
4 Diskussion

4.1 Der zelluläre Ursprung von IFN- γ in der frühen Infektabwehr

Historisch gesehen waren aktivierte T-Helfer-Zellen die erste Zellpopulation, bei der eine Produktion von IFN- γ nachgewiesen wurde, die zu einer Aktivierung von Makrophagen und damit zu einem Schutz gegen Infektionen mit intrazellulären Erregern führte (Havel et al., 1982). Dann konnten Bancroft und Mitarbeiter einen T-Zell unabhängigen Weg der frühen IFN- γ Produktion aufzeigen (Bancroft et al., 1987 und 1991). Sie zeigten, dass T-Zell und B-Zell defiziente Mäuse bei einer Immunantwort auf intrazelluläre Erreger, u. a. *Listeria monocytogenes* (VL), IFN- γ produzieren und dass M Φ hierdurch zu einer verstärkten MHC II Expression und zu erhöhter Zytotoxizität aktiviert werden. In vitro konnte eine IFN- γ Produktion nach Stimulation von SCID Milzzellen mit hitzegetöteten *Listeria monocytogenes* (HKL) in Abwesenheit von T-Zellen und T-Zellfaktoren (IL-2) nachgewiesen werden. Hierbei zeigten NK-Zellen, die mit M Φ coinkubiert wurden, nach einer in vitro Stimulation mit HKL eine IFN- γ Produktion. Die Autoren schlossen aus ihren Beobachtungen, dass die IFN- γ Produktion von einem mikrobiellen Stimulus und dem Vorhandensein von M Φ und NK-Zellen abhängen muss.

Durch in vitro Experimente mit M Φ ist gezeigt worden, dass die IFN- γ Produktion nicht auf T-Zellen und NK-Zellen beschränkt bleibt. Puddu und Mitarbeiter zeigen bei einer Inkubation von frisch isolierten Peritoneal-M Φ in IL-12 konditioniertem Kulturmedium eine verstärkte Resistenz der Zellen gegen das Vesikuläre Stomatitis Virus. Die Autoren führen diesen Effekt auf eine IFN- γ Produktion durch die M Φ zurück (Puddu et al., 1997). Die Aktivierung von Knochenmarks-M Φ (BMM Φ) durch die Kombination der Zytokine IL-12 und IL-18 in vitro führt zu einer Expression von IFN- γ mRNA und von IFN- γ Protein. Diese Beobachtungen lassen Munder und Mitarbeiter spekulieren, dass M Φ über eine autokrine Stimulation wesentlich an der frühen IFN- γ Produktion beteiligt sind (Munder et al., 1998). Koyasu und Mitarbeiter zeigen, dass bei *Listeria monocytogenes* infizierten C57BL6 rag-2^{-/-} (RAG-2) Mäusen noch nach Depletion der NK-Zellen mit Antiasialo GM Serum IFN- γ im Serum nachweisbar ist. Diese Beobachtungen scheinen deutlich die Theorie einer T-Zell und NK-Zell-fremden IFN- γ Quelle zu unterstützen.

Demgegenüber zeigen Bancroft und Coautoren, dass nach Depletion der NK-Zellaktivität mit Antiasialo GM Serum bei *Listeria monocytogenes* infizierten SCID Mäusen (C.B.-17 scid^{-/-})

die IFN- γ induzierte MHC II Expression bei M Φ inhibiert ist. Diese kann in vitro durch Zugabe von rekombinantem IFN- γ wieder induziert werden. Auch kann bei NK-depletierten Tieren eine sechzigfach höhere Replikationsrate der Listerien gezeigt werden, als sie bei den Kontrollen gezeigt wurde (Bancroft et al., 1989). Diese Ergebnisse wiederum weisen darauf hin, dass die frühe IFN- γ Produktion allein von den NK-Zellen abhängt und ziehen andere Quellen als wesentliche IFN- γ Produzenten durch in Zweifel.

Ohteki und Coautoren isolierten aus der Milz von RAG-2 defizienten Mäusen über einen Zell-Sorter M Φ , DC und NK-Zellen und zeigen, dass nach drei Tagen in vitro Kultivierung in Anwesenheit von 1 ng/ml IL-12 [CD8(+)] DC die höchsten IFN- γ Titer im Zellmedium aufweisen. Aus diesen Beobachtungen schließen die Autoren, im Einklang mit vorherigen Arbeiten (Puddu et al., 1997; Munder et al., 1998), dass NK-Zellen im Vergleich zu DC nur einen geringen Anteil an der frühen IFN- γ Produktion im Verlauf der natürlichen Immunabwehr haben können (Ohteki et al., 1999). Die Stimulation von [CD8(+)] DC in vitro durch die Kombination der Zytokine IL-12 und IL-18 induziert eine IFN- γ Produktion. Aus diesen Beobachtungen postulieren Fukao und Mitarbeiter, dass M Φ und DC eine bedeutende Rolle bei der IFN- γ Produktion sowohl bei der natürlichen als auch bei Regulation der erworbenen Immunantwort haben (Fukao et al., 2000). Die Kombination von IL-12 und IL-18 kann aber jedoch auch bei anderen Zellpopulationen wie NK-Zellen, T-Zellen, M Φ und B-Zellen die Sekretion von IFN- γ induzieren. Im Gegensatz zu der Gruppe von Koyasu und Mitarbeitern zeigen Hochrein und Mitarbeiter, dass in vitro stimulierte [CD4(-)/CD8(-)] DC die stärksten IFN- γ Produzenten sind, während [CD4(-)/CD8(+)] DC die stärksten IL-12 Produzenten darstellen (Hochrein et al., 2001).

Obwohl die Berichte über die Fähigkeit der unterschiedlichen DC Populationen, IFN- γ zu produzieren, voneinander abweichen, bleibt als Konsens, dass M Φ und DC als die wesentlichen Quellen der frühen IFN- γ Produktion angesehen werden (Frucht et al., 2001). Die sich aus hieraus ergebenden Modelle für den zellulären Ursprung von IFN- γ in der natürlichen Infektabwehr wurden in der Einleitung dargestellt.

Diese Rückschlüsse auf die wesentliche Rolle der M Φ und DC bei der frühen IFN- γ Produktion basieren auf Beobachtungen, die vornehmlich in vitro gemacht wurden. Ein direkter Nachweis, der eine IFN- γ Produktion dieser Antigen-präsentierenden Zellpopulationen oder NK-Zellen auf Einzelzellniveau während einer akuten, primären Infektion mit einem mikrobiellen Erreger zeigen, fehlten jedoch bislang.

Für die Untersuchung der IFN- γ produzierenden Zellpopulationen während der natürlichen Infektabwehr wurde eine primäre Infektion mit dem grampositiven, fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* durchgeführt. Als Tiermodell wurden zunächst C57BL/6 rag-1^{-/-} Mäuse gewählt. Diese Tiere weisen keine funktionalen T-Zellen und B-Zellen auf und erleichtern so ein Studium der zellulären Komponenten der natürlichen Immunität.

Nach 19 h p.i. konnte bei den Zellen der Milz und der Leber ein sehr deutliches intrazelluläres Signal für IFN- γ detektiert werden, 5 h p.i. war noch kein intrazelluläres Signal für IL-12, IFN- γ und TNF- α erkennbar (Daten nicht dargestellt). Der Zeitpunkt 44 h p.i. war nicht mehr aussagekräftig, da die RAG-1 Mäuse (wie auch die WT Mäuse) zu diesem Zeitpunkt der Infektion schon hochgradig moribund waren. Ein Teil der Tiere starb schon zwischen 36 h p.i. und 44 h p.i. . Diese Beobachtungen bestätigten Ergebnisse von Bancroft und Mitarbeitern, die Infektionen mit ähnlich hohen Bakterientitern durchgeführt hatten (Lertmemongkolchai et al., 2001).

[MHC II(+)] Zellpopulationen waren bei den infizierten Tieren im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen erhöht (vergl. Abb. 1B und C). Diese Beobachtung ist ein Hinweis auf eine beginnende Immunabwehr, da mikrobiell aktivierte M Φ und DC verschiedene Oberflächenmoleküle, u. a. MHC II, verstärkt auf der Membran exprimieren (Bancroft et al., 1986, 1987 und 1991). [MHC II(+)]-Zellpopulationen der Milz waren bei den infizierten Tiere auch erwartungsgemäß die wesentlichen IL-12-Produzenten (vergl. Abb. 9B; Trinchieri, 1997). [MHC II(+)] Zellpopulationen der Milz und der Leber von RAG-1 Mäusen exprimierten jedoch nach 19 h p.i. kein intrazelluläres Signal für IFN- γ (vergl. Abb. 9C und Abb. 11C). [NK1.1(+)] Zellen der Milz und der Leber von RAG-1 Mäusen exprimierten demgegenüber ein starkes intrazelluläres IFN- γ Signal nach 19 h p.i. (Abb. 9D und Abb. 11D). Diese Daten bestätigten die Arbeiten von Unanue und Mitarbeitern, die über Zytokine parakrin aktivierte NK-Zellen als die wesentlichen IFN- γ Produzenten der angeborenen Immunantwort dargestellt hatten (vergl. 1.5 Abb. 2).

Ein Marker für Neutrophile Granulozyten ist das membranständige *granulocyte differentiation antigen* GR-1. Diese Zellpopulation wird durch den anti GR-1 mAk, Klon RB6-8C5, markiert (Hestdal et al., 1991). Die [GR-1(+)] Zellpopulation war in der Leber von infizierten RAG-1 Mäusen nach 19 h p.i. im Vergleich zu der nicht infizierten Kontrolle deutlich erhöht. Auch dies war ein Hinweis auf eine beginnende Immunantwort gegen die Infektion mit VL (Rogers und Unanue, 1993)

WT Mäuse verfügen im Gegensatz zu RAG-1 Mäusen über funktionelle T- und B-Zellpopulationen. In der Milz bilden [CD3(+)/CD4(+)] T-Helferzellen und die [CD3(+)/CD8(+)] zytotoxischen T-Zellen die stärksten [CD3(+)] Subpopulationen. Beim Menschen und bei Nagetieren wird bei einem Großteil der zytotoxischen T-Zellen das CD8 Antigen durch ein Heterodimer von CD8 α (auch Lyt-2 bei Nagetieren) und CD8 β (auch Lyt-3 bei Nagetieren) gebildet (Nakauchi et al., 1987). CD8 α wird nicht nur auf der Membran von T-Zellen, sondern auch auf Subpopulationen von DC und NK-Zellen exprimiert. Bei den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten wurde die [CD3(+)/CD8(+)] T-Zellpopulation durch einen mAk gegen die β -Kette des CD8 Moleküls markiert, was eine spezifische Färbung der CD8(+) T-Zellpopulation ermöglichte.

Die Milzzellen von infizierten, syngenen WT Mäusen zeigten nach 9 h p.i. noch kein intrazelluläres Zytokinsignal. Erst die Infektionszeitpunkte 19 h p.i. und 29 h p.i. zeigten ein deutliches, intrazelluläres IFN- γ Signal. Die NK-Zellen [NK1.1(+)/CD3(-)] konnten hier als die stärksten IFN- γ Produzenten identifiziert werden. Nach 19 h p.i. und nach 29 h p.i. exprimierten [CD3(+)] T-Zellen ebenfalls ein intrazelluläres IFN- γ Signal. Hier konnte sowohl bei den [CD3(+)/CD8(+)] zytotoxischen T-Zellen als auch bei den [CD3(+)/CD4(+)] T-Helferzellen ein intrazelluläres IFN- γ Signal nach 19 h p.i. und nach 29 h p.i. beobachtet werden. Relativ zu dem gesamten intrazellulären IFN- γ Signal nahm der Anteil der [CD3(+)/CD8(+)/IFN- γ (+)] nach 29 h p.i. im Vergleich zu 19 h p.i. noch zu, während der Anteil der [CD3(+)/CD4(+)/IFN- γ (+)] annähernd konstant blieb. Diese Beobachtungen unterstützten die Berichte von Bancroft und Coautoren, die [CD8(+)] T-Zellen und in geringerem Maße [CD4(+)] T-Zellen auf Einzelzellniveau als IFN- γ Produzenten nach einer *in vitro* Stimulation von Milzzellen mit *Burkholderia pseudomallei* bzw. *Listeria monocytogenes* zeigen. Die Autoren diskutieren in diesem Zusammenhang als Ursache für ihre Beobachtungen eine Antigen-unspezifische Aktivierung der T-Zellpopulationen durch einen *Bystander* Mechanismus über Zytokine wie IL-12 und IL-18 (Lertmemongkolchai et al., 2001).

Bei dem Vergleich der im Ergebnisteil dargestellten Daten im Kontext mit der Literatur ist generell anzumerken, dass bei den Infektionen zu den jeweiligen Zeitpunkten jedes analysierte Tier für sich betrachtet wurde und dass es sich um *ex vivo* Ergebnisse handelte. Es wurde bei den für die Detektion der intrazellulären Zytokine notwendigen *in vitro* Inkubationen auf jegliche Restimulation verzichtet.

Bancroft und Coautoren verwendeten bei der für die Blockade der Zytokinsekretion notwendigen *in vitro* Inkubation ein PMA- und Ionomycin-haltiges Kulturmedium (Lertmemongkolchai et al., 2001). Dies führt bekanntermaßen zu einer unspezifischen Aktivierung von Lymphozyten und damit allein schon zu einer Zytokinexpression (Picker et al., 1995). In den in dieser Arbeit dargestellten Experimenten wurde nicht versucht, eine Verbesserung der Zytokinexpression durch eine erneute Stimulation der Milzzellen *in vitro* durch LPS (Fehniger et al., 2000), VL oder HKL bzw. durch die Verwendung von Indomethacin über eine Inhibition der Prostaglandinsynthese (Bancroft et al., 1989) zu erzielen. Der Prozess der biologischen Aktivierung fand bei den hier durchgeführten Infektionsexperimenten ausschließlich im Tier unter physiologischen Bedingungen statt und war allein eine Folge der Infektion mit dem Erreger *Listeria monocytogenes*. Die anschließend notwendige *in vitro* Kultivierung mit Brefeldin A wurde nur so lange durchgeführt, wie es für die intrazelluläre Akkumulation der Zytokine notwendig war.

Bei den WT Mäusen teilt sich die [MHC II(+)] Zellpopulationen in eine [MHC II(+)/CD19(-)] Subpopulation und eine [MHC II(+)/CD19(+)] Subpopulation auf. Die erstere repräsentiert Monozyten, M Φ und DC und die letztere die B-Zellen. Beide Populationen exprimierten zu den betrachteten Zeitpunkten der Infektion keine intrazellulären Signale für IFN- γ . Diese Beobachtungen machten deutlich, dass in der frühen Phase einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* [MHC II(+)] Zellpopulationen sowohl bei RAG-1 Mäusen als auch bei WT Mäusen keine Rolle bei der Produktion von IFN- γ spielten.

Die wesentliche Quelle für frühes IFN- γ waren vor allem NK-Zellen und T-Zellen. Diese Beobachtungen bestätigten die frühen Schlussfolgerungen von Bancroft und Mitarbeitern und haben durch einen kürzlich veröffentlichten Bericht von Bogdan und Mitarbeitern Unterstützung erfahren. Die Autoren zeigen in ihren Untersuchungen, dass nach der Aufarbeitung von Peritoneal-M Φ bzw. Knochenmarks-M Φ ein geringer Anteil an NK-Zellen oder T-Zellen in diesen Kulturen verbleibt. Diese lymphoiden Zellen in den M Φ -Kulturen sind allerdings nach Stimulation mit einer Kombination von IL-12 und IL-18 die einzigen Produzenten von IFN- γ , was im Gegensatz zu den Aussagen von Munder und Mitarbeitern (Munder et al., 1998) steht. (Schleicher et al., 2005).

4.2 Die Abnahme spezieller Lymphozytenpopulationen bei Infektionen mit *Listeria monocytogenes*

Infektionsexperimente mit RAG-1 und WT Mäusen hatten nach 19 h p.i. eine deutliche Reduktion von [NK1.1(+)] Zellen der Milz und der Leber gegenüber den nicht infizierten Kontrollen gezeigt. Diese Beobachtung wurde mit Hilfe von FITC gekoppeltem Annexin V und einer Markierung der abgestorbenen Zellen mit Propidiumjodid (PJ) überprüft. Annexin V bindet mit hoher Spezifität an Phosphatidylserin, welches im frühen Apoptosestadium von der zytosolischen Seite der Zellmembran auf die Außenseite der Zellmembran umgelagert wird. In diesem Stadium sind die Zellen noch nicht sensitiv für eine PJ Färbung. In späten Apoptosestadien erscheinen die Zellen sowohl [Annexin V(+)] als auch [PJ(+)]. Allerdings tritt diese Markierung auch bei Zellen auf, die durch Nekrose abgestorben sind.

Mit Hilfe dieser Methode konnte ein deutlicher Anstieg der [Annexin V(+)/PJ(+)] NK 1.1 (+) Zellpopulation gezeigt werden. In dem dargestellten Experiment stieg der Anteil von 21 % bei nicht infizierten RAG-1 Mäusen auf ca. 36 % bei 19 h infizierten RAG-1 Mäusen (Abb.17C). Der hohe Anteil der toten NK-Zellen bei nicht infizierten Milzzellen zeigt den frühen Verlust der Vitalität speziell bei dieser Zellpopulation (Hebert und Pruett, 2001). Nur ein sehr geringer Teil der NK-Zellen zeigte die Markierung des frühen Apoptosestadiums [Annexin V(+)/PJ(-)/NK1.1(+)] nach 19 h p.i. Hier war ein Anstieg von ca. 4 % bei nicht infizierten auf ca. 6 % nach 19 h p.i. in dem Beispielexperiment zu beobachten. Auch bei den Milzzellen der WT Mäuse konnte ein deutlicher Anstieg der [Annexin V(+)/PJ(+)] NK 1.1(+)] Zellpopulation von ca. 16 % bei nicht infizierten WT Mäusen auf ca. 53 % nach 19 h p.i. gezeigt werden. Noch deutlicher ist sich der kontinuierliche Anstieg der [Annexin V(+)/PJ(+)] NK 1.1(+)] Zellpopulation bis 29 h p.i. in der Abb. 19A dargestellt. Der Anstieg der [Annexin V(+)/PJ(-)/NK1.1(+)] war nur geringfügig. Hier stieg der Anteil von 2 % bei nicht infizierten WT Mäusen auf ca. 4 % nach 19 h p.i. in dem dargestellten Beispielexperiment (Abb 18C). Die Abb. 19A zeigt, dass diese Zellpopulation im Verlauf der Infektion nicht verstärkt gemessen wurde. Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass im Verlauf der Infektion NK-Zellen der Milz in vivo abstarben. Eine Unterscheidung zwischen nekrotischen oder apoptotischen Prozessen war aufgrund dieser Daten jedoch nicht möglich.

Carson und Mitarbeiter berichten, dass nach intraperitonealer Injektion von IL-12 in Kombination mit IL-15 oder mit IL-2 in verschiedenen Mausspezies speziell die NK-Zellen deutliche Anzeichen von Apoptose zeigten (Carson et al., 1999) IL-15 und IL-12 sind Zytokine die im Verlauf der Infektion verstärkt auch in der Milz gebildet werden (vergl. 1.5).

Somit wird die Vermutung, dass es sich bei dem Absterben der NK-Zellen im Verlauf einer Infektion um Apoptose handelt, unterstützt.

Bei den infizierten immunkompetenten WT Mäusen zeigten auch die [CD3(+)] T-Zellen der Milz eine deutliche Reduktion der Zellpopulation gegenüber den nicht infizierten Kontrollen. Sowohl die [CD3(+)/CD4(+)] Zellpopulation als auch die [CD3(+)/CD8b(+)] Zellpopulation nahmen kontinuierlich bis 29 h p.i. ab. Im Gegensatz zu der [NK1.1(+)] Zellpopulation war hier allerdings weder ein deutlicher Anstieg der [Annexin V(+)/PJ(-)] Population noch der [Annexin V(+)/PJ(+)] Population zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigte keine Hinweise darauf, ob die [CD3(+)] Zellpopulationen abstarben. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre, dass speziell die [CD4(+)] und [CD8(+)] T-Zellen abstarben und sich in ihrer Größe und Granularität sehr rasch veränderten. Somit konnten diese [PJ(+)] Zellpopulationen in der Analyse der durchflusszytometrischen Daten nicht mehr als Leukozyten erfasst werden (vergl. 2.5.1.4). Eine Ausgrenzung der degenerierten Zellen und Zelltrümmern über die Größe und Granularität war allerdings notwendig, da die Zellpopulation markierenden Antikörper verstärkt mit diesen Zellbestandteilen interagieren und unspezifische Hintergrundsignale verursachen (Sasaki et al., 1987, vergl. 2.5.4.1). Eine nicht weiter untersuchte Möglichkeit, die Abnahme der T-Zellen zu erklären, wäre eine Auswanderung der T-Zellen aus der Milz in die Peripherie.

Chan und Mitarbeiter zeigen in einer frühen Arbeit, dass nach einer primären Infektion mit sublethalen Dosen *Listeria monocytogenes* ($1,0 \times 10^3$ cfu) die T-Zellpopulationen der Milz innerhalb von 3 Tagen auf 10% reduziert wurden. Die B-Zellpopulation wuchs im Gegensatz hierzu an (Chan und Cheers, 1982). Die [CD19(+)] B-Zellpopulation aus der Wild-Typ-Milz zeigte im Gegensatz zu den NK-Zell- und T-Zellpopulationen keine Reduktion über die betrachteten Infektionszeitpunkte. Sie schien eher zuzunehmen. Dieser Effekt wäre dadurch erklärbar, dass der Anteil der eingegrenzten Leukozyten (vergl. 2.5.4.1) über die Infektionszeit konstant blieb, aber der Anteil der T-Zellen und NK-Zellen abnahm, je weiter die Infektion fortschritt. Damit musste der Anteil der B-Zellen relativ zu der betrachteten Leukozytenpopulation ansteigen, da diese nicht durch die Infektion beeinträchtigt wurden. Eine Analyse mittels einer Annexin V und einer PJ Markierung zeigte keine Erhöhung der [Annexin V(+)/PJ(-)/CD19(+)] oder der [Annexin V(+)/PJ(+)/CD19(+)] Zellpopulation. Somit konnten auch keine Hinweise auf Apoptose oder Nekrose bei den B-Zellen beobachtet werden. Die Analyse der Annexin V- und PJ-Markierung der einzelnen Teilpopulationen der Milzlymphozyten insgesamt zeigte keine eindeutigen Ergebnisse, die speziell auf Apoptose als Ursache für die Reduktion der Zellpopulation hinwiesen.

Andere Autoren zeigen dagegen Hinweise auf apoptotische Prozesse, die durch eine Infektion mit VL induziert werden. Bei einer Infektion mit VL akkumulieren sich die Erreger schnell in der Leber. Vor diesem Hintergrund zeigen Unanue und Coautoren, dass die infizierten Hepatozyten apoptotisch werden (Rogers et al., 1996). Sie zeigen in darauffolgenden Arbeiten, dass sich in den ersten Stunden nach einer Infektion mit VL vor allem in der Milz im Bereich der weißen Pulpa akute Läsionen nachweisen lassen. Hierbei sind die Anzahl und die Größe der gefundenen Läsionen abhängig von der Infektionsdosis. Mit Hilfe des TUNEL-Assays wird gezeigt, dass diese Läsionen von einer massiven Apoptose der Lymphozytenpopulation begleitet sind. Es konnte aber nicht geklärt werden, welche Teilpopulationen der Lymphozyten von der Apoptose betroffen waren. Die Autoren vermuten als Ursache für diese Apoptose den Virulenzfaktor Listerialysin (LLO), da diese Läsionen bei Infektionen mit avirulenten Listerienstämmen nicht auftreten (Merrick et al., 1997). Bei einer näheren Untersuchung von T-Zellen zeigen die Autoren *in vitro* und *in vivo*, dass aktivierte, proliferierende T-Zellen nach Kontakt mit geringen Konzentrationen LLO apoptotisch werden (Carreo et al., 2004). Nach den Aussagen der Autoren sind VL die einzigen Erreger, die so stark Apoptose bei Milzzellen in der frühen Phase einer Infektion verursachen.

Für die endgültige Klärung der Fragestellung, warum nur spezielle Lymphozytenpopulationen *in vivo* von einem Absterben betroffen sind und welcher Mechanismus diesem Absterben zugrunde liegt, wäre die Kombination von verschiedenen Methoden eines Apoptosenachweises denkbar. Eine Unterscheidung der einzelnen Zellpopulationen ist über spezifische Marker in der Durchflusszytometrie sehr gut durchführbar. Eine Unterscheidung zwischen vitalen und absterbenden Zellen wäre mit anderen Farbstoffen wie DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol-dilactat) u. U. erfolgreicher, da hier eine bessere Trennung der Emissionswellenlängen der eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe vorliegt (vergl. 2.5). Hierbei wäre allerdings auch der Einsatz eines technisch aufwendigeren Durchflusszytometers erforderlich, der Messungen im UV-Spektralbereich ermöglicht. Andere Methoden wie der Einsatz von Caspase-Inhibitoren oder die intrazelluläre Analyse von aktivierten Caspasen (z.B. mit monoklonalen Antikörpern gegen Caspase 3) würden die Aussagen der Annexinfärbung sehr gut ergänzen.

4.3 Regulation von CD122 auf der Membranoberfläche von NK-Zellen

Bei der Analyse von intrazellulären Proteinen, z.B. Zytokinen, ist die Inkubation mit Inhibitoren des intrazellulären Membrantransportes eine Voraussetzung für die Akkumulation

der Proteine in der Zelle. Für die intrazelluläre Markierung von Zytokinen wurden die Einzellsuspensionen der untersuchten Organe 4 h mit Brefeldin A (BFA) inkubiert (vergl. 2.4.3). In BFA behandelten Zellen wird die Proteinsekretion auf einer frühen Stufe, nämlich dem Transport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi Apparat, inhibiert (Klausener et al., 1992). BFA verursacht eine Rückbildung des Golgi Apparates in rudimentäre Golgi-Cluster bestehend aus Tubulovesikeln, die sich nach dem Entfernen wieder zurückbilden (Tamaki und Yamashina, 2002).

Nach 19 h einer VL Infektion zeigten [NK1.1(+)] Zellen aus der Milz von RAG-1 und WT Mäusen keine Expression von CD122 auf der Oberfläche. Diese [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation exprimierte jedoch ein intrazelluläres Signal für IFN- γ . Die [NK1.1(+)] Zellen der nicht infizierten Kontrollen exprimierten CD122 auf der Membranoberfläche, aber kein intrazelluläres Signal für IFN- γ (vergl. 3.4). Das Phänomen der gegenläufigen Regulation von CD122 und IFN- γ bei NK-Zellen konnte auch in vitro durch VL Stimulation von RAG-1 Milzzellen verifiziert werden. Mit fortschreitender VL Stimulation nahm die Expression von CD122 auf den NK-Zellen ab und diese Zellen exprimierten ein stärker werdendes, intrazelluläres Signal für IFN- γ . Nach 6 h in vitro Stimulation mit VL wurde kein CD122 mehr auf den NK-Zellen exprimiert und ein Großteil der [NK1.1(+)] Zellpopulation zeigte ein IFN- γ Signal (vergl. 3.5.1).

In der Einleitung wurde dargelegt, dass sowohl IL-2 als auch IL-15 Signale über CD122 in die NK-Zelle transloziert werden können. Beide Zytokine verstärkten in vitro erheblich die IFN- γ Produktion von den NK-Zellen aus der RAG 1 Milz, die mit hitzegetöteten Listerien (HKL) stimuliert worden waren. Die eingesetzten IL-2 bzw. IL-15 Konzentrationen waren jedoch allein nicht ausreichend, NK-Zellen zu einer IFN- γ Produktion zu aktivieren (vergl. 3.5.3). Auf diese Weise ließ sich darstellen, dass eine Verstärkung des intrazellulären IFN- γ Signals bei NK-Zellen direkt von der dem Kulturmedium beigefügten IL-2 bzw. IL-15 Konzentration abhängig war. Ohne eine Stimulation durch HKL allerdings blieb ein intrazelluläres IFN- γ Signal bei den NK-Zellen aus (vergl. 3.5.3). Andererseits war eine Abnahme des CD122 Signals unabhängig von der Induktion eines intrazellulären IFN- γ Signals allein durch Zugabe von IL-2 oder IL-15 zu dem Kulturmedium in konzentrationsabhängiger Weise induzierbar. Diese in vitro Beobachtungen zeigten, dass die Signalabnahme von CD122 auf den NK-Zellen nicht in einem kausalen Zusammenhang mit einer IFN- γ Produktion gesehen werden muss. Somit kann aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass die Signalabnahme von CD122 bei einer VL Infektion in vivo oder

in vitro allein durch die Konzentration von mikrobiell induziertem, endogenem IL-2 oder IL-15 in vivo oder in vitro verursacht worden sein muss (vergl. 3.4, 3.5.1).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse konnten ein intrazelluläres IFN- γ Signal nur bei [NK1.1(+)] Zellen zeigen, die kein CD122 mehr exprimierten, d.h. die mit IL-2 oder IL-15 in vivo oder in vitro costimuliert wurden. Diese Beobachtung zeigt die Bedeutung der costimulatorischen Zytokinsignale auf, die über CD122 in die Zellen transloziert wurden und die für die IFN- γ Produktion bei NK-Zellen in vivo und in vitro notwendig waren.

Das Phänomen der Signalabnahme von CD122 bei IFN- γ produzierenden [NK1.1(+)] Zellen wurde nur bei Zellen gemacht, die im Vorfeld der durchflusszytometrischen Analyse mit BFA behandelt wurden. Bei einer Analyse der [NK1.1(+)] Zellen ohne vorausgehende Inkubation mit BFA war festzustellen, dass CD122 trotz Zugabe von IL-2 oder IL-15 zu dem Kulturmedium auf der Membranoberfläche nachgewiesen werden konnte (vergl. 3.7.1, 3.8.1 und 3.8.2). Erst nach einer Inkubation mit BFA war die Abnahme des CD122-Signals nach IL-2 oder IL-15 Zugabe zu dem Kulturmedium auch ohne Fixierung der Zellen mit Formaldehyd darstellbar (vergl. 3.7.2).

Verschiedene Berichte in der Literatur zeigen auf, dass der IL-2 Rezeptorkomplex nach der Bindung seines Liganden internalisiert wird. Eine Endozytose von Rezeptoren ist bei Zytokinen (u.a. IFN- γ ; Farrar und Schreiber, 1993), Wachstumsfaktoren (z.B. *epidermal growth factor*, EGF, oder *growth hormon*, GH) und Hormonen (z.B. Insulin) weit verbreitet. Die schnelle Endozytose von membranständigen Proteinen ist ein Charakteristikum der Plasmamembran (Steinman et al., 1996; Mayor et al., 1993). Neben der Signaltransduktion ist auch die rezeptorvermittelte Endozytose eine Folge der Interaktion von IL-2 mit dem IL-2 *high affinity* oder *intermediate* Rezeptorkomplex bei humanen T-Zellen und NK-Zellen (Subtil et al., 1994). Hemar und Mitarbeiter zeigen in einer humanen T-Zelllinie die schnelle Endozytose dieses IL-2R-Komplexes innerhalb von 30 min. CD25 bleibt zusammen mit dem Transferrin-Rezeptor in den frühen Endosomen lokalisiert, während CD122 und CD132 zu den späten Endosomen transportiert und abgebaut wird (Hemar et al., 1995). Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass CD25 zusammen mit dem Transferrin-Rezeptor wieder an die Zellmembran zurücktransportiert wird. Diese Annahme wird in nachfolgenden Arbeiten bestätigt (Naslavsky et al., 2003).

Der Transferrin-Rezeptor ist ein Beispiel für einen Rezeptor, der kontinuierlich internalisiert wird und über die frühen Endosomen wieder exprimiert wird (Klausener et al., 1983). Die Endozytose dieses Rezeptors wird über die Ausbildung von *cathrin coated pits* gesteuert. Die

Clathrin-abhängige Endozytose ist ein sehr gut untersuchter Mechanismus. Rezeptoren und andere zellmembranständige Proteine werden über Dileucin- und Tyrosin- Motive in ihrem zytoplasmatischen Teil von Adapterproteinen (AP) erkannt. Diese initiieren durch die Aggregation von Clathrinproteinen die Bildung von Vesikeln, wodurch diese Membranbestandteile effizient internalisiert werden (Kirchhausen, 1999).

Bei humanen T-Zell und NK-Zelllinien wird eine Internalisierung des IL-2 / IL-2 *high affinity* Rezeptor-Komplexes nicht inhibiert, wenn die Ausbildung von *clathrin-coated Pits* durch Kalium-Komplexierung oder Zyotsol Ansäuerung blockiert wird (Subtil et al., 1994). Yu und Mitarbeiter identifizierten im zytoplasmatischen Teil von CD132 zwei Sequenzen, die beide wichtige Funktionen bei Internalisierung des IL-2 / IL2R-Komplexes ausüben. Eine Sequenz steuert einen kontinuierlichen, aber relativ langsamen Austausch von membranständigem CD132. Eine weitere, 9 Aminosäuren große Sequenz, scheint für die schnelle, rezeptorvermittelte Endozytose nach Bindung von IL-2 verantwortlich zu sein. Für eine effektive Internalisierung wird von den Autoren ein noch nicht identifizierter Lymphozyten-Faktor postuliert (Yu et al., 2000). Sie diskutieren die Internalisierung von Rezeptoren allgemein als einen Mechanismus zur Regulation der biologischen Wirkung von Zytokinen. Durch diesen Prozess wird die Rezeptordichte auf der Zielzelle verringert und somit wird diese weniger empfindlich für weitere Stimulationen durch das entsprechende Zytokin. Durch intrazellulären Abbau des Zytokin-Rezeptorkomplexes können die biologisch aktiven Zytokine keine weitere Interaktion mit Rezeptoren auf anderen Zellen mehr durchführen (Yu et al., 2000). Aufgrund dieser Berichte erscheint es plausibel, dass CD122, als Teil des auf murinen NK-Zellen exprimierten IL-2 / IL-15 Rezeptorkomplexes, nach Bindung des Liganden internalisiert wird.

Subtil und Mitarbeiter zeigten, dass die Internalisierung von CD122 nicht von gut charakterisierten, Clathrin abhängigen Transportmechanismen abhängt. Für den *growth hormone receptor* (GHR) und den *epidermal growth factor* (EGF) Rezeptor konnte nach Bindung der Liganden eine Ubiquitinylierung an dem zytoplasmatischen Rezeptoranteil gezeigt werden. Auf diese Weise markierte Rezeptoren wurden dann internalisiert und über die späten Endosomen und Proteasomen abgebaut (Hicke, 1997). Eine Ubiquitinylierung des IL-2 Rezeptors konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Yu und Malek, 2001). Ein weiterer Mechanismus, der für die Internalisierung von CD122 denkbar wäre, wird über Adenosindiphosphat-Ribosylierungsfaktoren (*ADP-ribosylation factor*, Arf) reguliert. Arf sind eine Familie von kleinen GTPasen, die eine zentrale Rolle in vielen Transportmechanismen innerhalb der Zelle spielen. Diese Proteine werden ubiquitär

exprimiert. In Säugetierzellen wurden sechs Arf identifiziert. Diese wurden aufgrund der Genstruktur und Homologien der Aminosäuresequenz in drei Klassen aufgeteilt. Die Klasse I Arf (Arf 1, 2 und 3) wurden bisher am besten charakterisiert. Sie initiieren die Bildung von Proteinkomplexen, die Transportvesikel von einer Donormembran abschnüren. Beispiele für diese Vesikelkomplexe sind der COPI-Komplex am Golgi Apparat, Clathrin-AP1 Komplex des trans Golgi Netzwerkes und Clathrin-AP3 Komplex an Endosomen. Über die Klasse II Arf (Arf 4 und 5) sind bisher wenig konkrete Daten bekannt. Bei den Klasse III Arf ist bisher nur ein Vertreter, Arf 6, charakterisiert. Er reguliert u. a. Transportmechanismen an der Plasmamembran. In einigen Zelltypen reguliert dieser Faktor die Endozytose und das Recycling von Rezeptoren. (Jackson und Casanova, 2000) Ein Beispiel für diesen Arf 6 regulierten Recycling-Mechanismus konnte für den MHC I Komplex und den CD25 gezeigt werden (Naslavsky et al., 2003). Arf kommen in einer GDP gebundenen inaktiven Form und in einer GTP gebundenen aktiven Form vor. Die GDP gebundenen, inaktiven Arf sind in erster Linie im Zytosol lokalisiert, während die aktiven GTP gebundenen Arf fest an die Donormembran binden. Den Austausch von GDP zu GTP katalysieren akzessorische Proteine, die *guanine nucleotide exchange factor*; (GEF). Die GEF bilden eine Familie von Proteinen, die sich in der Molekülgröße und ihrer Sequenz sehr voneinander unterscheiden. Sie weisen aber eine strukturelle Gemeinsamkeit auf, eine Domäne von ca. 200 Aminosäuren, die aufgrund der großen Homologie zu dem Hefe-Protein Sec7p als Sec7-Domäne bezeichnet wird. Diese Domäne konzentriert im Wesentlichen die katalytische Aktivität der GEF. Innerhalb dieser Domäne bilden ca. 35 Aminosäuren eine hydrophobe Spalte. Untersuchungen in vivo und in vitro haben gezeigt, dass diese Spalte sensitiv auf geringe BFA Konzentrationen reagiert. BFA stabilisiert die Bindung von Arf -GDP an seinen Katalysator GEF in einer nicht kompetitiven Weise. Hierdurch wird ein Austausch von GDP zu GTP und damit eine Aktivierung von Arf inhibiert. Die Bildung und Abschnürung der Transportvesikel von der Donormembran kann somit nicht stattfinden und ein gerichteter Membrantransport in der Zelle ist nicht mehr möglich. Jedoch nicht alle GEF sind sensitiv gegenüber BFA, es konnten auch BFA insensitive GEF isoliert und kloniert werden. BFA sensitive und BFA insensitive GEF-Unterfamilien unterscheiden sich im Wesentlichen in den 35 Aminosäuren, die die hydrophobe Spalte bilden. Somit werden nicht alle intrazellulären Membrantransporte durch BFA inhibiert (Moss und Vaughan, 1998; Jackson und Casanova, 2000).

Nachdem eine Internalisierung des IL-2/IL-15 Rezeptorkomplexes anhand von Berichten verschiedener Autoren wahrscheinlich erscheint, erscheint auch die Ligand-induzierte Internalisierung des IL-2/IL-15 Rezeptors durch BFA-insensitive Transportprozesse plausibel.

Bei den murinen NK-Zellen wurde eine IL-2 oder IL-15 induzierte Signalabnahme von CD122 nur nach einer BFA Behandlung beobachtet. BFA-insensitive Transportprozesse werden auch von Frank und Mitarbeitern beschrieben. Sie zeigen durch Zellmembran-Untersuchungen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie, dass ein BFA-insensitives GEF (ARNO) an der Plasmamembran einer Zelllinie lokalisiert ist. In diesem Kompartiment ist auch Arf 6 vorwiegend nachweisbar. Die Autoren schließen daraufhin, dass dieser GEF in vivo Arf 6 initiierte Membrantransporte aktiviert (Frank et al., 1998). Für CD25 konnte eine Arf 6-abhängige Internalisierung in die Zelle gezeigt werden (Naslavsky et al., 2003). BFA-sensitive GEF sind bei Säugetierzellen in erster Linie an der Golgi Membran lokalisiert (Spang et al., 2001). Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass CD122 auf der Zellmembran von NK-Zellen nach BFA Behandlung nicht mehr exprimiert wurde. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung wäre, dass in der Zelle vorhandene CD122-Moleküle nicht mehr an die Zellmembran transportiert werden. Der Transportmechanismus könnte durch eine Blockade der hier lokalisierten, BFA-sensitiven GEF inhibiert werden.

Diese Überlegung lässt auch Spekulationen über die Herkunft der intrazellulären CD122 Moleküle zu. Einen Hinweis auf den Abbau von CD122 und damit die Notwendigkeit einer Neusynthese wird schon in dem Bericht von Hemar und Mitarbeiter aufgezeigt (Hemar et al., 1995). Yu und Coautoren berichten, dass bei murinen T-Zellen und T-Zelllinien die fortgesetzte Internalisierung und der Abbau des IL-2R / IL-2 Komplexes in den Lysosomen mit einem Proteasom-Inhibitor blockiert werden kann. Diese Beobachtung zeigen, dass die Proteasomen eine Rolle bei der Regulation der Internalisierung spielen. Eine Ubiquitinylierung des IL-2 Rezeptors selbst konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (s.o.). Die Autoren diskutieren einen Weg, der unabhängig von einer Ubiquitinylierung den Abbau des Rezeptors im den Proteasomen reguliert (Yu und Malek, 2001).

Ein Nachweis von intrazellulärem CD122 nach einer Brefeldin A-Inkubation bei NK-Zellen über die Durchflusszytometrie konnte bisher nicht erbracht werden. Dies hatte vor allem technische Gründe, da im Durchflusszytometer die Abnahme der Fluoreszenzemissionen und damit der Leuchtstärke bei intrazellulären Signalen viel stärker ist als bei extrazellulären Signalen (Shapiro, 2003). Die Darstellung der NK-Zellpopulation mit dem intrazellulär markierten CD122 war von der Negativkontrolle nicht mehr unterscheidbar (Daten nicht dargestellt). Für die Darstellung dieser Markierung im Durchflusszytometer und in der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie sind eine Auswahl der einzusetzenden Fluoreszenzfarbstoffe sowie die Art der Markierung (vergl. 2.5.1) noch zu optimieren.

Yu und Mitarbeiter zeigten, dass die IL-2R-Internalisierung durch den Tyrosinkinase-Inhibitor Genistein blockiert werden kann. Dabei war keine mit der Signaltransduktion assoziierte Tyrosinkinase involviert (Yu et al., 2000). Durch Inhibition der CD122-Internalisierung bei NK-Zellen von RAG-1 Milzzellen mit Genistein kann *in vitro* untersucht werden, ob eine Rezeptorinternalisierung für eine effektive Signaltransduktion notwendig ist. Durch Inkubation von Milzzellen mit Cycloheximid (Hemar et al., 1995) kann untersucht werden, ob eine Wiederverwertung der Rezeptorkomponenten bei NK-Zellen erfolgt oder ob eine Neusynthese erfolgt.

4.4 Die biologische Wirkung von IL-15 und IL-2 auf NK-Zellen

In der Einleitung wurde schon auf die redundanten biologischen Eigenschaften von IL-2 und IL-15 *in vitro* aufgrund der gemeinsam genutzten Rezeptorkomponenten hingewiesen, u. a. auf ihre Vitalität-stabilisierende Wirkung bei NK-Zellen.

Carson und Mitarbeiter haben verschiedene Zytokine aus der Hematopoitin-Rezeptorfamilie hinsichtlich ihrer Vitalität-erhaltenden Wirkung auf humane NK-Zellen untersucht. Die Autoren zeigen, dass nach Inkubation von humanen NK-Zellen *in vitro* mit 10 ng/ml IL-2 oder 10 ng/ml IL-15 die Vitalität der Zellen über 8 Tage erhalten werden kann. Bei den übrigen untersuchten Zytokinen, u. a. IL-7, einem Überlebensfaktor für T-Zellen, sind nach 6 Tagen nur noch ca. 30% der NK-Zellpopulation vital und diese zeigen darüber hinaus deutliche Anzeichen von Apoptose (Carson et al., 1997).

Hepert und Pruett zeigen, dass schon nach 18 h *in vitro* Kultur ohne weitere Mediumzusätze nur noch ca. 25% der murinen NK-Zellen vital sind. Nach Zugabe von 250 U/ml IL-2 oder 100 ng/ml IL-15 in das Kulturmedium bleiben ca. 60% der NK-Zellen vital. In dieser Studie wurden allerdings keine Unterschiede zwischen IL-2 und IL-15 als Überlebensfaktoren für NK-Zellen herausgearbeitet (Hebert und Pruett, 2001).

Ein direkter Vergleich dieser beiden Zytokine in ihrer Wirkung auf die Vitalität von murinen NK-Zellen sollte die Frage aufklären, ob *in vitro* tatsächlich beide Zytokine identisch redundante Ergebnisse aufzeigen.

Die IL-2 und IL-15 Lösungen, die in diesen Experimenten eingesetzt wurden, wurden in einem Vortest auf KY-1 Zellen (Karlhofer et al., 1995) austitriert und die Bioaktivität der Zellen wurde durch den Umsatz von MTT gemessen (vergl. 2.8.3). Diese Zelllinie exprimiert CD122 auf der Oberfläche und für ein Überleben benötigen diese Zellen die kontinuierliche Stimulation durch IL-2 oder IL-15. Um 50 % der KY-1 Zellen vital zu erhalten, wurden 25

ng/ml IL-15, aber nur 1 ng/ml IL-2 benötigt (Daten nicht dargestellt). Die Schlussfolgerung aus diesem Vortest war zum einen, dass die beiden, in dieser Arbeit verwendeten Zytokinlösungen biologisch aktiv auf KY-1 Zellen waren, zum anderen, dass im Vergleich zu IL-15 geringere IL-2 Konzentrationen für Erhalt der Vitalität notwendig waren.

Die unter 3.8.1 mit Hilfe der Durchflusszytometrie dargestellten Ergebnisse zeigen die Wirkung der IL-2 und IL-15 Lösungen auf die Vitalität von murinen NK-Zellen aus der RAG-1 Milz. Die Abb. 34 zeigt zusammenfassend den Vergleich von IL-2 oder IL-15 in ihrer Wirkung als Überlebensfaktor auf NK-Zellen aus der RAG-1 Milz. Die Zugabe von 50 ng/ml IL-15 zu dem Kulturmedium zeigte nach 19 h in vitro Inkubation eine Überlebensrate von ca. 86 % der NK Zellen bezogen auf die direkt nach der Aufarbeitung als Einzelzellsuspension analysierten NK-Zellen. Die Zugabe von 56 ng/ml (100 U) IL-2 dagegen zeigte eine Überlebensrate von ca. 24 %. Diese Daten gaben Hinweise dafür, dass IL-15 effektiver in vitro als Überlebensfaktor auf murine NK-Zellen wirkt als IL-2.

Eine Proliferation der NK-Zellen über 19 h in vitro bei einer Konzentration von ca. 50 ng/ml IL-15 oder IL-2 konnte ausgeschlossen werden. Die RAG-1 NK-Zellen, die über 19 h und 44 h mit 50 ng/ml IL-15 oder 113 ng/IL-2 inkubiert wurden, zeigten nach Inkubation mit CFSE (5- carboxyfluorescein-di-acetate-sucinimidylester = CFDA-SE) keine Zellteilungen. CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Zellen eindringt und diese mittels Durchflusszytometrie detektierbar macht. Bei jeder Zellteilung verteilt sich dieser Farbstoff auf beide Tochterzellen, damit halbiert sich die Intensität des Fluoreszenzsignals.

Diese Beobachtungen unterstützten den Bericht von Toomey und Mitarbeiter. Sie zeigen, dass in vitro kultivierte, reife NK-Zellen erst nach 3 bis 5 Tagen in Anwesenheit von hohen IL-2 (20 nM, 310 ng/ml) Konzentrationen oder IL-15 (20 nM, 280 ng/ml) Konzentrationen proliferieren. In dieser Arbeit wurde auch dargestellt, dass IL-15 besser in der Lage war, reife NK-Zellen zu einer Proliferation anzuregen, als vergleichbare Konzentrationen an IL-2 (Toomey et al., 2003).

In der Einleitung wurde unter 1.5 und 1.7 dargestellt, dass sowohl IL-2 als auch IL-15 an der Regulation der frühen IFN- γ Produktion beteiligt sein können. Die unter 3.5.3 und 3.5.4 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass IL-15 auf den murinen NK-Zellen offensichtlich sowohl eine Signalabnahme von CD122 als auch nach mikrobieller Stimulation eine IFN- γ Produktion effektiver induzierten als vergleichbare IL-2 Konzentrationen. In dem unter 3.5.4 dargestellten Beispielperiment exprimierten nach 19 h in vitro Inkubation mit 56 ng/ml IL-2 ca. 41 % der NK-Zellen kein CD122 auf der Membranoberfläche. Demgegenüber

exprimierten nach Inkubation mit 50 ng/ml IL-15 ca. 88 % der NK-Zellen kein CD122 mehr auf der Zellmembran (Abb. 26 D und J). Zusätzlich zeigte das unter 3.5.3 dargestellte Beispielerperiment, dass nach 19 h in vitro Stimulation mit HKL und einer Costimulation von 56 ng/ml IL-2 bei ca. 61 % der NK-Zellen CD122 auf der Membranoberfläche nicht mehr nachweisbar war. Allerdings exprimierten ca. 18 % ein intrazelluläres Signal für IFN- γ . Demgegenüber exprimierten nach einer 19-stündigen Stimulation mit HKL plus 50 ng/ml IL-15 ca. 93 % der NK-Zellen kein CD122 mehr auf der Membranoberfläche und ca. 40 % zeigten ein intrazelluläres Signal für IFN- γ (Abb. 25 D und J).

Zusammenfassend kann aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass IL-15 in der Lage war, effektiver als Überlebensfaktor auf murine NK-Zellen in vitro einzuwirken als IL-2 und effektiver die Signalabnahme von CD122 zu induzieren. Auch konnte dargestellt werden, dass IL-15 nach einer HKL Stimulation ein stärkeres intrazelluläres IFN- γ Signal induziert als vergleichbare Konzentrationen IL-2. Diese Daten zeigen, dass in vitro durchaus Unterschiede zwischen IL-2 und IL-15 in ihrer biologischen Wirkung auf murine NK-Zellen bestehen.

Granucci und Mitarbeiter zeigen, dass IL-2 von DC sehr früh nach einer mikrobiellen Stimulation in vitro produziert wird und folgern für dieses Zytokin eine wichtige biologische Funktion bei Regulation der frühen IFN- γ Produktion durch NK-Zellen (Granucci et al., 2001; Granucci et al., 2004). Die unter 3.9 dargestellten funktionalen Untersuchungen von mikrobiell stimulierten RAG-1 Milzzellen in vitro zeigen allerdings keine Hinweise für eine Wirkung von IL-2 bei der Regulation der frühen IFN- γ Produktion durch murine NK-Zellen.

Bei den unter 3.9.1 dargestellten Ergebnissen wurden die RAG-1 Milzzellen mit IL-15 optimal in einem vitalen Zustand erhalten. Durch eine Stimulation mit HKL und die Coinkubation mit verschiedenen Antikörpern in vitro wurde der Einfluss bestimmter Zytokine und Oberflächemoleküle auf die mikrobiell induzierte IFN- γ Produktion untersucht. Als Kontrolle für eine Inhibition bzw. eine Verstärkung der mikrobiell induzierten IFN- γ Produktion bei RAG-1 Milzzellen wurden in diesen Experimenten mAk gegen IL-12, TNF- α und IL-10 eingesetzt. Unanue und Mitarbeitern zeigen durch HKL Stimulation von C.B.17 SCID Milzzellen in vitro, dass IL-12 und TNF- α notwendige Costimulatoren bei der mikrobiell induzierten IFN- γ Produktion sind. Sie zeigten auch, dass IL-10 sowohl die IL-12 und TNF- α , als auch die IFN- γ Produktion von HKL stimulierten SCID- Milzzellen inhibiert (Tripp et al., 1993). Wie erwartet, zeigten die mAk gegen IL-12 oder TNF- α auf

Einzelzellniveau eine deutliche Inhibition der intrazellulären IFN- γ Produktion bei den NK-Zellen gegenüber den eingesetzten Kontrollen (Abb. 43B Probe 7 und 9). Die für eine IFN- γ Produktion notwendigen Stimuli wurden durch die Inkubation mit diesen mAk blockiert, so dass eine Aktivierung der NK-Zellen ausblieb. Ein mAk gegen IL-10 zeigte eine leichte Verstärkung der intrazellulären IFN- γ Produktion (Abb. 43B Probe 8). Über die Inkubationszeit wird die aktivierende Wirkung der proinflammatorischen Zytokine durch die Produktion von hemmend wirkenden Zytokinen inhibiert (vergl. 1.5). Eines dieser hemmend wirkenden Zytokine ist IL-10. Durch die Bindung der anti IL-10 mAk wird die Wirkung von endogen produziertem IL-10 aufgehoben sodass die IFN- γ Produktion gegenüber den Kontrollen verstärkt erscheint. Alle Proben zeigten hier ungefähr gleich große [NK1.1(+)] Zellpopulationen (Abb. 43 A, Proben 7,8 und 9) im Vergleich mit den Kontrollen (Abb. 43 A, Proben 2 bis 6). Dies war ein Hinweis, dass die Effekte der eingesetzten mAk nicht auf eine zytotoxische Wirkung auf die NK-Zellen oder eine Steigerung der Proliferation der NK-Zellen zurückzuführen waren. Als Kontrollen wurden Antikörper eingesetzt, die das Reaktionssystem nicht beeinflussten, d. h. sie interagierten nicht mit Oberflächenmolekülen auf RAG-1 Milzzellen, die an der Regulation der IFN- γ Produktion beteiligt waren. Ebenso wurden auch keine Zytokine blockiert, welche die IFN- γ Produktion bei NK-Zellen regulieren. Auch zeigten sie keine Veränderungen der [NK1.1(+)] Zellpopulation gegenüber den nur HKL stimulierten RAG-1 Milzzellen (Abb. 43, Proben 4,5 und 6).

Eine Coinkubation von HKL stimulierten RAG-1 Milzzellen mit einem inhibierend wirkenden mAk gegen IL-2 zeigte keine Beeinflussung der [NK1.1(+)] Zellpopulation. Eine Abweichung des intrazellulären IFN- γ Signals im Vergleich zu den Kontrollen konnte ebenfalls nicht gezeigt werden. Die Coinkubation der RAG-1 Milzzellen mit einem anti CD122 mAk (Klon TM- β 1, Tanaka et al., 1991) zeigte allerdings eine deutliche Reduktion der [NK1.1(+)] Zellpopulation (Abb. 43A, Probe 12) im Vergleich zu den eingesetzten Kontrollen, die verbliebenen NK-Zellen zeigten auch eine deutlich geringere Expression von intrazellulärem IFN- γ (Abb. 43B, Probe 10).

Die Ursache dieser stark reduzierten [NK1.1(+)] Milzzellpopulation wurde näher durch die Analyse der Vitalität der NK-Zellen über eine PJ Gegenfärbung untersucht. Hierzu wurden RAG-1 Milzzellen in Gegenwart von IL-15 über 19 h in vitro kultiviert und mit verschiedenen Kontrollantikörpern sowie anti CD122 mAk coinkubiert (vergl. 3.8.2, Abb. 35). Ein großer Anteil der NK-Zellen aus der RAG-1 Milz waren nach 19 h ohne Zusatz des Überlebensfaktors IL-15 abgestorben. Ein ähnliches Ergebnis zeigten die NK-Zellen, die mit

IL-15 und mit dem anti CD122 mAk inkubiert wurden. Die NK-Zellen, die mit IL-15 ohne Antikörper, und die mit den Isotypkontrollen inkubiert wurden, waren erwartungsgemäß vital (vergl. 3.8.2).

Die Ergebnisse aus beiden Experimenten ließen die Schluss zu, dass die Blockade von CD122 über 19 h in vitro ein verstärktes Absterben der NK-Zellen aus der RAG-1 Milz verursachte. Die überlebenden NK-Zellen zeigten durch die fehlenden costimulatorischen IL-15 Signale eine starke Reduktion der intrazellulären IFN- γ Produktion. Die Blockade von endogenem IL-2 durch einen anti IL-2 Antikörper zeigte weder eine Auswirkung auf die [NK1.1(+)] Zellpopulation, noch wurde die intrazelluläre IFN- γ Produktion der NK-Zellen beeinflusst.

Die funktionellen Untersuchungen mit Hilfe der HKL stimulierten, IL-15 konditionierten RAG-1 Milzzellen ließen allerdings keine Aussagen über die mikrobiell induzierte, endogene IL-15 Produktion des Reaktionssystems zu. Durch die Verwendung von IL-15 als Überlebensfaktor für die NK-Zellen konnte auch die durch endogenes IL-15 oder endogenes IL-2 induzierte Signalabnahme von CD122 nicht gemessen werden. Eine in vitro Stimulation von RAG-1 Milzzellen über 6 h mit VL ohne Zusatz von Überlebensfaktoren zu dem Zellkulturmedium (vergl. 3.5.1) sollte Aussagen über die Bedeutung von mikrobiell induzierten IL-2 und IL-15 an der Regulation der IFN- γ Produktion möglich machen. Auch sollte überprüft werden, welches der beiden endogen produzierten Zytokine die CD122 Signalabnahme auf den NK-Zellen induziert.

Bei den unter 3.9.2 dargestellten Ergebnisse zeigten die NK-Zellen der VL stimulierten RAG-1 Milzzellen nach Coinkubation mit einem anti IL-12 mAk (Abb. 44B Probe 7) und einem anti TNF- α mAk (Abb. 44B Probe 9) erwartungsgemäß eine Inhibition der IFN- γ Produktion. Die Coinkubation der VL stimulierten RAG-1 Milzzellen mit einem anti IL-10 Antikörper zeigte eine schwache Verstärkung des intrazellulären IFN- γ Signals bei den NK-Zellen (Abb. 44B, Probe 8). Die eingesetzten Kontrollen zeigten erwartungsgemäß ebenfalls keine Beeinflussung der IFN- γ Produktion der NK-Zellen. Diese Daten bestätigten, dass die Methode der VL stimulierten RAG-1 Milzzellen Aussagen über die Regulation der mikrobiell induzierten IFN- γ Produktion zuließ.

Die Coinkubation von VL stimulierten RAG-1 Milzzellen mit einem anti CD122 mAk zeigte keine Reduktion der [NK1.1(+)] Zellpopulation gegenüber den eingesetzten Kontrollen (Abb. 44A Probe 10). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Daten, die bei HKL stimulierten Milzzellen unter Zusatz von IL-15 gezeigt werden konnten.

Bei einer Inkubation von RAG-1 Milzzellen über 19 h in einem IL-15-haltigen Medium konnte gezeigt werden, dass ca. 86 % der NK-Zellen, bezogen auf die Populationsstärke, die ohne weitere in vitro Inkubationen gemessen wurde, überlebten (Abb. 34). Die NK-Zellen wurden hier mit löslichen IL-15 Konzentrationen in vitro stabilisiert, die in Zellkulturen nach einer mikrobiellen Stimulation nicht gemessen wurden. Der Zusatz von IL-15 induziert bei NK-Zellen in vitro und in vivo die Produktion von Apoptose-hemmenden Proteinen z.B. Bcl-2 (Carson et al., 1997; Cooper et al., 2002). Durch die Dauer der in vitro Inkubation konnten die Auswirkungen des IL-15 Zusatzes auf die NK-Zellen sehr gut beobachtet werden. Bei der Methode der VL Stimulation wurde auf einen Zusatz von IL-15 verzichtet. Nur die endogene IL-15 Produktion konnte somit Auswirkungen auf die NK-Zellen zeigen. Aber die durch VL induzierten IL-15 Konzentrationen waren nicht ausreichend, die Vitalität der NK-Zellen zu stabilisieren. Bei der VL Stimulation von RAG-1 Milzzellen war auffällig, dass weniger [NK1.1(+)] Zellen nach 6 h Infektion gemessen werden konnten, als bei der HKL Stimulation von RAG-1 Milzzellen mit IL-15 konditioniertem Kulturmedium nach 19 h Inkubation. Die Vermutung liegt nahe, dass die Lymphozyten bei der VL Stimulation sehr schnell (innerhalb von 6 h) abstarben. Unanue und Mitarbeiter haben gezeigt, dass der VL-Virulenzfaktor Listeriolysin (LLO) in geringen Konzentrationen allein schon ausreicht, um in Lymphozyten Apoptose zu induzieren (Merrick et al., 1997; Carreo et al., 2004).

Eine Beeinflussung der IFN- γ Produktion konnte nach Coinkubation von VL stimulierten RAG-1 Milzzellen mit dem anti CD122 mAk nicht gezeigt werden (Abb. 44B Probe 10). Auch dieses Ergebnis steht nicht in Einklang mit den Daten, die mit Hilfe der HKL Stimulation gezeigt wurden.

Fehniger und Coautoren berichten, dass bei der Inkubation von LPS stimulierten C.B.-17 SCID Milzzellen mit einem anti CD122 mAk über 48 h eine ca. 50 %-ige Inhibition der IFN- γ Produktion gemessen wurde. Die Autoren verwendeten denselben Klon (TM- β 1) für ihre Inhibitionsexperimente, der auch in dieser Arbeit für die Blockade von CD122 eingesetzt wurde. Die unter 3.8. (Abb. 34) dargestellten Daten zeigen, dass nach 19 h in vitro Inkubation ein Großteil der IFN- γ produzierenden NK-Zellpopulation bei RAG-1 Milzzellen ohne Zusatz von Überlebensfaktoren gestorben war. Fehniger und Mitarbeiter verwendeten in dem Medium für die in vitro Stimulation keine derartigen Faktoren. Da die Autoren nur die IFN- γ Konzentration der Zellkulturüberstände mit Hilfe der ELISA Methode bestimmt hatten, wurden keine Angaben über die Vitalität der NK-Zellen gemacht. Dies legt die Vermutung

nahe, dass auch die NK-Zellen der C.B.-17 SCID Milzzellen nur ca. 20 h der Inkubation überlebt hatten.

In den unter 3.8.2 und 3.9 beschriebenen Experimenten wurden 12 µg/ml dieses Antiköpers eingesetzt, während Fehniger und Mitarbeiter in ihren Experimenten die Konzentration von 50 µg/ml verwendet hatten. Sie zeigen hierbei eine 50 %-ige Reduktion der IFN- γ Konzentrationen verglichen mit den von ihnen eingesetzten Kontrollen. Diese Daten lassen vermuten, dass die Bindung des anti CD122 mAk (TM- β 1) die Signaltransduktion nicht vollständig inhibiert. Die durch den Antikörper blockierten Effekte konnten somit erst nach einer gewissen Inkubationsdauer beobachtet werden. Die Inkubationszeit bei der VL Stimulation von RAG-1 Milzzellen betrug jedoch nur 6 h. Eine Beeinflussung der IFN- γ Produktion konnte in dieser Stimulationszeit im Vergleich mit den Kontrollen noch nicht dargestellt werden. Im Vergleich hierzu waren jedoch schon deutliche Effekte bei den über 19 h mit HKL stimulierten Milzzellen nach Coinkubation mit anti CD122 zu beobachten.

Die Coinkubation der VL stimulierten RAG-1 Milzzellen mit einem blockierenden Antikörper gegen IL-2 zeigte analog den Kontrollen keine Beeinflussung der mikrobiell induzierten IFN- γ Produktion bei NK-Zellen (Abb. 44B Probe 3). Demgegenüber konnte bei einer Coinkubation mit einem anti IL-15 pAk eine deutliche Inhibition der IFN- γ Produktion bei den NK-Zellen beobachtet werden (Abb.44B Probe 11). Die für den IL-15 pAk eingesetzte Kontrolle zeigte sowohl nach HKL Stimulation (vergl. 3.9.1, Abb. 43B Probe 6) als auch nach VL Stimulation (vergl. 3.9.2 Abb. 44B Probe 6) keine Beeinflussung der IFN- γ Produktion.

Diese Daten zeigten deutliche Hinweise darauf, dass IL-2 bei der Regulation der mikrobiell induzierten IFN- γ Produktion von RAG-1 Milzzellen keine wesentliche Rolle spielt. Die Inaktivierung von endogenem IL-2 mit Hilfe von mAk zeigte sowohl bei HKL stimulierten Milzzellen als auch bei VL stimulierten RAG-1 Milzzellen *in vitro* keinen Effekt auf die IFN- γ Produktion der NK-Zellen. Demgegenüber zeigte die Inaktivierung von endogenem IL-15 bei VL stimulierten RAG-1 Milzzellen auf Einzelzellniveau eine deutlich reduzierte IFN- γ Produktion bei NK-Zellen.

Diese Ergebnisse bestätigen den Bericht von Fehniger und Coautoren. Die Autoren zeigen bei einer *in vitro* Stimulation von C.B.17 SCID Milzzellen durch LPS, dass die Inaktivierung von IL-2 mit einem mAk keinen Einfluss auf die IFN- γ Produktion hat. Demgegenüber zeigen Antikörper gegen IL-15 und CD122 eine deutliche Reduktion der IFN- γ Titer im

Zellkulturüberstand. Die Autoren bestätigen die essentielle Bedeutung von IL-15 für die LPS induzierte IFN- γ Produktion auch in vivo bei SCID Mäusen (Fehniger et al., 2000).

Die unter 3.9.2.4 dargestellte Analyse der [NK 1.1(+)] Zellpopulation von nicht stimulierten RAG-1 Milzzellen zeigte nach 6 h eine Expression von CD122 auf der Oberfläche (ca. 55 %) aber keine Expression eines intrazellulären IFN- γ Signals (ca. 0,5 %). Nach einer VL Stimulation über 6 h war die CD122 Expression auf der Membran von [NK1.1(+)] Zellen deutlich reduziert (ca. 17 %), dafür wurden ein deutliches intrazelluläres IFN- γ exprimiert (ca. 69% der NK Zellen). Die Coinkubation mit einem anti IL-2 Antikörper zeigte ebenfalls ein deutliches intrazelluläres IFN- γ Signal bei ca. 60 % der NK-Zellen und eine Reduktion der CD122 Expression auf der Membranoberfläche der NK-Zellen (ca. 25 %). Demgegenüber zeigt die Inkubation mit einem anti IL-15 Antiserum eine deutliche Reduktion des intrazellulären IFN- γ Signals (nur ca. 29 %), dafür eine Expression von CD122 auf der Membran von NK-Zellen (52 %), die der von nicht stimulierten RAG-1 Milzzellen entsprach.

Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung von endogenem IL-15 bei der CD122 Signalabnahme bei NK-Zellen von RAG-1 Mäusen. Demgegenüber konnte für IL-2 keine wesentliche Funktion bei der Induktion der Signalabnahme von CD122 auf murinen NK-Zellen zugewiesen werden.

Diese Ergebnisse werden indirekt durch Fehniger und Mitarbeiter bestätigt. Sie injizierten anti CD122 mAk in IL-2 defiziente Mäuse eine Stunde vor Aktivierung einer IFN- γ Produktion durch LPS-Injektion. Nach 6 h p.i. konnten die Autoren auch in IL-2 defizienten Mäusen eine deutliche Reduktion der IFN- γ Seruntiter feststellen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie zeigten sie, dass die NK-Zellpopulation durch die Injektion von CD122 mAk im Vergleich zu den Kontrolltieren nach 6 h p.i. noch nicht verändert war. Damit wurde nachgewiesen, dass eine Depletion der IFN- γ produzierenden NK-Zellen nach Injektion von CD122 mAk noch nicht stattgefunden hatte (Fehniger et al., 2000). Dieses Ergebnis bestätigt, dass bei einer mikrobiellen Stimulation im wesentlichen IL-15 an CD122 bindet und hierdurch NK-Zellen zu einer IFN- γ Produktion aktiviert werden.

Bei den unter 3.6 dargestellten Ergebnissen wurde die IL-15 und IL-2 Genexpression durch Amplifikation spezifischer Genfragmente aus Milzzellen nach einer Listerieninfektion von RAG-1 und syngeneten WT Mäusen 5 h p.i. und 19 h p.i. analysiert. Sowohl bei den Milzzellen der RAG-1 Mäuse als auch bei denen der WT Mäuse wurde nach 5 h p.i. ein schwaches Signal für eine IL-2 Genexpression dargestellt, die allerdings nach 19 h p.i. nicht

mehr gezeigt werden konnte. Demgegenüber konnte ein starkes Signal für die Expression der IL-15 mRNA nach 5 h p.i. und nach 19 h p.i. detektiert werden. Diese Beobachtung unterstützt die Berichte von Granucci und Mitarbeiter, die zwischen den Zeitpunkten 2 h und 6 h nach Stimulation einer DC-Zelllinie mit *E.coli* IL-2 mRNA nachweisen konnten. Sie zeigten auch bei DC, die aus dem Knochenmark isoliert und in vitro aktiviert worden waren über eine semiquantitative RT-PCR nach 2 h - 6 h die Expression von IL-2 mRNA. Im Kulturüberstand konnten sie IL-2 Protein (nach 4 h - 8 h und 14 h - 18 h Stimulation) nachweisen (Granucci et al., 2001).

Diese Beobachtungen geben Hinweise darauf, dass sowohl IL-2 als auch IL-15 bei einer Infektion mit VL induziert werden kann. Die IL-15 mRNA wird aber im Vergleich mit der IL-2 mRNA im Verlauf einer Infektion mit VL deutlich länger und starker exprimiert (vergl.3.6). Im Kontext mit den vorher diskutierten Daten unterstreichen auch diese Ergebnisse die dominierende Bedeutung von IL-15 bei der Infektabwehr von *Listeria monocytogenes* bei RAG-1 Mäusen und immunkompetenten WT Mäusen.

Weitere Untersuchungen, vor allem in vivo, sind notwendig, um die Rolle von IL-15 in Abgrenzung zu der von IL-2 während der natürlichen Infektabwehr näher zu charakterisieren. Hierzu ist die Bereitstellung von monoklonalen Antikörper für die Detektion aller IL-15 / IL-2 Rezeptorkomponenten sowie für die Detektion und selektive Blockade von IL-15 und IL-2 in ausreichenden Quantitäten und genügender Sensitivität notwendig, was derzeit ein finanzielles und technisches Problem darstellt.

4.5 Detektion von IL-15 in biologischen Systemen

Verschiedene Autoren berichten, dass eine direkte quantitative Messung der IL-15 Konzentration in Zellkulturüberständen oder im Serum über einen ELISA oder Bioassay nicht erfolgreich war (Bamford et al., 1996; Alleva et al., 1998; Nguyen et al., 2002, Schluns et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass IL-15 für die Übertragung der Signale an die Zielzellen den Kontakt der IL-15 produzierenden Zelle mit der Zielzelle benötigt. Nach einer mikrobiellen Stimulation produzieren über Toll-like Rezeptoren aktivierte Monozyten, MΦ und DC IL-15. Durch diese Aktivierung wird u.a. auch die Expression der IL-15R α Kette induziert (z.B. DC; Mattei et al., 2001). IL-15 bindet an diese Rezeptorkette und wird so den sensitiven Zellpopulationen u.a. CD8(+) *memory* T-Zellen, NK-Zellen, NK-T-Zellen und IEL präsentiert (Dubios et al., 2002; Sandau et al., 2004). Dieser Mechanismus der Transpräsentation von membranassoziertem IL-15 erklärt, warum in Zellkulturüberständen

lösliches IL-15 nicht oder nur in sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. Eine weitere Möglichkeit der Transpräsentation ist die direkt membrangebundene Form des Zytokins. Musso und Mitarbeiter konnten auf humanen Monozyten und monozytären Zelllinien konstitutiv exprimiertes, membrangebundenes und biologisch aktives IL-15 nachweisen. Sie zeigen, dass dieses IL-15 auf den Zellen durch IFN- γ hochreguliert werden kann (Musso et al., 1999). Weitere Arbeiten zeigen Hinweise bei humanen Monozyten, dass membrangebundenes IL-15 selbst Signale in Zelle transferieren kann und auf diese Weise u. a. die Monozyten in vitro zu einer IL-8 Sekretion aktiviert (Budagian et al., 2004; Neely et al., 2004).

Der Weg der Übertragung der biologischen Signale von IL-15 an die Zielzelle und die strikte Regulation von IL-15 (vergl. 1.7) erschwert den Nachweis und eine Quantifizierung von IL-15 in vitro und in vivo. Dieses Problem wird durch das Fehlen von kommerziell erhältlichen, IL-15 spezifischen mAk, vor allem im murinen System, noch verschärft. Somit ist auch der Nachweis von membrangebundenem oder potentiell intrazellulärem IL-15 über die Durchflusszytometrie nur sehr eingeschränkt möglich.

Eine Nachweismethode für biologisch aktives IL-15 war die Cokultivierung von M Φ oder M Φ -ähnlichen Zelllinien (RAW 264.7 Zellen) mit IL-15 sensitiven Zellen (z.B. KY-1 Zellen). Auch ein Nachweis von IL-15 auf der Membranoberfläche von mikrobiell stimulierten RAW 264.7 Zellen konnte erfolgreich durchgeführt werden (Hennig et al., 2004; Hennig, 2005). Diese Methode war allerdings für den Nachweis von membrangebundenen IL-15 auf M Φ und DC aus Milzzellkulturen nicht sensitiv genug (Daten nicht dargestellt).

Eine neue Nachweismöglichkeit von murinem IL-15 in vivo und in vitro ist über die biologische Wirkung auf murinen NK-Zellen möglich. IL-15 ist gemäß den in dieser Arbeit dargestellten und diskutierten Daten das Zytokin, das wesentlich die Abnahme des CD122 Signals auf NK-Zellen nach einer BFA Inkubation induziert. Die unter 3.5.3 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Signalabnahme konzentrationsabhängig verlief. Bei einer Infektion von Milzzellkulturen mit VL konnte ebenfalls eine Zeitabhängigkeit der Signalabnahme von CD122 dargestellt werden (vergl. 3.5.1). Weiterhin konnte mit den unter 3.4 dargestellten Daten die Sensitivität der Methode gezeigt werden. Sowohl in vitro (vergl. 3.5.1) als auch in vivo (vergl. 3.4) konnte eine Signalabnahme von CD122 bei NK-Zellen aus der Milz gezeigt werden, die nur durch endogen produziertes IL-15 induziert sein konnte.

4.6 Vergleich von vitalen und Hitze-inaktivierten Listerien als mikrobielle Stimulanzen

Die unter 3.5.2.1 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass VL eine stärkere IFN- γ Produktion bei RAG-1 Milzzellen induzieren als vergleichbare HKL-Titer (vergl. Abb. 23). Allerdings kann auch gezeigt werden, dass HKL durchaus in der Lage sind hohe IL-12 Titer zu induzieren (vergl. 3.5.2.2 Abb. 24).

Die IL-12 Produktion durch aktivierte Monozyten, M Φ und DC ist essentiell sowohl für die Aktivierung der natürlichen Immunität als auch auf für die Ausbildung einer zellvermittelten, erworbenen Immunantwort (Trinchieri, 2003). IL-12 ist ein Schlüsselzytokin bei der Induktion von frühem IFN- γ bei einer primären Infektion. Eine Blockade von IL-12 durch u. a. monoklonale Antikörper inhibiert die IFN- γ Produktion von SCID Milzzellen trotz mikrobieller Stimulation (Tripp et al., 1994). IL-12 allein ist nur ein schwacher Stimulus, um NK-Zellen zu einer IFN- γ Produktion zu aktivieren (Tripp et al., 1993). Erst in Kombination mit TNF- α , IL-2 (Tripp et al., 1993), IL18 (Tomura et al., 1998) oder IL-15 (Carson et al., 1995; Fehniger et al., 2000; Fehniger et al., 1999) zeigt IL-12 ein starkes Potential, NK-Zellen zu einer IFN- γ Produktion zu aktivieren. Neben IL-12 scheint auch IL-15 ein wichtiges, regulatorisches Zytokin für die Aktivierung von NK-Zellen zu sein, wie der Vergleich der CD122 Signalabnahme auf NK-Zellen bei HKL oder VL stimulierten RAG-1 Milzzellen zeigte.

RAG-1 Milzzellen, die über 19 h in vitro ohne Stimulation inkubiert wurden, zeigten, dass bei ca. 80 % der NK-Zellen CD122 auf der Oberfläche exprimiert wurde (Abb. 26, 3.5.4). Die Stimulation von RAG-1 Milzzellen über 19 h mit HKL ohne Zusatz von IL-2 und IL-15 zu dem Kulturmedium zeigte, dass bei ca. 79 % der NK-Zellen CD122 auf der Membranoberfläche exprimiert wurde. Nur bei ca. 1,3 % der [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation konnte schwaches, intrazelluläres IFN- γ Signal nachgewiesen werden (Abb. 25, 3.5.3). Sowohl bei HKL stimulierten als auch bei nicht stimulierten NK-Zellen führte erst die Erhöhung der IL-15 Konzentration im Kulturmedium zu einer Signalabnahme von CD122. Nur bei den NK-Zellen der HKL stimulierten RAG-1 Milzzellen konnte das intrazelluläre IFN- γ Signal durch exogenes IL-15 konzentrationsabhängig verstärkt werden (vergl. 3.5.3 Abb. 25). Demgegenüber zeigte die Stimulation von RAG-1 Milzzellen schon nach 6 h mit VL ohne weitere Mediumzusätze von IL-15, dass das CD122 Signal von ca. 96 % der [NK1.1(+)]-Zellen nicht mehr exprimiert wurde. Bei ca. 84 % der NK1.1(+) Zellen konnte ein intrazelluläres Signal für IFN- γ nachgewiesen werden (vergl. 3.5.1, Abb. 22D) Von den

NK-Zellen der nicht stimulierten RAG-1 Milzzellen exprimierten noch ca. 80 % das CD122 Signal auf der Membran, ein intrazelluläres Signal für IFN- γ war nicht messbar (Abb. 22E 3.5.1),

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass HKL allein nicht in der Lage war, M Φ und DC zu einer IL-15 Produktion zu aktivieren. Dies konnte indirekt durch eine Messung der CD122 Signalabnahme auf NK-Zellen dargestellt werden. Durch den fehlenden IL-15 Stimulus konnten die NK-Zellen auch nur zu einer schwachen IFN- γ Produktion aktiviert werden. Bei einer Stimulation der RAG-1 Milzzellen mit VL konnte schon nach 6 h dargestellt werden, dass fast alle NK-Zellen kein CD122 auf der Membranoberfläche mehr exprimierten. Dies ist im Kontext mit den unter 4.4 und 4.5 diskutierten Ergebnisse ein deutlicher Hinweis für die Aktivierung der Zellen durch IL-15.

Diese Beobachtungen bestätigen, dass die CD122 Regulation auf NK-Zellen für die Detektion von endogenem IL-15, welches an der Regulation von komplexen Effektormechanismen in vivo und in vitro beteiligt ist, eine geeignete und sensitive Nachweismethode darstellt. Sie finden in Berichten über Unterschiede bei der Immunisierung mit HKL und VL in WT Mäusen Bestätigung, die auf die Bedeutung von endogenem IL-15 hinweisen.

Studien im murinen Listeriose-Modell zeigen, dass nach einer Immunisierung mit VL CD8(+) zytotoxische *memory* T-Zellen eine protektive Immunität vermitteln (Harty et al., 1992). Demgegenüber wird nach Immunisierung mit HKL keinen Immunschutz aufgebaut (von Koenig und Finger, 1982). Lauvau und Mitarbeiter zeigen, dass sowohl VL als auch HKL in der Lage sind, die Bildung CD8(+) *memory* T-Zellen zu induzieren. Hierbei vermitteln die nach HKL Immunisierung induzierten CD8(+) *memory* T-Zellen jedoch keinen Schutz gegen eine Sekundärinfektion mit VL, da diese nach einer HKL Immunisierung ausgebildeten CD8(+) *memory* T-Zellen keine zytolytische Aktivität erwerben. Die HKL Immunisierung induziert zwar die klonale Expansion von spezifischen CD8(+)-T-Zellen, aber diese Zellen differenzieren nicht zu zytotoxischen Effektorzellen aus (Lauvau et al., 2001). Die Perforin vermittelte Lyse von infizierten Zielzellen ist ein wesentlicher Effektormechanismus bei der CD8(+) T-Zell vermittelten Immunabwehr gegen VL (Kagi et al., 1994). Liu und Mitarbeiter zeigen, dass IL-15 die Produktion von Granzym B und Perforin hochreguliert, die direkt mit einer verstärkten zytotoxischen Effektorfunktion von CD8(+) *memory* T-Zellen in vitro einhergeht (Liu et al., 2002).

Bei der Immunisierung von Mäusen mit Lysaten von *Toxoplasma gondii* wird analog der Immunisierung mit HKL kein protektives Immungedächtnis bei einer Sekundärinfektion

aufgebaut. Auch eine Immunisierung mit IL-15 allein ist erfolglos. Die Kombination von beiden Parametern ist allerdings in der Lage, ein protektives Immungedächtnis über CD8(+) Gedächtniszellen zu erzeugen (Kahn et al., 1996).

Daten über eine Immunisierung mit HKL unter Verwendung von IL-15 als Adjuvans zur Ausbildung eines protektiven Immungedächtnisses konnten in der Literatur nicht ermittelt werden. Dies würde eine neue Rolle von IL-15 bei der Anlage von zytotoxischen Eigenschaften bei der klonalen Selektion von Effektorzellen aufzeigen, die bei einer Sekundärinfektion abgerufen werden.

4.7 Die Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen durch IL-15 über autokrine Mechanismen

Verschiedene Autoren berichten, dass IL-15 auch Antigen-präsentierende Zellen aktivieren kann. So diskutieren Alleva und Mitarbeiter, dass Peritoneal-M Φ mit hohen Konzentrationen IL-15 zu einer TNF- α , IL-6 und IL-1 Produktion stimuliert werden können, während geringe Konzentrationen IL-15 diese inhibieren (Alleva et al., 1997). Koyasu und Mitarbeiter diskutieren IL-15 als ein Zytokin, welches wichtig für die Funktionen der Antigen-präsentierenden Zellen ist. Dieses schließt auch die Produktion von IL-12, NO und IFN- γ durch diese Zellen mit ein (Ohteki et al., 2001).

Die Wirkung von IL-15 auf die Antigen-präsentierenden Zellen der RAG-1 Milz [MHC II(+)] wurde im Vergleich zu den NK-Zellen [NK1.1(+)] unter 3.8.3 dargestellt. Hierbei wurden RAG-1 Milzzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen IL-15 inkubiert dabei nicht stimuliert oder mit HKL stimuliert. Die Zellüberstände wurden dann im ELISA auf die IL-12 und die IFN- γ Titer hin getestet. Die Abb. 40 zeigt, dass die IFN- γ Titer bei den HKL stimulierten Milzzellen mit ansteigenden IL-15 Konzentrationen ebenfalls anstiegen. Demgegenüber zeigt die Abb. 38, dass bei HKL stimulierten RAG-1 Milzzellen die IL-12 Konzentrationen trotz steigender IL-15 im Kulturmedium konstant blieben. Unstimulierte Milzzellen zeigten keine erhöhten IL-12 oder IFN- γ Titer im Kulturmedium. Diese Ergebnisse wurden über auf Einzelzellebene über die Durchflusszytometrie verifiziert. In Abb. 9B und Abb. 39 wurde auf Einzelzellniveau dargestellt, dass die wesentlichen IL-12 Produzenten nach einer mikrobiellen Stimulation durch die [MHC II(+)] Zellpopulation gebildet wurde (Trinchieri, 2003). Die [MHC II(+)/IL-12(+)] Zellpopulation blieb allerdings trotz steigender IL-15 Konzentrationen im Kulturmedium konstant (Abb. 42). Diese Ergebnisse zeigten keine Hinweise auf einen IL-15 induzierten Anstieg der IL-12 Produktion bei den Antigen-präsentierenden Zellen der RAG-1 Milzzellen. Die Abb. 41B zeigt demgegenüber deutlich ein

verstärktes intrazelluläres IFN- γ Signal bei der [NK1.1(+)/CD122(-)] Zellpopulation mit steigender IL-15 Konzentration (von ca. 3 % ohne Zusatz von IL-15 auf ca. 55 % mit Zusatz von 50 ng/ml IL-15 in dem dargestellten Experiment) nach einer HKL Stimulation.

Diese Beobachtungen zeigten keine Hinweise auf, dass IL-15 die [MHC II(+)] RAG-1 Milzzellen aktivierte, verstärkt IL-12 zu produzieren. Eine Verstärkung der IFN- γ Produktion durch IL-15 bei NK-Zellen konnte jedoch gezeigt werden. Die Abb. 41A zeigt, dass steigende IL-15 Konzentrationen ein Ansteigen der NK-Zellpopulation bei RAG-1 Milzzellen verursachten (von ca. 15% ohne Zusatz von IL-15 bis ca. 40 % mit Zusatz von 50 ng/ml zu dem Kulturmedium, Abb. 41A). In diesem Zusammenhang konnte beobachtet werden, dass die aufgrund ihrer Eigenschaften Größe und Granularität als Leukozyten eingegrenzte Population mit steigenden IL-15 Konzentrationen im Kulturmedium ebenfalls deutlich anstieg (Abb. 39). Dieser Effekt war eine Folge der gesteigerten Vitalität bei der NK-Zellpopulation (vergl. 3.8.1 und 3.8.2). Demgegenüber war mit steigender IL-15 Konzentration ein Anstieg der [MHC II(+)] Zellpopulation bei den mit HKL stimulierten Milzzellen nicht zu erkennen (Abb. 39 und Abb. 42). Dies war ein Hinweis darauf, dass IL-15 auf die Vitalität der Antigen-präsentierenden Zellen aus der RAG-1 Milz keinen Einfluss nahm, jedoch bei den NK-Zellen die Vitalität erhalten konnte.

Zusammenfassend ließen diese Beobachtungen den Schluss zu, dass IL-15 die [MHC II(+)] Zellpopulation (Antigen-präsentierende Zellen) nicht beeinflusste, weder zu einer verstärkten IL-12 Produktion nach einer mikrobiellen Stimulation noch zu einer verbesserten Vitalität.

Für die Übertragung von Zytokinsignalen in die Zielzelle sind die auf der Zielzelle exprimierten Rezeptoren essentiell. Ohteki und Coautoren behaupten, dass der *high affinity* IL-15 Rezeptor auf den Antigen-präsentierenden Zellen der Maus exprimiert wird und essentiell für die Entwicklung und funktionelle Reifung von DC und M Φ , sowie für die Regulation der IL-12 Produktion in der Maus ist. Sie untermauern diese Behauptung allein durch Literaturzitate und durch funktionale in vitro Tests. Sie zeigen aber keine durchflusszytometrischen Daten, dass u. a. das für die Signaltransduktion von IL-15 wichtige CD122 auf der Membran der von ihnen isolierten Antigen-präsentierenden Zellen, u. a. aus murinen RAG-2 Mäusen, tatsächlich exprimiert wird (Ohteki et al., 2001) Eine wichtige von den Autoren zitierte Literaturstelle bezieht sich auf Arbeiten von Fukao und Mitarbeitern. Sie zeigen bei aus C57BL/6 Mäusen isolierten DC die Amplifikation eines für die CD122 mRNA spezifischen Fragmentes. Sie können aber das Protein auf der Membranoberfläche dieser DC über die Durchflusszytometrie nicht nachweisen (Fukao[CT246] und Koyasu, 2000). Eigene

durchflusszytometrische Untersuchungen bei Milzzellen von RAG-1 Mäusen konnten darlegen, dass CD122 ausschließlich auf [NK1.1(+)] Zellen exprimiert wurde (vergl. Abb. 4F). Eine weitere wichtige Literaturstelle, die von Ohteki und Mitarbeiter in Bezug auf die Expression des IL-15 Rezeptors auf Antigen-präsentierenden Zellen zitiert wurde, bezieht sich auf frühe Arbeiten von Espinoza-Delgado. Die Autoren zeigen bei frisch isolierten, humanen Monozyten mit Hilfe der Durchflusszytometrie, dass diese CD122 konstitutiv auf der Membran exprimieren (Espinoza-Delgado et al., 1990). In diesem Fall scheint jedoch ein Unterschied zwischen murinen und humanen Antigen-präsentierenden Zellen zu bestehen. Daher konnte die vor allem bei Ohteki diskutierte aktivierende Wirkung von IL-15 auf IL-12 produzierenden Antigen-präsentierenden Zellen anhand der unter 3.8.3 dargestellten Beobachtungen nicht nachvollzogen werden.

Mestas und Hughes zeigen weitere Unterschiede zwischen dem humanen System und dem murinen System auf. Auf die Unterschiede bei murinen und humanen M Φ in bezug auf die mikrobiell induzierte RNI Produktion wurde in der Einleitung hingewiesen (vergl. 1.4.1). In ihrem Bericht bemängeln die Autoren die weit verbreitete Tendenz, diese Unterschiede zu ignorieren. (Mestas und Hughes, 2004). Hierbei ist die Gefahr von Fehlinterpretationen der Versuchsergebnisse sehr hoch.