

V. DISKUSSION

Noch bevor eine Antigen-spezifische, T-Zell-vermittelte Immunität ausgebildet werden kann besitzt die angeborene Infektabwehr schon in den frühen Stadien einer Infektion wirkungsvolle Mechanismen der Erregerabwehr. In Situationen der Immundefizienz, in denen die spezifische Abwehr gar nicht erst ausgebildet werden kann, muß sich der Wirt alleine mit den Mechanismen der unspezifischen Abwehr gegen Pathogene verteidigen. Der Aktivierung von Makrophagen ($M\Phi$) kommt hierbei eine besondere Bedeutung zu. $M\Phi$ werden durch diese Aktivierung in einen Zustand erhöhter Zytotoxizität versetzt und können sich so wirkungsvoll gegen eingedrungene Erreger zur Wehr setzen. Der wichtigste lösliche Mediator einer $M\Phi$ -Aktivierung ist Interferon (IFN -) γ . In Abwesenheit von T-Lymphozyten wird dieses Zytokin hauptsächlich von Natürlichen Killer (NK) Zellen gebildet, dessen Produktion jedoch nicht direkt durch einen Erreger ausgelöst werden kann. Unanue und Bancroft hatten gezeigt, daß während einer Infektion mit dem fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*) die Produktion von NK Zell- IFN - γ durch die Wirkung von zwei weiteren Zytokinen initiiert wird. Diese Zytokine, Tumor Nekrose Faktor (TNF -) α und Interleukin (IL -) 12 werden von $M\Phi$ gebildet, nachdem diese in Kontakt mit dem Erreger getreten sind. Gemeinsam induzieren sie die Bildung von IFN - γ durch NK Zellen, welches dann wiederum für die Aktivierung von $M\Phi$ zur Verfügung steht. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, besitzt dieses zytokinabhängige Modell der IFN - γ Induktion keine Gültigkeit, wenn statt *L. monocytogenes* der opportunistische Infekterreger *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) als Erreger verwendet wird. Darüber hinaus wurden Hinweise gefunden, daß ein weiterer Weg der NK Zell-Aktivierung existiert. Es wird postuliert, daß während der Interaktionen zwischen $M\Phi$ und NK Zellen auch membranständigen Molekülen eine für die Initiierung der IFN - γ Produktion signaltransduktorische Bedeutung zukommt. Folgendes wurde gezeigt:

- 1) Gesamtmilzzellen (GMZ) von SCID Mäusen reagieren auf die Koinkubation mit sowohl dem Bakterium *L. monocytogenes* als auch mit dem Pilz *P. carinii* mit der Bildung von IFN - γ .
- 2) Im Gegensatz zu *L. monocytogenes* induzieren *P. carinii*-Organismen in isolierten $M\Phi$ keine Produktion von TNF - α und IL -12.

- 3) Fehlt ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen den Effektorzellen der unspezifischen Infektabwehr, M Φ und NK Zellen, so wird im Falle von *L. monocytogenes* eine geringere, im Falle von *P. carinii* keine Produktion von IFN- γ induziert.
- 4) Bei Inkubation in Gegenwart von monoklonalen Antikörpern (mAk) gegen das murine M Φ Oberflächenantigen F4/80 wird die Produktion von IFN- γ inhibiert. Diese Wirkung wird durch eine funktionelle Blockierung des F4/80 Antigens verursacht und ist in beiden Erregermodellen zu beobachten.
- 5) Die Expression des F4/80 Antigens erfolgt konstitutiv und wird während einer Infektion mit *L. monocytogenes* nur in den ersten Stunden nach der Inokulation moduliert. Durch eine Überexpression des F4/80 Antigens wird die Stärke der IFN- γ Induktion nicht verändert. Bei einem gänzlichen Fehlen des F4/80 Antigens jedoch wird *in vitro* nur mit einer geringeren IFN- γ Produktion auf eine Infektion mit *L. monocytogenes* reagiert.
- 6) Neu produzierte mAk gegen NK Zell-Antigene inhibieren ebenfalls die IFN- γ Induktion durch Blockierung von M Φ -NK Zell-Interaktionen.

1. Die Induktion von IFN- γ während der unspezifischen zellulären Infektabwehr

Durch eine Inkubation von isolierten M Φ mit *L. monocytogenes* wurde die Freisetzung von TNF- α und IL-12 induziert. Im Gegensatz dazu konnten diese Zytokine mittels spezifischem ELISA in den Zellkulturüberständen von M Φ nach einer Inkubation mit *P. carinii* nicht nachgewiesen werden. Der Nachweis eines Zytokins auf der Ebene des gebildeten Proteins hat den Nachteil, daß nur die zum Zeitpunkt der Messung aktuelle Zytokinkonzentration bestimmt werden kann. Durch Proteolyse abgebautes oder von den produzierenden Zellen wieder aufgenommenes Protein kann nicht bestimmt werden. Darüber hinaus können Zytokine, die nicht in den Überstand abgegeben werden, sondern membranständig verbleiben, nicht nachgewiesen werden. Gerade diese könnten jedoch während Zell-Zell-Interaktionen im Mikromilieu zwischen verschiedenen Zellpopulationen durchaus wirksam sein. So wurde zum Beispiel eine zellmembrangebundene Form des Zytokins IL-12 auf M Φ nachgewiesen (Fan *et al.*, 1996). Um beurteilen zu können, ob *P. carinii* die Expression von TNF- α und IL-12

überhaupt nicht induziert oder die Freisetzung dieser Zytokine erst auf posttranskriptionaler Ebene inhibiert wird, wurde die Methode der semiquantitativen RT-PCR in unserem Labor etabliert. Die Mengen der eingesetzten DNA wurden anhand des unabhängig von einer Aktivierung exprimierten Gens für HPRT normalisiert. Unterschiede der Fluoreszenzintensitäten der mit Ethidiumbromid gefärbten PCR-Produkte waren daher ausschließlich auf eine Beeinflussung durch den jeweiligen Erreger zurückzuführen.

Da mit Hilfe des ELISA festgestellt worden war, daß sowohl *L. monocytogenes* als auch *P. carinii* GMZ zu einer Zytokinproduktion stimulieren, wurde die Methode der RT-PCR geprüft, indem zuerst GMZ von SCID Mäusen mit den jeweiligen Erregern inkubiert wurden. In beiden Fällen wurden TNF- α und IL-12 nachgewiesen. Allerdings unterschieden sich die Zeitpunkte der Expression voneinander: Während GMZ nach Inkubation mit *L. monocytogenes* mit der Transkription von TNF- α bereits nach 30 Minuten und von IL-12 nach sechs Stunden antworteten, wurden diese Zytokine durch *P. carinii* erst später (TNF- α : sechs Stunden, IL-12: 24 Stunden) induziert. Ribonukleinsäure von IFN- γ wurde nach sechs Stunden beobachtet, die Expression nahm bis 24 Stunden nach Inkubation mit beiden Erregern zu. Ebenfalls keinen Unterschied zwischen beiden Erregermodellen zeigte die Expression der induzierbaren Stickoxidsynthase (iNOS), welche für die Spaltung von L-Arginin in L-Citrullin verantwortlich ist, bei der zytotoxisch wirkende anorganische Stickoxide freiwerden. Diese Spaltung findet nur in aktivierten M Φ statt, eine Heraufregulation von iNOS ist dementsprechend ein Maß für den Aktivierungszustand von M Φ .

Die Expression von IL-10 war in beiden Fällen 24 Stunden nach Infektion nachweisbar. Die Expression dieses Zytokins wurde untersucht, da IL-10 eine inhibierende Funktion auf die Bildung von sowohl durch *L. monocytogenes*- als auch *P. carinii*-induziertem IFN- γ besitzt (Warschkau *et al.*, 1997, 1998). Die Expression von IL-1 β war in beiden Fällen konstitutiv und wurde durch keinen der Erreger beeinflusst. Die Rolle von IL-1 β ist in dem in der vorliegenden Arbeit behandelten Thema der IFN- γ Auslösung sehr umstritten: Hunter *et al.* (1994) beobachteten, daß Antikörper gegen IL-1 β die Produktion von *Toxoplasma gondii* induziertem IFN- γ gänzlich hemmt. Im Gegensatz dazu wurde in der Arbeitsgruppe von Unanue (Rogers *et al.*, 1992, Tripp *et al.*, 1993) nach Zugabe von anti IL-1 β Antikörpern kein Unterschied in der Produktion von IFN- γ beobachtet. Die *in vivo* Rolle für IL-1 β während

einer Listeriose ist jedoch unbestritten. Hier sorgt dieses Zytokin für eine verstärkte Migration von PMN an den Infektionsort und damit für eine verstärkte Abwehrfunktion gegen diesen Erreger (Rogers *et al.*, 1994).

Nachdem die erregerinduzierte Expression der Zytokin-mRNA in GMZ untersucht worden war, wurden hochreine Knochenmarkkulturmakrophagen mit den Erregern koinkubiert und die Zytokininduktion beobachtet. In isolierten M Φ zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den beiden Erregermodellen. Nach Inkubation mit *L. monocytogenes* wurde TNF- α nach 30 Minuten, IL-12 und iNOS nach sechs Stunden und IL-10 nach 24 Stunden beobachtet. Nach Inkubation mit *P. carinii* wurde keiner der untersuchten Faktoren hochreguliert. Nur die auch in unstimulierten Zellen beobachteten Zytokine IL-1 β und IL-12 konnten nachgewiesen werden, deren Expression allerdings durch den Erreger nicht beeinflusst wurden.

Zusammengefaßt zeigen die Daten, daß M Φ in Abwesenheit anderer Zelltypen durch *P. carinii* nicht zu einer Expression der genannten Faktoren stimuliert werden. Hierbei ist besonders hervorzuheben, daß die Zytokine IL-12 und TNF- α , die nach Stimulation mit Listerien als Induktoren der IFN- γ Produktion gelten, nicht beobachtet wurden. Diese Daten werden durch die Ergebnisse in erregerstimulierten GMZ komplementiert: Nach Inkubation mit *P. carinii* wurden IL-12 und TNF- α erst sehr spät beobachtet, eine direkte Induktion der Bildung dieser Zytokine scheint damit ausgeschlossen werden zu können. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß im *P. carinii*-Modell andere Mechanismen ablaufen müssen, durch deren Wirkung erst eine Produktion von IFN- γ , und anschließend, durch dessen M Φ -aktivierende Wirkung, die Produktion von IL-12 und TNF- α ausgelöst werden kann.

Zuerst wurde geprüft, ob andere, bisher nicht untersuchte, lösliche Faktoren an einer IFN- γ -Induktion in NK Zellen beteiligt sind. Für diese Untersuchung wurde ein *in vitro* Inkubationssystem gewählt, in dem zwei verschiedene Zellpopulationen durch eine Membran räumlich voneinander getrennt, jedoch im selben Medium inkubiert werden konnten. Lösliche Moleküle, nicht aber Zellen, konnten durch diese mit einer sehr hohen Anzahl von Poren (1×10^8 , 0,45 μm Durchmesser) durchsetzte Membran ausgetauscht werden. Als Effektorzellpopulationen wurden M Φ aus Knochenmarkkultur und über Nylonwolle Säulen aufgereinigte Milz-NK Zellen verwendet, da diese beiden Zellpopulationen im

Zusammenspiel ausreichen, um eine erregerinduzierte Produktion von IFN- γ beobachten zu können. Eine direkte Erreger-Induktion von IFN- γ in NK Zellen ist jedoch ebensowenig möglich wie eine Produktion von IFN- γ in Abwesenheit von NK Zellen (Wherry *et al.*, 1991, Warschkau *et al.*, 1998). Die Versuche zeigten, daß *P. carinii* Organismen keine Produktion von IFN- γ induzieren konnten, wenn M Φ und NK Zellen ohne einen direkten Zell-Zell-Kontakt zueinander inkubiert wurden. Wurden hingegen die Zellpopulationen in direkter Kokultur mit *P. carinii*-Organismen inkubiert, so konnte IFN- γ nachgewiesen werden. Somit wurde gezeigt, daß M Φ nach Kontakt mit diesen Erregern keine löslichen Faktoren bildeten, welche in der Lage wären, NK Zell-IFN- γ zu induzieren. Nach Inkubation mit *L. monocytogenes* konnte IFN- γ nachgewiesen werden, wenn M Φ und NK Zellen zusammen inkubiert worden waren. Wurden diese Zellpopulationen getrennt voneinander mit den Erregern inkubiert, so konnte ebenfalls IFN- γ in den Überständen gemessen werden. Die Konzentrationen waren jedoch geringer als in direkter Kokultur von M Φ und NK Zellen. Diese Daten deuten darauf hin, daß ein direkter Zell-Zell-Kontakt zwischen M Φ und NK Zellen nach Stimulation mit *L. monocytogenes* die erregerinduzierte Aktivierung von NK Zellen verstärkt.

Um diese Aussagen zu überprüfen, wurde eine weitere Versuchsreihe durchgeführt, mit deren Hilfe ebenfalls die Effekte erregerinduzierter M Φ auf die Aktivierung von NK Zellen untersucht werden konnte. Isolierte M Φ wurden mit den jeweiligen Erregern inkubiert, die M Φ -Überstände wurden anschließend filtriert und zu isolierten NK Zellen gegeben. Nach Inkubation mit *P. carinii* waren die M Φ -Überstände nicht in der Lage NK Zell-IFN- γ zu induzieren. Im Gegensatz dazu produzierten NK Zellen nach Inkubation mit *L. monocytogenes*- konditionierten M Φ -Überständen IFN- γ . Auch hier war auffallend, daß die Konzentrationen an IFN- γ , die durch *L. monocytogenes* ausgelöst wurden, signifikant geringer waren, als die aus dem nicht getrennten System. Diese Daten bestätigten die Theorie, daß ein direkter Kontakt zwischen M Φ und NK Zellen während der erregerinduzierten IFN- γ Produktion eine Rolle spielen könnte.

In einer Arbeit von Wherry (1991) wurde beschrieben, daß hkLm-konditionierte M Φ -Überstände keine Induktion einer IFN- γ Produktion in frisch isolierten NK Zellen bewirkten. Eine Induktion war nur zu beobachten, wenn die NK Zellen zuvor mit hohen Dosen IL-2

präaktiviert worden waren. Diese Präaktivierung erfolgte bei der Herstellung der verwendeten NK Zellen, da für diese Versuche Knochenmarkstammzellen sieben Tage lang in Gegenwart von 300 E/ ml IL-2 inkubiert worden waren, was eine selektive Vermehrung der NK-Vorläuferzellen zur Folge hatte. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, daß der Aktivierungszustand der NK Zellen verantwortlich ist für die Reaktion auf lösliche MΦ-Zytokine: Sind die NK Zellen durch IL-2 aktiviert, so können sie allein durch MΦ-Zytokine zu einer Produktion von IFN- γ stimuliert werden. Andere Mechanismen, wahrscheinlich ein direkter Zell-Zell-Kontakt, müßten in Abwesenheit von IL-2 die Aktivierung von NK Zellen unterstützen.

In der vorliegenden Arbeit interessierte das Verhalten naiver, nicht voraktivierter Zellen. Aus diesem Grunde wurde die Isolierung der NK Zellen durch Aufreinigung aus der Milz bevorzugt. Trotzdem mußten die Versuche mit isolierten NK Zellen in R10 mit einer niedrigen Dosis (20 E/ ml) IL-2 durchgeführt werden, da ohne den Zusatz von IL-2 die Viabilität der NK Zellen eingeschränkt war. Andere Untersuchungen in unserem Labor konnten anhand des Einbaus von MTT ebenfalls zeigen, daß die Lebensfähigkeit von NK Zellen ohne IL-2 stark vermindert ist (Haixin Yu, persönl. Mitt.). Vorversuche mit titrierter IL-2 Zugabe ergaben, daß 20 E/ ml IL-2 ausreichen, um eine optimale Vitalität von NK Zellen zu gewährleisten. Mit dieser Dosis IL-2 allein inkubierte NK Zellen konnten kein IFN- γ bilden. Welche Mechanismen für die eingeschränkte Viabilität von NK Zellen in Abwesenheit von IL-2 verantwortlich sind, ist bis heute nicht bekannt. In direkter Kokultur von NK Zellen mit MΦ ist der beschriebene Effekt hingegen nicht zu beobachten. Diese Daten könnten für das Vorhandensein membranabhängiger Kontakte zur Erhaltung der Lebensfähigkeit von NK Zellen *in vitro* sprechen. *In vivo* hat die IL-2 Abhängigkeit wahrscheinlich eine weit geringere Rolle, da zum Beispiel in der SCID Maus kein IL-2 gebildet wird. Ob in der SCID Maus andere Zytokine die Rolle von IL-2 übernehmen oder andere Mechanismen das Fehlen von IL-2 kompensieren, bleibt zu untersuchen.

Auffallend in den zuvor beschriebenen Versuchen war, daß murine MΦ aus der Milz oder Knochenmarkkultur nach Inkubation mit *P. carinii* keine Zytokine bildeten. Dieses Ergebnis entspricht Erkenntnissen, die aus anderen Arbeiten gewonnen werden konnten. Ishimine *et al.* (1995) beobachteten die Produktion von anorganischen Stickoxiden (aNO) und damit auch eine Erhöhung der MΦ Aktivität durch *P. carinii* erst, wenn die untersuchten

Peritonealmakrophagen vor der *in vitro* Inkubation mit IFN- γ vorbehandelt worden waren. Diese Steigerung war erst nach mehr als drei Tagen signifikant. Zu dem gleichen Ergebnis kamen verschiedene andere Gruppen in *in vitro* Systemen mit Alveolarmakrophagen aus Ratten (Simonpoli *et al.*, 1996, Downing *et al.*, 1999). Weitere Studien in unserem Labor zeigten anhand der Messungen von aNO, TNF- α und IL-6 ebenfalls keine M Φ -Aktivierung durch *P. carinii* in unbehandelten Ratten-Alveolarmakrophagen (V. Karsten, persönl. Mitt.). Eine fehlende M Φ -Zytokininduktion durch *P. carinii* stellt eine erstaunliche Beobachtung dar, wenn die Tatsache herangezogen wird, daß selbst eine unspezifische Phagozytose von Latexpartikeln durch humane Monozyten eine Induktion von IL-12 bewirken kann (Fulton *et al.*, 1996). Dies könnte darauf hindeuten, daß *P. carinii*, wie andere Pathogene auch, Mechanismen zur Verhinderung einer Auslösung proinflammatorischer Prozesse besitzt. Ähnliche Strategien sind von Sibley *et al.* (1988) am Beispiel von *Mycobacterium leprae* gezeigt worden. In diesem Fall senkt ein Zellwandbestandteil dieser Bakterien, Lipoarabinomannan, die Reaktionsfähigkeit von M Φ gegen die aktivierende Wirkung von IFN- γ und verhindert somit zytotoxische Effekte. Ob diese Mechanismen auch bei *P. carinii* eine Rolle spielen, bleibt zu untersuchen.

Im Gegensatz zu *P. carinii*-Organismen induzierten *L. monocytogenes* die Produktion von TNF- α und IL-12. Die Gründe für diesen Unterschied konnten bislang noch nicht geklärt werden, da die Mechanismen, die nach dem Erregerkontakt eine Zytokinproduktion in M Φ auslösen, noch weitgehend unbekannt sind. Einige Arbeitsgruppen messen dem Prozeß der Listeriolysin-O-vermittelten Evasion aus dem Phagolysosom und dem Übergang der Erreger in das Zytoplasma eine Bedeutung bei der *L. monocytogenes*-vermittelten Induktion von M Φ -Zytokinen bei. So beschrieben Kuhn und Goebel (1994), daß nur hämolytische *Listeria*-Stämme, welche die Möglichkeit besitzen, aus dem Phagolysosom heraus in das Zytoplasma entfliehen zu können, IL-1 β , IL-6 und TNF- α mRNA in der humanen M Φ Zelllinie P338D₁ induzieren konnten. Andere Arbeitsgruppen berichteten hingegen, daß die Zytokinproduktion, die durch *L. monocytogenes* in Knochenmarkkultur- oder Milzmakrophagen hervorgerufen wurde, alleine durch die Bindung an die Oberfläche der Zellen ausgelöst wird. So beobachteten Demuth *et al.* (1996) die Expression von Zytokin-mRNA in mit lebenden *L. monocytogenes* (*vLm*) inkubierten Knochenmarkmakrophagen auch dann, wenn die Bewegungen des Zytoskeletts der Zellen und damit die Phagozytose der Erreger durch den Einsatz von Cytochalasin D inhibiert wurde. Darüber hinaus spricht die Tatsache, daß

hitzegetötete *L. monocytogenes* in der Lage sind *in vitro* Zytokine in MΦ auszulösen, für Evasions-unabhängig vermittelte Mechanismen der Zytokininduktion.

Obwohl sich extrazelluläre *P. carinii*-Organismen und fakultativ intrazelluläre *L. monocytogenes* in ihrer Biologie deutlich unterscheiden, so konnte mit der Verwendung von *hkLm* in den Versuchen sichergestellt werden, daß beide Organismen nur von MΦ phagozytiert und dann abgebaut werden; eine aktiv durch *L. monocytogenes* vermittelte Evasion aus dem Phagolysosom und dadurch ausgelöste Effekte konnten somit ausgeschlossen werden. Die unterschiedlichen Beobachtungen hinsichtlich der erregervermittelten Induktion von MΦ-Zytokinen können somit nur durch eventuell verschiedene Mechanismen des MΦ-Kontaktes und durch unterschiedliche die Bindung und Phagozytose vermittelnden Rezeptoren erklärt werden. Über deren Auswirkungen auf die Zytokinproduktion von MΦ ist jedoch erst wenig bekannt.

In dem in dieser Arbeit verwendeten *in vitro* System wird zwei Rezeptortypen auf MΦ eine Rolle bei der Bindung an *L. monocytogenes* zugesprochen. Zum einen wurde beschrieben, daß Listerien nach Komplement-Opsonisierung durch die Wirkung des Komplement-Rezeptors 3 (complement receptor type 3, CR3) von MΦ aufgenommen werden (Croize *et al.*, 1993, Drevets *et al.*, 1993). Die CR3-vermittelte Auslösung der Phagozytose führte dann zu einer erhöhten intrazellulären Zytotoxizität gegenüber *L. monocytogenes*. Es wurden jedoch keine direkten Aussagen über eine CR3-vermittelte Induktion von Zytokinen gemacht.

Darüber hinaus wird eine Phagozytose durch Scavenger Rezeptoren (SR) vermittelt, die an bakterielle Lipoteichonsäuren binden (Dunne *et al.*, 1994). Hauf *et al.* (1997) berichten, daß die Lipoteichonsäure-vermittelte Bindung von *L. monocytogenes* an SR der humanen MΦ-Zelllinie P388 den Transkriptionsfaktor NF-kappaB aktiviert. Diese Aktivierung könnte die Bildung von MΦ-Zytokinen verstärken, da NF-κB teilweise die Genexpression von TNF-α kontrolliert (Siebenlist *et al.*, 1994).

Neben der möglichen Aufnahme von mit Komplementfaktoren opsonisierten *P. carinii*-Organismen über CR3 ist bekannt, daß der Mannose Rezeptor (MR) auf Alveolar-MΦ die Phagozytose von nicht opsonisierten *P. carinii* vermittelt. Diese Bindung führte zu einer Aktivierung von MΦ mit verstärkter Produktion von zytotoxisch wirkenden reaktiven

Sauerstoffintermediaten (Ezekowitz *et al.*, 1991), beeinflusste jedoch nicht die Freisetzung von TNF- α (Hoffman *et al.*, 1993).

Weiterhin wird, zumindest in den Alveolarräumen, die Bindung von *P. carinii* über das als Brückenmolekül dienende Fibronectin und den Fibronectin Rezeptor auf M Φ vermittelt. Eine Phagozytose konnte *in vitro* jedoch nur durch zusätzliche opsonisierende anti-*P. carinii*-Antikörper ausgelöst werden und führte zu keiner Aktivierung der M Φ (von Behren & Pesanti, 1978).

In einem Modell mit Alveolar-M Φ aus der Ratte beobachteten Hoffman *et al.* (1993) die Induktion von TNF- α durch Inkubation mit *P. carinii*. Diese Zytokinproduktion wurde durch eine Bindung von β -Glukanen auf der Oberfläche von *P. carinii* und einem dazugehörigen Rezeptor auf M Φ vermittelt, da die Induktion durch kompetitives β -Glukan oder β -Glukan-Antagonisten inhibiert werden konnte. Ob die Tatsache, daß sich die Rezeptoren auf M Φ , die eine Bindung oder Phagozytose von *L. monocytogenes* oder *P. carinii* vermitteln, unterscheiden, für die divergierende Reaktion auf diese Erreger verantwortlich sein könnte, bleibt zu untersuchen.

Während Listerien sich nach der Infektion nur innerhalb der Zellen aufhalten, handelt es sich bei *P. carinii* um einen extrazellulären Organismus. In der Literatur ist die Bedeutung der intrazellulären Lebensweise von *L. monocytogenes* für die Auslösung von Zytokinen in M Φ umstritten: Ein Punkt, der gegen Unterschiede der IFN- γ Induktion aufgrund einer verschiedenen Lebensweise spricht wird in einer Publikation von Kaye und Bancroft (1992) deutlich. Sie berichten von Versuchen mit *Leishmania donovani*, welcher nach *in vitro* Inkubation mit SCID GMZ weder TNF- α noch IFN- γ induzierte, obwohl es sich bei diesem Erreger um einen intrazellulären Parasiten handelt. Auch ein anderer intrazellulärer Organismus, *Mycobacterium bovis* BCG, induziert im Gegensatz zu *L. monocytogenes* IL-12 in isolierten M Φ nicht direkt, sondern nur, wenn diese vorher durch rekombinantes IFN- γ aktiviert worden waren (Flesch & Kaufmann, 1995). Dahingegen sind extrazelluläre Streptokokken der Gruppe B, bekapselt oder unbekapselt, in der Lage, sowohl IFN- γ in SCID GMZ, als auch IL-12 und TNF- α in isolierten M Φ zu induzieren (Derrico & Goodrum, 1996). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine eindeutige Unterscheidung der Wirtsreaktionen gegen intra- oder extrazelluläre Pathogene, obwohl sich die Wichtigkeit der Effektorfunktionen (z.B.

Induktion einer B Zell-Antwort gegen extrazelluläre Organismen) je nach Art des Erregers verlagern können.

Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen berichtet, daß sich die *in vivo* Reaktionen des Wirtes auf einen Stimulus durch lebende oder tote Erreger unterscheiden können. So berichten Zhan & Cheers (1998), daß *hkLm* im Gegensatz zu *vLm in vivo* kein IL-12 induzieren konnten. Um zu überprüfen, ob *hkLm* und *vLm* Unterschiede bei der *in vitro* Induktion von IFN- γ in GMZ zeigen, wurden die Versuche, die mit *hkLm* im Vergleich zu lebenden *P. carinii* durchgeführt wurden, mit *vLm* wiederholt. In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Versuchen konnte tendenziell kein Unterschied zwischen lebenden und abgetöteten Listerien beobachtet werden. Allerdings wurden leicht höhere IFN- γ -Konzentrationen durch *vLm* induziert als durch *hkLm*. Ähnliches wurde von Zhan & Cheers (1995) berichtet. Sie beobachteten, daß lebende Organismen *in vitro* (eingesetzt wurden *Listeria spp.* und *Brucella spp.*) höhere Konzentrationen an TNF- α in murinen Milz-M Φ induzieren konnten als getötete.

2. Das murine F4/80 Antigen

Die Ergebnisse der funktionellen Versuche zeigten, daß eine räumliche Trennung von M Φ und NK Zellen zu einer abgeschwächten oder sogar fehlenden Erreger-abhängigen Aktivierung dieser Zellen führte. Diese Daten führten zu der Hypothese, daß zellständige Rezeptoren an den Prozessen der Erreger-induzierten Aktivierung von NK Zellen beteiligt sein könnten. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden GMZ während der Aktivierung in Gegenwart von Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle von M Φ inkubiert und beobachtet, ob sich die Freisetzung von IFN- γ in Anwesenheit der Antikörper änderte. Eventuell in den Antikörperpräparationen enthaltene Konservierungsmittel wie Natrium-Azid wurden vor der Verwendung der Antikörper durch Zentrifugations-Dialyse entfernt, um die Viabilität und damit die Funktionalität der Zellen nicht zu beeinflussen.

Die verwendeten Antikörper waren gegen ein Spektrum von M Φ -Antigenen gerichtet, die entweder eine Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen spielen oder kostimulatorische Funktionen besitzen. Das CD11a/CD18 (LFA-1) Antigen wird auf allen Leukozyten exprimiert und

reguliert sowohl die homotypische als auch die heterotypische interzelluläre Adhäsion (zusammengefaßt in Springer *et al.*, 1987). Von dem verwendeten anti-CD11a Antikörper des Klones M17/4 ist bekannt, daß er in der Lage ist, die Zell-zu-Zell Adhäsion zu blockieren und dadurch unter anderem die Antigen-abhängige (T-Zell-vermittelte) und Antigen-unabhängige (NK Zell-vermittelte) Zytolyse zu verhindern (Sanchez-Madrid *et al.*, 1982). Das CD11b/CD18 (Mac-1) Antigen wird unter anderem auf M Φ , NK Zellen und Granulozyten exprimiert (Springer *et al.*, 1979, Holmberg *et al.*, 1981). Der verwendete Antikörperklon M1/70 verhindert Zelladhäsion und die Bindung des Komplementfaktors C3bi an CR3, jedoch keine zellmedierte Lysis (Springer *et al.*, 1982, Beller *et al.*, 1982, Sanchez-Madrid *et al.*, 1983).

Das CD54 (ICAM-1) Antigen ist ein Ligand für sowohl LFA-1 als auch Mac-1 (Staunton *et al.*, 1988, Diamond *et al.*, 1990). Der Effekt einer möglichen Bindung an diese Antigene konnte daher durch Verwendung von mAk gegen ICAM-1 zusätzlich geprüft werden. Die B7 Moleküle (CD80, CD86) dienen als Kostimulatoren der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten. Innerhalb der unspezifischen Abwehr ist außerdem bekannt, daß NK Zell-regulierte Zytotoxizität durch Bindung an CD80 verstärkt werden kann (Chambers *et al.*, 1996). Der verwendete Antikörper gegen CD86 inhibiert die Stimulation von T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (Hathcock *et al.*, 1993).

In den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte keiner der genannten Antikörper einen Einfluß auf die Produktion von IFN- γ , weder nach Induktion mit *L. monocytogenes*, noch mit *P. carinii*. Ein gegen die für die Antigenpräsentation an T-Zellen notwendigen MHC Moleküle der Klasse II gerichteter Antikörper zeigte ebenfalls keinen Effekt. Die Inkubation von GMZ und Erregern zusammen mit Antikörpern gegen das murine M Φ -Oberflächenantigen F4/80 führten jedoch zu einer Verringerung der IFN- γ Freisetzung. Um zu prüfen, ob die Wirkung des F4/80 Antikörpers spezifisch oder aufgrund einer unspezifischen Bindung an Fc Rezeptoren auf M Φ zustandekam, wurde ein Kontrollantikörper des gleichen Immunglobulin Subtyps (IgG_{2b}) eingesetzt. Dieser zeigte keinen Effekt auf die Produktion von IFN- γ .

Der verwendete Antikörper (Klon F4/80) wurde von Austyn und Gordon (1981) in Ratten generiert, die mit Thioglykolat-elizitierten Peritonealmakrophagen immunisiert worden

waren. Als einer der ersten M Φ -spezifischen Reagenzien wird dieser Antikörper für die immunhistochemische Identifizierung von Maus M Φ -Populationen in murinen Geweben verwendet (Hume & Gordon, 1985, Gordon *et al.*, 1992). Das F4/80 Antigen, welches mit diesem Antikörper entdeckt wurde, ist ein 160 kDa großes Zelloberflächen Glykoprotein (Austyn & Gordon, 1981, Starkey *et al.*, 1987), welches auf den meisten Gewebsmakrophagen-Populationen exprimiert wird. Darunter sind die Kupffer Zellen der Leber, Milzmakrophagen der roten Pulpa, Mikroglia des Gehirns, M Φ der Lamina propria des Darms und die Langerhans Zellen der Haut (Hume & Gordon, 1985, Gordon *et al.*, 1992, McKnight & Gordon, 1996). Das F4/80 Molekül wird nicht exprimiert auf der Vorläuferzelle von M Φ und PMN (Hirsch *et al.*, 1981). Höchste Expressionsraten lagen im Knochenmark, in Milz, Lymphknoten, Leber, Nieren und im Gastrointestinaltrakt vor (Lee *et al.*, 1985). Der F4/80 Antikörper reagiert nicht mit anderen Leukozyten wie reifen Dendritischen Zellen oder aus Monozyten differenzierten Osteoklasten oder nicht hämatopoetischen Zelltypen. M Φ in den T-Zell Bereichen der Milz (weiße Pulpa), Lymphknoten (Parakortex) und in den Peyerschen Plaques sind immer F4/80 negativ. Dort können M Φ nur mit anderen spezifischen Antikörpern, wie gegen Makrosialin, nachgewiesen werden (Rabinowitz & Gordon, 1991).

Obwohl molekularbiologisch und biochemisch gut untersucht, konnte dem F4/80 Molekül bislang keine Funktion oder physiologische Rolle zugeordnet werden. Es wird jedoch spekuliert, daß das Antigen adhärenzvermittelnd wirken könnte. Dieser Hypothese liegen mehrere Beobachtungen zugrunde: Zum einen spricht die Tatsache, daß im Blut zirkulierende Monozyten nur wenig F4/80 exprimieren, Gewebsmakrophagen jedoch stark F4/80 positiv sind, für eine mögliche Rolle bei der Ausbildung einer Zelladhärenz (Nussenzweig *et al.*, 1981). Des weiteren verlieren F4/80-positive Langerhans Zellen der Haut das Molekül von ihrer Oberfläche sobald sie nach einem Kontakt mit einem Fremdanigen in die drainierenden Lymphknoten migrieren (Hume *et al.*, 1983). Auch nach Differenzierung dieser Zellen in interdigitierende Zellen in den T-Zell Bereichen sekundärer lymphatischer Organe ist das Antigen nicht nachweisbar.

Antikörper-vermittelte Effekte auf die Produktion von Zytokinen sind seit langer Zeit bekannt. So wurde beschrieben, daß die Bindung von mAk gegen CD2 und CD3 Strukturen Signale induziert, die zu einer T-Zell Proliferation und erhöhten Zytokinsekretion führen (Hünig *et al.*, 1987). Die hier beschriebene verminderte Freisetzung von IFN- γ in

erregerstimulierten GMZ nach Zugabe des anti-F4/80 Antikörpers könnte vielfältige Ursachen haben. Zum einen könnte die unspezifische Bindung an Fc-Rezeptoren den beobachteten Effekt bewirken. So wurde von Sutterwala *et al.* (1997) beobachtet, daß die Bindung von M Φ Fc γ -Rezeptoren die Lipopolysaccharid-induzierte Freisetzung von IL-12 selektiv inhibierte. In einer weiteren Publikation (1998) wurde von der gleichen Arbeitsgruppe gezeigt, daß die Bindung an Fc γ R die Produktion von IL-10 verstärkte. Die Erhöhung der IL-10 Produktion führte dann zu einer verminderten Freisetzung von IL-12. Da ebenfalls bekannt ist, daß IL-10 mit der Hemmung von IL-12 auch die Produktion von IFN- γ sowohl im Human- (D'Andrea *et al.*, 1993) als auch im Mausmodell (Kelly & Bancroft, 1996) hemmen kann, wurden in der vorliegenden Arbeit Dosis-Wirkungs-Kinetiken des Antikörpers auf die erregerinduzierte Produktion von IL-10 und anderen in diesem Zusammenhang wichtigen Mediatoren durchgeführt. Die Freisetzung von IL-10 wurde durch die Zugabe des anti-F4/80 Antikörpers verstärkt. Allerdings wurde die IL-10 Produktion auch durch die parallel verwendete Isotyp-Kontrolle erhöht. Diese Daten sprachen für eine unspezifische Wirkung des Antikörpers.

Zur näheren Untersuchung dieses Effektes wurden drei verschiedene experimentelle Ansätze gewählt: Nach enzymatischer Spaltung des F4/80 Antikörpers wurden die für eine spezifische Wirkung verantwortlichen Fab-Fragmente mit den für eine Bindung an unspezifische Rezeptoren verantwortlichen Fc-Fragmenten verglichen. Die Herabregulierung von IFN- γ , TNF- α und IL-12 erfolgt aufgrund einer spezifischen Wirkung des Antikörpers, da die Fab-Fragmente des Antikörpers für diesen Effekt alleine ausreichen. Diese Wirkung wird jedoch unterstützt durch unspezifische Mechanismen des Antikörpers; der Einsatz der Fc-Fragmente zeigte eine Heraufregulation von IL-10 und eine gleichzeitige, wenn auch schwache, Abnahme der IFN- γ , TNF- α und IL-12 Freisetzung. Zur Überprüfung dieser Aussage wurde daraufhin jedes in dem *in vitro* Inkubationssystem freigesetzte IL-10 durch den Einsatz von spezifischen Ratte anti-Maus IL-10 Antikörpern (Klon JES5-2A5) neutralisiert. Die Neutralisierung von IL-10 mit monoklonalen Antikörpern ist eine gebräuchliche Methode und kann selbst *in vivo* durchgeführt werden (Wagner *et al.*, 1994). Ohne die inhibitorischen Einflüsse von IL-10 läßt sich auf diese Weise der Effekt des F4/80 Antikörpers auf hkLm-stimulierte GMZ untersuchen. Es konnte gezeigt werden, daß der Einsatz des anti-F4/80 Antikörpers auch in Abwesenheit von IL-10 eine Herabregulation von erregerinduziertem IFN- γ , TNF- α und IL-12 bewirkt. Ein dritter Versuchsansatz diente der zusätzlichen Kontrolle der Ergebnisse. GMZ der SCID Maus wurden in Anwesenheit von Antikörpern

gegen CD16 und CD32 mit *hkLm* stimuliert. Diese Antikörper (Klon 2.4G2) reagieren spezifisch mit einem gemeinsamen Epitop der extrazellulären Domänen der murinen Fc γ III- und Fc γ II-Rezeptoren (Unkeless, 1979, Ravetch *et al.*, 1986). Durch diese Bindung wird *in vivo* und *in vitro* jede unspezifische Bindung von anderen im Inkubationssystem enthaltenen Antikörpern blockiert (Kurlander *et al.*, 1984, Titus *et al.*, 1984, Perussia *et al.*, 1989). Die nachträgliche Zugabe von anti F4/80 Antikörpern zeigte auch ohne Bindung an Fc-Rezeptoren die inhibitorische Wirkung auf IFN- γ . Diese durch drei unabhängige Experimente gewonnenen Daten zeigten, daß die Wirkung des anti-F4/80 Antikörpers spezifisch ist.

Die Wirkung von anti-F4/80 mAk auf erregersstimulierte GMZ wurden auch mit Hilfe der RT-PCR untersucht. Hierbei zeigte sich, daß die IFN- γ -Inhibition auf prätranskriptionaler Ebene stattfindet. Die mRNA Expression von TNF- α und IL-12 wurde ebenfalls inhibiert, wohingegen IL-1 β und IL-10 verstärkt und die mRNA Expression von iNOS nicht verändert wurde. Kokulturen in Anwesenheit von anti-F4/80 Fab zeigten eine ähnliche Inhibition der IFN- γ , IL-12 und TNF- α Expression, wohingegen IL-1 β , IL-10 und iNOS nicht moduliert wurden. Somit konnte auch auf mRNA Ebene gezeigt werden, daß die Zytokininhibition durch den Antikörper gegen F4/80 spezifisch ist.

Die beobachtete verminderte Freisetzung von IFN- γ hätte durch einen weiteren Antikörper-abhängigen Mechanismus erzielt werden können: Geissler *et al.* (1990) berichteten von einem gegen die Struktur des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 gerichteten mAk, der die Produktion von TNF- α inhibierte. Sie fanden heraus, daß die Bindung des Antikörpers ein negatives Signal in die Zelle induzierte, welches für eine verminderte Transkription von TNF- α RNA verantwortlich war. Es wäre daher ebenso denkbar gewesen, daß auch der anti-F4/80 Antikörper nach der spezifischen Bindung an sein Antigen eine direkte Signaltransduktion in M Φ auslöste, die dann zu einer verminderten Produktion von IFN- γ induzierenden Faktoren geführt hätte. Diese Möglichkeit wurde geprüft, indem isolierte M Φ mit *hkLm* inkubiert wurden und der Effekt von anti-F4/80 Antikörpern auf die erregersinduzierte Freisetzung von TNF- α und IL-12 beobachtet wurde. Die Zugabe des Antikörpers hatte keine inhibierende Wirkung auf die Produktion von M Φ -Zytokinen. Durch diese Beobachtung konnte außerdem nachgewiesen werden, daß der Antikörper nicht die Anheftung oder die Phagozytose der Erreger blockiert und dadurch eine verringerte Immunantwort provoziert.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, welche Wirkung der Antikörper auf stimulierte NK Zellen ausübt. So wurden isolierte NK Zellen entweder mit rekombinanten M Φ Zytokinen (jeweils 70 E/ ml TNF- α und IL-12) oder mit dem Überstand von mit *hkLm* inkubierten M Φ zu einer Produktion von IFN- γ stimuliert. Während der Inkubation zu den NK Zellen gegebene anti F4/80 Antikörper hatten keine inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung von IFN- γ . Diese Ergebnisse zeigten zum einen, daß die inhibierende Wirkung des anti-F4/80 Antikörpers auf die Produktion von IFN- γ nicht durch die Verminderung der Produktion von TNF- α und IL-12 zustandekommt. Zum zweiten ist dieser Effekt auch nicht in einer verminderten Sensitivität der NK Zellen gegen TNF- α und IL-12 begründet.

Eine ganze Reihe von Antikörpern ist bekannt, die, durch die Blockierung einer Adhärenz an andere Zellen verursacht, verschiedene Leukozytenfunktionen unterdrücken können. So wurde beschrieben, daß eine Blockade durch Antikörper gegen die Adhäsionsmoleküle LFA-1 (CD11a/CD18) und ICAM-1 (CD54) eine verminderte Zytotoxizität oder Proliferation von T Lymphozyten nach sich zog (Davignon *et al.*, 1981, Inaba & Steinman, 1987, Boyd *et al.*, 1988, Patarroyo *et al.*, 1989). Es wird angenommen, daß auch das F4/80 Molekül adhärenzvermittelnd wirkt, unter anderem deshalb, weil eine häufig bei Liganden von Adhäsionsmolekülen beobachtete Arginin-Glycin-Aspartat (RGD-) Sequenz in der extrazellulären Domäne des F4/80 Moleküls beobachtet wurde (Haidl & Jefferies, 1996). So bestünde die dritte Möglichkeit der Wirkung des anti-F4/80 Antikörpers in der Blockierung einer Rezeptor-Liganden Kopplung. Für diese Theorie spricht, daß der Antikörper seinen spezifischen inhibitorischen Effekt nur zeigt, wenn M Φ und NK Zellen zusammen, mit der Möglichkeit eines direkten Zell-Zell-Kontaktes, inkubiert wurden.

Diese Hypothese würde einen neuen Mechanismus der IFN- γ Induktion während der unspezifischen zellulären Abwehr darstellen: Die Produktion von IFN- γ wird bei Erregern wie *L. monocytogenes* sowohl über die direkte Stimulation der Freisetzung von TNF- α und IL-12 ausgelöst, ein Zell-Zell-Kontakt verstärkt die Induktion mittels membranständiger Moleküle wie F4/80. Nach Inkubation mit Erregern wie *P. carinii* ist die Induktion der IFN- γ Freisetzung einzig über den direkten Zell-Zell-Kontakt möglich. Anschließend an das Signal zur IFN- γ Freisetzung kommt es bei beiden Erregertypen zwischen M Φ und NK Zellen zu einem gegenseitigen Austausch von Zytokinen, um den Aktivierungszustand beider Zellpopulationen zu erhöhen.

Durch den Einsatz von F4/80-gendeletierten („Knock-out“) Mäusen konnte in dieser Arbeit ein erster Hinweis erbracht werden, daß das Fehlen dieses Moleküls zu einer verminderten IFN- γ Freisetzung führt: Nach Inkubation von GMZ aus F4/80-gendeletierten Mäusen mit *hkLm* wurde deutlich weniger IFN- γ gebildet als in Milzzellen von Mäusen des Wildtypstammes. Diese Ergebnisse könnten somit die nach den Blockierungsversuchen mit mAk gegen F4/80 aufgestellte Hypothese verifizieren, daß die Inhibition des F4/80 Antigens auf M Φ die IFN- γ Induktion in NK Zellen vermindert. Allerdings konnten aufgrund von Problemen bei der Zucht der gendeletierten Mäuse bislang erst wenige Versuche unternommen werden. Unabhängig von den hier beschriebenen Experimenten wurden jedoch auch von anderen Arbeitsgruppen vergleichbare Untersuchungen durchgeführt. Die Ergebnisse entsprachen den hier vorgestellten Resultaten (M. Mielke, persönl. Mitt.). Darüber hinaus fehlen weiterführende Daten, die helfen könnten, eine physiologische Relevanz der F4/80-vermittelten Interaktion aufzuklären. So könnte überprüft werden, ob eine durch das Fehlen des F4/80 Antigens verminderte IFN- γ Produktion auch die Stärke der MHC-II Expression und damit die Stärke der M Φ Aktivierung beeinflußt. Im Gegensatz zu den Versuchen mit den F4/80 KO Mäusen erbrachte die Änderung der Expression von F4/80 auf einer M Φ Zelllinie keine Unterschiede in der IFN- γ Freisetzung nach Stimulation mit *L. monocytogenes*.

Wie in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Durchflußzytometrie gezeigt werden konnte, ist das F4/80 Antigen konstitutiv auf Milzmakrophagen exprimiert: Ca. 20 % der naiven Milzzellen tragen dieses Molekül. Die konstitutive Expression könnte darauf hindeuten, daß dieses Molekül einen Mechanismus reguliert, der für eine schnelle Reaktion eine frühe Anwesenheit dieses Antigens benötigt. Nach Injektion mit 1×10^4 lebenden *L. monocytogenes* Organismen wurde während der ersten sechs Stunden die Expression des F4/80 Antigens auf M Φ um ein Drittel erhöht. Anschließend wurde das Antigen wieder bis auf das Niveau der konstitutiven Expression herabreguliert. Dies könnte bedeuten, daß zu einem späteren Zeitpunkt nach Auslösen einer Signalkette andere Mechanismen (M Φ -Zytokine) die Wirkung des Antigens ersetzen. Hierfür spricht auch die Beobachtung, daß eine Zugabe von blockierenden mAk gegen F4/80 zu einem späteren Zeitpunkt als vier Stunden nach Infektion keinen inhibitorischen Effekt auf die Bildung von IFN- γ mehr bewirkte. Die für die *in vivo* Versuche verwendete Infektionsdosis war subletal und entsprach der halben Letalitätsdosis (Bhardwaj *et al.*, 1998).

In vitro wurde nach Koinkubation von SCID GMZ mit *L. monocytogenes* eine schwache, aber kontinuierliche Herabregulierung des Antigens festgestellt. In anderen Erregermodellen konnte gezeigt werden, daß das F4/80 Molekül auf antigenstimulierten M Φ herabreguliert wird. So beobachteten Ezekowitz *et al.* (1981, Ezekowitz & Gordon, 1982), daß BCG aktivierte Peritonealmakrophagen eine um ca. 50% geringere F4/80 Expression aufwiesen als residente M Φ . Da sich sowohl die Erreger, als auch die M Φ , als auch der verwendete Mausstamm in den Modellen unterscheiden, können die Ergebnisse nur unzureichend miteinander verglichen werden; andere Arbeiten zu diesem Thema existieren nicht.

Eine Aktivierung von M Φ wurde sowohl nach *in vivo* als auch *in vitro* Inkubation durchflußzytometrisch anhand der verstärkten Expression von MHC Molekülen der Klasse II bestätigt. Laut Smith und Ault (1981) ist IFN- γ der wichtigste physiologische Induktor für eine Hochregulation von MHC-II Antigenen. Beller *et al.* (1980) stellten als erste eine IFN- γ abhängige verstärkte MHC-II Expression *in vivo* fest, Steinmann *et al.* (1980) konnten dies *in vitro* beobachten. Nibbering *et al.* (1990) zeigten bei Mäusen nach 18 Stunden eine Verstärkung der MHC-II Expression auf M Φ nach intraperitonealer Injektion mit IFN- γ . Im vorliegenden Falle wurde die Freisetzung von IFN- γ durch die Stimulation mit dem jeweiligen Erregertyp induziert. Somit diente der Nachweis der verstärkten MHC-II Expression zum einen der Prüfung der M Φ Aktivierung, zum anderen dem Nachweis der Produktion von IFN- γ und damit der Initiierung der unspezifischen zellulären Infektabwehr.

Die Expressionsstärke von F4/80 scheint jedoch eine eher untergeordnete Bedeutung auf die Induktion von IFN- γ in NK Zellen zu haben: Im Überstand von Kokulturen aus NK Zellen und M Φ , welche nach Transfektion mit F4/80 cDNA das F4/80 Antigen überexprimierten, konnten keine erhöhten IFN- γ Konzentrationen gemessen werden als in Kulturen aus NK Zellen und dem M Φ -Wildtyp.

Die vorliegenden Daten sprechen dafür, daß membranständige Mechanismen während der M Φ -Aktivierung durch IFN- γ eine Rolle spielen. Dieser Nachweis wurde zuerst anhand der Wirkung von Antikörpern gegen ein M Φ -gebundenes Molekül, F4/80, geführt. Mit Hilfe gentechnisch veränderter Tiere wurde dann *in vitro* festgestellt, daß in der Abwesenheit des Antigens F4/80 weitaus weniger durch hk*Lm* induziertes IFN- γ gebildet wurde. Es wurde die Frage gestellt, ob ein Testsystem etabliert werden könnte, das es erlaubt, andere in diesem

Zusammenhang möglicherweise wirksame Antigene nachweisen zu können. Um dieser Frage nachzugehen, wurde entschieden, blockierende Antikörper zu generieren, mit deren Hilfe später auf die Funktion des jeweiligen Antigens rückgeschlossen werden konnte.

Es wurden drei der neu generierten mAk genauer untersucht. Ein Klon, 6E1, wurde aufgereinigt und zeigte auch in Abwesenheit unspezifischer Serumproteine einen IFN- γ -inhibitorischen Effekt. Wie auch mAk gegen F4/80 hatte der gegen ein auf NK Zellen exprimiertes Antigen gerichtete mAk 6E1 weder einen Einfluß auf die Sensitivität von NK Zellen gegen IL-12 und TNF- α , noch wurde die Produktion von IFN- γ aufgrund einer durch die direkte Interaktion mit seinem Zielantigen vermittelte Wirkung inhibiert. Die Inhibition der IFN- γ Bildung zeigte sich nur in Anwesenheit von sowohl M Φ als auch NK Zellen. Diese Daten weisen darauf hin, daß, neben F4/80, auch weitere zellständige Antigene an den Interaktionen zwischen M Φ und NK Zellen zur Induktion von erregerestimuliertem IFN- γ beteiligt sein könnten.

In Zusammenfassung zeigen die Ergebnisse, daß, neben dem Zytokin-vermittelten Weg zur Induktion von NK Zell-IFN- γ , zumindest *in vitro* ein weiterer Mechanismus existiert, der über membranständige Rezeptoren sowohl auf M Φ als auch auf NK Zellen verläuft. Die Bedeutung des jeweiligen Weges ist, in Abhängigkeit des verwendeten Erregers, unterschiedlich relevant.

Wie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die unspezifische zelluläre Immunität ein eigenständiges und potentes Abwehrsystem. Allerdings können Infektionen oft nur durch die nachgeschalteten Mechanismen der antigenspezifischen Immunabwehr erfolgreich bekämpft werden. Gerade diese fehlen jedoch bei angeborenen oder durch Erreger ausgelösten Immundefizienzen. Induzierte Immunsuppressionen sind darüber hinaus aufgrund von Chemotherapie oder ansteigender Zahlen von Transplantationen inzwischen ein bedeutendes Problemfeld innerhalb der modernen Medizin. Die Erforschung unspezifischer Mechanismen während einer Immundefizienz ist ein Schritt auf dem Weg zur Entwicklung adjuvanter Therapieansätze und könnte somit helfen, die Situation der betroffenen Patienten zu verbessern.