

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden 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, um anschließend die zytotoxisch aktive Zellpopulation zu identifizieren und die Effekte von Immunmodulatoren zu untersuchen.

Hierzu wurde der Versuchsansatz auf der Basis früherer Arbeiten zu diesem Thema miniaturisiert und hinsichtlich der Quantifizierung der Effekte wesentlich verbessert. Anstelle von Exsudat- oder Milzzellen wurden naive residente Peritonealzellen verwendet.

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Untersuchungen legen nahe, dass Makrophagen mittels eines bisher nicht bekannten Mechanismus zum Untergang listerieninfizierter Hepatozyten führen. Die zytotoxische Aktivität war mit IFN- $\gamma$  stimulierbar und von TNF- $\alpha$  sowie der Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) unabhängig.

### 4.1 Plaueindex als Maß für die zytotoxische Aktivität von Peritonealzellen

Das hier etablierte und im folgenden verwendete *ex-vivo-in-vitro*-Experimentalsystem ist ein Modell für die Interaktion von Effektorleukozyten mit listerieninfizierten Parenchymzellen.

Die Grundlage bildet ein einfacher, sensitiver, nicht-radioaktiver Mikrozytotoxizitätsassay, der von M. Takasugi und E. Klein etabliert und hier für unsere Fragestellung modifiziert wurde (Takasugi and Klein 1970).

Der Assay nutzt die Eigenschaft der Oberflächenadhärenz von lebenden Zellen. Das Herauslösen von Zellen aus einem Monolayer stellt ein Maß für Zytotoxizität dar und ist eines der direktesten Verfahren zum Nachweis einer Zellschädigung (Takasugi and Klein 1970; Andjargholi and Dale 1977).

B. J. Wahlberg et al. verglichen den ebenfalls gut etablierten Chromfreisetzungssassay ( $^{51}\text{CrFA}$ ) mit dem Mikrozytotoxizitätsassay (MZA) bei NK-Zell-induziertem, nekrotischen und apoptotischen Zelltod verschiedener Zielzellen. Sie hoben hervor, dass der  $^{51}\text{CrFA}$  eher den nekrotischen Zelltod (induziert durch zytoplasmatische Granula wie Perforin / Granzyme) nachweist, während der MZA vor allem auch den apoptotischen Zelltod, induziert durch zytotoxische Liganden der TNF-Familie, erfasst und von größerer biologischer Relevanz im Rahmen zytotoxischer Abwehrprozesse zu sein scheint (Wahlberg, Burholt et al. 2001).

Um die in Frage kommenden zytotoxisch aktiven Zellpopulationen von vornherein einzuschränken, wurden residente Peritonealleukozyten naiver Mäuse eingesetzt.

Durch die Verwendung naiver Peritonealzellen ist die Zusammensetzung der Effektorzellpopulation definiert. Granulozyten sowie die unspezifische Aktivierung der Zellen werden weitestgehend ausgeschlossen, wie sie nach Einwirkung eines Entzündungsreizes (Proteosepton oder Thioglycollat) vorkommen (Czuprynski, Henson et al. 1984).

Als infizierte Parenchymzellen wurden Leberzellen gewählt, da sie auch in besonderer Weise im Rahmen der natürlichen Infektion betroffen sind (Mainou-Fowler, MacGowan et al. 1988; Conlan and North 1992; Marco, Prats et al. 1992; Gregory, Sagnimeni et al. 1996; Barsig, Flesch et al. 1998; Cousens and Wing 2000).

Aufgrund der ständigen Verfügbarkeit und Reproduzierbarkeit wurde eine Zelllinie ausgewählt. Hierbei handelt es sich um einen sehr gut untersuchten Klon von adhärenenten, embryonalen Hepatozyten (ATCC, TIB 73), die als einschichtiger Zellrasen (Monolayer) wachsen und *in vitro* mit *Listeria monocytogenes* infiziert werden können (Wood, Maroushek et al. 1993; Gaillard, Jaubert et al. 1996; Haponsaph and Czuprynski 1996).

Der Einsatz einer Zelllinie gewährleistet gegenüber der Gewinnung von Leberzellen *ex vivo* mittels Kollagenase-Perfusion (Seglen 1976; Bankey, Hill et al. 1994) eine homogene Zellpopulation und schließt die Verunreinigung mit in der Leber befindlichen residenten, aktivierten Leukozyten aus.

In den Experimenten wurde die Listerienmutante *Listeria monocytogenes ActA-* verwendet, der durch Inaktivierung eines virulenzassoziierten Gens die Fähigkeit zur Aktin-

vermittelten Zell-Zell-Ausbreitung fehlt (Tilney and Portnoy 1989; Niebuhr, Chakraborty et al. 1993; Marchand, Moreau et al. 1995; Chakraborty 1996; Chakraborty 1999).

Die Infektion mit *Listeria monocytogenes ActA*- führt anders als beim Wildtyp nicht zu einer Destruktion der Leberzellrasens (Gerber 1999).

Die Kokultur von listerieninfizierten Hepatozyten mit murinen Peritonealexsudatleukozyten führt zu polyzyklisch begrenzten Läsionen (Plaques) (Gerber 1999).

Zur Quantifizierung des MZA und damit des Ausmaßes der Zytotoxizität wurde eine computergestützte Analyse digitalisierter Abbildungen der Monolayer etabliert. Dieses Verfahren nutzt die Möglichkeit bildverarbeitender Software, Flächenberechnungen durchzuführen.

## 4.2 Die zytotoxisch aktive Zellpopulation

Aus früheren Untersuchungen war bekannt, dass unter Verwendung von infizierten Hepatozyten als Zielzellen, sowohl Milzzellen listerieninfizierter Tiere als auch Peritonealexsudatzellen naiver Mäuse die Fähigkeit der selektiven Zytotoxizität besitzen (Peters 1997; Gerber 1999).

Beide Untersucher arbeiteten jedoch mit aktivierten Effektorzellen. Die Frage nach der Identität der Effektorzelle wurde in beiden Arbeiten nicht beantwortet.

In unseren Experimenten wurden murine, residente Peritonealzellen naiver Tiere als Effektorzellen verwendet und damit ein reduktionistischer Ansatz gewählt. Auf dieser Grundlage konnten die Untersuchungen mit einer weitgehend definierten Zellpopulation durchgeführt werden (Tab. 1).

**Tabelle 1.** Relative Anteile muriner residenter Peritonealzellen (gewonnen durch Peritoneallavage, Gesamtzellzahl:  $2-4 \times 10^6$  / Tier) (Kaufmann and Kabelitz 1998)

Zellpopulation	Relativer Anteil in Prozent (%)
<b>Makrophagen</b>	50-70
<b>Lymphozyten</b>	25-50
B-Zellen	k.A.
T-Zellen CD4 <sup>+</sup>	74% der T-Zellen
T-Zellen CD8 <sup>+</sup>	18% der T-Zellen
T-Zellen CD4-/CD8-	8% der T-Zellen
Neutrophile Granulozyten	2
Eosinophile Granulozyten	<1
Mastzellen	>1
NK-Zellen	<0.5

k.A.: keine Angabe

Die in unseren Experimenten ermittelte zelluläre Zusammensetzung des Peritonealzellgemisches differierte von den Literaturangaben methodenbedingt nur in der Weise, dass weniger Makrophagen / Monozyten ( $20,25 \% \pm 8,24 \%$ ) und ein größerer Anteil Lymphozyten ( $79,25 \% \pm 8,25 \%$ ) vorhanden waren (Abb. 4). Dies ist am ehesten auf Unterschiede in

der Präparation und bei den verwendeten Mausstämmen zurückzuführen. Granulozyten waren nur zu einem Anteil von weniger als 1% vorhanden.

Um die zytotoxisch aktive Zellpopulation aus dem Peritonealzellgemisch zu identifizieren und die zugrunde liegenden Effektormechanismen zu untersuchen, wurden die Leukozyten hinsichtlich ihrer Eigenschaft der unspezifischen Kunststoffadhärenz (Kaufmann and Kabelitz 1998) aufgetrennt und auf den listerieninfizierten Hepatozytenmonolayern getestet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die zytotoxische Aktivität von der adhärennten Zellfraktion getragen wird, während den nicht-adhärennten Zellen diese Fähigkeit selbst bei 40x höherer Zellzahl fehlt. Anhand der Zytospinpräparate sind Lymphozyten die vorherrschende Population in der nicht adhärennten Zellsuspension. Die adhärennte Zellpopulation besteht überwiegend aus Makrophagen (Hori, Ehrke et al. 1987; Kaufmann and Kabelitz 1998). Von uns durchgeführte immunzytologische Färbungen der Zytospinpräparate zeigen überwiegend F4/80 positive Makrophagen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Eigenschaften von Peritonealmakrophagen sind sehr gut erforscht (Leenen, Jansen et al. 1986; Nibbering, Leijh et al. 1987; Nibbering, Leijh et al. 1987; Nelson, Parhar et al. 1990; Nibbering, Van de Gevel et al. 1990; Plasman and Vray 1993; Plasman and Vray 1994; DaMatta, Araujo-Jorge et al. 1995).

Experimente von M. Peters demonstrierten die Fähigkeit von Milzzellen immunisierter Tiere zur selektiven Lyse listerieninfizierter Hepatozyten. In diesen Experimenten konnten Lymphozyten mittels Einsatz von Antikörpern gegen CD4 und CD8 als lytisch aktive Zellpopulation ausgeschlossen werden. Nach Zellseparation mit oberflächenaktivierten magnetischen Polystyrenbeads und Anreicherung von Thy<sup>+</sup> T-Zellen wurde vermutet, dass Thy<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> Zellen, wie z. B. NK-Zellen, die gesuchte Zellpopulation darstellten. Da dieses Verfahren der Zellseparation aber durch die Verunreinigung der Lymphozyten mit Makrophagen erheblich in seiner Aussagekraft eingeschränkt war, konnten Makrophagen als zytotoxische Effektorzellen nicht ausgeschlossen werden (Peters 1997).

Die hier gezeigten Ergebnisse sind auch vereinbar mit den Untersuchungen von H. Gerber, der Makrophagen als lytisch aktive Zellen favorisierte, indem er nach Zellseparation von Peritonealexsudatzellen mittels Dichtegradient Neutrophile Granulozyten und Lymphozyten als zytotoxische Effektorzellen ausschloss (Gerber 1999).

Verschiedene Untersucher setzten in ihren Experimenten zur zellvermittelten Zytotoxizität die Effektorzellen in einer vielfachen Menge gegenüber den Zielzellen ein, um einen ausreichenden Effekt demonstrieren zu können (Takasugi and Klein 1970; Andjargholi and Dale 1977; Billiar, Curran et al. 1989; Wahlberg, Burholt et al. 2001). In diesem Zusammenhang erscheint das in den eigenen Versuchen vergleichsweise niedrige Effektor- Zielzell-Verhältnis bemerkenswert. Ziel- und Effektorzellen wurden in den meisten der eigenen Experimente im Verhältnis 0,1 : 1 eingesetzt.

Unter diesem Gesichtspunkt erscheinen auch die Interpretationen verschiedener Experimente von J. Conlan und R. North verständlich, die myelomonozytäre Rekrutierung mittels 5C6 mAk (CR3) antagonisierten und dadurch eine Exazerbation der frühen Listeriose beobachten konnten. Nicht zuletzt aufgrund des zahlenmäßigen Überwiegens von Neutrophilen Granulozyten (PMNs) unter den frühzeitig einwandernden Zellen wurde ihnen die herausragende Bedeutung für die Listerienabwehr in der präimmunen Phase zugeschrieben (Conlan and North 1991). Da aber auch Monozyten CR3-abhängig in das Entzündungsbiet einwandern (Rosen 1990), ist es durchaus denkbar, dass, wie von H. Rosen postuliert, eigentlich das Fehlen der Monozyten / Makrophagen in Experimenten mit CR3-blockierenden Antikörpern für die ungebremste Vermehrung der Listerien unter diesen Bedingungen verantwortlich war.

### 4.3 Effektormechanismen von Makrophagen

Nachdem deutlich geworden war, dass es sich bei der zytotoxisch aktiven adhärennten Peritonealzelle um Makrophagen handelte, sollten die Zell-Zell-Interaktion von Makrophagen und den listerieninfizierten Hepatozyten sowie die involvierten Effektormechanismen näher untersucht werden. Hierbei waren die bekannten Effektormechanismen von Makrophagen für die Konzeption der Experimente wegweisend.

#### 4.3.1 Die Rolle von IFN- $\gamma$

Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) gilt als das wichtigste Makrophagen-aktivierende Zytokin (Virelizier and Arenzana-Seisdedos 1985; Hori, Ehrke et al. 1987; Schultz and Altom 1990) und wurde aus diesem Grunde früher auch als Makrophagen-aktivierender-Faktor (MAF) bezeichnet (Nathan, Murray et al. 1983).

Des weiteren wird es als einer der wichtigsten Mediatoren für die präimmunen Abwehrmechanismen in der Listeriose angesehen (Buchmeier and Schreiber 1985; Metcalf and Campbell 1994; van den Broek, Muller et al. 1995; Lu, Ebensperger et al. 1998; Roesler, Kofink et al. 1999). Die Bedeutung von IFN- $\gamma$  in der Frühphase der Listeriose wurde von W. Dai mit Hilfe von IFN- $\gamma$ -Rezeptor-knock-out-Mäusen (IFN- $\gamma$ R $^{-/-}$ ) untersucht. Diese transgenen Tiere waren nicht in der Lage, das Wachstum der Listerien zu limitieren und starben spätestens am 7 d p.i. an niedrigsten Infektionsdosen. Außerdem war ein schnelles Übertreten der Listerien aus dem Phagosom ins Zytoplasma zu beobachten und die Organe waren wesentlich stärker von Mikroabszessen durchsetzt als bei den Kontrolltieren (IFN- $\gamma$ R $^{+/+}$ ) (Dai, Bartens et al. 1997). Es lag daher nahe, zunächst die Rolle von IFN- $\gamma$  in der Zell-Zell-Interaktion zu untersuchen.

Hierzu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von rIFN- $\gamma$  kokultiviert.

Die Ergebnisse zeigen, dass IFN- $\gamma$  den zytotoxischen Effekt dosisabhängig verstärkt.

Andere Untersucher demonstrierten, dass das zytotoxische Potential von Milzzellen immuner Tiere gegenüber listerieninfizierten Parenchymzellen im Laufe der Infektion parallel zu einer ansteigenden CD4-T-Zell-vermittelten IFN- $\gamma$ -Produktion zunahm (Peters 1997).

IFN- $\gamma$  aktiviert eine Reihe von Effektormechanismen in Makrophagen und anderen Zellarten. Es induziert verschiedene Proteine wie z. B. den TNF- $\alpha$ -Rezeptor, die Gruppe der B7 kostimulatorischen Proteine, Fc-Rezeptoren, Proteine, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, wie MHC Klasse I / II und lysosomale Cathepsine, Chemokine wie MCP, RANTES und IP-10, Komplement- und Akute-Phase-Proteine und nicht zuletzt die Integrin Liganden VCAM / ICAM (Virelizier and Arenzana-Seisdedos 1985; Boehm, Klamp et al. 1997).

Von besonderer Bedeutung für die Abwehr von intrazellulären Erregern gilt die Bildung von reaktiven Radikalen. IFN- $\gamma$  führt neben der Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen auch zur Expression der NO-Synthase, die die enzymatische Abspaltung von Stickstoffmonoxid katalysiert (Beckerman, Rogers et al. 1993; DeGeorge, Heck et al. 1997).

TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  wirken in vielerlei Hinsicht synergistisch. Dies erklärt sich partiell dadurch, dass die meisten Gene Promotorbindungsstellen für Transkriptionsfaktoren beider Zytokine besitzen. Darüber hinaus können sich die Transkriptionsfaktoren von TNF- $\alpha$  sowie IFN- $\gamma$  gegenseitig aktivieren (Boehm, Klamp et al. 1997).

Von den IFN- $\gamma$ -vermittelten Effektormechanismen von Makrophagen wurden im folgenden die beiden bedeutendsten, die TNF- $\alpha$ -Ausschüttung und die Aktivierung der NO-Synthase, hinsichtlich ihrer Rolle bei der Zytotoxizität untersucht.



### 4.3.2 Die Rolle von TNF- $\alpha$

Der wohl bekannteste Mediator der Zytotoxizität von Makrophagen neben der Phagozytose ist der Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ) (Mannel 1986).

TNF- $\alpha$  ist auch *in vivo* essentiell für die Überwindung sowohl der Primär- als auch der Sekundärinfektion mit *Listeria monocytogenes* (Bancroft, Sheehan et al. 1989; Rothe, Lesslauer et al. 1993; Leenen, Canono et al. 1994; Samsom, Langermans et al. 1995).

TNF- $\alpha$  zusammen mit IFN- $\gamma$  und Il-1 fördern die lokale Entstehung eines inflammatorischen Exsudats (Boehm, Klamp et al. 1997). Die Chemotaxis von Leukozyten mündet in die Formation der typischen Granulome (Mielke, Ehlers et al. 1993). TNF- $\alpha$  zusammen mit Il-12 ist außerdem an der Zytokinschleife für die Produktion des protektiven IFN- $\gamma$  beteiligt sowie auch von Bedeutung für die IFN- $\gamma$ -vermittelte Aktivierung von Makrophagen in der Listeriose (Langermans, van der Hulst et al. 1992).

Um zu untersuchen, ob TNF- $\alpha$  an der unmittelbaren zytotoxischen Aktivität von Peritonealmakrophagen gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten beteiligt ist, wurde die Aktivität des Zytokins mittels eines anti-TNF- $\alpha$  mAk blockiert.

Es zeigte sich, dass der Einsatz von anti-TNF- $\alpha$  mAk die zytotoxische Aktivität der Makrophagen nicht zu hemmen vermochte. Zudem ließ sich bei einer ergänzend durchgeführten Analyse der Kulturüberstände mittels ELISA TNF- $\alpha$  nicht nachweisen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit Untersuchungen von Gerber, der ebenfalls durch die Blockade von TNF- $\alpha$  mittels Antikörpern keine Verminderung der zytotoxischen Aktivität von Peritonealexsudatzellen erreichen konnte. Allerdings führte die Applikation einer hohen Dosis von TNF- $\alpha$  in seinen Untersuchungen zum Zelltod der infizierten Leberzellen (Gerber 1999).

Dass TNF- $\alpha$  in der Lage ist, Nekrose oder Apoptose von Leberzellen auszulösen, ist sehr gut an verschiedenen Sepsismodellen beschrieben (Hartung and Wendel 1991; Leist, Gantner et al. 1994; Leist, Gantner et al. 1995; Leist, Gantner et al. 1995; Wang, Redmond

et al. 1995; Bohlinger, Leist et al. 1996; Leist, Gantner et al. 1997; Leist, Gantner et al. 1998).

Nicht ausgeschlossen ist, dass membranständiges TNF- $\alpha$  involviert sein könnte, was einen aus früheren Untersuchungen bekannten und für die Zytotoxizität erforderlichen Zell-Zell-Kontakt erklären könnte (Dumont, Mabondzo et al. 1990; Gerber 1999).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen ist TNF- $\alpha$  in anderen Experimentalsystemen an der Makrophagen-vermittelten Abtötung z. B. transformierter Zellen beteiligt (Dumont, Mabondzo et al. 1990; Kusenda, Kalafut et al. 1992; Pyo and Rhee 1999).

### 4.3.3 Die Rolle von NO

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein zytotoxisches Radikal, welches in einer enzymatisch katalysierten Reaktion aus L-Arginin gebildet wird (Moncada and Higgs 1993). Von dem Enzym NO-Synthase (NOS) sind verschiedene Isoformen mit unterschiedlicher Verteilung bekannt. Neben konstitutiven Formen im ZNS (nNOS, NOS1) und Endothel (ehemals EDRF, eNOS, NOS3) besitzen Makrophagen eine induzierbare Isoform (iNOS, NOS2) (MacMicking, Xie et al. 1997; Thiemermann 1997).

Neben Neurotransmission, antiaggregatorischen, vasodilatatorischen (Parratt 1998), zytoprotektiven (Kroncke, Fehsel et al. 1997) und immunmodulatorischen Eigenschaften ist auch eine direkte zytotoxische Wirkung von NO auf verschiedene Zellarten bekannt (Billiar, Curran et al. 1989; Albina, Cui et al. 1993; Sveinbjornsson, Olsen et al. 1996; Albina and Reichner 1998; Nishikawa, Sato et al. 1998).

T. R. Billiar et al. konnten *in vitro* an einem LPS-Sepsismodell zeigen, dass bei der Kupferzell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber Hepatozyten NO involviert ist (Billiar, Curran et al. 1989).

Auch für die Listeriose wurde eine Bedeutung von Stickstoffmonoxid beschrieben. So geht eine akute Infektion mit *Listeria monocytogenes in vivo* mit einer erhöhten Ausscheidung von Nitrat (stabiler Metabolit von NO) einher. Eine experimentelle Hemmung der NO-Bildung mit L-NMMA führt zu einer erhöhten Erregerlast in Milz und Leber und zeigt klinische Zeichen einer schweren Infektion (Boockvar, Granger et al. 1994).

Einige Untersucher zeigten, dass Stickstoffmonoxid von Bedeutung für die intrazelluläre Abtötung von Listerien innerhalb permissiver Makrophagen ist (Beckerman, Rogers et al. 1993).

Die eigenen Messungen zeigen, dass in IFN- $\gamma$ -stimulierten Kulturen eine deutliche NO-Synthese zu verzeichnen ist. Stickstoffmonoxid wurde ausschließlich produziert, wenn die Hepatozyten mit Listerien infiziert waren. Eine alleinige Stimulation der Peritonealleukozyten mit IFN- $\gamma$  reichte als Stimulus für eine NO-Bildung nicht aus.

Dieses Ergebnis deckt sich mit Ergebnissen anderer Untersucher, die zeigten, dass mehr als ein Stimulus für die Aktivierung der Makrophagen zur NO-Synthese notwendig ist. So zeigen *in-vitro*-Studien, dass IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  oder Muramyldipeptide (MDP) in Kombination (Drapier, Wietzerbin et al. 1988; Frankova and Zidek 1998) sowie hitzegetötete Listerien (HKL) zusammen mit IFN- $\gamma$  (Beckerman, Rogers et al. 1993) notwendig sind für die Stickstoffmonoxidproduktion.

Um die Rolle der Stickstoffmonoxidsynthese durch IFN- $\gamma$ -stimulierte Peritonealzellen bei der zytotoxischen Aktivität zu untersuchen, wurde die NO-Bildung durch den spezifischen iNOS-Hemmstoff Aminoguanidin (AG) (Ruetten and Thiemermann 1996) blockiert.

Die Analyse der Monolayer zeigte, dass AG keinen Einfluss auf die Zytotoxizität hatte. Auch der nicht-selektive, kompetitive NO-Blocker NG-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) blieb ohne Wirkung (Ergebnisse nicht gezeigt). Die zytotoxische Aktivität war somit von der NO-Bildung zu dissoziieren.

Auch Untersuchungen an chronisch infizierten SCID-Mäusen konnten keinen Effekt einer Applikation des iNOS-spezifischen NO-Antagonisten Aminoguanidin finden (Bhardwaj, Kanagawa et al. 1998). P. J. Leenen et al. untersuchten die Fähigkeit einer Makrophagen-Zelllinie zur intrazellulären Abtötung von Listerien und fanden, dass TNF- $\alpha$  in Kombination mit IFN- $\gamma$  hierfür ausreichend ist, ohne eine Beteiligung von Stickstoffmonoxid erkennen zu können (Leenen, Canono et al. 1994).

Andere Untersuchungen unter Verwendung von J 774.1 Makrophagen und LPS1916 Makrophagen (defekte ROI Bildung) zeigten ebenfalls keine Bedeutung von RNI, sehr wohl aber von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROI) (Inoue, Itagaki et al. 1995).

Neuere *in-vivo*-Untersuchungen an phox / iNOS-knock-out-Mäusen zeigten, dass beide Enzymsysteme sich in ihrer Funktion bei der Abtötung intrazellulärer Bakterien gegenseitig zu kompensieren vermögen, wenn eines ausgeschaltet wird (Shiloh, MacMicking et al. 1999).

#### 4.3.4 Die Rolle von LPS

Wie in den vorangegangenen Abschnitten gezeigt, konnte IFN- $\gamma$  die zytotoxische Potenz residenter, naiver Makrophagen gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten steigern.

Das bekannteste Makrophagen für die Reaktion auf IFN- $\gamma$  kostimulierende Agens sind die Lipopolysaccharide (LPS) in der Zellwand Gram-negativer Bakterien (Dumont, Mabondzo et al. 1990). Derart stimulierte Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle beim Sepsisgeschehen und sind gemeinsam mit der Ausschüttung von TNF- $\alpha$  maßgeblich an den deletären Folgen beteiligt (Kielian and Blecha 1995; Ingalls, Heine et al. 1999; Antal-Szalmas 2000).

LPS vermittelt seine Wirkung über verschiedene Rezeptoren wie CD14 und TLR-4, die zu der Gruppe der Toll-like-Rezeptoren (TLR) gezählt werden (Medzhitov and Janeway 1997; Medzhitov and Janeway 2000).

Auch *Listeria monocytogenes* aktiviert diesen Rezeptortyp (TLR-2), der wie CD14 auch LPS und Bestandteile Gram-positiver Bakterien erkennt (Flo, Halaas et al. 2000).

Aufgrund dieser Zusammenhänge wurde der Effekt von LPS auf das Phänomen der Makrophagen-vermittelten Zytotoxizität in dem verwendeten Testsystem untersucht.

Die Versuche zeigen, dass LPS allein ausreichend ist, um zytotoxische Mechanismen von Peritonealzellen gegenüber (nicht-infizierten) Hepatozyten zu aktivieren. Auch hier war unter IFN- $\gamma$ -Stimulation eine Zunahme sowohl der Zytotoxizität als auch eine signifikante NO-Bildung nachweisbar. Auch in diesem Fall konnte kein Zusammenhang zwischen Stickstoffmonoxidbildung und Zytotoxizität nachgewiesen werden. Darüber hinaus blieb auch die Blockade von TNF- $\alpha$  ohne Effekt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Kokultur von listerieninfizierten Hepatozyten mit LPS und Peritonealzellen ließ keine Steigerung der zytotoxischen Aktivität erkennen. Die Summe dieser Beobachtungen kann als Hinweis gedeutet werden, dass es sich bei den Listerien- bzw. den LPS-induzierten zytotoxischen Phänomenen nicht um additive oder synergistische Mechanismen handelt.

#### 4.4 Die Bedeutung der Befunde für das Verständnis der Abwehrmechanismen in der murinen Listeriose *in vivo*

Zusammen mit den in dieser Arbeit gewonnenen neuen Daten ergibt sich das folgende Bild (Abb. 15) für die in der präimmunen Phase der Listeriose ablaufenden Wirtsreaktionen:

Die im Blut zirkulierenden Bakterien adhären an Kupffer Zellen in der Leber und dringen direkt in die Hepatozyten ein, wo hauptsächlich ihre Replikation stattfindet (Gregory, Barczynski et al. 1992; Gregory, Sagnimeni et al. 1996; Gregory and Wing 2002).

Angeborene Immunmechanismen begrenzen das Wachstum der Listerien in den ersten 2-3 Tagen der Infektion bis T-Zell-abhängige Effektormechanismen den Erreger vollständig eliminieren (Medzhitov and Janeway 1997; Medzhitov and Janeway 2000).

Infizierte Kupffer Zellen (Mac-1<sup>+</sup>) produzieren eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen: neben Monocyte Chemoattractant Protein (MCP) werden auch IL-1, IL-6, Macrophage Inflammatory Protein (MIP-1/2), Interferon Gamma Inducible Protein (IP-10), IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$ , NO u.v.m. sezerniert (Ehlers, Mielke et al. 1992; Barsig, Flesch et al. 1998; Flesch, Barsig et al. 1998; Gregory, Wing et al. 1998; Dorner, Scheffold et al. 2002).

Die listerienbefallenen Hepatozyten sezernieren ebenfalls verschiedene proinflammatorische Zytokine und akute Phase Proteine unter der Stimulation mit IL-6 wie z. B. MIP (entspricht IL-8 beim Menschen), MCP-1, CRP (Thornton, Strieter et al. 1990; Thornton, Ham et al. 1991; Barsig, Flesch et al. 1998).

Angelockt von Chemokinen wie IL-1 und IL-8 immigrieren Neutrophile Granulozyten in das Entzündungsgebiet, werden aktiviert (z.B. durch IL-1) und tragen durch die Sezernierung von eigenen Zytokinen wie IL-1, IL-12 und Chemokinen wie MIP-1, (unter IFN- $\gamma$  Einfluss auch MIC, IP-10, I-TAC) (Cassatella, Meda et al. 1995) wiederum zur Akkumulation und Aktivierung von Monozyten (Mac-1<sup>+</sup>), NK-Zellen und T-Lymphozyten bei (Goossens, Jouin et al. 1991; Seebach, Bartholdi et al. 1995; Gasperini, Marchi et al. 1999). Dieser Vorgang ist CD18/11b (Mac-1) abhängig. Die Granulozyten treten dabei in Interaktion mit den Kupffer Zellen (Gregory, Cousens et al. 2002) und den listerieninfizier-

ten Hepatozyten (Boury and Czuprynski 1995) und besitzen die Fähigkeit, extrazelluläre Listerien abzutöten (Gregory, Sagnimeni et al. 1996).

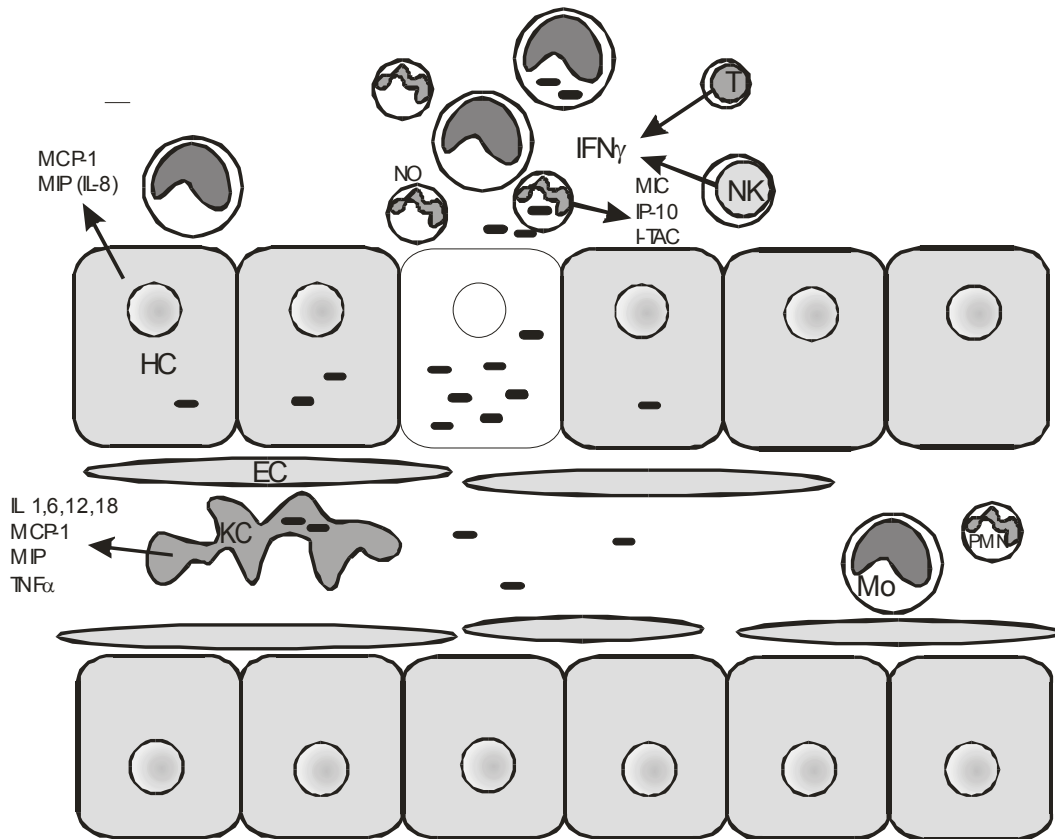
Unter dem Einfluss von IL-12 (von Monozyten und Granulozyten sezerniert) und TNF- $\alpha$  (Tripp, Wolf et al. 1993) wiederum produzieren NK-Zellen IFN- $\gamma$  (Guo, Niesel et al. 1992; Gregory, Jiang et al. 1996). Eine direkte Lyse infizierter Hepatozyten durch NK-Zellen ist bisher nicht bewiesen. Gregory et al. zeigten zwar, dass die Kokultur von Lymphokin-Aktivierten-Killerzellen (LAK) mit infizierten Hepatozyten *in vitro* erhöhte ASAT Level als Zeichen einer zellulären Schädigung aufweisen und es zu einer Verminderung der intrazellulären Bakterienzahlen kommt. Dies ist aber wahrscheinlich auf das sezernierte IFN- $\gamma$  zurückzuführen, welches die intrazelluläre Replikation der Bakterien in Hepatozyten zu hemmen vermag (Gregory and Wing 1993). Zusätzlich ist zu erwähnen, dass IL-2, welches in der Arbeit von Gregory et al. für die NK-Zell-Stimulation notwendig war, in der frühen Phase der Listeriose nicht produziert wird.

Die eigenen Daten zeigen, dass Monozyten / Makrophagen unter dem Einfluss von IFN- $\gamma$  die Fähigkeit zur Lyse von infizierten Hepatozyten erlangen und so die Bakterien aus dem protektiven Milieu der befallenen Wirtszelle freigesetzt werden.

Die nun extrazellulär vorliegenden Listerien werden von den umliegenden Granulozyten und Makrophagen phagozytiert und so an der Dissiminierung gehindert (Gregory, Sagnimeni et al. 1996). Die direkte zytotoxische Aktivität der Makrophagen gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten ist mit IFN- $\gamma$  steigerbar aber unabhängig von Stickstoffmonoxid (NO)(eigene Daten). Zu dem Aspekt der direkten Makrophagen-induzierten Zytotoxizität gegenüber listerieninfizierten Wirtszellen und so auch nicht zu der Rolle von NO in diesem Zusammenhang existieren zur Zeit keine Daten in der Literatur.

NO ist in der Phase der unspezifischen Immunabwehr wahrscheinlich durch direkte bakterizide Aktivität protektiv (Beckerman, Rogers et al. 1993), ab d3 kann NO die Immunabwehr durch die Proliferationshemmung von T-Zellen hemmen (Gregory, Wing et al. 1993).

Welcher Mechanismus allerdings dem Makrophagen-vermittelten Zelltod zugrunde liegt, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden und wird Gegenstand späterer Untersuchungen sein.



**Abbildung 15: Immunreaktion in der Frühphase der Listeriose.** Listerieninfizierte Kupfer Zellen (KC), infizierte Hepatozyten (HC) und Blutmonozyten (Mo) / Makrophagen sezernieren eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen (siehe Text). Dies führt zu der Produktion von IFN-  $\gamma$ , welches Makrophagen zur Zytotoxizität gegenüber listerieninfizierten Hepatozyten aktiviert. Die Erreger werden so aus dem protektiven Intrazellulärraum freigesetzt und extrazellulär wirksamen Immunmechanismen zugänglich gemacht.