

I. EINLEITUNG

Es ist die Aufgabe des Immunsystems einen Organismus vor Infektionen zu schützen. Eine wichtige Grundlage der Immunantwort auf verschiedene Erreger ist die Aktivierung von Makrophagen ($M\Phi$). Schon während der ersten, unspezifischen Effektorphase vernichten aktivierte $M\Phi$ eingedrungene Mikroorganismen. Darüber hinaus stellen aktivierte $M\Phi$ den Ausgangspunkt für nachfolgende, spezifische Reaktionen des Wirtes auf Infektionen dar. Für den Vorgang der $M\Phi$ -Aktivierung ist das Zytokin Interferon ($IFN-\gamma$) unerlässlich. Die Freisetzung von $IFN-\gamma$ innerhalb der frühen, unspezifischen Phase einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* erfolgt, nachdem $M\Phi$ und Natürliche Killer (NK) Zellen in gegenseitige Wechselwirkungen treten (Bancroft *et al.*, 1989). Diese Interaktionen werden durch die Sekretion von löslichen Immunmediatoren (Zytokinen) durch mikrobiell stimulierte $M\Phi$ initiiert. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, existieren neben den durch $M\Phi$ - Zytokine vermittelten jedoch auch andere, bisher nicht beschriebene Mechanismen, welche die frühe, T-Zell-unabhängige Aktivierung von $M\Phi$ und somit wichtige Abläufe der gesamten Immunantwort einleiten.

1. Unspezifische und spezifische Infektabwehr

Während der Evolution entwickelte sich die Immunantwort in ein aus mehreren Komponenten zusammengesetztes Abwehrsystem. So basiert eine vollständige Abwehrreaktion von Wirbeltieren gegen infektiöse Erreger und deren Strategien, in einen Körper einzudringen und sich dort auszubreiten und zu vermehren, auf dem Zusammenwirken von sowohl erregerspezifischen als auch spezifisch gegen bestimmte Antigene gerichteten Mechanismen. Die unspezifische Immunantwort besitzt der Körper von Geburt an und wird daher angeborene oder auch natürliche Abwehr genannt. Diese ist schon vor Eindringen eines Erregers funktionsfähig. Um hingegen die Mechanismen der spezifischen Immunantwort ausbilden zu können, muß zuvor ein Kontakt mit einem Erreger stattgefunden haben. Daher wird die spezifische Komponente der Abwehr als erworbene oder auch adaptive Immunantwort bezeichnet. Ein wichtiges Prinzip, nach dem die spezifische Abwehr arbeitet, ist das der klonalen Selektion spezifischer lymphozytärer Effektorzellen. Wird ein

körperfremdes Antigen von einem Rezeptor eines Lymphozyten erkannt, so wird dieser aktiviert. Aus jedem aktivierten Lymphozyten entsteht ein Klon von Zellen, deren Rezeptoren dasselbe Antigen binden. Solche Zellen differenzieren zu Effektorzellen, die entweder direkte Zytotoxizität gegen einen Erreger besitzen oder Antikörper produzieren. Die Aktivitäten der Effektorzellen vernichten den Krankheitserreger und entfernen so den auslösenden Reiz. Dadurch und durch gezielte, zeitlich gestaffelte inhibitorische Regelkreise klingt die Immunantwort schließlich ab. Die klonale Selektion ist die Grundlage für eine wichtige Eigenschaft der adaptiven Immunität, das immunologische Gedächtnis. Dieser Begriff beschreibt die Fähigkeit, auf das zweite Zusammentreffen mit einem Krankheitserreger sehr viel schneller und stärker zu reagieren; es entsteht eine protektive Immunität. Um alle Mechanismen der spezifischen Infektabwehr ausbilden zu können werden mehrere Tage nach dem Beginn einer Infektion benötigt. Diesen Zeitraum zu überbrücken und einen Erreger in seiner Verbreitung im Körper einzuschränken ist eine Aufgabe der angeborenen Infektabwehr.

2. Mechanismen der angeborenen Infektabwehr

Physikalische und anatomische Barrieren eines Organismus bilden die erste Abwehrformation gegen Erreger. So verhindern zum Beispiel der niedrige pH der Haut oder des Magens eine Vermehrung der meisten Mikroorganismen. Speichel-, Tränenflüssigkeit und muköse Exsudate waschen Pathogene aus dem Körper und enthalten darüber hinaus lytische Proteine (z.B. Lysozym), die Erreger unspezifisch abtöten können. Erst wenn ein Erreger diese schützenden Barrieren durchbrochen hat und sich im Körper ausbreitet, entsteht eine Infektion mit den damit verbundenen Krankheitssymptomen.

Die Ausbreitung von Krankheitserregern zu verhindern ist Aufgabe von sowohl humoralen als auch zellulären Mechanismen der angeborenen Infektabwehr (**Tab. 1.1**). So werden einige der eingedrungenen Erreger in der frühen Phase einer Infektion durch ständig im Plasma vorhandene Komplementproteine zerstört. Andere Bakterien werden durch das Komplementsystem erst vernichtet, nachdem in der Leber produzierte Proteine der akuten Phase an ihre Zelloberfläche gebunden haben. Die Aufnahme von Makromolekülen durch Endozytose beziehungsweise von partikulären Strukturen bis hin zu ganzen Mikroorganismen durch Phagozytose ist ein Teil der zellvermittelten unspezifischen Infektabwehr. Während

Endozytose von den meisten Körperzellen durchgeführt werden kann, werden für die Phagozytose spezialisierte Zellen, Phagozyten, benötigt. Dazu gehören Monozyten aus dem Blut, gewebständige MΦ und polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN). Inkorporiertes partikuläres Material wird in Vesikeln (Phagosomen) aufgenommen. Lysosome sind Vakuolen, die eine Vielzahl an antibakteriellen Substanzen und katabolischen Enzymen enthalten. Diese fusionieren dann mit den Phagosomen und das aufgenommene Material wird abgebaut.

Tabelle 1.1: Merkmale der natürlichen und der spezifischen Immunität

	natürlich (angeboren)	spezifisch (erworben)
physikalische Barrieren	Haut, Schleimhaut, Sekrete	Antikörper in Sekreten
humorale Mechanismen	Komplement, akute Phase Proteine	Antikörper
zelluläre Mechanismen	Phagozyten (Makrophagen, neutrophile Granulozyten), Natürliche Killer Zellen	T- und B-Lymphozyten

Die Adhärenz von Mikroorganismen und die nachfolgende Aufnahme durch Phagozyten stellen den ersten Kontakt der unspezifischen zellulären Abwehr mit einem Erreger dar. Durch die Produktion von inflammatorischen Zytokinen leiten die Phagozyten Signale zu anderen Zellen der unspezifischen Abwehr und den Komponenten der spezifischen Abwehr weiter. Diese Abläufe und Mechanismen wurden zuerst anhand des Infektionsmodells der murinen Listeriose beschrieben (Mackness, 1962). Seitdem gilt dieses System als Standardmodell der zellulären Immunantwort gegen einen fakultativ intrazellulären Erreger und wurde daher auch in der vorliegenden Arbeit als Modell verwendet.

3. *Listeria monocytogenes* und Listeriose

Listerien sind Gram-positive, nicht sporenbildende Bakterien, welche ubiquitär in der Natur vorkommen. Krankheitsbilder, die durch Listerien hervorgerufen werden können, werden sowohl in Haus- als auch in Wildtieren beobachtet (Gray & Killinger, 1966). Der Erreger ist enteroinvasiv und gelangt über eine orale Aufnahme in den Körper. Dort kann er ein Spektrum von Krankheiten verursachen, das von lokaler Enteritis bis zu einer disseminierenden Infektion reicht, die alle Organe, einschließlich des Hirns, betrifft (Lorber, 1990). Innerhalb der Gattung *Listeria* ist *Listeria monocytogenes* eine humanpathogene Art. Trotz häufiger lokaler Besiedelung des Intestinaltrakts (bei 1-5% der gesunden Menschen ist *L. monocytogenes* im Stuhl nachweisbar, Ortel, 1971), stellt dieser Erreger für die meisten Menschen keine Bedrohung dar. Die Gefahr einer manifesten Erkrankung besteht hauptsächlich für abwehrgeschwächte Personen wie Neugeborene, Kleinkinder, Rekonvaleszenten, ältere Menschen und Patienten, deren Abwehr durch angeborene oder erworbene Immundefizienz (immunsupprimierende Medikamente während Chemotherapie oder Transplantation) geschwächt ist. Bedeutsam ist die Möglichkeit, daß von einer unauffälligen Listeriose einer Schwangeren eine intrauterine Infektion des Föten ausgehen kann, die zum Fruchttod oder einer manifesten Erkrankung führt. Eine Infektion des Kindes ist auch unter der Geburt im Geburtskanal möglich. Die medizinische Bedeutung der Listeriose ergibt sich aus der vergleichsweise hohen Letalität der manifesten Listeriose. So endeten in Deutschland in den letzten Jahren 30% der Erkrankungen an Listerien-Meningitis tödlich (Robert Koch-Institut, 1998). Darüber hinaus erschwert die Fähigkeit dieses Organismus im Wirt intrazytoplasmatisch zu leben und zu replizieren (Suter, 1956, Cossart & Mengaud, 1989) grundsätzlich das Wirken vieler Antibiotika.

4. Murine Listeriose als Modell für die zelluläre Infektabwehr

Infektionsverlauf

Neben vielen Vorteilen, die *L. monocytogenes* aufgrund des relativ gefahrlosen Umgangs und seines schnellen Wachstums in konventionellen Bakterienmedien als Infektionsmodell bietet, wird dieser Erreger wegen eines hoch reproduzierbaren Infektionsverlaufes als verlässliches Modell für Infektionsstudien genutzt. Nach einer Infektion mit *Listeria* in der Maus (natürlich

oder experimentell) wird der Erreger innerhalb einer Stunde durch die Tätigkeit von MΦ in Leber und Milz aus dem Blut entfernt, wobei ungefähr 80% der Erreger von der Leber aufgenommen werden (Mackaness, 1962, North, 1970, Filice, 1988). Innerhalb der ersten acht bis zwölf Stunden werden in der Leber 60 – 80 % eines intravenösen Inokulums inaktiviert (Conlan & North, 1991). Histologische Untersuchungen der Lebern *Listeria*-infizierter Mäuse zeigten, daß die Erreger in den ersten Stunden nach der Infektion ausschließlich in residenten (ruhenden) Leber MΦ (Kupffer Zellen) lokalisiert sind (Conlan & North, 1992).

In der Milz werden während der ersten 24 Stunden nur wenige Bakterien abgetötet (Conlan & North, 1994, Dunn & North, 1991a). Hier werden die Erreger anfänglich in den MΦ der Rinden-Sinus beobachtet, die die Bakterien jedoch nicht an einer weiteren Ausbreitung hindern können. Von dort geht die Infektion in die Zone der weißen Pulpa, in der Listerien sowohl phagozytierende Zellen, als auch Parenchymzellen und Dendritische Zellen parasitieren (Conlan & North, 1994, Conlan, 1996).

Diese Permissivität von MΦ für Listerien kurz nach Beginn der Infektion hat folgende Gründe: Den Erregern ist es möglich, durch die Sekretion eines bakteriellen Hämolytins, Listeriolysin O, und einer Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase, das Phagolysosom nicht aktivierter Makrophagen zu verlassen (Mengaud *et al.*, 1987, Gaillard *et al.*, 1987, Mengaud *et al.*, 1991). Im Zytoplasma werden durch die Wirkung des Oberflächenproteins ActA Aktinfilamente an der Bakterienzellwand angehäuft und dann so ausgerichtet, daß der Organismus durch das Zytoskelett der Wirtszelle im Zytoplasma vorangetrieben wird (Kocks *et al.*, 1982, Domann *et al.*, 1992). An der inneren Zellmembran angekommen, ermöglichen zwei weitere Oberflächenmoleküle, Internalin A und B, die Evasion der Bakterien aus den Phagozyten und anschließend die Invasion in benachbarte, nicht listerizid wirkende Zellen (z. B. Parenchymzellen), ohne dabei ihr intrazelluläres Habitat zu verlassen (Portnoy *et al.*, 1988, Tilney & Portnoy, 1989, Portnoy *et al.*, 1992, Dramsi *et al.*, 1995, Drevets *et al.*, 1995). In diesen Zellen können sich die Bakterien während der ersten 24 Stunden ohne Einschränkung vermehren (Rosen *et al.*, 1989, Gregory *et al.*, 1992). Listeriolysin O-Deletionsmutanten besitzen nicht die Möglichkeit aus dem Phagosom zu entfliehen und sind daher nicht virulent (Cossart *et al.*, 1989). Anhand von *in vitro* Versuchen mit Peritonealmakrophagen wurde gezeigt, daß residente MΦ trotz einer starken konstitutiven bakteriziden Wirkung nicht in der Lage sind, die Evasion überlebender Erreger aus dem

Phagosom zu verhindern (van Dissel *et al.*, 1987, Portnoy *et al.*, 1989). Erst nach einer Aktivierung von M Φ ist die Flucht aus dem Phagosom stark inhibiert und alle aufgenommenen Bakterien werden zerstört (Portnoy *et al.*, 1989).

Die Mechanismen, mit denen M Φ aufgenommene Listerien töten, sind bis jetzt noch unklar. Reaktive Stickoxide (anorganische Stickoxide, aNO, zusammengefaßt in Moncada *et al.*, 1991) und reaktive Sauerstoffintermediate (Shepherd, 1986, Carnutte & Babior, 1987), die nur von aktivierten M Φ produziert werden (Drath & Karnovsky, 1975, Green *et al.*, 1991), scheinen jedoch ganz entscheidend an der Vernichtung der Bakterien beteiligt zu sein. Das M Φ Zytokin Tumor Nekrose Faktor (TNF-) α , früher als Kachektin bezeichnet, zeigt ebenfalls eine direkte bakterizide Wirkung (Old, 1985). Darüber hinaus führt die Aktivierung zu weiteren phänotypischen Veränderungen von M Φ : Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) der Klasse II werden nach Aktivierung verstärkt exprimiert. Mit Hilfe dieser Moleküle wird T-Zellen phagozytiertes und prozessiertes Erregermaterial präsentiert. Diese Präsentation leitet die Mechanismen der spezifischen Abwehr ein und entscheidet über den weiteren Ablauf der Immunreaktion. Sowohl die Dichte der Komplexe aus MHC-II und prozessiertem Peptid auf Antigen-präsentierenden Zellen, als auch die während der unspezifischen Phase gebildeten Zytokine sind verantwortlich für die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen entweder in inflammatorische Th1- oder in T-Helfer-Zellen vom Typ Th2. Unterschieden werden diese Zellpopulationen durch das Spektrum der von ihnen gebildeten Zytokine. Th2-Zellen produzieren Interleukin (IL-) 3, 4, 5, 6, 10 und IL-13 und leiten Mechanismen der humoralen Abwehr (Stimulierung von B Zellen zur Antikörperproduktion, Mastzell-Stimulierung) gegen extrazelluläre Antigene oder Allergene ein. Eine durch intrazelluläre Erreger hervorgerufene IL-12 Produktion von aktivierten M Φ lenkt die Differenzierung in Richtung IFN- γ bildender Th1-Zellen. Durch die Produktion von IFN- γ werden wiederum M Φ in erhöhte Reaktionsbereitschaft versetzt und somit die Mechanismen der zellulären Infektabwehr aufrechterhalten (Tripp & Unanue, 1995). Gleichzeitig wird die Bildung von Th2-Zellen verhindert (Hsieh *et al.*, 1993). Somit ist die Aktivierung von M Φ durch IFN- γ eine Grundvoraussetzung für eine wirkungsvolle Reaktion auf intrazelluläre Erreger.

24 Stunden nach der Infektion nimmt die Multiplikationsrate der Bakterien ab. Hierfür sind aktivierte MΦ verantwortlich, welche die infizierten Parenchymzellen lysieren und so die Bakterien aufnehmen und zerstören können (Conlan & North, 1991, 1992). Zur Verhinderung der Ausbreitung der durch die Lysis freigesetzten Bakterien tragen zusätzlich polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) bei, die listerizide Eigenschaften besitzen (Campbell, 1986, Alford *et al.*, 1991). Während seit den Studien von Lurie über Tuberkulose und Mackaness über Listeriose in den sechziger Jahren bekannt ist, daß MΦ für eine Erregerabwehr eminent wichtig sind (Lurie, 1964, Mackaness, 1962), wurde die Bedeutung von PMN in diesem System erst relativ spät erkannt (Rogers & Unanue, 1993, Conlan & North, 1994, Czuprynski *et al.*, 1994). Die Rekrutierung von PMN an den Infektionsort wird durch das Zytokin IL-1 vermittelt. Nach Aufnahme von Listerien wird IL-1 von MΦ freigesetzt (Kurt-Jones *et al.*, 1986). Es wurde beschrieben, daß IL-1 nicht direkt chemotaktisch wirksam für PMN ist, wohl aber die Sekretion verschiedener Chemokine induziert, die PMN an den Infektionsort leiten (Kuijpers *et al.*, 1991).

Nur in Anwesenheit von Zellen der spezifischen Immunantwort kann eine vollständige Klärung einer Listeriose bewirkt werden. Nachweisbare Zahlen Listerien-spezifischer T-Lymphozyten werden vier bis fünf Tage nach einer Primärinfektion beobachtet (Mackaness, 1964, North *et al.*, 1981, Kaufmann, 1984) und ihre Proliferation geht mit einer starken Verringerung der Bakteriendichte einher. CD4⁺-T-Zellen sind beteiligt an der Rekrutierung von monozytären Zellen und der Isolierung eines infizierten Areals von anderen Gewebeteilen durch die Bildung von Granulomen. Sowohl CD8⁺- als auch CD4⁻CD8⁻-T Zellen sind die vorrangigen Mediatoren einer langanhaltenden protektiven Immunität gegen Listerien. Depletionsversuche und Transferexperimente beweisen die Schutzfunktion von CD8⁺-Zellen vor Reinfektionen (Cheers & Sandrin, 1983, Bishop & Hinrichs, 1987, Mielke *et al.*, 1988), die aufgrund der Fähigkeit besteht, infizierte Zellen zu erkennen und zu lysieren (Kaufmann, 1986, Brunt *et al.*, 1990).

T-Zell-unabhängige Makrophagenaktivierung

Wie erwähnt, zeigen residente MΦ nur wenig antibakterielle Aktivität. Um Erreger effektiv abtöten zu können, müssen MΦ aktiviert werden. Mehrere Signale können eine Aktivierung auslösen. Dazu zählen bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharide, LPS) und Zytokine. Unter

den Zytokinen ist vor allem IFN- γ an diesem Vorgang beteiligt. Es konnte gezeigt werden, daß der Einsatz von neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen IFN- γ die vollständige Klärung von Infektionen mit *L. monocytogenes* verhindert (Buchmeier & Schreiber, 1985). Mäuse, denen das Gen für IFN- γ (Dalton *et al.*, 1993) oder für dessen Rezeptor (Huang *et al.*, 1993) fehlt, zeigen eine verstärkte Suszeptibilität für *L. monocytogenes*-Infektionen. Eine Aktivierung von M Φ durch lokal oder systemisch appliziertes rekombinantes IFN- γ führt *in vivo* zu stark verminderten Erregerzahlen (Kiderlen *et al.*, 1984).

Große Mengen IFN- γ werden von T-Lymphozyten produziert, die jedoch in der frühen Phase einer Infektion oder in immundefizienten Wirten mit fehlender spezifischer Abwehr nicht zur Verfügung stehen. Newborg und North postulierten 1980 einen T-Zell-unabhängigen Weg der Makrophagenaktivierung, nachdem sie in *L. monocytogenes*-infizierten T-Zell-defizienten Mäusen die als streng IFN- γ -abhängig geltende Expression von MHC-II auf M Φ beobachtet hatten. Diese Beobachtung deutete daraufhin, daß IFN- γ auch in Abwesenheit von T-Lymphozyten gebildet wird. Die Induktion der MHC-II Expression konnte durch Zugabe von neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen IFN- γ aufgehoben werden (Bancroft *et al.*, 1986). Nach einer *in vivo* Depletion von NK Zellen durch anti-Asialo GM1 Serum wurde beobachtet, daß die Produktion von IFN- γ ausblieb (zusammengefaßt in Bancroft, 1993).

Weitere Hinweise für die Notwendigkeit einer Beteiligung von NK Zellen für eine erfolgreiche Abwehr einer Listerien-Primärinfektion auch in immunkompetenten Mäusen wurden im Labor von North erbracht: Eine subkutane Infektion mit *L. monocytogenes* führte zu einer Ansammlung einer großen Zahl IFN- γ produzierender Zellen in dem drainierenden Lymphknoten. Die IFN- γ Produktion hatte 24 Stunden nach Infektion ihren Höhepunkt und fiel mit einer Abnahme der Bakterienzahlen zusammen. Die meisten dieser Zellen waren morphologisch große granuläre Lymphozyten, die das NK1.1 Antigen trugen. Depletion dieser Zellen mit neutralisierenden Antikörpern oder anti-Asialo Serum führte zu einer Verstärkung der Infektion. Im Gegensatz dazu hatte die Depletion von CD4⁺-oder CD8⁺-Zellen keinen Einfluß auf die Produktion von IFN- γ nach 24 Stunden (Dunn & North, 1991b).

In vitro Studien lieferten zusätzliche Hinweise für eine NK abhängige IFN- γ Produktion: Koinkubationen von Gesamtmilzzellen (GMZ) und *L. monocytogenes* hatten die Produktion von IFN- γ zur Folge. Wiederum führte die Depletion von NK Zellen zu einem Ausbleiben der IFN- γ Freisetzung. Wurden die M Φ aus den Experimenten entfernt, so blieb, obwohl M Φ selbst kein IFN- γ bilden können, eine IFN- γ Produktion ebenfalls aus. NK Zellen mit *L. monocytogenes* allein inkubiert bildeten kein IFN- γ . Demnach ist die Bildung von IFN- γ durch NK Zellen makrophagenabhängig (Bancroft *et al.*, 1989).

5. Listeriose in der SCID Maus

Zur Untersuchung von Immunreaktionen in Abwesenheit von T-Zellen bietet die severe combined immunodeficiency (SCID) Maus ein sehr gutes Modell (Bosma *et al.*, 1983). In der SCID Maus fehlt aufgrund einer rezessiven Mutation eine DNA-abhängige Proteinkinase. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Reparatur von DNA-Brüchen, die während der Rekombination von Genen für Immunglobuline oder T-Zell-Rezeptoren entstehen. Dies führt dazu, daß Gensegmente, die für die variable Region eines Antigenrezeptors kodieren, nicht wieder zusammengefügt werden können. Infolgedessen sind in der SCID Maus keine T- oder B-Lymphozyten Funktionen nachweisbar. Das System der spezifischen Immunabwehr ist damit ausgeschaltet. Die Mechanismen der unspezifischen Abwehr sind von der Mutation unbeeinflusst

Wherry *et al.* fanden 1991 heraus, daß SCID-M Φ nach einer durch die Aufnahme von *L. monocytogenes* verursachten Stimulierung lösliche Faktoren sezernierten, die eine Produktion von IFN- γ durch NK Zellen induzieren. Die Zugabe von neutralisierenden Antikörpern gegen TNF- α zu Beginn der Inkubation verminderte die IFN- γ Produktion. Dies bewies, daß eine frühe TNF- α Produktion durch M Φ für die Aktivierung von NK Zellen wichtig ist. Die Gabe von anti-TNF- α Antikörpern *in vivo* resultierte in einer um den Faktor 1000 erhöhten Replikation von Listerien. Es wurde beobachtet, daß Mäuse, denen der Rezeptor für TNF- α fehlt, sensitiver für eine Infektion sind, als Mäuse mit einem funktionellen Rezeptor (Pfeffer *et al.*, 1993, Rothe *et al.*, 1993). Nach einer Gabe von rekombinantem TNF- α zu GMZ wurde jedoch kein IFN- γ gebildet. Dieses Ergebnis zeigte,

daß TNF- α alleine zu einer Stimulierung von NK Zellen nicht ausreicht. Ein weiterer Faktor für die Induktion einer IFN- γ Produktion von NK Zellen ist IL-12 (Tripp *et al.*, 1993). In LPS-stimulierten Mäusen, denen die Möglichkeit fehlt, IL-12 zu bilden, wurde beobachtet, daß die Produktion von IFN- γ durch NK Zellen stark eingeschränkt, wenn auch nicht vollkommen unterdrückt wird (Magram *et al.*, 1996). IL-12 (zusammengefaßt in Trinchieri, 1997), ursprünglich als NK cell stimulatory factor, NKSF, bezeichnet, stimuliert außerdem ruhende mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut zu einer Produktion von IFN- γ und NK Zellen zu erhöhter lytischer Aktivität (Kobayashi *et al.*, 1989, Wolf *et al.*, 1991). Gebildet wird IL-12 von Monozyten und M Φ , PMN und Dendritischen Zellen (D'Andrea *et al.*, 1992, Cassatella *et al.*, 1995, Macatonia *et al.*, 1995).

Der zytokinabhängigen Aktivierung von M Φ im Modell der murinen Listeriose steht eine negative Regulierung durch IL-10 gegenüber. Die erste Beobachtung, die zu einer Beschreibung von IL-10 führte, war der Nachweis, daß Überstände aktivierter T-Zellen die Synthese von Zytokinen durch Th1-Zellklone hemmen konnten. Diese Aktivität wurde erst als Cytokine Synthesis Inhibition Factor (CSIF) bezeichnet. Der Name IL-10 wurde erst gewählt, als man erkannte, daß dieses Protein eine Vielzahl von Funktionen auf unterschiedliche Zelltypen ausübt (Moore *et al.*, 1990). In der SCID Maus sind aktivierte M Φ die einzigen IL-10 Produzenten (Goodman *et al.*, 1992). IL-10 hemmt die Bildung einer Vielzahl von Zytokinen, die von M Φ nach einer Stimulation mit LPS produziert werden. Dazu gehören unter anderem IL-1, TNF und IL-12 (Fiorentino *et al.*, 1991, Tripp *et al.*, 1993). IL-10 hemmt die Produktion von IFN- γ durch IL-2 stimulierte NK Zellen (Hsu *et al.*, 1992). Außerdem ist die Bildung von IL-10 selbstlimitiert, daß heißt, daß IL-10 seine eigene Produktion hemmen kann (deWaal Malefyt *et al.*, 1991). Auch IFN- γ hemmt die Bildung von IL-10 (Chomarat *et al.*, 1993). Daher können sich IFN- γ und IL-10 unter bestimmten Voraussetzungen gegenseitig direkt hemmen.

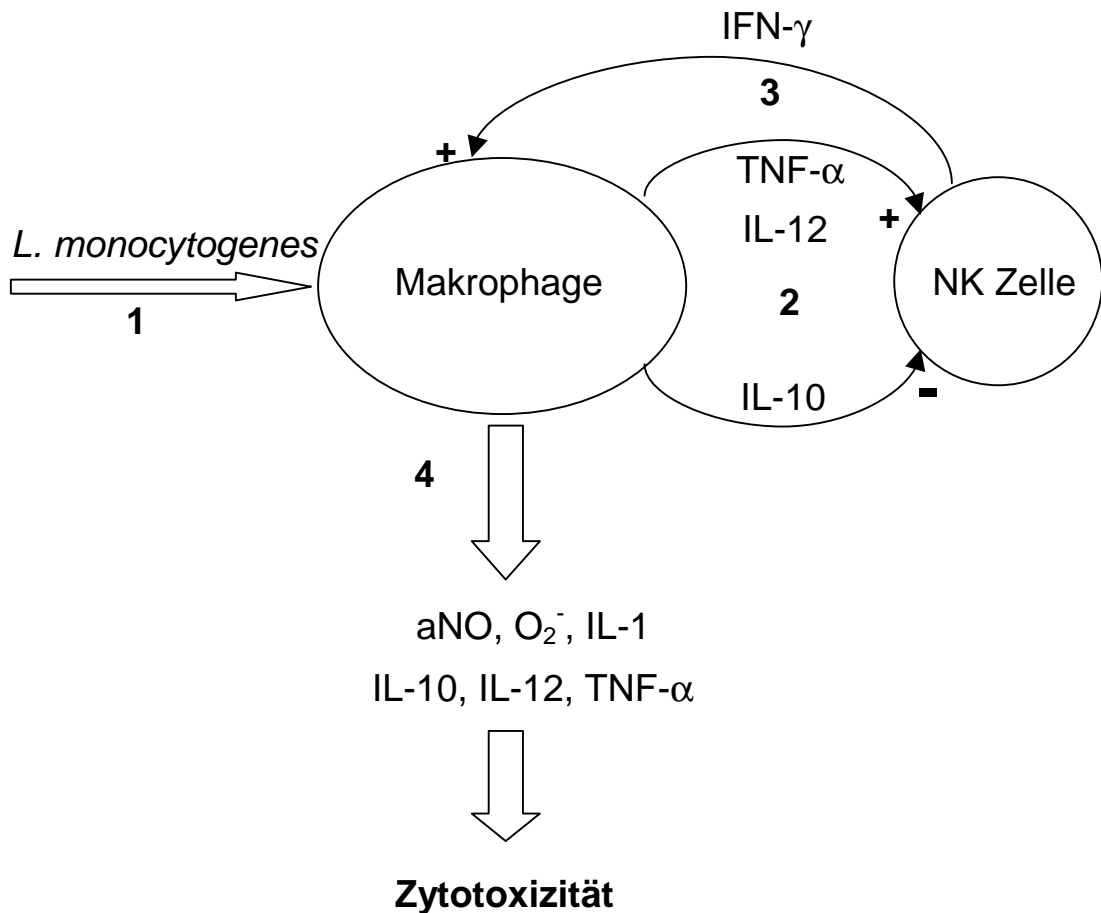


Abb 1.1: Interaktionen zwischen den Zellen der unspezifischen Abwehr nach einer Stimulierung durch *L. monocytogenes*. Makrophagen werden durch den bakteriellen Stimulus zu einer Freisetzung von Zytokinen angeregt. Unter ihnen sind TNF- α und IL-12, die zusammen NK Zellen aktivieren. Daraufhin produzieren NK Zellen IFN- γ , das die Makrophagen zu einer verstärkten Zytokinausschüttung und zur Bildung von bakteriziden Faktoren stimuliert. Die erhöhte Zytokinausschüttung wiederum verstärkt die Bildung von IFN- γ durch NK Zellen. Ein anderes von Makrophagen gebildetes Zytokin, IL-10, wirkt inhibierend auf die Aktivität von TNF- α und IL-12 (aus: Warschkau *et al.* (1997), APMIS Suppl. 7, 105:14-18).

Abb.1.1 stellt die heute gängige Hypothese über den Mechanismus der gegenseitigen Aktivierung und Inhibierung von MΦ und NK Zellen und somit der T-Zell-unabhängigen IFN-γ Produktion dar. Einer Stimulierung durch *L. monocytogenes* (1) folgt die Bildung von TNF-α und IL-12 (2). Diese Zytokine aktivieren gemeinsam NK Zellen zu einer Produktion von IFN-γ (3). Das freigesetzte IFN-γ wiederum führt zu einem höheren Aktivierungszustand der MΦ. Dieser Zustand bewirkt die Freisetzung von zytotoxischen Metaboliten und eine höhere TNF-α und IL-12 Produktion (4). Diese führt wiederum zu einer stärkeren Aktivierung von NK Zellen. In diesem positiven Regelkreis wirkt IL-10 als negativer Faktor, da es, zeitlich versetzt von MΦ produziert, die Bildung von IFN-γ unterdrücken kann.

6. T-Zell-unabhängige Makrophagenaktivierung in anderen Erregermodellen

Die Fähigkeit, als Stimulus für eine NK Zell-abhängige IFN-γ Produktion zu wirken, konnte bislang einer großen Anzahl von Mikroorganismen und ihrer aufgereinigte Komponenten nachgewiesen werden. Neben den bereits erwähnten Listerien befinden sich darunter *Corynebacterium parvum*, Bacille Calmette Guerin (BCG), *Salmonella* und aufgereinigtes LPS aus *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Legionella*, *Mycobacterium avium* und Mycoplasmen (zusammengefaßt in Bancroft, 1993). Parasiten wie *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli *et al.*, 1993a) und *Leishmania major* (Varkila *et al.*, 1993) konnte ebenso eine NK Zell stimulierende Aktivität zuerkannt werden. Im Gegensatz dazu besitzt *Leishmania donovani*, Erreger der viszeralen Leishmaniose, Mechanismen, die Aktivierung der natürlichen zellulären Immunantwort zu verhindern. Nach Inkubation von sowohl amastigoten als auch promastigoten *L. donovani* Organismen mit Milzzellen aus SCID Mäusen wurde kein IFN-γ nachgewiesen (Kaye & Bancroft, 1992). Der Mechanismus dieser Inhibition ist bis heute unbekannt, jedoch spielen nach Ansicht der Autoren die hemmenden Eigenschaften von IL-10 in diesem Falle nicht die ausschlaggebende Rolle. Experimente mit dem Parasiten *Cryptosporidium parvum* wurden bislang nur *in vivo* durchgeführt. Auch dieser Erreger scheint in der Lage zu sein, eine IFN-γ abhängige natürliche Abwehr auszulösen. Wurden *C. parvum* infizierte SCID Mäuse mit einem anti-IFN-γ Antikörper behandelt, so resultierte das in einem frühzeitigen Tod der Mäuse. Die Gabe von anti-TNF-α Antikörpern erbrachte dagegen keine Veränderung (McDonald & Bancroft, 1994). Demnach scheint in diesem Falle

TNF- α für die Interaktionen der unspezifischen Immunabwehr keine auslösende Rolle zuzukommen. Diese Beobachtung war ein erster Hinweis darauf, daß die für *L. monocytogenes* postulierten Mechanismen der TNF- α - und IL-12-induzierten IFN- γ Produktion nicht während jedes Stimulationsmodells ablaufen.

Erregermodell *Pneumocystis carinii*

In unserer Arbeitsgruppe wurde untersucht, welche Rolle den Mechanismen der unspezifischen Infektabwehr in Situationen der Immundefizienz, etwa in Abwesenheit der spezifischen Abwehrkomponente, zukommt. Es wurde die Möglichkeit einer Übertragung der für *L. monocytogenes* beschriebenen zytokinabhängigen Mechanismen der M Φ Aktivierung auf das Erregermodell *Pneumocystis carinii* geprüft. *P. carinii* ist ein ubiquitär vorkommender, opportunistischer Erreger. In Menschen und Tieren mit angeborenem oder erworbenem Immundefekt ruft dieser gegenwärtig zu den Ascomyceten zählende Organismus interstitielle Pneumonien hervor. Unbehandelt ist die *P. carinii* Pneumonie eine der wesentlichen Todesursachen von Patienten mit AIDS (Walzer, 1994). Die Ursachen der Anfälligkeit von immunsupprimierten Patienten gegenüber Infektionen mit *P. carinii* ist bisher nicht vollständig geklärt. Trotz ihrer Bedeutung herrschen bei der infektionsimmunologischen Erforschung der *P. carinii* Pneumonie, vor allem aufgrund der aufwendigen methodischen Zugänge, große Lücken. In verschiedenen Tiermodellen konnte *P. carinii* nachgewiesen werden. So werden in SCID Mäusen im Alter von ungefähr vier Wochen natürlich erworbene *P. carinii* Infektionen beobachtet (Harmsen & Stankiewicz, 1990). Experimente im Maus Modell haben gezeigt, daß das Vorhandensein von CD4⁺ T-Lymphozyten und B-Lymphozyten (nicht aber von Antikörpern) zum Schutz vor einer *P. carinii* Infektion essentiell sind (Beck *et al.*, 1991). Der Verlust der CD4⁺ T-Zellen, wie für AIDS charakteristisch, erhöht die Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *P. carinii* (Lidman *et al.*, 1992). Jedoch wurden auch in SCID Mäusen (ohne T- und B-Lymphozyten) teilweise mehrmonatige Inkubationszeiten zwischen einer hochtitrigen Infektion und dem Ausbruch der Krankheit beobachtet. Diese Daten sprechen für potente, T-Zell-unabhängige, Abwehrmechanismen gegen eine *P. carinii*-Infektion. Auch während einer *P. carinii* Pneumonie wird M Φ eine herausragende Rolle bei der Erregerbekämpfung zuerkannt, da im Alveolarraum vorhandene M Φ *P. carinii* rasch binden, internalisieren und abbauen können (Masur & Jones, 1978). Auch NK Zellen kommen für eine Rolle bei der Abwehr von *P. carinii* in Betracht: Patienten mit Immundefekten, welche mit einer Verminderung von NK

Zellen bzw. mit einer Einschränkung von NK Funktionen einhergehen, entwickeln vermehrt *P. carinii* Infektionen (Bonagura *et al.*, 1992).

Zur Prüfung der Übertragbarkeit der Abwehrmechanismen gegenüber dem Listerienmodell auf das *P. carinii*-Infektionsmodell wurden Gesamtmilzzellen von C.B-17 SCID Mäusen entweder mit hitzegetöteten *L. monocytogenes* (hkLm) oder mit *P. carinii* Organismen inkubiert und die Produktion der im Modell beschriebenen Zytokine gemessen (Warschkau, 1996). Es zeigte sich, daß beide Erregertypen IFN- γ in vergleichbaren Mengen produzierten. Wurden die Erreger zusammen mit isolierten M Φ aus Knochenmark oder Milz und aufgereinigten NK Zellen inkubiert, so wurde ebenfalls IFN- γ in ähnlichen Mengen beobachtet. Die im Modell für eine M Φ Aktivierung unbedingt notwendigen Zytokine TNF- α und IL-12 wurden nach Inkubation von hkLm und isolierten M Φ ebenfalls nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde durch eine Inkubation mit *P. carinii* und isolierten M Φ allein weder TNF- α noch IL-12 induziert. Diese Daten zeigten, daß sich die der IFN- γ Produktion durch NK Zellen und damit einer M Φ Aktivierung zugrunde liegenden Mechanismen sich zwischen den Erregermodellen unterscheiden. Die Induktion von IFN- γ im Modell von *P. carinii* wird anscheinend nicht durch eine initiale Freisetzung von TNF- α und IL-12 durch M Φ eingeleitet. So müssen entweder andere, bisher nicht gemessene lösliche Faktoren oder ein direkter Zell-Zell Kontakt zwischen M Φ und NK Zellen eine Signaltransduktion auslösen, die zu einer Produktion von IFN- γ führt.

Eine weitere Beobachtung, die für zusätzliche Mechanismen der IFN- γ Induktion spricht, als die durch M Φ Zytokine vermittelten, machten Wherry *et al.*, 1991 in der Erstbeschreibung der M Φ -NK Zell Interaktionen: Sie beobachteten im *in vitro* Modell mit hkLm unterschiedliche Konzentrationen an IFN- γ in Abhängigkeit der Inkubationsbedingungen. So wiesen sie die höchsten Mengen an IFN- γ nach, wenn M Φ und NK Zellen zusammen, mit der Möglichkeit eines direkten Zell-Zell Kontaktes, inkubiert wurden. Wurden die Zellpopulationen von einer für lösliche Mediatoren wie Zytokine durchlässigen Membran getrennt, so nahm die IFN- γ Konzentration um fast 70% ab.

Andere Mechanismen der für die gesamte Immunantwort wichtigen M Φ Aktivierung als die durch Zytokine vermittelten wurden bisher nicht beschrieben und sollen Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein.

II. ZIELSETZUNG

Durch Interferon (IFN-) γ werden Makrophagen (M Φ) aktiviert, was sie befähigt, phagozytierte Erreger effektiv abzutöten. Darüber hinaus vermittelt IFN- γ zwischen den Mechanismen der unspezifischen und der spezifischen Infektabwehr. Die Induktion dieses Zytokins ist daher ein wichtiger Schritt für die Auslösung der gesamten zellvermittelten Immunantwort. Während der frühen Phase der Immunantwort wird IFN- γ von NK Zellen gebildet. Vorversuche hatten ergeben, daß ein für *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) und eine Reihe anderer Erreger gültiges Modell der IFN- γ -Induktion nicht auf Infektionen mit *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) übertragen werden kann. Dieses Modell beinhaltet die direkte Auslösung der Produktion der M Φ -Zytokine Tumor Nekrosis Faktor (TNF-) α und Interleukin (IL-) 12 durch den jeweiligen Erreger. Diese Zytokine zusammen stimulieren dann NK Zellen zu einer Produktion von IFN- γ . *P. carinii* ist jedoch nicht in der Lage, diese Zytokine in isolierten M Φ zu induzieren. Trotzdem wird nach einem Stimulus mit diesem Erreger in Gesamtmilzzellen die Bildung von IFN- γ ausgelöst, dessen Konzentrationen der nach einer Stimulation mit *L. monocytogenes* entspricht.

Die mit der Methode des ELISA erworbenen Daten sollten durch den Einsatz der Polymerase-Ketten-Reaktion ergänzt werden, um die im Kulturüberstand gemessenen Proteinkonzentrationen mit der Expression der Zytokin-mRNA vergleichen zu können.

Obwohl isolierte M Φ nach Stimulation mit *P. carinii* kein TNF- α produzieren, induziert dieser Erreger in Gesamtmilzzellen der SCID Maus die Produktion von IFN- γ . Daher sollte überprüft werden, ob durch *P. carinii* andere, bisher nicht nachgewiesene lösliche Mediatoren in M Φ induziert werden, die die Freisetzung von IFN- γ durch NK Zellen auslösen. Als Vergleichsmodell sollte *L. monocytogenes* dienen.

Der gleiche Grund führte zu der Überlegung, daß Zytokin-unabhängige Mechanismen zwischen M Φ und NK Zellen eine IFN- γ Produktion ermöglichen könnten. So sollte

untersucht werden, ob eine Zellkontakt-vermittelte Signaltransduktion zwischen M Φ und NK Zellen existiert.

Im Falle des Nachweises eines Zellkontakt-abhängigen Mechanismus sollten Oberflächenmoleküle nachgewiesen werden, die an diesem System beteiligt sind.

Die an den Zelloberflächen-vermittelten Mechanismen der M Φ Aktivierung beteiligten Antigene sollten in Hinblick auf ihre Funktion und ihre durch den Erreger induzierte Expression untersucht werden.

Die Herstellung von blockierenden Antikörpern sollte die zukünftige Suche nach weiteren, ebenfalls an Zell-Zell-Kontakten zwischen M Φ und NK Zellen beteiligten, Antigenen erleichtern.

Die Erweiterung der Kenntnisse über die Abläufe der Wirtszellantwort ist die Voraussetzung für ein besseres Verständnis auf dem Gebiet der frühen Infektion. Der Zeitraum während der Initiierung einer Immunantwort ist hierbei besonders wichtig, da die Mechanismen im Anfangsstadium für den Ablauf und den Schweregrad einer Infektion maßgeblich sind.