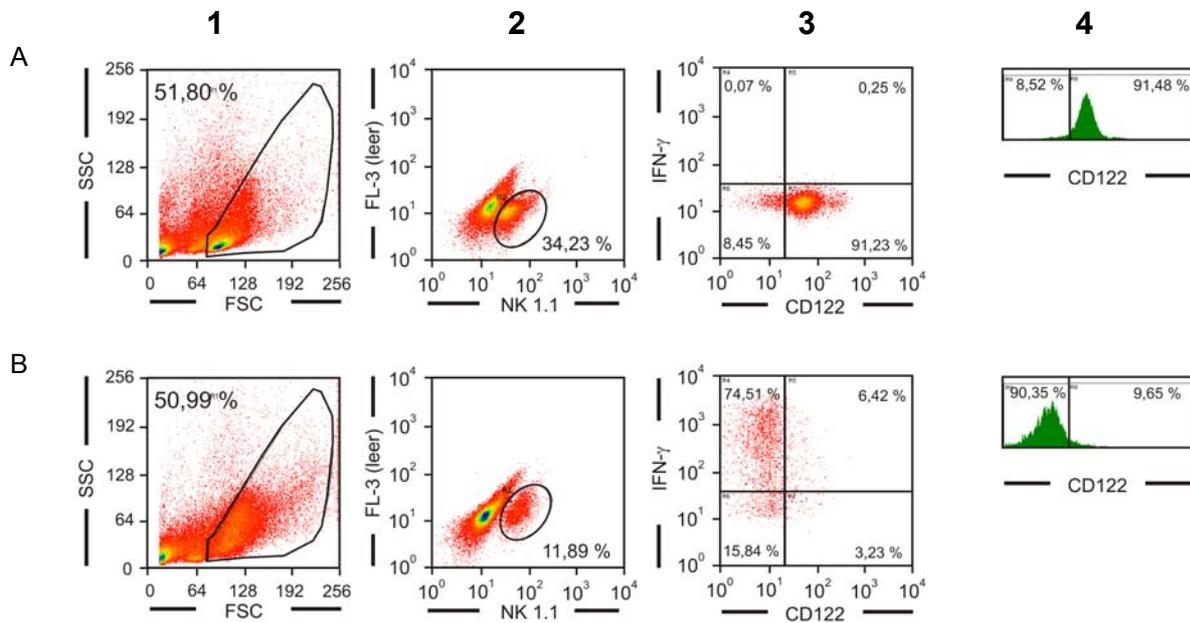
Murine NK-Zellen tragen einen Rezeptor für IL-15 und IL-2 auf der Oberfläche (vergl. 1.5). Durch eine Doppelmarkierung der Oberflächenantigene NK1.1 und der IL2/IL15R β Kette (CD122) ist somit eine genaue Abgrenzung der NK-Zellpopulation von den übrigen Leukozytenpopulationen möglich.

3.4.1 Analyse der NK-Zellen aus der RAG-1 Milz

RAG-1 Mäuse wurden mit VL infiziert, Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 19 h wurden die Tiere getötet. Die Milzzellen wurden als Einzelsuspension aufgearbeitet und weitere 4 h in Gentamicin- und BFA-haltigem Kulturmedium *in vitro* inkubiert. Danach wurden sie mit den monoklonalen Antikörpern anti CD122, anti NK1.1 und intrazellulär mit dem mAk anti IFN- γ markiert.

[NK 1.1(+)] Zellen aus der Milz von nicht infizierten RAG-1 Mäusen exprimierten auf der Oberfläche die β -Kette des IL-2/IL15 Rezeptors (CD122, Abb. 20A). Ein intrazelluläres Signal für IFN- γ konnte bei dieser [NK1.1(+)/CD122(+)] Zellpopulation nicht nachgewiesen werden. [NK1.1(+)] Zellen aus der Milz von VL infizierten RAG-1 Mäusen zeigten nach 19 h p.i. ein deutliches intrazelluläres Signal für IFN- γ . Auf diesen Zellen allerdings wurde CD122 nicht exprimiert (Abb. 20B). Die NK-Zellen aus der Milz infizierter RAG-1 Mäuse zeigten somit eine inverse Reaktion zwischen der membranständigen Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- γ gegenüber den nicht infizierten Kontrollen.

Dieses Phänomen konnte sowohl bei den [NK1.1(+)] Zellen der Milz (Abb. 20A und 20B), als auch bei den NK-Zellen der Leber beobachtet werden (Daten nicht dargestellt).

Abb. 27 IFN- γ Produktion und CD122 Expression bei [NK1.1(+)] RAG-1 Milzzellen

RAG-1 Mäuse wurden nicht behandelt (A) oder mit VL infiziert (B). Nach 19 h p.i. wurden die Tiere getötet. Die Milzzellen wurden 4 h in vitro in einem BFA- und Gentamicin-haltigem Medium inkubiert, dann wurden die Leukozyten nach einer Erythrozytenlyse im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen (1). Die NK1.1(+) Zellen wurden selektioniert (2) und auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche und intrazellulärem IFN- γ hin untersucht (3 und 4).

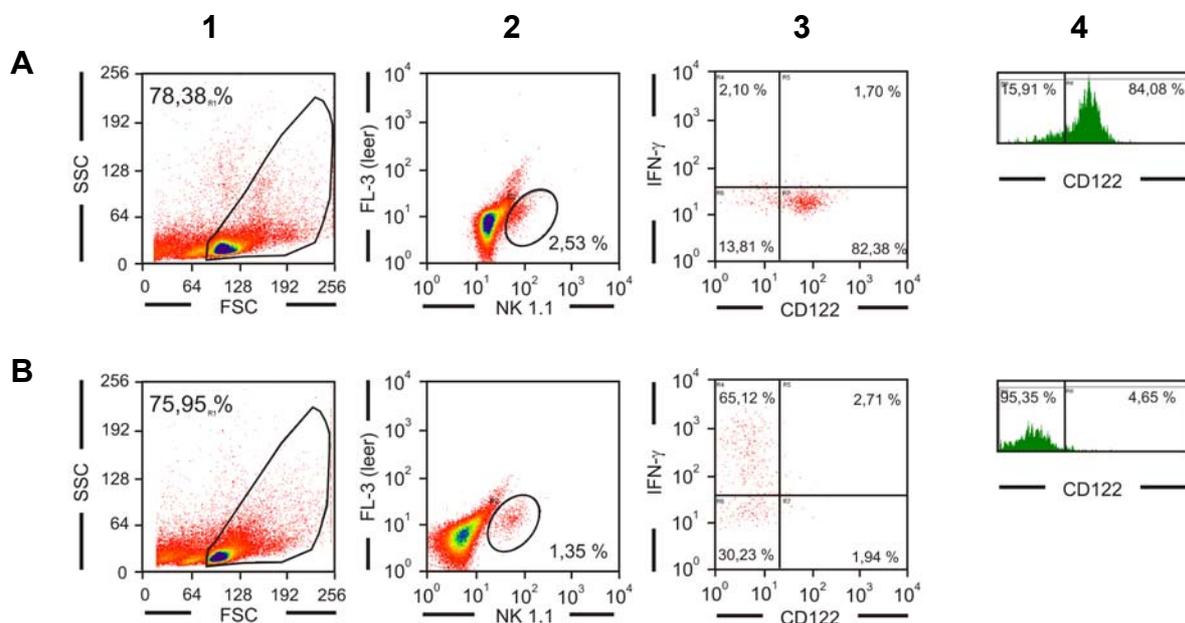
3.4.2 Analyse der [NK1.1(+)] Milzzellen von syngenen WT Mäusen

WT Mäuse wurden analog den RAG-1 Mäusen mit VL infiziert, auch hier wurden die Kontrolltiere nicht behandelt. Nach 19 h p. i. wurden diese Tiere geopfert. Die Milz wurde als Einzelsuspension aufgearbeitet und weitere 4 h mit Brefeldin A- und Gentamicin-haltigem Kulturmedium in vitro inkubiert. Dann wurden die Milzzellen und mit den monoklonalen Antikörpern anti CD122, anti NK1.1, und intrazellulär mit einem anti IFN- γ mAk markiert.

Bei immunkompetenten WT Mäusen ist bei der Betrachtung von NK1.1 exprimierenden Zellpopulationen zwischen einer [NK1.1(+)/CD3(-)] Zellpopulation, den NK-Zellen, und einer [NK1.1(+)/CD3(+)] Zellpopulation, den NK-T-Zellen zu unterscheiden (vergl. 3.2.1). Für eine bessere Übersicht wurde in der Abb. 21 auf diese Unterscheidung verzichtet, zumal schon unter 3.2.1 dargestellt wurde, dass sowohl NK-Zellen als auch NK-T-Zellen nach 19 h p.i. mit VL ein intrazelluläres Signal für IFN- γ exprimierten und die NK-T-Zellen in der Milz nur eine kleine Population darstellen.

Die [NK1.1(+)] Zellpopulationen der Milz von nicht infizierten WT Mäusen exprimierten ebenfalls CD122 auf der Membranoberfläche. Ein intrazelluläres Signal für IFN- γ konnte nicht beobachtet werden (Abb. 21A). Die [NK1.1(+)] Zellpopulationen der Milz von VL infizierten WT Mäusen zeigten deutlich ein intrazelluläres Signal für IFN- γ , jedoch konnte die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche nicht mehr nachgewiesen werden (Abb. 21B). Diese Daten bestätigen die Beobachtungen, die bei mit VL infizierten RAG-1 Mäusen gemacht worden waren (vergl. 3.4.1, Abb. 20).

Abb. 28 IFN- γ Produktion und CD122 Expression bei NK1.1(+) WT Milzzellen



WT Mäuse wurden nicht behandelt (A) oder mit VL infiziert (B). Nach 19 h p.i. wurden die Tiere getötet. Die Milzzellen wurden 4 h in vitro in einem Gentamicin- und BFA-haltigem Medium inkubiert, dann wurden die Leukozyten nach einer Erythrozytenlyse im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen (1). Die NK1.1(+) Zellen wurden selektioniert (2) und auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche und intrazellulärem IFN- γ hin untersucht (3 und 4).

3.5 IFN- γ Produktion und CD122 Expression bei murinen NK-Zellen in vitro

In den folgenden Experimenten steht die Frage im Vordergrund, ob und unter welchen Bedingungen sich die Beobachtungen der Infektionsversuche in Bezug auf die CD122 Expression der NK-Zellen in vitro verifizieren lassen.

3.5.1 Analyse der NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation mit lebenden *Listeria monocytogenes* auf Einzelzellniveau

Bei der in vitro Stimulation von Zellkulturen mit lebenden Bakterien besteht die Gefahr, dass die Bakterien die Zellkultur im Verlauf der Inkubation überwachsen. Die für die Stimulation verwendete Bakterienkonzentration und die Inkubationszeit müssen jedoch so gewählt sein, dass gut detektierbare, intrazelluläre Zytokinsignale sowie Änderungen der Rezeptorexpressionen auf der Membranoberfläche als Reaktion auf die Bakterienstimulation gemessen werden können. In diesem Experiment steht die Optimierung der in vitro Stimulation von Milzzellen naiver RAG-1 Mäuse mit vitalen Listerien (VL) im Vordergrund. Besonderes Augenmerk wurde in der Zeitkinetik (Abb. 22) auf die Entwicklung von CD122 auf den NK-Zellen und die Expression von intrazellulärem IFN- γ gelegt.

Die Milzzellen (WSC) naiver RAG-1 Mäuse wurden als Einzelzellsuspension aufgearbeitet (vergl. 2.4.1) und mit VL in einem Verhältnis VL:WSC = 3:1 infiziert. Nach Ablauf von 2 h, 4 h und 6 h wurden die Zellen gesammelt und mit sterilem PBS gewaschen. Hierdurch wurden nicht internalisierte Bakterien weitestgehend entfernt. Die Zellen wurden dann in dem gleichen Volumen eines Gentamicin- und Brefeldin A-haltigen Mediums aufgenommen und weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach einer Erythrozytenlyse und Blockade der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen mit den mAk anti CD122 und anti NK1.1 auf der Membranoberfläche markiert, fixiert sowie intrazellulär mit anti IFN- γ gefärbt (vergl. 2.9.3)

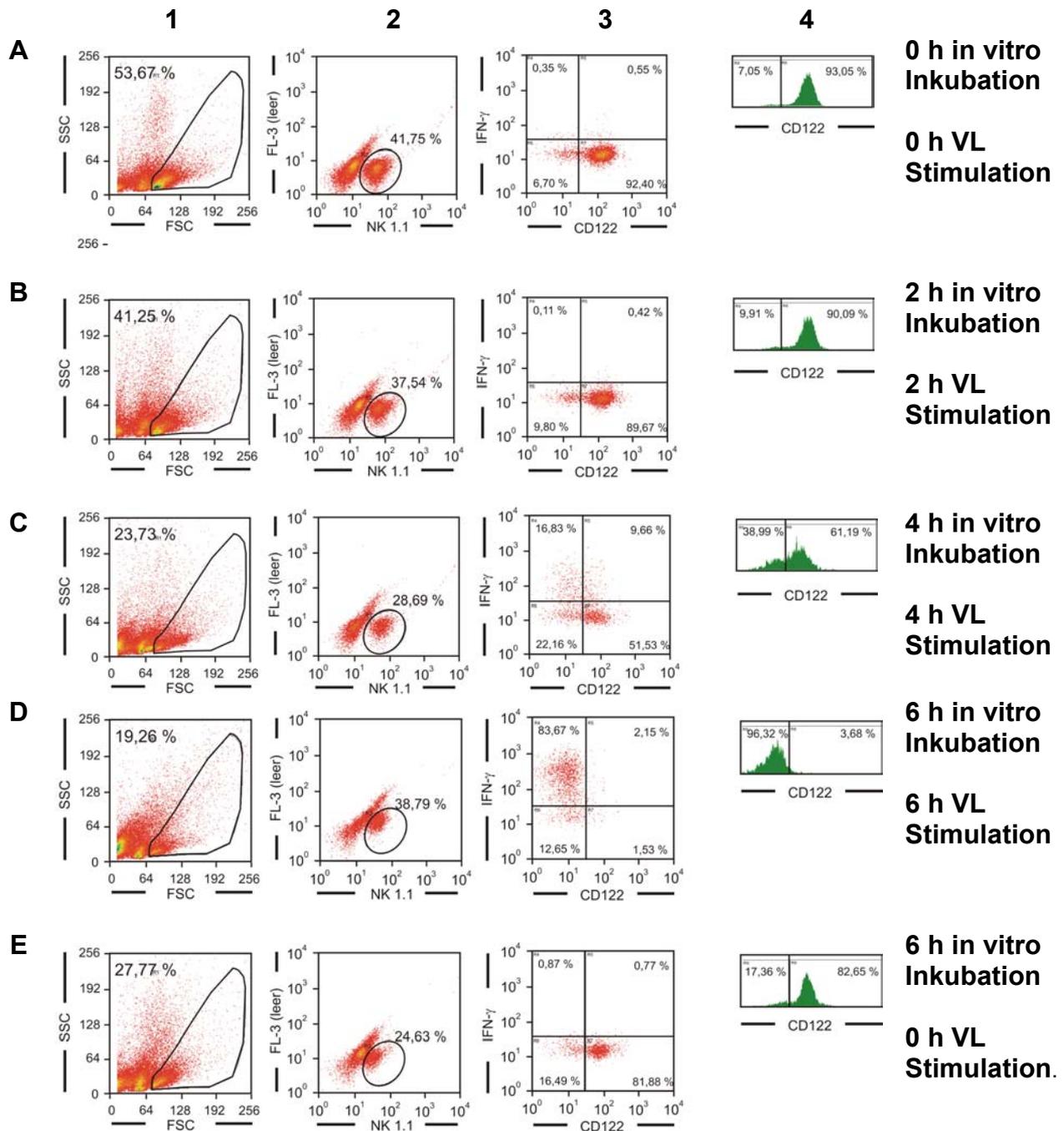
Über die Inkubationszeit hinweg wurde beobachtet, dass die eingegrenzte Leukozytenpopulation deutlich abnahm (Abb. 22, Reihe A bis D). Diese Abnahme zeigte eine Veränderung der Zellen in der Größe (FSC) und der Granularität (SSC) an. Ein Teil der Milzleukozyten wurden mit fortschreitender Inkubationszeit kleiner und granulärer, deutliche Anzeichen für aufgrund von Nekrose oder Apoptose abgestorbene und damit degenerierte Zellen. Diese Zellen wurden nicht mehr als Leukozyten in eine weitere Analyse miteinbezogen (vergl. 2.5.4.1). Auch die [NK1.1(+)] Milzzellpopulation nahm innerhalb der eingegrenzten Leukozytenpopulation über die in vitro Inkubationszeit ab. Die Abnahme der

NK-Zellen erschien dabei weitgehend unabhängig von der VL-Stimulation zu sein, da auch die nicht stimulierten Milzzellkulturen dieses Phänomen zeigten. Diese Abnahme schien eher in der *in vitro* Situation selbst begründet zu sein (vergl. Abb. 22D und 22E).

[NK1.1(+)] Milzzellen, die nicht mit VL stimuliert worden waren, zeigten kein intrazelluläres IFN- γ Signal. Auf der Membranoberfläche wurde CD122 analog den Beobachtungen bei den VL-Infektionen (3.4.1 und 3.4.2) exprimiert. Nach 2 h *in vitro* Stimulation mit VL zeigten die [NK1.1(+)] Milzzellen noch kein intrazelluläres Signal für IFN- γ . Die Signalabnahme von CD122 auf den [NK1.1(+)] Milzzellen war allerdings schon schwach zu erkennen (Abb. 22B). Nach einer *in vitro* Stimulation von 4 h konnte deutlich ein Anstieg der [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation beobachtet werden. Diese Zellpopulation exprimierte zu diesem Zeitpunkt schon ein intrazelluläres Signal für IFN- γ (Abb. 22C). Nach einer *in vitro* Stimulation über 6 h exprimierte die [NK1.1(+)] Milzzellpopulation kein CD122 mehr auf der Oberfläche. Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch ein starkes intrazelluläres Signal für IFN- γ beobachtet werden (Abb. 22D). Milzzellkulturen, die über 6 h *in vitro* ohne Stimulation inkubiert worden waren, zeigten eine Reduktion der [NK1.1(+)] Zellpopulation, aber kein intrazelluläres Signal für IFN- γ und auch keine Abnahme des CD122 Signals bei den NK-Zellen (Abb. 22E).

Diese Beobachtungen bestätigten die Resultate, die bei Infektionen von RAG-1 Mäusen und WT Mäusen mit VL gezeigt wurden (vergl. 3.4). Durch die *in vitro* Stimulation von naiven RAG-1 Milzzellen mit VL wurde dargelegt, dass sowohl die Zunahme des VL-induzierten, intrazellulären IFN- γ Signals als auch die Abnahme von CD122 auf [NK1.1(+)] Zellen über die Infektionszeit titrierbar waren.

Analog den unter 3.1 und 3.2 dargestellten Experimenten waren auch bei einer *in vitro* Stimulation von RAG-1 Milzzellen mit VL die NK-Zellen die wesentliche Quelle für IFN- γ .

Abb. 29 Stimulation von naiven RAG-1 Milzzellen in vitro mit vitalen *Listeria monocytogenes*

Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden direkt nach der Aufarbeitung der Einzelzellsuspension markiert (A), 2 h (B), 4 h (C) 6 h (D) in vitro mit VL stimuliert. Als Kontrolle wurden Milzzellen über 6 h in vitro ohne VL-Stimulation inkubiert (E). Danach wurden die Zellen in BFA- und Gentamicin-haltigem Kulturmedium weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen (1). Die NK1.1(+) Zellen wurden selektioniert (2) und auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche und intrazellulärem IFN- γ hin untersucht (3 und 4).

3.5.2 Vergleich der Zytokinproduktion von RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation mit Hitze-inaktivierten oder lebenden Listerien mittels ELISA

Die Stimulation von Milzzellen *in vitro* mit lebenden Listerien (VL) hat den Nachteil, dass sich die Bakterien während der Stimulationsphase weiter vermehren. Damit kann der Stimulus auf die Zellen nicht konstant gehalten werden. Wird die Dauer der Stimulationsphase zu lang gewählt, so überwachsen die Bakterien die Kultur und führen zu einem Absterben von M Φ und NK-Zellen. Eine Auswertung des Experimentes ist nicht mehr möglich. In Vorversuchen wurde beobachtet, dass eine Stimulationsdauer von 19 h zu einem Überwachsen der Zellkultur geführt hatte (Daten nicht dargestellt).

Für *in vitro* Arbeiten stellte die Verwendung von Hitze-inaktivierten *Listeria monocytogenes* (HKL) als bakteriellen Stimulus eine Möglichkeit dar, die Versuchsbedingungen besser zu standardisieren. In dem folgenden Experiment wurden verschiedene Konzentrationen von VL und HKL über verschiedene Zeitpunkte hinweg in ihrem Potential verglichen, RAG-1 Milzzellen *in vitro* zu einer IFN- γ Produktion zu aktivieren.

3.5.2.1 Vergleich der IFN- γ Produktion

Milzzellen (WSC) von naiven RAG-1 Mäusen wurden *in vitro* nicht stimuliert oder mit HKL in verschiedenen Verhältnissen (HKL:WSC = 1:10, 3:1, 10:1) stimuliert beziehungsweise in den gleichen Verhältnissen mit VL stimuliert (VL:WSC = 1:10, 3:1, 10). Die Überstände wurden nach Ablauf der jeweiligen Stimulationszeit (2 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h) abgenommen und mittels ELISA auf ihre IFN- γ Konzentration hin untersucht.

In dem in Abb. 23 dargestellten Experiment zeigte die Stimulation von RAG-1 Milzzellen mit HKL in einem Verhältnis HKL:WSC = 3:1 in den ersten 8 h keine IFN- γ Titer. Bei einem Verhältnis HKL:WSC = 10:1 konnte nach 7 h eine leichte Erhöhung (0,2 ng/ml IFN- γ) der IFN- γ Konzentration im Kulturüberstand festgestellt werden. Nach 8 h konnten deutliche IFN- γ Titer (ca. 1,3 ng IFN- γ) im Kulturmedium nachgewiesen werden (Abb. 23A).

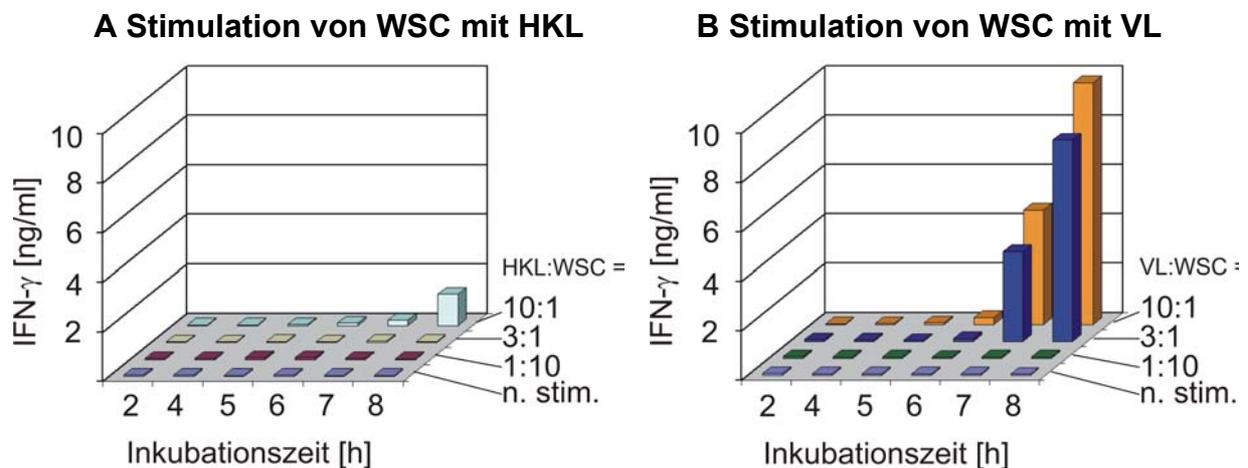
Demgegenüber zeigte die Stimulation von Milzzellen mit VL in einem Verhältnis von VL:WSC = 3:1 schon nach 6 h eine schwache (0,1 ng/ml IFN- γ), nach 7 h (3,6 ng/ml IFN- γ) und 8 h (8,1 ng/ml IFN- γ) jedoch deutliche Erhöhungen der IFN- γ Titer im Kulturmedium. Der Vergleich mit den durch HKL in einem Verhältnis HKL:WSC = 10:1 induzierten IFN- γ Konzentrationen zeigte, dass VL schon bei einem Verhältnis VL:WSC = 3:1 sehr viel höhere IFN- γ Konzentrationen induzierte.

Bei einem Verhältnis VL:WSC = 10:1 waren die IFN- γ Titer im Vergleich zu VL:WSC = 3:1 noch einmal etwas erhöht (nach 6 h ca. 0,3 ng/ml, 7 h ca. 4,5 ng/ml IFN- γ und 8h ca. 9,8 ng/ml), jedoch auch hier waren erst nach 6 h erhöhte IFN- γ Konzentrationen im Kulturmedium messbar (Abb. 23B).

Diese Daten zeigten, dass VL in der Lage waren, Milzzellen stärker zu einer IFN- γ Produktion zu aktivieren, als es mit HKL im der gleichen Inkubationszeit der Fall war.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse von RAG-1 Milzzellen nach einer VL-Stimulation in vitro konnte bei den Zeitpunkten 4 h und 6 h ein intrazelluläres IFN- γ Signal bei NK-Zellen beobachtet werden (vergl. 3.5.1, Abb. 29C und D). Demgegenüber konnte bei HKL stimulierten Milzzellkulturen auch nach einer Stimulationszeit von 19 h kein deutliches intrazelluläres IFN- γ Signal detektiert werden (s.u. 3.5.3, Abb. 25A und F).

Abb. 30 Vergleich der IFN- γ Produktion von in vitro mit VL und HKL stimulierten RAG-1 Milzzellen



$1,0 \times 10^6$ Milzzellen (WSC) von naiven RAG-1 Mäusen wurden in vitro in 1 ml WSC Medium nicht stimuliert oder mit HKL (HKL:WSC = 1:10, 3:1, 10:1; A) bzw. VL (VL:WSC = 1:10, 3:1, 10:1; B) stimuliert. Nach 2 h, 4 h, 5 h, 6 h und 8 h wurden die Zellkulturüberstände gesammelt, sterilfiltriert und auf die IFN- γ Konzentrationen mit Hilfe eines ELISA getestet. Vergleichbare Resultate wurden in zwei unabhängigen Experimenten gemessen.

3.5.2.2 Vergleich der IL-12 Produktion

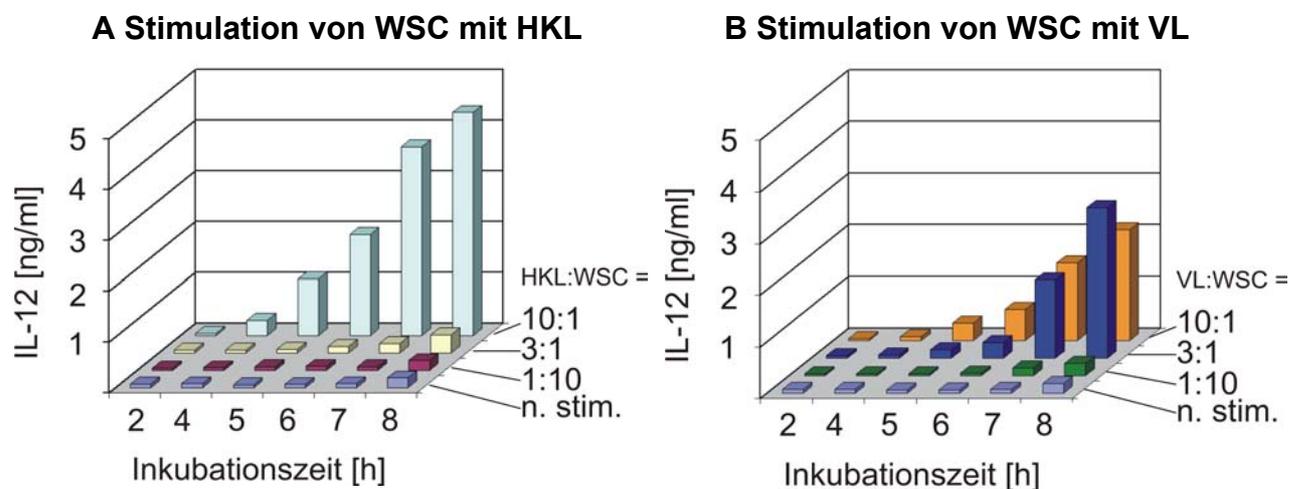
In der Einleitung wurde dargelegt, dass unterschiedliche proinflammatorische Zytokine NK-Zellen zu einer IFN- γ -Produktion aktivieren. Ein Schlüsselzytokin für diese Aktivierung von NK Zellen zu einer IFN- γ Produktion ist IL-12 (vergl. 1.4.2). Um das unterschiedliche Potential von VL und HKL in der Stimulation von RAG-1 Milzzellen zu einer IFN- γ Produktion zu erklären, wurde die Produktion von IL-12 nach Stimulation von RAG-1 Milzzellen mit VL und HKL über verschiedene Zeitpunkte verglichen.

Milzzellen (WSC) von naiven RAG-1 Mäusen wurden wie unter 3.5.2.1 beschrieben *in vitro* stimuliert. Die Überstände der Zellkulturen wurden mittels ELISA auf ihre IL-12 Konzentrationen hin untersucht. Die Stimulation von Milzzellen mit HKL zeigte bei einem Verhältnis von HKL:WSC = 3:1 in dem dargestellten Experiment nach 6 h ein leichtes Ansteigen der IL-12 Konzentration im Zellkulturmedium (0,1 ng/ml), und erhöhte sich bis 8 h auf ca. 0,4 ng/ml. Bei einem Verhältnis von HKL:WSC = 10:1 jedoch konnte schon nach 4 h eine erhöhte IL-12 Konzentration mit Zellkulturmedium gemessen werden (0,3 ng/ml) die über 8 h bis auf 4,4 ng/ml IL-12 anstieg (Abb. 24A).

Bei einer Stimulation der Milzzellen mit VL konnte erst nach 5 h sowohl bei einem Verhältnis von VL:WSC = 3:1 (ca. 0,1 ng/ml) als auch bei einem Verhältnis von VL:WSC = 10:1 (0,3 ng/ml) eine schwache IL-12 Konzentration im Zellkulturüberstand gemessen werden. Die IL-12 Konzentrationen erhöhten sich kontinuierlich bis zu einer Inkubationszeit von 8 h, erreichte aber maximal nur 2,9 ng/ml bei einer Verhältnis von VL:WSC = 3:1 und nur 2,1 ng/ml bei einem Verhältnis von VL:WSC = 10:1.

Diese Daten zeigten, dass HKL (HKL:WSC = 10:1) durchaus in der Lage waren, eine starke IL-12 Produktion bei RAG-1 Milzzellkulturen *in vitro* zu induzieren (Abb. 24B). Diese IL-12 Produktion reichte jedoch nicht für die Induktion einer IFN- γ Produktion bei NK-Zellen aus (vergl. 3.5.2.1).

Abb. 31 Vergleich der IL-12 Produktion von in vitro mit HKL und VL stimulierten RAG-1 Milzzellen



$1,0 \times 10^6$ Milzzellen (WSC) von naiven RAG-1 Mäusen wurden in vitro in 1 ml WSC Medium nicht stimuliert (n. stim.) oder mit HKL (HKL:WSC = 1:10, 3:1, 10:1; A) bzw. VL (VL:WSC = 1:10, 3:1, 10:1; B) stimuliert. Nach 2 h, 4 h, 5 h, 6 h und 8 h wurden die Zellkulturüberstände gesammelt, sterilfiltriert und auf die IL-12 Konzentrationen mit Hilfe eines ELISA getestet. Vergleichbare Resultate wurden in zwei unabhängigen Experimenten gemessen.

3.5.3 Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- γ bei NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation durch Hitze-inaktivierte Listerien und IL-2 oder IL-15

Kaufmann und Mitarbeiter beschrieben, dass aktivierte NK-Zellen sowohl spontan zytotoxisch wirken als auch Produzenten von IFN- γ sind. Sie zeigten, dass Milzzellen von RAG-1 Mäusen in vitro durch HKL nicht aktiviert wurden, allerdings durch Costimulation von HKL und rekombinantem IL-2 (Daugelat et al., 1996).

In der Einleitung wurde dargelegt, dass IL-2 und IL-15 an gleiche Untereinheiten, CD122 und CD132, eines Rezeptors binden. Auf diese Weise erklären sich auch viele Überschneidungen in ihren biologischen Funktionen. Eine Optimierung der IFN- γ Produktion bei NK-Zellen aus der RAG-1 Milz wäre also durch in vitro Stimulation von HKL und Costimulation von IL-2 oder IL-15 denkbar.

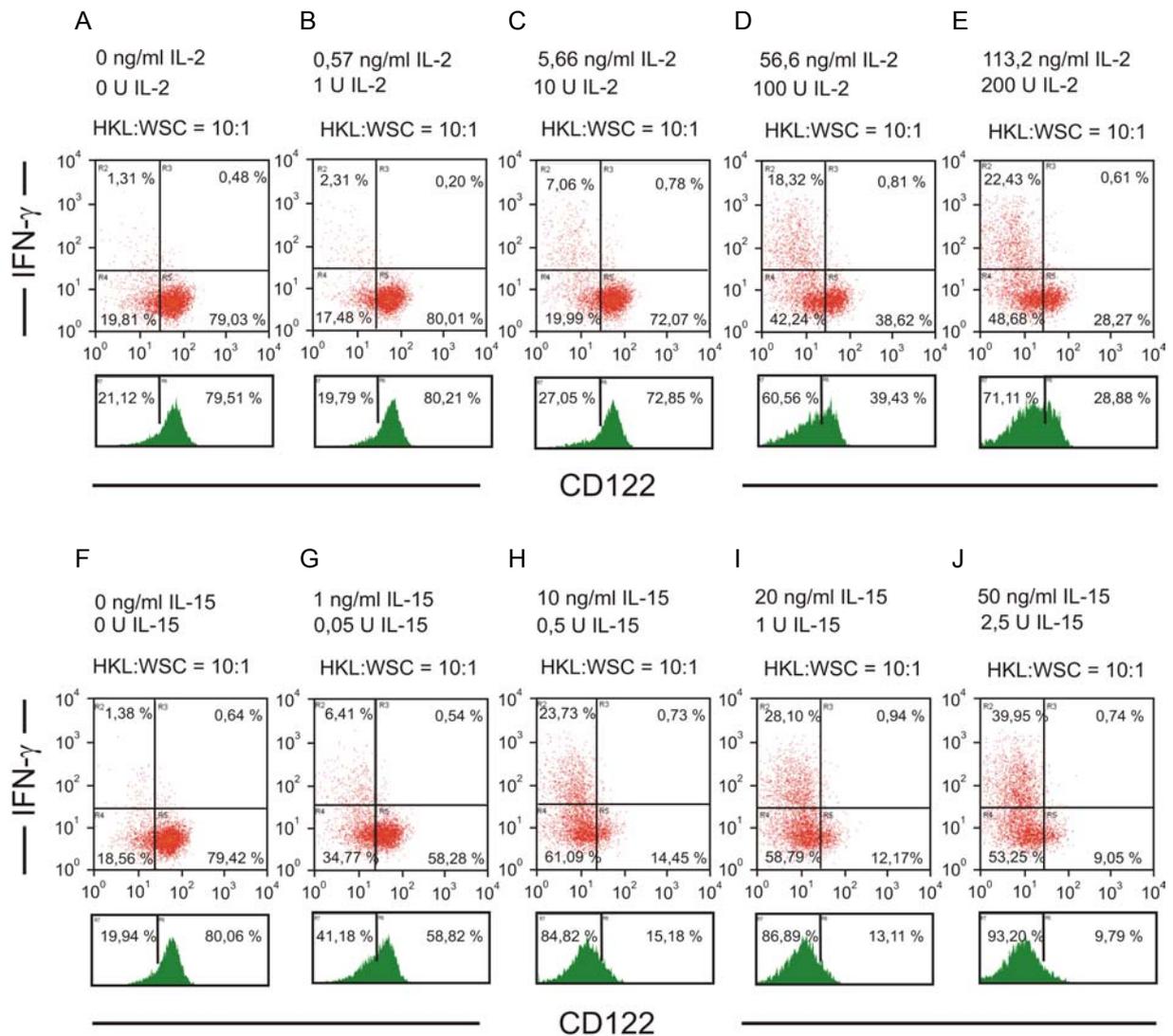
Durch die folgenden Experimente wurde die IFN- γ Produktion von naiven RAG-1 Milzzellen durch in vitro Stimulation von HKL und Costimulation durch IL-2 oder IL-15 optimiert. Die

hier eingesetzten IL-2 oder IL-15 Konzentrationen wurden dabei so gewählt, dass diese allein nicht in der Lage waren, die NK-Zellen zu einer IFN- γ Produktion zu aktivieren.

WSC von RAG-1 Mäusen wurden ohne Zusatz von IL-2 oder IL-15 (Abb. 25 A und F), mit Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen IL-2 (Abb. 25B bis 25E) oder mit Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen IL-15 (Abb. 25G bis 25J) *in vitro* inkubiert. Die Milzzellkulturen wurden mit einem Verhältnis von HKL:WSC = 10:1 über 19 h stimuliert, danach wurden die Zellen weitere 4 h mit in einem BFA-haltigem Medium inkubiert. Nach der Erythrozytenlyse und dem Block der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen mit den mAk anti NK1.1 und anti CD122 auf der Zelloberfläche markiert. Die Zellen wurden danach fixiert und intrazellulär mit anti IFN- γ mAk markiert. Analog der in Abb. 22 (vergl. 3.5.1) gezeigten Darstellungen wurden degenerierte Zellen und Zelltrümmer über ihre Streulichteigenschaften Größe und Granularität von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die [NK1.1(+)] Zellen wurden auf die Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- γ hin analysiert.

Die HKL Stimulation ohne Costimulation mit IL-2 (Abb. 25A) oder IL-15 (Abb. 25F) zeigte nur eine geringfügige Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals (ca. 1,3 %) bei den NK-Zellen, sie exprimierten jedoch CD122 auf der Oberfläche. Mit der Zugabe steigender Konzentrationen IL-2 (Abb. 25B bis 25E) oder IL-15 (Abb. 25G bis 25J) stieg der Anteil der [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation an. Ebenso stieg der Anteil der [NK1.1(+)] Milzzellen an, die ein intrazelluläres Signal für IFN- γ exprimierten. Diese [IFN- γ (+)] Zellen waren generell [NK1.1(+)]-Zellen, die kein CD122 mehr auf der Membranoberfläche exprimierten. Bei einem Vergleich der IL-2 Zugabe und der IL-15 Zugabe zu dem Kulturmedium war stets folgendes zu beobachten:

Im Vergleich zu IL-2 induzierten geringere IL-15 Konzentrationen im Kulturmedium eine stärkere Abnahme des CD122 Signals auf [NK1.1(+)] RAG-1 Milzzellen (vergl. Abb. 25D und 25J) und sie induzierten ein stärkeres intrazelluläres IFN- γ -Signal bei [NK1.1(+)/CD122(-)] Milzzellpopulationen als vergleichbare IL-2 Konzentrationen (vergl. Abb. 25D und 25J).

Abb. 32 Titration von IL-2 oder IL-15 auf HKL-stimulierte RAG-1 Milzzellen

Naive RAG-1 Milzzellen wurden in einem Kulturmedium mit verschiedenen Konzentrationen von IL-2 oder IL-15 aufgenommen. Die Milzzellen wurden mit HKL:WSC = 10:1 über 19 h *in vitro* stimuliert. Danach wurden die Zellen weitere 4 h mit BFA inkubiert. Nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen. Die NK1.1(+) Zellen wurden selektioniert (vergl. 3.5.1, Abb. 29) und auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche und intrazellulärem IFN- γ hin untersucht (A bis J). Vergleichbare Resultate wurden in drei unabhängigen Experimenten gemessen.

3.5.4 Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- γ bei NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen nach Inkubation mit IL-2 oder IL-15

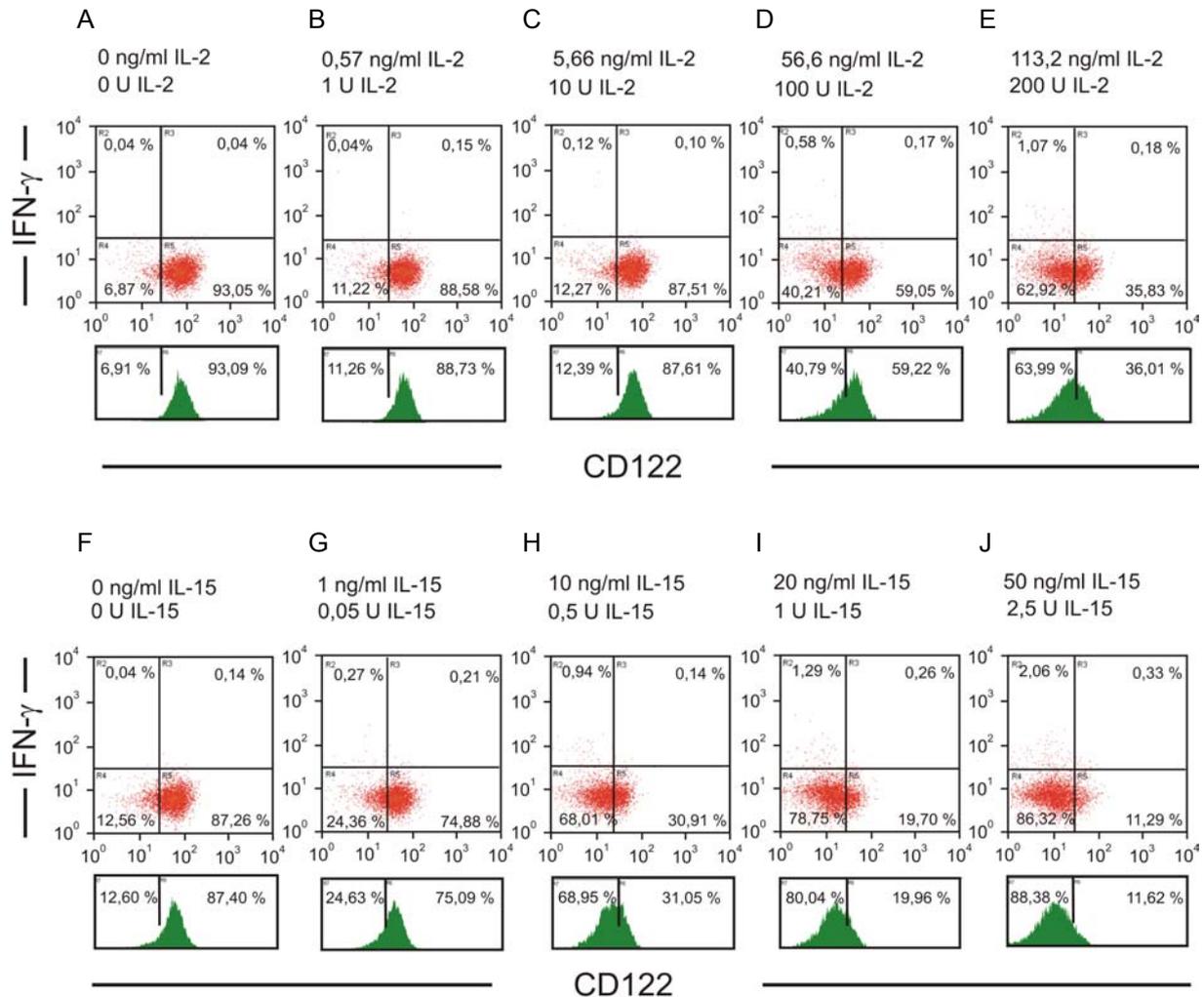
In den folgenden Experimenten wurde kontrolliert, ob die eingesetzten IL-2 oder die IL-15 Konzentrationen allein in der Lage waren, Milzzellkulturen von naiven RAG-1 Mäusen *in vitro* zu einer IFN- γ Produktion zu stimulieren. Bei diesen Experimenten stand die Frage im Vordergrund, ob die Abnahme des CD122 Signals in einem zwingenden Zusammenhang mit der IFN- γ Produktion zu sehen ist.

Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden *in vitro* unter Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen IL-2 oder IL-15 zu dem Kulturmedium 19 h inkubiert. Danach wurden die Zellen weitere 4 h mit in einem Brefeldin A-haltigem Medium inkubiert, dann wie unter 3.5.3 beschrieben markiert und analysiert.

Die *in vitro* Inkubation von Milzzellen ohne Zusatz von IL-2 (Abb. 26A) oder IL-15 (Abb. 26F) zeigten keine Abnahme des CD122 Signals. Mit steigender IL-2 Konzentration (Abb. 26B bis 26E) war eine stetige Zunahme der [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation zu beobachten. Ein intrazelluläres IFN- γ Signal wurde auch bei der höchsten IL-2 Konzentration (Abb. 26E) nicht exprimiert. Analog war mit steigender IL-15 Konzentration im Kulturmedium (Abb. 26G bis 26J) ein Ansteigen der [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation zu beobachten. Auch hier war bei der höchsten, eingesetzten IL-15 Konzentration ein deutliches intrazelluläres IFN- γ Signal nicht zu erkennen (Abb. 26J).

Während eine Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals im Vergleich mit den HKL stimulierten Milzzellen (Abb. 25) nicht detektierbar war, erwies sich die Abnahme des CD122 Signals auf den NK-Zellen mit Zunahme der IL-15 Konzentrationen bzw. IL-2 Konzentration im Kulturmedium sowohl bei den HKL stimulierten (Abb. 17) als auch bei den nicht stimulierten RAG-1 Milzzellen (Abb. 18) als titrierbar.

Bei den nicht stimulierten RAG-1 Milzzellen (Abb. 26) war zu beobachten, dass im Vergleich mit IL-2 geringere IL-15 Konzentrationen in dem Kulturmedium eine stärkere Abnahme des CD122 Signals auf [NK1.1(+)] RAG-1 Milzzellen verursachten (vergl. Abb. 26D: ca. 41 %, und 26J: ca. 86 %).

Abb. 33 Titration von IL-2 und IL-15 auf RAG 1 Milzzellen Mäuse

Naive RAG-1 Milzzellen wurden in einem Kulturmedium mit verschiedenen IL-2 oder IL-15 Konzentrationen aufgenommen. Die Milzzellen wurden ohne Stimulation über 19h in vitro inkubiert, danach weitere 4h mit BFA. Nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen. Die NK1.1(+) Zellen wurden selektiert (vergl. 3.5.1, Abb. 22) und auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche und intrazellulärem IFN- γ hin untersucht (A bis J). Vergleichbare Resultate wurden in drei unabhängigen Experimenten gemessen.

3.6 IL-2 und IL-15 Genexpression bei Milzzellen im Verlauf einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Unter 3.4 und 3.5.1 wurde dargestellt, dass nach einer Infektion mit VL in vivo und in vitro ausschließlich die [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation ein intrazelluläres Signal für IFN- γ

exprimierte. Unter 3.5.3 wurde dargestellt, dass sowohl exogenes IL-2 als auch exogenes IL-15 konzentrationsabhängig *in vitro* die Abnahme des CD122 Signals auf NK-Zellen induzieren konnten und nach HKL Stimulation die Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals verstärken konnten. Unter 3.5.4 wurden dargelegt, dass die Abnahme des CD122 Signals auf NK-Zellen allein abhängig von der exogenen IL-2 oder IL-15 Konzentration ist.

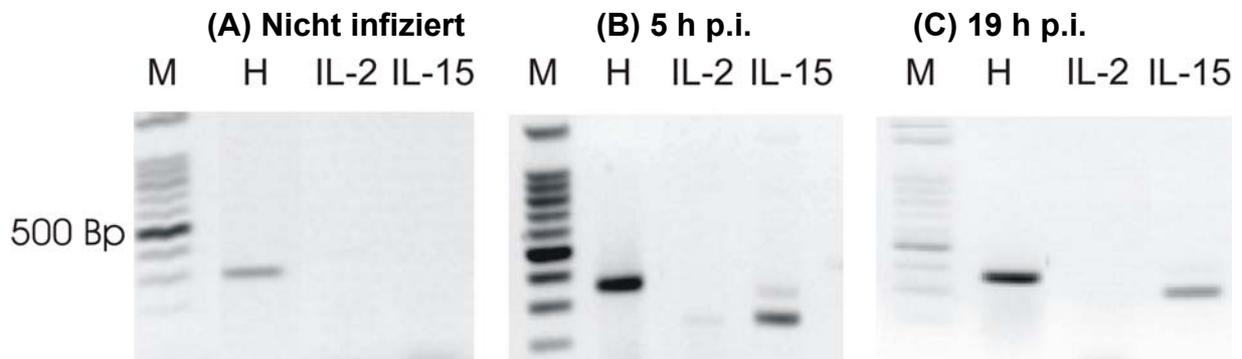
In den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, welche Gentranskripte dieser beiden Zytokine im Verlauf einer Infektion von Mäusen mit VL in den Zellen der Milz nachweisbar sind. Durch diese Experimente sollen Hinweise auf die *in vivo* Regulation von IL-2 und IL-15 bei einer primären, systemischen Infektion mit VL erhalten werden.

3.6.1 Transkription von IL-15 und IL-2 mRNA aus Milzzellen von RAG-1 Mäusen

RAG-1 Mäuse wurden mit VL wie unter 3.1 und 3.2 beschrieben intravenös infiziert, Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 5 h p.i. und nach 19 h p.i. wurden Tiere getötet. Die Milzzellen wurden aus den Organkapseln ausgestrichen (vergl. 2.4.1) und die Gesamt-RNA wurde aus $1,0 \times 10^7$ WSC extrahiert (vergl. 2.7). Mit Hilfe von polyadenylierten Oligonukleotiden wurde die Gesamt-RNA der Milz in komplementäre cDNA umgeschrieben. Unter Verwendung von Oligonukleotiden (Primern), die spezifisch in den IL-2 und IL-15 Gentranskripten binden, wurden für diese mRNA spezifische Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. (vergl. 2.7). Als Kontrolle wurde ein spezifischer Primer für das in den Zellen konstitutiv exprimierte Gen für die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) eingesetzt.

Die nicht infizierten Kontrollen zeigten erwartungsgemäß keine Transkripte der IL-2 oder der IL-15 mRNA (Abb. 27A). Die Analyse der Gesamt RNA aus der Milz infizierter RAG-1 Mäuse zeigte nach 5 h p.i. eine deutliche Transkription des IL-15 Gens an. Das IL-2 Gen wurde im Vergleich zu der Systemkontrolle (HPRT Gen) und der Expression des IL-15 Gens nur sehr schwach transkribiert (Abb. 27B). Nach 19 h p.i. war eine Transkription des IL-2 Gens nicht mehr detektierbar, das IL-15 Gen wurde allerdings weiterhin deutlich erkennbar transkribiert (Abb. 27C).

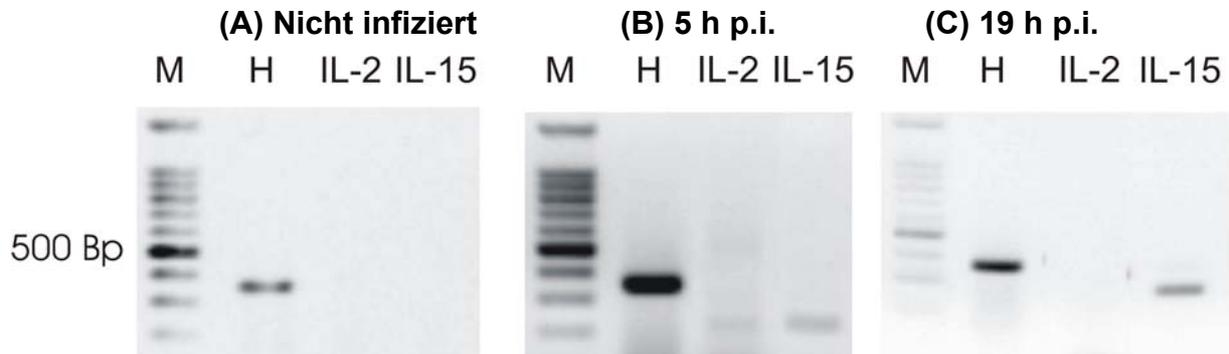
Abb. 34 Transkription der IL-2 und der IL-15 mRNA aus Milzzellen von infizierten RAG-1 Mäusen



RAG-1 Mäuse wurden mit $5,0 \times 10^6$ VL i.v. infiziert. Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Tiere wurden nach 5 h und nach 19 h getötet. Die $1,0 \times 10^7$ Milzzellen wurden als Einzelzellsuspension aufbereitet und die Gesamt-RNA wurde isoliert. Die RNA wurde in komplementäre DNA umgeschrieben. Spezifische Oligonukleotide für das IL-2 oder das IL-15 Gentranskript wurden in der PCR eingesetzt und ein charakteristisches Genfragment wurde amplifiziert. Ebenso wurde ein Genfragment für das konstitutiv transkribierte HPRT-Gen als Positivkontrolle amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem 1,5 %-igem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt mit Hilfe von Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt invers dargestellten Photographien. M bezeichnet den 100 Basenpaar (Bp) Marker, H bezeichnet die Expression des HPRT-Gens (Positivkontrolle, vergl. 2.7)

3.6.2 Transkription von IL-15 und IL-2 mRNA aus Milzzellen von WT Mäusen

WT Mäuse wurden wie unter 3.1 und 3.2 beschrieben mit VL intravenös infiziert, Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Nach 5 h p.i. und nach 19 h p.i. wurden Tiere getötet. Die Milzzellen wurden wie unter 3.6.1 beschrieben behandelt und analysiert. Als Kontrolle wurde die Transkription des HPRT-Gens nachgewiesen (Abb. 28A bis 28C). Die nicht infizierten Kontrollen zeigten erwartungsgemäß keine Transkription des IL-2 oder IL-15 Gens (Abb. 28A). Die Gesamt-RNA aus der Milz VL infizierter WT Mäuse zeigte nach 5h p.i. ein deutliches Signal für eine IL-15 mRNA an. Die IL-2 mRNA wurde zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu der Systemkontrolle und der IL-15 Probe sehr schwach exprimiert (Abb. 28B). Nach 19 h p.i. war eine Transkription der IL-2 Gens nicht mehr detektierbar (analog den in Abschnitt 3.6.1 gezeigten Daten). Das IL-15 Gen wurde allerdings weiterhin deutlich erkennbar abgelesen.

Abb. 35 Transkription der IL-2 und der IL-15 mRNA aus Milzzellen von WT Mäusen

WT Mäuse wurden mit $5,0 \times 10^6$ VL i.v. infiziert. Kontrolltiere wurden nicht behandelt. Tiere wurden nach 5h und nach 19h getötet. Die $1,0 \times 10^7$ Milzzellen wurden als Einzelzellsuspension aufbereitet und die Gesamt RNA wurde isoliert. Die RNA wurde in komplementäre DNA umgeschrieben. Spezifische Oligonukleotide für das IL-2 oder das IL-15 Gentranskript wurden in der PCR eingesetzt und ein charakteristisches Genfragment wurde amplifiziert. Ebenso wurde ein Genfragment für das konstitutiv transkribierte HPRT-Gen als Positivkontrolle amplifiziert. Die Produkte wurden auf einem 1,5 %-igem Agarosegel der Größe nach aufgetrennt mit Hilfe von Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Abbildung zeigt invers dargestellten Photographien. M bezeichnet den 100 Basenpaar (Bp) Marker, H bezeichnet die Expression des HPRT-Gens (Positivkontrolle, vergl. 2.7)

3.7 Einfluss von Brefeldin A bei der Abnahme des CD122 Signals auf der Membranoberfläche von NK-Zellen

Intrazelluläre Analysen, zum Beispiel die hier dargelegten Analysen der [NK1.1(+)] Zellpopulationen auf ein intrazelluläres IFN- γ Signal, setzen eine Inkubation der Zellen mit einer Substanz voraus, welche die Sekretion dieser Proteine verhindert. Sie akkumulieren dann in der Zelle und sind auf diese Weise detektierbar. Bei den bisher dargelegten intrazellulären Analysen wurden die Milzzellen über 4h in vitro mit einem Brefeldin A -haltigen Zellkulturmedium wie unter 2.4.3 beschrieben, inkubiert.

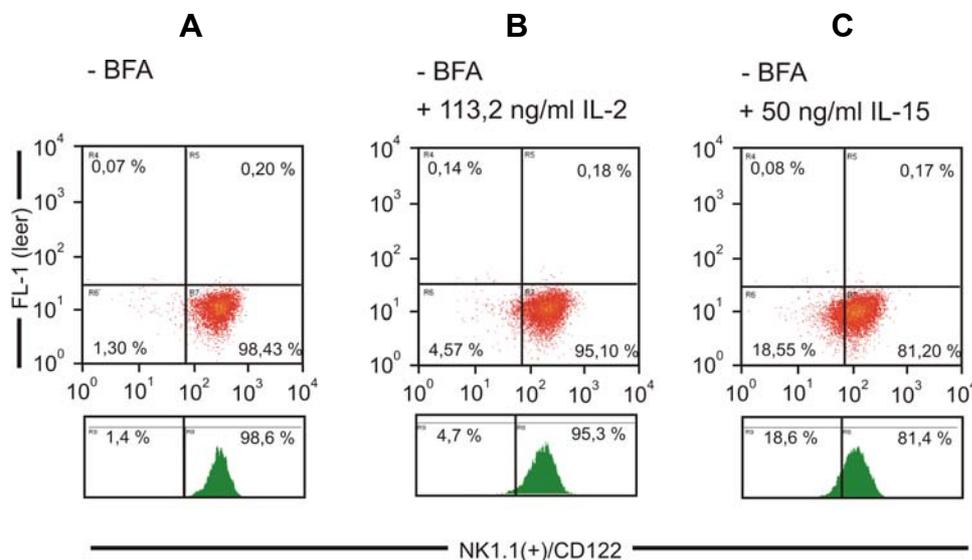
In den folgenden Experimenten wurde die Frage näher analysiert, ob eine Abnahme des CD122 Signals auf NK-Zellen auch unabhängig von der BFA Inkubation beobachtet werden kann, wenn die Zellen nur mit IL-2 oder IL-15 inkubiert werden.

3.7.1 Analyse von NK-Zellen nach IL-2 oder IL-15 Inkubation ohne Brefeldin A-Zusatz

Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden *in vitro* mit Zusatz von 113,2 ng/ml IL-2 (Abb. 29B;) oder 50 ng/ml IL-15 (Abb. 29C,) zu dem Kulturmedium inkubiert, um eine für jedes Zytokin maximale CD122 Bindung im Rahmen der in dieser Arbeit ausgetesteten Titer zu erzielen. Als Kontrolle wurden Milzzellen ohne weiteren Zusatz zu dem Kulturmedium *in vitro* inkubiert (Abb. 29A). Nach 4 h wurde eine Erythrozytenlyse und eine Blockade der Fc-Rezeptoren durchgeführt. Dann wurden die Leukozyten mit mAk gegen NK1.1 und gegen CD122 markiert. Mit einer PJ Gegenfärbung wurden die Zellen vital im Durchflusszytometer analysiert.

Weder bei den Milzzellen, die *in vitro* mit IL-2 inkubiert wurden, noch bei den Milzzellen, die *in vitro* mit IL-15 inkubiert wurden, konnte eine signifikante Abnahme des CD122 Signals innerhalb von 4 h auf der Oberfläche von NK-Zellen beobachtet werden (Abb. 29).

Abb. 36 *In vitro* Inkubation von NK-Zellen mit IL-2 oder IL-15 ohne BFA Behandlung

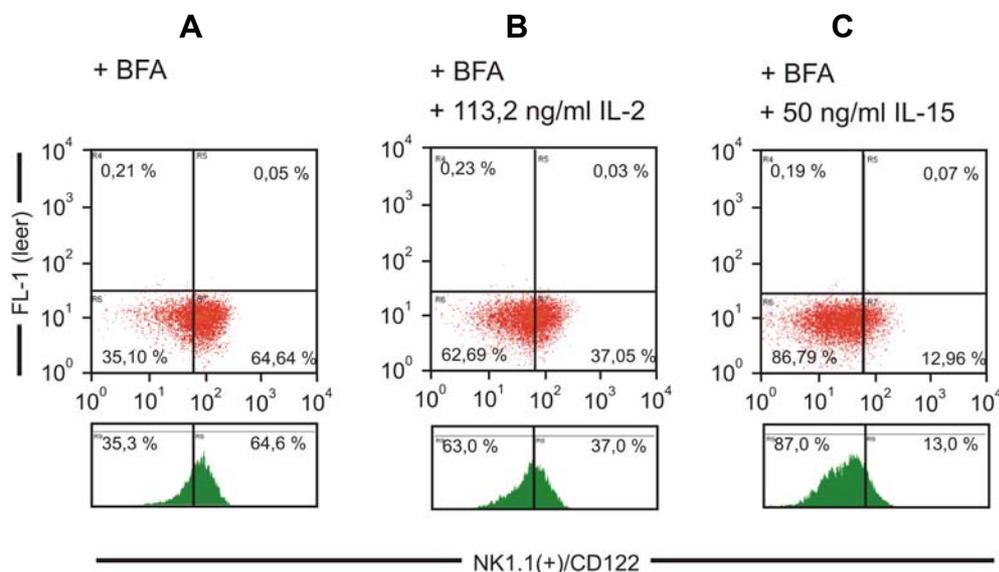


Jeweils $1,0 \times 10^6$ Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden in 1 ml Kulturmedium (A), mit 113,2 ng/ml IL-2 (B) und mit 50,0 ng/ml IL-15 (C) *in vitro* inkubiert. Nach 4 h wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen. [NK1.1(+)] Zellen wurden selektioniert und auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche hin analysiert.

3.7.2 Analyse von NK-Zellen nach IL-2 oder IL-15 Inkubation mit Brefeldin A-Zusatz

Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden über 4 h in einem Brefeldin A-haltigen Kulturmedium unter Zusatz von IL-2 (Abb. 30B; 113,2 ng/ml) oder IL-15 (Abb. 30C, 50 ng/ml) inkubiert. Als Kontrolle wurden Milzzellen mit BFA-haltigem Kulturmedium ohne Zytokinzugabe über 4 h in vitro inkubiert (Abb. 30A). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Milzzellen in der unter 3.7.1 beschriebenen Weise aufgearbeitet und markiert. Im Vergleich zu dem in Abschnitt 3.7.1 dargelegten Versuchsaufbau konnte nach einer Brefeldin A-Behandlung der Milzzellen eine Abnahme des CD122-Signals auf den NK-Zellen gezeigt werden, nachdem die Zellen mit IL-2 oder IL-15 inkubiert wurden (vergl. Abb. 30B und 30C). Die mit IL-15 inkubierte Probe zeigte hierbei eine noch stärkere Abnahme des CD122-Signals als diejenige, die mit IL-2 inkubiert wurde, obwohl die eingesetzte IL-15 Konzentration im Kulturmedium deutlich geringer war als die eingesetzte IL-2 Konzentration (vergl. Abb. 30B und 30C). Dieses Ergebnis zeigte, dass eine Brefeldin A-Inkubation der Milzzellen notwendig war, damit eine durch IL-2 oder IL-15 zu induzierte Abnahme des CD122-Signals auf NK-Zellen detektiert werden konnte (vergl. Abb. 29 und Abb. 30).

Abb. 37 In vitro Inkubation von NK-Zellen mit IL-2 oder IL-15 mit Brefeldin A Behandlung



Jeweils $1,0 \times 10^6$ Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden in 1 ml Kulturmedium mit 10 μ g/ml BFA (A), mit BFA und 113,2 ng/ml IL-2 (B) und mit BFA und 50,0 ng/ml IL-15 (C) in vitro inkubiert. Nach 4 h wurden die Zellen gesammelt, eine Erythrozytenlyse wurde durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen. [NK1.1(+)] Zellen wurden selektioniert und auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche hin analysiert.

3.8 Die biologische Wirkung von IL-15 auf in vitro kultivierte NK-Zellen von RAG-1 Mäusen

Die bisher dargestellten Experimente zeigten für IL-15 eine stärkere biologische Wirkung als IL-2

1. bei der Verstärkung der IFN- γ Produktion von NK-Zellen durch in vitro HKL stimulierte Milzzellkulturen nach Brefeldin A-Inkubation (vergl. 3.5.3) und
2. bei der Induktion der CD122 Signalabnahme auf NK-Zellen aus der RAG-1 Milz nach BFA Inkubation (vergl. 3.5.3, 3.5.4)

Durch Analyse der Genexpression von IL-2 und IL-15 konnten Hinweise erbracht werden, dass das bei einer Infektion für die CD122 Signalabnahme wesentlich verantwortliche Zytokin IL-15 war (vergl. 3.6).

In der Literatur wurde für IL-15 und für IL-2 gezeigt, dass beide Zytokine in vitro einen positiven Einfluss auf das Überleben von NK-Zellen ausüben (Hebert und Pruett, 2001). In den folgenden Experimenten wurden die beiden Zytokine in Bezug auf ihre Fähigkeit getestet, das Überleben der NK-Zellen aus der RAG-1 Milz über 19 h zu sichern.

3.8.1 IL-15 und IL-2 sichern das Überleben der NK-Zellen in RAG-1 Milzzellkulturen.

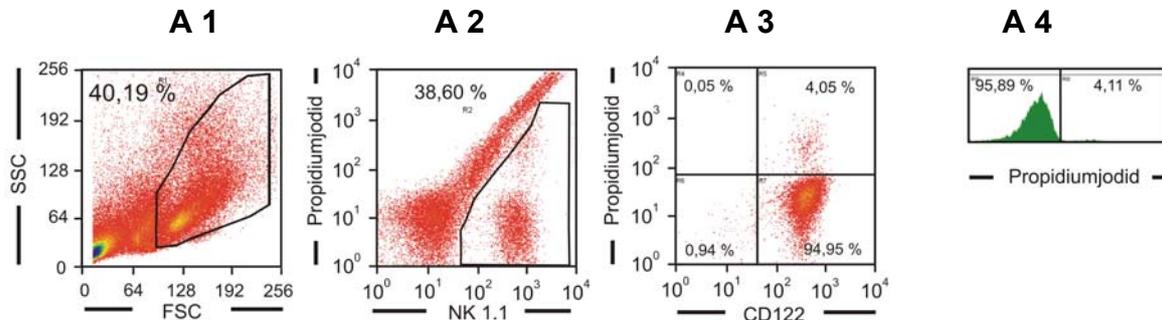
Die Unterschiede in der biologischen Wirkung von IL-2 und IL-15 auf murine NK-Zellen steht bei dieser Untersuchung im Vordergrund. In der Einleitung wurde dargestellt, dass murine NK-Zellen in vitro sehr schnell absterben. IL-2 und IL-15 sind in der Lage, in vitro die Vitalität der murinen NK-Zellen zu verlängern. In den folgenden Experimenten wurde die Wirkung von IL-2 und IL-15 auf das Überleben der NK-Zellen aus der Milz von RAG-1 Mäusen in vitro verglichen.

Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden ohne eine weitere Behandlung wie unter 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben für eine Markierung aufgearbeitet. Die Leukozyten der Milz wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen die Oberflächenantigene NK1.1 und CD122 markiert und danach vital mittels PJ-Gegenfärbung im Durchflusszytometer analysiert.

Die Abbildung 31 zeigt eine repräsentative Analyse der [NK1.1(+)] Zellpopulation aus einer RAG-1 Milz. Die direkt nach der Aufarbeitung mittels Durchflusszytometrie analysierten

NK-Zellen zeigten erwartungsgemäß eine hohe Vitalität, 90 % - 96 % der analysierten NK-Zellen war zu diesem Zeitpunkt nicht mit PJ anfärbbar.

Abb. 38 NK-Zellen aus der Milz naiver RAG-1 Mäuse

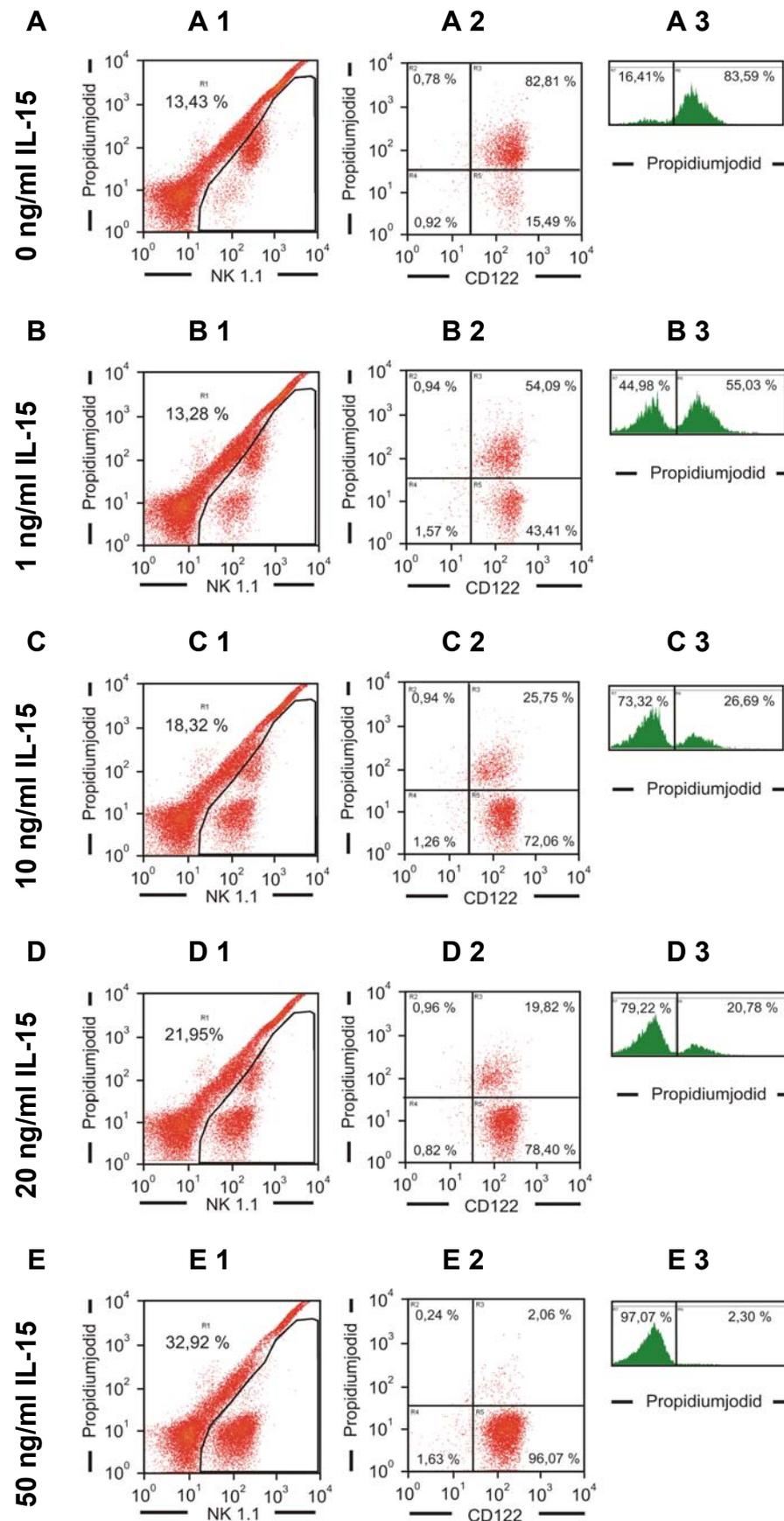


Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden als Einzelzellsuspension aufgearbeitet. Direkt im Anschluss an die Aufarbeitung wurden die Leukozyten mit mAk gegen den Oberflächenmarker NK1.1 und CD122 markiert. Die markierten Zellen wurden dann vital im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe (FSC) und Granularität (SSC) der Messereignisse aus der Betrachtung ausgeschlossen (A1). NK1.1(+) Zellen wurden selektioniert und auf die Expression von CD122 auf der Zelloberfläche und auf die Sensitivität gegenüber PJ hin analysiert (A2 bis A4). Diese Darstellung ist ein repräsentatives Beispiel für Markierungen von Milzzellen aus sechs weiblichen RAG-1 Mäusen.

Nach einer 19-stündigen Inkubation ohne weitere spezielle Zusätze zu dem Kulturmedium waren unter den betrachteten Leukozyten (Abb. 32A1) nur noch ca. 11 % - 14 % als [NK1.1(+)] detektierbar (Abb. 32 und Abb. 33A1). Von diesen NK-Zellen waren über 80 % mit PJ anfärbbar (Abb. 32 A2, A3 und Abb. 33, A2 und A3), d. h. sie waren während der Kultivierungsphase abgestorben. Die Zugabe von geringen IL-15 Mengen zu dem Kulturmedium zeigte konzentrationsabhängig einen stetigen Anstieg der [NK1.1(+)] Zellpopulation (Abb. 32, B1 bis E1). Analog stieg auch der Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation mit dem Anstieg der IL-15 Konzentration im Kulturmedium an, der mit PJ nicht anfärbbar, also als vital angesehen wurde (Abb. 32, B2 und B3, bis E2 und E3). Somit nahm die Vitalität der NK-Zellen mit dem Anstieg der IL-15 Konzentration zu.

Bei einer Konzentration von 50 ng/ml IL-15 im Kulturmedium nach 19 h in vitro war der Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation an den analysierten Leukozyten der Milz nahezu mit jenem identisch, der direkt nach der Aufarbeitung der RAG-1 Milz gemessen werden konnte. (vergl. Abb. 31 A2 und Abb. 32 E1). Von diesen NK-Zellen waren über 90 % mit PJ nicht anfärbbar, d.h. diese Population war vital analog der [NK1.1(+)] Zellpopulation, die direkt nach der Aufarbeitung analysiert wurde (vergl. Abb. 31, A3 und A4 mit Abb. 32, E2 und E3).

Abb. 39 Überleben von murinen NK-Zellen in vitro: Titration von IL-15



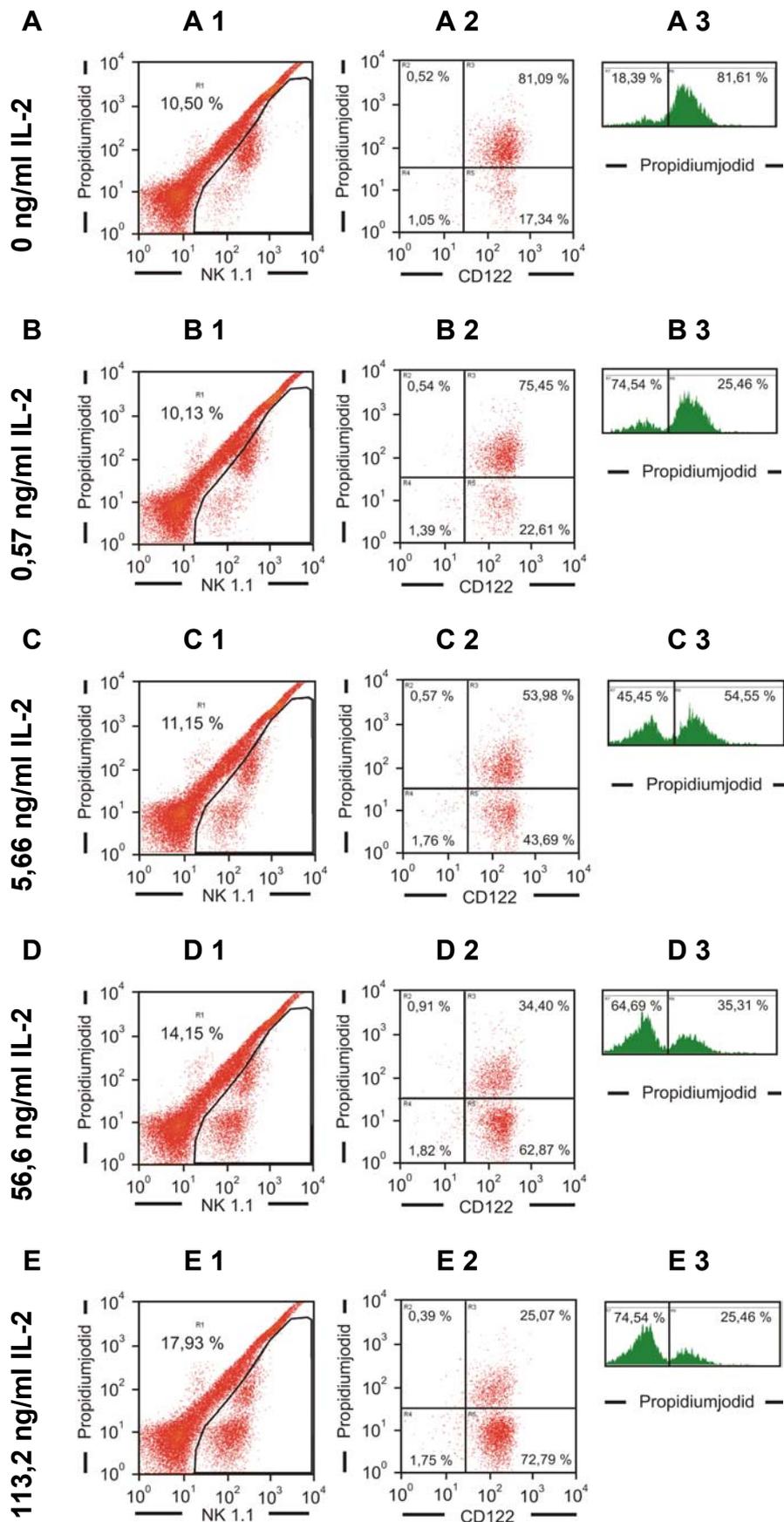
Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden als Einzelsuspension aufgearbeitet und jeweils $1,0 \times 10^6$ wurden in vitro über 19 h ohne IL-15 (A), 1,0 ng/ml IL-15 (B), 10,0 ng/ml IL-15 (C) 20 ng/ml IL-15 (D) 50 ng/ml IL-15 (E) inkubiert. Nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten mit mAk gegen den Oberflächenmarker NK1.1 und CD122 markiert und vital mittels Durchflusszytometrie analysiert. Degenerierte Zellen bzw. Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität aus der Betrachtung (vergl. Abb. 31 A1). NK1.1(+) Zellen wurden selektioniert (A1 bis E1), und auf die Sensitivität gegenüber Propidiumjodid (A2, A3 bis E2, E3) sowie die Expression von CD122 auf der Zelloberfläche (A2 bis E2) hin analysiert.

Auch mit steigender Konzentration von IL-2 in dem Kulturmedium konnte die Vitalität der NK-Zellen über die in vitro Inkubationszeit verbessert werden. Im Vergleich mit der Zugabe von IL-15 war allerdings der Anteil der [NK1.1 (+)] Zellpopulation an den analysierten Leukozyten deutlich geringer (vergl. Abb. 32 , B1 bis E1 und Abb. 33, B1 bis E1). Diese NK-Zellen waren auch gegenüber der PJ-Färbung sensitiver als die, die mit IL-15 inkubiert wurden.

Bei einer Zugabe von 56,6 ng/ml IL-2 zu dem Kulturmedium wurden nur 14 % der über die Größe und Granularität erfassten Leukozyten als NK-Zellen erkannt (Abb. 33D1). Über 30 % dieser Zellen waren sensitiv gegenüber PJ, d.h. sie waren abgestorben. Bei einer Konzentration von 113,2 ng/ml IL-2 im Kulturmedium wurden ca. 18 % als [NK1.1(+)] Zellpopulation der analysierten Leukozyten erkannt (Abb. 33E1), hiervon waren ca. 73 % vital (Abb. 33, E2 und E3). Im Vergleich hierzu wurden bei den direkt nach der Aufarbeitung analysierten Leukozyten ca. 38 % als [NK1.1(+)] Zellpopulation erkannt (Abb. 31A2), hiervon waren ca. 95 % vital (Abb. 31, A3 und A4).

Anzumerken ist, dass trotz ansteigender Konzentration von IL-15 oder IL-2 im Kulturmedium eine Abnahme des CD122 Signals auf der [NK1.1(+)] Zellpopulation ohne Zusatz von Brefeldin A nicht dargestellt werden konnte (Abb. 32 und Abb. 33, A2 bis E2).

Abb. 40 Überleben von murinen NK-Zellen in vitro: Titration von IL-2



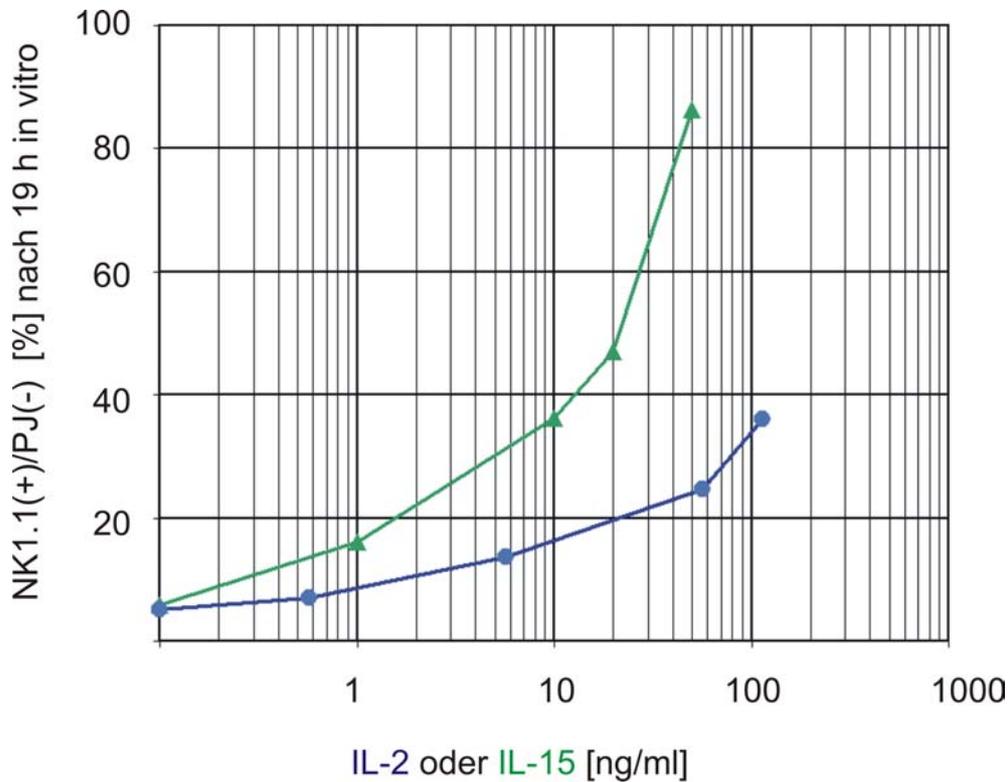
Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden als Einzelzellsuspension aufgearbeitet und jeweils $1,0 \times 10^6$ wurden in vitro über 19h ohne IL-2 (A), 0,57ng/ml IL-2 (B), 5,66 ng/ml IL-2 (C) 56,6 ng/ml IL-2 (D) 113,2 ng/ml IL-2 (E) inkubiert. Nach einer Erythrozytenlyse wurden die Leukozyten mit mAk gegen die Oberflächenmarker NK1.1 und CD122 (Klon 5H4) markiert und vital mittels Durchflusszytometrie analysiert. Degenerierte Zellen bzw. Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität aus der Betrachtung ausgeschlossen (vergl. Abb. 31 A1). [NK1.1(+)] Zellen wurden selektiert (A1 bis E1), und auf die Sensitivität gegenüber Propidiumjodid (A2, A3 bis E2, E3) sowie die Expression von CD122 auf der Zelloberfläche (A2 bis E2) hin analysiert.

Die Abb. 39 A1 bis E1 und Abb. 40 A1 bis E1 stellt jeweils die NK-Zellpopulation aus der insgesamt betrachteten Leukozytenpopulation dar. Über die Abb. 32 A3 bis E3 und Abb. 33 A3 bis E3 konnte der PJ(-) Anteil dieser NK-Zellpopulation ermittelt werden. Somit konnte der als lebend bzw. PJ(-) detektierte Anteil an den insgesamt gemessenen NK-Zellen für die einzelnen IL-2 und IL-15 Konzentrationen bestimmt werden. In gleicher Weise wurde auch der in Abb. 38 dargestellte PJ(-) Anteil der NK-Zellen an den insgesamt betrachteten Leukozyten bestimmt. Diese Größe repräsentierte den Anteil der lebenden NK-Zellen, die ohne zusätzliche in vitro Inkubationen gemessen werden konnte.

Der [PJ(-)]-Anteil der NK-Zellen an den insgesamt betrachteten Leukozyten bei den einzelnen IL-2 und IL-15 Konzentrationen (Abb. 32 und Abb. 33) wurde auf die [PJ(-)] NK-Zellpopulation in Abb. 31 bezogen und so ein relativer Anteil an lebenden NK-Zellen ermittelt. In der Abb. 34 wurde der relative Anteil der lebenden NK-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen IL-2 und IL-15 inkubiert wurden, bezogen auf die lebenden NK-Zellen ohne zusätzliche Inkubation gegenübergestellt.

Eine Inkubation von RAG-1 Milzzellen mit verschiedenen Konzentrationen IL-15 oder IL-2 zeigte eine verbesserte Vitalität der [NK1.1(+)]-Zellpopulation. Ohne Zusatz von IL-2 oder IL-15 waren nach 19 h in vitro Inkubation nur noch ca. 6 % der ursprünglichen NK-Zellpopulation am Leben. Bei einer Konzentration von ca. 50 ng/ml IL-15 in dem Kulturmedium waren ca. 86 % der ursprünglichen NK-Zellpopulation nachweisbar, während bei einer Konzentration von 56 ng/ml IL-2 im Kulturmedium nur noch ca. 25 % der ursprünglichen NK-Zellpopulation nachweisbar waren. Auch bei einer Zugabe von 113 ng/ml IL-2 betrug der Anteil an den in Abb. 31 dargestellten lebenden NK-Zellen nur 36 % .

IL-15 zeigte in diesem Experiment gegenüber IL-2 eine effektivere Wirkung, das Überleben der NK-Zellen von RAG-1 Mäusen in vitro zu verbessern.

Abb. 41 Anteil der PJ(-) NK-Zellen nach 19 h in vitro Inkubation

Jeweils $1,0 \times 10^6$ naive RAG 1 Milzzellen wurden in vitro mit IL-15 (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml) oder mit IL-2 (0 ng/ml, 0,6 ng/ml, 6 ng/ml, 56 ng/ml und 113 ng/ml) über 19 h inkubiert. Über die Durchflusszytometrie wurde der Anteil der lebenden NK-Zellen [NK1.1(+)/PJ(-)] an den insgesamt betrachteten Leukozyten bestimmt. Dieser wurde auf den Anteil der lebenden NK-Zellen bezogen, der direkt nach der Milzentnahme aus dem Tier bestimmt werden konnte.

P(-) NK-Zellen, die direkt nach der Organentnahme gemessen wurden = 100 % lebende NK-Zellen, (vergl. Abb. 31).

3.8.2 Rolle von CD122 für das Überleben in vitro kultivierter NK-Zellen

In dem folgenden Experiment wurde die Frage untersucht, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der IL-15 Bindung an membranständigem CD122 auf NK-Zellen und dem Phänomen der IL-15 induzierten Erhaltung der NK-Zell-Vitalität nachgewiesen werden kann.

Um zu überprüfen, ob die in Abschnitt 3.8.1 dargestellten Auswirkungen von IL-15 auf die Vitalität der NK-Zellen allein durch dieses Zytokin verursacht werden, oder ob Sekundärprozesse (Induktion von anderen Zytokinen, z.B. IL-7 bzw. Caspase inhibitorische Substanzen über parakrine Mechanismen) eine Rolle spielen, wurde die Bindung von IL-15

an die IL-2/IL-15 Rezeptor β -Kette (CD122) durch einen blockierenden Antikörper unterbunden. Als Kontrolle wurden zwei weitere monoklonale Antikörper gleichen Isotyps eingesetzt (Isotypkontrollen).

Milzzellen von naiven RAG-1 Mäusen wurden dem Zusatz von 50,0 ng/ml IL-15 in vitro über 19 h inkubiert. Die Bindung von IL-15 an die IL-2/IL15 Rezeptor β -Kette(CD122) wurde durch die Inkubation von 12 μ g/ml eines nicht markierten, azidfreien anti CD122 mAk (Klon TM- β 1) blockiert (Abb. 35E). Als Isotypkontrollen für die Spezifität der Blockade wurden 12 μ g/ml anti CD16/CD32 mAk (anti FcRIII/II, Klon 24G2, Abb. 35C) und 12 μ g/ml anti MHC II (Klon M5/114; Abb. 35D) eingesetzt. Als Negativkontrolle (Todkontrolle) wurden Milzzellen ohne Zugabe von IL-15 zu dem Kulturmedium und ohne Zusatz von mAk inkubiert (Abb. 35A). Nach Ablauf einer 19-stündigen Inkubation wurden die Zellen wie unter 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben für eine Markierung vorbehandelt, danach wurden die Leukozyten mit den monoklonalen Antikörpern anti NK1.1, anti CD122 (Klon 5H4) auf der Oberfläche markiert. Diese Zellen wurden im Durchflusszytometer mit einer PJ-Gegenfärbung vital analysiert. Die [NK1.1(+)] Milzzellen wurden auf ihre Sensitivität gegenüber (PJ) und auf die Expression von CD122 auf der Zelloberfläche hin untersucht.

Die hier eingesetzten Klone für anti CD122 mAk TM- β 1 und 5H4 binden jeweils an unterschiedliche Epitope des Proteins. TM- β 1 ist als blockierender Antikörper beschrieben worden (Tanaka et al., 1991), während 5H4 die Bindung des Liganden nicht beeinflusst (Malek et al., 1995). In Vortests wurde gezeigt (Daten nicht dargestellt), dass beide Antikörper mit gleicher Statistik die [NK1.1(+)/CD122(+)IFN- γ (-)] Milzzellpopulation erkennen und sich gegenseitig in ihrer Bindung nicht beeinflussen. Die Signalabnahme von CD122 bei IFN- γ produzierenden aktivierten RAG-1 NK-Zellen konnte mit beiden mAk in gleicher Weise nachgewiesen werden.

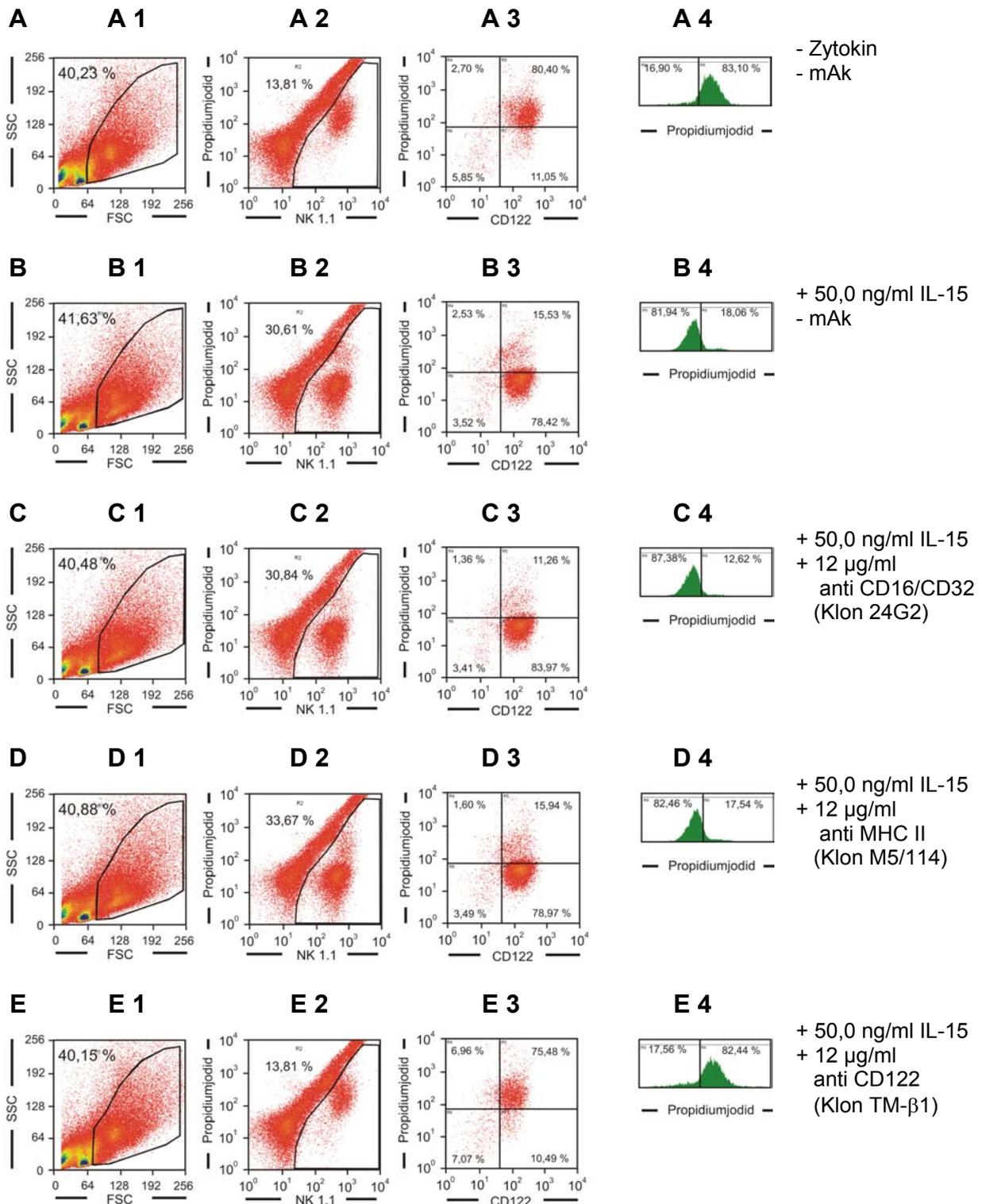
Der Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation bei den Milzzellen, die ohne Zusatz von IL-15 über 19 h in vitro inkubiert wurden, betrug nur ca. 14 % (Abb. 35 A2 , vergl. Abschnitt 3.8.1). Von dieser [NK1.1(+)] Zellpopulation waren ca. 80 % mit PJ anfärbbar und wurden als nicht mehr vital angesehen (Todkontrolle; Abb. 35 A3 und A4). Der Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation bei den Milzzellen, die über 19 h mit 50 ng/m IL-15 in vitro kultiviert wurden, betrug ca. 30 %. Von diesen Zellen waren ca. 78 % nicht mit PJ anfärbbar, d.h. sie wurden als vital angesehen (Lebendkontrolle; Abb. 27 B3 und B4, vergl. auch 3.8.1).

Bei der Inkubation der Milzzellen mit IL-15 und mit anti CD16/CD32 mAk oder mit anti MHC II mAk wurden ca. 31 % bis 34 % der analysierten Leukozyten als [NK1.1(+)]

Zellpopulation erkannt (Abb. 35 C2 und Abb. 35 D2). Es konnten somit ähnlich starke NK-Zellpopulationen als vital detektiert werden, wie es bei der Lebendkontrolle der Fall war (Abb. 35, B3 und B4, vergl. mit Abb. 35, C3 und C4 sowie Abb. 35, D3 und D4). Bei einer Inkubation der Milzzellen mit IL-15 Zusatz, aber gleichzeitiger Blockade der Zytokinbindungsstelle des CD122 Moleküls mit Hilfe des anti CD122 mAk, wurden analog der Todkontrolle nur ca. 14 % als [NK1.1(+)] Zellpopulation erkannt (Abb. 35E2). Von dieser [NK1.1(+)] Zellpopulation waren ca. 76 % mit PJ anfärbbar und somit nicht mehr vital. Auch diese Populationsstärken stimmten mit denen der Todkontrolle überein (Abb. 35 E3 und E4, vergleich mit A3 und A4).

Die hier für IL-15 gezeigten Daten konnten prinzipiell auch mit IL-2 gezeigt werden (Daten nicht dargestellt). Bei diesen Experimenten war jedoch bei einer Inkubation mit IL-15 der Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation an den analysierten Leukozyten größer mit einer analogen IL-2 Konzentration. Auch war die Überlebensrate dieser NK-Zellen nach einer Inkubation mit IL-15 höher als IL-2. (vergl. 3.8.1).

Abb. 42 Inhibitor der Interaktion von IL-15 und CD122 bei NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen



1,0x10⁶ naive RAG-1 Milzzellen wurden ohne weitere Zusätze (A) mit einem Zusatz von 50 ng/ml IL-15 (B), mit einem Zusatz von 50 ng/ml IL-15 und anti CD18/CD32 (C), anti MHC II (D) und anti CD122, Klon TM-β1, (E) inkubiert. Nach 19h in vitro wurden die Zellen gesammelt und eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Die Leukozyten wurden lebend im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden aus der Betrachtung ausgeschlossen (A1 bis E1). Die NK1.1(+) Zellen wurden selektiert (A2 - E2) und auf die Expression von membranständigen CD122 (A3 bis E3) und die Sensitivität gegenüber PJ hin untersucht (A3, A4 bis E3, E4).

3.8.3 Der Einfluss von IL-15 auf die IL-12 und die IFN- γ Produktion bei RAG-1 Milzzellen in vitro

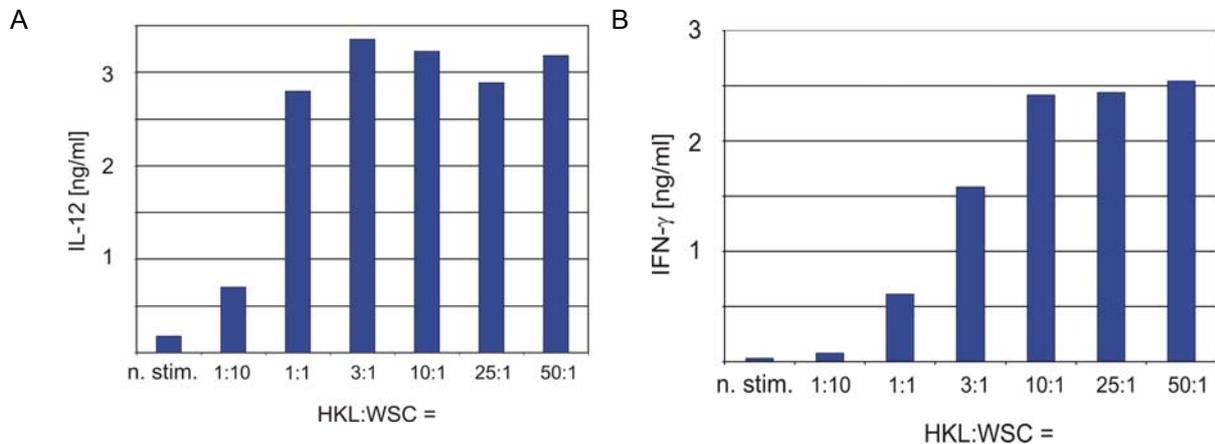
In den folgenden Experimenten wurde die Frage untersucht, ob eine Änderung der exogenen IL-15 Konzentration in dem Kulturmedium von HKL stimulierten RAG-1 Milzzellkulturen auch einen Einfluss auf die endogene Produktion von IL-12 bei Antigen-präsentierenden Zellen hat. Eine Verstärkung der IL-12-Produktion durch Erhöhung der exogenen IL-15 Titer in vitro wäre ein Hinweis darauf, dass IL-15 über autokrine Stimulationsmechanismen auch in der Lage ist, [MHC II(+)] Zellpopulationen der RAG-1 Milz zu aktivieren.

3.8.3.1 Die IL-12 und der IFN- γ -Produktion in Abhängigkeit von der Konzentration Hitze-inaktivierter Listerien

Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden über 19 h in vitro mit unterschiedlichen Konzentrationen von HKL stimuliert. Die Kulturüberstände wurden mittels ELISA auf ihre Konzentration von IFN- γ und IL-12 hin getestet.

Eine Erhöhung der HKL Titer bewirkte bei der Stimulation von RAG-1 Milzzellen eine Erhöhung der IL-12-Konzentration im Zellkulturüberstand. Dieser Effekt war bis zu einem Verhältnis HKL:WSC = 3:1 titrierbar. Bei der Stimulation von RAG-1 Milzzellen mit höheren HKL Konzentrationen blieb die IL-12-Konzentration jedoch annähernd konstant (Abb. 36A). Eine Erhöhung der HKL Titer bei der Stimulation von RAG-1 Milzzellen hatte neben einer verstärkten IL-12 Produktion auch eine Erhöhung der IFN- γ Konzentration im Kulturmedium zur Folge. Bis zu einem Verhältnis von HKL:WSC = 10:1 erhöhte sich die Konzentration von IFN- γ im Kulturüberstand stetig, darüber hinaus blieb die IFN- γ -Konzentration annähernd konstant (Abb. 36B).

Diese Daten zeigten, dass bei RAG-1 Milzzellen die IL-12 Produktion der Monozyten, M Φ und DC (vergl. 3.1.1) in einer direkten Abhängigkeit zu dem bakteriellen Stimulus stand. Auch die IFN- γ Produktion der NK-Zellen schien damit in einer direkten Abhängigkeit zu den Zytokinkonzentrationen zu stehen, die von den MHC II exprimierenden Zellpopulationen nach Stimulation sezerniert wurden.

Abb. 43 Titration von HKL zur Stimulation von RAG-1 Milzzellen

Jeweils $1,0 \times 10^6$ RAG-1 Milzzellen wurden nicht stimuliert (Medium) oder wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen HKL (HKL:WSC = 0:1 bis 50:1) *in vitro* stimuliert. Nach 19 h Inkubation wurden die Zellüberstände gesammelt und mittels ELISA auf ihre Konzentration von IL-12 (A) und IFN- γ (B) getestet. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.8.3.2 Titration der IL-15 Konzentration *in vitro*

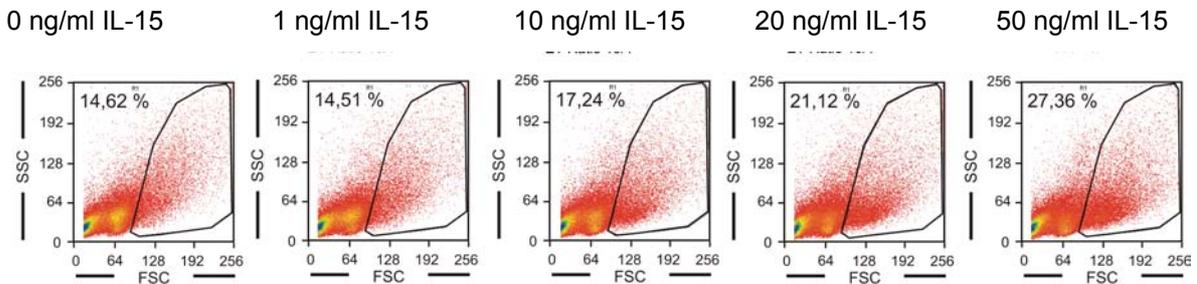
Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden über 19 h unter Zusatz von unterschiedlichen Konzentrationen IL-15 *in vitro* inkubiert, jeweils ein Ansatz nicht stimuliert bzw. mit HKL (Verhältnis HKL:WSC = 10:1) stimuliert. Die Kulturüberstände wurden abgenommen und mittels ELISA auf ihre IFN- γ Konzentration und ihre IL-12 Konzentration getestet.

Die Milzzellen wurden weitere 4 h mit Brefeldin A-haltigem Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden wie unter 2.4.3 und 2.4.4 beschrieben für eine Markierung vorbereitet. Mit den monoklonalen Antikörpern anti NK1.1 und anti CD122 oder anti MHC II wurden die Zellen auf der Oberfläche markiert, fixiert und intrazellulär mit dem mAk anti IFN- γ oder anti IL-12 markiert. Die [NK1.1(+)] Zellpopulation wurde auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche und intrazellulärem IFN- γ hin analysiert, die [MHC II(+)] Zellpopulationen auf die Expression eines intrazellulären IL-12 Signals.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Milzzellen konnte gezeigt werden, dass bei einer Erhöhung der IL-15 Konzentration in dem Kulturmedium ein Anwachsen der als Leukozyten eingegrenzten Zellpopulation erfolgte. Diese Erhöhung der Leukozytenzahl

konnte sowohl bei den nicht stimulierten als auch bei den mit HKL stimulierten Milzzellen gezeigt werden (Abb. 37).

Abb. 44 Ansteigen der erfassten Leukozyten unter IL-15 Einfluss



Jeweils $1,0 \times 10^6$ Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden in vitro über 19 h mit 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml IL-15 als Zusatz zu dem Kulturmedium inkubiert. Degenerierte Zellen oder Zelltrümmer wurden aufgrund ihrer Größe (FSC) oder Granularität (SSC) über die Streulichtmessung von der Analyse ausgeschlossen.

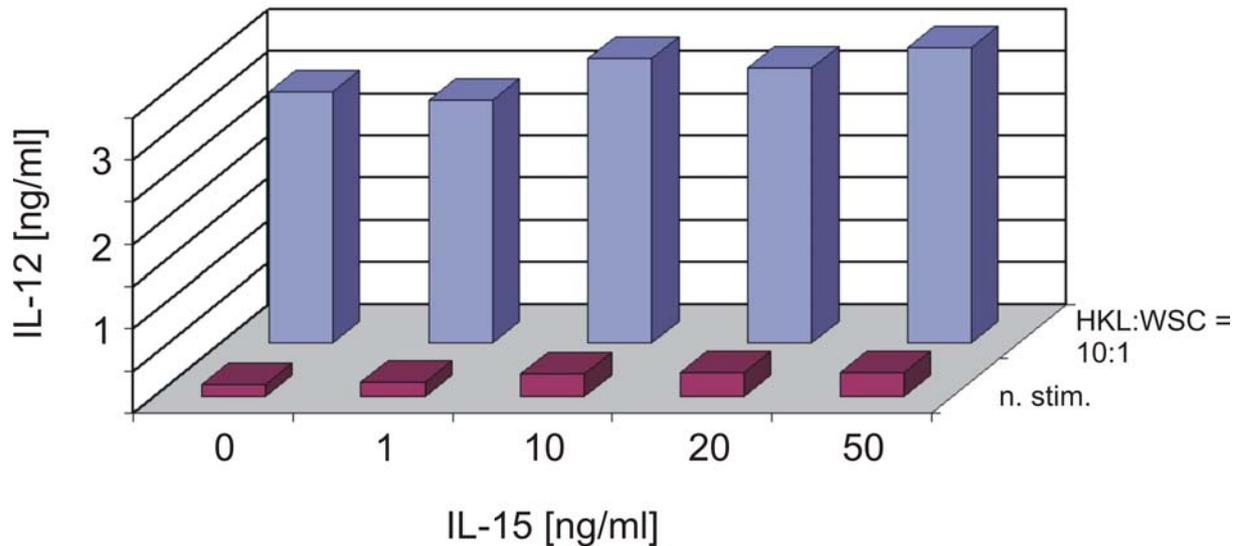
3.8.3.2.1 Betrachtung der IL-12 Produktion

Um zu testen, ob verschiedene IL-15 Konzentrationen im Kulturmedium einen Einfluss auf die IL-12 Produktion der [MHC II(+)] RAG-1 Milzzellen ausüben können, wurden die Kulturüberstände nach 19 h Inkubation auf die IL-12 Konzentrationen getestet.

Die Kulturüberstände der Milzzellkulturen, die nur mit verschiedenen IL-15 Konzentrationen inkubiert wurden, zeigten keine erhöhten IL-12 Titer (Abb. 38: n. stim.). Erst nach Inkubation mit HKL konnte IL-12 im Medium nachgewiesen werden. Hier blieben die IL-12-Konzentrationen jedoch unbeeinflusst von der IL-15 Zugabe zu dem Medium (Abb. 38, HKL:WSC = 10:1).

Diese Daten ergaben Hinweise, dass IL-15 keinen Einfluss auf die mikrobiell stimulierte IL-12 Produktion hatte.

Abb. 45 Titration der IL-15 Konzentration auf RAG-1 Milzzellen in vitro: Messung der IL-12 Konzentration

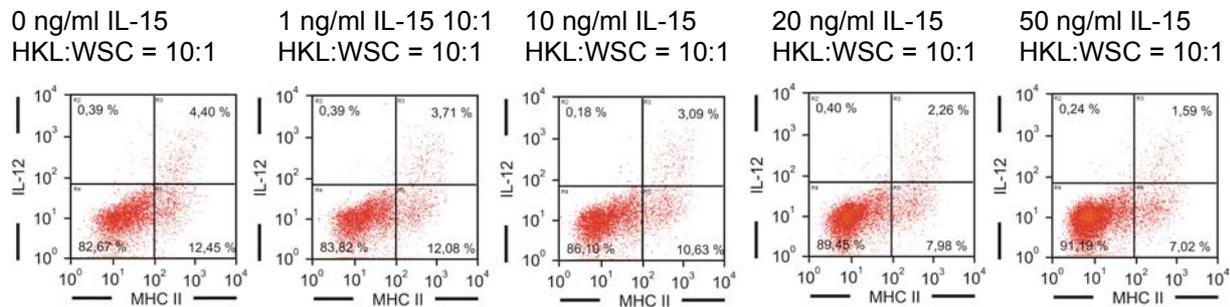


$1,0 \times 10^6$ RAG-1 Milzzellen pro Ansatz wurden in vitro nicht stimuliert (■) oder wurden mit HKL (HKL:WSC = 10:1 (■)) stimuliert. Die Ansätze wurden mit 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml rekombinanten IL-15 als Zusatz zu dem Kulturmedium coinkubiert. Nach 19 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf die IL-12 Konzentration hin analysiert. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente

Die Analyse der [MHC II(+)] Zellpopulationen auf Einzelzellniveau nach Stimulation der Milzzellen mit HKL zeigte, dass trotz des Anstiegs der analysierten Leukozytenpopulationen die [MHC II(+)] Zellpopulationen mit steigender IL-15 Konzentration im Kulturmedium konstant blieben. Die Abnahme des prozentualen Anteils der [MHC II(+)/IL-12(+)] Zellpopulation in der Abbildung wurde durch die Zunahme der insgesamt betrachteten Leukozytenpopulation verursacht (Abb. 39).

Diese Daten bestätigten die Hinweise aus den ELISA-Ergebnissen (Abb. 38) und bestärkten die Vermutung, dass IL-15 die mikrobiell induzierte IL-12 Produktion der [MHC II(+)] Zellpopulationen nicht beeinflusst.

Abb. 46 Titration der IL-15 Konzentration auf HKL stimulierte RAG-1 Milzzellen in vitro: Analyse der [MHC II(+)] und IL-12 (+) Zellpopulation

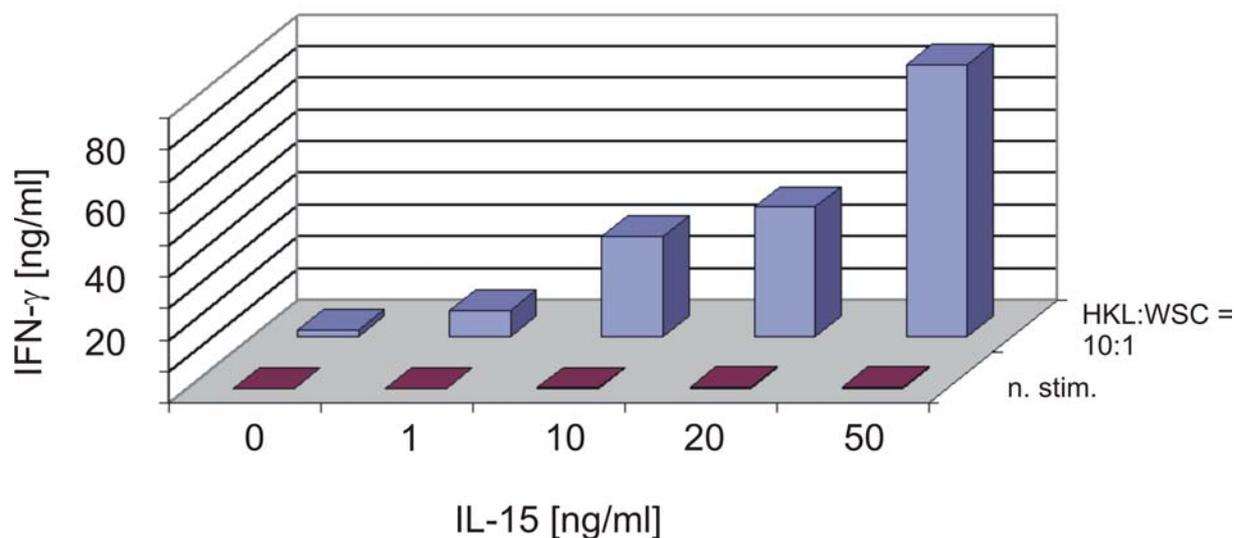


Jeweils $1,0 \times 10^6$ Milzzellen (WSC) wurden mit HKL (HKL:WSC = 10:1) in vitro stimuliert. Zu den Ansätzen wurde IL-15 hinzugegeben. Nach 19 h wurde der Überstand für eine weitere Analyse im ELISA abgenommen und die Zellen wurden weitere 4 h in BFA-haltigem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen gesammelt, eine Erythrozytenlyse wurde durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen (vergl. Abb. 37). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von MHC II auf der Zellmembran und intrazellulärem IL-12 hin analysiert.

3.8.3.2.2 Betrachtung der IFN- γ Produktion

Eine Analyse der Kulturüberstände mit Hilfe eines IFN- γ spezifischen ELISA's zeigte deutlich, dass auch hier nur die HKL stimulierten Milzzellen IFN- γ produzierten (Abb. 40, vergl. 3.5.4). Die IFN- γ Produktion der RAG-1 Milzzellen war hierbei von der IL-15 Konzentration in dem Kulturmedium abhängig (Abb. 40): je mehr IL-15 zu dem Kulturmedium hinzugegeben wurde, desto höher war auch die IFN- γ Konzentration in dem Kulturmedium nach einer Stimulationsphase von 19 h. Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen des IL-12 ELISA (Abb. 38), bei dem keine IL-15 Abhängigkeit gezeigt werden konnte.

Abb. 47 Titration der IL-15 Konzentration auf RAG-1 Milzzellen in vitro: Messung der IFN- γ Konzentration

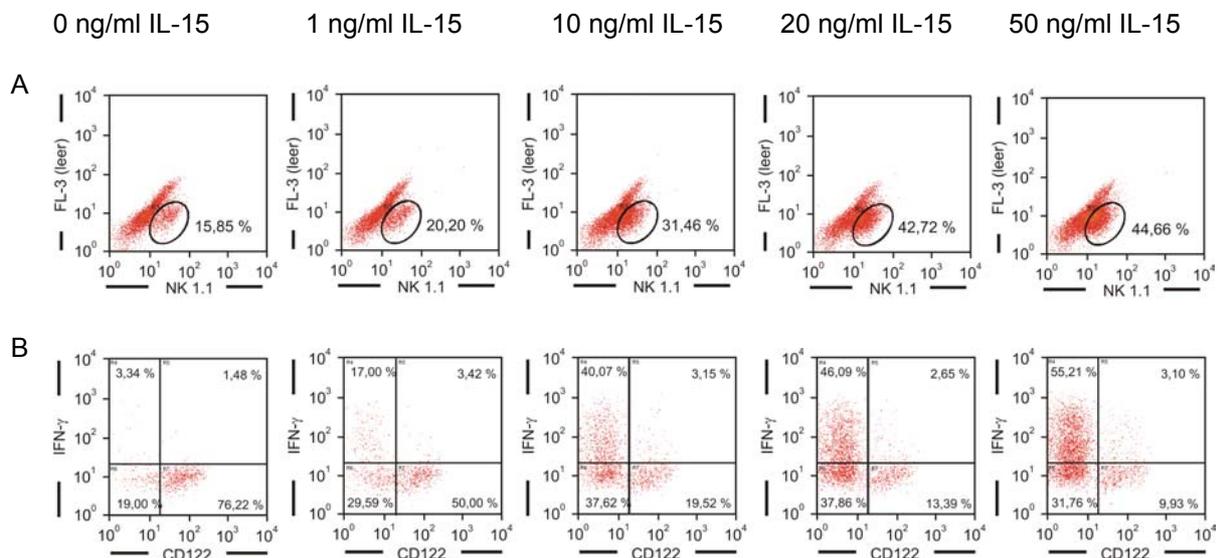


$1,0 \times 10^6$ RAG-1 Milzzellen in jedem Ansatz wurden entweder nicht stimuliert (■) oder mit HKL (Verhältnis HKL:WSC = 10:1, ■) in vitro stimuliert. Die Ansätze wurden mit 0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml rekombinantem IL-15 als Zusatz zu dem Kulturmedium coinkubiert. Nach 19 h wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf die IFN- γ Konzentration hin analysiert. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Analyse der durchflusszytometrischen Daten zeigte, dass mit steigender IL-15 Konzentration im Kulturmedium auch der Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation der gemäß Abb. 44 eingegrenzten Leukozyten anstieg (Abb. 41A). Mit steigender IL-15 Konzentration in dem Kulturmedium der HKL stimulierten Milzzellen von RAG-1 Mäusen konnten nach der Inkubation mit Brefeldin A und nach Fixierung bei der [NK1.1(+)] Zellpopulation zwei Phänomene beobachtet werden:

- die stetige Abnahme des CD122-Signals bei steigender IL-15 Konzentration und
- die Zunahme der IFN- γ produzierenden NK-Zellen [NK1.1(+)/CD122(-)/IFN- γ (+)] (Abb. 41B). Die Zunahme des intrazellulären IFN- γ Signals bei der [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation von HKL stimulierten RAG-1-Milzzellkulturen bestätigen die in Abb. 40 gezeigten Daten aus den Zellkulturüberständen.

Abb. 48 Titration von IL-15 auf HKL stimulierte RAG-1 Milzzellen in vitro: Analyse der [NK1.1 (+)] Zellpopulation



Jeweils $1,0 \times 10^6$ WSC wurden mit HKL (HKL:WSC = 10:1) in vitro stimuliert. Zu den Ansätzen wurden verschiedene IL-15 Konzentrationen hinzugegeben. Nach 19 h wurde der Überstand für eine Analyse im ELISA abgenommen und die Zellen wurden weitere 4 h in BFA-haltigem Medium inkubiert. Danach wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen (vergl. Abb. 37). Die NK1.1(+) Zellen wurden selektiert (A) und auf die Expression von membranständigem CD122 und intrazellulärem IFN- γ (B) hin analysiert.

Die mit IL-15 gezeigten Ergebnisse konnten auch in der Grundaussage in vitro mit IL-2 gezeigt werden. Für denselben Effekt wurden allerdings höhere IL-2 Konzentrationen benötigt als hier mit IL-15 dargestellt wurde (Daten für IL-2 nicht dargestellt).

3.8.4 Zusammenfassung : IL-12 und IFN- γ Produktion bei RAG-1 Milzzellkulturen nach Stimulation durch IL-15 und Hitze-inaktivierte Listerien

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie wurden hier zur besseren Übersicht in einer Graphik zusammengefasst:

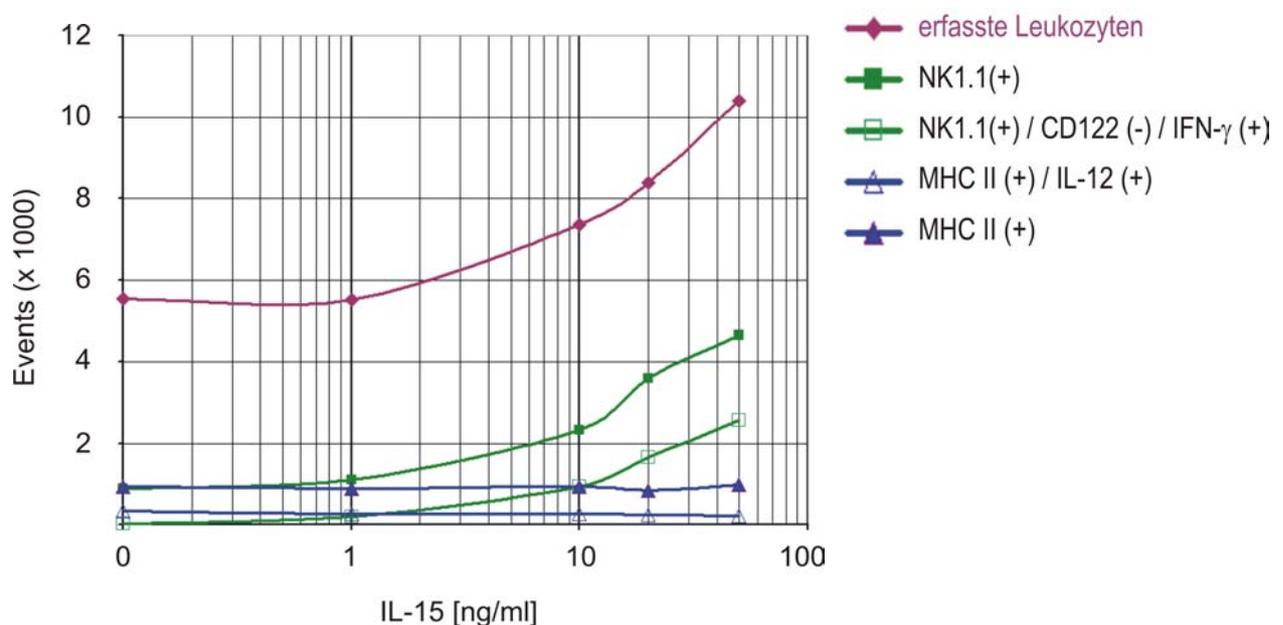
Mit dem Ansteigen der IL-15 Konzentrationen im Kulturmedium von RAG-1 Milzzellen nahmen die über die Granularität und die Größe eingegrenzten Leukozytenpopulationen zu. Die [NK1.1(+)] Zellpopulation nahm ebenfalls mit steigender IL-15 Konzentration im Kulturmedium zu. Diese Beobachtung konnte sowohl bei HKL stimulierten (Abb. 37 und

Abb. 41 A) als auch bei nicht stimulierten RAG-1 Milzzellen gezeigt werden (Daten nicht dargestellt). Bei den HKL stimulierten Milzzellen nahmen die IFN- γ produzierenden NK-Zellen [NK1.1(+)/CD122(-)/IFN- γ (+)] mit dem Ansteigen der IL-15 Konzentration im Kulturmedium zu.

Die [MHC II(+)] Zellpopulationen hingegen blieben bei dem Anstieg der IL-15 Konzentration im Kulturmedium konstant; ebenso blieben die [MHC II(+)/IL-12(+)] Zellpopulation, d.h. die IL-12 produzierenden Antigen-präsentierenden Zellen, konstant.

Aus diesen Daten ergab sich kein Hinweis darauf, dass [MHC II(+)] Zellpopulationen in vitro durch IL-15 zu einer verstärkten IL-12 Produktion aktiviert werden konnten, oder dass das Überleben dieser Zellpopulation in vitro durch IL-15 beeinflusst wurde. Im Gegensatz dazu konnte abhängig von der IL-15 Konzentration bei der [NK1.1 (+)] Zellpopulation in vitro sowohl eine verbesserte Überlebensrate als auch eine Verstärkung der IFN- γ Produktion gezeigt werden.

Abb. 49 Entwicklung der APC und NK-Zellen nach HKL Stimulation und exogener IL-15 Titration



Jeweils $1,0 \times 10^6$ Milzzellen (WSC) wurden mit HKL (HKL:WSC = 10:1) in vitro stimuliert. Zu den Ansätzen wurde IL-15 (0 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml, 20 ng/ml und 50 ng/ml) hinzugegeben. Nach 19 h wurde der Überstand für eine weitere Analyse im ELISA abgenommen und die Zellen wurden weitere 4 h in BFA-haltigem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen gesammelt, eine Erythrozytenlyse durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe und Granularität ausgeschlossen (vergl. Abb. 37). Die eingegrenzten Leukozyten wurden auf die Expression von MHC II auf der Zellmembran und intrazellulärem IL-12 (vergl. Abb. 39) bzw. membranständigem NK1.1 und CD122 sowie intrazellulärem IFN- γ (vergl. Abb. 41) hin analysiert.

3.9 Inhibition der IFN- γ Produktion bei mikrobiell stimulierten RAG-1 Milzzellkulturen durch Antikörper

In diesen Experimenten wurde die erregerinduzierte IFN- γ Produktion von RAG-1 Milzzellen durch azidfreie, gereinigte Antikörper beeinflusst. Sie sollten zur Beantwortung der folgenden Fragestellungen beitragen:

- Welches der Zytokine IL-2 oder IL-15 ist nach mikrobieller Stimulation als proinflammatorisches Zytokin an der Aktivierung der NK-Zellen zu einer IFN- γ Produktion in vitro beteiligt?
- Kann eine Blockade von CD122 mit einem mAk (Klon TM- β 1) eine erregerinduzierte Produktion von IFN- γ inhibieren?

3.9.1 Inhibition der HKL stimulierten IFN- γ Produktion von RAG-1 Milzzellen in IL-15 konditioniertem Medium

In der Arbeit von Warschkau und Kiderlen wurde gezeigt, dass ein mAk gegen das membranständige Glykoprotein F4/80 auf M Φ und DC in der Lage ist, die HKL stimulierte IFN- γ Produktion von SCID (C.B.17 *scid*^{-/-}) Milzzellen bei einer Coinkubation zu inhibieren. (Warschkau, 1999). Die Zytokinkonzentrationen der Kulturüberstände von HKL stimulierten Milzzellkulturen wurden mit Hilfe der Sandwich ELISA Methoden bestimmt, die Inkubationszeit der Milzzellkulturen in vitro betrug für IFN- γ 48 h. Diese funktionalen Blockade-Experimente zeigten die Möglichkeit auf, Interaktionen der einzelnen Zellpopulationen von Milzzellen bei einer Erregerstimulation zu untersuchen und hierbei Hinweise für Regulationsmechanismen aufzuzeigen.

3.9.1.1 Erläuterung der Methode des optimierten Inhibitionsassays

In den vorangegangenen Kapiteln wurde dargelegt, dass NK-Zellen in vivo und in vitro die wesentliche Quelle für IFN- γ in der natürlichen Immunantwort darstellen (vergl. 3.1 und 3.2). Weiterhin wurde dargelegt, dass die NK-Zellpopulation in vitro innerhalb der ersten 19 h ohne Zugabe von IL-15 oder IL-2 zum Großteil abgestorben war (vergl. 3.8.1).

Eine Verbesserung der Überlebensrate der NK-Zellen wurde durch Zugabe von IL-15 zu dem Kulturmedium erreicht (vergl. 3.8.1). Es wurde gezeigt, dass eine IL-15 Konzentration von 50 ng/ml erstens die NK-Zellen über 19 h zu über 80 % über die Bindung an CD122 vital

erhält (vergl. Abb. 34) und zweitens diese IL-15 Konzentration nicht ausreicht, NK-Zellen ohne bakteriellen Stimulus zu einer IFN- γ Produktion zu aktivieren (vergl. 3.5.4).

In den folgenden Experimenten wurde untersucht, welchen Einfluss verschiedene Zytokine und Oberflächenmarker auf die Regulation der IFN- γ Produktion von HKL stimulierten RAG-1 Milzzellen haben. Hierzu wurden RAG-1 Milzzellen *in vitro* durch HKL in einem Verhältnis HKL:WSC = 10:1 stimuliert und mit verschiedenen, gegen Zytokine oder Oberflächenproteine gerichteten Antikörpern inkubiert. Um die NK-Zellen für die Dauer der Inkubation über 19 h optimal zu konditionieren, wurde zu dem Kulturmedium 50 ng/ml IL-15 hinzugegeben (vergl. 3.8.1). Hierdurch wurde gewährleistet, dass über die gesamte Inkubationszeit die IFN- γ produzierende Zellpopulation auch funktionell war. So konnten die Reaktionen der bei der Coinkubation verwendeten Antikörper direkt auf ihre Interaktion mit dem Reaktionssystem zurückgeführt werden. Dies schloss auch die mögliche Induktion von Apoptose oder Nekrose auf die NK-Zellpopulation mit ein. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Ansätze weitere 4 h in einem Brefeldin A-haltigem Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden danach gesammelt, für eine Markierung wie unter 2.4.3 und 2.4.4 weiterbehandelt und dann mit den monoklonalen Antikörpern anti NK 1.1 und anti CD122 (vergl. 3.8.2) auf der Oberfläche markiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen intrazellulär mit dem anti IFN- γ mAk markiert. Diese Zellen wurden dann im Durchflusszytometer analysiert, wobei degenerierte Zellen und Zelltrümmer über die Streulichteigenschaften Größe und Granularität von der Betrachtung ausgeschlossen wurden. Die [NK1.1(+)] Zellpopulationen wird auf die Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals hin untersucht.

3.9.1.2 Auswertung

In der Abbildung 43A zeigt den relativen Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation an den eingegrenzten Leukozyten, wobei jeder Wert einen Mittelwert aus drei Experimenten dargestellt. Der **grüne Bereich** repräsentiert den Normalbereich, der sich aus den gemittelten Werten der stimulierten Zellkontrollen (Probe 2) und der mit Kontrollantikörpern versetzten Proben zusammensetzt, die in Vortests keine Beeinträchtigung des Reaktionssystem in Bezug auf die IFN- γ Produktion gezeigt hatten. Die Ober- und Untergrenze des Normalbereiches wurde aus der Standardabweichung für diese Kontrollen gebildet.

In der Abbildung 43B wurde der gemessene Anteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation für jede Probe gleich 100 % gesetzt. Bei einer mikrobiellen Stimulation der Milzzellen exprimierte ein Teil der [NK1.1(+)] Zellpopulation ein intrazelluläres Signal für IFN- γ , somit wurden zwei

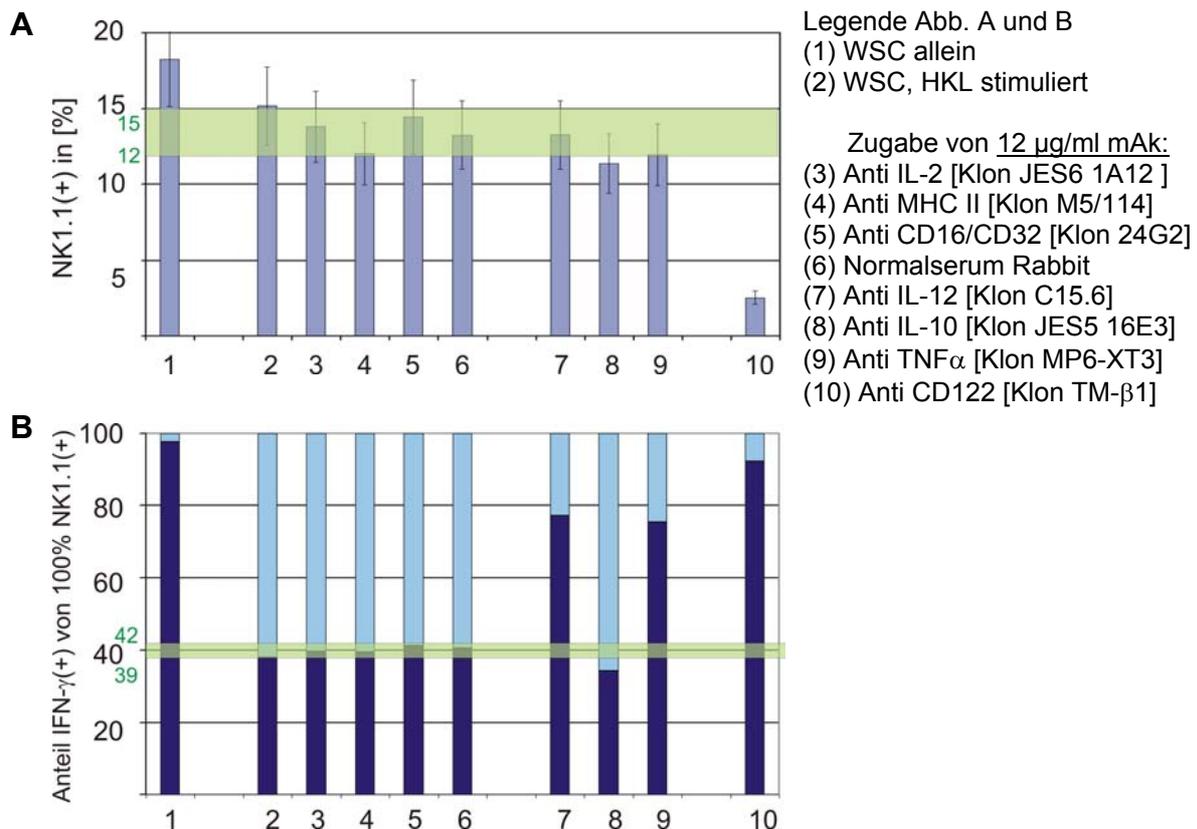
Subpopulationen gebildet: [NK1.1(+)/IFN γ (+)] und [NK1.1(+)/IFN γ (-)]. Die hier dargestellten Daten zeigen die Relationen in der Aufteilung der NK-Zellen innerhalb eines Experimentes für jede Probe auf. Diese Relationen wurde insgesamt in drei Experimenten bestätigt. Der grüne Bereich repräsentiert auch hier den Normalbereich. Dieser Normalbereich errechnet sich aus dem Mittelwert der [NK1.1(+)/IFN γ (-)]-Population für die Proben, die nur mikrobiell stimuliert oder zusätzlich mit Antikörpern versetzt wurden, welche in Vortests die IFN- γ Produktion nicht beeinflusst hatten. Die Ober- und Untergrenze des Normalbereiches wurde aus der Standardabweichung dieses Mittelwertes berechnet.

3.9.1.3 Ergebnis

NK-Zellen von Gesamtmilzzellen, die nicht mit HKL stimuliert wurden, zeigten überdurchschnittliche Populationsstärken im Vergleich zu den HKL stimulierten Milzzellen (Abb. 43A: vergleiche Probe 1 mit den Proben 2 bis 10). Im Durchschnitt waren die betrachteten [NK1.1(+)] Zellpopulationen der stimulierten Proben gleich stark (Abb. 43A, Proben 2 bis 9). Bei der Probe 10 war die [NK1.1(+)] Population auffallend klein. Dieses Ergebnis bestätigt die unter 3.8.2 gezeigten Daten, die ein Absterben der [NK1.1(+)] Zellpopulation nach Blockade von CD122 zeigten. Die Abbildung 43B zeigt die Aufteilung der [NK1.1(+)] Zellpopulation in eine [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] und eine [NK1.1(+)/IFN- γ (-)] Zellpopulation. Hierbei wurden die in Abb. 43A dargestellten die [NK1.1(+)] Werte gleich 100 % gesetzt, um einen Vergleich der jeweiligen Populationen zu ermöglichen. Die [NK1.1(+)] Zellpopulation der Milzzellen, die nicht durch HKL stimuliert worden waren, zeigt erwartungsgemäß kein intrazelluläres IFN- γ Signal (Abb. 43B: Probe 1). Bei den Proben, die mit HKL stimuliert wurden und nicht mit einem Antikörper coinkubiert wurden, zeigten ca. 60 % der [NK1.1(+)] Zellpopulation ein intrazelluläres Signal für IFN- γ (Abb. 43B, Probe 2). Bei den mit HKL stimulierten Proben, die mit Antikörpern ohne Einfluss auf das Reaktionssystem coinkubiert wurden (Kontrollantikörper; Abb. 43B, Probe 4 bis 6), zeigten ebenfalls ca. 60 % der NK1.1(+) Zellpopulation ein intrazelluläres Signal für IFN- γ . Auch nach Zusatz eines inhibierend wirkenden monoklonalen Antikörpers gegen IL-2 wurde die IFN- γ Produktion der NK-Zellen nicht beeinflusst (Abb. 43B, Probe 3). Nach Zusatz eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-12 wurde die Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals bei NK-Zellen erwartungsgemäß deutlich inhibiert (Abb. 43B, Probe 7). Ein analoges Ergebnis zeigte der Zusatz eines monoklonalen Antikörpers gegen TNF- α (Abb. 43B, Probe 9). Der Zusatz eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-10 zeigte eine schwache Verstärkung des intrazellulären IFN- γ Signals der [NK1.1(+)] Zellpopulation

(Abb. 43B, Probe 8). Der Zusatz des anti CD122 Antikörpers (Klon TM-β1) zeigte neben der starken Abnahme der [NK1.1(+)] Zellpopulation (Abb. 43A, Probe 10) auch eine starke Inhibition des intrazellulären IFN-γ Signals der verbleibenden [NK1.1(+)] Zellpopulation (Abb. 43B, Probe 12).

Abb. 50 Inhibition der HKL induzierten IFN-γ Produktion bei RAG-1 Milzzellen mit IL-15 Coinkubation



$1,0 \times 10^6$ RAG-1 Milzzellen wurden in jeder Probe eingesetzt. Das Kulturmedium wurde mit 50ng/ml IL-15 konditioniert. Die Probe 1 wurde nicht stimuliert, die Proben 2 bis 12 wurden mit HKL (HKL:WSC = 10:1) stimuliert. Die Proben 3 bis 12 wurden mit 12 µg/ml azidfreien, gereinigten Antikörpern, wie in der Legende angegeben, inkubiert. Nach 19h wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und BFA-haltigem Medium weiter 4h inkubiert. Danach wurden die Milzzellen gesammelt, eine Erythrozytenlyse durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe (FSC) und Granularität (SSC) aus der Betrachtung ausgeschlossen.

Der Mittelwert der gemessenen, NK1.1(+) Zellen bezogen auf die eingegrenzten Leukozyten aus drei unabhängigen Experimenten wurde in der Abbildung A dargestellt. Die Abbildung B zeigt den Anteil der IFN-γ produzierenden NK-Zellen [NK1.1(+)/IFN-γ(+)] in Relation zu den Nicht IFN-γ produzierenden NK-Zellen [NK1.1(+)/IFN-γ(-)], wobei alle gemessenen NK-Zellen gleich 100 % gesetzt wurden. Diese Daten sind repräsentativ für drei Experimente. Der grüne Balken zeigt den Normalbereich an, in dem sich die NK1.1(+) Zellpopulation (A) und eine IFN-γ exprimierenden NK-Zellen (B) in einem nicht beeinflussten Reaktionssystem befinden.

3.9.2 Inhibition der VL stimulierten IFN- γ Produktion von RAG-1 Milzzellen ohne speziell konditioniertes Kulturmedium

Die Stimulation von Milzzellen mit HKL erforderte für die Detektion eines ausreichenden intrazellulären IFN- γ Signals die Costimulation mit IL-2 oder IL-15 (vergl. 3.5.3). Eine adäquate Vitalität der NK-Zellen wurde nur durch Zugabe von IL-15 zu dem Kulturmedium gewährleistet (vergl. 3.8.1). Bei einer Zugabe von IL-15 zu dem Kulturmedium war allerdings die Signalabnahme von CD122 durch mikrobielle Stimulation induziertes, endogenes IL-15 bzw. IL-2 nicht mehr detektierbar. Desweiteren ist die Blockade von endogen produziertem IL-15 bzw. IL-2 und die Beobachtung der Auswirkung auf das Reaktionssystem nicht mehr möglich. Daher wurden naive RAG-1 Milzzellkulturen *in vitro* mit VL über 6 h infiziert (vergl. 3.5.1. Abb. 29).

3.9.2.1 Erläuterung der Methode

Milzzellen von RAG-1 Mäusen wurden über 6 h *in vitro* kultiviert. Inkubationskontrollen wurden nicht stimuliert (Abb. 44 A und B, Probe 1), ansonsten erfolgte die Stimulation der Milzzellen über die Zugabe von VL in einem Verhältnis VL:WSC = 3:1 (vergl. 3.5.1 und 3.5.2). Stimulationskontrollen (Abb. 44A und B, Probe 2) wurden nicht mit monoklonalen Antikörpern versetzt, Antikörperkontrollen wurden mit 12 μ g/ml Antikörpern versetzt, die in Vortests VL stimulierte Milzzellen nicht in der IFN- γ Produktion beeinflusst hatten. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Ansätze weitere 4 h mit einem Brefeldin A-haltigem Kulturmedium inkubiert. Die Zellen wurden wie unter 2.4.3 und 2.4.4 behandelt und dann mit den monoklonalen Antikörpern anti NK1.1 anti CD122 (Klon 5H4) sowie intrazellulär mit anti IFN- γ markiert. Diese Zellen werden im Durchflusszytometer analysiert, wobei degenerierte Zellen und Zelltrümmer über die Streulichteigenschaften Größe und Granularität von der Betrachtung ausgeschlossen wurden. Die [NK1.1(+)] Zellpopulationen wurde auf die Expression von CD122 auf der Membranoberfläche und eines intrazellulären IFN- γ Signals hin untersucht.

3.9.2.2 Auswertung

Diese Auswertung erfolgte analog der unter 3.9.1.2 beschriebenen Vorgehensweise.

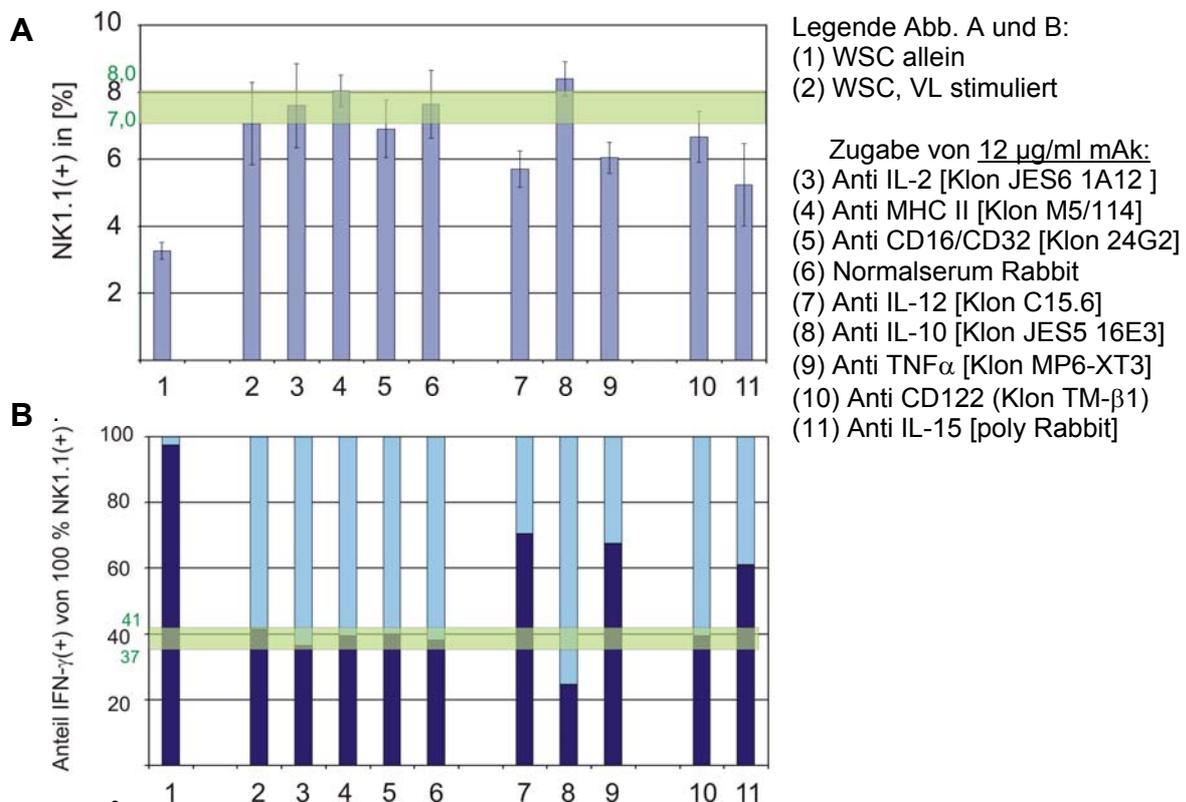
3.9.2.3 Ergebnis

Die Abb. 44B zeigte die Aufteilung der [NK1.1(+)] Zellen nach erfolgter Inkubation in eine [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] Zellfraktion und eine [NK1.1(+)/IFN- γ (-)] Zellfraktion. Die in Abb.

44A dargestellten [NK1.1(+)] Messereignisse wurden gleich 100 % gesetzt. Nicht stimulierte NK-Zellen zeigten erwartungsgemäß keine Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals. Ca. 70 % der [NK1.1(+)] Zellpopulation der RAG-1 Milzzellen, die nur mit VL stimuliert wurden (Abb. 44B, Probe 2). oder die zusätzlich mit Kontrollantikörpern coinkubiert wurden (Abb. 44B Probe 4 bis 6), exprimierten ein intrazelluläres IFN- γ Signal. Als Kontrollantikörper wurden Antikörper eingesetzt, die das Reaktionssystem nicht beeinflussen (vergl. 3.8.2).

Die Coinkubation von VL stimulierten Milzzellen mit anti IL-12 mAk und anti TNF- α mAk zeigten eine deutliche Abnahme der [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] Zellpopulation (Abb. 44B, Probe 7 und 9). Bei der Coinkubation mit dem anti IL-10 mAk konnte eine Zunahme der [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] Population gezeigt werden (Abb. 44B, Probe 8). Dies bestätigte die zuvor auf Einzelzellniveau gemessenen Ergebnisse der HKL induzierten IFN- γ Produktion durch IL-15 konditionierte RAG-1 Milzzellen.

Der anti IL-2 mAk zeigte bei einer Coinkubation mit VL stimulierten WSC keine Beeinflussung der [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] Population im Vergleich mit den Kontrollen (Abb. 44B, Probe 3). Dieses Ergebnis bestätigte auf Einzelzellniveau Ergebnisse, die bei HKL stimulierten RAG-1 Milzzellen im Zellkulturüberstand und auf Einzelzellniveau gemessen wurden (Daten nicht dargestellt, vergl. 3.9.1.3). Die Größe der [NK1.1(+)] Zellpopulation lag im Normalbereich (Abb. 44A, Probe 3), dagegen zeigte eine Coinkubation von VL stimulierten WSC mit dem anti IL-15 polyklonalen Antikörper (pAk) eine deutliche Abnahme der [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] Population (Abb. 44B, Probe 11) und eine unter dem Normalbereich liegende Größe der [NK1.1(+)] Zellpopulation gegenüber den Kontrollen (Abb. 44A, Probe 13). Die Coinkubation von Kaninchenserum als Antikörperkontrolle für das eingesetzte anti IL-15 Serum zeigte keine Beeinflussung der [NK1.1(+)] Zellpopulation in Bezug auf die Größe (Abb. 44A, Probe 6) und in Bezug auf die [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] Zellpopulation (Abb. 44B, Probe 6). Die Coinkubation der VL-stimulierten Milzzellen mit dem anti CD122 mAk zeigte in diesem Versuchsansatz keine Veränderung der [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] Population im Vergleich mit den Kontrollen (Abb 44B Probe 10), ebenso war die [NK1.1(+)] Zellpopulation im Normalbereich (Abb 44A Probe 10). Diese Ergebnis steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die mit HKL stimulierten Milzzellen gemacht wurden (vergl. 3.9.1.3).

Abb. 51 Inhibition der VL induzierten IFN- γ Produktion bei RAG-1 Milzzellen

$1,0 \times 10^6$ RAG-1 Milzzellen wurden in jeder Probe eingesetzt. Die Probe 1 wurde nicht stimuliert, die Proben 2 bis 13 wurden mit VL (VL:WSC = 3:1) stimuliert. Die Proben 3 bis 13 wurden zusätzlich mit 12 $\mu\text{g/ml}$ azidfreien, gereinigten Antikörpern, wie in der Legende angegeben, inkubiert. Nach 6h wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und in einem Gentamicin- und BFA-haltigem Medium weitere 4h inkubiert. Danach wurden die Milzzellen gesammelt, eine Erythrozytenlyse durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe (FSC) und Granularität (SSC) aus der Betrachtung ausgeschlossen. Der Mittelwert der gemessenen, NK1.1(+) Zellen bezogen auf die eingegrenzten Leukozyten aus drei unabhängigen Experimenten wurde in der Abbildung A dargestellt. Die Abbildung B zeigt den Anteil der IFN- γ produzierenden NK-Zellen [NK1.1(+)/IFN- γ (+)] in Relation zu den Nicht IFN- γ produzierenden NK-Zellen [NK1.1(+)/IFN- γ (-)], wobei alle gemessenen NK-Zellen gleich 100 % gesetzt wurden. Diese Daten sind repräsentativ für drei Experimente. Der grüne Balken zeigt den Normalbereich an, in dem sich die NK1.1(+) Zellpopulation (A) und eine IFN- γ exprimierenden NK-Zellen (B) in einem nicht beeinflussten Reaktionssystem befinden.

3.9.2.4 Expression von CD122 und intrazellulärem IFN- γ bei NK-Zellen auf Einzelzellniveau

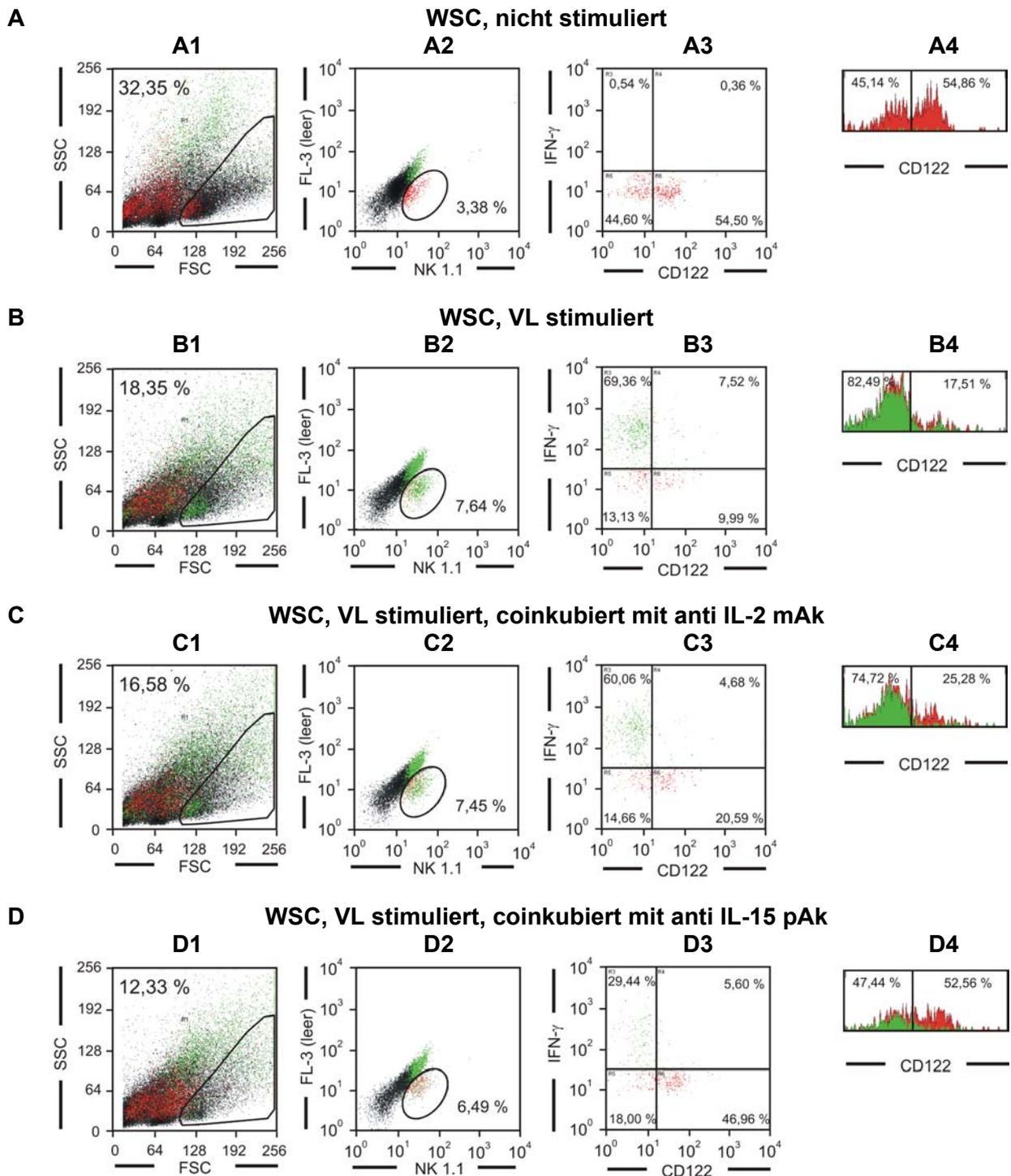
Die Coinkubation von VL stimulierten RAG-1 Milzzellen mit einem anti IL-2 Antikörper zeigte im Vergleich zu den Kontrollen keine Inhibition des intrazellulären IFN- γ Signals (vergl. Abb. 44B, Probe 3). Bei einer Coinkubation mit einem anti IL-15 Antikörper war jedoch eine deutlich Inhibition des intrazellulären IFN- γ Signals zu beobachten (vergl. Abb. 44B, Probe 11).

Eine Betrachtung dieser beiden Proben auf Einzelzellniveau zeigte die inverse Reaktion zwischen membranständigen CD122 und intrazellulärem IFN- γ bei NK-Zellen, wie sie auch bei nicht stimulierten und nur mit VL stimulierten RAG-1 Milzzellen beobachtet werden konnte. Bei den nicht stimulierten, über 6 h in vitro inkubierten Milzzellen zeigte sich bei den überlebenden NK-Zellen in den dargestellten Experiment, dass über 50 % CD122 auf der Membranoberfläche exprimierten. Ein intrazelluläres Signal für IFN- γ konnte nicht detektiert werden (Abb. 45, Reihe A, A3 und A4, rot dargestellt). Die NK-Zellen der VL stimulierten RAG-1 Milzzellen zeigten demgegenüber ein starkes intrazelluläres Signal für IFN- γ (Abb. 45, Reihe B, B3 und B4, grün dargestellt). Dieses Signal wurde ausschließlich von NK-Zellen exprimiert, die CD122 auf der Oberfläche nicht mehr exprimierten.

Die Coinkubation von VL stimulierten Milzzellen mit dem anti IL-2 mAk zeigte ebenfalls ein starkes Signal für intrazelluläres IFN- γ (Abb. 45, Reihe C, C3 und C4, grün dargestellt). Hierbei zeigte sich, dass das intrazelluläre IFN- γ Signal der mit anti IL-2 mAk coinkubierten Probe der Probe entsprach, die nur mit VL stimuliert war. Auch hier exprimierte nur die NK-Zellpopulation ein intrazelluläres IFN- γ Signal, die kein CD122 auf der Membran mehr exprimierte (Abb. 45, Reihe C, C3 und C4).

Bei einer Coinkubation von VL stimulierten RAG-1 Milzzellen mit dem anti IL-15 Antikörper zeigte sich ein anderes Bild. Hier exprimierten die NK-Zellen von VL stimulierten RAG-1 Milzzellen nur ein schwaches intrazelluläres Signal für IFN- γ . Auch hier war die [NK1.1(+)/ CD122(-)] Zellpopulation diejenige, die das intrazelluläre Signal für IFN- γ exprimiert (Abb. 45, Reihe D, D3 und D4, grün dargestellt). Über 50 % der NK-Zellen exprimieren jedoch CD122 weiterhin auf ihrer Membranoberfläche.

Diese Daten weisen darauf hin, dass endogenes IL-2 bei VL stimulierten RAG-1 Milzzellen, zumindest in vitro, in Bezug auf die Regulation der IFN- γ Produktion von NK-Zellen keine Rolle spielt. Im Gegensatz hierzu wird allerdings dargestellt, dass endogenes IL-15 an der Regulation der IFN- γ Produktion beteiligt ist.

Abb. 52 Blockade von endogenem IL-2 oder IL-15 nach VL Stimulation in vitro

Jeweils $1,0 \times 10^6$ RAG-1 Milzzellen wurden nicht stimuliert (A), mit VL (VL:WSC = 3:1) infiziert (B) und zusätzlich mit 12 $\mu\text{g/ml}$ anti IL-2 mAk (C) oder mit 12 $\mu\text{g/ml}$ anti IL-15 pAk coinkubiert. Nach 6 h wurden die Zellen gesammelt, gewaschen und mit BFA- und Gentamicin-haltigem Medium weitere 4 h inkubiert. Danach wurden die Milzzellen gesammelt, eine Erythrozytenlyse durchgeführt und die Leukozyten wurden im Durchflusszytometer analysiert. Degenerierte Zellen und Zelltrümmer wurden über die Größe (FSC) und Granularität (SSC) aus der Betrachtung ausgeschlossen (A1 bis D1). NK1.1(+) Zellen wurden selektiert (A2 bis D2) und auf die Expression von membranständigem CD122 (A3 bis D3) und intrazellulärem IFN- γ (B3, B4 bis D3, D4 grün dargestellt) hin analysiert.