

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aktivierung von Makrophagen (M Φ) durch Interferon (IFN-) γ ist ein bedeutender Abschnitt der zellulären Immunreaktion auf Erreger. Die Mechanismen der *in vitro* Induktion der IFN- γ Produktion durch Mikroorganismen sind Thema der vorliegenden Arbeit. In Abwesenheit von T-Lymphozyten wird die Bildung von IFN- γ durch zytokinvermittelte Interaktionen zwischen M Φ und Natürlichen Killer (NK) Zellen initiiert. Allerdings wurde beobachtet, daß a) die IFN- γ Produktion abgeschwächt ist, wenn ein Membrankontakt zwischen M Φ und NK Zellen fehlt und b) in manchen Erregermodellen eine enge Nachbarschaft dieser Zellen für eine IFN- γ Produktion sogar unabdingbar ist. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, daß, neben den zytokinvermittelten, auch membranständige Mechanismen an der Induktion von IFN- γ beteiligt sind.

Es wurde untersucht, ob weitere lösliche M Φ -Faktoren an der Induktion der IFN- γ Produktion beteiligt sind. Während der Koinkubation mit entweder *Pneumocystis carinii* oder *Listeria monocytogenes* wurden M Φ in einem Zweikammersystem durch eine für Makromoleküle durchlässige Membran von NK Zellen getrennt. Eine Inkubation mit *P. carinii* induzierte keine Produktion von IFN- γ . Nach einer Inkubation mit *L. monocytogenes* waren geringere IFN- γ Konzentrationen zu beobachten, als in einer Kokultur mit der Möglichkeit eines direkten Membrankontaktes zwischen M Φ und NK Zellen. Die Beteiligung von löslichen, bislang unbekanntem Mediatoren an der durch *P. carinii*-Organismen ausgelösten IFN- γ Induktion konnte demnach ausgeschlossen werden.

Die Rolle von zellständigen Antigenen bei der Induktion der IFN- γ Produktion wurde durch Blockadeversuche mit monoklonalen Antikörpern untersucht. Eine Koinkubation von M Φ , NK Zellen und *L. monocytogenes* oder *P. carinii* in Gegenwart von Antikörpern gegen das F4/80 Molekül führte sowohl auf Ebene der mRNA als auch auf Proteinebene zu einer verringerten Bildung von IFN- γ , IL-12 und TNF- α . Diese Daten wurden dahingehend interpretiert, daß der Antikörper das Antigen blockiert und somit eine Signalübertragung von M Φ zu NK Zellen verhindert.

Die Stärke der F4/80 Expression hat keinen Einfluß auf die Produktion von IFN- γ . Milzzellen von Mäusen hingegen, die aufgrund einer Mutation das F4/80 Antigen nicht exprimieren, konnten nach Inkubation mit *L. monocytogenes* weitaus weniger IFN- γ bilden, als Tiere des Wildtyps.

Die These eines membranabhängigen Signalweges zwischen M Φ und NK Zellen zur Induktion von IFN- γ wurde dadurch erhärtet, daß gegen NK Zellen gerichtete monoklonale Antikörper generiert werden konnten, welche eine erregerinduzierte Produktion von IFN- γ inhibierten.

Die Daten dieser Arbeit weisen auf eine interzellulär wirksame Funktion des F4/80-Antigens hin und stellen damit die erste Funktionsbeschreibung dieses Moleküls dar. Weiterhin wird durch diese Arbeit zum ersten Mal eine Beteiligung membrangebundener Antigene an der mikrobiell induzierten IFN- γ Produktion gezeigt. Es wird vermutet, daß ein membranabhängiger Signalweg zwischen M Φ und NK Zellen je nach Typ des Erregers entweder eine essenzielle (*P. carinii*) oder eine zumindest kostimulatorische Rolle (*L. monocytogenes*) besitzt.

SUMMARY

Activation of macrophages (M Φ) by gamma-interferon (IFN- γ) is an important step in cellular immune reactions against microbial pathogens. In the absence of T lymphocytes, production of IFN- γ is initiated by cytokine-dependent interactions between M Φ and natural killer (NK) cells, triggered by the pathogen. We found that a) *Listeria monocytogenes*-triggered release of IFN- γ was significantly reduced when cell contact between M Φ and NK cells was inhibited, and b) Cell contact between M Φ and NK cells was even prerequisite for IFN- γ release when triggered by *Pneumocystis carinii*. This led to the hypothesis that, in addition to cytokine-release, membrane associated mechanisms play a role in inducing NK-dependent IFN- γ . First, we examined whether other soluble M Φ -derived factors contribute to the induction of IFN- γ . Macrophages were incubated with *L. monocytogenes* or *P. carinii* organisms in the same well as purified NK cells but separated by a semipermeable membrane. While *P. carinii* organisms did not trigger any IFN- γ release, *L. monocytogenes* triggered significantly lower amounts of IFN- γ than either pathogen when cell contact was uninhibited. These and other results made it unlikely, that as yet unknown soluble M Φ products played a significant role in this system. Next, we investigated whether known M Φ surface antigens were involved by inhibition experiments with monoclonal antibodies (mAb). Co-incubation of M Φ , NK cells and *L. monocytogenes* or *P. carinii* with mAb against the F4/80 antigen inhibited the production of IFN- γ , interleukin (IL)-12 and tumor necrosis-factor (TNF)- α , both on mRNA and on protein levels. These data were interpreted in that the mAb blocked F4/80, thereby preventing a necessary or accessory signaling between microbe-triggered M Φ and NK cells. The intensity of F4/80 expression on M Φ did not seem to affect IFN- γ release in vitro. In contrast, spleen cells of gene-deleted F4/80 knock-out mice produced much less IFN- γ in the presence of *L. monocytogenes* than spleen cells of wild-type mice. The hypothesis of a membrane-dependent signaling pathway between M Φ and NK cells was affirmed by the development of NK-specific mAb which also inhibited pathogen-triggered, T cell-independent IFN- γ release. Our data suggest an intracellular regulatory role for F4/80. Although widely used as a cell marker, this is the first report on a function for this murine M Φ -specific antigen. Taken together, our work suggests a membrane-associated signaling pathway between M Φ and NK cells. Its relative importance in initiating natural cellular immune response mechanisms depends on the nature of primary microbial stimulus.