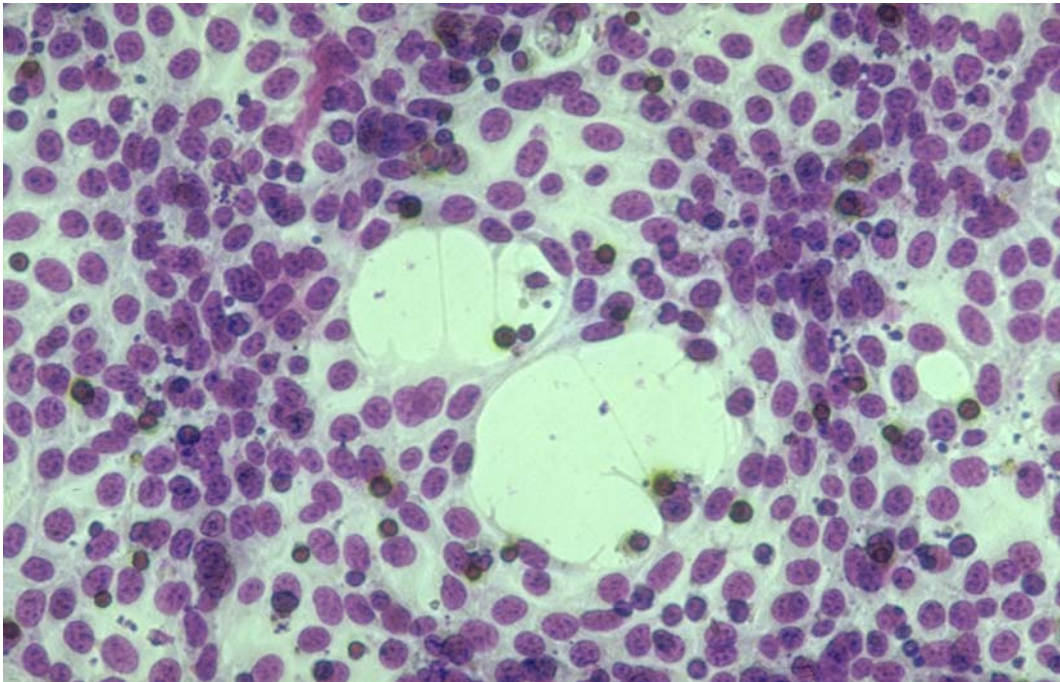


## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung des Versuchsansatzes

Alle Versuche zur Zytotoxizität von Peritonealzellen gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten (Abb. 1) wurden bisher in einem Makroansatz (in 2 ml Kunststoffröhrchen) durchgeführt (Peters 1997; Gerber 1999). Um für die weitergehende Analyse eine größere Anzahl von Versuchsgruppen zu ermöglichen und den Bedarf an Material und Versuchstieren zu begrenzen, musste ein miniaturisierter Versuchsansatz geschaffen werden.

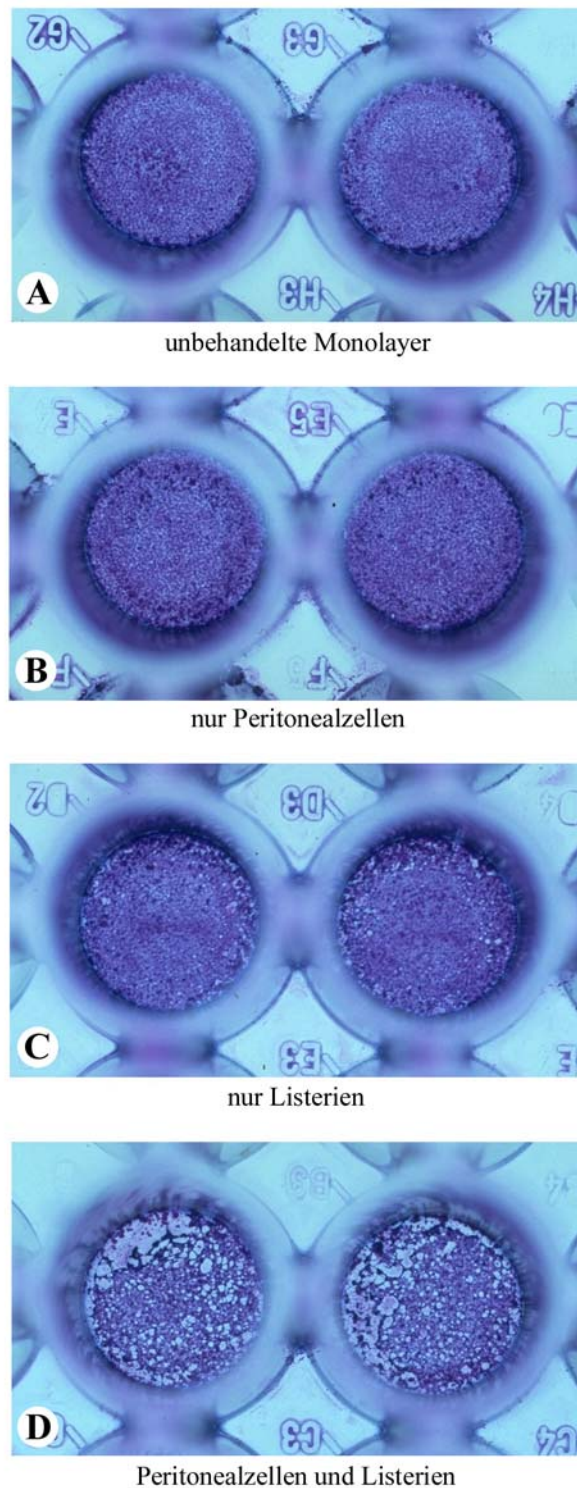


**Abbildung 1: Peritonealzellinduzierter Plaque in einem listerieninfizierten Hepatozytenmonolayer.** Listerieninfizierte Leberzellrasen wurden für 24 h mit Peritonealzellen ( $1 \times 10^5$  / Well) inkubiert und anschließend das Ausmaß der Läsionen (Plaques) bestimmt. Gezeigt ist ein nach Pappenheim gefärbter Monolayer (40x) mit einem typischen Plaque, entstanden durch den Adhärenzverlust der zugrundegegangenen Hepatozyten. Die läsionsbegrenzenden Leberzellen ziehen sich endothelartig aus und bilden lange Zytoplasmafortsätze. Neben den violetten Zellkernen der Leberzellen und den sich in ihrem Zytoplasma befindlichen Listerien sind die bräunlichen Nuclei der Peritonealleukozyten zu erkennen.

Hierzu boten sich 96-Well-Mikrotiterplatten an. Der Bedarf an Leber- und Peritonealzellen reduzierte sich dabei um circa Achtzig Prozent, wobei jeweils vier identische Versuchsansätze pro Versuchsgruppe durchgeführt werden konnten (Abb. 2).

Die bedeutendsten hierdurch bedingten Veränderungen bezogen sich auf die Erfassung und Auswertung der Versuchsergebnisse.

Die Quantifizierung der sich als Plaques darstellenden zytotoxischen Effekte wurde mit Hilfe bildverarbeitender Software (Adobe Photoshop™) durchgeführt.

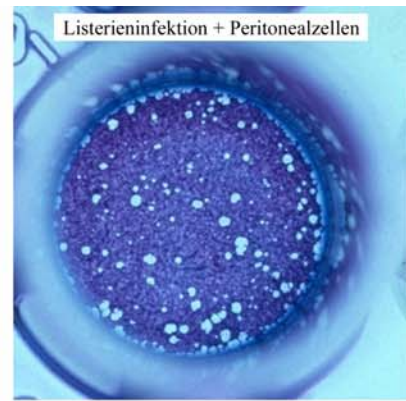
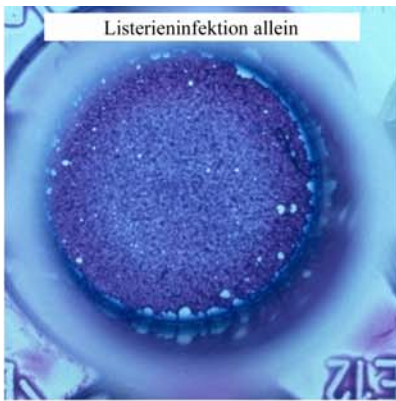


**Abbildung 2: Destruktion eines listerieninfizierten Monolayers durch Peritonealzellen naiver Mäuse.** Die Peritonealzellen wurden für 24 h mit listerieninfizierten Hepatozytenmonolayern in 96-Well-Milrotiterplatten inkubiert. Die Monolayer in den einzelnen Wells wurden bei Versuchsende mit Giemsa gefärbt, um das Ausmaß der Läsionen sichtbar zu machen. Nur bei Anwesenheit von Peritonealzellen und Listerien treten sichtbare Läsionen (D) auf. Unbehandelte Monolayer (A), Peritonealzellen alleine (B) sowie Listerien alleine (C) zeigten keine oder nur wenig Läsionen. Dargestellt sind Fotos von jeweils zwei Wells einer Versuchsgruppe.

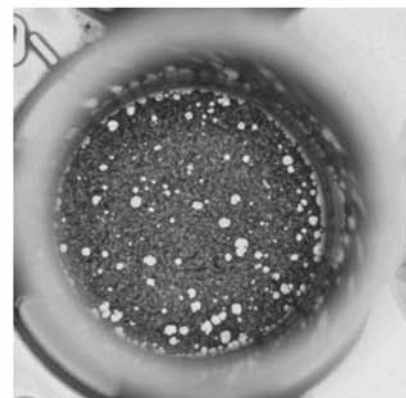
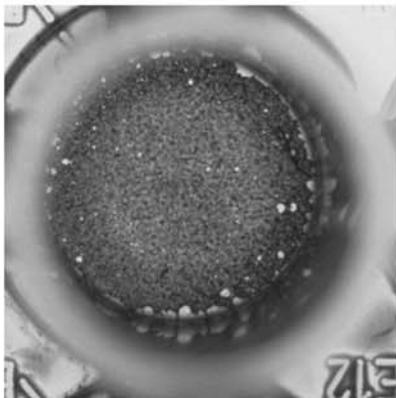
Zur Quantifizierung der Plaquebildung wurden die mit Giemsa gefärbten Monolayer fotografiert, die Abbildungen digitalisiert und mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogramms ausgewertet. Die Analyse nutzte die Tatsache, dass sich durch den Zelluntergang entstandene zellfreie Areale weiß, lebende adhärente Zellen dagegen blau darstellen.

Die Gesamtfläche entstandener Plaques stellte ein Maß für die zytotoxische Aktivität der eingesetzten Zellpopulation dar.

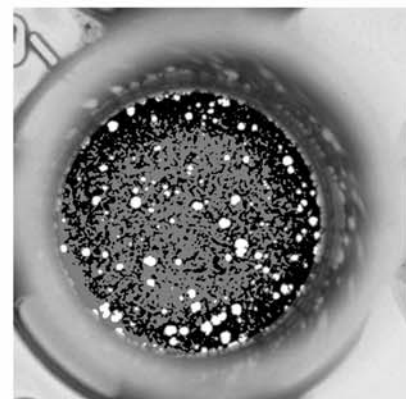
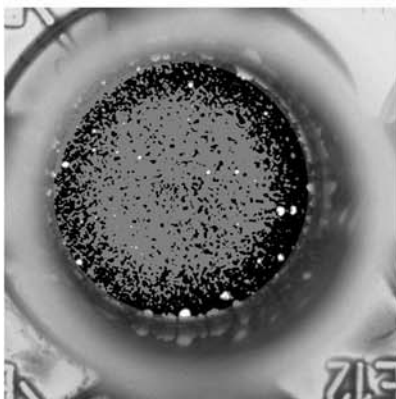
Zur besseren Vergleichbarkeit wurde die Plaquebildung in den Ansätzen mit listerieninfizierten Hepatozyten und nicht-fraktionierten Peritonealzellen (pos. Kontrolle) jeweils 100 % gesetzt. Eine Steigerung oder Verminderung der zytotoxischen Läsionen konnte so in Prozent dargestellt werden und wurde im folgenden als Plaqueindex bezeichnet (Abb. 3).



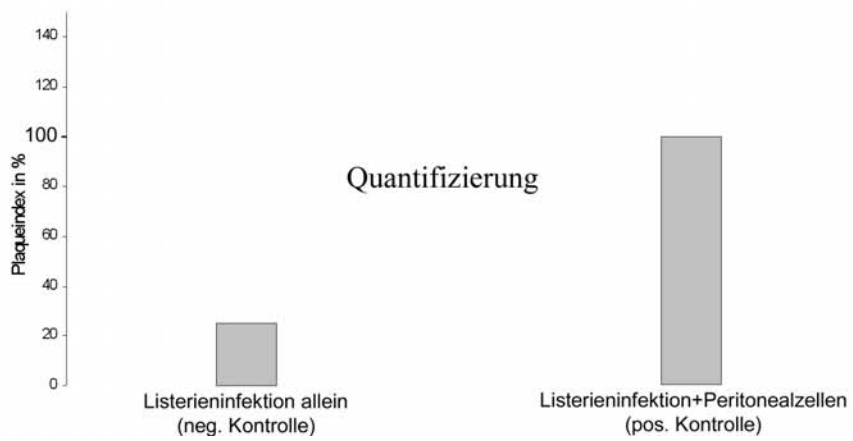
Dokumentation der gefärbten Monolayer



Schwarz-Weiß-Konversion



Tontrennung



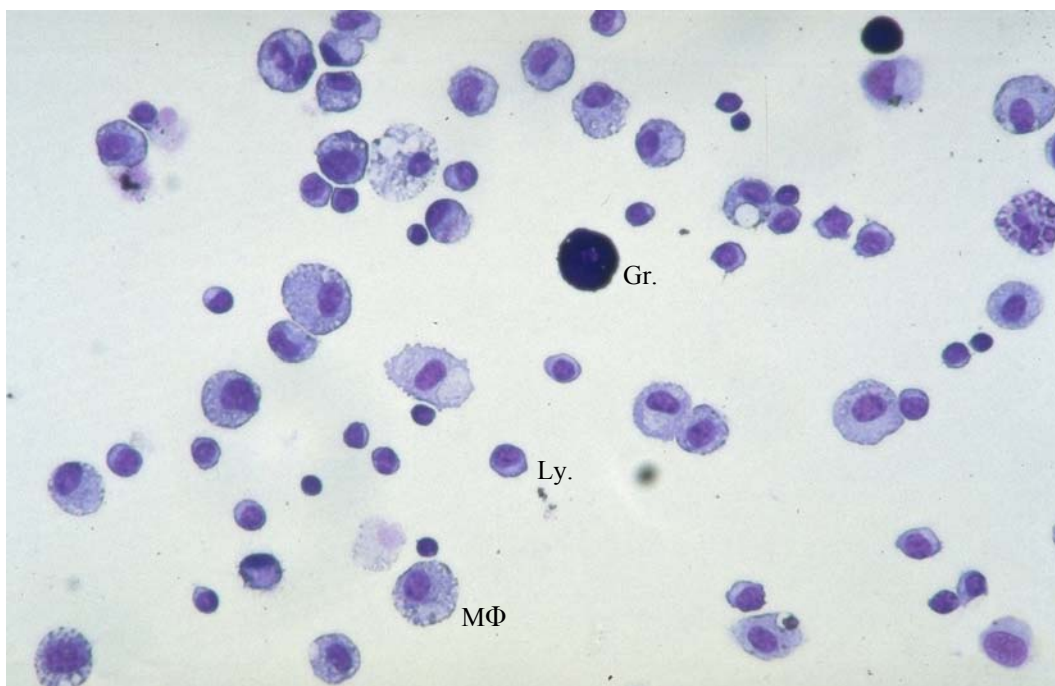
**Abbildung 3: Arbeitsschritte der Bildprozessierung und Bildanalyse zur Quantifizierung von Zeldefekten (Plaques) in Monolayern.** Die linke Seite zeigt listerieninfizierte Monolayer ohne Peritonealzellen (neg. Kontrolle). Auf der rechten Seite sind Defekte (Plaques) im infizierten Hepatozytenmonolayer erkennbar, hervorgerufen durch naive Peritonealleukozyten (pos. Kontrolle). Die dargestellten Arbeitsschritte leistet das Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop™ 5.5.

Ausgehend von dem dokumentierten, gefärbten Monolayer, wurde zu dessen Größenbestimmung ein Kreis mit bekannter Bildpunktzahl (Pixel) den Rändern des Monolayers angenähert. Im Anschluss an die Schwarz-Weiß-Konversion des Fotos wurden alle vorhandenen Grautöne in eine Drei-Tonskala mit den Farben Schwarz, Grau und Weiß (Tontrennung) eingeordnet. Plaques stellten sich nun hauptsächlich weiß und die intakten Leberzellareale hingegen grau und schwarz dar. Die Plaques können quantifiziert werden, da sie sich in ihrer Farbinformation von der Umgebung, d.h. den intakten Zellarealen unterscheiden. Nach der Auswahl des weißen Farbbereiches erfolgte die Bestimmung der Gesamtzahl der weißen Pixel und schließlich die Berechnung ihres relativen Anteils bezogen auf die zuvor ermittelte Größe des Monolayers (Quantifizierung). Zur übersichtlichen Darstellung wurden die Ergebnisse der Pixelberechnung auf die positive Kontrolle (infizierte Monolayer) bezogen und in Prozent dargestellt. Dies wurde im folgenden als Plaqueindex bezeichnet.

## 3.2 Analyse der zytotoxischen Aktivität naiver residenter Peritonealzellen

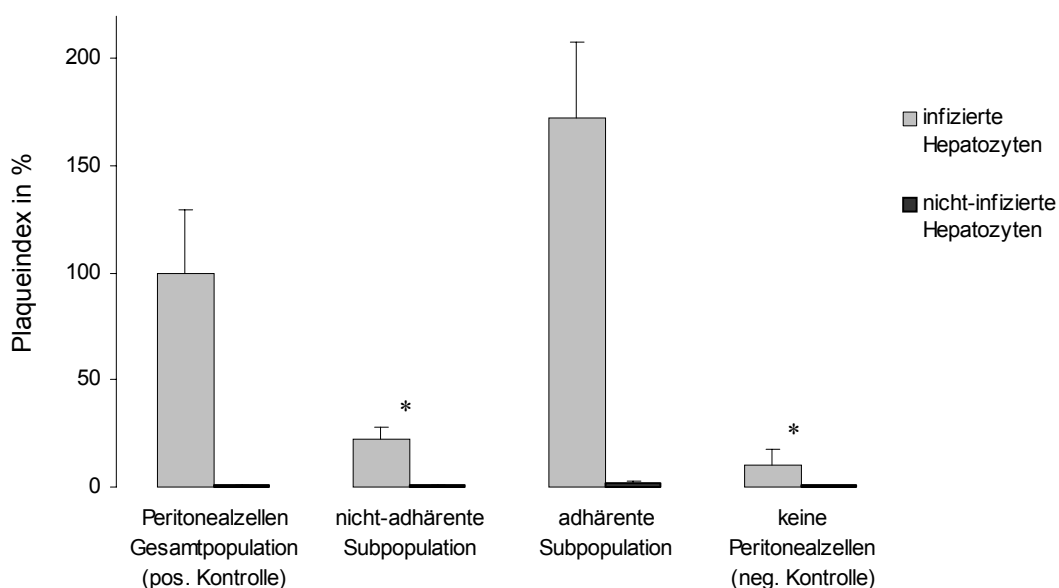
### 3.2.1 Die zytotoxische Aktivität naiver residenter Peritonealzellen gegen listerieninfizierte Hepatozyten beruht auf der adhärennten Zellfraktion

Um die in diesem Ansatz zytotoxisch aktive Zellpopulation zu identifizieren, wurde eine Fraktionierung der durch Peritoneallavage gewonnenen, naiven residenten Peritonealleukozyten (Abb. 4) durchgeführt. Hierzu wurde die unterschiedlich ausgeprägte Eigenschaft der Zellen, an Kunststoffoberflächen zu haften, genutzt (Kaufmann and Kabelitz 1998). Das Verfahren der Trennung mittels Adhärenz ist allgemein als Methode für die Depletion bzw. Anreicherung von Makrophagen anerkannt (Hori, Ehrke et al. 1987; Nelson, Parhar et al. 1990; Kaufmann and Kabelitz 1998).



**Abbildung 4: Peritonealzellen der Maus.** Für die Fraktionierung wurden residente Peritonealzellen eingesetzt. Die Gewinnung erfolgte durch Peritoneallavage der Bauchhöhle von naiven Tieren. Die Gesamtpopulation setzte sich aus 20,25 %  $\pm$  8,24 % Makrophagen (MΦ) / Monozyten, 79,75 %  $\pm$  8,25 % Lymphozyten (Ly.) und <1 % Granulozyten (Gr.) zusammen (ermittelt aus der Zählung von fünf Gesichtsfeldern bei 40x Vergrößerung von fünf Versuchen). Gezeigt ist ein repräsentativer Ausschnitt eines Zytospins der Peritonealzellpopulation naiver Tiere, Färbung nach Pappenheim (40x).

Die zytotoxische Aktivität adhärenter Zellen war signifikant höher als die in gleicher Zellzahl eingesetzte nicht-adhärenente Population (Abb. 5).

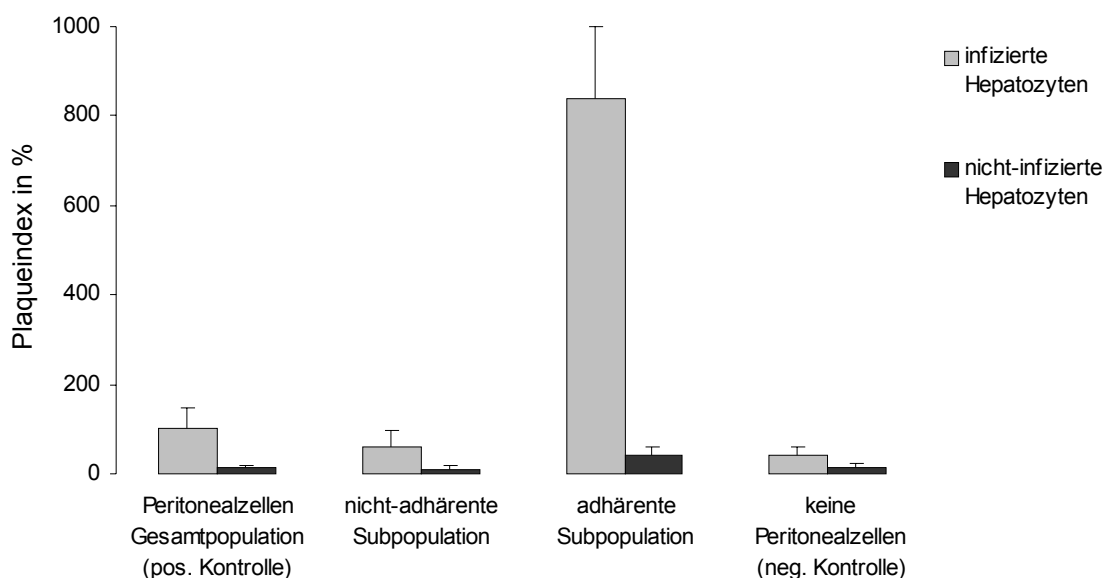


**Abbildung 5: Vergleich der zytotoxischen Potenz verschiedener Peritonealzellsubpopulationen.** Als Zielzellen dienten listerieninfizierte und nicht-infizierte Hepatozyten. Die adhärenente Zellpopulation ( $1 \times 10^5$  Zellen / Well) wurde durch 3 h Inkubation der Peritonealzell-Gesamtpopulation auf einer Kunststoffoberfläche gewonnen; bei der nicht-adhärenente Population ( $1 \times 10^5$  / Well) handelt es sich um Zellen des entsprechenden Überstandes. Die Kulturen wurden für 24 h inkubiert. Als neg. Kontrolle dienten Monolayer ohne Peritonealzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von Quadruplikaten. \* $p < 0,05$ , bezogen auf die pos. Kontrolle.



Um diesen Befund abzusichern sowie die Vermutung zu überprüfen, dass die zytotoxische Aktivität von Peritonealzellen von adhären Zellen vermittelt wird, wurde die nicht-adhären Zellenpopulation in einer 40x höheren Zellkonzentration im Vergleich zur adhären Population eingesetzt.

Selbst unter diesen Bedingungen wurde die zytotoxische Aktivität ganz überwiegend in der adhären Population beobachtet (Abb. 6).

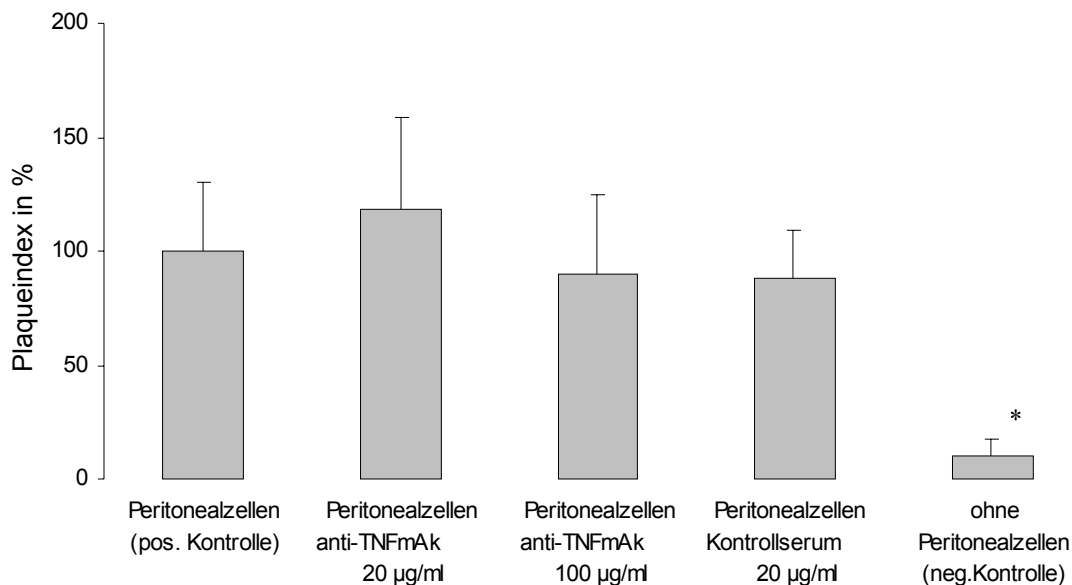


**Abbildung 6: Vergleich der zytotoxischen Potenz verschiedener Peritonealzellsubpopulationen in unterschiedlichen Zellzahlen.** Als Zielzellen dienten listerieninfizierte und nicht-infizierte Hepatozyten. Die adhären Zellenpopulation ( $1 \times 10^4$  Zellen / Well) wurde durch 3 h Inkubation der Peritonealzellgesamtpopulation auf einer Kunststoffoberfläche gewonnen; bei der nicht-adhären Population ( $4 \times 10^5$  / Well) handelt es sich um Zellen des entsprechenden Überstandes. Die Zellzahl der Gesamtpopulation betrug  $1 \times 10^5$  / Well. Als neg. Kontrolle dienten Monolayer ohne Peritonealzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von Quadruplikaten.

### 3.2.2 TNF- $\alpha$ ist *nicht* essentiell für die zytotoxische Aktivität

Um die Rolle von Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ) bei der Vermittlung der zytotoxischen Aktivität der Peritonealzellen zu untersuchen, wurde die Wirkung von TNF- $\alpha$  mit einem monoklonalen Antikörper (anti-TNF- $\alpha$  mAk) gehemmt.

Es zeigte sich, dass neutralisierende anti-TNF- $\alpha$  mAk keinen Einfluss auf die Plaquebildung hatten (Abb. 7).

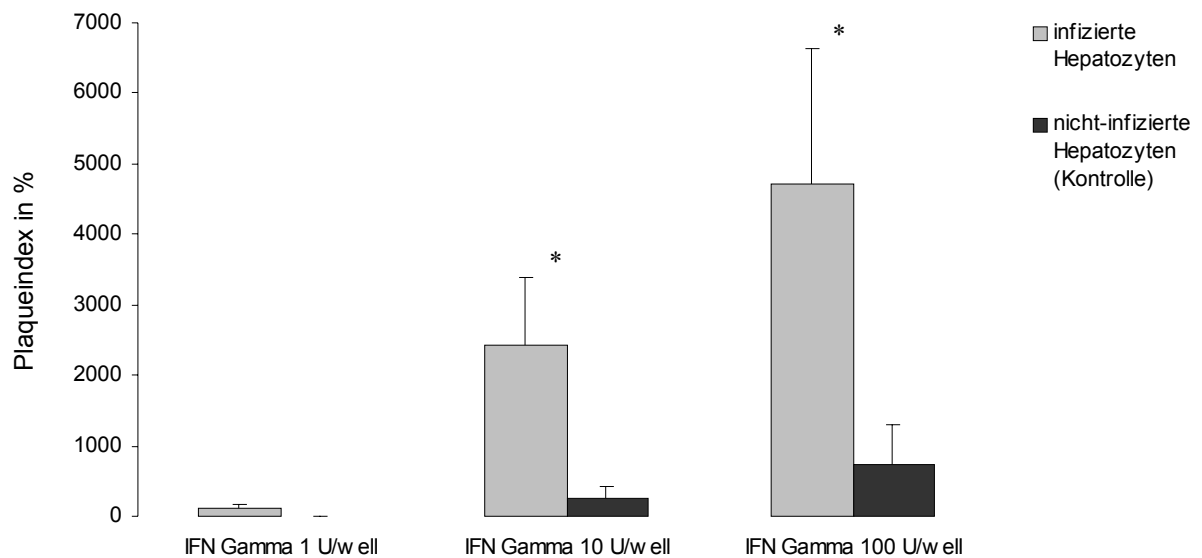


**Abbildung 7: Beteiligung von TNF- $\alpha$  an der Zytotoxizität von Peritonealzellen gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten.** Peritonealzellen ( $1 \times 10^5$  / Well) wurden für 24 h mit listerieninfizierten Hepatozyten inkubiert. Eine mögliche TNF- $\alpha$ -vermittelte Zytotoxizität wurde mit TNF- $\alpha$ -Antikörpern (anti-TNFmAk) in den angegebenen Konzentrationen gehemmt. Als Kontrolle diente ein unspezifisches Serum der gleichen Spezies bzw. Monolayer ohne Peritonealzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von Quadruplikaten. Das Ergebnis konnte in einem zweiten Versuch bestätigt werden. \* $p < 0,05$ , bezogen auf die pos. Kontrolle.

### 3.2.3 IFN- $\gamma$ steigert die zytotoxische Aktivität

Um die Bedeutung von IFN- $\gamma$  für die zytotoxische Aktivität der Peritonealzellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit verschiedenen Dosen rIFN- $\gamma$  kokultiviert.

Die zytotoxische Aktivität der Peritonealzellen ließ sich konzentrationsabhängig mit rIFN- $\gamma$  steigern, konnte aber auch in diesen Versuchen nur dann beobachtet werden, wenn die Hepatozyten mit Listerien infiziert waren (Abb. 8).

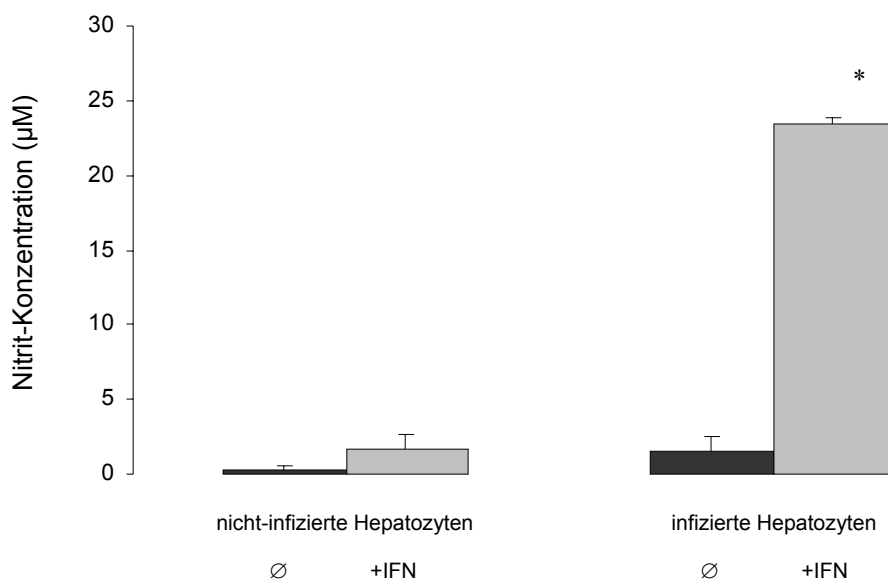


**Abbildung 8: Dosisabhängigkeit der IFN- $\gamma$ -vermittelten Steigerung der zytotoxischen Potenz von Peritonealzellen.** Peritonealzellen wurden für 30 h mit listerieninfizierten Hepatozyten inkubiert und gleichzeitig mit unterschiedlichen Dosen rIFN- $\gamma$  stimuliert. Als Kontrolle dienten IFN- $\gamma$ -stimulierte Peritonealzellen auf nicht-infizierten Monolayern. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD von Quadruplikaten. \* $p < 0,05$ , bezogen auf IFN 1 U / Well.

### 3.2.4 IFN- $\gamma$ -stimulierte Peritonealzellen produzieren Stickstoffmonoxid in Kokultur mit listerieninfizierten Hepatozyten

Um eine mögliche Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) an dem IFN- $\gamma$ -abhängigen Effekt auf die Plaquebildung zu untersuchen, wurde die Konzentration von Nitrit im Überstand bestimmt. Nitrit entsteht aus NO, dem Produkt der IFN- $\gamma$ -regulierten NO-Synthese (Abb. 9).

Die Messung ergab, dass eine signifikante NO-Bildung nur in Kokulturen mit listerieninfizierten Hepatozyten stattfand. Eine IFN- $\gamma$ -Stimulation von Peritonealzellen in Kokultur mit nicht-infizierten Hepatozyten ließ keine Stickstoffmonoxidbildung erkennen.

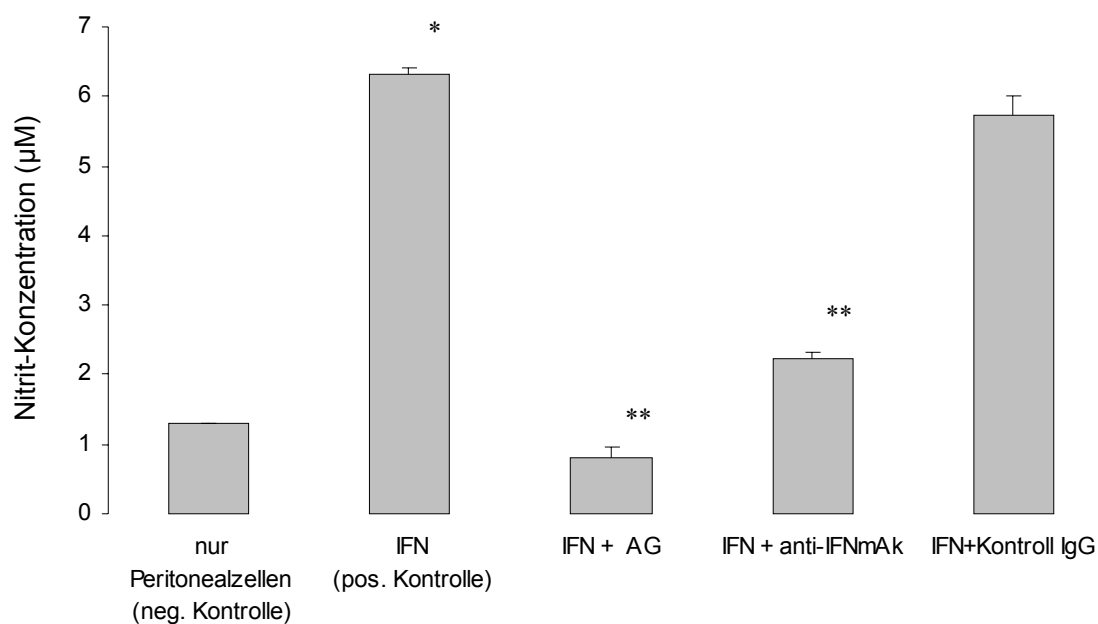


**Abbildung 9: IFN- $\gamma$ -abhängige NO-Produktion in Kokulturen von Peritonealzellen und Hepatozyten.** Peritonealzellen ( $2 \times 10^5$  / Well) wurden für 48 h mit Hepatozyten inkubiert und anschließend die NO-Produktion mittels der Griess-Reaktion (Nitritbestimmung) gemessen. Als Kontrolle ( $\emptyset$ ) dienten Monolayer ohne IFN- $\gamma$ -Stimulation. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei parallelen Messungen von gepoolten Überständen aus jeweils vier Wells. Das dargestellte Ergebnis konnte in einem zweiten Versuch reproduziert werden. \* $p < 0,0001$ , bezogen auf infizierte Kulturen ohne IFN- $\gamma$  Stimulation.

### 3.2.5 Die IFN- $\gamma$ -induzierte NO-Produktion ist durch Aminoguanidin hemmbar

Um die Bedeutung der NO-Produktion für die zytotoxische Aktivität näher zu untersuchen, wurden die Kokulturen von listerieninfizierten Hepatozyten und Peritonealzellen mit dem selektiven Antagonisten der NO-Synthase Aminoguanidin inkubiert und anschließend die Stickstoffmonoxidbildung bestimmt. Parallel wurde untersucht, ob die NO-Synthese mit anti-IFN- $\gamma$  mAk hemmbar ist.

Es wurde deutlich, dass sowohl der NO-Synthasehemmer Aminoguanidin als auch blockierende IFN- $\gamma$ -Antikörper die Stickstoffmonoxidbildung deutlich hemmten (Abb. 10).



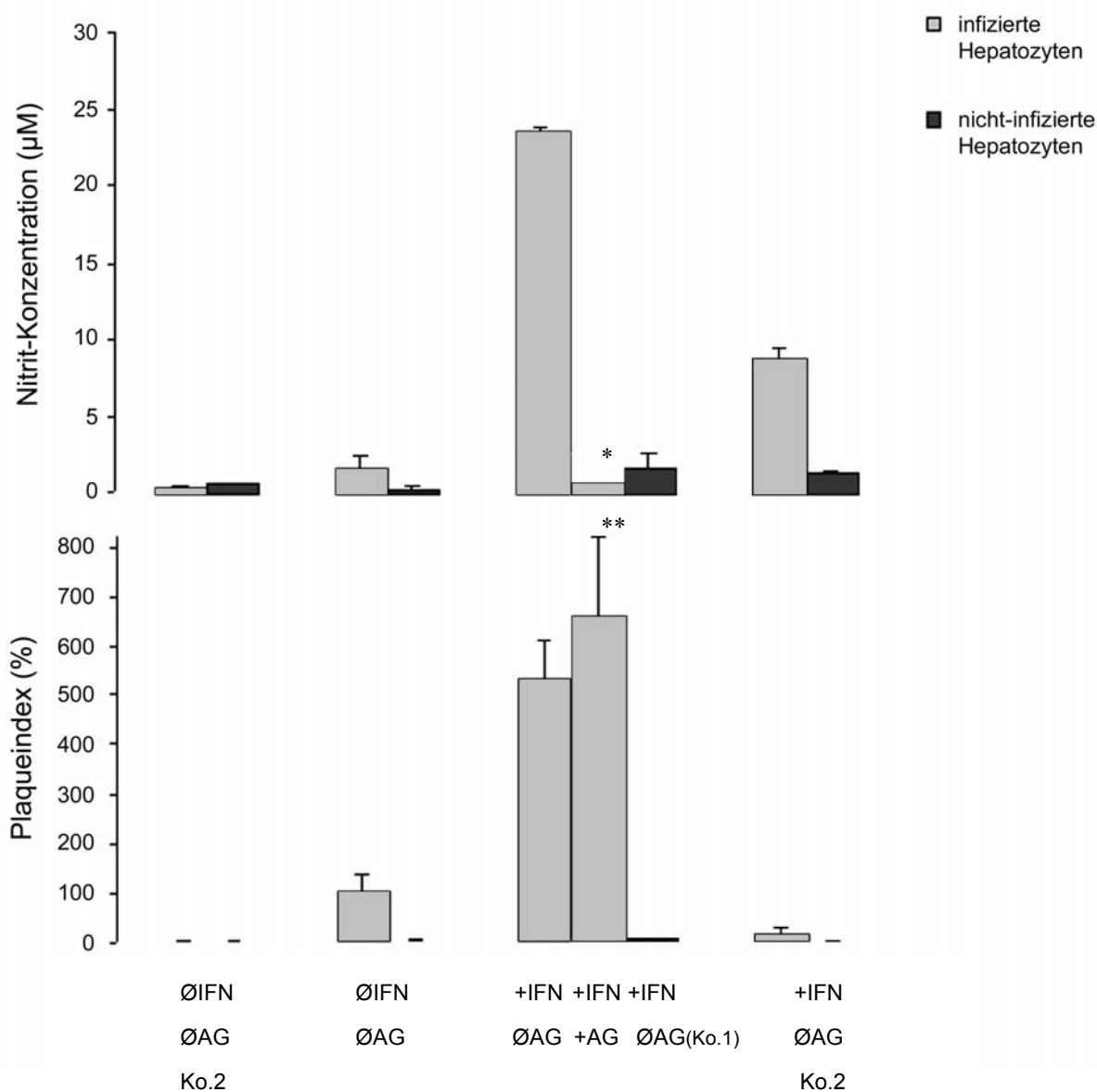
**Abbildung 10: Effekt von Aminoguanidin auf die IFN- $\gamma$ -induzierte NO-Produktion.** Peritonealzellen ( $2 \times 10^5$  / Well) wurden für 48 h mit listerieninfizierten Hepatozyten inkubiert und mit IFN- $\gamma$  (100 U / Well) stimuliert. Zur Hemmung der NO-Synthese wurde Aminoguanidin (AG, 5 mM) hinzugegeben. Die IFN- $\gamma$ -Effekte wurden mit IFN- $\gamma$ -Antikörpern (anti-IFNmAk, 1  $\mu$ g / Well) antagonisiert. Als Kontrollserum wurden Immunglobuline (IgG, 5  $\mu$ g / Well) von der Ziege benutzt. Die NO-Konzentration im Überstand wurde mit Hilfe der Griess-Reaktion (Nitritmessung) bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei parallelen Messungen von gepoolten Überständen aus jeweils vier Wells. \* $p < 0,001$ , bezogen auf die neg. Kontrolle; \*\* $p < 0,0001$ , bezogen auf die pos. Kontrolle.

### 3.2.6 Die zytotoxische Aktivität ist von der NO-Konzentration dissoziierbar

Wie unter Punkt 3.2.3 gezeigt, konnte die zytotoxische Potenz von Peritonealzellen gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten mit IFN- $\gamma$  gesteigert werden. Die Zugabe von IFN- $\gamma$  ist außerdem verbunden mit der Bildung von Stickstoffmonoxid (3.2.4).

Um zu untersuchen, ob die Hemmung der IFN- $\gamma$ -induzierten Stickstoffmonoxidproduktion mittels Aminoguanidin auch zu einer Hemmung der zytotoxischen Potenz von Peritonealzellen gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten führt, wurde parallel der Plaqueindex bestimmt.

Es zeigte sich, dass es trotz vollständiger Hemmung der NO-Produktion nicht zu einer Reduktion der Plaquebildung durch IFN- $\gamma$ -stimulierte Peritonealzellen kam. Zusätzlich wurde deutlich, dass auch IFN- $\gamma$ -stimulierte und listerieninfizierte Hepatozyten selbst einen geringen Anteil Stickstoffmonoxid bildeten, ohne dass Peritonealzellen anwesend waren und ohne dass die Monolayer Läsionen aufwiesen (Abb. 11).

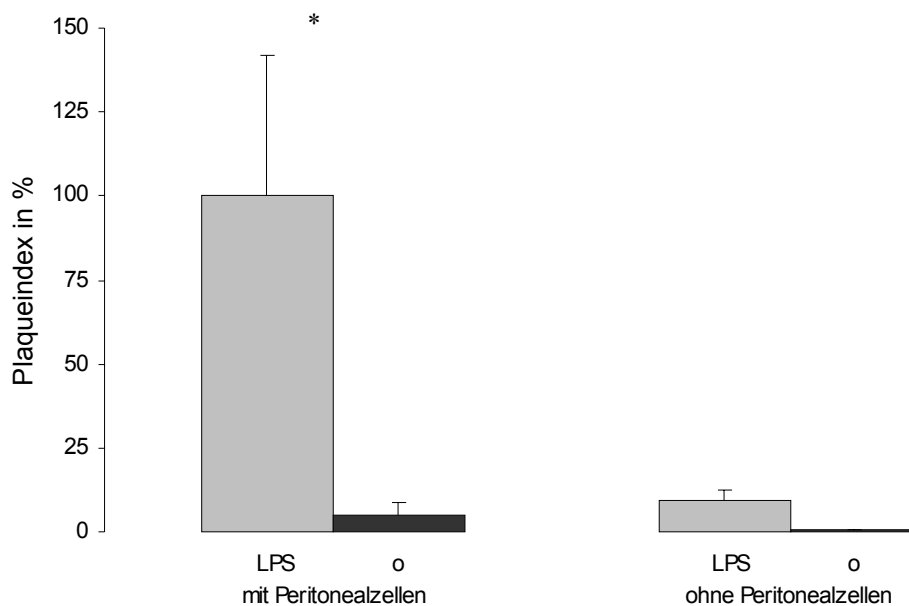


**Abbildung 11: Effekt von Aminoguanidin auf die IFN- $\gamma$ -induzierte NO-Produktion und die zytotoxische Potenz von Peritonealzellen.** Peritonealzellen wurden über 24 h mit listerieninfizierten Hepatozyten inkubiert und mit IFN- $\gamma$  (+IFN, 100 U / Well) stimuliert. Gleichzeitig wurde die NO-Bildung mit Aminoguanidin (+AG, 5 mM) gehemmt. Anschließend wurden die Läsionen im Monolayer (Plaqueindex) und die NO-Bildung mittels der Griess-Reaktion (Nitritmessung) bestimmt. Als Kontrollen dienten IFN- $\gamma$ -stimulierte Peritonealzellen auf nicht-infizierten Monolayern (Ko.1) sowie Kulturen ohne Peritonealzellen (Ko.2). Aminoguanidin alleine war nicht toxisch für Hepatozyten. Bezüglich der NO-Messung handelt es sich um die Mittelwerte  $\pm$  SD von Dreifachmessungen von gepoolten Überständen aus jeweils vier Wells. Hinsichtlich der Plaqueindices (Zytotoxizität) sind Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils vier Wells dargestellt. \* $p < 0,0001$  (signifikante Hemmung der NO-Bildung mit AG); \*\**nicht* signifikante Veränderung der Peritonealzellzytotoxizität durch AG.

### 3.2.7 Effekte von Lipopolysaccharid

Um zu untersuchen, ob an Stelle der intrazellulär vitalen Listerien auch Zellmembranbestandteile von Bakterien geeignet sind, die zytotoxische Aktivität von Peritonealzellen gegenüber Hepatozyten zu induzieren, wurden die Zellen mit dem bekanntermaßen Makrophagen-stimulierenden Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien inkubiert.

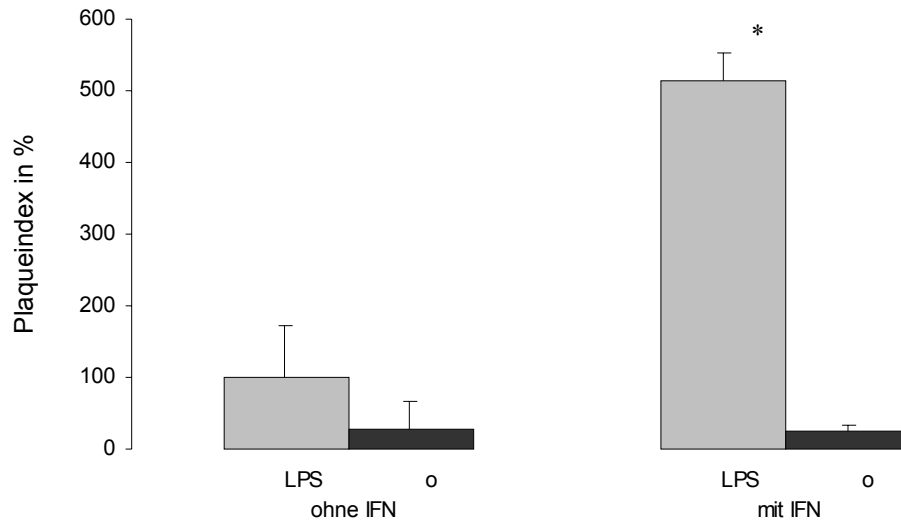
Es ließ sich zeigen, dass auch bei Verwendung von LPS Läsionen im Monolayer auftraten (Abb. 12).



**Abbildung 12: LPS als sensibilisierendes Agens für Peritonealzell-Leberzell-Kokulturen.** Peritonealzellen ( $1,6 \times 10^5$  / Well) und Hepatozyten wurden simultan mit oder ohne (o) LPS ( $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) über 36 h inkubiert und anschließend das Ausmaß der Leberzellschädigung (Plaqueindex) bestimmt. Als Kontrolle dienten Monolayer ohne Peritonealzellen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von vier Wells. Das gezeigte Ergebnis konnte in einem zweiten Versuch reproduziert werden. \* $p < 0,05$ , bezogen auf nicht-LPS-stimulierte Kulturen.



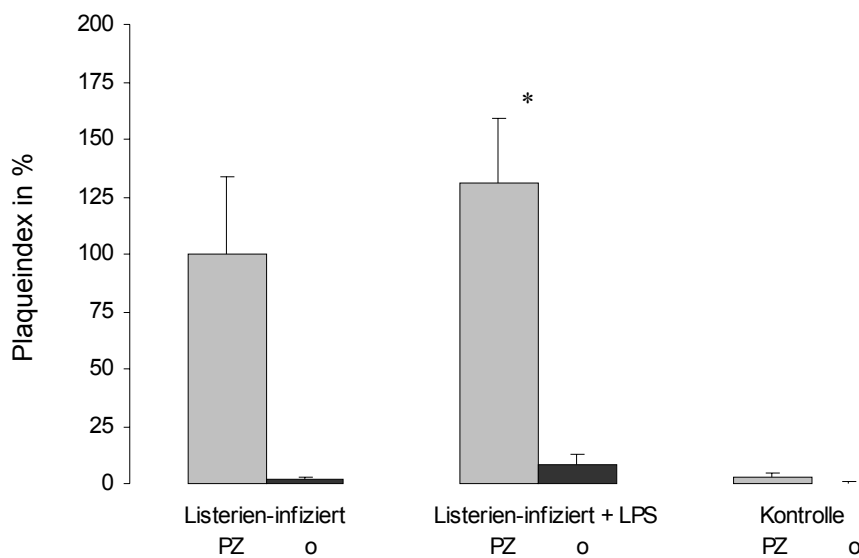
Auch unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich eine deutliche Steigerung der zytotoxischen Aktivität von Peritonealzellen durch Zugabe von rIFN- $\gamma$ . (Abb. 13).



**Abbildung 13: Stimulierbarkeit der Zytotoxizität von Peritonealzellen in LPS-sensibilisierten Kulturen mit IFN- $\gamma$ .** Peritonealzellen ( $2 \times 10^5$  / Well) wurden über 24 h zusammen mit nicht-infizierten Hepatozyten mit oder ohne (o) LPS ( $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) inkubiert und gleichzeitig mit IFN- $\gamma$  ( $100 \text{ U} / \text{Well}$ ) stimuliert. Als Kontrolle dienten nicht-IFN- $\gamma$ -stimulierte Ansätze. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von jeweils vier Wells. \* $p < 0,05$ , bezogen auf nicht-IFN- $\gamma$ -stimulierte Kulturen.

Um zu untersuchen, ob sich der durch LPS und Listerien induzierte zytotoxische Effekt addiert, wenn zusätzlich zur Listerieninfektion mit LPS stimuliert wird, wurden die Kokulturen beiden Stimuli ausgesetzt.

Die Analyse ergab, dass sich die zytotoxische Aktivität der Peritonealzellen gegenüber listerieninfizierten *nicht* signifikant ( $p=0,4$ ) steigern ließ, wenn die infizierten Kokulturen zusätzlich mit LPS behandelt werden (Abb. 14).



**Abbildung 14: Einfluß von LPS auf Kokulturen von Peritonealzellen und listerieninfizierte Hepatozyten.** Peritonealzellen (PZ,  $2 \times 10^5$  / Well) wurden für 40 h mit listerieninfizierten Hepatozyten inkubiert und die Kulturen zusätzlich mit Lipopolysacchariden (LPS,  $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ ) stimuliert. Als Kontrolle dienten sowohl nicht-infizierte Monolayer als auch jeweils Hepatozytenmonolayer ohne Peritonealzellen (o). Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von Triplikaten. \* $p=0,4$ , *nicht* signifikant, bezogen auf infizierte Kulturen ohne LPS-Stimulation.