

1 Einleitung

1.1 Die Abwehr von Infektionserregern durch den infizierten Wirt

Infektionserreger lassen sich in extrazellulär und intrazellulär vitale Erreger einteilen. Extrazellulär vitale Erreger sind in ihrem Zellstoffwechsel unabhängig von Wirtszellen. Intrazellulär vitale Erreger besitzen die Fähigkeit, in die Wirtszelle einzudringen und deren Metabolismus für das eigene Wachstum und ihre Vermehrung zu nutzen. Sie kommen als Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten vor. Innerhalb der Wirtszelle können sie sich sowohl frei im Zytoplasma als auch in speziellen membranumhüllten Vesikeln, den Phagosomen, aufhalten (Geoffroy, Gaillard et al. 1987; Kaufmann and Hess 1999; Goebel and Kuhn 2000).

Als Wirtszellen für intrazellulär vitale Bakterien kommen entweder Parenchymzellen oder Zellen der Immunabwehr wie Makrophagen in Betracht.

Intrazellulär vitale Bakterien sind vor protektiven, extrazellulär aktiven humoralen Abwehrmechanismen geschützt. Im Inneren der Zelle können sie sich der Abtötung entziehen, indem sie aus der Phagozytosevakuole in das Zytoplasma entkommen, oder in Makrophagen die Verschmelzung von Phagosom und Lysosom blockieren (De Heer, Kersten et al. 1980; de Chastellier and Berche 1994; Fratti, Vergne et al. 2000). In diesen Fällen kann die Abtötung der permissiven Wirtszellen, z. B. durch Zytolyse oder Apoptose, zur Überwindung der Infektion beitragen. Hierzu sind eine Reihe von spezialisierten Zellen des Immunsystems in der Lage. Die effektivsten zytotoxischen Mechanismen sind bei $CD8^+$ T-Lymphozyten bekannt (Kagi, Ledermann et al. 1996).

Die Ausbildung einer spezifischen Immunabwehr durch Aktivierung und klonale Expansion der zytotoxischen T-Lymphozyten benötigt in der Regel mehrere, mindestens jedoch drei, Tage (Goossens, Jouin et al. 1991; Mielke, Ehlers et al. 1993; Pamer 1994; Seaman, Wang et al. 2000).

Bei sich schnell vermehrenden Erregern stehen diese Zellen daher nicht rechtzeitig zur Verfügung, und es besteht die Notwendigkeit für den Wirtsorganismus, ihre Vermehrung bereits in der präimmunen Phase der Infektion zu limitieren.

Von besonderer Bedeutung sind hier Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen (Bancroft and Kelly 1994; Ladel, Blum et al. 1996).

Für die Analyse dieser frühen Phase der unspezifischen Abwehr eines intrazellulär vitalen Erregers hat sich das Mausmodell der Listeriose bewährt (Portnoy 1992; Czuprynski and Haak-Frendscho 1997; Cousens and Wing 2000).

1.2 Das Modell der murinen Listeriose

Die Infektion mit dem fakultativ pathogenen, Gram-positiven, stäbchenförmigen Bakterium *Listeria monocytogenes*, dem Erreger der Listeriose, ist eine Anthroozoonose, die histologisch durch granulomatöse Entzündungen verschiedener Organe gekennzeichnet ist. Disponiert sind vor allem immunsupprimierte Personen. Die Infektion erfolgt meist oral über kontaminierte Lebensmittel oder transplazentar als materno-fetale Infektion mit dem Krankheitsbild der Granulomatosis infantiseptica. Daneben kommen Sepsis, Meningoenzephalitiden sowie benigne Gastroenteritiden bei Erwachsenen vor (Larsson and Linell 1979; Albritton, Cochi et al. 1984; Schmidt-Wolf, Seeliger et al. 1987; Seeliger 1988; Mielke, Ehlers et al. 1993; Silver 1998; Schluter, Buck et al. 1999; Temple and Nahata 2000; Wing and Gregory 2000).

Das Modell der murinen Listeriose geht auf G. B. Mackaness aus dem Jahre 1962 zurück, der in seinen grundlegenden Arbeiten die Bedeutung der zellulären Immunität für die Abwehr von Infektionen mit intrazellulären Erregern etablierte (Mackaness 1962). Hierbei unterstrich er die herausragende Rolle von aktivierten Makrophagen, die in der Lage sind, Listerien intrazellulär abzutöten. Die Bedeutung von Lymphozyten für die erworbene Immunität wurde durch Transfer von lymphatischen Zellen immuner auf nicht-immune Mäuse gezeigt (Mackaness 1969; Mackaness and Hill 1969).

In den letzten 30 Jahren haben sich die Kenntnisse über die protektiven Mechanismen weiter komplettiert und die Funktion, Bedeutung und Interaktion der verschiedenen beteiligten Leukozyten bei der Abwehr der Primär- und Sekundärinfektion wurden intensiv untersucht (Bouwer, Barry et al. 1997; North, Dunn et al. 1997; Unanue 1997; North and Conlan 1998; Cousens and Wing 2000; Edelson and Unanue 2000; Wing and Gregory 2000).

Die Überwindung einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* ist in erster Linie von spezifischen, zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten abhängig. Die Bildung dieser zytotoxischen T-Zellen ist sowohl bei der Primär- als auch der Sekundärinfektion der entscheidende Schritt für die vollständige Eradikation des Erregers (Brunt, Portnoy et al. 1990; Pamer, Wang et al. 1992; Kagi, Ledermann et al. 1994; Kagi, Ledermann et al. 1996; Bouwer,

Barry et al. 1997; Jiang, Gregory et al. 1997; North, Dunn et al. 1997; Bouwer, Bai et al. 1998; Jensen, Glass et al. 1998; Gregory and Liu 2000; Wing and Gregory 2000).

In der Frühphase der Listeriose hingegen, die von Effektormechanismen der angeborenen Immunabwehr getragen wird, sind Makrophagen / Monozyten, Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) an der Limitierung der Erregervermehrung in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt (Bancroft and Kelly 1994; Bancroft, Kelly et al. 1994; Dai, Bartens et al. 1997; Ebe, Hasegawa et al. 1999) (Conlan and North 1991; Rogers and Unanue 1993; Conlan and North 1994; Sjostedt, Conlan et al. 1994; Boury and Czuprynski 1995; Rakhmievich 1995; Unanue 1997; Ebe, Hasegawa et al. 1999) (Wherry, Schreiber et al. 1991; Beckerman, Rogers et al. 1993; Bancroft and Kelly 1994; Tripp, Gately et al. 1994; Dauge-lat, Ladel et al. 1996; Gregory, Jiang et al. 1996; Ladel, Blum et al. 1996; Unanue 1997; Warschkau and Kiderlen 1999; Lertmemongkolchai, Cai et al. 2001).

1.2.1 Zytotoxische Wirtsreaktionen im Verlauf der Listeriose

Residente Makrophagen und in das Gewebe einwandernde Monozyten besitzen die Fähigkeit, Listerien zu phagozytieren und nach Aktivierung abzutöten (Hahn 1983; Drevets, Leenen et al. 1993; Campbell 1994; de Chastellier and Berche 1994; Drevets, Leenen et al. 1996; Dai, Bartens et al. 1997; Alvarez-Dominguez, Carrasco-Marin et al. 2000).

Versuche, die die Immigration von Blutmonozyten mittels anti-CD18/11b-spezifischer (Komplementrezeptor 3, CR3, Mac-1, β_2 -Integrin) monoklonaler Antikörper (mAk) in das Entzündungsgebiet hemmen, sollten Auskunft über die Bedeutung dieser Zellart für die Begrenzung des Bakterienwachstums und die Überwindung der Infektion geben. Untersuchungen von Rosen et al. demonstrierten eine Exazerbation der Listerieninfektion nach einer Applikation CR3-spezifischer Antikörper. In diesem Zusammenhang betonten sie die Unfähigkeit der Tiere, Makrophagen am Infektionsort zu akkumulieren (Rosen, Gordon et al. 1989).

Die Aussagekraft dieser Experimente ist aber in der Weise eingeschränkt, dass bei Anwendung dieses Antikörpers neben Monozyten auch auf die Einwanderung von Neutrophilen

Granulozyten Einfluss genommen wird (Mielke, Rosen et al. 1992; Langermans, Mayanski et al. 1994; Macey, McCarthy et al. 1995).

J. N. Samsom et al. untersuchten die Bedeutung von residenten Makrophagen für die Erregerabwehr im Rahmen einer Sekundärinfektion mit *Listeria monocytogenes*. Liposomales Dichlormethylen-Diphosphonat (L-Cl₂MDP) depletiert selektiv residente Makrophagen in Leber und Milz, ohne Einfluss auf die Einwanderung und Funktion von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten zu haben. Werden immune, L-Cl₂MDP-behandelte Mäuse mit Listerien infiziert, so ist die Erregerlast in Leber und Milz 3 d p.i. um das Zehntausendfache höher als bei den Kontrolltieren (Samsom, Annema et al. 1997), was auf die Bedeutung residenter Makrophagen in der Frühphase der Infektabwehr hindeutet.

Es ist bekannt, dass Interferon Gamma (IFN- γ) für das Überleben listerieninfizierter Tiere in den ersten Wochen der Infektion erforderlich ist (Buchmeier and Schreiber 1985; Harty and Bevan 1995; Dai, Bartens et al. 1997).

Der Zusammenhang von IFN- γ und Makrophagen konnte in Versuchen mit IFN- γ -Rezeptor-knock-out-Mäusen (IFN γ R^{-/-}) demonstriert werden. Die Untersucher konnten zeigen, dass die Aktivierung der Makrophagen durch IFN- γ entscheidend ist, um phagozytierte Listerien intrazellulär abzutöten und ihr Übertreten vom Phagosom in das Zytosol zu unterbinden (Huang, Hendriks et al. 1993; Dai, Bartens et al. 1997).

Mäuse mit einem schweren kombinierten Immundefekt (SCID) sind aufgrund einer Mutation auf Chromosom 16 nicht in der Lage, funktionelle B- und T-Lymphozyten zu bilden. Diese Tiere verfügen jedoch über alle Elemente des unspezifischen Immunsystems einschließlich NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und Komplementproteine (Bosma, Custer et al. 1983; Czitrom, Edwards et al. 1985). Das SCID-Modell liefert daher wichtige Informationen über die präimmunen, T-Zell-unabhängigen Abwehrmechanismen.

SCID-Mäuse sind zwar zur initialen Begrenzung der Erregervermehrung befähigt, entwickeln jedoch eine chronische Listerieninfektion, sind also nicht in der Lage, den Erreger zu eliminieren (Rogers and Unanue 1993; Bhardwaj, Kanagawa et al. 1998).

Insbesondere durch Versuche an diesen Tieren wurde der Stellenwert der NK-Zellen in der frühen Listeriose deutlich. Es zeigte sich, dass die Ausschüttung der Zytokine Interleukin

(IL)-1, IL-12 und TNF- α durch Makrophagen für die frühe Produktion von IFN- γ durch NK-Zellen notwendig ist (Ladel, Blum et al. 1996). Dies wiederum ist der entscheidende Schritt für die frühe Aktivierung von Makrophagen (Bancroft, Schreiber et al. 1987; Wherry, Schreiber et al. 1991; Tripp, Wolf et al. 1993; Tripp, Gately et al. 1994; Tripp and Unanue 1995).

In Ergänzung zur IFN- γ -Produktion wurde auch eine direkte zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber listerieninfizierten Parenchymzellen gezeigt (Daugelat, Ladel et al. 1996; Gregory, Jiang et al. 1996).

Bei experimenteller Depletion von Granulozyten im SCID-Modell exazerbiert die Infektion (Bhardwaj, Kanagawa et al. 1998).

Diese Untersuchungen demonstrieren den Stellenwert von Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen in der Abwehr der Listerien in der präimmunen Phase, ohne dass die relevanten Effektormechanismen bekannt wären.

Unbestritten ist, dass die Leber kurz nach der Infektion befallen wird und eine Vermehrung innerhalb von Hepatozyten stattfindet (Conlan and North 1992; Langermans, Mayanski et al. 1994; Gaillard, Jaubert et al. 1996; Barsig, Flesch et al. 1998; Ebe, Hasegawa et al. 1999; Gregory and Liu 2000).

Die Funktion der Neutrophilen Granulozyten in der Frühphase der Listeriose wurde hauptsächlich mittels des Granulozyten-depletierenden monoklonalen Antikörpers RB6-8C5 oder mit dem β_2 -Integrin-spezifischen Antikörper (anti-CD18/11b) 5C6 untersucht (Conlan and North 1991; Conlan and North 1994; Conlan and North 1994; Rakhmilevich 1995; Czuprynski, Theisen et al. 1996; Gregory, Sagnimeni et al. 1996; Lopez, Marco et al. 2000).

Neutrophile Granulozyten immigrieren in der präimmunen Phase in listerieninfizierte Organe (Rogers and Unanue 1993; Conlan and North 1994; Czuprynski, Brown et al. 1994; Gregory, Sagnimeni et al. 1996; Krull, Nost et al. 1997; Sibelius, Schulz et al. 1999; Lopez, Marco et al. 2000).

J. Conlan und R. North führten histologische Beobachtungen an listerieninfizierten Organen durch und zeigten Neutrophile Granulozyten in unmittelbarer Nachbarschaft zu infi-

zierten Hepatozyten. Nach anti- CD18/11b mAk Behandlung (5C6) blieb der Einstrom von Neutrophilen Granulozyten aus und es kam 48 h p.i. zu einer Zunahme der Erregerlast auf das Tausendfache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Daraus schlossen sie, dass Granulozyten zur Lyse infizierter Hepatozyten in der Lage und entscheidend an der Begrenzung des Bakterienwachstums in der präimmunen Abwehrphase beteiligt seien. Es darf jedoch nicht übersehen werden, dass sowohl residente Makrophagen (Kupffer-Zellen), immigrierte Monozyten und NK-Zellen in der infizierten Leber akkumulierten und eine Beteiligung an der Erregerbekämpfung nicht ausgeschlossen werden konnte (Conlan and North 1991; Conlan and North 1992).

Die Behandlung der Tiere mit dem oben genannten Antikörper verhindert neben dem Einstrom von myelomononukleären Zellen in das Entzündungsgebiet auch die komplementvermittelte Phagozytose und die intrazelluläre Abtötung von Listerien innerhalb der Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten (Altieri, Agbanyo et al. 1990; Rosen 1990; Drevets and Campbell 1991; Drevets, Canono et al. 1992; Ehlers, Mielke et al. 1992; Mielke, Rosen et al. 1992; Drevets, Leenen et al. 1993; Drevets, Leenen et al. 1996; Drevets 1997; Mielke, Peters et al. 1997).

Es ist verständlich, dass die simultane Einflussnahme auf mehrere Zellarten und ihre Effektormechanismen eindeutige Interpretationen dieser Untersuchungsbefunde stark einschränken.

Unter diesem Aspekt ist die Behandlung der Tiere mit dem anti-Granulozyten mAk RB6-8C5, der gegen den Ly-6G (Gr-1 Ag) gerichtet ist und zur selektiven Depletion von Neutrophilen Granulozyten führt, eindeutiger (Lai, Alaverdi et al. 1998; Seiler, Aichele et al. 2000).

Die Applikation dieses Antikörpers hat eine erhebliche Einschränkung der präimmunen Erregerabwehr mit erhöhter Erregerlast und letalem Ausgang zur Folge (Conlan and North 1994; Czuprynski, Brown et al. 1994; Czuprynski, Theisen et al. 1996; Gregory, Sagnimeni et al. 1996; Appelberg and Leal 2000; Lopez, Marco et al. 2000; Seiler, Aichele et al. 2000). Selbst immune Tiere sterben im Rahmen einer Sekundärinfektion wenn die Granulozyten mit RB6-8C5 depletiert werden (Czuprynski, Brown et al. 1994; Rakhmilevich 1995).

Die Autoren dieser Arbeiten schlossen aus den Ergebnissen ihrer Untersuchungen, dass den Neutrophilen Granulozyten eine *unmittelbare* Rolle bei der Abwehr der intra- und extrazellulär vorliegenden Bakterien zukommt. Die Annahme, dass Neutrophile Granulozyten zur selektiven Lyse von listerieninfizierten Parenchymzellen in der Lage sind, ist allerdings nicht bewiesen und stützt sich lediglich auf die Interpretation histologischer Schnitte.

1.3 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Aus den dargestellten Untersuchungen geht hervor, dass Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und NK-Zellen entscheidend an der präimmunen Infektabwehr beteiligt sind. Unklar bleibt auf welche Weise diese Zellen protektiv wirken.

Frühere Untersuchungen unter Verwendung von infizierten Hepatozyten als Zielzellen konnten zeigen, dass Peritonealexsudatzellen die Fähigkeit der selektiven Zytotoxizität besitzen. Die Fraktionierung der durch unspezifischen Entzündungsreiz (i.p. Proteoseinjektion) gewonnenen Peritonealleukozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation zeigte aber, dass Granulozyten nicht, wie bisher vermutet, die zytotoxisch aktive Population darstellen (Gerber 1999).

Andere *in-vitro*-Experimente demonstrierten, dass auch Milzzellen immuner Tiere zur selektiven Lyse listerieninfizierter Parenchymzellen in der Lage sind (Peters 1997).

Die Identität der zytotoxisch aktiven Zellpopulation konnte bisher aber nicht befriedigend geklärt werden.

Ziel dieser Arbeit war es,

- durch Weiterentwicklung eines *ex-vivo-in-vitro*-Experimentalsystems die Grundlage für eine detailliertere Analyse der Zell-Zell-Interaktion in der präimmunen Phase der Listeriose zu schaffen und
- die Effektormechanismen näher zu untersuchen.

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Untersuchungen legen nahe, dass Makrophagen zur Lyse listerieninfizierter Hepatozyten in der Lage sind. Ihre zytotoxische Aktivität war durch IFN- γ zu steigern, aber von TNF- α und Stickstoffmonoxid (NO) unabhängig.