

5 Zusammenfassung

Interferon gamma (IFN- γ) ist ein Zytokin von zentraler Bedeutung für die Regulation sowohl der natürlichen als auch der erworbenen Immunantwort. Seine Rolle wird dadurch unterstrichen, dass seine biologischen Funktionen nicht durch andere Mediatoren ersetzt werden können. Trotz seiner Bedeutung für die Immunantwort besteht Unklarheit über die Zellpopulationen, die wesentlich an der Produktion von IFN- γ in der frühen Phase der Infektabwehr beteiligt sind. Die Regulationsmechanismen der frühen IFN- γ Produktion sind ebenfalls nur unvollständig aufgeklärt und werden in der Literatur kontrovers diskutiert.

In dieser Arbeit wurde auf Einzelzellniveau mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen, dass NK-Zellen bei einer primären systemischen Infektion mit dem grampositiven, fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* bei T- und B-Zell-defizienten C57BL/6 rag-1^{-/-} (RAG-1) Mäusen und bei immunkompetenten C57BL/6 (WT) Mäusen die wesentliche Quelle für frühes IFN- γ darstellen. Spekulationen über die Rolle von Antigen-präsentierenden Zellen als wesentliche Produzenten für IFN- γ während der natürlichen Infektabwehr wurden hingegen nicht bestätigt. Bei infizierten immunkompetenten WT Mäusen wurden auch T-Zellen als Quelle für frühes IFN- γ identifiziert; CD8(+) zytotoxische T-Zellen zeigten hierbei ein stärkeres IFN- γ Signal als CD4(+) T Helferzellen.

Beobachtungen von verschiedenen Autoren, dass in der frühen Phase einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* NK-Zellen absterben und auch die T-Zellpopulationen abnehmen, wurden bestätigt. Behauptungen, dass Apoptose, im Gegensatz zu Nekrose, die Ursache für die Reduktion der Zellpopulationen sei, konnten hingegen nicht bestätigt werden.

Für die Regulation der frühen IFN- γ Produktion werden lösliche Mediatoren, in erster Linie Zytokine, diskutiert. Neben Interleukin 12 (IL-12) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) sind auch IL-2 und IL-15 als Faktoren beschrieben worden, die hierbei eine wichtige Rolle spielen. IL-2 und IL-15 binden an die signaltransduzierenden Komponenten des gleichen Rezeptors, obwohl sie selbst keine Homologien in der sie codierenden Nukleotid- oder ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Über Rezeptorkomponenten, wie die IL-2/IL-15R β -Kette (CD122), sind beide in der Lage, unter anderem NK-Zellen zu stimulieren.

Die Blockade der IL-2 oder IL-15 Bindung an CD122 mit Hilfe von Antikörpern zeigte, dass diese Ligand-Rezeptor Interaktion, zumindest in vitro, essentiell für die Vitalität ruhender, muriner NK-Zellen ist. Die gemeinsame Bindung an CD122 macht die zwischen diesen

Zytokinen beobachtete hohe Redundanz plausibel. Dennoch konnte hier gezeigt werden, dass zwischen beiden Zytokinen Unterschiede in ihrer Wirkung auf NK-Zellen bestehen. So war IL-15 viel effizienter in Lage, *in vitro* die Vitalität von ruhenden NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen aufrecht zu erhalten als IL-2 in vergleichbaren Konzentrationen.

Die Stimulation von RAG-1 Milzzellkulturen mit vitalen Listerien (VL) zeigte bei Coinkubation von NK-Zellen mit blockierenden anti-IL-15 Antikörpern eine Reduktion der intrazellulären IFN- γ Produktion. Vergleichbare Resultate erzielten auch Antikörper gegen IL-12 und TNF- α . Blockierende anti-IL-2 Antikörper blieben hingegen ohne Einfluss. Somit wurde die in der Literatur beschriebene zentrale Rolle für IL-2 bei der frühen IFN- γ Produktion nicht bestätigt.

CD122 ist als eine Rezeptorkomponente beschrieben, die unter anderem auf NK-Zellen konstitutiv exprimiert ist. Milzzellen sowohl von naiven als auch von *L. monocytogenes* infizierten RAG-1- und WT-Mäusen wurden für die intrazelluläre Zytokinanalyse mit Brefeldin A inkubiert, um eine Sekretion von Proteinen zu inhibieren. Diejenigen NK-Zellen aus infizierten Mäusen die daraufhin intrazelluläres IFN- γ vorwiesen, zeigten jedoch kein CD122 auf ihrer Oberfläche. Demgegenüber blieben NK-Zellen aus nicht infizierten Mäusen negativ für intrazelluläres IFN- γ und positiv für extrazelluläres CD122. Der gleiche Verlust von CD122 wurde auch auf NK-Zellen aus RAG-1 Milzzellkulturen entdeckt, die *in vitro* mit VL stimuliert worden waren. Wie oben beschrieben, erschien IL-15 als der wesentliche Auslöser einer von IFN- γ Produktion in diesem System. Entsprechend führte seine Bindung auch den Verlust von membranständigem CD122 auf NK-Zellen herbei. IL-2 schien in beiden Situationen keine Rolle zu spielen. Diese Beobachtung eröffnet die Möglichkeit, biologisch aktives IL-15 zu detektieren.

In vitro mit Hitze-getöteten *L. monocytogenes* (HKL) stimulierte RAG-1 Milzzellen zeigten eine zunehmende Produktion von IFN- γ der NK-Zellen in Abhängigkeit von der Menge an zugegebenem IL-15. Eine Zunahme der IL-12 Produktion durch Antigen-präsentierende Zellen als Reaktion auf das zugegebene IL-15 konnte hingegen weder im ELISA noch auf Einzelzellniveau im FACS nachgewiesen werden. Somit konnten Publikationen über eine indirekte Wirkung von IL-15 auf NK-Zellen, indem dieses erst in Antigen-präsentierenden Zellen NK-aktivierendes IL-12 induziert, nicht bestätigt werden. Nach den vorliegenden Daten wirkt IL-15 im Wesentlichen direkt auf NK-Zellen.

Summary

Interferon-gamma (IFN- γ) plays an essential role in regulating both innate and adaptive immune response. However, the major IFN- γ -producing cell populations in the early phase of microbial infections, the molecular mechanisms leading to their activation, and contradictory publications based on *in vitro* experiments are still a matter of intense debate. The work presented here aimed to clarify some of these aspects, especially to discern what might be *in vitro* artefacts or of minor importance from what is relevant to the *in vivo* situation.

For this, both immunocompetent C57BL/6 wild-type (WT) and immunodeficient C57BL/6 *rag-1*^{-/-} (RAG-1) mice were infected *i.v.* with facultative intracellular *Listeria monocytogenes* bacteria. At various time points ranging from 9 h to 29 h *p.i.*, individual spleen cells were analysed by flow cytometry (FACS-analysis) for characteristic surface markers and intracellular cytokines. In contrast to related protocols published by other groups, the splenic leukocytes cells were analysed directly and not restimulated *in vitro*.

All results clearly indicate that natural killer (NK) cells were the relevant IFN- γ producers in the early immune response to *L. monocytogenes* infection. Publications claiming antigen-presenting cells to be important IFN- γ producers could not be confirmed. In WT mice [CD3(+)] T cells, in majority coexpressing CD8, were the next largest leukocyte population to produce IFN- γ at given time points.

As also mentioned by others both the NK and the T cell populations tended to diminish early *p.i.*. The reason for this remains unclear. As we could find no clear indications for apoptosis, a transient redistribution of these cells within the animal offers an alternative explanation.

The regulation of innate IFN- γ production is another matter of debate, with either Interleukin-2 (IL-2), IL-12, IL-15, or tumour necrosis factor- α (TNF- α) proposed as the major IFN- γ -inducing cytokine. IL-2 and IL-15 use a common receptor and signal transducing components despite showing no homologies at the genomic or protein level. Accordingly, both cytokines display redundant functions, e.g. activating NK cells *in vitro*. Using blocking antibodies (Ab), we could show that one component of the IL-2/IL-15 receptor, the β -chain (CD122) is essential for maintaining viability of resting NK cells in culture. Further, the specific activity of recombinant IL-15 was much higher in this respect than recIL-2.

When stimulating RAG-1 spleen cells with viable *L. monocytogenes* (VL), in the presence of anti-IL-15 Ab, the IFN- γ production by NK cells was inhibited. Similar results were achieved

with anti-IL-12 and anti-TNF- α Ab, but not with anti-IL-2 Ab. These data indicate that IL-2 is not produced in relevant amounts under such circumstances and contradict publications claiming that IL-2 plays an important role also in innate immunity by inducing early IFN- γ . On the other hand, these results stress the importance of IL-15 in this respect.

CD122 is described as a general marker for murine NK cells that is constitutively expressed. To facilitate intracellular cytokine detection by FACS, protein secretion must be inhibited for some time using inhibitors such as Brefeldin A. We noticed that on all splenic NK cells from *L. monocytogenes*-infected RAG-1 or WT mice that contained intracellular IFN- γ CD122 could no longer be detected on their surface. In vitro experiments confirmed this finding. Although the exact mechanisms responsible for the loss of CD122 on IFN- γ -producing NK cells could not yet be uncovered, binding of IL-15 was found to be an essential element. Based on this phenomenon, a functional assay for IL-15 could be established.

Compared to viable *L. monocytogenes*, heat-killed bacteria (HKL) induced only little IFN- γ in RAG-1 spleen cell cultures. However, when adding recIL-15, IFN- γ production was strongly enhanced in a dose-dependent manner. Some authors speculate, that IL-15 acts on NK cells mainly indirectly by stimulating antigen presenting cells to release IL-12. As we could detect no concomitant IL-12 under these circumstances we conclude, that IL-15 activates NK cells directly.