

IV. ERGEBNISSE

1. Erregerinduzierte Wechselwirkungen zwischen Zellen der natürlichen Infektabwehr

Pneumocystis carinii (*P. carinii*) und hitzegetötete *Listeria monocytogenes* (hkLm) induzieren in Gesamtmilzzellen (GMZ) von Mäusen mit severe combined immunodeficiency (SCID) Interferon (IFN)- γ in vergleichbaren Mengen. Makrophagen (M Φ) alleine konnten jedoch, im Gegensatz zu *L. monocytogenes*, durch *P. carinii* nicht zu einer Freisetzung von TNF- α und IL-12 stimuliert werden (Warschkau, 1996, Warschkau *et al.*, 1997). Die Produktion dieser beiden Mediatoren ist im zytokinabhängigen Induktionsmodell nach Bancroft *et al.* (1989) und Tripp *et al.* (1993) jedoch notwendiger Ausgangspunkt für die IFN- γ Produktion durch NK Zellen. Dieser Widerspruch wurde in der vorliegenden Arbeit mit einem erweiterten Methodenspektrum detailliert hinterfragt und damit zugleich die alternative Hypothese einer Zellkontakt-vermittelten NK Zell-Aktivierung überprüft.

1.1. Zytokinexpression nach *in vitro* Stimulierung mit *L. monocytogenes* und *P. carinii*

Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* stimulieren *P. carinii* Organismen in hochreinen M Φ Populationen keine Freisetzung von TNF- α und IL-12 (Warschkau *et al.*, 1997). Dieses Erkenntnis betrifft die Sekretion von funktionell aktivem TNF- α (nachgewiesen in L929-Bioassay) und von IL-12- und TNF- α -Protein (nachgewiesen in spezifischen ELISA). Es wurde daher zuerst geprüft, ob während einer Inkubation von *P. carinii* mit isolierten M Φ bereits die Induktion von TNF- α - und IL-12-mRNA (Transkription) unterbleibt oder die Freisetzung der Zytokine durch posttranskriptionale Mechanismen unterdrückt wird. Hierfür wurde die Expression der Zytokin-Ribonukleinsäure während der frühen Infektionsphase mittels Reverser Transkriptions-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) untersucht, eine Methode, die in der Arbeitsgruppe neu etabliert werden mußte. Zur Evaluierung der Methode wurden zuerst GMZ von SCID Mäusen entweder mit hkLm oder *P. carinii* *in vitro* inkubiert, da beide Erreger in Milzzellen ein breites Spektrum an Zytokinen induzieren. Die RNA der Zellen wurde nach verschiedenen Zeitpunkten aufgereinigt und, nach Transkription der RNA in DNA, die Technik der Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR)

verwendet, um die DNA zu vervielfältigen. Die DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen und mit dem in die DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Anhand der Fluoreszenzintensität der PCR-Produkte konnte auf die Menge der ursprünglich in den Proben vorhandenen RNA geschlossen werden. Um mit Hilfe der PCR quantitative Aussagen über die Menge der in den Zellen gebildeten mRNA treffen zu können, mußten die Mengen des eingesetzten Probenmaterials vereinheitlicht werden. Dazu wurden anhand des aktivierungsunabhängig exprimierten Gens für Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase (HPRT) die Mengen der cDNA verschiedener Proben angeglichen. Wie in **Abb. 4.1** dargestellt, induzierten *P. carinii* Organismen und *L. monocytogenes* ähnliche Zytokin-Induktionsmuster in SCID GMZ: IL-10 wurde in beiden Erregermodellen erst nach 24 Stunden beobachtet. Ribonukleinsäure von IFN- γ und der induzierbaren Stickoxid Synthase (iNOS) konnte nach sechs Stunden nachgewiesen werden, die Expression nahm bis 24 Stunden nach Infektion zu. IL-1 β wurde konstitutiv exprimiert und durch beide Erreger nicht beeinflußt. Unterschiede zeigten jedoch die Induktionsmuster für IL-12 und TNF- α : Während IL-12 durch *L. monocytogenes* bereits nach sechs Stunden hochreguliert wurde, wurde eine verstärkte Expression nach Infektion mit *P. carinii* erst nach 24 Stunden beobachtet. 30 Minuten nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* wurde TNF- α detektiert, dessen Expression nach sechs Stunden ein Maximum erreichte. Dementgegen wurde eine starke TNF- α -Expression erst 24 Stunden nach einer *P. carinii*-Infektion beobachtet.

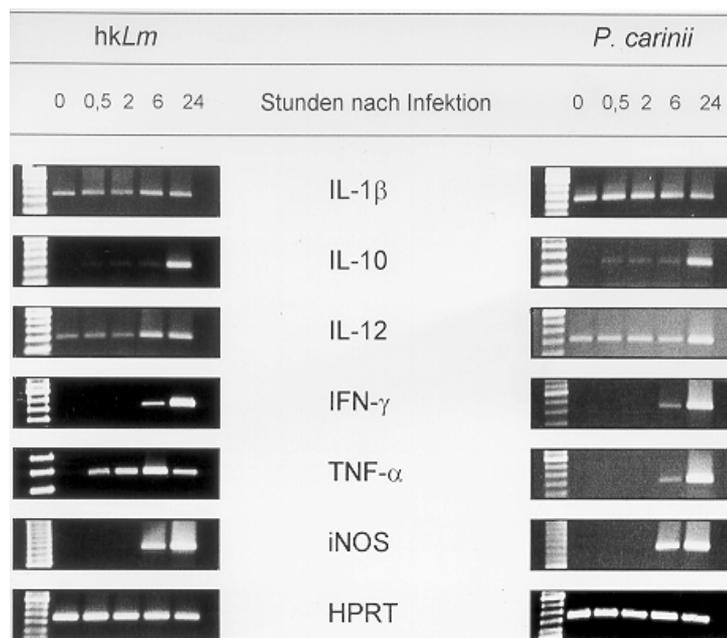


Abb. 4.1: Zytokinexpression in GMZ von SCID Mäusen nach *in vitro* Inkubation mit hkLm und P. carinii. Gesamtmilzzellen von SCID Mäusen (2×10^6) wurden entweder mit hkLm (2×10^7) oder P. carinii (2×10^6) bei 37°C, 6% CO₂ inkubiert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die Gesamt-RNA aufgereinigt und transkribiert. Vor der Zytokin-PCR wurden die Proben anhand ihres Gehaltes an HPRT-RNA densitometrisch normalisiert, Unterschiede zwischen den Intensitäten der dargestellten PCR-Produkte sind daher allein auf eine Beeinflussung durch die Erreger zurückzuführen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von vier.

Im Anschluß an die Untersuchung der Zytokinmuster, die beide Erreger in GMZ auslösen, wurde deren Zytokininduktion in isolierten MΦ miteinander verglichen. Hierfür wurden MΦ aus einer Knochenmarkkultur gewonnen, mit hkLm oder P. carinii *in vitro* inkubiert, die Gesamt-RNA nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 0,5, 2, 6, 24 h) aufgereinigt und transkribiert. Auch in isolierten Knochenmarkkultur-MΦ wurde IL-1β konstitutiv exprimiert und durch hkLm nicht beeinflusst. Wie in GMZ wurden TNF-α nach 30 Minuten, IL-12 und iNOS nach sechs Stunden, IL-10 nach 24 Stunden beobachtet. 24 Stunden nach Infektion der MΦ mit hkLm ist die Expression aller untersuchten Faktoren deutlich zu beobachten **Abb. 4.2.**

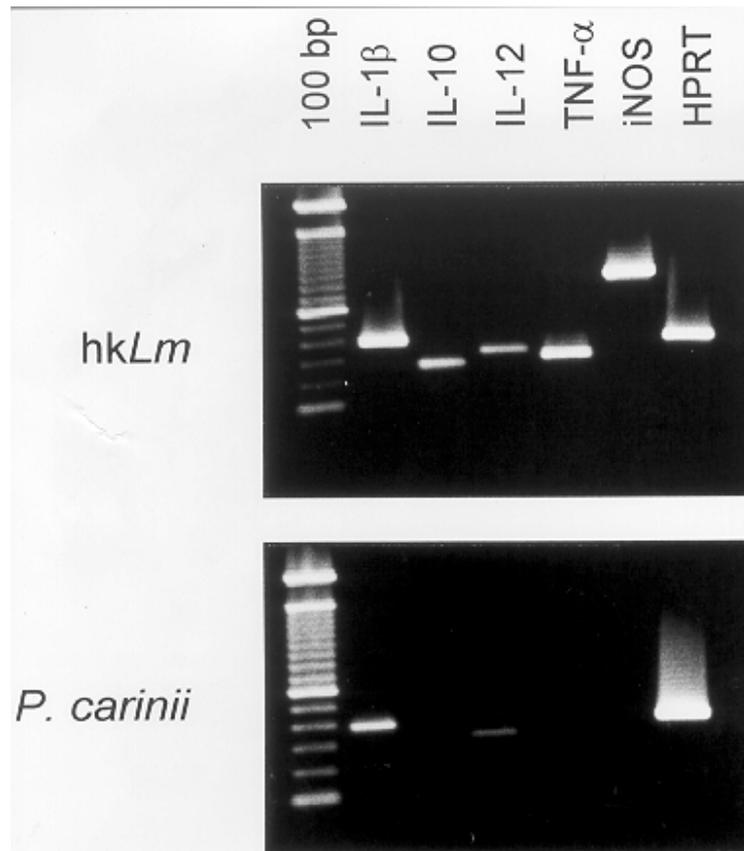


Abb. 4.2: Zytokinexpression in isolierten Knochenmarkkulturmakrophagen nach *in vitro* Inkubation mit *hkLm* und *P. carinii*. M Φ wurden aus Knochenmarkstammzellen in Anwesenheit von M Φ -Kolonie-stimulierendem Faktor (M-CSF) gewonnen. 1×10^6 M Φ wurden mit 1×10^7 *hkLm* oder 1×10^6 *P. carinii* Organismen für 24 h bei 37°C, 6% CO₂ inkubiert, die Gesamt-RNA isoliert und transkribiert. Vor der Zytokin-PCR wurden die Proben anhand ihres Gehaltes an HPRT-RNA densitometrisch normalisiert, Unterschiede zwischen den Intensitäten der dargestellten PCR-Produkte sind daher allein auf eine Beeinflussung durch die Erreger zurückzuführen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier.

Im Gegensatz dazu reagierten die isolierten M Φ zu keinem der beobachteten Zeitpunkte auf einen Stimulus durch *P. carinii* mit einer erhöhten Expression der untersuchten Zytokine. Nur die Expression der auch in nicht infizierten Zellen nachzuweisenden Zytokine IL-1 β und IL-12 konnte beobachtet werden. Allerdings wurden diese Zytokine durch eine Inkubation mit *P. carinii* nicht beeinflusst.

Diese Daten zeigen, daß die Unterschiede der M Φ -Reaktionen auf den jeweiligen Erreger auf prätranslativationaler Ebene liegen. M Φ werden durch *P. carinii* nicht zu einer Produktion von TNF- α und IL-12 stimuliert.

1.2. Nachweis der Funktion löslicher Faktoren bei den Interaktionen zwischen M Φ und NK Zellen

Nach Stimulierung von M Φ durch *P. carinii* wurden TNF- α und IL-12 weder auf Protein- noch auf mRNA-Ebene gemessen. Entsprechend wurden TNF- α - und IL-12-unabhängige Mechanismen der Erreger-induzierten NK Zell-Aktivierung geprüft. Es wurde die Frage gestellt, ob andere, bisher nicht erfaßte, lösliche M Φ -Faktoren durch den Erreger induziert wurden, welche NK Zellen zu einer Produktion von IFN- γ stimulieren. Dieser Nachweis wurde anhand der Wirkung dieser Faktoren, also dem Auslösen einer Produktion von IFN- γ , geführt. Um sichergehen zu können, daß nur M Φ und NK Zellen an der Produktion von IFN- γ beteiligt sind, wurden hochreine Zellpopulationen hergestellt. Die Verwendung definierter Populationen bot darüber hinaus die Möglichkeit, diese auch voneinander getrennt, also ohne direkten Zell-Zell-Kontakt zu inkubieren.

Die Generierung von M Φ aus Knochenmarkkulturzellen erbringt eine hochreine Zellpopulation ohne Kontamination durch andere Zelltypen (s. Kap. III, 10.2). Die Reinheit der M Φ -Population wurde dennoch mittels voneinander unabhängiger Verfahren getestet: Die für die Funktionstests verwendeten Zellen waren adhärenz an Zellkultur-Plastik, positiv für nicht-spezifische Esterase und die Bindung des Maus M Φ spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAk) F4/80. Zur Aufreinigung von NK Zellen aus GMZ von SCID Mäusen

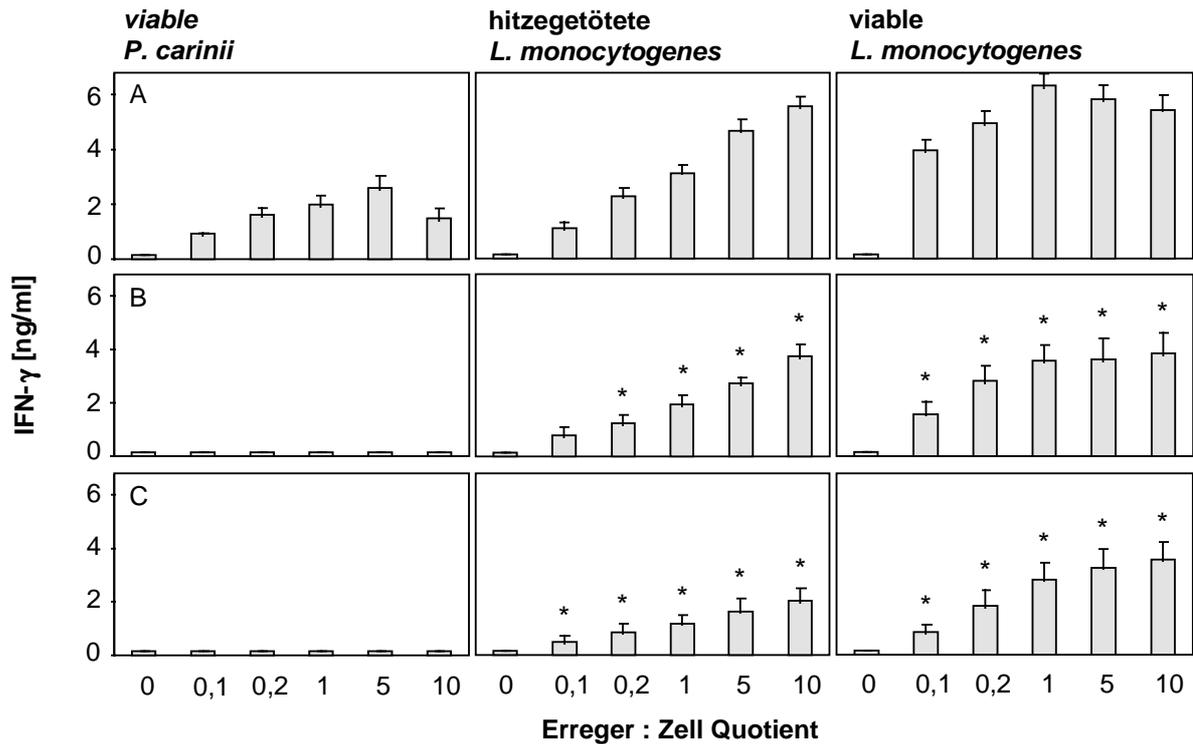


Abb. 4.3: *P. carinii* und *L. monocytogenes* induzieren IFN- γ in Kokulturen von M Φ und NK Zellen, jedoch nur (*P. carinii*), bzw. in höheren Konzentrationen (hkLm, vLm), wenn der direkte Zellkontakt zwischen M Φ und NK Zellen nicht unterbunden wurde. M Φ und NK Zellen (jeweils 5×10^5 /ml) wurden entweder zusammen (Reihe A) oder durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt (Reihe B) 48 h entweder mit viablen *L. monocytogenes*, mit hkLm oder mit viablen *P. carinii*-Organismen inkubiert. Reihe C: M Φ wurden mit den jeweiligen Erregern 16-18 h inkubiert, die Zellkulturüberstände zentrifugiert und filtriert (Porengröße 0,22 μ m) zu NK Zellen gegeben und diese für weitere 48 h inkubiert. IFN- γ wurde mit einem Sandwich ELISA bestimmt. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt vier. * = $p < 0,001$ gegenüber den vergleichbaren Werten aus Reihe A.

wurden adhärenente Zellen während einer Inkubation in Nylonwolle-Säulen entfernt (s. Kap. III, 10.4). Die Reinheit des Effluates wurde aufgrund morphologischer, antigener und funktioneller Kriterien bestimmt: Nichtadhärenente Zellen aus SCID Mäusen mit der Morphologie großer granulärer Lymphozyten, negativ für nicht-spezifische Esterase und F4/80, positiv für Asialo GM1 und zytotoxisch gegen YAC-1 Zellen wurden als NK Zellen bezeichnet und im Funktionstest verwendet.

Für die Versuche wurden zuerst jeweils 5×10^5 M Φ und NK Zellen in einem Gesamtvolumen von 1 ml zusammen für 48 h inkubiert (**Abb. 4.3**, Reihe A). Vorversuche zeigten, daß keiner der beiden Zelltypen alleine IFN- γ sowohl spontan, als auch in Anwesenheit von *P. carinii* oder auch *L. monocytogenes* sezerniert. Beide Zellpopulationen zusammen waren jedoch ausreichend, um *in vitro* auf einen Erregerstimulus durch *P. carinii* hin IFN- γ in deutlich nachweisbaren Konzentrationen zu bilden. Die Mengen gebildeten IFN- γ waren abhängig von der Dosis zugegebener Erreger. Hitzegetötete *L. monocytogenes*, wie auch viable *L. monocytogenes* (*vLm*), induzierten IFN- γ ebenfalls in Erregerdosis-abhängigen Mengen. Die Maximalkonzentrationen an IFN- γ unterschieden sich jedoch in Abhängigkeit des Erregertyps: Nach Zugabe von *P. carinii* wurde die höchste IFN- γ Konzentration mit 2590 pg/ml gemessen, während nach Stimulus durch *hkLm* die höchste Konzentration mit 5580 pg/ml, bei Verwendung von *vLm* sogar mit 6320 pg/ml nachgewiesen wurde.

Lösliche Faktoren, die von M Φ auf einen Erregerstimulus hin produziert werden, sollten NK Zellen zu einer Produktion von IFN- γ stimulieren, auch wenn M Φ und NK Zellen nicht in direktem Kontakt zueinander inkubiert werden. Aus diesem Grund wurde nun ein Versuchsansatz gewählt, der die Effektorzellpopulationen räumlich voneinander trennte, den Transfer löslicher Makromoleküle jedoch nicht behinderte: In einem Zweikammernsystem separierte eine permeable Membran (Porengröße 0,45 μm , Porendichte 1×10^8) M Φ von NK Zellen, sodaß kein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den Populationen hergestellt werden konnte. Die Ergebnisse dieses Versuchs sind in **Abb. 4.3**, Reihe B dargestellt. Wieder wurde keine Produktion von IFN- γ beobachtet, wenn *P. carinii* als Stimulus eingesetzt wurde, während *hkLm* und *vLm* Erregerdosis-abhängige Mengen an IFN- γ induzierten. Dessen Konzentrationen waren jedoch deutlich geringer ($p < 0,001$) als diejenigen, die in direkter Kokultur gebildet wurden.

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde ein weiterer Versuchsansatz gewählt, der ebenfalls keinen Kontakt zwischen MΦ und NK Zellen ermöglichte: Makrophagen wurden mit den jeweiligen Erregern für 16 bis 18 Stunden inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde anschließend zentrifugiert und filtriert und dann zu isolierten NK Zellen gegeben (**Abb. 4.3**, Reihe C). Auch in dieser Versuchsreihe konnte kein IFN-γ nachgewiesen werden, wenn die MΦ mit *P. carinii* inkubiert worden waren. Im Gegensatz dazu wurden die NK Zellen durch die Überstände von mit *L. monocytogenes* inkubierten MΦ zu einer IFN-γ Sekretion stimuliert. Auch hier waren die Konzentrationen gebildeten IFN-γ signifikant geringer als in den Versuchen, in denen MΦ und NK Zellen ein direkter Zell-Zell-Kontakt ermöglicht wurde.

MΦ und NK Zellen reagieren nur auf einen Stimulus durch *P. carinii* mit einer Produktion von IFN-γ, wenn beide Zelltypen in direktem Kontakt zueinander stehen. Diese Beobachtung ergänzt die früher gemachten Ergebnisse: Kokulturen von MΦ und NK Zellen produzieren IFN-γ nach *in vitro* Inkubation mit *P. carinii*. Diese Induktion wird jedoch weder durch IL-12, TNF-α, noch durch andere lösliche Mediatoren initiiert. Wurden *hkLm* oder *vLm* als Erreger verwendet, so waren die Konzentrationen an IFN-γ signifikant geringer, wenn MΦ und NK Zellen räumlich voneinander getrennt inkubiert wurden. Diese Ergebnisse sprechen für einen Zellkontakt-vermittelten akzessorischen Mechanismus der NK Zell-Aktivierung.

1.3. Blockierung von membranständigen Antigenen auf M Φ während der Aktivierungsphase der natürlichen zellulären Infektabwehr

Die im vorhergehenden Kapitel gezeigten Daten legten den Schluß nahe, daß Zellkontakt-abhängige Mechanismen während der Aktivierungsphase der natürlichen zellulären Infektabwehr eine Rolle spielen könnten. Diese Rolle wäre, je nach Art der Erreger, für eine IFN- γ Produktion entweder essenziell (*P. carinii*) oder zumindest im Zusammenspiel mit M Φ Zytokinen wirksam (*L. monocytogenes*). Um diese Hypothese zu überprüfen wurde versucht, für die Signaltransduktion eventuell verantwortliche Membranrezeptoren durch Zugabe von monoklonalen Antikörpern (mAk) zu blockieren. Hierfür wurden GMZ aus der SCID Maus mit *hkLm* in Anwesenheit spezifischer mAk gegen M Φ -Oberflächenantigene inkubiert. Für diesen Versuch wurde ein Erreger : Zell Verhältnis von 10 : 1 gewählt, da die IFN- γ Sekretion bei dieser Erregerdosis maximal ist. Die Differenz der IFN- γ -Konzentration gegenüber der des Inkubationssystems ohne mAk wurde als Maß für den Einfluß der jeweiligen Antikörper verwendet. In **Abb. 4.4 A** sind die Ergebnisse dieser Versuche dargestellt. Von den getesteten Antikörpern führten nur mAk gegen das F4/80-Antigen auf M Φ zu einer verringerten IFN- γ Sekretion. Je nach Experiment betrug diese Antikörper-abhängige Inhibition der IFN- γ Produktion bis zu 80 %. In dem dargestellten Versuch wurde die Zytokinfreisetzung um immer noch signifikante 50 % erniedrigt. Alle anderen eingesetzten Antikörper und auch ein Kontrollantikörper des gleichen Immunglobulin (Ig) Subtyps wie der des F4/80 Antikörpers beeinflussten die Freisetzung von IFN- γ in keiner Weise, unstimulierte Zellen bildeten kein IFN- γ .

Das Experiment wurde ebenfalls mit *P. carinii* durchgeführt (**Abb. 4.4 B**). In GMZ von SCID Mäusen wurden maximale IFN- γ Mengen bei einem Erreger : Zell Verhältnis von 5 : 1 gemessen. Daher wurde diese Erregerdosis auch hier verwendet. Durch Zugabe von Antikörpern gegen das F4/80 Antigen wurde die Sekretion von IFN- γ um bis zu 80 % verringert. Im Gegensatz dazu zeigte kein anderer der in diesem Versuch verwendeten mAk einen modulatorischen Effekt.

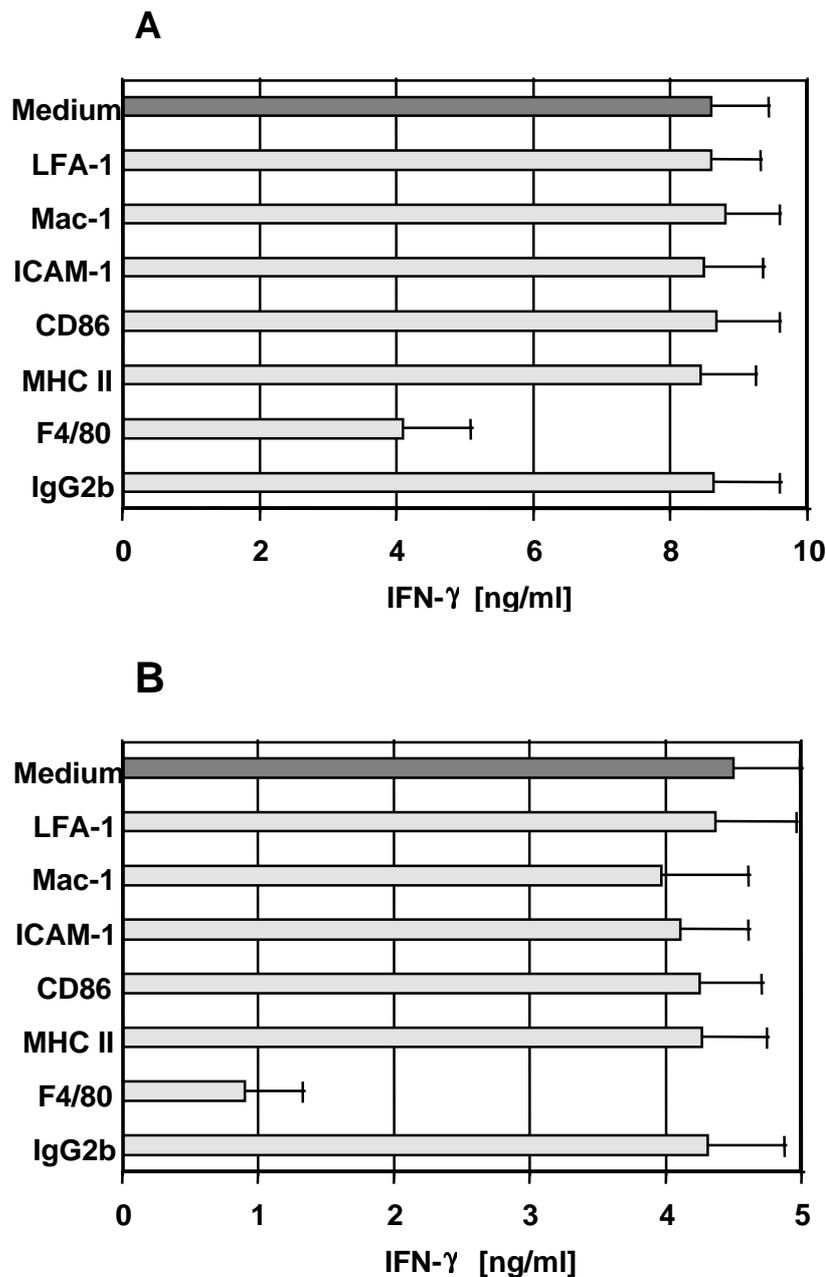


Abb. 4.4: Inhibierung der IFN- γ Produktion durch stimulierte SCID Gesamtmilzzellen in Gegenwart des M Φ -spezifischen monoklonalen Antikörpers F4/80. Gesamtmilzzellen aus der SCID Maus (1×10^6 / ml) wurden 48 h entweder mit hkLm in einem Erreger : Zell Verhältnis von 10 : 1 (A) oder *P. carinii* (5 : 1, B) und den angegebenen mAk (12 μ g/ ml) gegen M Φ Oberflächenrezeptoren inkubiert. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend mit einem Sandwich ELISA auf IFN- γ getestet. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt vier. * = $p < 0,0001$ gegenüber der Kontrolle ohne Antikörper.

1.4. Nachweis der Wirkungsweise des anti-F4/80 Antikörpers

Der in den Versuchen eingesetzte Antikörper gegen das F4/80 Oberflächenantigen wird häufig für den spezifischen Nachweis muriner M Φ mittels Immunhistochemie oder Durchflußzytometrie verwendet. Eine blockierende Wirkung des Antikörpers oder eine Funktion des Antigens wurde bislang noch nicht beschrieben. Um die Wirkung des anti-F4/80 Antikörpers genauer zu charakterisieren, wurde das Listerien-Modell ausgewählt. Es wurde zuerst überprüft, zu welchem Zeitpunkt der Antikörper zu hk*LM*-stimulierten GMZ gegeben werden muß, um seinen inhibierenden Effekt zu zeigen. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in **Abb. 4.5** dargestellt. Um eine Inhibition der Freisetzung von IFN- γ und IL-12 beobachten zu können, muß der Antikörper entweder vor oder während der Zugabe der Erreger in das System gegeben werden. Der Antikörper ist nicht mehr wirksam, wenn er sechs Stunden nach Zugabe der Mikroorganismen verwendet wird.

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigt, daß der Antikörper nur während der ersten Phase der Aktivierungskaskade wirksam ist. Zu einem späteren Zeitpunkt, also nach dem Zustandekommen der Wechselwirkungen zwischen M Φ und NK Zellen kann der Antikörper nicht mehr eingreifen.

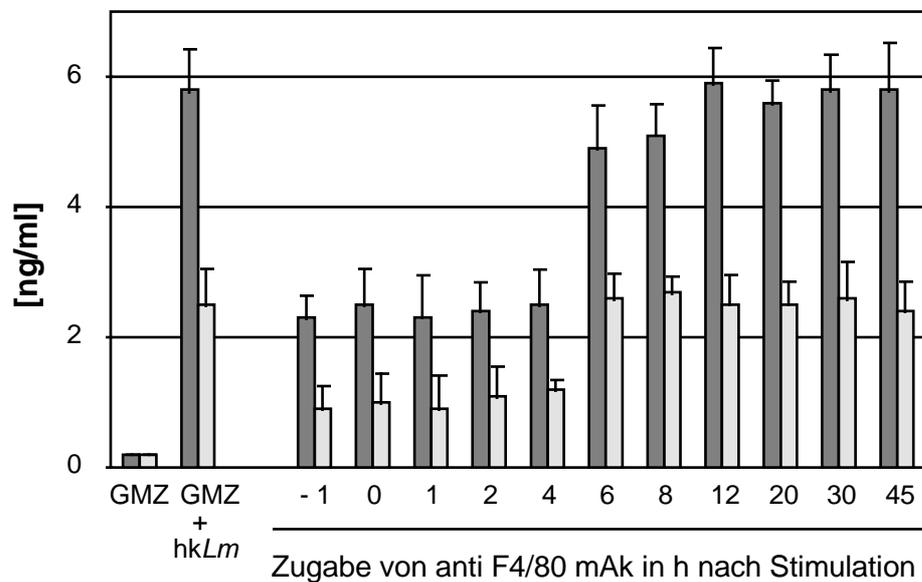


Abb. 4.5: Abhängigkeit der Wirkung des anti-F4/80 mAk vom Zeitpunkt seiner Zugabe zu hkLm-stimulierten SCID GMZ. Gesamtmilzzellen der SCID Maus (1×10^6 / ml) wurden mit hkLm (1×10^7 / ml) 48 h lang inkubiert. Antikörper gegen F4/80 ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) wurden den Zellkulturen zu den angegebenen Zeitpunkten zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Überstände entnommen und in spezifischen ELISA auf IFN- γ (■) und IL-12 (□) getestet. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei.

Um diese Daten abzusichern, wurde geprüft, ob die Produktion von IFN- γ , die letztendlich aus diesen Wechselwirkungen resultiert, schon von Beginn an durch den Antikörper herunterreguliert wird. Dazu wurden GMZ aus der SCID Maus zusammen mit hkLm und dem Antikörper inkubiert, die Überstände zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen und auf IFN- γ getestet. Wie in **Abb. 4.6** dargestellt, konnten in Abwesenheit des Antikörpers bereits nach sechs Stunden deutliche IFN- γ Konzentrationen nachgewiesen werden, die innerhalb von 48 Stunden kontinuierlich anstiegen. Danach (bis 72 Stunden) änderte sich die IFN- γ Konzentration nicht mehr. Wurden Antikörper gegen F4/80 zusammen mit den Zellen und Erregern inkubiert, so wurden stets signifikant ($p < 0,001$) geringere IFN- γ Mengen gemessen.

Die Konzentrationsdifferenzen wurden schon zum Zeitpunkt des ersten Nachweises von IFN- γ (nach sechs Stunden) beobachtet. Die Zugabe eines Kontrollantikörpers des gleichen Ig Subtyps veränderte die Stärke der IFN- γ Freisetzung nicht. Auch dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der Antikörper mit Mechanismen interagiert, die zu einem frühen Zeitpunkt nach einer Stimulation stattfinden und die IFN- γ Produktion einleiten. Um sicherzugehen, daß die Herabregulierung der IFN- γ Produktion wirklich aus einer Blockierung des Zellkontaktes durch den Antikörper resultiert, mußten weitere Kontrollversuche durchgeführt werden.

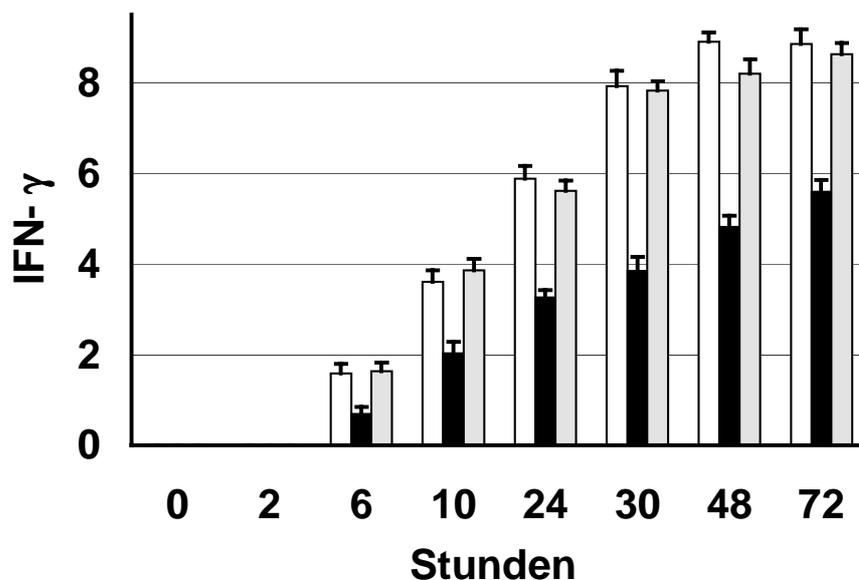


Abb. 4.6: Zeitabhängige Kinetik der IFN- γ Freisetzung von SCID GMZ nach Inkubation mit *hkLm* und anti-F4/80 mAb. Gesamtmilzzellen aus SCID Mäusen (1×10^6 / ml) wurden mit *hkLm* (1×10^7 / ml), in Anwesenheit (■) oder Abwesenheit (□) von anti-F4/80 mAb (12 μ g/ml) oder eines Kontrollantikörpers des gleichen Ig Subtyps (▒), inkubiert. Die Zellüberstände wurden anschließend mit einem Sandwich ELISA auf IFN- γ getestet. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei.

Da die verminderte IFN- γ Produktion auch durch den Zelltod von IFN- γ -produzierenden Zellen begründet sein konnte, wurden eventuelle zytotoxische Wirkungen des mAk F4/80 untersucht. Eine Zytotoxizität des Antikörpers konnte ausgeschlossen werden: Die in den *in vitro* Versuchen verwendeten Zellen wurden nach der Entnahme der zu testenden Überstände mit MTT (s. Kapitel III, 9.3) angefärbt. Lebende Zellen können den gelben Farbstoff MTT in blaue Formazankristalle umwandeln, die Farbentwicklung korreliert somit mit der Viabilität der Zellen und kann photometrisch bestimmt werden. Zwischen GMZ, die mit oder denen, die ohne mAk inkubiert worden waren, wurden keine Unterschiede in der Viabilität festgestellt. Mit Hilfe der TUNEL Methode (Boehringer Mannheim) konnte darüber hinaus keine apoptotische Wirkung des Antikörpers nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine verminderte IFN- γ Bildung nach Zugabe des mAk F4/80 könnte auch dadurch bewirkt werden, daß die spezifische Bindung von mAk F4/80 an das F4/80 Antigen auf M Φ signaltransduktorische Effekte in diesen Zellen auslösen könnte, die eine verminderte Produktion von IL-12 und TNF- α zur Folge hätten. Eine verminderte Freisetzung von IL-12 und TNF- α könnte dann für eine verminderte IFN- γ -Bildung verantwortlich sein. Daher wurden sowohl M Φ aus Knochenmarkkultur, als auch Milz-M Φ alleine mit hkLm oder mit hkLm und α -F4/80 mAk inkubiert. Die Menge der von den M Φ gebildeten Zytokine TNF- α und IL-12 wurden nach 24 h (TNF- α) oder 48 h mit Hilfe von spezifischen ELISA gemessen. Unstimulierte M Φ produzierten nur geringe Mengen an IL-12 (Milz: $0,08 \pm 0,03$ ng/ ml, Knochenmarkkultur: $0,05 \pm 0,02$ ng/ ml), jedoch kein TNF- α . **Abb. 4.7** zeigt, daß der mAk F4/80 keine direkte regulatorische Wirkung auf hkLm-stimulierte M Φ ausübt, die eine verminderte Produktion von TNF- α oder IL-12 zur Folge hätte.

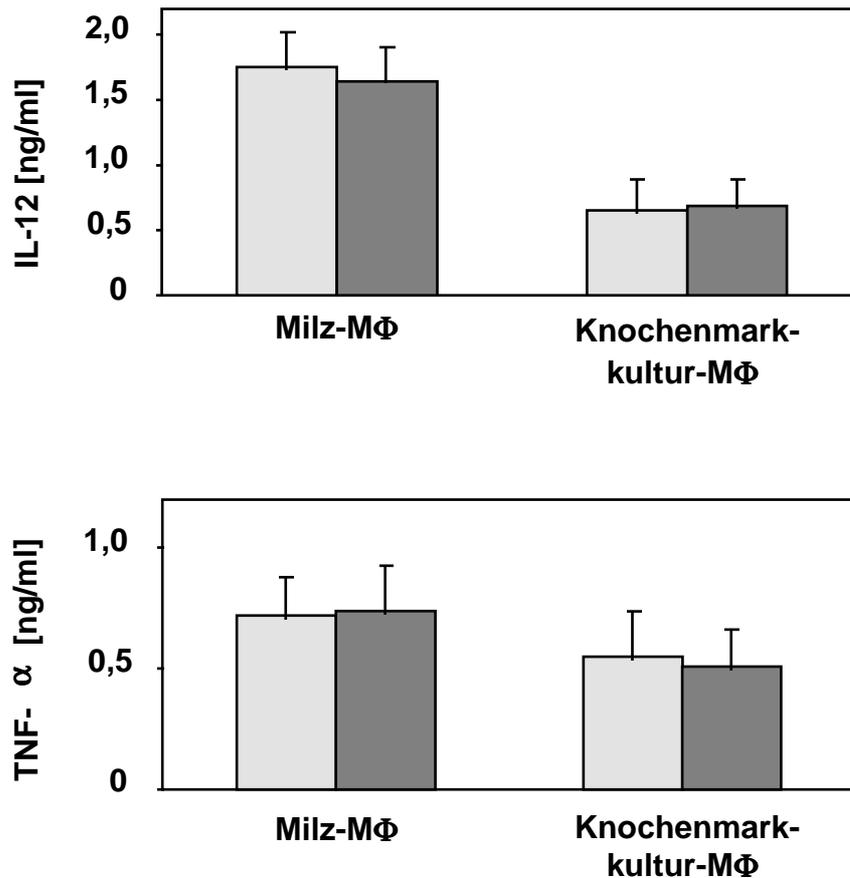


Abb. 4.7: Wirkung von α -F4/80 mAk auf die Produktion von TNF- α und IL-12 von *hkLm*-stimulierten Knochenmarkkultur- oder Milz-M Φ . Makrophagen aus Knochenmarkkultur oder Adhärenz-gereinigte Milz-M Φ (1×10^6 / ml) wurden mit *hkLm* (1×10^7 / ml) in Ab- (□) oder Anwesenheit von α -F4/80 mAk (■, 10 µg/ ml) inkubiert. Die Zellüberstände wurden nach 24 h (TNF- α) oder 48 h (IL-12) entnommen und die enthaltenen Zytokinkonzentrationen mit spezifischen ELISA gemessen. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei.

Nachdem festgestellt worden war, daß die Zugabe von anti-F4/80 mAk nicht die Produktion von TNF- α und IL-12 von isolierten, Erreger-aktivierten, M Φ inhibiert, wurden die Effekte des Antikörpers auf die hkLm-induzierte Synthese verschiedener immunologisch wirksamer Faktoren in GMZ untersucht. Dazu wurden Gesamtmilzzellen von SCID Mäusen mit hkLm und verschiedenen Konzentrationen von α -F4/80 mAk inkubiert. Neben TNF- α , IL-12 und IFN- γ wurden IL-1 β , IL-10 und anorganische Stickstoffintermediate (aNO) untersucht. Diesen Faktoren wird *in vitro* und *in vivo* eine Rolle während der frühen Listeriose zugesprochen. Die Überstände wurden nach 24 h (TNF- α) oder 48 h mit Hilfe von spezifischen ELISA oder einem chemischen Test (aNO) untersucht.

Abb. 4.8 zeigt, daß hkLm in einem Erreger : Zell-Verhältnis von 10 : 1 hohe Konzentrationen an IFN- γ , IL-12, TNF- α und aNO induzieren. Unstimulierte Zellen produzierten nur wenig IL-12 ($0,12 \pm 0,1$ ng/ ml), und kein IFN- γ , TNF- α , IL-10 oder aNO (Daten nicht gezeigt). IL-1 β wurde nur in geringen Mengen produziert, die sich kaum von denen unterschieden, die in unstimulierten Zellen gebildet wurden ($0,24 \pm 0,1$ ng/ ml, Daten nicht gezeigt).. Der anti-F4/80 Antikörper inhibierte IFN- γ , TNF- α und IL-12 dosisabhängig. Dahingegen zeigten weder der Kontrollantikörper des gleichen Subtyps (IgG2_b) noch der verwendete Antikörper gegen CD11a (LFA-1 α -Kette) einen signifikanten Einfluß auf die Zytokinproduktion. Im Gegensatz zu den inhibitorischen Effekten auf die Produktion von IFN- γ , TNF- α und IL-12 verstärkte der Antikörper gegen F4/80 die Freisetzung von IL-1 β und IL-10. Der mAk gegen LFA-1 zeigte auch auf die Freisetzung dieser Zytokine keinen Effekt. Auf die Produktion von aNO hatte keiner der eingesetzten mAk eine eindeutige Wirkung. Alle Antikörper erhöhten die Freisetzung in ähnlicher Stärke und mit einem Maximum bei 3 μ g/ ml. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Wirkung des anti F4/80 mAk auf hkLm-stimulierte GMZ in Abhängigkeit jedes einzelnen Zytokins unterschiedlich ist. Auffällig war weiterhin, daß mAk F4/80 und dessen Isotyp-Kontrolle unterschiedliche Effekte auf die Freisetzung der Zytokine zeigten. Während IFN- γ , IL-12 und TNF- α durch den mAk F4/80 inhibiert wurden, wurde die Freisetzung dieser Zytokine durch die Isotyp-Kontrolle nicht beeinflusst. Beide mAk zeigten jedoch eine ähnlich aktivierende Wirkung auf die Freisetzung von aNO, IL-1 β und IL-10.

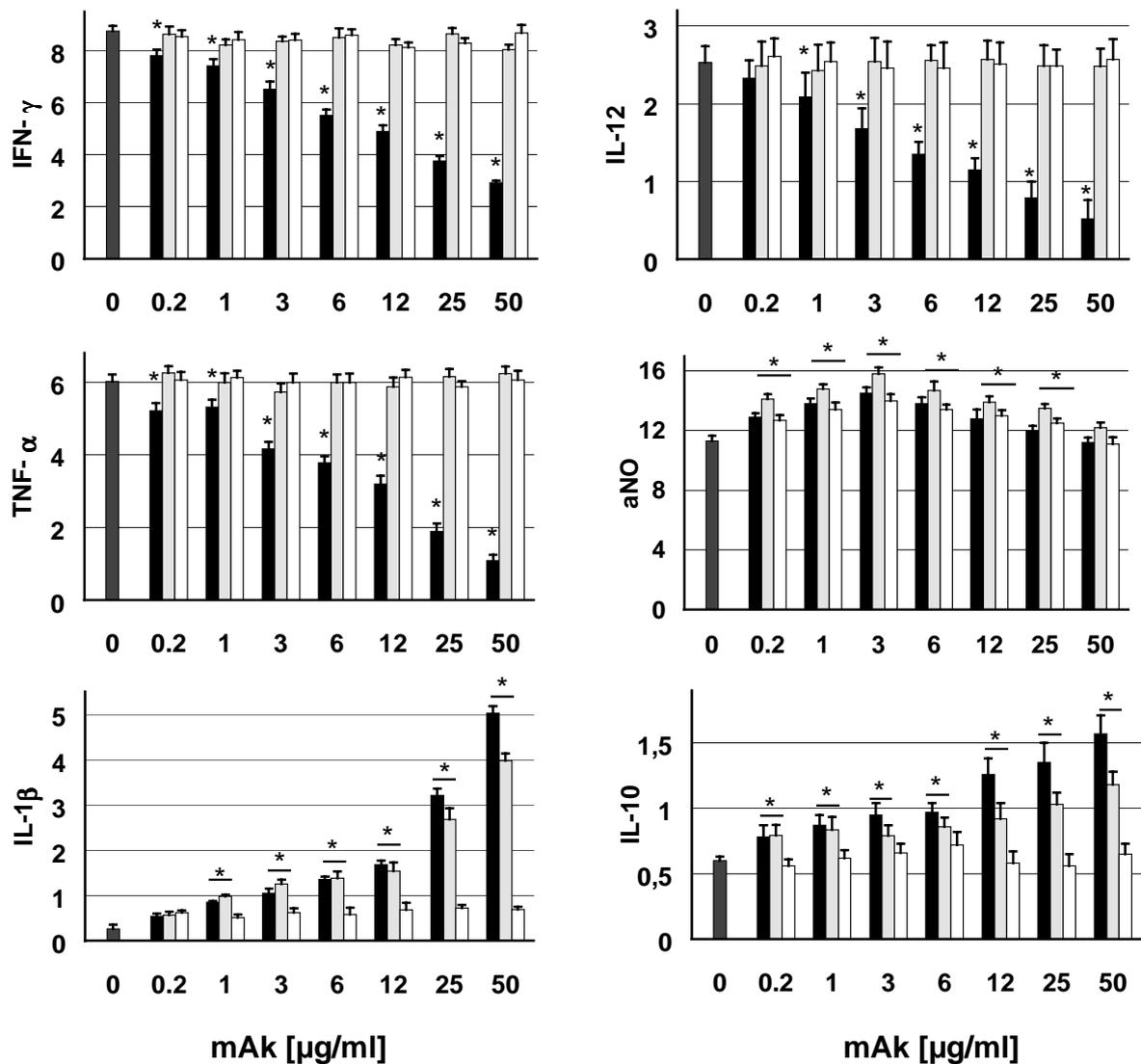


Abb. 4.8: Die Zytokinfreisetzung aus *hkLm* stimulierten SCID Gesamtmilzzellen wird durch anti F4/80 Antikörper unterschiedlich reguliert. Die Wirkung von anti-F4/80 mAk (■) wurde der Wirkung eines unspezifischen mAk des gleichen Subtyps (IgG2_b, □) und mAk gegen das Oberflächenmolekül LFA-1 (□) gegenübergestellt. Gesamtmilzzellen aus der SCID Maus (1×10^6 / ml) wurden mit 1×10^7 *hkLm*/ ml und verschiedenen Dosen an Antikörpern inkubiert. Nach 48 h (TNF- α : 24 h) wurden die Überstände entnommen und in spezifischen ELISA (ng/ ml) oder mit einem chemischen Test (aNO, μM) gemessen. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt vier. * = $p < 0,001$ gegenüber der Kontrolle ohne Antikörper (■).

Die divergierenden Effekte des mAk F4/80 wurden genauer untersucht. Es ist bekannt, daß $M\Phi$ durch die Zugabe von Antikörpern unspezifisch aktiviert werden können und in Folge eine Reihe von Effektormolekülen produzieren, die sie im ruhenden Zustand nicht bilden. Die im vorangegangenen Experiment beobachtete aktivierende Wirkung der Isotyp-Kontrolle sprach für einen solchen unspezifischen Effekt. Eine unspezifische Aktivierung wird über das Fc-Fragment des Antikörpers und den dazugehörigen Fc-Rezeptor z.B. auf $M\Phi$ vermittelt. Eine vermehrte Produktion von IL-10 durch $M\Phi$ könnte für die beobachtete Antikörper-abhängige Inhibition von IFN- γ verantwortlich sein. Dieser Mechanismus wäre dementsprechend unspezifisch und nicht in einer Blockierung der Wechselwirkungen zwischen $M\Phi$ und NK Zellen begründet.

Um herauszufinden, ob die Erhöhung der Produktion von IL-10 ihre Ursache aufgrund spezifischer oder unspezifischer Effekte des Antikörpers hatte, wurde der Antikörper enzymatisch gespalten (s. Kapitel III, 15). Die separaten Effekte der Antigen-bindenden (Fab) bzw. der Fc-Fragmente wurden jeweils mit denjenigen des vollständigen Antikörpers verglichen (**Abb. 4.9**). Dazu wurden GMZ aus der SCID Maus mit *hkLm* für 48 Stunden inkubiert und die in die Überstände abgegebenen Zytokine untersucht. Der Einsatz des ungespaltenen Antikörpers bewirkte die bereits zuvor beobachtete Verringerung der Freisetzung von IFN- γ , TNF- α und IL-12. Dementgegen wurde die Produktion von IL-10 verstärkt. Nach Zugabe der spezifischen Fab-Fragmente konnte eine dosisabhängige Abnahme sowohl von IFN- γ , TNF- α , IL-12 als auch von IL-10 beobachtet werden.

Die unspezifischen Fc-Fragmente bewirkten keine dosisabhängige Verringerung der IFN- γ - und TNF- α - Bildung. Eine signifikante Herabregulation ($p < 0,001$) durch die Fc-Fragmente konnte nur bei IL-12 beobachtet werden. Interleukin 10 wurde durch den Einsatz der Fc-Fragmente heraufreguliert ($p < 0,001$). Diese Daten weisen darauf hin, daß die Abnahme der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-12 aufgrund eines Antigen-spezifischen Effektes des Antikörpers bewirkt wurde, während die Erhöhung der Produktion von IL-10 eine unspezifische, Fc-Rezeptor-vermittelte Ursache hatte. Im Falle des ungespaltenen Antikörpers gegen F4/80 summieren sich beide Effekte zu der beobachteten Zytokinmodulation.

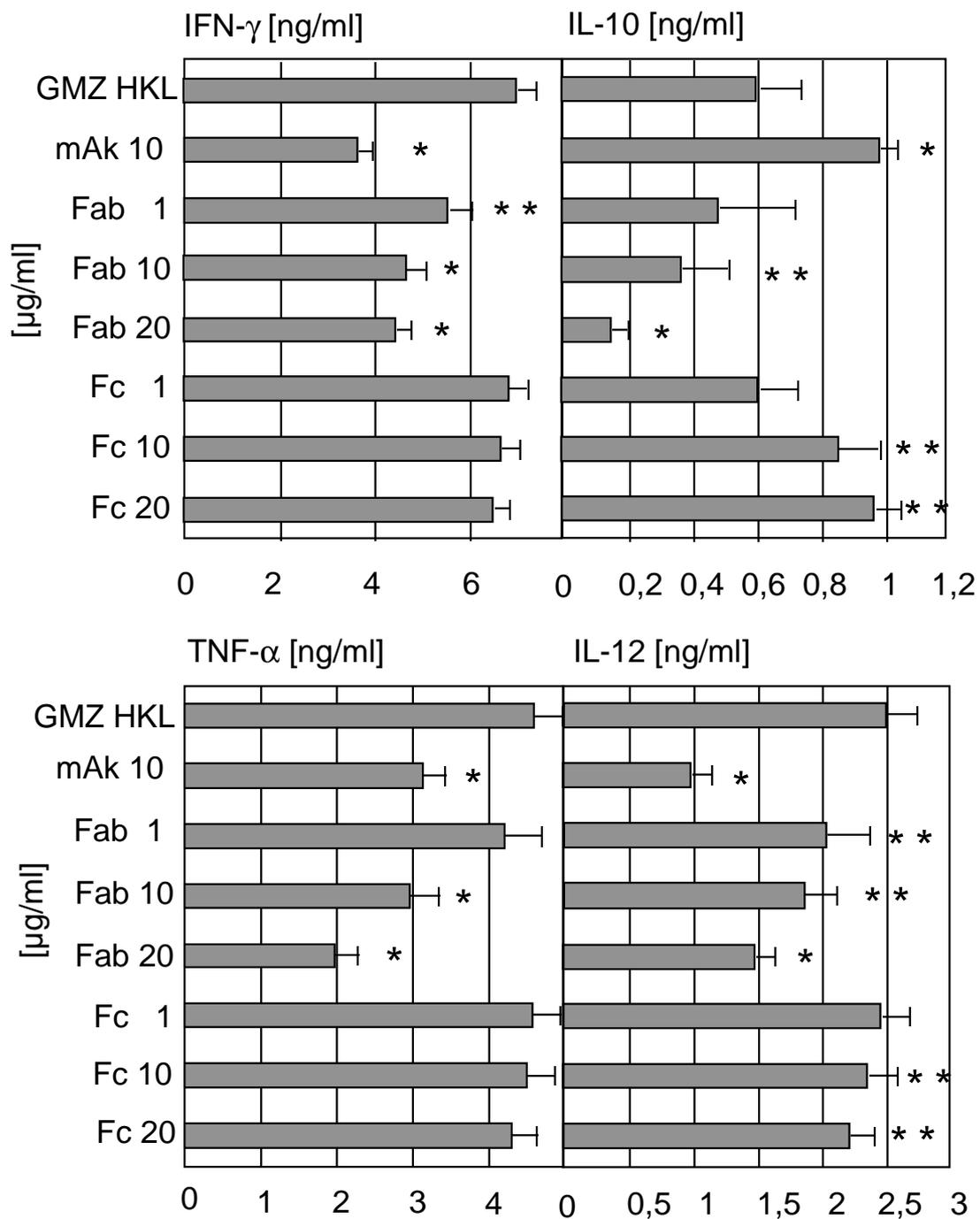


Abb. 4.9: Spezifische und unspezifische Wirkungen des mAk F4/80. Gesamtmilzzellen aus SCID Mäusen (1×10^6 / ml) wurden 48 h lang mit *hkLm* (1×10^7 / ml) inkubiert. Zusätzlich wurden entweder Antikörper gegen F4/80 oder deren Fab oder Fc Fragmente in den angegebenen Konzentrationen koinkubiert. Die Zytokine wurden in spezifischen ELISA aus den Zellüberständen nachgewiesen. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei. * $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$.

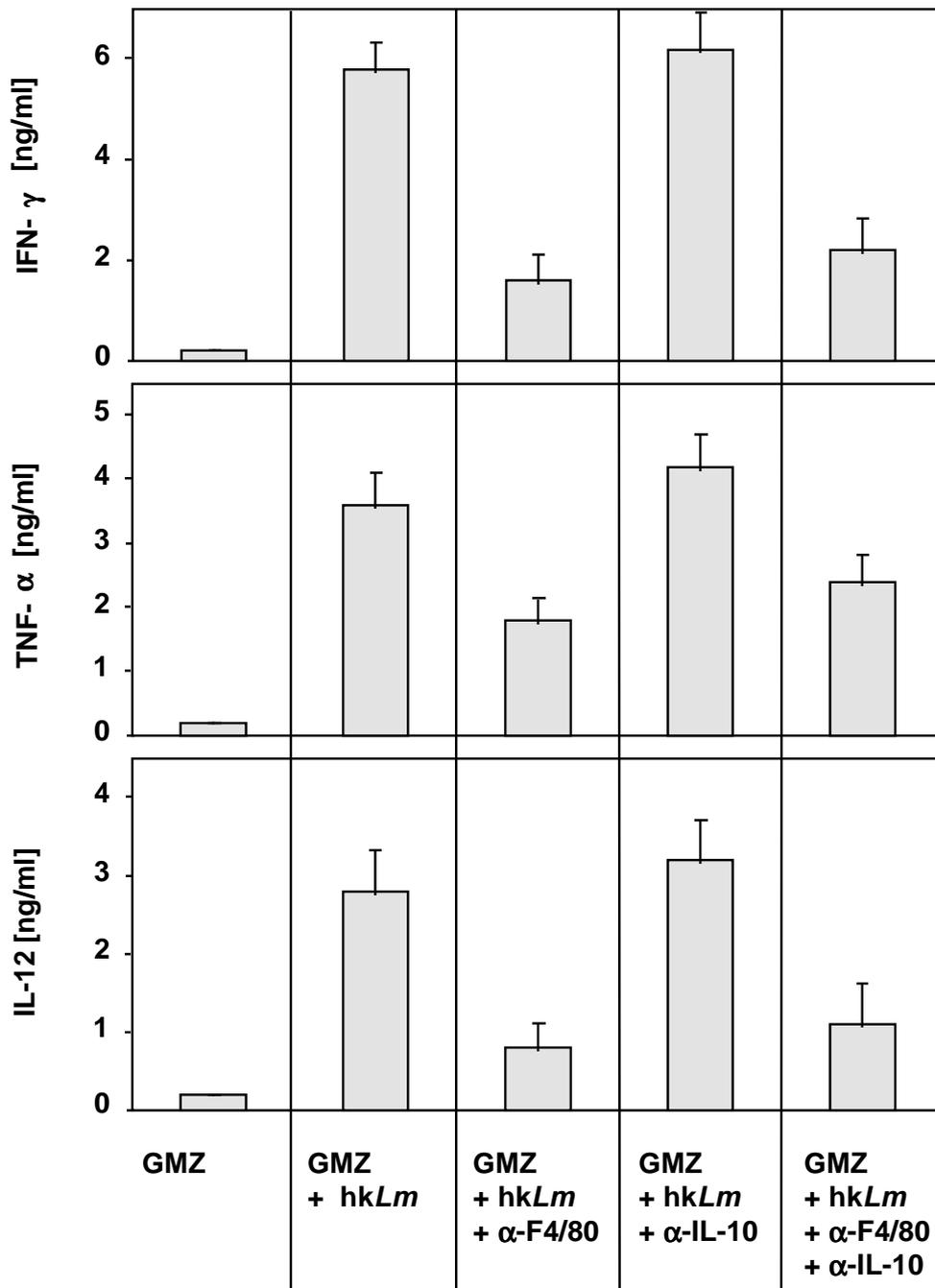


Abb. 4.10: Spezifische Modulation der Zytokinsekretion durch Antikörper gegen F4/80 in Abwesenheit von IL-10. Gesamtmilzzellen aus SCID Mäusen (1×10^6 / ml) wurden 48 Stunden lang mit *hkLm* (1×10^7 / ml), mAk gegen IL-10 (Klon JES5-2A5, $10 \mu\text{g}/\text{ml}$) und gegen F4/80 ($12 \mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert. Die Zytokine wurden in spezifischen ELISA aus den Zellkulturüberständen nachgewiesen. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei.

Ein weiterer Kontrollversuch wurde durchgeführt, um den Nachweis führen zu können, daß die spezifische Wirkung des F4/80 Antikörpers unabhängig von der inhibitorischen Wirkung von IL-10 ist. Dazu wurde während der *hkLm* Stimulation von GMZ gebildetes IL-10 durch spezifische mAk neutralisiert. Im Anschluß wurde beobachtet, ob die Antikörper gegen F4/80 im nunmehr IL-10 freien Kultursystem noch ihre inhibitorische Wirkung zeigten. Vorversuche hatten ergeben, daß die Zugabe von anti-IL-10 mAk des Klones JES5-2A5 keine stimulierende Wirkung auf GMZ hatte. In **Abb. 4.10** ist dargestellt, daß die *hkLm*-induzierte Freisetzung von IFN- γ , TNF- α und IL-12 durch das Fehlen von IL-10 leicht, wenn auch nicht signifikant, verstärkt wurde. Eine ebenso schwache Zunahme der Zytokinfreisetzung wurde auch nach Zugabe von anti-F4/80 mAk beobachtet: In Anwesenheit von IL-10 war eine etwas stärkere mAk F4/80-abhängige Zytokininhibition zu beobachten, als im IL-10-freien Kultursystem.

Auch dieses Ergebnis zeigt, daß die Wirkung des anti-F4/80 Antikörpers spezifisch ist. Die aus einer aktivierenden Wirkung des Antikörpers resultierenden Erhöhung der IL-10 Produktion unterstützt die Inhibition von IFN- γ , TNF- α und IL-12. Diese ist jedoch unspezifisch.

Sowohl M Φ als auch NK Zellen tragen auf ihrer Oberfläche Fc γ II- und III- Rezeptoren, welche für die unspezifische Bindung des Fc-Teils von Antikörpern verantwortlich sind. Um die Fc-Rezeptor-vermittelte, unspezifische Reaktionen der Zellen auf eine mAk F4/80-Zugabe von vornherein auszuschließen, wurden diese Rezeptoren auf GMZ während der Listerien-Stimulierung mit neutralisierenden Antikörpern (anti CD16/ CD32, Fc Block) blockiert. Diese Blockierung läßt dann keine weitere Bindung durch Fc-Termini von Antikörpern zu und geschieht ohne die Zellen zu aktivieren. Nach 30 Minuten Inkubation wurden dann mAk gegen F4/80 zu den Zellen gegeben und deren Wirkung auf die Produktion der M Φ -Zytokine IL-10 und IL-12 und von NK Zell-IFN- γ beobachtet. In **Abb. 4.11** sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt.

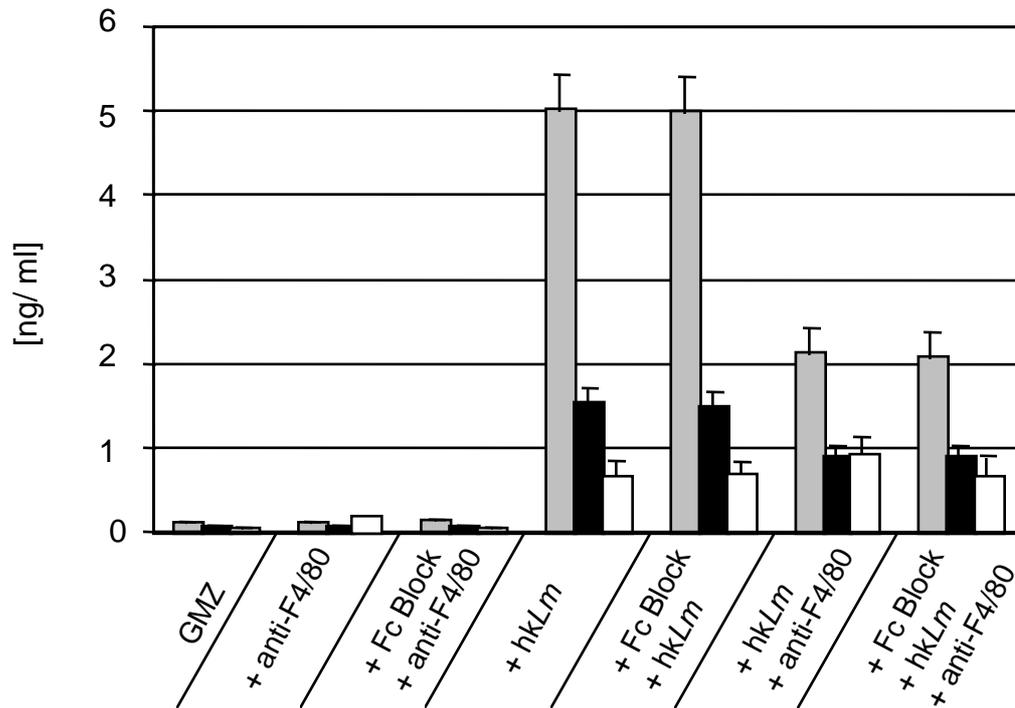


Abb. 4.11: Spezifische Modulation der Zytokin-Sekretion durch Antikörper gegen F4/80 in Anwesenheit von blockierenden Antikörpern gegen Fc γ Rezeptoren.

Gesamtmilzzellen von SCID Mäusen (1×10^6) wurden mit hkLm (1×10^7) und Antikörpern gegen CD16 und CD32 (Fc γ R III/ II, Fc Block, $10 \mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach 30 Minuten wurden Antikörper gegen F4/80 ($10 \mu\text{g/ml}$) zugegeben. Die Zellkultur wurde dann für 48 Stunden bei 37°C , 6% CO_2 inkubiert, die Zellüberstände mit spezifischen ELISA auf IFN- γ (□), IL-12 (■) und IL-10 (□) getestet. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei.

Die Zugabe von Antikörpern gegen Fc γ -Rezeptoren wirkt nicht aktivierend auf die mit *hkLm*-stimulierten Zellen, da die Freisetzung von IFN- γ , IL-12 und IL-10 in An- oder Abwesenheit dieser mAk gleich hoch war. Darüber hinaus verursachte die Zugabe der anti-CD16/ CD32 mAk keine Veränderung der anti-F4/80 mAk-vermittelten Inhibition der IFN- γ - und IL-12 - Freisetzung. Die Produktion von IL-10, die in Anwesenheit von anti-F4/80 mAk leicht erhöht war, wurde durch anti-Fc γ -Rezeptor mAk wieder ausgeglichen. Ebenfalls durch anti-CD16/ CD32 mAk ausgeglichen wurde die aktivierende Wirkung der Isotypkontrolle (Daten nicht gezeigt).

Zusammengefaßt wird durch diese Versuche deutlich, daß die inhibitorische Wirkung von mAk gegen F4/80, trotz einer geringfügigen unspezifischen, FcR-vermittelten Erhöhung von IL-10, spezifisch ist.

Die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung des mAk F4/80 an NK Zellen wurde detaillierter geprüft. Es wurde untersucht, ob eine eventuelle Fc Rezeptor-vermittelte Bindung des mAk F4/80 an NK Zellen die Fähigkeit dieser Zellen, auf einen Stimulus durch TNF- α und IL-12 zu reagieren, herabsetzt. Hierzu wurden mit Nylonwolle aufgereinigte NK Zellen mit verschiedenen Dosen an rekombinantem TNF- α und IL-12 (maximal 100 E/ ml) inkubiert. Mit einer Dosis von 70 E/ ml jedes Zytokins wurden den in Koinkubationsversuchen mit M Φ und *hkLm* gemessenen vergleichbare IFN- γ Konzentrationen beobachtet. Die Zugabe von anti-F4/80 (20 μ g/ ml) veränderte die Stärke der IFN- γ Freisetzung durch NK Zellen nicht. Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn statt rekombinanter Proteine der Überstand von mit *hkLm*-inkubierten M Φ zu NK Zellen gegeben wurde: wiederum wurde die Höhe der IFN- γ Konzentration durch Koinkubation des mAk mit den NK Zellen nicht verändert (**Tab. 4.1**).

Tabelle 4.1: Effekt von α -F4/80 mAk auf die IFN- γ Produktion aufgereinigter, Zytokin-aktivierter, NK Zellen^a

NK Zellen inkubiert mit:			
TNF- α / IL-12 ^b (rekombinant)	M Φ -konditionierter Zellkulturüberstand ^c	α -F4/80 ^d	IFN- γ ng/ ml (\pm SD) ^e
+	-	-	2,52 (0,62)
+	-	+	2,61 (0,51)
-	+	-	1,86 (0,47)
-	+	+	1,74 (0,52)

^a über Nylonwolle aufgereinigte NK Zellen (5×10^5 / ml) wurden wie angegeben für 48 h inkubiert, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt vier

^b jeweils 70 E/ ml

^c M Φ (5×10^5 / ml) wurden für 48h mit 5×10^6 hkLm/ ml inkubiert, die Überstände zentrifugiert und filtriert

^d 20 μ g/ ml

^e gemessen im ELISA, angegeben sind Mittel aus Dreifachwerten

Es wurde untersucht, ob den modulierenden Wirkungen des mAk F4/80 auf die Zytokinsekretion prä- oder posttranskriptionale Ursachen zugrunde liegen (**Abb. 4.12 A**). Densitometrische Schätzungen der PCR Produkte zeigen, daß die Anwesenheit des mAk F4/80 IFN- γ schon auf prätranskriptionaler Ebene inhibiert (**Abb. 4.12 B**). Während auch die Expressionen von IL-12 und TNF- α inhibiert wurden, wurde die mRNA Expression von IL-1 β und IL-10 verstärkt. Die mRNA Expression von iNOS wurde nicht moduliert. Anti F4/80 Fab bewirkten ähnliche inhibitorische Effekte auf IFN- γ , IL-12 und TNF- α wie der vollständige mAk, wohingegen die erregerinduzierte Expression von IL-1 β , IL-10 und iNOS nicht verändert wurden.

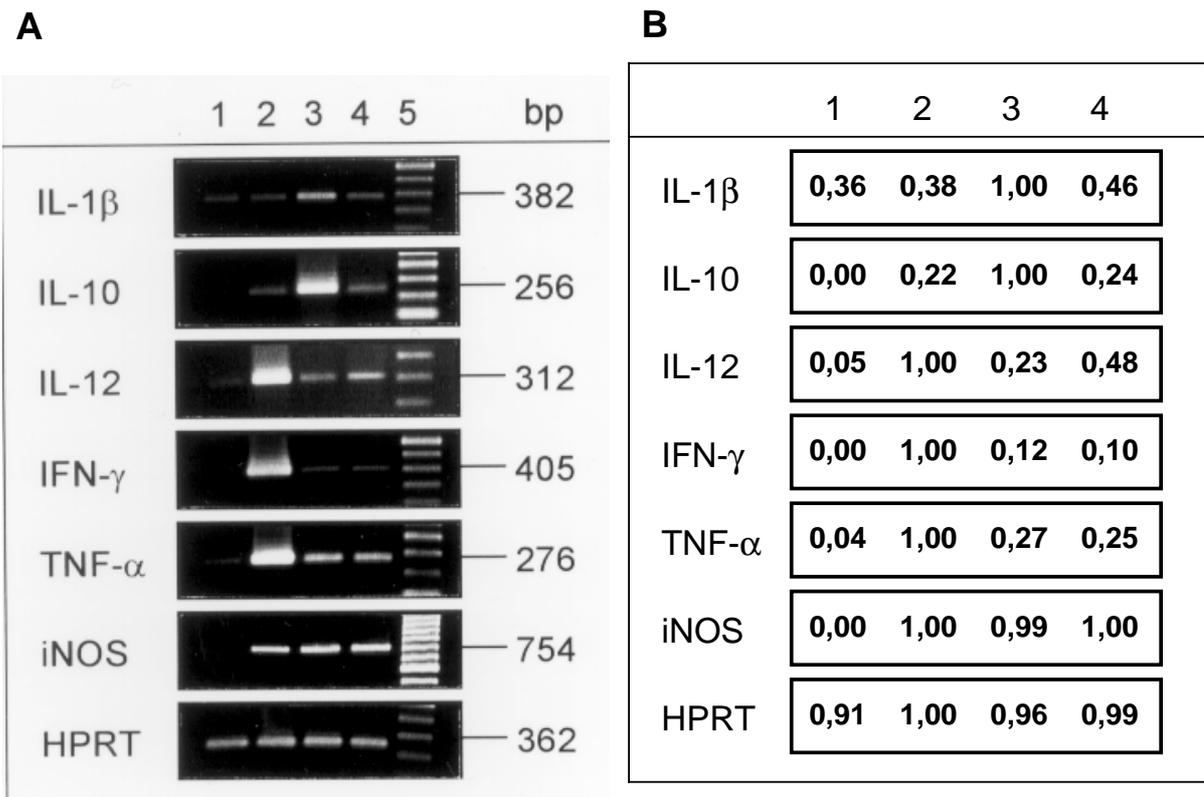


Abb. 4.12: Differenzielle Modulation der Zytokin-mRNA Expression durch anti-F4/80 mAk. SCID GMZ (1×10^6 / ml) wurden für 24 Stunden entweder alleine (Spalte 1), mit *hkLm* (1×10^7 / ml, Spalte 2), mit *hkLm* und anti F4/80 mAk (20 μ g/ ml, Spalte 3) oder mit *hkLm* und anti-F4/80 Fab (Spalte 4) inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und transkribiert. Vor der Zytokin-PCR wurden die Proben anhand ihres Gehaltes an HPRT-RNA densitometrisch normalisiert, Unterschiede zwischen den Intensitäten der dargestellten PCR-Produkte sind daher allein auf eine Beeinflussung durch Erreger oder Antikörper zurückzuführen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von drei. **A.** Parallel mit den PCR Produkten wurde ein 100 bp Fragmentgrößenstandard mitgeführt (Spalte 5). **B.** Densitometrischer Vergleich der in A gezeigten Zytokin PCR-Produkte.

2. Untersuchung der Funktion des murinen M Φ Antigens F4/80

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt eines monoklonalen Antikörpers gegen das M Φ Oberflächenmolekül F4/80 beschrieben: Nach Zugabe dieses mAk zu *L. monocytogenes*-stimulierten M Φ und NK Zellen wurde eine deutlich niedrigere IFN- γ Produktion beobachtet. Die Untersuchung der Wirkungsweise des mAk ergab, daß das F4/80 Antigen durch den mAk blockiert wird. Die Rolle des F4/80 Antigens während der NK Zell-Aktivierung und IFN- γ -Induktion direkt zu untersuchen war die Aufgabe, die im zweiten Teil der Arbeit behandelt wird.

Durch Transfektion einer M Φ -Zelllinie mit dem Gen für F4/80 wurden M Φ mit unterschiedlich starker F4/80 Expression hergestellt. In Koinkubationsversuchen dieser M Φ mit NK Zellen wurde untersucht, ob die Konzentration des in NK Zellen induzierten IFN- γ mit der Stärke der F4/80 Expression auf M Φ korreliert. Mit der Verwendung von M Φ aus Mäusen, denen durch eine Deletion das F4/80-Gen fehlt („Knock-out“ Mäuse), wurde untersucht, ob das vollständige Fehlen von F4/80 auf M Φ eine verminderte IFN- γ -Induktion zur Folge hat.

2.1 Stabile Transfektion von RAW 264.7 Zellen mit F4/80 cDNA

Die Stärke der F4/80 Expression wurde durch Transfektion mit für F4/80 kodierender cDNA erhöht. Da neben der veränderten F4/80 Expression ebenfalls alle weiteren M Φ -Funktionen (z.B. Phagozytose) ausgeprägt sein sollten, konnten nur M Φ für die Transfektion verwendet werden. Die schwach F4/80-exprimierende M Φ Zelllinie RAW 264.7 wurde mit F4/80 cDNA transfiziert (s. Kap. III, 17) und die Expression durchflußzytometrisch überprüft. Diese nun ca. zehnfach stärker F4/80 exprimierende Zelllinie wurde zusammen mit NK Zellen und *hkLm* für 48 Stunden inkubiert. Die Konzentrationen des von NK Zellen gebildeten IFN- γ wurden dann mit denen in Gegenwart des RAW Zell Wildtyps verglichen. Um eine mögliche F4/80-abhängige Erhöhung der IFN- γ Produktion nicht durch eine mangelnde Anzahl eventueller Liganden zu limitieren wurden verschiedene Relationen von NK Zellen eingesetzt. Wie in **Abb. 4.13** dargestellt, nahm die Produktion von IFN- γ in Abhängigkeit der Anzahl der

eingesetzten NK Zellen zu. Diese Beobachtung konnte mit beiden MΦ Varianten gemacht werden. Ebenfalls bei beiden MΦ Typen gleich und damit unabhängig von der Anzahl der F4/80 Antigene waren die Höhen der Konzentrationen von IFN- γ .

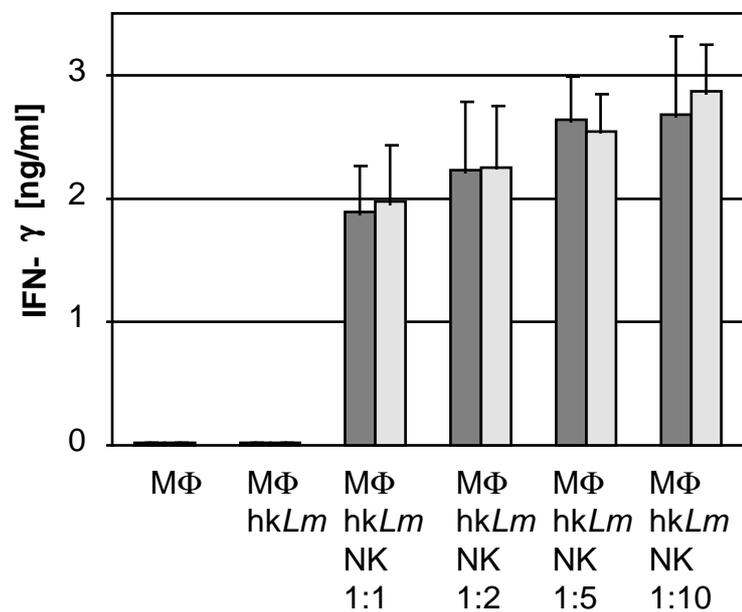


Abb. 4.13: *Listeria monocytogenes*-induzierte IFN- γ Produktion von NK Zellen in Anwesenheit von schwach oder stark F4/80 exprimierenden RAW 264.7 Zellen. RAW 264.7 Wildtyp-(■) oder RAW 264.7-F4/80 transfizierte Zellen (□, 5×10^5 / ml) wurden jeweils mit 5×10^6 hkLm/ ml und angegebenen NK Zell Zahlen für 48 h inkubiert. IFN- γ wurde mit einem spezifischen ELISA gemessen. Aufgetragen sind Mittelwerte aus vier Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt fünf.

2.2 F4/80 Gen-deletierte (“Knock-out”) Maus

In dem vorangegangenen *in vitro* Experiment wurde gezeigt, daß die unterschiedlich starke Expression des F4/80 Antigens auf M Φ die Höhe der IFN- γ Produktion durch NK Zellen nicht beeinflußt. Mit Hilfe der F4/80-Knock-out Maus (s. Kap. III, 7.1) wurde untersucht, ob ein gänzlich Fehlen von F4/80 auf M Φ die Bildung von IFN- γ durch NK Zellen einschränkt. Die IFN- γ Produktion nach *hkLm* Stimulierung von Gesamtmilzzellen aus der F4/80 homozygot negativen Maus wurden *in vitro* mit denen aus dem F4/80-exprimierenden Wildtyp verglichen.

Wie in **Abb. 4.14** dargestellt, produzierten *hkLm*-stimulierte GMZ aus der 129sv x C57BL/6 Wildtyp Maus Erregerdosis-abhängig steigende Konzentrationen von IFN- γ . Diese waren vergleichbar mit denen, die von C.B-17 SCID Mäusen produziert wurden. Die Produktion von IFN- γ in der F4/80 homozygot negativen Maus war deutlich geringer (bis zu Faktor 4). Trotzdem sind diese Mäuse grundsätzlich in der Lage IFN- γ auf einen bakteriellen Stimulus hin zu bilden. Diese Daten zeigen erste Hinweise, daß das Fehlen von F4/80 auf M Φ zu einer verminderten Produktion von IFN- γ durch NK Zellen führt.

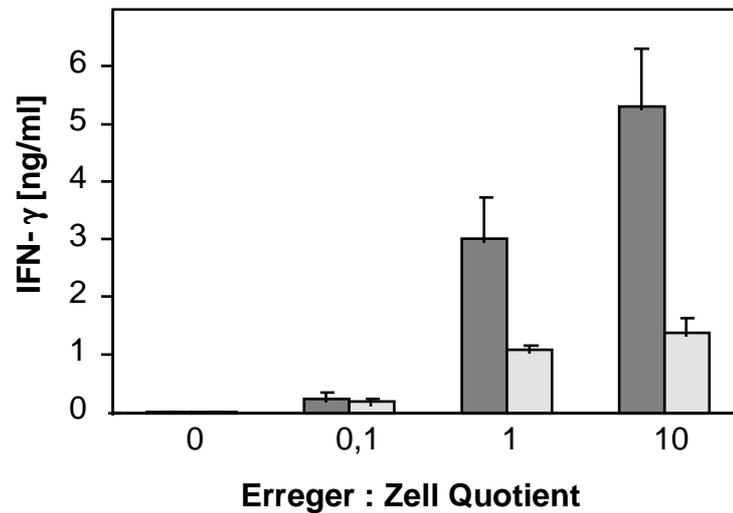


Abb. 4.14: Vergleich der *hkLm*-induzierten IFN- γ Produktion von Gesamtmilzzellen zwischen F4/80 KO - und Wildtyp Mäusen. Gesamtmilzzellen (1×10^6 / ml) von F4/80 homozygot negativen (□) und Wildtyp Mäusen (■) wurden 48 h lang mit *hkLm* in verschiedenen Erregerdosen inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurden die Mäuse mit Hilfe der PCR auf Vorhandensein oder Fehlen von F4/80 DNA untersucht. IFN- γ wurde mit einem spezifischen ELISA gemessen. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei.

3. Expressionsstudien von F4/80 und anderen membranständigen Antigenen während Listeriose in der SCID Maus

Die vorangegangenen Experimente zeigten, daß das membranständige F4/80 Antigen während der Aktivierungsphase der natürlichen zellulären Infektabwehr eine Rolle spielen könnte. Wie in Kap. 2. beschrieben, konnte eine Veränderung der Expressionsstärke von F4/80 auf einer MΦ-Zelllinie im Zusammenspiel mit NK Zellen keine unterschiedliche IFN- γ Produktion bewirken. Das Fehlen des Antigens führte jedoch zu einer signifikant niedrigeren IFN- γ Produktion. Um diese Daten von einer anderen Seite her zu beleuchten wurde die Frage gestellt, wie die Expression des F4/80 Antigens *in vitro* und *in vivo* im Listeriose-Modell verändert wird.

3.1 *In vitro* Expression

Als Kontrolle in diesem System diente der Nachweis der Expression der Moleküle des Haupthistokompatibilitäts Komplexes Klasse II (major histocompatibility complex class II, MHC-II). Da die Expression dieser Moleküle nur durch IFN- γ hochreguliert werden kann, konnte anhand dieses Nachweises indirekt auch überprüft werden, ob IFN- γ freigesetzt wird und somit, ob ein wesentlicher Grundschrift der natürlichen zellulären Infektabwehr initiiert wurde. Für die Darstellung der *in vitro* Expression wurde naiven SCID Mäusen die Milz entnommen. Die gewonnenen Zellen wurden nach der Lyse der Erythrozyten in vier gleichgroße Fraktionen aufgeteilt, von denen drei mit einer Zelldichte von jeweils $2 \times 10^6/5$ ml in Petrischalen (Durchmesser = 6 cm) aufgenommen wurden. Die vierte Fraktion wurde sofort mit mAk gegen F4/80 und MHC-II, den dazugehörigen Subtyp Kontrollen gefärbt und in einem fixierenden Puffer aufgenommen, der die Messung zu einem späteren Zeitpunkt erlaubt. Zu den übrigen Zellen wurden 2×10^7 hkLm gegeben. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen nach Kältebehandlung geerntet, gefärbt und bis zur Messung in dem oben genannten Puffer aufgenommen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.15** zusammengefaßt. Ungefähr 20% aller naiven Milzzellen aus SCID Mäusen waren positiv für F4/80. Nach Zugabe der Erreger nahm die Expression leicht aber kontinuierlich ab. Nach 72 Stunden waren nur noch 10% der Zellen F4/80 positiv. Im Gegensatz dazu nahm die Stärke der

Expression von MHC-II Molekülen stetig zu: In naiven Milzen waren 20% der Zellen positiv für MHC-II. Über den beobachteten Zeitraum nahm die Stärke der Expression um 20% zu. In Abwesenheit der Erreger veränderte sich über den beobachteten Zeitraum weder die Expression von F4/80 noch von MHC-II signifikant (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend wurde gezeigt, daß in dem Maße, in dem die MHC-II Expression zunahm, die Expression von F4/80 leicht, aber kontinuierlich reduziert wurde. Die Zunahme der MHC-II-Expression läßt in dem beobachteten Zeitrahmen indirekt auf eine verstärkte Bildung von IFN- γ schließen.

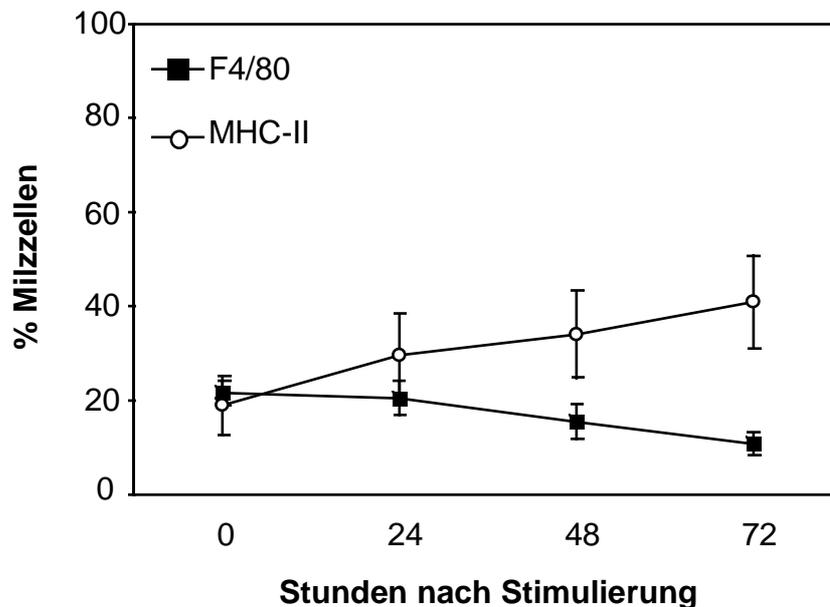


Abb. 4.15: Expression von F4/80 und MHC-II Antigenen nach *in vitro* Stimulierung von SCID Gesamtmilzzellen mit *hkLm*. Gesamtmilzzellen (2×10^6) aus SCID Mäusen wurden in Petrischalen für die angegebenen Zeiten mit 2×10^7 *hkLm* inkubiert und nach der Ernte mit mAk gegen F4/80 oder MHC-II Moleküle angefärbt. Die Messung erfolgte durchflußzytometrisch. Unspezifische Bindungen der zum Färben benutzten Antikörper wurden durch parallele Anfärbung mit Antikörpern des gleichen Subtyps korrigiert. Aufgetragen sind Mittelwerte von fünf Messungen und ihre Standardabweichungen. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch von insgesamt drei.

3.2 *In vivo* Expression

Für diese Untersuchung wurden 1×10^4 lebende *L. monocytogenes* intravenös in SCID Mäuse injiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Tiere getötet und ihre Milz für die Durchflußzytometrie homogenisiert. Um den Verlauf der Infektion beobachten zu können, wurden die Erregerzahlen in der Milz bestimmt. Diese sind in **Abb. 4.16** als koloniebildende Einheiten (colony forming units, CFU) gegen die Zeit aufgetragen.

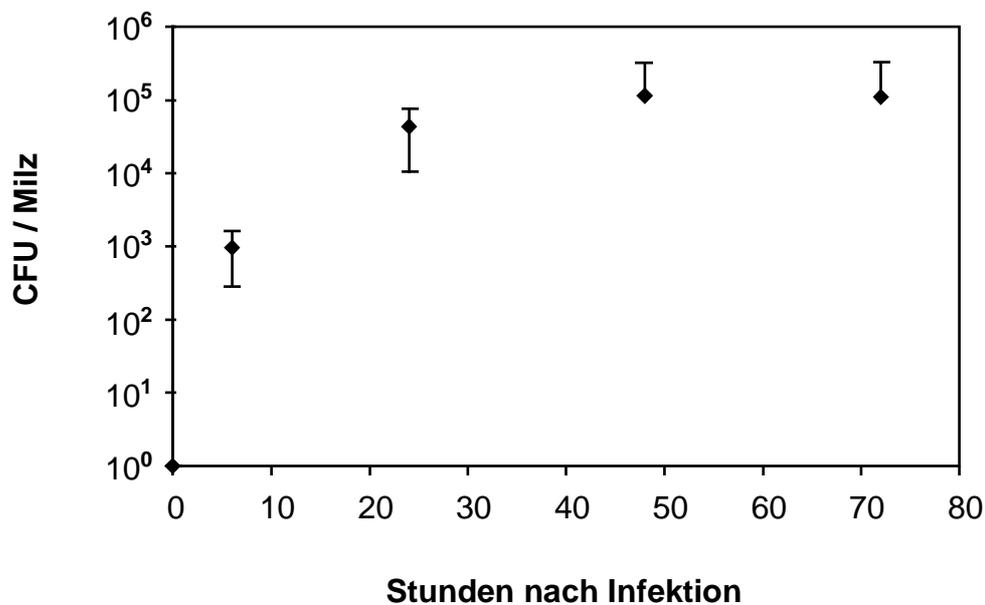


Abb. 4.16: Anzahl von Koloniebildenden Einheiten in der Milz von SCID Mäusen nach Infektion mit viablen *L. monocytogenes*. Zehn Wochen alten, weiblichen Tieren wurde intravenös 1×10^4 vLm/ Tier injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 6 Tiere getötet und Verdünnungen einer in sterilem PBS hergestellten Milzsuspension auf Tryptikase Soja Agar Platten ausgestrichen. Nach 48 h Inkubation bei 37°C wurden die Koloniebildenden Einheiten (CFU) ausgezählt. Aufgetragen sind die Mediane und ihre Standardabweichungen.

Nach sechs Stunden wurde ungefähr ein Zehntel der injizierten CFU in den Milzen beobachtet. Die Zahl der CFU/ Milz nahm nach 24 Stunden um den Faktor 15 zu und stieg nach 48 Stunden auf eine Dichte von $1 - 2,5 \times 10^5$. Zum letzten Meßpunkt, bei 72 Stunden, konnte, verglichen mit den 48 Stunden-Meßwerten, keine Veränderung der CFU beobachtet werden.

Die Stärke der Expression von F4/80 während des Verlaufes der eben beschriebenen Listeriose wurde durchflußzytometrisch bestimmt und ist in **Abb. 4.17** dargestellt. Um nur Leukozyten in die Messung aufzunehmen wurden die Milzzellen zuerst mit Antikörpern gegen CD45 angefärbt. Nur die CD45 positiven Zellen, und damit nur die Leukozytenpopulationen, wurden während der weiteren Messungen einbezogen. Unspezifische Bindungen der zum Färben benutzten Antikörper wurden durch parallele Anfärbung mit Antikörpern des gleichen Subtyps korrigiert. Die gemessenen Werte der Subtyp Kontrollen wurden von den Werten der spezifischen Antikörper abgezogen.

Das F4/80 Antigen wird konstitutiv exprimiert. Zum ersten Meßpunkt waren ungefähr 22% der Milzleukozyten F4/80 positiv. Während des frühen Verlaufes der Infektion nahm die Expressionsstärke bis zur Stunde sechs nach Infektion um ein Drittel zu ($p < 0,05$ gegenüber der Expression zum Zeitpunkt der Injektion). Nach 24 Stunden nahm die Expression wieder ab, um sich bis zum Ende des beobachteten Zeitrahmens wieder auf den Anfangswert einzupendeln.

Die Zunahme der F4/80 Expression in den ersten Stunden nach einer Inokulierung mit Listerien führte zu der Fragestellung, in welcher Stärke andere Oberflächenantigene während einer Listeriose exprimiert werden.

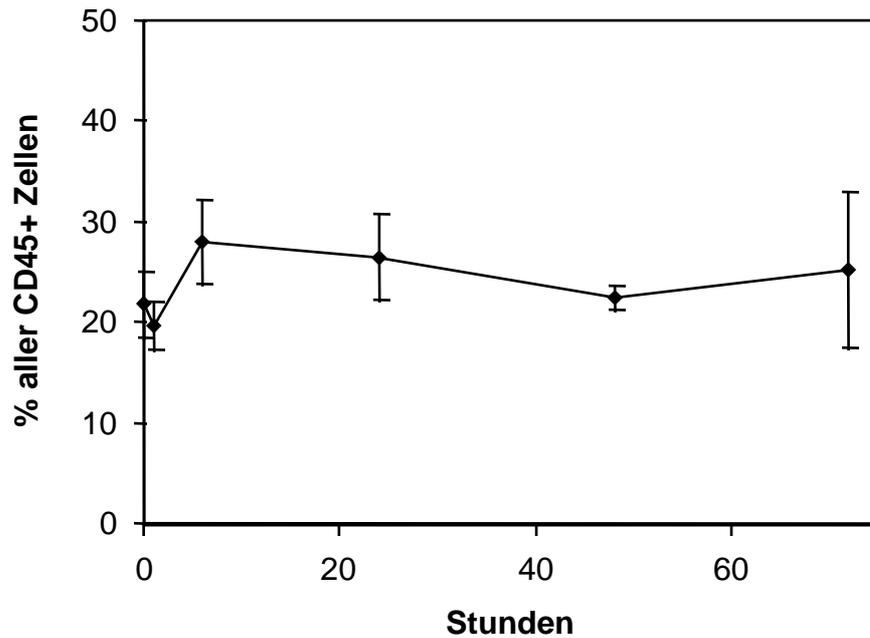


Abb. 4.17: Expression des F4/80 Antigens in der Milz von SCID Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes*. Zehn Wochen alten, weiblichen Tieren wurde intravenös 1×10^4 vLm/ Tier injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden jeweils 6 Tiere getötet und ihre Milzen entnommen. Die Zellen der verschiedenen Milzen wurden nach Lysis der Erythrozyten jeweils mit einem Fluoresceinisothiocyanat-gekoppelten spezifischen mAk gegen F4/80 oder gegen CD45 angefärbt und die Bindung durchflußzytometrisch gemessen. Nur die CD45 positiven Zellpopulationen wurden anschließend auf die Expression von F4/80 hin beurteilt. Unspezifische Bindungen der zum Färben benutzten Antikörper wurden durch parallele Anfärbung mit Antikörpern des gleichen Subtyps korrigiert. Dargestellt sind Mittelwerte und ihre Standardabweichungen.

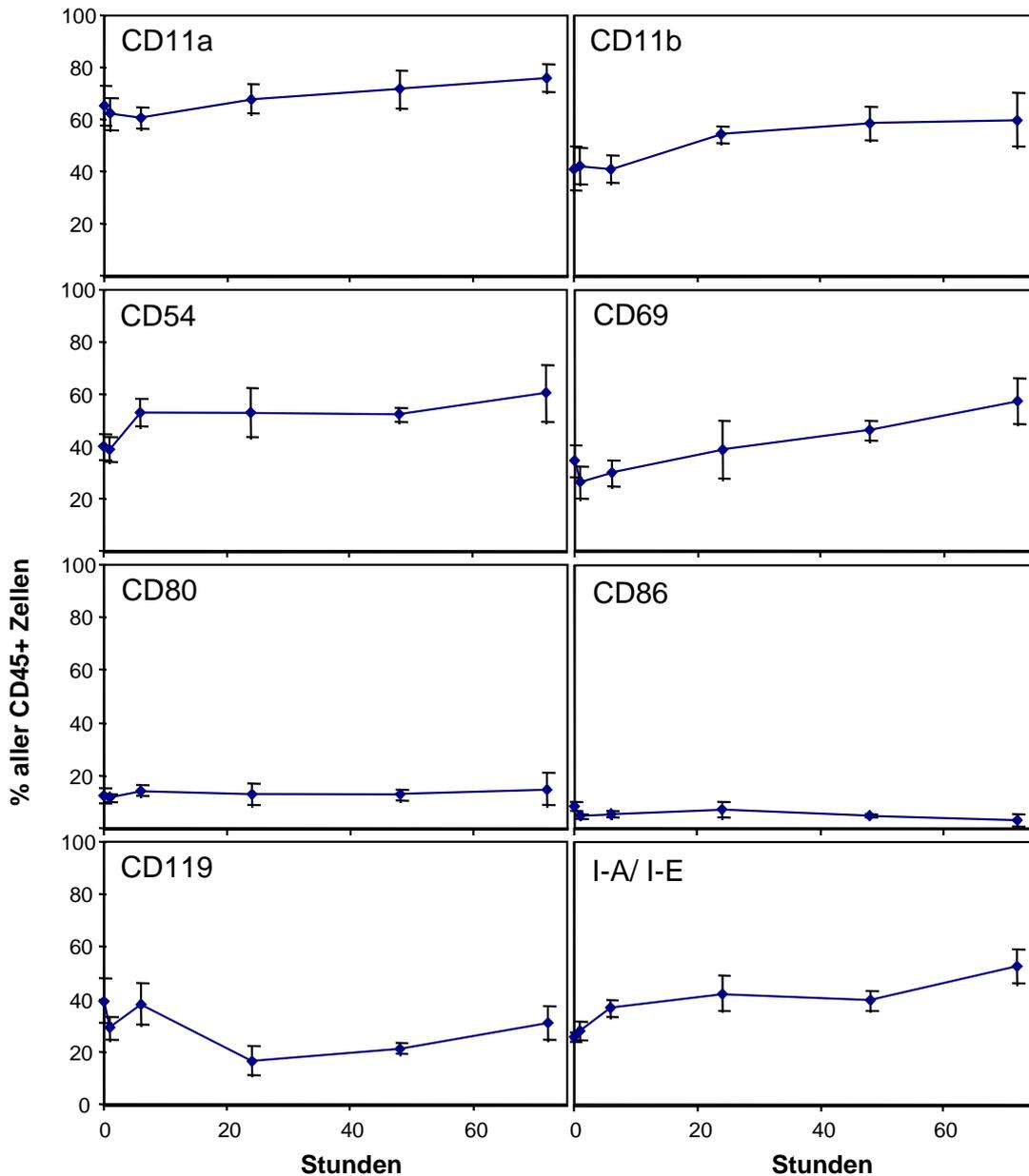


Abb. 4.18: Expression verschiedener Oberflächenantigene in der Milz von SCID Mäusen nach Infektion mit *L. monocytogenes*. Zehn Wochen alten, weiblichen Tieren wurde intravenös 1×10^4 vLm/ Tier injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden jeweils 6 Tiere getötet und ihre Milzen entnommen. Die Zellen der verschiedenen Milzen wurden nach Lysis der Erythrozyten jeweils mit Fluoresceinisothiocyanat gekoppelten spezifischen mAk gegen die dargestellten Antigene oder gegen CD45 angefärbt. Nur die CD45 positiven Zellpopulationen wurden anschließend auf die Expression der Antigene hin beurteilt. Unspezifische Bindungen der zum Färben benutzten Antikörper wurden durch parallele Anfärbung mit Antikörpern des gleichen Subtyps korrigiert. Dargestellt sind Mittelwerte und ihre Standardabweichungen.

Abb. 4.18 zeigt, daß die Expression verschiedener Moleküle während einer Listeriose in der SCID Milz unterschiedlich reguliert wird. Eine hohe konstitutive Expression wurde bei den untersuchten Adhäsionsmolekülen beobachtet: Ungefähr 65% der Milzzellen waren LFA-1 (CD11a) positiv, innerhalb von sechs Stunden nach Injektion wurde die Expression verstärkt und stieg bis auf 80% nach 72 Stunden an. Die Moleküle Mac-1 (CD11b) und ICAM-1 (CD54) wurden nach ebenfalls hohem Ausgangswert von 40% auf 60% der Zellen hochreguliert. Das als sehr frühe Aktivierungsantigen (Very Early Activation Antigen, VEA) bezeichnete CD69 wurde nach 72 Stunden von 50% der Zellen exprimiert, die Expression wurde somit ebenfalls um 20% verstärkt.

Im Gegensatz dazu blieb die Expression der Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) über den gemessenen Zeitraum mit ungefähr 20% (CD80) bzw. 5% (CD86) von der Listerien-Infektion unbeeinflusst. Die als Nachweis einer M Φ Aktivierung dienenden MHC-II Moleküle (I-A/ I-E) wurden nach einem Anfangswert von 20% auf über 40% der Leukozyten hochreguliert. Die Expression des IFN- γ Rezeptors (CD119) wurde während des aufgezeichneten Verlaufs stark verändert: In den naiven Mäusen waren ungefähr 40% der Milzleukozyten positiv für CD119. Innerhalb von einer Stunde wurde die Expression um 10% verringert, um dann innerhalb von sechs Stunden wieder auf den Anfangswert zu steigen. Stark verringert war die Expression des IFN- γ -Rezeptors während des weiteren Verlaufs der Infektion. Zu den Meßpunkten nach 24 und 48 Stunden waren nur ungefähr 20% der Leukozyten CD119 positiv. Danach stieg die Expressionsstärke wiederum auf 30% an.

Die Gesamtzellzahlen der Milzen änderten sich während der Listerien-Infektion nur unwesentlich: Zum Zeitpunkt der Injektion betrug die Zahl der GMZ $6,9 \pm 1,1 \times 10^6$, nach einer Stunde wurden $6,7 \pm 1,2 \times 10^6$, nach sechs Stunden $7,0 \pm 0,9 \times 10^6$, nach 24 Stunden $6,9 \pm 1,3 \times 10^6$ und nach 48 Stunden $6,8 \pm 1,3 \times 10^6$ GMZ gezählt. Zum Zeitpunkt der Messung nach 72 Stunden wurden $7,1 \pm 0,8 \times 10^6$ Zellen/ Milz gezählt.

4. Produktion weiterer Antikörper mit inhibierender Wirkung auf die Induktion der IFN- γ -Bildung

In den vorangegangenen Abschnitten wurde beschrieben, daß ein membranständiges Antigen eine Rolle während der Aktivierungsvorgänge von M Φ und NK Zellen innerhalb der natürlichen zellulären Infektabwehr spielen könnte. Diese Beobachtung stellt den ersten Hinweis einer Involvierung von zellständigen Molekülen in diesem Themenkreis dar. Es wurde daher die Frage gestellt, ob andere Zelloberflächenantigene ebenfalls an diesen Mechanismen beteiligt sein könnten. Dabei wurde besonderer Wert auf Moleküle gelegt, die nicht wie F4/80 auf M Φ , sondern auf der zweiten in diesem System wichtigen Zellpopulation, den NK Zellen, exprimiert werden. Hierfür wurden Antikörper hergestellt, die folgende Auswahlkriterien erfüllten:

- 1) Die Antikörper mußten gegen naive murine NK Zellen gerichtet sein
- 2) Antikörper-haltige Überstände mußten in einem funktionellen Testsystem mit GMZ und *hkLm* eine mindestens gleichstarke IFN- γ Inhibition verursachen wie der mAk gegen F4/80.
- 3) Die Antikörper-haltigen Überstände mußten gut für die Durchflußzytometrie geeignet sein
- 4) Die hergestellten Antikörper-haltigen Überstände mußten gut für die Immunhistochemie geeignet sein, um das Organexpressionsmuster untersuchen zu können.
- 5) Die Antikörper mußten nach ihrer Aufreinigung aus den Überständen noch in der Lage sein, ihr inhibitorisches Potential in *hkLm*-stimulierten GMZ zu entfalten.
- 6) Um sichergehen zu können, daß die Antikörper eine Rezeptor-Ligand-Interaktion blockieren, durften die Antikörper nur im Beisein von sowohl M Φ als auch von NK Zellen inhibitorisch wirksam sein und die Zytokinproduktion der jeweiligen Zellpopulation alleine nicht beeinflussen.

Ratten (Stamm Wistar) wurden zu definierten Zeitpunkten (s. Kap. III, 14) mit naiven SCID NK Zellen immunisiert. Drei Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Milzzellen der Ratten mit der Antikörper-produzierenden B Zelllinie P3X63Ag8.653 fusioniert und die Überstände dieser Zellkulturen zum ersten Nachweis ("Screening") ihrer Verwendbarkeit eingesetzt. Dazu wurden GMZ aus SCID Mäusen mit *hkLm in vitro* in einem Gesamtvolumen

von 200 μ l stimuliert und zusammen mit 20 μ l der jeweiligen Überstände für 24 Stunden bei 37°C, 6% CO₂ inkubiert. Die Menge des in den Kulturüberstand abgegebenen IFN- γ wurde mit einem spezifischen ELISA gemessen und sowohl mit der Freisetzung von *hkLm*-stimulierten GMZ ohne zusätzlichen Antikörper als Negativkontrolle als auch mit *hkLm*-stimulierten GMZ und koinkubierten anti-F4/80-haltigen Überständen als Positivkontrolle verglichen. Während des ersten Screenings wurden 1.800 Überstände auf ihr IFN- γ inhibierendes Potential getestet. Von diesen waren ca. 8% in der Lage, die Produktion von IFN- γ einzuschränken, jedoch nur 2% (ca 40 Klone) mit einer der dem anti-F4/80 Überstand vergleichbaren Stärke. Die positiven Klone wurden zweimal rekloniert, vermehrt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Waren die Klone nach dem Auftauen immer noch positiv, so wurden genauer auf ihr Bindungsverhalten und das Expressionsmuster hin untersucht.

Abb.4.19 zeigt das Ergebnis eines funktionellen Tests von Überständen reklonierter Hybridome auf ihr Vermögen, die IFN- γ Freisetzung von *hkLm*-stimulierten SCID GMZ einzuschränken. Während Überstände der Klone 6E1, 8F11 und 15E12 eine der anti-F4/80 vergleichbare Inhibition der IFN- γ Freisetzung von ca. 75% zeigten, entsprach die Inhibition von Überständen des Klones 5D7 nur etwa 40%. Dieser Klon wurde daraufhin verworfen.

Nach der Bestimmung des Immunglobulin-Subtyps (s. Kap. III, 15.5) wurde durchflußzytometrisch untersucht, an welche Zellpopulationen die Klone 6E1, 8F11 und 15E12 binden. Dazu wurden zuerst ganze Milzzellen aus immunkompetenten BALB/c Mäusen mit Hilfe von Doppelmarkierungen untersucht. Die erste Anfärbung diente der Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen, da dort mAk zum Einsatz kamen, die selektiv an für jede untersuchte Zellpopulation charakteristische Differenzierungsantigene banden. Gleichzeitig wurden die Zellen mit den jeweiligen zu untersuchenden mAk Klonen gefärbt. Weiterhin wurden durch Nylonwolle aufgereinigte SCID NK Zellen untersucht und die Bindung der Überstände mit dem Bindungsverhalten des spezifisch NK Zellen anfärbenden Antikörper Klones DX5 verglichen. Die Ergebnisse dieser Versuche faßt **Tab. 4.2** zusammen.

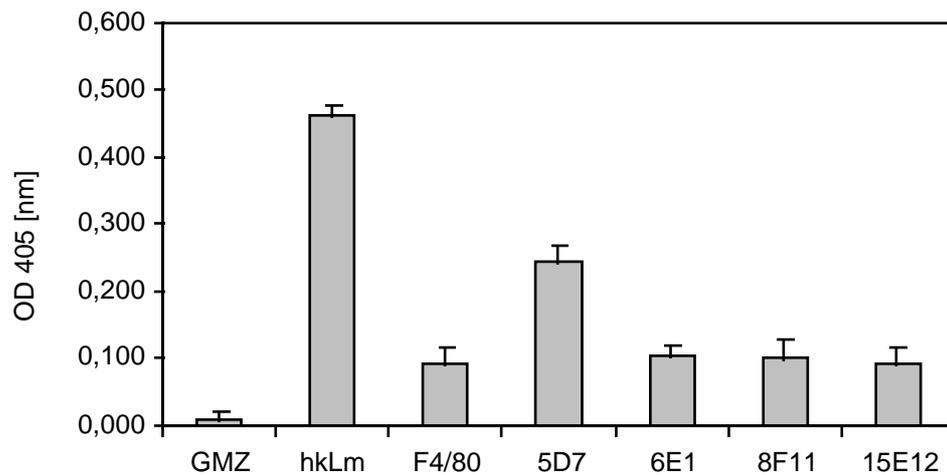


Abb. 4.19: Inhibition der *hkLm*-induzierten IFN- γ -Sekretion durch neu generierte Antikörper gegen murine NK Zellen. Zur Herstellung von Antikörpern wurden Ratten (Stamm Wistar) mit über Nylonwolle aufgereinigten SCID Milz-NK Zellen immunisiert, die Milzzellen anschließend mit einer Plasmazytom-Zelllinie fusioniert. 20 μ l der gewonnenen Antikörper-haltigen Überstände wurden mit *hkLm*-stimulierten GMZ aus SCID Mäusen in einem Gesamtvolumen von 200 μ l für 24 Stunden bei 37°C, 6% CO₂ inkubiert. Die Freisetzung von IFN- γ (gemessen im ELISA) wurde verglichen mit der IFN- γ Produktion von *hkLm*-stimulierten GMZ, die mit 20 μ l anti-F4/80-haltigen Überständen koinkubiert wurden. Dargestellt sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen und ihre Standardabweichung.

Tab. 4.2: Bindungsverhalten der neu generierten Antikörper mit IFN- γ inhibitorischer Wirkung

Klon ^a	6E1	8F11	15E12
Ig Subtyp	IgG _{2b}	IgG _{2b}	IgM
<u>Gesamtmilzzellen</u> ^{b, c}			
NK Zellen	+	+	+
Granulozyten	+	+	+
T-Lymphozyten	-	+	-
B-Lymphozyten	+	+	-
Makrophagen	+/-	+	+

^a Hybridomüberstände

^b aus immunkompetenten BALB/c Mäusen

^c nach Doppelfärbung mit mAk Klonen DX5 (NK Zellen), RB6-8C5 (Granulozyten), 17A2 (T-Lymphozyten), 1D3 (B-Lymphozyten), F4/80 (Makrophagen) und den jeweiligen Klon-Überständen

Der Klon 6E1 wurde für eine weitere Charakterisierung ausgesucht. Dazu wurde er mittels Affinitätschromatographie (Protein G, s. Kap. III, 15.1) aufgereinigt. Auch nach der Aufreinigung war der Antikörper in der Lage, die Freisetzung von *hkLm*-stimulierten GMZ in gleicher Stärke wie der aufgereinigte anti-F4/80 mAk zu inhibieren.

Das wichtigste Kriterium für die neu produzierten mAk war, daß sie die NK Zell-Produktion von IFN- γ durch eine Zellkontakt-Blockierung zwischen M Φ und NK Zellen inhibieren sollten. Daher mußte geprüft werden, ob der mAk 6E1 eine IFN- γ -inhibitorische Wirkung auch dann zeigt, wenn nur diese beiden Zellpopulationen vorhanden waren. Für diese Untersuchung wurden M Φ aus Knochenmarkkultur und über Nylonwolle aufgereinigte SCID NK Zellen aus der Milz mit *hkLm* oder mit *hkLm* und mAk 6E1 inkubiert und die Konzentrationen des von NK Zellen gebildeten IFN- γ gemessen (**Abb. 4.20**).

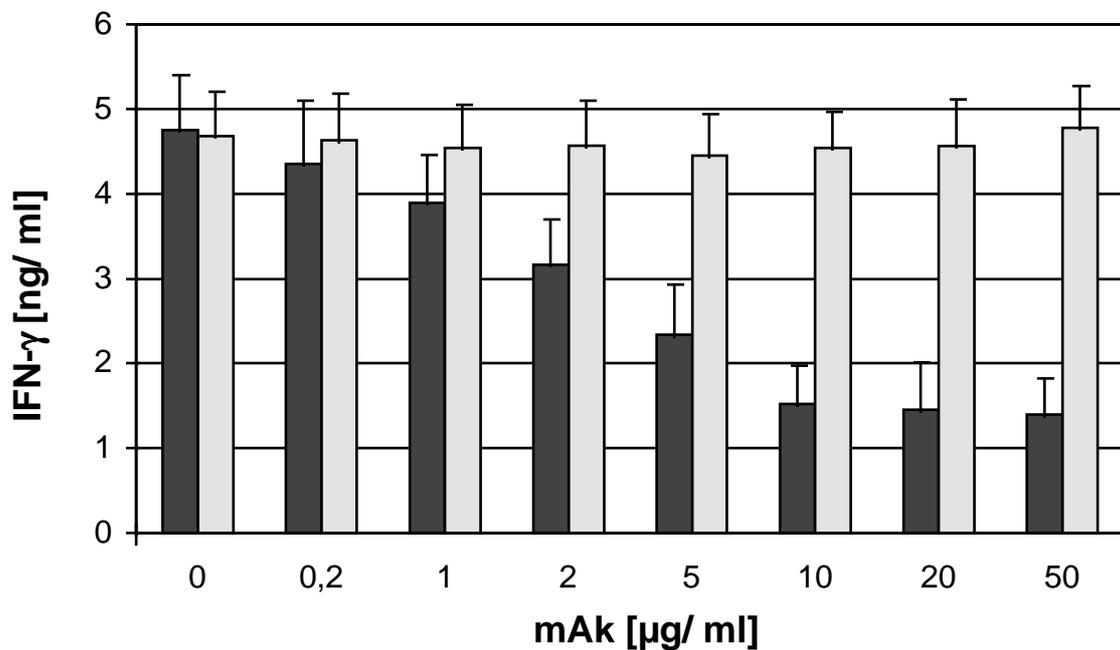


Abb. 4.20: In Kokulturen von M Φ und NK Zellen inhibiert mAk 6E1 die IFN- γ Produktion durch NK Zellen. Makrophagen aus Knochenmarkkultur und Nylonwolle-aufgereinigte NK Zellen aus der SCID Milz (jeweils $5 \times 10^5/\text{ml}$) wurden zusammen mit *hkLm* ($1 \times 10^7/\text{ml}$) und verschiedenen Konzentrationen des Ratte-anti-Maus NK Zell-mAk 6E1 (■) oder einem Kontrollantikörper des gleichen Subtyps (□) für 48 h inkubiert. IFN- γ wurde mit einem Sandwich ELISA bestimmt. Aufgetragen sind Mittelwerte aus drei Bestimmungen und ihre Standardabweichungen.

Die Ergebnisse zeigen, daß der mAk 6E1 die IFN- γ Produktion durch NK Zellen in Kokulturen von M Φ und NK Zellen dosisabhängig vermindert. Andere Zellpopulationen sind für diesen Effekt demnach nicht notwendig.

Nicht nur eine mAk-vermittelte Rezeptor-Ligand-Blockierung zwischen M Φ und NK Zellen könnte eine verminderte IFN- γ Produktion zur Folge haben. Ebenso gut könnte der mAk eine

Herabsetzung der Reaktionsfähigkeit von NK Zellen auf IFN- γ -stimulierende M Φ -Zytokine bewirken. Dementsprechend durfte der hergestellte mAk 6E1 keine inhibierenden Effekte auf isolierte, Zytokin-aktivierte NK-Zellpopulationen allein ausüben. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden NK Zellen mit rekombinantem TNF- α und IL-12 in Ab- oder Anwesenheit des mAk 6E1 inkubiert. Wie in **Tab. 4.3** dargestellt ist, war die Freisetzung von IFN- γ in An- oder Abwesenheit des mAk gleich hoch.

Tabelle 4.3: Effekt von mAk 6E1 auf die IFN- γ Produktion aufgereinigter NK Zellen^a

NK Zellen inkubiert mit		
TNF- α / IL-12 ^b (rekombinant)	mAk 6E1 ^c	IFN- γ ng/ ml (\pm SD) ^d
-	-	0,04
-	+	0,04
+	-	1,32 (0,41)
+	+	1,28 (0,33)

^a über Nylon Wolle aufgereinigte NK Zellen (5×10^5 / ml) wurden wie angegeben für 48 h inkubiert, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei

^b jeweils 70 E/ ml

^c 20 μ g/ ml

^d gemessen im ELISA, angegeben sind Mittel aus Dreifachwerten

Diese Ergebnisse zeigten, daß die Bindung des mAk 6E1 an Zytokin-stimulierte NK Zellen keine direkten Effekte auf diese Zellen ausübte, die zu einer verminderten IFN- γ Produktion führten.

Ebensowenig durften die mAk direkte regulatorische Effekte auf eine Erreger-stimulierte, isolierte M Φ -Population ausüben, die eine verminderte TNF- α und IL-12 und damit auch eine verminderte IFN- γ Produktion zur Folge hätten. Daher wurden M Φ aus Knochenmarkkultur,

alleine mit *hkLm* oder *hkLm* und mAk 6E1 inkubiert. Die Konzentrationen der von den MΦ gebildeten Zytokine TNF-α und IL-12 wurden mit Hilfe von spezifischen ELISA gemessen (Tab. 4.4).

Tab.4.4: Wirkung von mAk 6E1 auf die Produktion von TNF-α und IL-12 von *hkLm*-stimulierten Knochenmarkkultur-MΦ^a

MΦ inkubiert mit:		TNF-α ^d ng/ ml (± SD)	IL-12 ^d ng/ ml (± SD)
<i>hkLm</i> ^b	mAk 6E1 ^c		
-	-	0,08	0,28 (0,09)
-	+	0,08	0,26 (0,11)
+	-	0,52 (0,15)	0,56 (0,20)
+	+	0,49 (0,22)	0,56 (0,16)

^a MΦ aus Knochenmarkkultur (5×10^5 / ml) wurden wie angegeben für 24 h (TNF-α) oder 48 h (IL-12) inkubiert, dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei

^b 5×10^6 / ml

^c 20 µg/ ml

^d gemessen im ELISA, angegeben sind Mittel aus Dreifachwerten

Die Ergebnisse zeigen, daß der mAk 6E1 keinen Einfluß auf die *hkLm*-induzierte Produktion von TNF-α oder IL-12 ausübte.