

**Aus der Universitätsklinik
für Anaesthesiologie und Transfusionsmedizin Tübingen
Abteilung Transfusionsmedizin ZKT
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. Northoff**

**Zytolyse von
Legionella pneumophila-infizierten Monozyten
durch natürliche Killerzellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Agnieszka Anna Ograbek
aus
Lodz/Polen
2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. B. Neumeister
2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. U. Schuhmacher

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	Historischer Hintergrund	1
1.2	Epidemiologie	2
1.3	Pathogenität, Virulenz	3
1.4	Klinik	5
1.5	Diagnose	5
1.6	Therapie	6
1.7	Immunität	7
1.8	Natürliche Killerzellen	10
1.9	MHC-Klasse-I-Komplex	12
1.10	Versuchsziel	15
1.10.1	EXPRESSION VON MHC-KLASSE-I AUF INFIZIERTEN MM6-ZELLEN	16
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	17
2.1	Material	17
2.1.1	CHEMIKALIEN, REAGENZIEN, HILFSSTOFFE	17
2.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	18
2.1.3	GERÄTE, TECHNISCHE HILFSMITTEL	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	ZELLISOLATION	19
2.2.2	ZELLKULTUR	22
2.2.3	BAKTERIENKULTUR	22
2.2.4	INFEKTION	23
2.2.5	51CR- MARKIERUNG	24
3	<u>ERGEBNISSE</u>	29
3.1	Vorversuche	29
3.1.1	MONOZYTEN	29

3.1.2	K562	35
3.2	Messungen	38
3.2.1	1:1 INFEKTION	38
3.2.2	10:1 INFEKTION	47
4	<u>DISKUSSION</u>	52
5	<u>AUSBLICK</u>	58
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	59
7	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	61
8	<u>DANKSAGUNG</u>	74
9	<u>LEBENS LAUF</u>	76

1 EINLEITUNG

1.1 Historischer Hintergrund

Die Legionärskrankheit trat zum ersten Mal im Juni 1976 während einer Versammlung der amerikanischen Legion in Erscheinung. Das Treffen, an dem 4400 Veteranen teilnahmen, fand in einer Hotelanlage in Philadelphia statt. Innerhalb weniger Tage führte die typische Symptomatik in Form von trockenem unproduktiver Husten und Fieber zur stationären Einweisung von 221 Mitgliedern der Vereinigung und schließlich zum Tod von 34 Menschen.

Die Krankheit erhielt aufgrund der Umstände den Namen „Legionärerkrankung“ (*legionaires' disease*) bzw. „Veteranenerkrankung“.

Innerhalb von nur sechs Monaten gelang es dem *Center for Disease Control* (CDC) in Atlanta den Erreger zu identifizieren. Als hilfreich erwies sich hierbei die Methode der Rickettsienzüchtung, bei der der Erregernachweis durch Kultivierung in der Gewebekultur, dem Hühnerembryo oder im Versuchstier erfolgt. Im Gegensatz zum Erreger konnte die Quelle der Infektion nicht identifiziert werden.

Nach der Situation seines Ausbruchs und seiner Symptome wurde das Bakterium *Legionella (L.) pneumophila* benannt. Aus den gewonnenen Informationen konnten anhand von eingefrorenen Patientenserum retrospektiv frühere Ausbrüche von *L. pneumophila* Infektionen serologisch nachgewiesen werden. Im Jahr 1968 erkrankten Besucher des Gesundheitsamtes der Stadt Pontiac (Michigan/USA) an einer leichteren Form der Infektion. Sie machte sich durch grippeähnliche Symptome der oberen Luftwege bemerkbar und verlief in keinem der Fälle letal. Seit diesem Vorfall wird diese Form der Erkrankung als Pontiac-Fieber bezeichnet ¹.

Als es gelang, Legionellen problemlos auf synthetischen Agarnährböden anzuzüchten, wurden immer mehr Spezies dieser Gattung sowohl aus Patientenproben als auch aus Umweltmaterial isoliert und charakterisiert. Es wird allgemein

angenommen, dass in Zukunft weitere Legionellen-Spezies beschrieben werden und die Gattung ein Ausmaß ähnlich dem der Salmonellen erreichen wird^{2,3}.

1.2 Epidemiologie

Legionella pneumophila wird für 4-20 % aller ambulant erworbenen Pneumonien verantwortlich gemacht⁴. Die jeweiligen Ausbrüche konnten auf eine Vielzahl von Infektionsquellen zurückverfolgt werden. Dazu gehören Kühltürme, Schwimmbäder, Eismaschinen, Springbrunnen und Duschen. Gemeinsames Kennzeichen aller Infektionsquellen ist die Bildung von Aerosolen, die den Transport des Erregers in die tiefen Lungenbereiche ermöglichen. Eine direkte Übertragung von Mensch zu Mensch konnte dagegen nicht beobachtet werden⁵. In einer Studie der Heißwassersysteme im Südosten Deutschlands wurde *Legionella* in 68 % der Krankenhäuser, 50 % der Arztpraxen, 58 % der Zahnarztpraxen, 85 % der öffentlichen Gebäude und 65 % der Privathaushalte isoliert. Die Konzentration lag in den meisten Fällen unter 100^{-1} ml⁶. Gründe für die Persistenz des Bakteriums in den Wassersystemen sind seine Resistenz gegenüber Maßnahmen der Abwässerklärung und die außergewöhnlich gute Überlebensfähigkeit bei Temperaturen zwischen 5°C und 65°C⁷.

Ökologische Studien haben gezeigt, dass zum Überleben außerhalb des Wirtes Mensch Protozoen gebraucht werden⁸. *Legionella* kann als deren Parasit fungieren, was unweigerlich zum Untergang des Wirtes führt⁹ oder sie kann den Amöben selbst als Futterquelle dienen¹⁰. In den meisten Fällen überlebt und vermehrt sich das Bakterium innerhalb der Vakuolen des Einzellers. Die Replikation in Protozoen ist nötig, um Bakterien zu generieren, die in der Lage sind in der Umwelt zu persistieren und Säugetierzellen zu infizieren^{11,12}. Der Aufnahmemechanismus von *L. pneumophila* durch *Acanthamoeba castellanii* („coi-

ling phagocytosis“) und die Hemmung der Fusion des Phagosoms mit lysosomalen Vakuolen innerhalb der Amöbe kann in ähnlicher Weise auch beim Menschen beobachtet werden ^{13,14}.

1.3 Pathogenität, Virulenz

Die 40 bisher identifizierten Spezies unterscheiden sich deutlich in ihrer Virulenz, wobei weniger als die Hälfte für eine Erkrankung beim Menschen verantwortlich gemacht werden kann. Etwa 85 % der Fälle werden durch *L. pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 ausgelöst, gefolgt von *L. pneumophila* Sg 6 (10 %) und *L. micdadei* (5 %) ¹⁵. Zugang zum Makrophagen erhält das Pathogen höchstwahrscheinlich durch eine vom endoplasmatischen Retikulum (ER) vermittelte Phagozytose. Die Verbindung des ER mit dem Plasmalemm des Makrophagen ermöglicht die Formation einer Phagosomenmembran und ist für die Bildung von Phagolysosomen auch darüber hinaus noch von Bedeutung. Diese ER-vermittelte Phagozytose wird bei der Internalisierung von intrazellulären Pathogenen unabhängig von ihrem weiteren Weg in der Wirtszelle beobachtet ¹⁶. In einem signifikanten Anteil der autophagosomalen Vakuolen (18 h nach Infektion) finden sich lysosomale Marker wie LAMP1 (*lysosomal-associated membrane protein 1*) und Cathepsin D und der durchschnittliche pH-Wert sinkt auf 5.6. Diese Ergebnisse stimmen mit der Beobachtung überein, dass intrazellulär replizierende Bakterien Säureresistenz zeigen. Die Grundlagen dafür werden höchstwahrscheinlich bereits während der Stunden nach der Infektion gelegt, wenn das Bakterium von dem endozytischen Pfad des Makrophagen noch isoliert ist. Es kommt zur Induktion von Faktoren, die ein Überleben in der feindseligen Umgebung ermöglichen ^{17,18}.

L. pneumophila ist in der Lage seine Genexpression zu modulieren und diverse Gene als Antwort auf spezifische Stimuli zu exprimieren. Der wahrscheinlich

wichtigste Stimulus ist die limitierte Verfügbarkeit von Aminosäuren, dem Hauptenergielieferanten des Bakteriums. Als Folge des Aminosäuremangels kommt es zur Akkumulation des *second messengers ppGpp* und einer Kette von Ereignissen im Zellstoffwechsel, die in die Expression mehrerer Virulenzfaktoren münden. Diese ermöglichen es dem Pathogen, einen Wirtswechsel durchzuführen⁹.

Zwischen virulenten und nicht-virulenten Stämmen gibt es Unterschiede auf mehreren Genloci, die mit der Fähigkeit zur intrazellulären Infektion und Replikation assoziiert sind¹⁹⁻²¹. Das MIP (*macrophage infectivity potentiator*) Protein beispielsweise ist zur erfolgreichen Zellinvasion und zum optimalen intrazellulären Überleben von *L. pneumophila* absolut notwendig. Es zeigt die Aktivität einer PPlase, eines in der Proteinfaltung involvierten Enzyms, das auch das Immunsuppressivum FK-506 binden kann^{22,23}.

Mehrere bakterielle für die intrazelluläre Proliferation notwendige Faktoren werden durch den Dot/Icm Genkomplex kodiert. Die meisten Dot/Icm Mangelmutanten sind zur intrazellulären Vermehrung nicht in der Lage und können dem endozytischen Prozess nicht entgehen²⁴⁻²⁶. Die Produkte dieser Genloci bilden die Grundlage für das Typ-IV-Sekretionssystem, das es den Legionellen erlaubt, bakterielle Faktoren aus den Vakuolen in das Zytoplasma der Wirtszelle zu schleusen. Die translozierten Proteine sind wesentlich für das intrazelluläre Wachstum, den intrazellulären Stoffwechsel sowie für die hohe MOI (multiplicity of infection) Zytotoxizität. Der IcmQ-IcmR-Komplex reguliert beispielsweise die Bildung eines Translokationskanals, der Proteine in die Wirtszellen befördert, und der IcmS-IcmW-Komplex wird für den Export von Virulenzfaktoren, die in den phagosomalen Bildungs- und Reifungsprozess eingreifen, benötigt²⁷⁻²⁹. Coers et al. haben gezeigt, dass die Primärfunktion der Dot- und Icm-Produkte in der Übersendung eines Signals an den Makrophagen liegt, der die Reifung des *L.-pneumophila-Phagosoms* in eine replikative Vakuole vorantreibt³⁰.

Luo and Isberg identifizierten mehrere Proteinfamilien, die durch das Typ-IV-Sekretionssystem transloziert werden und konnten anhand eines neu identifizierten Proteins (SidC) die Translokation über die phagosomale Membran bis zur zytoplasmatischen Seite des *L.-pneumophila-Phagosoms* zeigen³¹.

1.4 Klinik

Es wird zwischen der klassischen Form der Legionellose (Legionärerkrankung) und dem Pontiac-Fieber als der milden Variante unterschieden.

Das Leitbild bei der klassischen Form ist die Pneumonie. Der Beginn der Erkrankung ist durch unspezifische Symptome wie Fieber, Übelkeit, Myalgien, Erbrechen und Kopfschmerzen gekennzeichnet, begleitet von einem Temperaturanstieg bis über 40°C. Der Husten ist meist trocken und unproduktiv. Gastrointestinale Symptome sind ebenfalls keine Seltenheit, denn Durchfall wird in 20 bis 40 % der Fälle beobachtet³². Extrapulmonale Legionellosen sind rar, aber die Verläufe sind äußerst dramatisch³³. Hier ist die häufigste Lokalisation das Herz, als Erkrankungsmanifestationen fungieren Myokarditiden und Perikarditiden^{34,35}. An der klassischen Form der Legionellose erkranken typischerweise ältere Menschen und Risikogruppen mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Immunschwäche. Dazu gehören beispielsweise Raucher, Personen mit chronischen Lungenerkrankungen und Tumorpatienten³⁶.

Das Pontiac-Fieber ist eine Infektion von immunkompetenten Personengruppen, charakterisiert durch Fieber, Schüttelfrost, Myalgien und Kopfschmerzen³⁷. Es unterscheidet sich von der Legionärerkrankung durch die kurze Inkubationszeit (6-48h), eine hohe Erkrankungsrate und die fehlende Letalität³⁸. Die Pathogenese des Pontiac-Fiebers ist weitgehend unbekannt, wobei eine Hypersensitivität gegenüber zellulären Komponenten der Legionellen oder auch der Amöbe vermutet wird³⁹.

1.5 Diagnose

Die Kultur ist der Goldstandard und für epidemiologische Untersuchungen unverzichtbar. Obwohl sie anspruchsvoll und zeitaufwändig ist (4-5 Tage), liegt

ihre Empfindlichkeit - je nach Untersuchungsmaterial - bei 50 bis 90 %. Legionellen wachsen nicht auf herkömmlichen Nährböden, sondern werden auf gepuffertem Kohle-Hefeextrakt-Agar mit Zusatz von α -Ketoglutarat (BCYE- α Agar) und evtl. von Antibiotika (z.B. Polymixin B, Cefamandol und Anisomycin) gezüchtet. Rasche Methoden zum Direktnachweis (Indirekte Immunfluoreszenz, DNA Sonden) sind mit 30 – 70 % nicht sensitiv. Für den Antigennachweis im Urin ist der ELISA (*enzyme-linked-immuno-sorbent-essay*) sensitiver (75 – 90 %), doch alle handelsüblichen Assays haben den Nachteil ausschließlich *L. pneumophila* der Serogruppe 1 zu erfassen. Die Persistenz des Antigens ist allerdings nicht mit dem Weiterbestehen der Krankheit gleichzusetzen⁴⁰. Die Spezifität der verschiedenen Methoden ist mit über 95 % zufriedenstellend. Der Antikörpernachweis wird zwar immer noch sehr häufig verwendet, sollte heute jedoch wegen seiner Mängel nur noch für epidemiologische Zwecke oder als Ergänzung zu anderen Methoden eingesetzt werden⁴¹. Die PCR ist spezifisch und der Kultur an Empfindlichkeit überlegen^{42,43}. Ein negatives Resultat für *Legionella spp.* erlaubt praktisch den Ausschluss der Infektion. Ein positives Resultat für *Legionella pneumophila* dagegen ist ein starker Hinweis auf eine Legionellose.

1.6 Therapie

Erythromycin war für lange Zeit das Mittel der Wahl, ist jedoch durch die neueren Makrolide, insbesondere Azithromycin, ersetzt worden. Sie weisen eine höhere In-vitro-Aktivität auf und gelangen besser in das betroffene Lungengewebe. Gegen Erythromycin sprechen auch die gastrointestinalen Nebenwirkungen und die notwendige Verabreichung großer Flüssigkeitsmengen. Ähnliche Vorteile wie die Makrolide weisen Quinolone auf und stellen somit eine mögliche Alternative dar^{44,45}.

Rifampicin ist gleichfalls sehr effektiv gegen *Legionella*^{46,47} und wird als Teil einer Kombinationstherapie (mit einem Makrolid oder Chinolon) bei schwer erkrankten Patienten eingesetzt .

Parenterale Therapie sollte bis zur deutlichen Verbesserung der Symptomatik verabreicht werden, gefolgt von der oralen Therapie. Die Gesamtdauer der Antibiose liegt zwischen 10-14 Tagen, wird aber bei immunsupprimierten Patienten auf 21 Tage ausgedehnt³².

1.7 Immunität

Es konnte anhand von Experimenten am Tier und am Menschen gezeigt werden, dass sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunität bei der Legionelleninfektion eine Rolle spielt. Die natürliche (angeborene) Immunität geht auf eine große Anzahl von Effektorzellen und Zytokinen zurück. Neben natürlichen Killerzellen und Makrophagen sind neutrophile Granulozyten, also zur Phagozytose fähige Zellen, involviert. Innerhalb von Stunden nach der Infektion werden neben Zytokinen, wie IL-1, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, TN, IFN γ , TGF β auch mehrere Chemokine freigesetzt. Die adaptive (erworbene) Immunität setzt sich aus B- und T-Lymphozyten, Zytokinen und antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen, u.a.) zusammen. Beide Gruppen tragen sowohl dazu bei, die Primärinfektion zu limitieren als auch die Antwort der T-Helferzellen zu triggern. Verschiedene Umweltfaktoren können eine Veränderung des quantitativen und qualitativen Gleichgewichtes zwischen den zahlreichen Zytokinen bewirken. Anstatt eine protektive Wirkung auszuüben, kann dieser Prozess dann zur einer Verstärkung der Erkrankung und auch zu einem tödlichen Verlauf führen⁴⁸.

Die zellvermittelte Immunität ist wahrscheinlich der wichtigste Mechanismus zur Inhibierung der intrazellulären Vermehrung und zur Begrenzung der Infektion.

Obwohl die Art und Weise dieser Immunantwort noch unklar ist, haben mehrere In-vitro-Studien gezeigt, dass IFN- γ aktivierte Makrophagen das intrazelluläre Wachstum des Bakteriums hemmen^{49,50}. Die Zytokininduktion durch Legionellen aktiviert hauptsächlich T-Helferzellen, von denen zwei Subtypen (Th1, Th2) anhand ihrer Zytokinprofile identifiziert werden konnten^{51,52}. Th1-Zellen sind mit den sezernierten Zytokinen (IFN- γ , TNF und IL-2) an der zellvermittelten Immunität, insbesondere der Abwehr von intrazellulären Erregern, beteiligt⁵³. Die Th2-Zellen produzieren indessen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10⁵⁴. Sie aktivieren B-Lymphozyten und sind somit bei der humoralen Abwehr von Bedeutung. Die auf den Stimulus hin produzierten Antikörper wehren unter anderem den Angriff extrazellulärer Erreger ab. Trotzdem scheinen diese Antikörper keine Rolle bei der Abwehr der Legionelleninfektion zu spielen. Zum einen zeigen nur 50 % der Patienten eine Serokonversion und zum anderen haben die Serumantikörper mit dem Komplementsystem keine lytische Wirkung auf das Pathogen. Sie fördern zwar die Phagozytose des Bakteriums durch die Makrophagen; dieser Prozess führt aber nicht zur Abtötung des Pathogens⁵⁵.

Es hat sich gezeigt, dass die immunmodulierenden Zytokine auch kreuzregulatorische Fähigkeiten besitzen. So fördert z.B. IL-12 nicht nur die Th1-Klonbildung und die Zytokinproduktion, sondern es unterdrückt auch Th2-Klone und ihre entsprechenden Zytokine⁵⁶. Bedeutsam für die Steuerung der Immunantwort gegenüber angreifenden Mikroben ist die Balance der Th1- und der Th2-Zytokinantwort^{51,52}. Experimentelle Modelle von durch *Leishmania spp.*^{57,58}, *Toxoplasma gondii*⁵⁹, *Mycobacterium spp.*⁶⁰, *Lysteria monocytogenes*⁶¹ und *Candida albicans*⁶² verursachten Erkrankungen haben die kritische Rolle des Th1/Th2 Gleichgewichtes bei infektionsinduzierter Reaktion des Immunsystems aufgezeigt. Nur einige klinische Infektionen wie die durch *Mycobacterium tuberculosis* verursachte Pleuritis⁶³ sowie Lepra⁶⁴ und Leishmaniose⁶⁵ wurden auf ihren Immunstatus untersucht. Sie wiesen aufgrund des Zytokinmusters ein Überwiegen der Th1-Antwort auf.

Bei mit *L. pneumophila* infizierten Mäusen hatte die Unterdrückung der Th1-Aktivität durch Marihuana eine deutliche Mortalitätserhöhung zur Folge⁶⁶. Kit-sukawa et al. fanden im Überstand von mit *L. pneumophila* infizierten, humanen

peripheren mononukleären Blutzellen mRNA von IFN- γ , aber keine mRNA, die für das Interleukin IL-4 kodiert⁶⁷. Tateda et al.⁵⁴ bestätigten anhand der Zytokinprofile von Patienten mit einer Legionellenpneumonie die überragende Rolle der Th1-Antwort.

IL-12 scheint das erworbene und das angeborene System zu verbinden⁵⁶. Die Fähigkeit des Zytokins, die Differenzierung von Th1-Zellen aus neutralen T-Lymphozyten (Initialisierung der zellvermittelten Immunität) und die Produktion von IFN- γ und anderen aktivierenden Zytokinen zu induzieren, ist insbesondere bei akuten bakteriellen Infektionen unerlässlich. Bei Patienten mit einer Legionellenpneumonie wurden bereits erhöhte Serumspiegel von IL-12 beobachtet⁵⁴. Ob die Infektion mit *L. pneumophila* aber tatsächlich vom Th1-Zytokintyp dominiert wird, muss durch weitere Studien geklärt werden. Eine durch Th1-gewichtete Antwort könnte aber die Anfälligkeit von immunsupprimierten Individuen, insbesondere älteren Personen, gegenüber einer Legionelleninfektion erklären und den immunologischen Unterschied zwischen der Legionärskrankheit und dem Pontiac-Fieber aufzeigen. Das Wissen über immunologische Veränderungen im Alter ist noch gering; fest steht aber, dass insbesondere T-Zellen eine Funktionsminimierung erfahren⁶⁸. In der dritten Lebensdekade ist vor allem die T-Zell-Aktivierung erheblich eingeschränkt⁶⁹ und das Zytokinmuster scheint sich von einer Th1- zu einer Th2-Antwort zu verschieben.^{70,71} Eine geringere Proliferationsrate und eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem CD96 sind weitere Kennzeichen des Alterungsprozesses⁶⁹.

Wichtige Komponenten der zellvermittelten Immunität sind neben Makrophagen und Th1-Zellen die zytotoxischen T-Zellen (CTLs), die den MHC-Klasse-I-Komplex an Zelloberflächen erkennen können. Fast alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-Klasse-I-Moleküle und präsentieren mit deren Hilfe zelleigene Proteine sowie – bei einer bestehenden Infektion – Proteine der entsprechenden Pathogene. Viren haben Mechanismen entwickelt, um dieser Erkennung zu entgehen. So reduzieren sie z. B. die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen oder sie produzieren Proteine, die diese Moleküle aus dem endoplasmatischen

Retikulum herausschleusen und so eine Oberflächenpräsentation des Antigens unmöglich machen.

Die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) spüren Zellen auf, die keine oder eine reduzierte MHC-Klasse-I-Expression aufweisen und deshalb einer Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entgangen sein könnten ⁷². Sowohl zu den CTLs als auch zu den natürlichen Killerzellen liegen noch keine Erkenntnisse im Hinblick auf eine Legionelleninfektion vor. Die Reaktion der NK-Zellen ist Gegenstand dieser Dissertation.

1.8 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen sind sowohl für die angeborene Immunantwort gegenüber Pathogenen als auch für die körpereigenen Tumorzellen entscheidend. Sie erkennen, wie bereits oben erwähnt, die MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche. Ist diese reduziert oder fehlt sie ganz, wird die Zielzelle eliminiert. Beim Menschen ist der Schritt von der Erkennung der Klasse-I-Moleküle bis zur entsprechenden Reaktion eine komplexe Interaktion zwischen aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren, wobei im Allgemeinen der Effekt der inhibierenden Gruppe überwiegt. Die Rezeptoren von NK-Zellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen, die KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptors*), die auf dem LRC-Abschnitt (*leukocyte receptor complex*) der DNA kodiert sind und die *lectin-like molecules*, dessen Strukturinformation der NK-Genkomplex (*natural killer cell gene complex*, NKC) trägt. Die Funktionen bzw. Liganden der meisten NKC-codierten Moleküle sind noch nicht charakterisiert. Eine der am besten untersuchten Rezeptorgruppen beim Menschen ist die NKG2-CD94-Familie. NKG2A-CD94, NKG2B-CD94 und NKG2C-CD94 erkennen das MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E, das Peptide (*leader peptides*) klassischer MHC-Moleküle präsentiert ⁷³. So kann die Expression von HLA-E mit Hilfe von NK-Zellen auch als

Indikator für eine korrekte MHC-Klasse-I-Bildung verwendet werden. In Tumorzellen und virusinfizierten Zellen wird durch die verminderte HLA-A, HLA-B und HLA-C Expression die Bindung des Peptids und somit eine Stabilisierung von HLA-E verhindert ⁷⁴.

Der NKG2D-Rezeptor, der auch auf einigen T-Zellen und Makrophagen exprimiert wird, weist im Gegensatz zu anderen NKG2-Molekülen eine begrenzte Sequenzhomologie auf ⁷⁵⁻⁷⁷ und hat sowohl aktivierende als auch costimulatorische Funktionen ^{78,79}. Die Liganden des NKG2D-Moleküls beim Menschen sind das *MHC class I chain-related gene A protein* (MIC-A), MIC-B und die ULBP-Familie (UL16-binding protein) ^{80,81}. Sie zeigen in Struktur und Sequenz Ähnlichkeit mit MHC-Klasse-I-Molekülen, assoziieren aber weder mit β_2 -Mikroglobulin noch weisen sie eine Peptidbindung auf. Die Expression dieser Liganden wird durch zwei Prozesse induziert: die Tumorgenese und die Virusinfektion. Die Aktivierung durch das Virus hat eine Costimulation von virus-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) und somit eine Lyse der infizierten Zellen zur Folge. Dies geschieht selbst dann, wenn das Virus die MHC-Klasse-I-Expression deutlich reduziert hat. ^{82,83}.

Die im NKC-Komplex der Maus kodierte Ly49-Familie und die *immunglobulin-like* Rezeptorfamilie beim Menschen, die die klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle erkennen kann, sind strukturell unterschiedliche, funktionell jedoch analoge MHC-Klasse-I-Rezeptoren ⁸⁴. Die Mitglieder der Ly49-Familie gehören mit Ausnahme von Ly49h und Ly49d zu den inhibierenden Molekülen. Insbesondere Ly49h kommt eine wichtige Rolle bei der angeborenen Immunantwort gegenüber Virusinfektionen zu ⁸⁵⁻⁸⁷. M157, ein durch das Cytomegalievirus codiertes Molekül, ist der entsprechende Ligand. Es wird durch infizierte Zellen exprimiert ⁸⁸ und triggert innerhalb von Stunden die IFN- γ -Produktion von frisch isolierten, Ly49h-exprimierenden NK-Zellen *in vitro*. Obwohl Ly49 von humanen NK-Zellen nicht exprimiert wird, ist es möglich, dass ähnliche Virus-Erkennungsmechanismen im LRC-Abschnitt kodiert sind. Es sind verschiedene Virusinvasionsstrategien bekannt, die direkt gegen NK-Zellen gerichtet sind und darauf hindeuten, dass humane NK-Zellen Rezeptoren für die Viruserkennung exprimieren ⁸⁹.

1.9 MHC-Klasse-I-Komplex

Die MHC Klasse I Moleküle setzen sich aus einer polymorphen, HLA-codierten schweren Kette und einer nicht-polymorphen, löslichen Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m) zusammen⁹⁰. Beide sind durch eine nicht-kovalente Bindung miteinander verbunden und der distale Teil der schweren Kette bildet eine Peptidbindungsfurche. Das Peptid ist ein integraler Bestandteil der MHC-Klasse-I-Struktur, wobei jedes MHC-Klasse-I-Molekül – mit Einschränkungen in Hinblick auf Länge und Sequenz – unterschiedliche Peptide binden kann⁹¹. Da die Bindungsfurche an beiden Enden geschlossen ist, werden nur Peptide mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren gebunden. Zusätzlich müssen die Seitenketten spezifische Charakteristika aufweisen, um an Aminosäureresten des MHC-Klasse-I-Moleküls andocken zu können. Bereiche der Bindungsfurche, die mit dem Antigen interagieren, werden als Antigenbindungstaschen bezeichnet, wohingegen die Aminosäurereste des Peptids als Ankerreste klassifiziert werden. Die Peptidbindungstaschen sind für die Variabilität und die Bindungsspezifität der MHC-Klasse-I-Moleküle verantwortlich. Die Präsenz multiplexer MHC-Klasse-I-Gene, ihr Polymorphismus und die kodominante Expression steigern die Vielfalt der möglichen, an der Oberfläche zu präsentierenden Peptide⁹².

Die meisten Peptide, die an Klasse I Moleküle binden, stammen von im Zytosol synthetisierten Proteinen⁹³. Obwohl reife Proteine, die sich am Ende ihres Lebenszyklus befinden auch durch Klasse I präsentiert werden können, zeigen neuere Studien, dass neu synthetisierten Proteine die Hauptquelle der präsentierten Antigene ausmachen^{94,95}. 30 bis 80 % dieser neusynthetisierter Proteine werden direkt nach der Synthese degradiert, weil es entweder vorzeitig terminierte Polypeptide oder missgefaltete Proteine (*defective ribosomal products*, DRiPs) sind. Sie stellen eine wichtige Quelle für die MHC-I-Antigenprozessierungsmaschinerie dar und ermöglichen eine schnelle Erkennung von infizierten oder anderweitig veränderten Zellen.

Im Zytosol lokalisierte Proteasomen können Proteine, Polypeptide sowie DRiPS nach einer vorherigen Bindung an den Kofaktor Ubiquitin degradieren⁹⁶. Das Proteasom selbst ist eine Protease mit mehreren katalytischen Untereinheiten und verschiedenen proteolytischen Aktivitäten. IFN- γ , ein Zytokin, das in der Regel bei einer viralen Infektion, aber auch bei der Legionelleninfektion produziert wird, induziert die Synthese von drei Untereinheiten: LMP2 (*low molecular weight protein*), LMP7 und MECL-1⁹⁷. Die neu gebildete Protease wird als Immunoproteasom bezeichnet und ist in antigenpräsentierenden Zellen (APCs) sowie entzündetem Gewebe zu finden. Die für LMP2 und LMP7 kodierenden Gene stehen mit HLA- I Bereichen in Verbindung und es erscheint naheliegend, dass eine Koevolution mit MHC-Klasse-I-Molekülen stattgefunden hat⁹².

Proteasomen, denen die IFN- γ -induzierbaren Einheiten fehlen, werden als Standardproteasome klassifiziert und sind in den meisten Zelltypen die prädominant exprimierte Form. Sie degradieren vor allem Selbstantigene effizienter als Immunoproteasomen, die besser in der Lage zu sein scheinen Peptide aus infektiösen Substanzen als aus Selbst-Proteinen zu generieren⁹⁸. Die Induktion dieser Proteasomen während einer Infektion könnte also einen Vorteil für den Wirt darstellen. Die Degradierung der Fremdantigene hätte dann Vorrang vor zelleigenen Antigenen. Es wäre möglich, dass dendritische Zellen, die eine konstitutive Expression der Immunoproteasomen zeigen und dadurch Selbstantigene weniger effizient als Fremdantigene prozessieren, eine Art Selbsttoleranz bei der CD8-T-Zellantwort induzieren⁹⁹.

Die meisten der nach der Prozessierung durch das Proteasom gebildeten Oligopeptide werden von Endopeptidasen und Aminopeptidasen weiter zu Aminosäuren degradiert, die für Proteinsynthese und Energieproduktion verwendet werden. Trotz allem wird ein kleiner Teil dieser Peptide durch den TAP-Transporter, einem integralen ER-Membranprotein, deren Untereinheiten TAP1 und TAP2 innerhalb des MHC Komplexes kodiert sind, in das endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert⁹⁶. Ähnlich wie bei Untereinheiten des Immunoproteasoms (LMP2, LMP7) ist die Expression von TAP1 und TAP2 durch die Präsenz von IFN- γ deutlich gesteigert.

TAP-defiziente Zellen haben tiefgreifende Defekte in der Klasse-I-Oberflächenexpression und sind erheblich in ihrer Antigenpräsentation eingeschränkt. Nichtsdestotrotz wurden bereits Proteasom- und TAP-unabhängige Wege der Antigenpräsentation beschrieben⁹³.

Das Beladen der MHC Klasse I Moleküle mit Peptiden innerhalb des ER ist ein hochregulierter Prozess, der eine Vielfalt von akzessorischen Proteinen benötigt^{27,93,100}. Die initialen Schritte werden durch die Lektin-ähnlichen Chaperone Calnexin und Calretikulin kontrolliert⁹³. Sofort nach ihrer Translokation in das ER bindet die schwere Kette Calnexin, welches dann nach der Assoziation mit β_2 -Mikroglobulin durch Calretikulin ersetzt wird. Die Bedeutung des Calnexins für die Zusammenfügung von Klasse-I-Molekülen ist unklar, weil dieser Prozess auch in humanen Zelllinien mit fehlendem Calnexin stattzufinden scheint¹⁰¹. Beim Menschen wird es wahrscheinlich durch andere Chaperone, wie das BiP (*immunoglobulin heavy chain binding protein*) ersetzt¹⁰². Bei Mäusen dagegen weisen die Calnexinmangelmутanten schwere Prozessierungsdefekte des Klasse-I-Antigens auf¹⁰³.

Tapasin, eine weitere Komponente des Peptidtransporters, ist ein in der MHC-Klasse-II-Region codiertes Transmembranprotein. Es erhöht die Expression des TAP-Transporters in der Zelle¹⁰⁴ und vermittelt eine effektive Assoziation von Klasse-I-Molekülen an das TAP¹⁰⁵. Daneben hat es ebenfalls eine Chaperon-ähnliche Funktion in der Stabilisierung des Klasse-I/ β_2 m-Dimers, die in Erhöhung der Halbwertszeit des Moleküls resultiert¹⁰⁶. Die Tapasinabhängigkeit bei der Peptidbeladung wurde nicht bei allen Allelen beobachtet¹⁰⁷ und die molekularen Mechanismen sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

ERp57 ist 1998 als eine Komponente des Peptidbindungskomplexes identifiziert worden. Als eine Thiol-abhängige Reduktase, auch bekannt als ER60-Protease, beeinflusst es die Bildung von Disulfidbrücken innerhalb der schweren Kette und somit die Faltung des MHC-Klasse-I-Moleküls¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Auch eine nicht kovalente Interaktion zwischen ERp57 und Calretikulin und eine über Disulfidbrücken erzeugte Bindung zum Tapasin wurden beobachtet^{100,111}. Die genaue Funktion des ERp67 ist noch unklar.

Die Peptidbindung verändert die Konformation des MHC-Klasse-I-Moleküls so weit, dass eine Lösung des Rezeptors vom TAP-Transporter möglich wird und der Transport des Moleküls aus dem ER zur Zelloberfläche initiiert wird ^{112,113}. Der Zyklus der ATP-Bindung und der Hydrolyse des TAP-Transporters ist neben der Regulation des Peptidtransportes in das ER ebenfalls für die Freisetzung des MHC-Klasse-I-Komplexes verantwortlich ¹¹⁴. Verlängerte Retention im endoplasmatischen Retikulum hat einen Transport aus dem ER in das Zytosol und dort die proteasomale Degradation zur Folge ^{115,116}.

1.10 Versuchsziel

Neuere Ergebnisse in der FACS-Analyse zeigen eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression bei der Infektion mit *Legionella pneumophila*. Nach 48 h ist die Oberflächenexpression von Mono-Mac-6-Zellen, die mit der pathogenen Spezies infiziert sind, deutlich vermindert (Abb. 1.10.1). Zellen, die mit der apathogenen *L. steigerwaltii* infiziert wurden, weisen hingegen im Histogramm eine deutlich geringere Reduktion auf (Abb. 1.10.2). Bei der Negativkontrolle findet kaum eine Minderung der Expression statt (Abb. 1.10.3). Die vorliegende Arbeit sollte die Interaktion zwischen infizierten Zellen und den natürlichen Killerzellen untersuchen und feststellen, ob autologe NK-Zellen infizierte Makrophagen erkennen und lysieren.

1.10.1 Expression von MHC-Klasse-I auf infizierten MM6-Zellen

Die Infektionsdosis betrug 1:100 (Wirtszelle: Legionella)

Infektion mit *L. pneumophila* subtyp pontiac

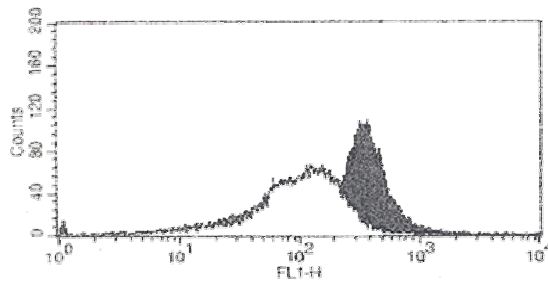


Abb. 1.10.1

Schwarze Fläche: 0h

Graue Fläche: 24h (nicht sichtbar)

Weißer Fläche: 48h

Infektion mit *L. steigerwaltii*

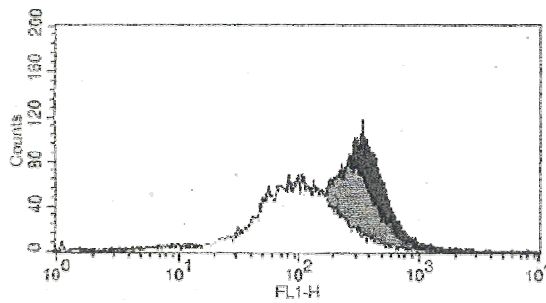


Abb. 1.10.2

Schwarze Fläche: 0h

Graue Fläche: 24h

Weißer Fläche: 48h

Uninfizierte Zellen

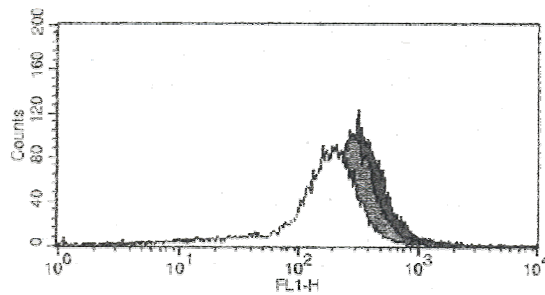


Abb. 1.10.3

Schwarze Fläche: 0h

Graue Fläche: 24h

Weißer Fläche: 48h

Freundlicherweise von M. Faigle zur Verfügung gestellt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Hilfsstoffe

RPMI-1640	Invitrogen, Eggenstein
FCS (fetal calve serum), hitzeinaktiv	Invitrogen, Eggenstein
L-Glutamin 10%	Invitrogen, Eggenstein
MEM nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Eggenstein
OPI (Oxalacetat-Pyruvat-Insulin)	Sigma, München
Legionella-Kulturplatten	Biotest, Heidelberg
Gentamicin (50mg/ml, mit RPMI auf 100µg/ml verdünnt)	Invitrogen, Eggenstein
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma, München
PBS	Invitrogen, Eggenstein
Trypanblau 0,4%	Sigma, München
MACS NK Isolation Kitt	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Monocyte Isolation Kitt	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Interleukin-2	Sigma, München
⁵¹ Cr	3,7x10 ⁷ Bq/ml, Amersham
Triton 2%	Sigma, München
Aqua dest.	Gibco, Eggenstein
Kulturmedium	RPMI-1640 Medium mit 10% FCS 1% L-Glutamin 1% nicht-essentielle Aminosäuren 1% OPI-Supplement
Infektionsmedium	RPMI-1640 Medium mit

1% L-Glutamin
1% nicht-essentielle Aminosäuren
1% OPI-Supplement

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen 75cm ² , 0,2µm Filter	Costar, Bodenheim
6-Lochplatten	Costar, Bodenheim
96-Lochplatten	Costar, Bodenheim
LumaPlate	Packard Biosciences, Niederlande
Zellschaber	Costar, Bodenheim
Spritzen (verschiedene Größen)	Braun, Melsungen
Sterilfilter 0,22µm	Millipore, Molsheim, Frankreich
Eppendorfcups, 2ml	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (weiß, gelb, blau)	Greiner, Frickenhausen
Einmalpipetten (1, 2, 5,10, 25, 50ml)	Costar, Bodenheim
Falcon Blue-Cap (50ml, 15ml)	Becton Dickinson, USA
Impfeschlingen, steril	Greiner, Frickenhausen
Elutionssäulen (MACS [®])	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.3 Geräte, technische Hilfsmittel

CO ₂ Brutschrank	Heraeus, Hanau
Sterile Werkbank MSC II-72	Holten, Allerod, DK
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Mikroskop	Olympus
Photometer	Pharmacia, Hamburg

Vortexer MS1 Minishaker	IKA-Works, NC, USA
Pipettboy	Hirschmann
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
MidiMACS [®] , Magnet zur Elution	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Neubauerzählkammer	Bender und Hobein, Zürich, CH
Ultraschallbad Optosonic	Breitfeld&Schliekert, Karben
Gammastrahlenmessgerät	Bertold
Liquid scintillation counter	Wallac, Turku, Finnland

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

Für die Versuche wurden periphere Monozyten und natürliche Killerzellen von jeweils unterschiedlichen Spendern ohne MHC-Typisierung verwendet. Die beiden Zelltypen wurden aus Buffy-coats (Institut für Transfusionsmedizin, Tübingen) über mehrere Zwischenstufen isoliert. Beim Buffy-coat handelt es sich um die leukozytenhaltige Zwischenschicht, die sich bei der Zentrifugation von Vollblut zwischen dem Blutplasma und der Erythrozytenmasse ablagert. Die weitere Anreicherung der Leukozyten erfolgte durch Zentrifugation über einen Dichtegradienten (Ficoll Paque[®]). Die nächsten Schritte der Zellisolierung fanden unter Verwendung der indirekten Minimacs[™]-Methode von Miltenyi Biotec[®] statt. Die Zellen wurden mit primären Antikörpern markiert und anschließend an kol-

loidale Magnetbeads gebunden. Die Trennung erfolgt über eine Säule mit Eisenkern, der mit einem Magneten vollständig magnetisiert werden kann. Die markierten Zellen bleiben in der Säule zurück und die ungebundenen Zellen lassen sich schonend selektieren.

Natürliche Killerzellen (NK):

Die Isolation von NK-Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte nach einem Protokoll von Miltenyi Biotec[®]. Jeweils 25 ml eines Buffy-coats wurden auf 25 ml Ficoll Paque[®] gegeben und 20 min bei 1000 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Die Zellen der Interphase (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) wurden anschließend aspiriert, mit 40 ml PBS vermischt und bei 400 x g für 10 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit PBS aufgefüllt und bei 200 x g (10 min) zentrifugiert. Die Zellen wurden gezählt und ein letztes Mal bei 120 x g (10 min) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einem Puffer (PBS, 0,5 % Rinderserumalbumin) auf ein Volumen von 80 µl pro 1×10^7 Zellen resuspendiert. Für je 1×10^7 wurden 20 µl einer Mischung von haptenkonjugierten CD3, CD14, CD19, CD36 und IgE-Antikörpern hinzugegeben (Markierung von T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Monozyten, Basophilen, dendritischen Zellen, Thrombozyten und erythroiden Vorstufen). Die Lösung wurde gut vermischt und bei 7 °C für 10 min inkubiert. Hinterher wurden die Zellen zweimal mit dem Puffer gewaschen (400 x g, 10 min) und erneut mit 80 µl Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Magnetbeads, die an einen monoklonalen Haptenantikörper gekoppelt waren (20 µl pro 1×10^7 Zellen), und die Inkubation bei 7 °C für 15 min. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Zellpellet mit 500 µl Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert und durch eine MACS[®]-Säule eluiert. Die markierten Zellen wurden im magnetischen Feld zurückgehalten, die unmarkierten NK-Zellen passierten hindurch und konnten aufgefangen werden.

Monozyten:

Die Isolation von Monozyten aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) erfolgte nach einem Protokoll von Miltenyi Biotec[®]. Jeweils 25 ml eines Buffy-coats wurden auf 25 ml Ficoll Paque[®] gegeben und 20 min bei 1000 x g (ohne Bremse) zentrifugiert. Die Zellen der Interphase (Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) wurden anschließend aspiriert, mit 40 ml PBS vermischt und bei 400 x g für 10 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet mit PBS aufgefüllt und bei 200 x g (10 min) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und erneut mit PBS gewaschen (120 x g, 10 min). Das Zellpellet wurde mit einem Puffer (PBS, 0,5 % Rinderserumalbumin) auf ein Volumen von 60 µl pro 1×10^7 Zellen resuspendiert. Für je 1×10^7 wurden 20 µl einer Mischung von haptenkonjugierten CD3, CD7, CD19, CD45RA, CD56 und IgE-Antikörpern hinzugegeben (Markierung von T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen und Basophilen). Die Lösung wurde gut vermischt und bei 7 °C für 5 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit dem Puffer gewaschen (400 x g, 10 min) und erneut mit 60 µl Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von Magnetbeads, die an einen monoklonalen Haptenantikörper gekoppelt waren (20 µl pro 1×10^7 Zellen) und die Inkubation bei 7 °C für 15 min. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Zellpellet mit 500 µl Puffer pro 1×10^8 Zellen resuspendiert und durch eine MACS[®]-Säule eluiert. Die markierten Zellen wurden im magnetischen Feld zurückgehalten, die unmarkierten Monozyten passierten hindurch und konnten aufgefangen werden.

2.2.2 Zellkultur

Monozyten:

Die Monozyten wurden nach der Isolation mit Hilfe einer Zählkammer gezählt, in Kulturmedium gegeben und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit) gelagert.

Natürliche Killerzellen (NK):

Die NK-Zellen wurden nach der Isolation gezählt, in Kulturmedium resuspendiert und im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit) gelagert.

K562:

Für die Versuche wurden K562-Zellen verwendet, die als Zelllinie aus Granulozytenvorstufen einer chronisch myeloischen Leukämie etabliert wurden. Da sich auf der Oberfläche dieser Zellen keine MHC-Klasse-I-Moleküle befinden, ist diese Zelllinie gegenüber einem Angriff durch NK-Zellen prädestiniert. Die K562-Zellen wurden in dieser Arbeit als Positivkontrolle eingesetzt. Sie wurden in RPMI mit einem Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum gehalten. Es hat sich gezeigt, dass bei der Kultivierung im Kulturmedium das Wachstum der Zelllinie erheblich beschleunigt ist, was auch die Chromaufnahme bzw. Inkorporation negativ beeinflusste. Die Zellen wurden deshalb im Abstand von drei Tagen umgesetzt.

2.2.3 Bakterienkultur

Legionellen

Legionella pneumophila Serogruppe 1 subtyp Pontiac wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ruckdeschel vom Institut für Bakteriologie der Ludwig-Maximilian-

Universität München zur Verfügung gestellt. Das Bakterium ist ein Patientenisolat.

Die Legionellen lagerten in lysiertem Pferdeblut bei -70 °C . Nach dem Auftauen erfolgte die Anzucht auf BCYE α -Agar bei 37 °C und 5% CO_2 für 5 bis 6 Tage. Für die Versuche wurden frische, 5 Tage alte Subkulturen verwendet.

2.2.4 Infektion

Die in Kulturmedium befindlichen isolierten humanen Monozyten wurden gewaschen ($400 \times g$, 10 min) und in 4 ml Infektionsmedium resuspendiert. Die Menge der isolierten Monozyten war bei jedem Buffy-coat unterschiedlich, bewegte sich aber in der Regel zwischen 2×10^8 und 8×10^8 Zellen. Der Ansatz wurde in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde infiziert, die andere verblieb uninfiziert (Negativkontrolle). Beide Ansätze unterlagen den gleichen Bedingungen.

Um eine Bakteriensuspension zu erhalten, wurden einige Einzellkolonien der Bakterienkultur mit einer Öse abgenommen und in 25 ml RPMI gegeben. Eventuell vorhandene Klümpchen wurden mit Hilfe eines Vortexmischers aufgelöst. Die Suspension wurde mittels Photometer bei 578 nm auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt, wobei RPMI als Nullabgleich diente. Bei dieser Extinktion enthielt die Suspension 3×10^8 koloniebildende Einheiten pro Milliliter (CFU/ml). Eine entsprechende Menge dieser Suspension wurde für die Infektion der humanen Monozyten verwendet, um ein Infektionsverhältnis von 1:1, 10:1 oder 100:1 zu erzielen. So wurden beispielsweise bei einer 1:1- Infektion und 4×10^8 zu infizierenden Monozyten 1,3 ml der Legionellensuspension hinzugegeben. Das Gemisch wurde in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte pipettiert und zwei Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 inkubiert. Danach wurde zur Abtötung der extrazellulär verbliebenen Bakterien 4,5ml Infektionsmedium, das eine Gentamicin-Konzentration von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ enthielt (Gentamicin-Endkonzentration $75\mu\text{g/ml}$), hinzugegeben und erneut für eine weitere Stunde inkubiert. Am Ende wurden

die Zellen sorgfältig mit dem Zellschaber vom Boden der Platte gelöst und dreimal mit RPMI (400 x g, 10 min) gewaschen. Mit diesem Schritt war die Infektion beendet. Die Zellen wurden in Infektionsmedium resuspendiert, erneut in eine 6-Loch-Platte gegeben und bis zur ⁵¹Cr-Markierung gelagert (37 °C, 5 % CO₂).

2.2.5 ⁵¹Cr- Markierung

Die ⁵¹Cr-Methode beruht auf der Fähigkeit von Zellen, Chrom in ihren Stoffwechsel mit einzubeziehen und es nach der Zellyse wieder freizusetzen. Der kleinste Wert bei der Messung ist die spontane Freisetzung (Spontanrelease), den größten Wert stellt die maximale Freisetzung (Maximumrelease) des radioaktiven Elements dar, das nach Lyse der Zelle gemessen wird. Die Lyse der Targetzellen (Monozyten, K562) ist zwischen den genannten Extremen angesiedelt. Sie erfolgt durch Effektorzellen, in diesem Fall den natürlichen Killerzellen. Das Verhältnis zwischen dem Spontan- und dem Maximumrelease sollte idealerweise 1:10 betragen. Die spezifische Lyse in Prozent errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$\text{Prozent spezifische Lyse} = \frac{(\text{cpm der Probe} - \text{Spontanrelease})}{(\text{Maximumrelease} - \text{Spontanrelease})} \times 100$$

Alle Messwerte werden in *counts per minute* (cpm) angegeben.

2.2.5.1 Markierung der Targetzellen (TZ)

Alle Proben wurden mit 45 μl ^{51}Cr ($1,665 \times 10^6$ Bq) inkubiert.

Monozyten

Ein Teil von beiden Monozytenfraktionen (sowohl von der infizierten als auch von der uninfizierten, wurde aus der Zellkultur entnommen, gewaschen (400 x g, 10 min) und erneut gezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Davon wurden 100 μl ($2,5 \times 10^5$ Zellen) in ein Falconröhrchen überführt mit 45 μl ^{51}Cr versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit wurden die Röhrchen über ein Metallgitter gezogen, um das Zellpellet aufzuwirbeln. Nach der Inkubation wurden die Zellproben zweimal mit je 5 ml RPMI gewaschen, mit 5 ml Kulturmedium aufgefüllt und auf eine Konzentration von 5×10^4 Zellen/ml eingestellt.

K562

Die Zellen wurden gewaschen, auf die Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Kulturmedium eingestellt und im Falconröhrchen mit 45 μl ^{51}Cr versetzt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Nach der Hälfte der Zeit wurde das Röhrchen über ein Metallgitter gezogen um das Zellpellet aufzuwirbeln. Nach der Inkubation wurde die Zellprobe zweimal mit je 5 ml RPMI gewaschen und anschließend mit 5 ml Kulturmedium versetzt. Die Konzentration betrug hiernach 5×10^4 Zellen/ml.

2.2.5.2 Vorbereitung der Effektorzellen (EZ)

Jeweils 48 h vor dem Einsatz erfolgte die Aktivierung der Killerzellen mit Interleukin-2. Dazu wurden 250 Units des Zytokins pro ml Zellsuspension hinzugegeben und die Zellen ruhen lassen (37 °C, 5 % CO_2 , 90 % Luftfeuchtigkeit). Am

Versuchstag wurden die Effektorzellen gewaschen (400 x g, 10 min) und mit Kulturmedium auf $2,5 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt.

2.2.5.3 Kontrollen

Positivkontrollen: 1. K562

2. heterologe Monozyten eines anderen Spenders

Negativkontrolle: uninfizierte homologe Monozyten

Spontanrelease (SR): Aktivität des Überstandes von ^{51}Cr -markierten Targetzellen ohne Zugabe von Effektorzellen.

Maximumrelease (MR): Aktivität des Überstandes von ^{51}Cr -markierten Targetzellen nach Lyse mit Triton.

2.2.5.4 Pipettierschema

Der Ansatz fand in einer 96-Loch-Platte statt. Das Gesamtvolumen betrug 200 μl pro Vertiefung. Das Verhältnis von Effektor- zur Targetzelle betrug: 50:1, 10:1 und 2:1.

Tabelle 2.1

EZ: Effektorzellen

TZ: Targetzellen

Spontanrelease	100µl Medium 100µl TZ
50:1 (EZ:TZ)	100µl EZ 100µl TZ
50:1 (EZ:TZ)	100µl EZ 100µl TZ
10:1 (EZ:TZ)	80µl Medium 20µl EZ 100µl TZ
10:1 (EZ:TZ)	80µl Medium 20µl EZ 100µl TZ
2:1 (EZ:TZ)	96µl Medium 4µl EZ 100µl TZ
2:1 (EZ:TZ)	96µl Medium 4µl EZ 100µl TZ
Maximumrelease	100µl 2% Triton 100µl TZ

2.2.5.5 Durchführung des Tests

Nach dem Zusammenführen von Effektor- und Targetzellen wurde die Platte bei 37 °C für vier Stunden inkubiert. Anschließend wurde sie bei 400 x g für 3 min abzentrifugiert, um die Zellen vom Überstand zu trennen. Es wurden 30 µl vom Überstand abgenommen und in eine 96-Loch-Lunaplate überführt. Diese wurde über Nacht unter den Abzug gestellt, so dass die Flüssigkeit verdunsten konnte, und dann im *liquid scintillation counter* gemessen.

Dieser Versuchsaufbau wurde sowohl für den 24-h- als auch den 48-h-Wert (nach Infektion) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Vorversuche

3.1.1 Monozyten

Der Versuchsaufbau im Hinblick auf die Monozyten musste verifiziert werden. Die Inkubationszeit von einer Stunde reichte für die Monozyten nicht aus, um genügend Chrom in ihren Stoffwechsel einzubauen. Ein Spontan- zu Maximum-release von 1:10 wurde nicht erreicht. Die Fraktion der K562-Zellen (Positivkontrolle) verhielt sich erwartungsgemäß und zeigte ein Verhältnis von 1:10 und höher.

3.1.1.1 Inkubationsdauer: 1h

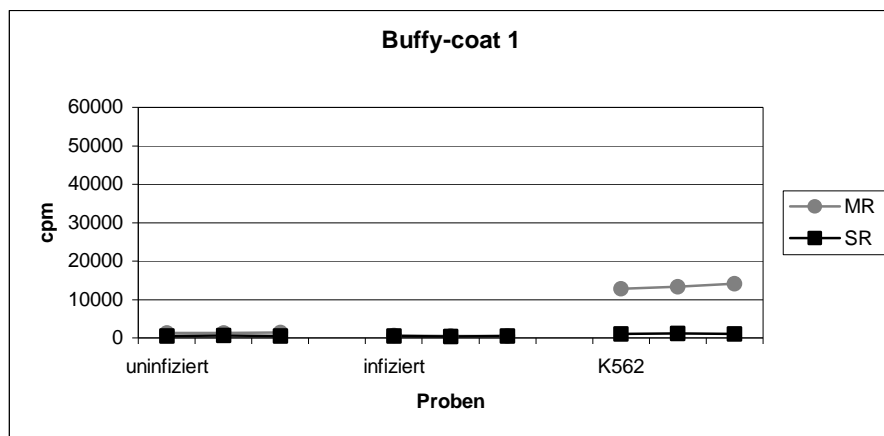


Abbildung 3.1.1

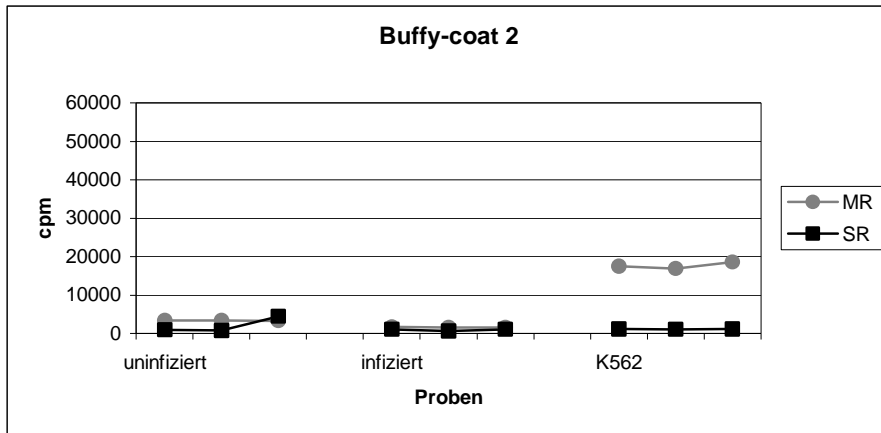


Abbildung 3.1.2

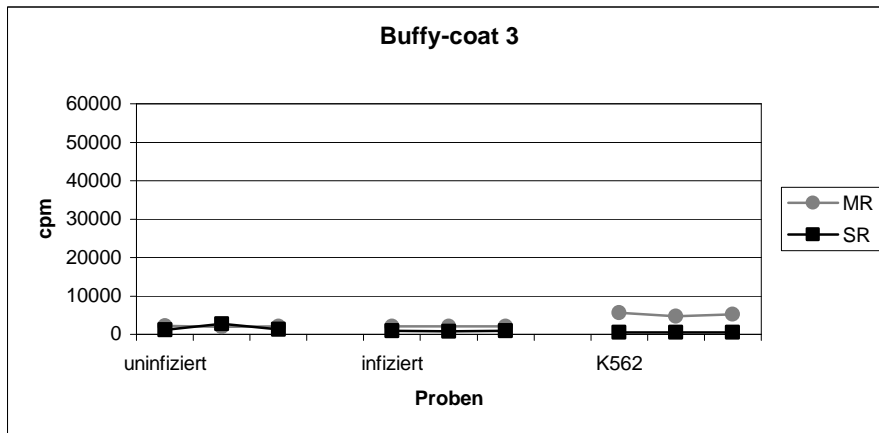


Abbildung 3.1.3

- SR: Spontanrelease
- MR: Maximumrelease
- cpm: counts per minute

3.1.1.2 Mehrstündige Inkubation von uninfizierten Monozyten:

Um den bestmöglichen Zeitpunkt herauszufinden, wurde eine Zeitkinetik mit Inkubationszeiten von 8 h, 18 h, 24 h und 48 h bei uninfizierten Monozyten durchgeführt. Das Chrom wurde vor dem jeweiligen Versuchsbeginn steril filtriert. Es wurden zwei Werte gemessen: der Spontanrelease (SR) und der Maximumrelease (MR), der durch Zusatz von zweiprozentigem Triton zu den Zellfraktionen erzielt wurde. Der entscheidende Faktor war das Verhältnis von Spontan- zum Maximumrelease, das im Idealfall mindestens 1:10 betragen sollte.

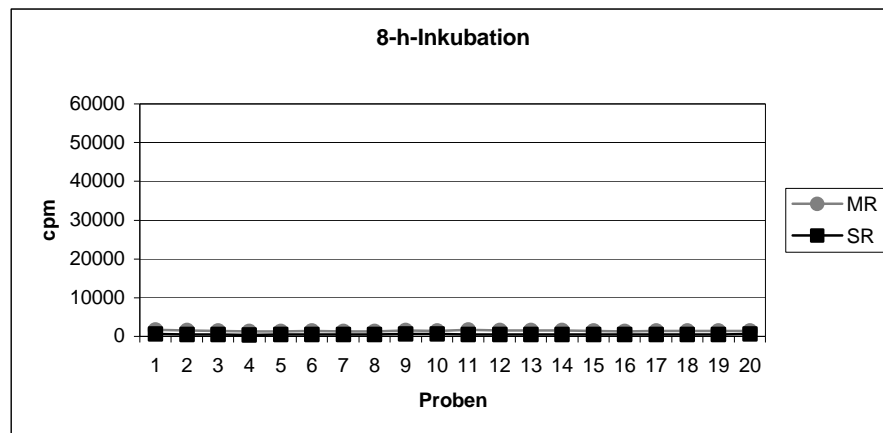


Abbildung 3.1.4

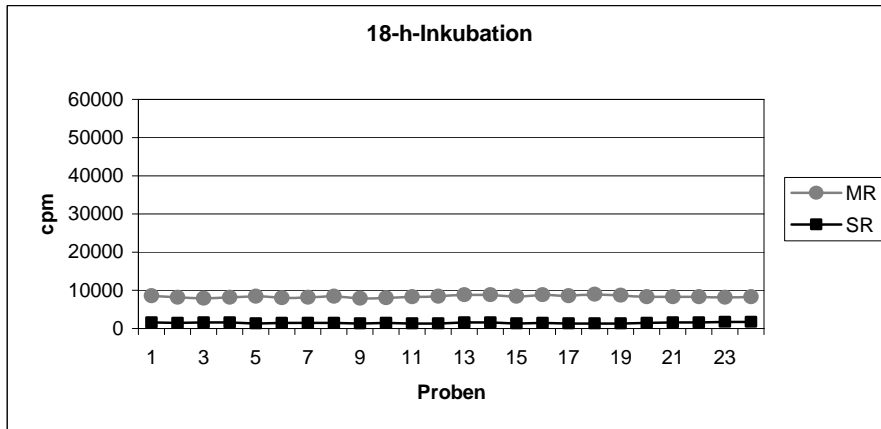


Abbildung 3.1.5

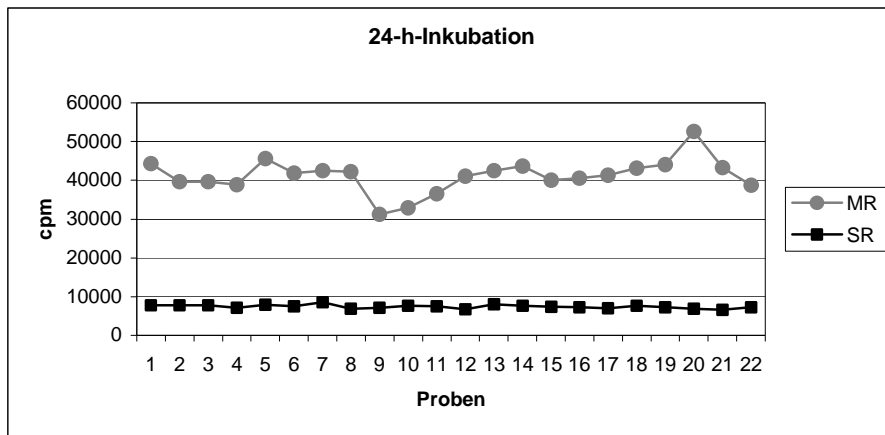


Abbildung 3.1.6

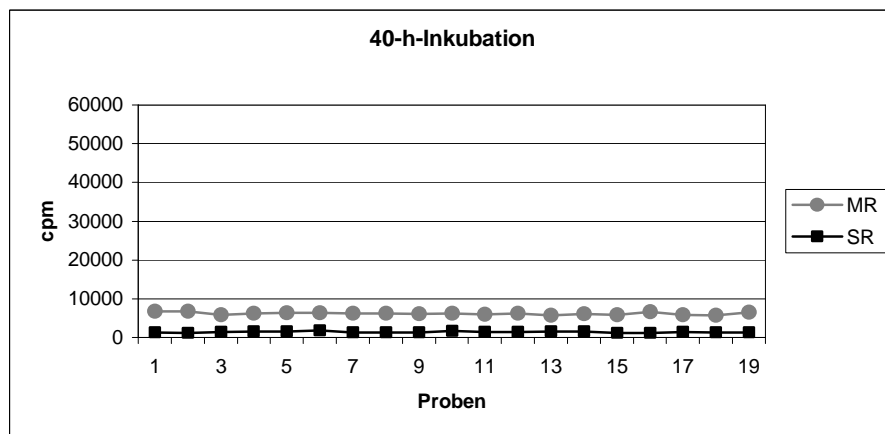


Abbildung 3.1.7

- SR: Spontanrelease
- MR: Maximumrelease
- cpm: counts per minute

Die gemessene Aktivität variierte bei den Versuchen deutlich. Je nach Länge der Inkubation betrug der Maximumrelease von 2000 bis 60000 counts per minute (cpm). Dies spiegelt die unterschiedliche Intensität der ^{51}Cr -Aufnahme durch die Monozyten wieder. Das Verhältnis von Maximum- zu Spontanrelease betrug bei 8 h das Zwei- bis Dreifache (Abb. 3.1.4), bei 24 h das Fünf- bis Sechsfache (Abb. 3.1.6) und bei 40 h das Dreifache (Abb. 3.1.7). Bei der 18-stündigen Inkubation war das Verhältnis am besten (Maximumrelease sechs- bis siebenmal höher als Spontanrelease, Abb.3.1.5). Für die weiteren Versuche wurden die infizierten als auch die uninfizierten Monozyten 18 h lang mit Chrom inkubiert.

3.1.1.3 Monozytenkonzentration

Die lange Inkubationszeit machte es notwendig, die Ausgangskonzentration der Monozyten zu erhöhen, um am Ende der Inkubation genügend Zellen zu erhalten. Weder bei der im Protokoll eingesetzten Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ noch bei der doppelten Zellzahl von 5×10^5 Zellen fand sich nach der 18-stündigen Inkubationszeit eine optimale Chrom-Freisetzung. Erst bei der Konzentration von 1×10^6 erhielt man ein Verhältnis von Maximum- zu Spontanrelease von bis zu 1:10.

Die Proben wurden in Triplets gemessen. Bei der Zellzahl von $2,5 \times 10^5$ wurde aufgrund der unzureichenden Isotopenaufnahme auf die Messung des 48-h-Wertes verzichtet.

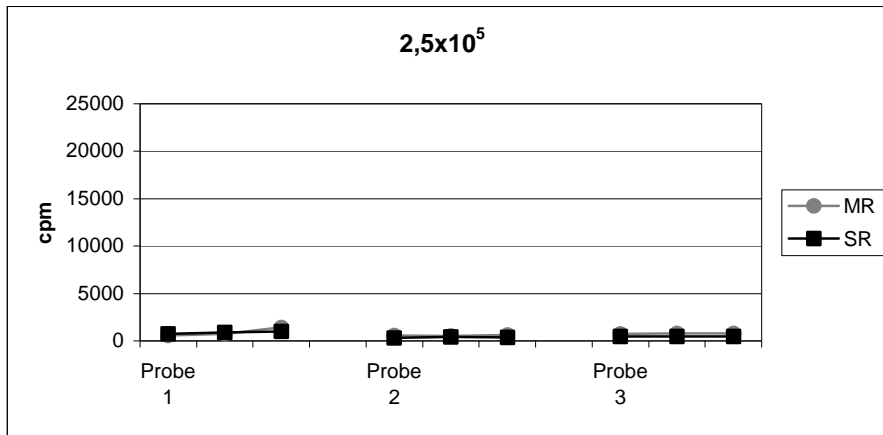


Abbildung 3.1.8

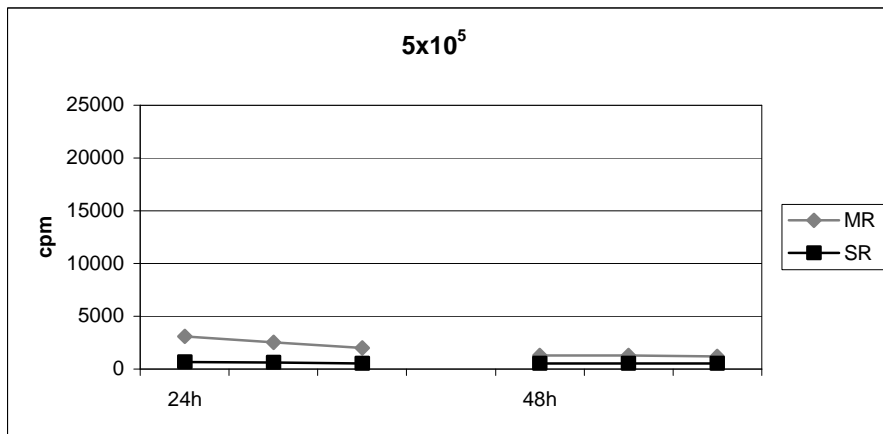


Abbildung 3.1.9

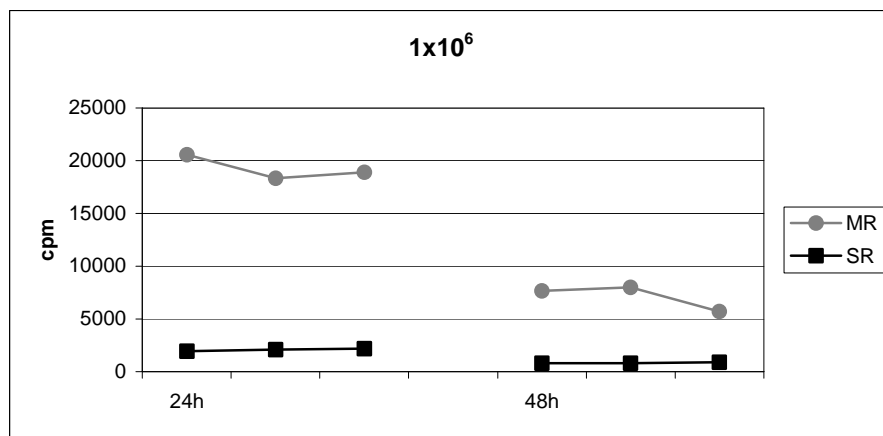


Abbildung 3.1.10

- cpm: counts per minute
- MR: Maximumrelease
- SR: Spontanrelease

3.1.2 K562

Jeweils zwei Tage vor der Inkubation mit Chrom wurde die Zelllinie gewaschen, auf 1×10^5 verdünnt und im Inkubator gelagert. Dieser Schritt war nötig, denn bei den vorhergehenden Versuchen ohne die Verdünnung fand keine Aufnahme von Chrom durch die K562-Zelllinie statt. Es wurden mehrere Probedurchläufe mit unterschiedlichen Verdünnungen vorgenommen. Diese zeigten ein Verhältnis von Spontan- zu Maximumrelease von mind. 1:10 und eine deutliche Lyse durch die Effektorzellen. Als Effektorzellen wurden sowohl unstimulierte als auch NK-Zellen, die über 48 h mit Interleukin-2 stimuliert wurden, verwendet.

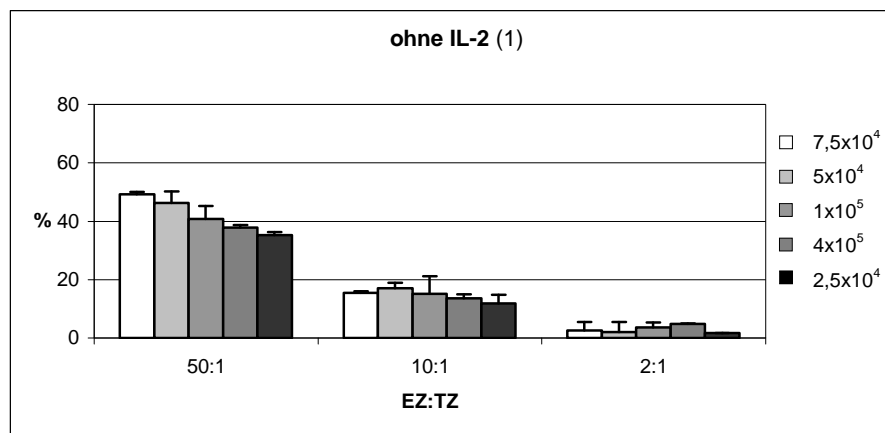


Abbildung 3.1.11

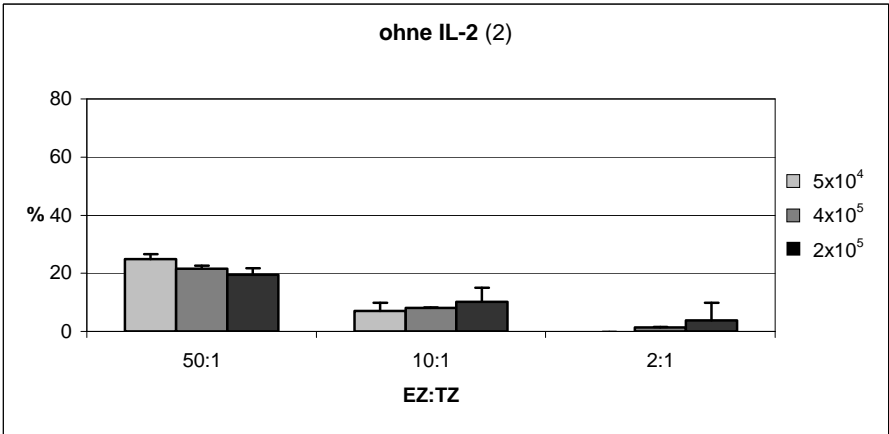


Abbildung 3.1.12

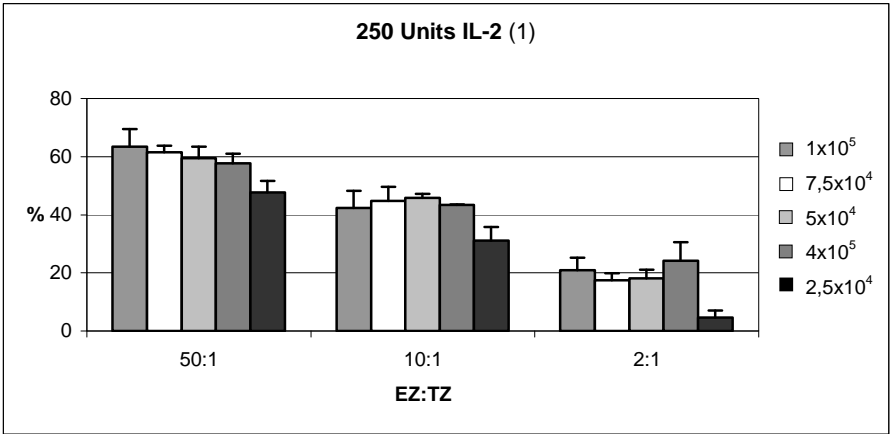


Abbildung 3.1.13

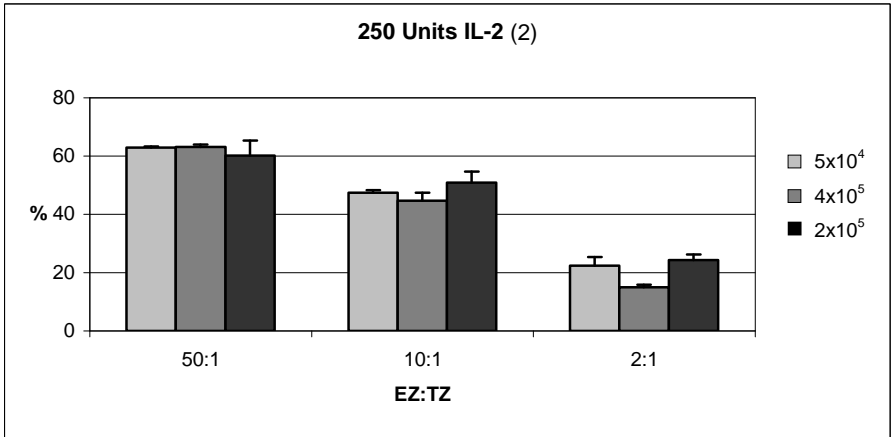


Abbildung 3.1.14

- IL-2: Interleukin-2
- %: Zellyse in Prozent
- EZ:TZ: Effektor- zur Targetzellratio
- 5×10^4 : Konzentration K562-Zellen

Für die weiteren Versuche wurde die 1×10^5 -Verdünnung eingesetzt. Zum einen wurde somit die Konzentration der Zellen möglichst gering gehalten, zum anderen konnte eine gute Lyse durch die Effektorzellen gemessen werden.

3.2 Messungen

3.2.1 1:1 Infektion

Das Infektionsverhältnis 1:1 war die niedrigste eingesetzte Infektionsdosis. Es wurden Lyseparameter zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Die Messungen fanden 24, 30 und 48 h nach Abschluss der Infektion statt (siehe 2.2.4). Die Lyse ließ sich am deutlichsten mit der höchsten Effektor- zur Targetzellratio (50:1) interpretieren. Die 10:1- und 2:1-Ratios waren schwächer und wiesen nur bedingt deutliche Unterschiede auf. Die Positivkontrolle mit der K562-Zelllinie zeigte sehr gute Empfänglichkeit gegenüber den natürlichen Killerzellen und erreichte somit Lyseraten von bis zu 90 % (Abb. 3.2.9).

3.2.1.1 Messung nach 24 Stunden

Der Vergleich von infizierten zu uninfizierten Zellen zeigte kein einheitliches Muster. Die Lyse der uninfizierten autologen Monozyten bewegte sich zwischen 20 und 36 %; die der infizierten Fraktion zwischen 18 und 37 % (Effektor- zur Targetzellratio 50:1). *Buffy-coat 1* und *5* zeigten eine höhere Lyse der infizierten Monozyten, wohingegen *Buffy-coat 3* ein umgekehrtes Bild ergab. Bei *Buffy-coat 1* und *4* fand sich kein Unterschied im Lysegrad. Wichtig anzumerken ist, dass der Unterschied zwischen der infizierten und uninfizierten Fraktion bei keinem der *Buffy-coats* mehr als 13 % betrug.

Die Lyse der heterologen, uninfizierten Monozyten variierte deutlich von Probe zu Probe und schwankte zwischen 28 und 49 % (Effektor- zur Targetzellratio 50:1). *Buffy-coat 3* zeigte ein bis zu 30 % höheres Killing als die beiden anderen Monozytenfraktionen, wohingegen *Buffy-coat 1* und *2* einen Unterschied von nur 5 bis 10 % aufwiesen. Bei *Buffy-coat 4* und *5* lag die Lyse der heterologen Monozyten sogar etwas unter der von der infizierten autologen Fraktion.

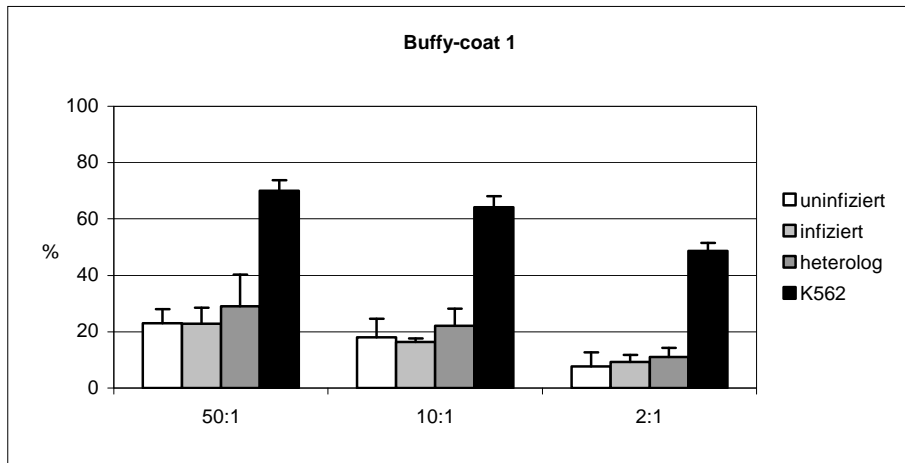


Abbildung 3.2.1

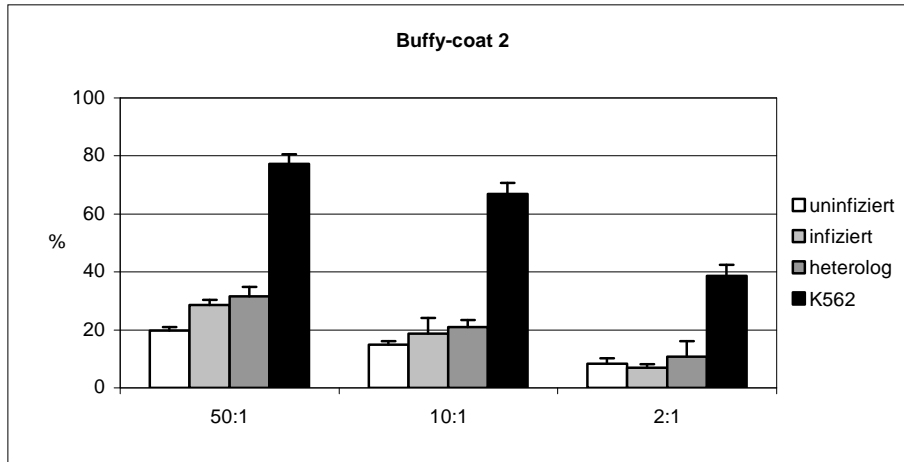


Abbildung 3.2.2

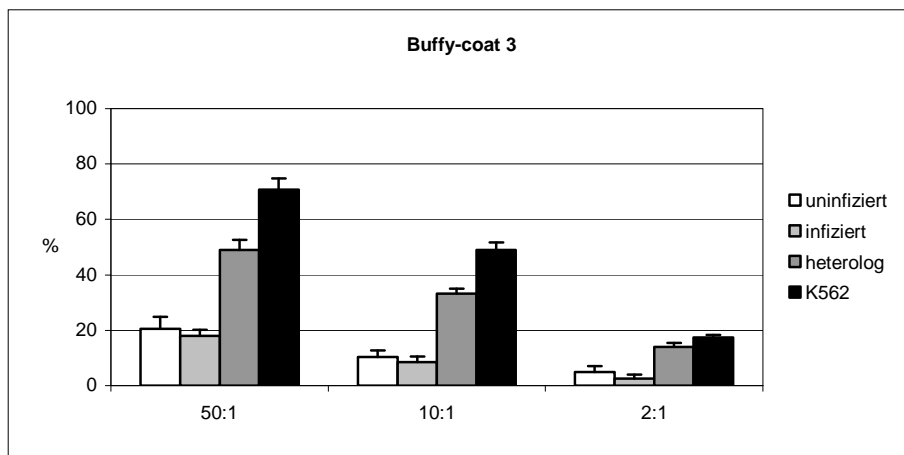


Abbildung 3.2.3

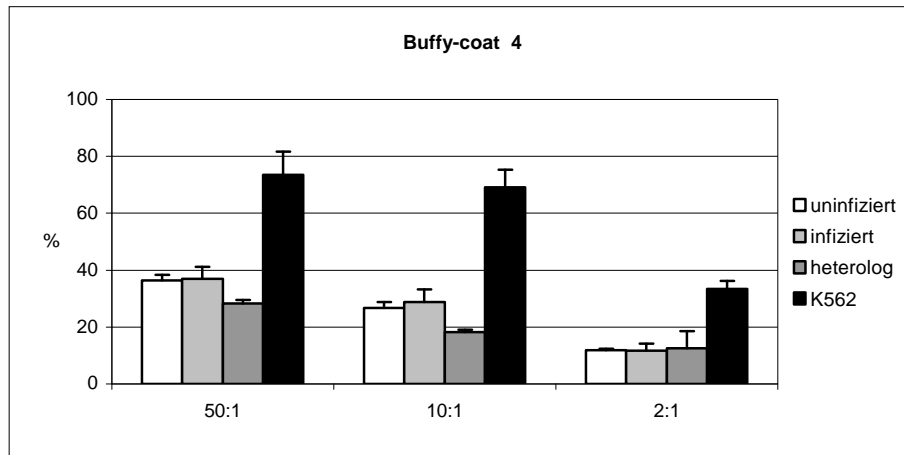


Abbildung 3.2.4

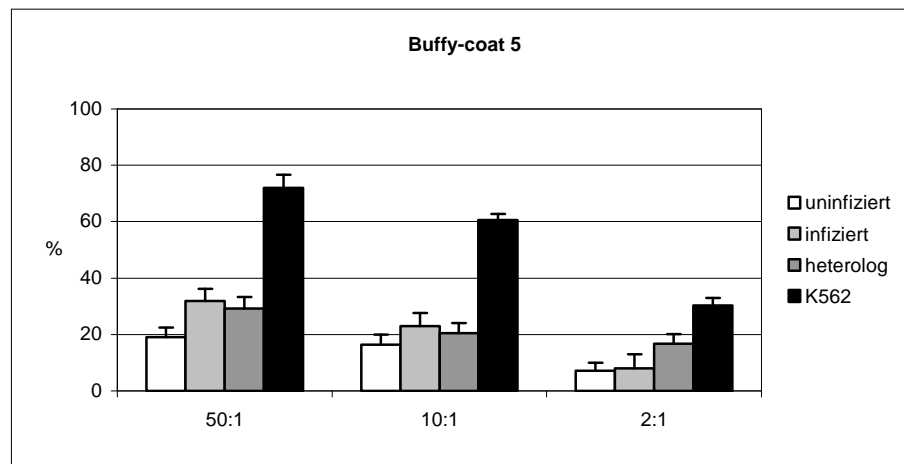


Abbildung 3.2.5

- %: Zellyse in Prozent
- 50:1/10:1/2:1 Effektor- zur Targetzellratio

- uninfizierte autologe Monozyten (Negativkontrolle)
- ▒ infizierte autologe Monozyten
- K562-Zellen (Positivkontrolle)
- uninfizierte heterologe Monozyten (Positivkontrolle)

3.2.1.2 Messung nach 30h

Die Ergebnisse für die infizierten als auch die uninfizierten Monozyten ähnelten den Werten für die 24-h-Versuche. Die infizierten Monozyten zeigten eine Lyse von 27 bis 42 % (Effektor- zur Targetzellratio 50:1), die Lyse der uninfizierten Monozyten hingegen bewegte sich im Bereich von 29 bis 43 % (Effektor- zur Targetzellratio 50:1). Bei den *Buffy-coats* 6, 8 und 9 fanden sich nur minimale Unterschiede zwischen den beiden Fraktionen, die 5 % nicht überschritten. Beim *Buffy-coat* 7 zeigte die infizierte Fraktion dagegen eine Lyse von 60 %, also 19 % höher als die uninfizierten Monozyten. Die heterologen Monozyten zeigten Ergebnisse im Bereich der beiden anderen Monozytenfraktionen (33 bis 50 %), mit Ausnahme des bereits erwähnten siebten *Buffy-coats*.

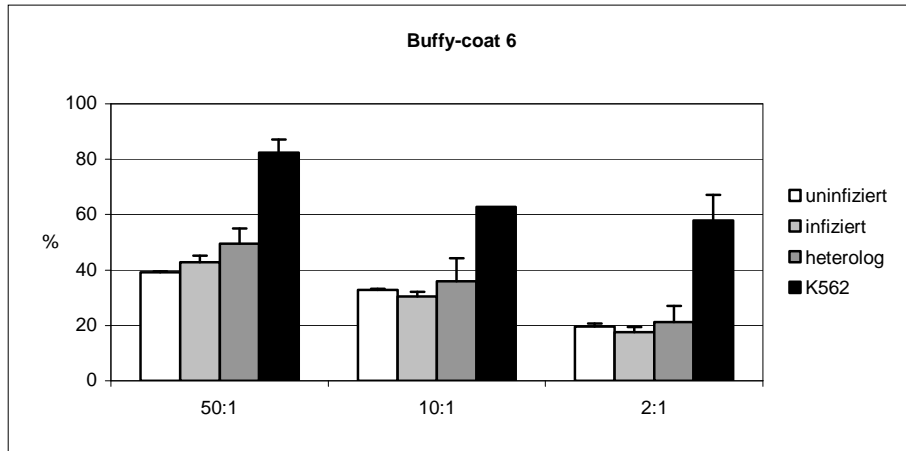


Abbildung 3.2.6

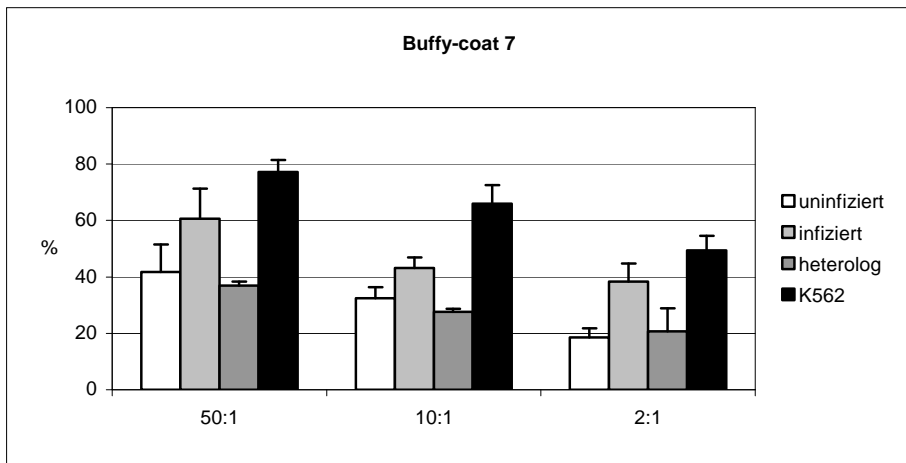


Abbildung 3.2.7

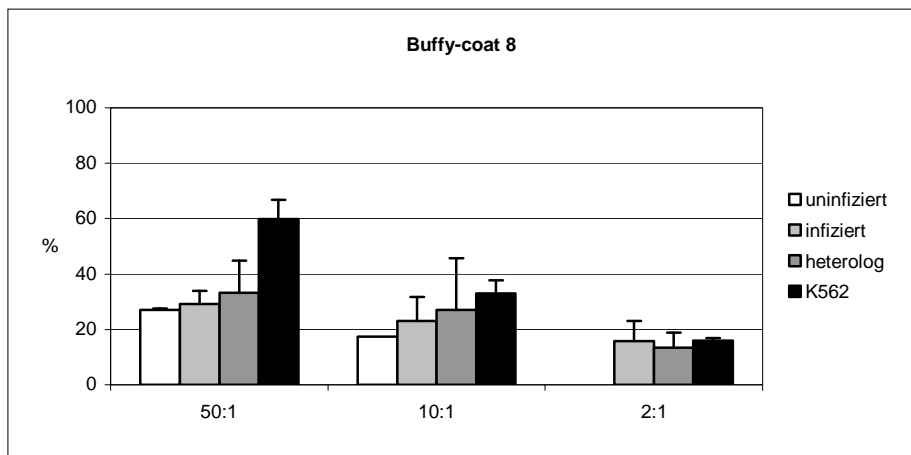


Abbildung 3.2.8

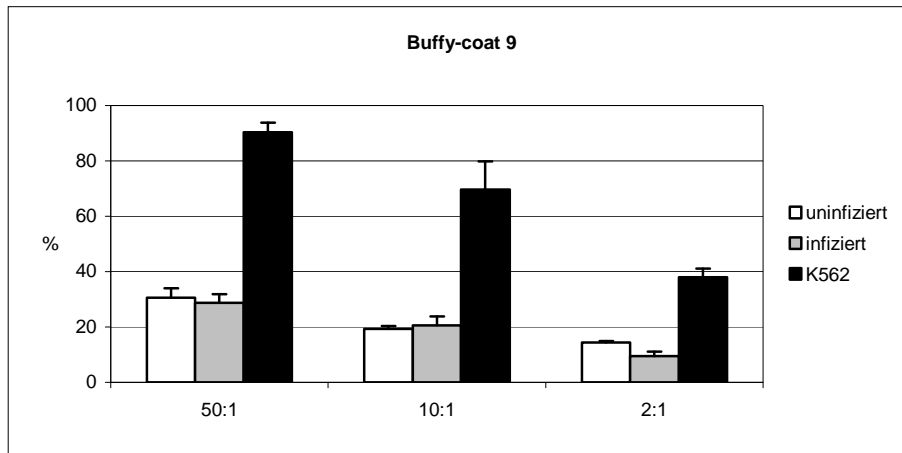


Abbildung 3.2.9

- %: Zellyse in Prozent
- 50:1/10:1/2:1 Effektor- zur Targetzellratio
- uninfizierte autologe Monozyten (Negativkontrolle)
- infizierte autologe Monozyten
- K562-Zellen (Positivkontrolle)
- uninfizierte heterologe Monozyten (Positivkontrolle)

3.2.1.3 Messung nach 48 Stunden

Die folgenden 48-h-Werte bilden die Folgemessungen für die in Abschnitt 3.2.1.1 dargestellten Proben. Die infizierte Fraktion fehlt bei diesen Messungen, da die Monozyten die Infektion über 48 h nicht überlebt haben. Somit entfällt der Vergleich zwischen den infizierten und den uninfizierten, autologen Monozyten.

Die Lyse der K562-Zelllinie ist auch in dieser Versuchsreihe mit Werten von bis zu 80 %, eindeutig. Die uninfizierten autologen Monozyten zeigten eine Lyserate von 13 bis 26 % (Effektor- zur Targetzellratio: 50:1). Die uninfizierten heterologen Monozyten wiesen mit 15 bis 35 % eine um bis zu 6 % höhere Lyse auf. Die höchste Differenz zwischen diesen beiden Zellfraktionen zeigte *Buffy-coat 3* auf, mit einer 17 % höheren Lyse der heterologen Monozyten.

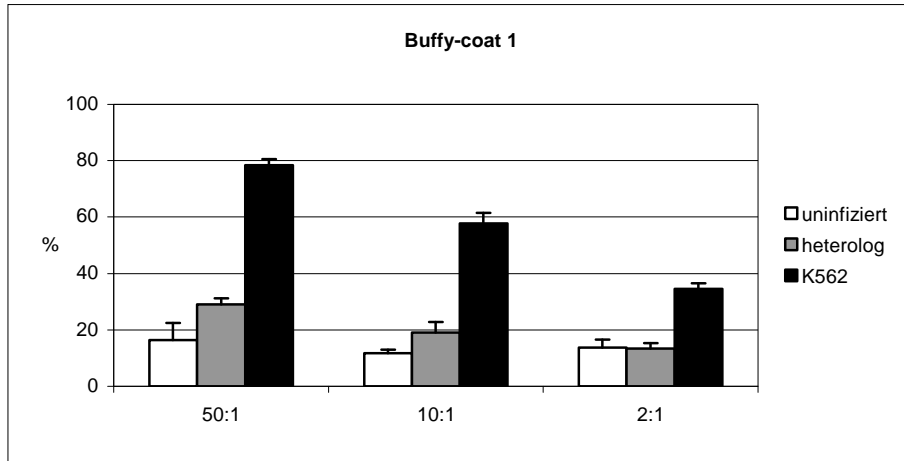


Abbildung 3.2.10

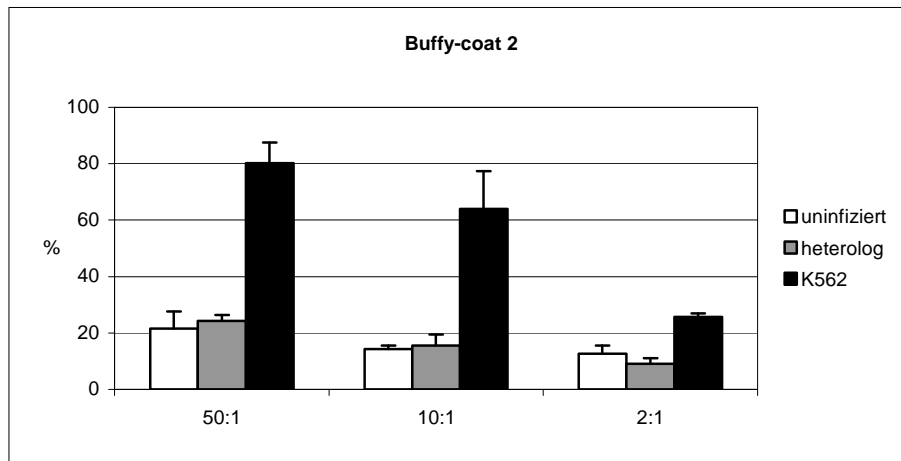


Abbildung 3.2.11

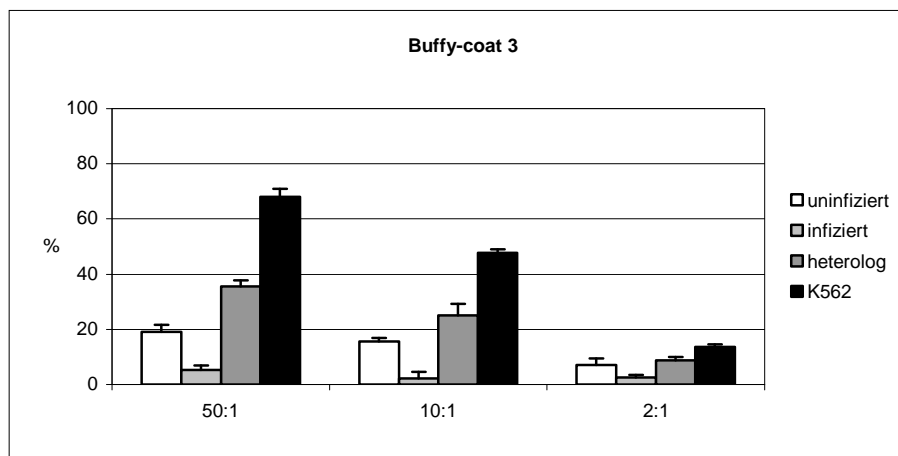


Abbildung 3.2.12

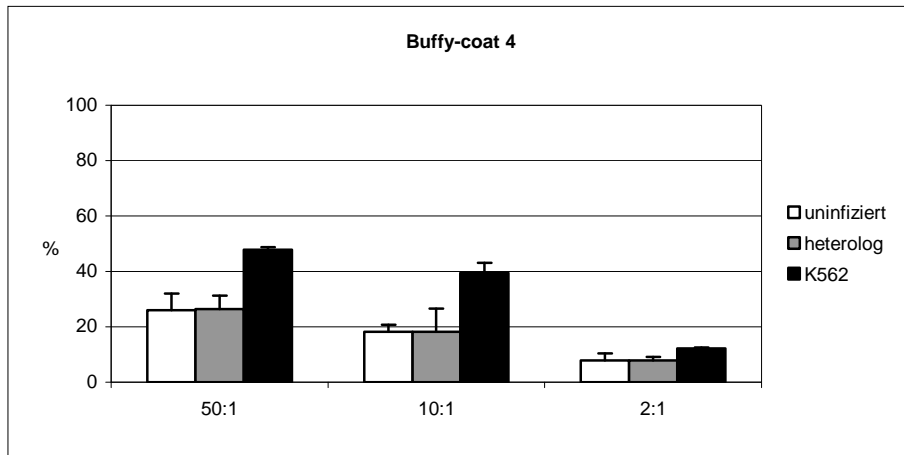


Abbildung 3.2.13

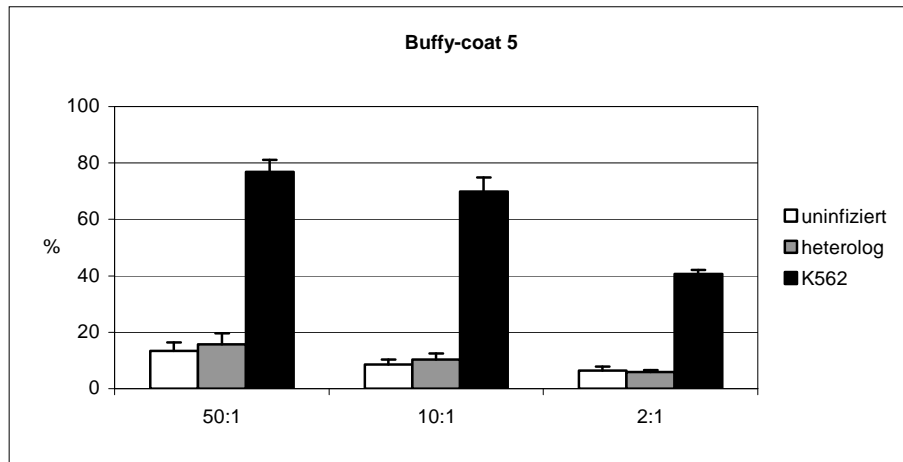


Abbildung 3.2.14

- %: Zellyse in Prozent
- 50:1/10:1/2:1 Effektor- zur Targetzellratio
- uninfizierte autologe Monozyten (Negativkontrolle)
- infizierte autologe Monozyten
- K562-Zellen (Positivkontrolle)
- uninfizierte heterologe Monozyten (Positivkontrolle)

3.2.2 10:1 Infektion

Es wurden Lyseparameter zu zwei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Die Messungen fanden 24 und 48 h nach Abschluss der Infektion statt (siehe 2.2.4). Die Lyse ließ sich am deutlichsten mit der höchsten Effektor- zur Targetzellratio (50:1) interpretieren. Die 10:1 und 2:1 Proben waren deutlich schwächer und wiesen nur bedingt deutliche Unterschiede auf. Die Positivkontrolle mit der K562-Zelllinie erreichte Lyseraten von bis zu 83 % (Abb. 3.2.20).

3.2.2.1 Messung nach 24 Stunden

Die 10:1-Infektionsdosis war die höchste Dosis, mit der gearbeitet werden konnte. Die lange Inkubationszeit kombiniert mit der Toxizität der Legionelleninfektion minimierte die Überlebensfähigkeit der Monozyten. Die infizierte Monozytenfraktion zeigte eine Lyserate von um die 20 % (Effektor- zur Targetzellratio 50:1). Die uninfizierte heterologe Fraktion zeigte ein breiteres Spektrum von 4 bis 22 %. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen betrug zwischen 4 und 17 % und war beim *Buffy-coat* 3 am höchsten. Die heterologen, uninfizierten Monozyten wiesen eine Lyse von 4 bis 18 % auf, wobei *Buffy-coat* 3 mit 10 % die höchste Lysedifferenz zu den uninfizierten, autologen Monozyten zeigte. Die Lyse der K562-Zelllinie betrug bis zu 75 % und war deutlich höher als die der anderen Zellpopulationen.

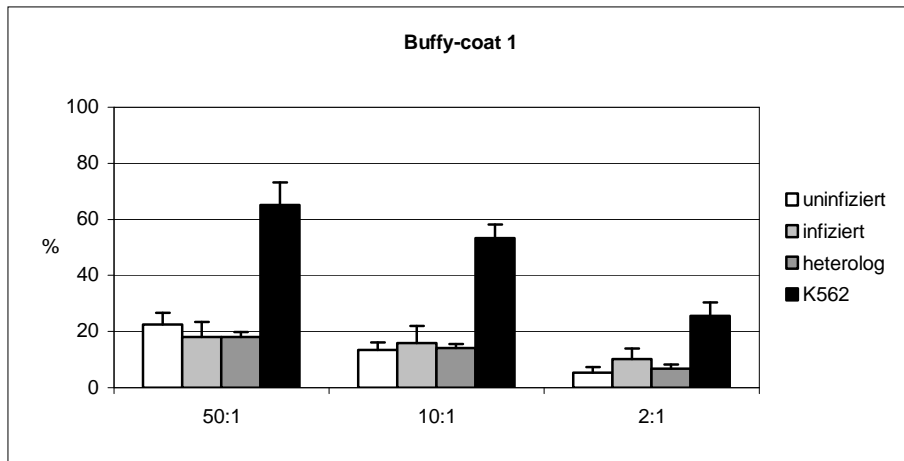


Abbildung 3.2.15

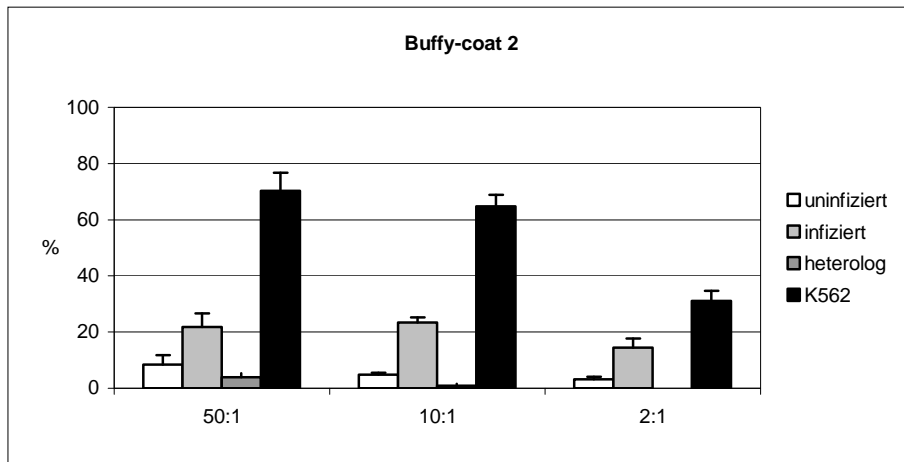


Abbildung 3.2.16

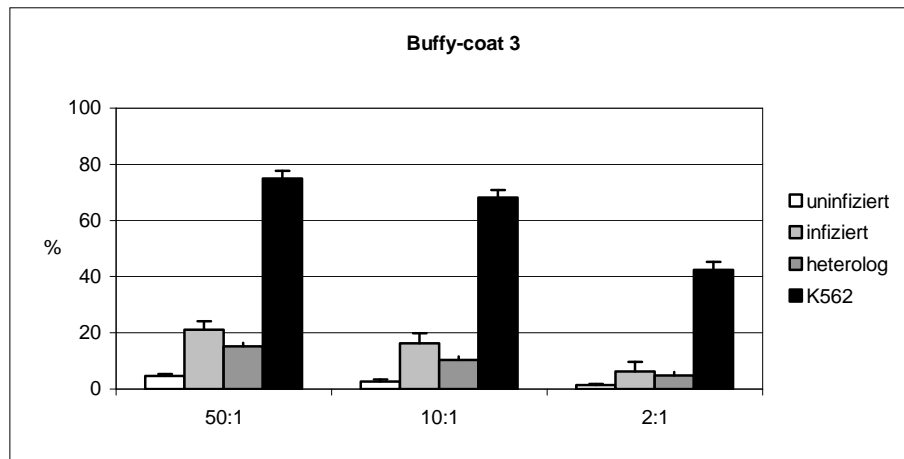


Abbildung 3.2.17

- %: Zellyse in Prozent
- 50:1/10:1/2:1 Effektor- zur Targetzellratio

- uninfizierte autologe Monozyten (Negativkontrolle)
- infizierte autologe Monozyten
- K562-Zellen (Positivkontrolle)
- uninfizierte heterologe Monozyten (Positivkontrolle)

3.2.2.2 Messung nach 48 Stunden

Die folgenden 48-h-Werte bilden die Folgemessungen für die in Abschnitt 3.2.2.1 dargestellten Proben (24-h-Messungen). Die Infektion erwies sich wie schon bei der 1:1-Infektionsdosis (3.2.1) als zu toxisch für die 48-h-Messungen. Somit konnten nur die uninfizierten Monozytenpopulationen miteinander verglichen werden. Die K562-Zelllinie zeigte eine Lyse von bis zu 83 % (Abb. 2.4.20). Die autologen Monozyten wiesen eine Lyserate von 4 bis 25 % auf, die heterologe Fraktion war mit 4 bis 28 % ähnlich angesiedelt. Der Unterschied zwischen diesen beiden Zellgruppen betrug 8 bis 23 %, mit der höchsten Differenz beim *Buffycoat 3*.

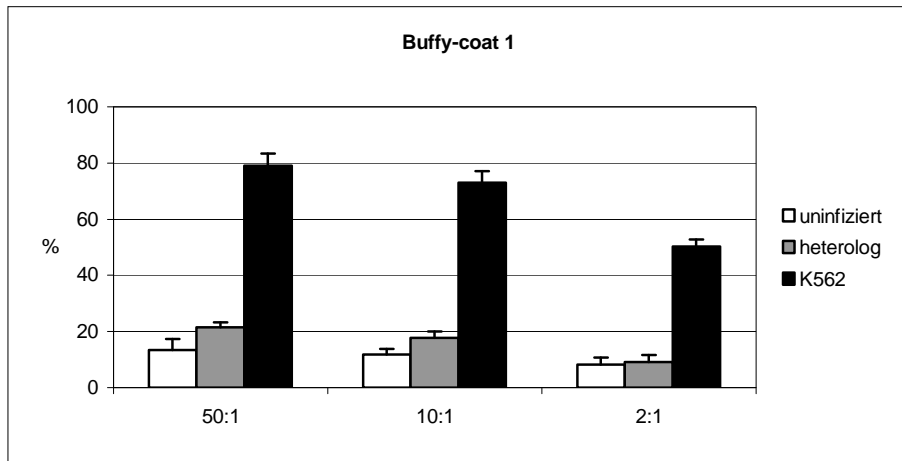


Abbildung 3.2.18

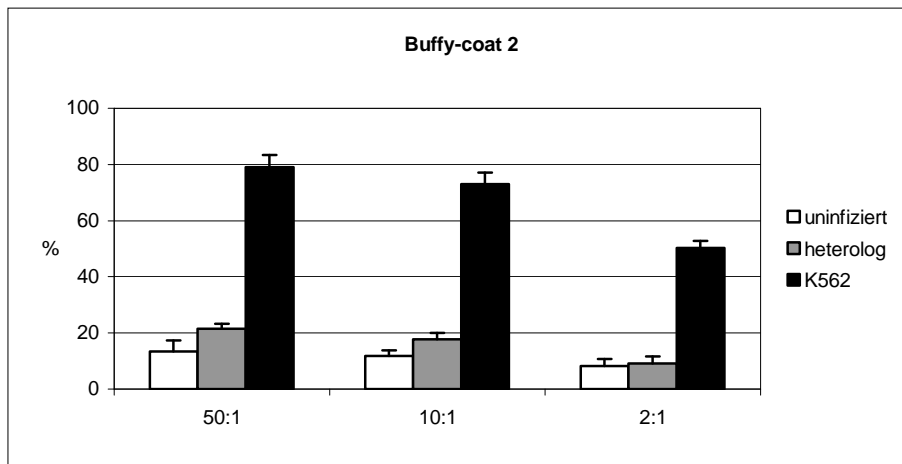


Abbildung 3.2.19

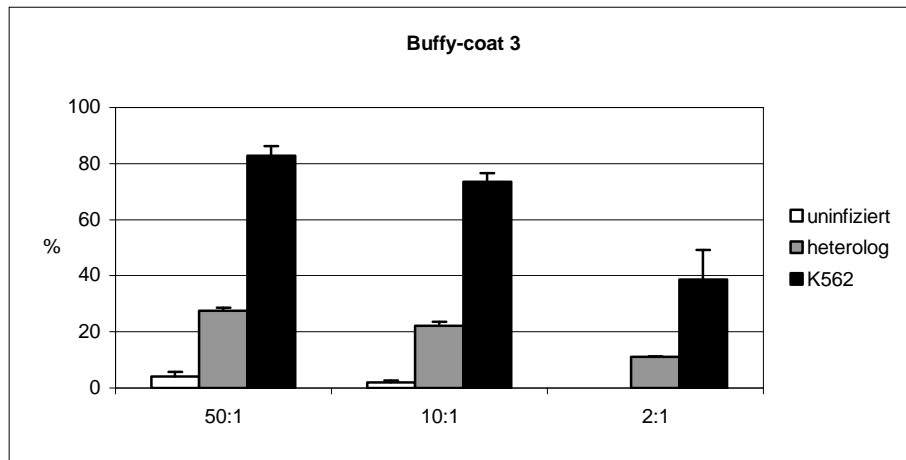


Abbildung 3.2.20

- %: Zellyse in Prozent
- 50:1/10:1/2:1 Effektor- zur Targetzellratio
- uninfizierte autologe Monozyten (Negativkontrolle)
- infizierte autologe Monozyten
- K562-Zellen (Positivkontrolle)
- uninfizierte heterologe Monozyten (Positivkontrolle)

4 DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob als Konsequenz der Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression auf von *L. pneumophila* infizierten Monozyten eine Aktivierung der natürlichen Killerzellen erfolgt.

Monozyten aus dem Buffy-coat gesunder Blutspender wurden mit *L. pneumophila* infiziert und die Lyse dieser Targetzellen durch natürliche Killerzellen (NK) mittels ^{51}Cr -Release-Essay wurde ermittelt.

Entscheidend war der Lysevergleich zwischen den infizierten und den uninfizierten autologen Monozyten. Es konnten zwei Gruppen von Ergebnissen gebildet werden. In der ersten Gruppe war die Lyse der infizierten Fraktion höher als die der uninfizierten. So zeigte bei der 1:1-Infektionsdosis ein Teil der Versuche ein Überwiegen der Lyse von infizierten Monozyten von bis zu 13 % 24 h nach der Infektion (Abb. 3.2.5) und bis zu 19 % bei den Versuchen nach 30 h (Abb. 2.4.7). Die 10:1-Infektion wies bei den 24-h-Messungen teilweise ein um bis zu 17 % höheres Killing auf (Abb. 3.2.15). In der zweiten Gruppe überwog weder die infizierte noch die uninfizierte Monozytengruppe bzw. die Lyse der infizierten Fraktion war geringfügig kleiner (bis zu 4 %). Bei den 24-h-Werten der 1:1-Infektion zeigt dies z.B. Abb. 3.2.1 und bei den 30-h-Werten Abb. 3.2.9. Bei den 24-h-Werten der 10:1-Infektion findet sich beispielsweise in Abb. 3.2.15 eine im Gegensatz den uninfizierten Monozyten schwächere Lyse der infizierten Fraktion.

Die Spannweite der Ergebnisse variierte von Spender zu Spender und es lässt sich keine allgemeingültige Aussage im Hinblick auf die Antwort der natürlichen Killerzellen treffen. Die Erklärung liegt zum einen in der Variabilität der HLA-I-Region und zum anderen in der Variabilität der Rezeptoren der natürlichen Killerzellen.

Wie bereits in der Einleitung dargestellt findet bei der Infektion mit der humanpathogenen *Legionella pneumophila* eine Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression um 50 % statt. Die teilweise schwache bzw. fehlende Lyse in den vorhergehenden Experimenten scheint dies nicht zu bestätigen. Beim Men-

schen jedoch spielt nicht nur der Grad der MHC-Klasse-I-Reduktion eine Rolle, sondern auch, welcher Klasse-I-Isotyp betroffen ist. Natürliche Killerzellen sind am empfindlichsten gegenüber Veränderungen in der HLA-C- Expression. Die Expression der HLA-B-Moleküle wird auch noch relativ gut überwacht, während Veränderungen im Expressionsgrad von HLA-A kaum eine Antwort der natürlichen Killerzellen triggern ¹¹⁷.

Auf der anderen Seite unterliegen die Haplotypen der KIR-Rezeptoren als den HLA-Bindungspartnern auf den natürlichen Killerzellen ebenfalls den Gesetzen der Variabilität, indem sie Unterschiede hinsichtlich ihrer Anzahl und Spezifität aufweisen. So kann z.B. das Rezeptorrepertoire eines Spenders von dem inhibitorischen CD94-NKG2A-Rezeptor dominiert werden. Da dieser für HLA-E spezifisch ist ⁷³ und die Infektion nur eine HLA-I-Reduktion zur Folge hat, erhält man einen geringen bzw. keinen Effekt. Wird aber die Rezeptorbandbreite von KIR2DL dominiert und das korrespondierende HLA-C-Molekül ist auf der Targetzelle nach unten reguliert, kann ein guter Effekt erzielt werden. Selbst bei zwei HLA-identischen Spendern können abhängig von den verschiedenen KIR-Haplotypen unterschiedliche Antworten getriggert werden.

Beide Mechanismen könnten zur Interpretation der Ergebnisse herangezogen werden und die Lyseunterschiede zwischen den individuellen Spendern erklären. Fest steht, dass in keinem der Versuche die Lyse der infizierten Monozyten die Lyse der uninfizierten autologen Monozyten um mehr als 19 % überstieg, während die K562-Zelllinie Lyseraten von 47 bis 90 % (höchste Effektor- zur Targetzellratio 50:1) zeigte. Immunkompetente Individuen sind in der Regel gegenüber einer Infektion mit *L. pneumophila* sehr gut gerüstet. Sie zeigen zwar eine grippeähnliche Symptomatik, genesen aber relativ zügig. Kann eine Lyse von 20 % diesen entscheidenden Unterschied ausmachen? Es muss innerhalb des angeborenen Immunsystems ein sehr effektiver Mechanismus existieren, um die potenzielle Letalität der Legionelleninfektion abwehren zu können. Nachdem die natürlichen Killerzellen in der vorliegenden Arbeit keine Lyse der infizierten Monozyten gezeigt haben, kann versucht werden die Infektabwehr der immunkompetenten Personen mit Hilfe der T-Lymphozyten zu erklären. Möglicherweise reicht die durch *Legionella pneumophila* induzierte Reduktion

der MHC-Klasse-I-Expression nicht aus, um eine Antwort der natürlichen Killerzellen zu triggern. Die durch das Molekül präsentierten Peptide aber könnten durchaus durch T-Zellen erkannt werden und eine entsprechende Immunantwort triggern. Die Zytokininduktion durch Legionellen könnte insbesondere T-Helferzellen aktivieren, von denen zwei Subtypen (Th1, Th2) anhand ihrer Zytokinprofile identifiziert werden konnten^{51,52}. Th1-Zellen sind mit den sezernierten Zytokinen IFN- γ , TNF und IL-2 an der zellvermittelten Immunität, insbesondere der Abwehr von intrazellulären Erregern beteiligt⁵³. Bedeutsam für die Steuerung der Immunantwort gegenüber angreifenden Mikroben ist die Balance der Th1- und Th2-Zytokinantwort^{51,52}. Experimentelle Modelle von durch *Leishmania spp.*^{57,58}, *Toxoplasma gondii*⁵⁹, *Mykobakterium spp.*⁶⁰, *Lysteria monocytogenes*⁶¹ und *Candida albicans*⁶² verursachten Erkrankungen haben die kritische Rolle des Th1/Th2-Gleichgewichtes bei infektionsinduzierter Reaktion des Immunsystems aufgezeigt. Nur einige klinische Infektionen, wie die durch *Mycobacterium tuberculosis* verursachte Pleuritis⁶³, Lepra⁶⁴ und Leishmaniose⁶⁵ wurden auf ihren Immunstatus untersucht. Sie wiesen aufgrund des Zytokinmusters ein Überwiegen der Th1-Antwort auf. Mehrere Studien konnten anhand von Zytokinprofilen auf die Bedeutung der Th1-Antwort bei *Legionella pneumophila* hinweisen^{54,67,118}. Eine auf diese Weise vermittelte Antwort könnte auch die Anfälligkeit von immunsupprimierten Individuen, insbesondere älteren Personen, gegenüber einer Legionelleninfektion erklären.

Das Wissen über immunologische Veränderungen im Alter ist noch gering, fest steht aber, dass vor allem T-Zellen eine Funktionsminimierung erfahren⁶⁸. In der dritten Lebensdekade ist die Aktivierung der T-Zellen erheblich eingeschränkt⁶⁹ und das Zytokinmuster scheint sich von einer Th1- zu einer Th2-Antwort zu verschieben.^{70,71} Eine geringere Proliferationsrate und eine verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem CD96 sind weitere Kennzeichen des Alterungsprozesses⁶⁹.

Auf welche Art und Weise die *L.-pneumophila*-Antigene den zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) präsentiert werden und ob diese an der Lyse von infizierten Monozyten beteiligt sind, ist bisher nicht untersucht worden. Bekannt sind mehrere alternative Wege zur Triggerung einer CD8⁺-Antwort. Ein Mechanismus bein-

haltet die direkte Injektion vom pathogenen Material in das Zytosol der antigenpräsentierenden Zelle, was eine Antigenverarbeitung durch die herkömmliche Prozessierungsmaschinerie für MHC-Klasse-I-Moleküle (Kap. 1.9) zur Folge hat. Dieses Phänomen konnte bereits bei Viren und intrazellulären Bakterien wie *Lysteria monocytogenes* beobachtet werden ^{119,120}. Die Fähigkeit von Legionellen Poren in eukaryotische Membranen zu inserieren ¹²¹ und die Präsenz des Typ-IV-Sekretionssystems ¹²² könnte die Überbringung des *Legionella*-Antigens in das Zytosol ermöglichen.

Einige Studien haben zeigen können, dass auch ein alternativer, TAP-unabhängiger Weg existiert. TAP-defiziente Makrophagen waren in der Lage Antigene von *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und mehreren Viren zu verarbeiten und an der Oberfläche zu präsentieren ^{123,124}. Die Prozessierung erfolgt in der Regel endosomal und kann auf zweierlei Weise geschehen. Möglich ist eine direkte endosomale Beladung von recycelten MHC-Klasse-I-Molekülen mit den Antigenpeptiden oder es findet eine Regurgitation der Peptidantigene aus dem endosomalen Kompartiment an die Zelloberfläche statt und die Peptide assoziieren dort mit präformierten MHC-Klasse-I-Molekülen ^{125,126}. Im letzteren Fall ist IFN- γ ein entscheidender Stimulus für die Peptidsekretion durch den Makrophagen. Es ist möglich, dass diese Aktivierung eine proteolytische Aktivität innerhalb des Phagolysosoms induziert und die so generierten Peptide, denen durch ein Proteasom prozessierten ähneln ¹²⁷.

Eine mögliche Erklärung für die in der FACS-Analyse bewiesene Reduktion von MHC-Klasse-I ist die Bindung des Chaperons Calnexin durch *L. pneumophila*. Verschiedene Ergebnisse deuten darauf hin, dass es die Expression von mehreren NK-Zielstrukturen kontrolliert. Calnexin-defiziente Zelllinien zeigen eine geringere NK-Sensitivität, die durch die geringere Expression von Adhäsionsmolekülen, die Calnexin für ihre Oberflächenpräsentation benötigen, erklärt werden könnte. Umgekehrt führt die Inkubation von NK-Zellen mit Calnexinproduzierenden Targetzellen zu einer signifikanten Erhöhung der CD69-Expression. Calnexin kontrolliert also die Expression von Strukturen auf Targetzellen, die zur Bindung und Aktivierung von NK-Zellen beitragen. ^{128,129}. Mögli-

cherweise verhindert *L. pneumophila* durch Bindung des Chaperons eine für das eigene Überleben gefährliche Aktivierungskaskade.

Die dokumentierten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es sich bei der Infektion mit *L. pneumophila* um einen Immunevasionsmechanismus handelt, der zur Verminderung der MHC-Klasse-I-Expression in Legionellen-infizierten Monozyten führt und in ähnlicher, aber im molekularen Mechanismus unterschiedlicher Weise bisher nur bei einigen Viren bekannt ist.

So ist z.B. die Reduzierung von Klasse-I-Molekülen durch HIV locuspezifisch^{80,130}. Das Nef-Protein ist an der Internalisierung von HLA-A und HLA-B, jedoch nicht von HLA-C oder HLA-E beteiligt. Der Grad der HLA-C-Expression von infizierten Zellen ist im Allgemeinen geringer als von HLA-A und HLA-B und hat somit geringere Chancen eine angemessene Reaktion der zytotoxischen T-Zellen zu provozieren. Es ist aber immer noch in der Lage mit inhibitorischen NK-Rezeptoren zu interagieren, um eine Aktivierung ebendieser zu verhindern¹³¹. Herpes-simplex-Viren vermindern die HLA-Klasse-I-Expression durch eine Inhibierung der Reifung und des Transports des Moleküls^{132,133}. Das Cytomegalievirus (CMV) weist ein Genprodukt (UL18) auf, das große Strukturähnlichkeit zur schweren Kette der MHC-Klasse-I besitzt und auch β_2 -Mikroglobulin binden kann¹³⁴. Dieses Protein interagiert mit einem inhibitorischen NK-Zellrezeptor aus der *immunoglobulin-like* Rezeptorfamilie.¹³⁵

Ebenso lohnt der Vergleich mit anderen intrazellulären Bakterien. Ein bedeutender Vertreter dieser Gruppe ist das Mykobakterium. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ruft beim Rind eine chronische granulomatöse Enteritis hervor. Infizierte Makrophagen zeigen nach 24 h eine deutliche Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression, die auch durch Gabe von Ginterferon nicht atenuiert werden kann. Die Reduktion der Klasse-I-Moleküle erlaubt es dem Bakterium scheinbar, einem Killing durch das zellvermittelte Immunsystem zu entgehen. Die Inkubation mit Lymphozyten ergibt nur eine leichte Abnahme von lebensfähigen Zellen. *Mycobacterium avium* subsp. *avium* als nichtpathogener Organismus zeigt keine Änderung in der Klasse-I-Expression und weist zudem einen Anstieg dieser Expression nach Zugabe von γ -Interferon auf. Die Inkubation mit

Lymphozyten resultiert somit auch in einer deutlichen Lyse der infizierten Makrophagen.

Entscheidend bei der Infektion mit *Mykobakterium avium* subsp. *paratuberculosis* ist die Reduktion von antigenpräsentierenden Molekülen. Dies kann eine Kette von Ereignissen zur Folge haben. Die zellvermittelte Immunität bei der Erkrankung wird verzögert, das Bakterium erhält die Chance zur Proliferation und das Immunsystem verpasst die Möglichkeit zur Pathogenbeseitigung¹³⁶.

Mit *L. pneumophila* infizierte Alveolarmakrophagen zeigen hingegen eine deutlich verbesserte Lyse der Bakterien nach Gabe von γ -Interferon. Die Verzögerung der MHC-Klasse-I-Abnahme während der *Legionella pneumophila* Infektion hält aber nur über die ersten zwölf Stunden an (Faigle, nicht publizierte Daten).

Beim *Mykobakterium tuberculosis* konnte keine Veränderung der Expression von klassischen MHC-Molekülen festgestellt werden¹³⁷.

Lysteria monocytogenes als ein weiterer Vertreter der intrazellulären Bakterien vermindert ebenfalls die MHC-Klasse-I-Expression auf infizierten Makrophagen. Die nicht-pathogene Spezies *Lysteria innocua* hat keinen Effekt auf die Oberflächenexpression des Moleküls¹³⁸.

Die Infektion mit Enterobakterien wie Salmonella, Yersinia oder Klebsiella ist gleichfalls in der Lage die Expression von Klasse-I-Molekülen in vivo zu verringern. Dies geschieht interessanterweise hauptsächlich bei Patienten mit einem HLA-B27-Genotyp¹³⁹, welcher für eine Gruppe von rheumatischen Erkrankungen verantwortlich ist¹⁴⁰.

Die fehlende Stimulation der natürlichen Killerzellen durch die Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression auf infizierten Monozyten kann also als ein Immunevasionsmechanismus gedeutet werden. Die individuelle Variabilität zwischen den Spendern kann durch Unterschiede in der Rezeptorspezifität der natürlichen Killerzellen und ihre vom HLA-Typ abhängige Reaktionsintensität erklärt werden. Es bleibt jedoch offen, auf welchem Wege die Immunantwort im Organismus initiiert und die Infektion limitiert wird.

5 AUSBLICK

Eine Abnahme der MHC-Klasse-I-Expression wurde nur bei *L. pneumophila* beobachtet. Die nicht-pathogenen Spezies greifen in diesen Bereich der Oberflächenexpression nicht ein. Da in dieser Arbeit keine signifikante Antwort der natürlichen Killerzellen gegenüber den pathogenen Spezies beobachtet werden konnte, gewinnen die weiteren Vertreter des angeborenen Immunsystems an Bedeutung. Reicht der Grad der MHC-Klasse-I-Expression für die CD8⁺ T-Lymphozyten aus, um das gebundene Peptid zu erkennen und die infizierte Zelle zu zerstören ?

Ein weiteres interessantes Forschungsziel ist die Aufklärung der Interaktion zwischen den infizierten Monozyten und den natürlichen Killerzellen. Wie bereits diskutiert wurde, ist das Ausmaß der Killerzellantwort abhängig von dem exprimierten HLA-Molekül. Welchen HLA-Genotyp weist der Blutspender auf? Ist der Einfluss von *L. pneumophila* beschränkt auf einen bestimmten Typ?

Die Auswirkungen der verminderten Expression von klassischen MHC- Molekülen auf die HLA-E-Präsentation sind ebenfalls zu untersuchen. Ist das Ausmaß der HLA-E-Expression ausreichend, um eine Abnahme von MHC- Klasse-I-Molekülen auszubalancieren und die Aktivierung der natürlichen Killerzellen zu verhindern?

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob als Konsequenz der Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression auf von *L. pneumophila* infizierten Monozyten eine Aktivierung der natürlichen Killerzellen erfolgt.

Monozyten aus dem Buffy-coat gesunder Blutspender wurden mit *L. pneumophila* infiziert und die Lyse dieser Targetzellen durch natürliche Killerzellen (NK) mittels ^{51}Cr -Release-Essay wurde ermittelt.

Das Infektionsverhältnis von 1:1 war die niedrigste eingesetzte Infektionsdosis. Bei den Messungen 24 h nach der Infektion wies der Vergleich von infizierten mit uninfizierten Zellen kein einheitliches Muster der Zytolyse auf. Je nach Spender zeigte sich sowohl ein geringes Überwiegen der Lyse infizierter als auch der Lyse uninfizierter Monozyten. Dies kann zum einen mit der Variabilität der HLA-I-Region und zum anderen mit der Variabilität der Rezeptoren der natürlichen Killerzellen erklärt werden. Auch unterliegen die Haplotypen der KIR-Rezeptoren als den HLA-Bindungspartnern auf den natürlichen Killerzellen ebenfalls den Gesetzen der Variabilität, indem sie Unterschiede hinsichtlich ihrer Anzahl und Spezifität aufweisen. Die gleiche Beobachtung konnte bei Messungen 30 h nach der Infektion gemacht werden. 48-h-Werte konnten für die infizierte Fraktion nicht ermittelt werden, denn im Laufe der Vorversuche hat sich gezeigt, dass die einstündige Inkubationszeit der humanen Monozyten mit ^{51}Cr nicht ausreicht, um eine gute Aufnahme in die Zelle zu gewährleisten. Erst bei einer Inkubationsdauer von 18 h konnte das Isotop in entsprechender Menge in den Zellstoffwechsel eingebaut werden. Dies und die Toxizität der Legionelleninfektion haben es nicht möglich gemacht, die Infektion über 30 h hinaus zu erhalten.

Das Infektionsverhältnis von 10:1 war die höchste Infektionsdosis, mit der gearbeitet werden konnte. Auch hier zeigte sich 24 h nach der Infektion eine spenderabhängige individuelle Variabilität. Der 48-h-Wert konnte wie bei der 1:1-Infektion für die infizierte Fraktion nicht ermittelt werden.

Insgesamt war bei den Versuchsreihen die Lyse der infizierten gegenüber den uninfizierten Monozyten maximal um 19 % höher.

Möglicherweise reicht die durch *L. pneumophila* induzierte Reduktion der MHC-Klasse-I-Expression nicht aus, um eine Antwort der natürlichen Killerzellen zu triggern. Die durch das Molekül präsentierten Peptide aber könnten durchaus durch T-Zellen erkannt werden und eine entsprechende Immunantwort auslösen. Auf welche Art und Weise die *L.-pneumophila*-Antigene den zytotoxischen T-Zellen (CD8⁺) präsentiert werden und ob diese an der Lyse von infizierten Monozyten beteiligt sind, ist bisher nicht untersucht worden.

Die dokumentierten Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass es sich bei der Reduktion der HLA-Klasse-I-Expression durch *L. pneumophila* um einen Immunevasionsmechanismus handelt, der in ähnlicher, aber im molekularen Mechanismus unterschiedlicher Weise bisher nur bei einigen Viren bekannt ist und auch bei anderen intrazellulären Bakterien noch Gegenstand weiterer Forschung ist.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Glick, T. H. et al. Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol* **107**, 149-60 (1978).
2. Winn, W. C. Legionnaires disease: historical perspective. *Clin Microbiol Rev* **1**, 60-81 (1988).
3. Neumeister, B., Woerndle, S. & Bartmann, P. Effects of different surfactant preparations on bacterial growth in vitro. *Biol Neonate* **70**, 128-34 (1996).
4. Rusin, P. A., Rose, J. B., Haas, C. N. & Gerba, C. P. Risk assessment of opportunistic bacterial pathogens in drinking water. *Rev Environ Contam Toxicol* **152**, 57-83 (1997).
5. Fields, B. S. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* **4**, 286-90 (1996).
6. Luck, P. C. et al. Prevalence of Legionella species, serogroups, and monoclonal subgroups in hot water systems in south-eastern Germany. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **193**, 450-60 (1993).
7. Palmer, C. J., Tsai, Y. L., Paszko-Kolva, C., Mayer, C. & Sangermano, L. R. Detection of Legionella species in sewage and ocean water by polymerase chain reaction, direct fluorescent-antibody, and plate culture methods. *Appl Environ Microbiol* **59**, 3618-24 (1993).
8. Nagington, J. & Smith, D. J. Pontiac fever and amoebae. *Lancet* **2**, 1241 (1980).
9. Kwaik, Y. A. Fatal attraction of mammalian cells to Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **30**, 689-95 (1998).
10. Tyndall, R. L. & Domingue, E. L. Cocultivation of Legionella pneumophila and free-living amoebae. *Appl Environ Microbiol* **44**, 954-9 (1982).
11. Cirillo, J. Legionella pneumophila in Acanthamoeba castellanii enhances invasion. *Infect Immun* **62**, 3254-61 (1994).

12. Abu Kwaik, Y., Gao, L. Y., Harb, O. S. & Stone, B. J. Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Mol Microbiol* **24**, 629-42 (1997).
13. Bozue, J. A. & Johnson, W. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun* **64**, 668-73 (1996).
14. Atlas, R. M. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environmental Microbiology* **1**, 283-293 (1999).
15. Reingold, A. L. et al. *Legionella* pneumonia in the United States: the distribution of serogroups and species causing human illness. *J Infect Dis* **149**, 819 (1984).
16. Gagnon, E. et al. Endoplasmatic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 5-8 (2002).
17. Wieland, H., Goetz, F. & Neumeister, B. Phagosomal acidification is not a prerequisite for intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in human monocytes. *J Infect Dis* **189**, 1610-4 (2004).
18. Skurgill-Koszycki, S. & Swanson, M. S. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J Exp Med* **192**, 1261-72 (2000).
19. Berger, K. H. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **7**, 7-19 (1993).
20. Dournon, E. Monoclonal antibody reactivity as a virulence marker for *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Infect Dis* **157**, 496-501 (1988).
21. Marre, A. Genetics of *Legionella pneumophila* virulence. *Annu Rev Genet* **26**, 51-69 (1992).
22. Wintermeyer, E. et al. Influence of site specifically altered Mip proteins on intracellular survival of *Legionella pneumophila* in eukaryotic cells. *Infect Immun* **63**, 4576-83 (1995).

23. Hacker, J., Ott, M., Wintermeyer, E., Ludwig, B. & Fischer, G. Analysis of virulence factors of *Legionella pneumophila*. *Zentralbl Bakteriol* **278**, 348-58 (1993).
24. Cianciotto, N. P. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int J Med Microbiol* **291**, 331-43 (2001).
25. Brand, B. C., Sadosky, A. B. & Shuman, H. A. The *Legionella pneumophila* *icm* locus: a set of genes required for intracellular multiplication in human macrophages. *Mol Microbiol* **14**, 797-808 (1994).
26. Vogel, J. P. & Isberg, R. R. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 30-4 (1999).
27. Van Kaer, L. Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* **23**, 205-14 (2001).
28. Coers, J. et al. Identification of *Icm* protein complexes that play distinct roles in the biogenesis of an organelle permissive for *Legionella pneumophila* intracellular growth. *Mol Microbiol* **38**, 719-736 (2000).
29. Dumenil, G. & Isberg, R. R. The *Legionella pneumophila* *IcmR* protein exhibits chaperone activity for *IcmQ* by preventing its participation in high-molecular-weight complexes. *Mol Microbiol* **40**, 1113-1127 (2001).
30. Coers, J., Monahan, C. & Roy, C. R. Modulation of phagosome biogenesis by *Legionella pneumophila* creates an organelle permissive for intracellular growth. *Nature Cell Biology* **1**, 451-53 (1999).
31. Luo, Z. Q. & Isberg, R. R. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* *Dot/Icm* system identified by interbacterial protein transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 841-6 (2004).
32. Stout, J. E. & Yu, V. L. Legionellosis. *N Engl J Med* **337**, 682-7 (1997).
33. Lowry, P. W. Nosocomial Legionellosis: a review of pulmonary and extrapulmonary syndromes. *Am J Infect Control* **21**, 21-7 (1993).
34. Nelson, D. *Legionella pneumophila* pericarditis without pneumonia. *Arch Intern Med* **145**, 926 (1985).
35. Tompkins, L. S. *Legionella* prosthetic-valve endocarditis. *N Engl J Med* **318**, 530-5 (1988).

36. Carratala, J. et al. Risk factors for nosocomial *Legionella pneumophila* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* **150**, 1209 (1994).
37. Kaufmann, A. F. et al. Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol* **114**, 337-47 (1981).
38. Fields, B. S. et al. Pontiac fever due to *Legionella micdadei* from a whirlpool spa: possible role of bacterial endotoxin. *J Infect Dis* **184**, 1289-92 (2001).
39. Rowbotham, T. J. Pontiac fever explained? *Lancet* **2**, 969 (1980).
40. Ruef, C. Nosocomial Legionnaires' disease - strategies for prevention. *Journal of Microbiological Methods* **33**, 81-91 (1998).
41. Edelstein, P. H. Detection of antibodies to *Legionella* spp. *Manual of Clinical Laboratory Immunology 3rd edition* (1997).
42. Lisby, G. Construction of DNA amplification assay for detection of *Legionella* species in clinical samples. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **13**, 225-231 (1994).
43. Jaulhac, B. e. a. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplification. *Journal of clinical Microbiology*, 920-924 (1992).
44. Barker, J. Speculations on the influence of infecting phenotype on virulence and antibiotic susceptibility of *Legionella pneumophila*. *J Antimicrob Chemother* **36**, 7-21 (1995).
45. Edelstein, P. H. Antimicrobial chemotherapy for Legionnaires' disease. *Clin Infect Dis* **21**, 5265-76 (1995).
46. Baltch, A. Inhibitory and bactericidal activities of levofloxacin, ofloxacin, erythromycin, and rifampicin used singly and in combination against *Legionella pneumophila*. *Antimicrob Agents Chemother* **39**, 1661-6 (1995).
47. Reda, C. In vitro activity of six intracellular antibiotics against *Legionella pneumophila* strains of human and environmental origin. *J Antimicrob Chemother* **33**, 757-64 (1994).
48. Yamamoto, Y., T.W. Klein, C. Newton, H. Friedman. in *5th International Conference on Legionella* (Ulm, 2000).

49. Nash, T. W., Libby, D. M. & Horwitz, M. A. IFN-gamma-activated human alveolar macrophages inhibit the intracellular multiplication of Legionella pneumophila. *J Immunol* **140**, 3978-81 (1988).
50. Skerrett, S. J. & Martin, T. R. Recombinant murine interferon-gamma reversibly activates rat alveolar macrophages to kill Legionella pneumophila. *J Infect Dis* **166**, 1354-61 (1992).
51. Romagnani, S. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J Clin Immunol* **15**, 121-9 (1995).
52. Lucey, D. R., Clerici, M. & Shearer, G. M. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clin Microbiol Rev* **9**, 532-62 (1996).
53. Friedman, H., Yamamoto, Y., Newton, C. & Klein, T. Immunologic response and pathophysiology of Legionella infection. *Semin Respir Infect* **13**, 100-8 (1998).
54. Tateda, K. et al. Serum cytokines in patients with Legionella pneumonia: relative predominance of Th1-type cytokines. *Clin Diagn Lab Immunol* **5**, 401-3 (1998).
55. Friedman, H. et al. Legionella pneumophila immunity and immunomodulation: nature and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* **239**, 327-41 (1988).
56. Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* **13**, 251-76 (1995).
57. Güler, M. L. et al. Genetic Susceptibility to Leishmania: IL-12 Responsiveness in TH1 Cell Development. *Science* **271**, 984-987 (1996).
58. Noben-Trauth, N., Kropf, P. & Müller, I. Susceptibility to Leishmania major Infection in Interleukin-4-Deficient Mice. *Science* **271**, 987-990 (1996).
59. Hunter, C., Subauste, C., Van Cleave, V. & Remington, J. Production of gamma interferon by natural killer cells from Toxoplasma gondii-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. *Infect. Immun.* **62**, 2818-2824 (1994).
60. Flynn, J. et al. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* **155**, 2515-2524 (1995).

61. Hsieh, C. S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547-9 (1993).
62. Gazzinelli, R. et al. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **153**, 2533-2543 (1994).
63. Lin, Y., Zhang, M., Hofman, F., Gong, J. & Barnes, P. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect. Immun.* **64**, 1351-1356 (1996).
64. Sieling, P. A. & Modlin, R. L. Cytokine patterns at the site of mycobacterial infection. *Immunobiology* **191**, 378-87 (1994).
65. Melby, P. C., Andrade-Narvaez, F., Darnell, B. J. & Valencia-Pacheco, G. In situ expression of interleukin-10 and interleukin-12 in active human cutaneous leishmaniasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **15**, 101-7 (1996).
66. Newton, C., Klein, T. & Friedman, H. Secondary immunity to *Legionella pneumophila* and Th1 activity are suppressed by delta-9-tetrahydrocannabinol injection. *Infect. Immun.* **62**, 4015-4020 (1994).
67. Kitsukawa, K. et al. Interferon-gamma (IFN-gamma) production by human T lymphocytes upon *Legionella pneumophila* stimulation in vitro. *Clin Exp Immunol* **99**, 76-81 (1995).
68. Pawelec, G., Ouyang, Q., Wagner, W., Biol, D. & Wikby, A. Pathways to a robust immune response in the elderly. *Immunol Allergy Clin North Am* **23**, 1-13 (2003).
69. Schindowski, K., Frohlich, L., Maurer, K., Muller, W. E. & Eckert, A. Age-related impairment of human T lymphocytes' activation: specific differences between CD4(+) and CD8(+) subsets. *Mech Ageing Dev* **123**, 375-90 (2002).
70. Gardner, E. M. & Murasko, D. M. Age-related changes in Type 1 and Type 2 cytokine production in humans. *Biogerontology* **3**, 271-90 (2002).
71. Mo, R. et al. T cell chemokine receptor expression in aging. *J Immunol* **170**, 895-904 (2003).
72. Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. in *Immunology* (Elsevier Science Limited, 2002).

73. Braud, V. M. e. a. HLA-E binds to natural-killer-cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* **391**, 795-799 (1998).
74. O`Callaghan, C. A. Molecular basis of human natural killer cell recognition of HLA-E (human leukocyte antigen-E) and its relevance to clearance of pathogen-infected and tumor cells. *Clinical Science* **99**, 9-17 (2000).
75. Bauer, S. e. a. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727-729 (1999).
76. Cerwenka, A. e. a. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* **12**, 721-727 (2000).
77. Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N. & Raulet, D.H. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature Immunol.* **1**, 119-126 (2000).
78. Diefenbach, A. e. a. Selective associations with signaling molecules determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nature Immunol.* **3**, 1142-1149 (2002).
79. Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M. & Colonna, M. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger natural killer cell activation and costimulation. *Nature Immunol.* **3**, 1150-1155 (2002).
80. Collins, K. L. & Baltimore, D. HIV's evasion of the cellular immune response. *Immunol Rev* **168**, 65-74 (1999).
81. Cosman, D. e. a. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate Nk cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* **14**, 123-133 (2001).
82. Groh, V. e. a. Costimulation of CD8a β T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunol.* **2**, 255-260 (2001).
83. Tortorella, D., Gewurz, B.E., Furman N.H., Schust, D.J. & Ploegh, H.L. Viral subversion of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 861-926 (2000).

84. Anderson, S. K., Ortaldo, J. R. & McVicar, D. W. The ever-expanding Ly49 gene family: repertoire and signaling. *Immunol Rev* **181**, 79-89 (2001).
85. Brown, M. G. Vital involvement of a natural killer cell activation receptor in resistance to viral infection. *Science* **292**, 934-937 (2001).
86. Daniels, K. A. Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49h. *J. Exp. Med.* **194**, 29-44 (2001).
87. Lee, S. H. Susceptibility to mouse cytomegalovirus is associated with deletion of an activating natural killer cell receptor of the C-type lectin superfamily. *Nature Genet.* **28**, 42-45 (2001).
88. Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B. & Lanier, L. L. Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* **296**, 1323-1326 (2002).
89. Yokoyama, W. M. & Plougastel, B. F. M. Immune functions encoded by the natural killer gene complex. *Nature Reviews* **3**, 304-316 (2003).
90. Jones, E. Y. MHC class I and class II structures. *Current Opinion in Immunology* **9**, 75-79 (1997).
91. Rammensee, H.-G. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Current Opinion in Immunology* **7**, 85-96 (1995).
92. Van Kaer, L. Major histocompatibility complex class I-restricted antigen processing and presentation. *Tissue Antigens* **60**, 1-9 (2002).
93. Pamer, E. & Cresswell, P. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* **16**, 323-58 (1998).
94. Reits, E. A., Vos, J. C., Gromme, M. & Neefjes, J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* **404**, 774-8 (2000).
95. Schubert, U. et al. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* **404**, 770-4 (2000).
96. Hershko, A. & Ciechanover, A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-79 (1998).

97. Rock, K. L. & Goldberg, A. L. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* **17**, 739-79 (1999).
98. Van den Eynde, B. J. & Morel, S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* **13**, 147-53 (2001).
99. Groettrup, M., Khan, S., Schwarz, K. & Schmidtke, G. Interferon-gamma inducible exchanges of 20S proteasome active site subunits: why? *Biochimie* **83**, 367-72 (2001).
100. Cresswell, P. Intracellular surveillance: controlling the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Traffic* **1**, 301-5 (2000).
101. Sadasivan, B., Cariappa, A., Waneck, G. & Cresswell, P. Assembly, peptide loading, and transport of MHC class I molecules in a calnexin-negative cell line. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **60**, 267-75 (1995).
102. Nossner, E. & Parham, P. Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* **181**, 327-37 (1995).
103. Gao, B. et al. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* **16**, 99-109 (2002).
104. Lehner, P. J., Surman, M. J. & Cresswell, P. Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* **8**, 221-31 (1998).
105. Li, S., Paulsson, K. M., Chen, S., Sjogren, H. O. & Wang, P. Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* **275**, 1581-6 (2000).
106. Grandea, A. G., 3rd, Lehner, P. J., Cresswell, P. & Spies, T. Regulation of MHC class I heterodimer stability and interaction with TAP by tapasin. *Immunogenetics* **46**, 477-83 (1997).
107. Peh, C. A. et al. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* **8**, 531-42 (1998).

108. Hughes, E. A. & Cresswell, P. The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex. *Curr Biol* **8**, 709-12 (1998).
109. Lindquist, J. A., Jensen, O. N., Mann, M. & Hammerling, G. J. ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly. *Embo J* **17**, 2186-95 (1998).
110. Morrice, N. A. & Powis, S. J. A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules. *Curr Biol* **8**, 713-6 (1998).
111. Radcliffe, C. M. et al. Identification of Specific Glycoforms of Major Histocompatibility Complex Class I Heavy Chains Suggests That Class I Peptide Loading Is an Adaptation of the Quality Control Pathway Involving Calreticulin and ERp57. *J. Biol. Chem.* **277**, 46415-46423 (2002).
112. Androlewicz, M. J., Anderson, K. S. & Cresswell, P. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9130-4 (1993).
113. Li, S., Paulsson, K. M., Sjogren, H. O. & Wang, P. Peptide-bound major histocompatibility complex class I molecules associate with tapasin before dissociation from transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* **274**, 8649-54 (1999).
114. Knittler, M. R., Alberts, P., Deverson, E. V. & Howard, J. C. Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules. *Curr Biol* **9**, 999-1008 (1999).
115. Hughes, E. A., Hammond, C. & Cresswell, P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 1896-901 (1997).
116. Wiertz, E. J. et al. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* **384**, 432-8 (1996).
117. Held, W. (ed. Neumeister, B.) (Lausanne, 2003).

118. Tateda, K. et al. Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of Legionella pneumophila Pneumonia. *J Immunol* **166**, 3355-61 (2001).
119. Finelli, A. MHC class I restricted T cell responses to Lysteria monocytogenes, an intracellular bacterial pathogen. *Immunol Res* **19**, 211-223 (1999).
120. Yewdell, J. W., Bennink, J. R. & Hosaka, Y. Cells process exogenous proteins for recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Science* **239**, 637-640 (1988).
121. Kirby, J. E., Vogel, J. P., Andrews, H. L. & Isberg, R. R. Evidence for pore-forming ability by Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **27**, 323-336 (1998).
122. Segal, G., Russo, J. J. & Shuman, H. A. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of Legionella pneumophila. *Mol Microbiol* **34**, 799-809 (1999).
123. Wick, M. J. & Pfeifer, J. D. Major histocompatibility complex class I presentation of ovalbumin peptide 257-264 from exogenous sources: protein context influences the degree of TAP-independent presentation. *Eur J Immunol* **25**, 1739-43 (1996).
124. Bachmann, M. F. et al. TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur J Immunol* **25**, 1739-43 (1995).
125. Heath, W. R. & Carbone, F. R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nature Reviews Immunology* **1**, 126-35 (2001).
126. Maksymowych, W. P. & Kane, K. P. Bacterial modulation of antigen processing and presentation. *Microbes and Infection* **2**, 199-211 (2000).
127. Martin-Orozco, N., Isibasi, A. & Ortiz-Navarrete, V. Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon-gamma activation. *Immunology* **103**, 41-48 (2001).
128. Malyguine, A. M., Scott, J. E. & Dawson, J. R. The role of Calnexin in Nk-target cell interaction. *Immunol. Lett.* **61**, 67-71 (1998).
129. Scott, J. E. & Dawson, J. R. MHC class I expression and transport in a calnexin deficient cell line. *J. Immunol.* **155**, 143-148 (1995).

130. Le Gall, S. Nef interacts with the μ subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules. *Immunity* **8**, 483-495 (1998).
131. Brodsky, F. M., Lem, L., Solache, A. & Bennett, E. M. Human pathogen subversion of antigen presentation. *Immunol. Rev.* **168**, 199-215 (1999).
132. Coscoy, L. & Ganem, D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8051-8056 (2000).
133. Ishido, S., Wang, C., Lee, B. C., Cohen, G. B. & Jung, J. U. Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *J. Virol.* **74**, 5300-5309 (2000).
134. Browne, H., Smith, G., Beck, S. & Minson, T. A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and β_2 -microglobulin. *Nature* **347**, 770-772 (1990).
135. Cosman, D., Fanger, N. & Borges, L. Human cytomegalovirus, MHC class I and inhibitory signaling receptors: more questions than answers. *Immunol. Rev.* **168**, 177-185 (1999).
136. Weiss, D. J., Evanson, O. A., McClenahan, D. J., Abrahamsen, M. S. & Walchek, B. K. Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis or Mycobacterium avium subsp. avium. *Infect Immun* **69**, 1002-1008 (2001).
137. Stenger, S., Kayvan, R. N. & Modlin, R. L. Down-regulation of CD1 on antigen-presenting cells by infection with Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Immunology* **161**, 3582-3588 (1998).
138. Schuller, S., Kugler, S. & W., G. Suppression of major histocompatibility complex class I and class II gene expression in Lysteria monocytogenes-infected murine macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol* **20**, 289-299 (1998).
139. Kirveskari, J. et al. Enterobacterial infection modulates major histocompatibility complex class I expression on mononuclear cells. *Immunology* **97**, 420-428 (1999).

140. Bowness, P., Zaccai, N., Bird, L. & Jones, E. Y. HLA-B27 and disease pathogenesis: new structural and functional insights. *Expert Rev Mol Med* **1**, 1-10 (1999).

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ich danke ganz besonders Frau PD Dr. med. Birgid Neumeister, der leitenden Oberärztin der Abteilung für Transfusionsmedizin, für die Vergabe des Dissertationsthemas. Sie war bei Problemen und Fragen immer zu erreichen und ihre Anregungen boten Anlass zu zahlreichen, auch außerfachlichen Diskussionen. Ihr Vertrauen begleitete mich während der gesamten Zeit im Labor.

Die Arbeit ist vor allem möglich geworden durch die große Unterstützung, die ich während der experimentellen Phase im Labor erfahren habe. Frau Marion Faigle, leitende MTA der Arbeitsgruppe für Infektionsimmunologie, hat mich zügig in die grundlegenden Techniken und Fertigkeiten eingearbeitet und dabei ein großes Maß an Geduld und Verständnis bewiesen. Sie half mir die Anlaufschwierigkeiten der Doktorarbeit durchzustehen und war auch immer bereit für Fragen und Diskussionen. Mit ihrer Kompetenz und ihren Anregungen trug sie entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Die Mitglieder der Arbeitsgruppe ‚Infektionsimmunologie‘ im Zentrum für medizinische Forschung (ZMF) haben mir gezeigt, wie mit Witz und guter Laune eine Auflockerung der täglichen Routine zu bewerkstelligen ist. Die vielen Tipps und Anregungen werden mich in auch in meinem weiteren Berufsleben begleiten. Vielen Dank!

Danken möchte ich auch Herrn Dr. med. Max Topp für die Einarbeitung in die ⁵¹Chrom-Methode.

Dem Graduiertenkolleg „Zelluläre Mechanismen immunassoziierter Prozesse“ danke ich für die Aufnahme und die finanzielle Unterstützung, die es mir ermög-

lichte, mich ganz meiner Dissertation zu widmen. Frau Valerie Bahr, der Koordinatorin des Graduiertenkollegs, gilt mein besonderer Dank. Mit Begeisterung hat sie sich aller Aufgaben und Projekte innerhalb des Kollegs angenommen und jedes neue Mitglied mit großer Herzlichkeit eingeführt.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinem Freund für die große Unterstützung und ihr Verständnis bedanken. Sie nahmen an allen Schwierigkeiten teil und freuten sich über die Erfolge. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

9 LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE DATEN

- Name: Ograbek
- Vorname: Agnieszka Anna
- Familienstand: ledig
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 16.10.76
- Geburtsort: Lodz (Polen)

AUSBILDUNG

1983 – 1986	Grundschule	Lodz/ Polen
1986 – 1987	„Internationale-Völker-Klasse“	Stuttgart
1987 – 1988	Grundschule	Stuttgart
1988 – 1989	Wagenburg-Gymnasium	Stuttgart
1989 – 1990	Jörg-Ratgeb-Gesamtschule	Stuttgart
1990 – 1992	Freiherr-vom-Stein-Gesamtschule	Eppstein
1992 – 1997	Elly-Heuss-Schule	Wiesbaden
1997	Abitur	Wiesbaden

STUDIUM

1999 – 2001	Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
März 2001	Physikum
Seit Mai 2001	Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
März 2002	1. Staatsexamen
August 2004	2. Staatsexamen
16.11.2005	3. Staatsexamen

