

# Sekretion immunregulatorisch wirksamer Zytokine bei der experimentellen murinen visceralen Leishmaniasis

**J. Lehmann, Marie-Luise Lohmann-Matthes, S. Hockertz**

## Einleitung

Noch immer ist das genaue Zusammenspiel der verschiedenen Zellpopulationen und löslichen Mediatoren bei der Immunregulation von Parasiteninfektionen nicht völlig aufgeklärt. Die Leishmaniasis stellt in diesem Zusammenhang ein häufig verwendetes Modellsystem zur Untersuchung von Infektionen mit obligat intrazellulären protozoischen Parasiten dar.

Von näherem Interesse sind hierbei zwei Gruppen von Zytokinen. Einmal solche, die bereits in der Frühphase der Infektion in Erscheinung treten und direkt oder durch die Regulation der spezifischen Immunantwort den Fortgang der Infektion beeinflussen können und auf der anderen Seite jene Zytokine, die in erster Linie für die Regulation und den Pathomechanismus der spezifischen Immunantwort verantwortlich zu sein scheinen. Zur erstgenannten Gruppe zählen Interleukin (IL)-1 (2, 3, 25, 35), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (15, 24, 27, 29, 30) und IL-6 (9, 30).

Unser Anliegen war es, das Verhalten der IL-6- und TNF- $\alpha$ -Sekretion bei der *Leishmania donovani*-Infektion zu untersuchen. Die zunächst im healer-Modell C57Bl/6 erhobenen Daten belegen, daß offenbar auch die *L. donovani*-Infektion mit einem Anstieg der IL-6- und TNF- $\alpha$ -Sekretion verbunden ist.

Zu der oben erwähnten zweiten Gruppe von Zytokinen, die maßgeblich an der Pathogenese der Leishmaniasis beteiligt sind, zählen IL-4 (11, 12, 26) und nach jüngeren Erkenntnissen mit hoher Wahrscheinlichkeit auch IL-10 (6, 7, 12, 19, 20). Da uns lediglich für IL-4 ein entsprechendes Nachweissystem zur Verfügung stand, konnte bisher nur die IL-4-Sekretion bei einer *L. donovani*-Infektion im healer-Modell C57Bl/6 untersucht werden. Auf die Bestimmung der IL-10-Sekretion mußte vorerst verzichtet werden. Es zeigte sich, daß in den ersten drei Infektionswochen ein beachtlicher Anstieg der IL-4-Sekretion stattfand, was mit einer Progression der Erkrankung in dieser Phase korreliert. Im weiteren Infektionsverlauf kam es dann zu einer fast vollständigen Unterdrückung der IL-4-Antwort, die wiederum mit einer erhöhten IFN- $\gamma$ -Sekretionsrate und mit dem Beginn der Ausheilung korrelierte.

## Material und Methoden

### Mäuse und Parasiten

Weibliche C57Bl/6-Mäuse wurden im Alter von 6 bis 8 Wochen von Charles River Wiga, Sulzfeld, BRD bezogen. Zur Tierpassage von *Leishmania donovani* wurden Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) aus der eigenen Zucht verwendet.

Die Isolierung, Kultivierung und Applikation der Parasiten sind bereits früher detailliert beschrieben worden (13). In Kürze die wichtigsten Fakten. Für die Infektion wurden je  $1 \times 10^7$  Promastigote aus der Kultur und  $1 \times 10^7$  Amastigote, die frisch aus einer Baumwollrattenmilz isoliert worden waren, verwendet. Die Mischsuspension aus Promastigoten und Amastigoten wurde in einem Volumen von 0,2 ml pro Maus i. v. injiziert.

### Präparation der Milzzellkulturen

Zum Zeitpunkt Null (nicht infiziert) sowie nach 20, 30 und 60 Tagen post infectionem (p.i.) wurden je fünf Tiere durch Äther getötet, anschließend wurden die Milzen und Lebern unter sterilen Bedingungen entnommen. Vor der Zellpräparation erfolgte eine Massebestimmung der Organe. Die Milzen wurden zerkleinert und mittels eines sterilen Stempels einer Injektionsspritze durch ein Stahlsieb ( $\varnothing$  0,180 mm) gedrückt. Diese Methode schien die Zellausbeute nicht einzuschränken und führte zu einer sauberen Einzelzellsuspension. Anschließend wurden die Zellen dreimal in kaltem RPMI 1640-Medium gewaschen (350 xg) und zuletzt in RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 2 mM L-Gln, 10 mM HEPES-Puffer,  $5 \times 10^{-5}$ M 2-Mercaptoäthanol (2-ME), 60 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub> und 0,01% Aprotinin, aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \times 10^6$ /ml in einem Volumen von 200 µl pro Kavität ausplattiert. Ein Teil des Ansatzes wurde zusätzlich mit 10 µg/ml Concanavalin A (Con A) (Sigma, Deisenhofen, BRD) stimuliert. Die Vitalität der isolierten Zellen betrug mindestens 95% (Trypanblau-Test).

Nach einer Kulturzeit von 72 Std. (37° C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% relative Luftfeuchtigkeit) wurden die Zellen in der Mikrokulturplatte zentrifugiert (3 min bei 300 xg) und anschließend je 100 µl zellfreier Überstand pro Kavität abgesaugt. Die so gewonnenen Kulturüberstände wurden bis zur Zytokinbestimmung bei -20° C gelagert.

### Präparation des Mausserums

Von den gleichen Tieren, aus denen die Organe entnommen worden sind, wurde durch Herzpunktion unter sterilen Bedingungen Blut entnommen. Das so gewonnene Vollblut wurde 1 Std. bei 4° C stehengelassen und anschließend 2 min bei 15.000 xg zentrifugiert. Das Serum wurde abgesaugt, 30 min bei 56° C inaktiviert und anschließend bis zur Zytokinbestimmung bei -20° C gelagert.

### Zelllinien und Zytokinassays

Für die Zytokinbestimmungen kamen folgende Zelllinien zum Einsatz: die IL-2-abhängige Zelllinie CTLL-2 (ATCC), die IL-6-abhängige Zelllinie 7TD1 (31) und F4/4.K6, eine IL-4-abhängige T-Zelllinie (14), die aus einer 15monatigen Langzeitkultur in Gegenwart von murinem rekombinanten (mr) IL-4 kloniert wurde und nur noch suboptimal in Gegenwart von gesättigten Konzentrationen von mrIL-2 proliferierte. Die 7TD1- und die F4/4.K6-Linie wurden uns freundlicherweise von Dr. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Universität Mainz, BRD) zur Verfügung gestellt.

Die Indikatorzellen wurden in Zelldichten von  $1 \times 10^4$  (CTLL-2),  $2,5 \times 10^3$  (7TD1) und  $3 \times 10^4$  Zellen/Kavität (F4/4.K6) in 100 µl Medium mit seriellen Verdünnungen der zu testenden Proben oder der rekombinanten Zytokinstandards bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Testmedium für die IL-2- und IL-6-Bioassays diente RPMI 1640 (Gibco, Eggenstein, BRD), supplementiert mit 10% FCS, 2 mM

L-Gln, 10 mM HEPES-Puffer,  $5 \times 10^{-5}$ M 2-ME, 60 µg/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>. Zur F4/4.K6-Kultivierung und für den IL-4-Bioassay wurde serumfreies CG-Medium<sup>®</sup> (Camon, Wiesbaden, BRD) verwendet.

Die Spezifität der Bioassays wurde mit entsprechenden neutralisierenden Antikörpern (AK) geprüft. Im IL-4-Bioassay wurde die Rest-IL-2-Sensitivität außerdem durch einen neutralisierenden Anti-IL-2-AK blockiert.

Die Auswertung aller Bioassays erfolgte durch eine Modifikation des Mikrokultur-Tetrazolium-Tests (MTT-Methode) nach MOSMANN (17). Pro Kulturkavität wurden 10 µl MTT-Stammlösung (5 mg/ml [Sigma, Deisenhofen, BRD]) zugesetzt, anschließend folgte eine Inkubation für 2 bis 4 Std. bei 37° C. Das Lysieren der Zellen und das Lösen der entstandenen MTT-Formazankristalle erfolgte durch Zugabe von 100 µl Extraktionspuffer (20% SDS w/v in 50% v/v DMF, pH 4,7, Ref. 10). Nach weiteren 20 Std. Inkubation bei 37° C wurde die OD<sub>570</sub> der Proben in einem ELISA-Reader gemessen.

Die Zytokinaktivität der einzelnen Proben wurde entweder graphisch anhand einer Standardbezugskurve oder mit Hilfe entsprechender Software ermittelt.

Die Bestimmung der IFN-γ- und TNF-α-Konzentrationen erfolgte mittels kommerzieller "Sandwich"-ELISA-Kits (Genzyme, Boston bzw. Cambridge, USA).

### Zytokine und Antikörper

Als Zytokinstandards dienten humanes rekombinantes (hr) IL-2, mrlIL-4 und hrIL-6 (Genzyme, Cambridge, USA). Die zur Spezifitätsprüfung verwendeten monoklonalen Antikörper (mAK) S4B6.1 (Anti-Maus-IL-2, Ref. 18) und 11B11 (Anti-Maus-IL-4, Ref. 22) wurden freundlicherweise von Dr. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Universität Mainz, BRD) bereitgestellt. Die IL-6-Spezifität wurde mit einem neutralisierenden polyklonalen Ziege-anti-Maus-IL-6 AK (British Bio-technology, Cowley, Oxford, GB) geprüft.

## Ergebnisse

Kinetik der IL-6-Aktivität über einen Zeitraum von 60 Tagen p. i.

Die spontane IL-6-Aktivität in den Milzzellkulturüberständen stieg während des Infektionsverlaufes permanent an.

Um eine Involvierung von IL-6 in der Pathogenese der viszeralen Leishmaniasis näher untersuchen zu können, sollte zunächst abgeklärt werden, inwieweit sich die Infektion auf die IL-6-Biosynthese der betreffenden Tiere auswirkt. Dazu sollten zwei Parameter bestimmt werden: einmal die IL-6-Sekretion von Milzzellen ex vivo und zum anderen der IL-6-Serumspiegel. Die Milz erschien uns hierbei aus doppelter Hinsicht von Interesse zu sein; sie ist zum einen ein leicht zu präparierendes sekundäres immunologisches Organ und andererseits auch das am stärksten parasitierte Organ, welches auch selbst bei healer-Mausstämmen wie C57Bl/6 für sehr lange Zeit eine Restparasitenlast behält.

Bereits 20 Tage p. i. war ein sechsfacher Anstieg der spontanen in vivo-IL-6-Aktivität in Kulturüberständen von Milzzellen aus infizierten C57Bl/6-Mäusen gegenüber solchen aus nichtinfizierten Kontrolltieren zu verzeichnen. Dieser Anstieg setzte sich kontinuierlich bis zum 60. Tag p. i. fort und erreichte zu diesem Zeitpunkt schließlich das 33fache des Kontrollwertes (Abb. 1A). Spätere Zeitpunkte sind nicht untersucht worden:

Um die potentielle Kapazität der Milzzellen zur IL-6-Synthese zu ermitteln, wurden die Zellen mit 10 µg/ml Con A stimuliert. Dabei fiel auf, daß die Aktivierbarkeit der Milzzellen zum Zeitpunkt 20 Tage p. i. gegenüber den übrigen untersuchten Zeitpunkten eingeschränkt war (Abb. 1A).

Die IL-6-Bestimmung im Serum führte zu keinem nennenswerten Ergebnis, was aber mit großer Wahrscheinlichkeit auf technische Probleme zurückzuführen ist, auf die in der Diskussion eingegangen wird.

Kinetik der TNF- $\alpha$ -Konzentration über einen Zeitraum von 60 Tagen p. i.

Die TNF- $\alpha$ -Konzentration in den Milzzellkulturüberständen war zu allen untersuchten Infektionszeitpunkten erhöht. Im Serum konnte erst 60 Tage p. i. ein erhöhter TNF- $\alpha$ -Titer nachgewiesen werden.

Von verschiedenen Autorengruppen wird TNF- $\alpha$  eine protektive Rolle in der Leishmaniasis zugewiesen, was hauptsächlich durch eine enge Korrelation zwischen dem Auftreten dieses Zytokins und der Ausheilung der Infektion in healer-Mausstämmen sowie durch eine symptomschwächende Wirkung exogener TNF- $\alpha$ -Applikationen bei non-healer-Mausstämmen begründet wird.

Tatsächlich war auch in unserem Testsystem ein Anstieg der TNF- $\alpha$ -Konzentration zu beobachten. Während spontan in den Milzzellüberständen bereits nach 20 Tagen p. i. ein deutlicher Konzentrationsanstieg nachzuweisen war (Abb. 1B), konnte im Serum erst zum Zeitpunkt 60 Tage p. i. ein deutlicher TNF- $\alpha$ -Anstieg ermittelt werden, was wiederum gut mit der begonnenen Ausheilung der Leber korrelierte (Abb. 3C). Interessant war außerdem, daß ähnlich wie bei IL-6 auch die TNF- $\alpha$ -Induzierbarkeit durch Con A in vitro nach 20 Tagen p. i. stark eingeschränkt war (Abb. 1B).

Kinetik der IL-4-Aktivität über einen Zeitraum von 60 Tagen p. i.

Die IL-4-Aktivität in den Milzzellüberständen und im Serum war in der Frühphase der Infektion erhöht.

Es gibt inzwischen deutliche Hinweise darauf, daß eine, durch welche Ursachen auch immer hervorgerufene, übernormale Aktivierung von TH<sub>2</sub>-Zellen und eine damit verbundene Überproduktion von TH<sub>2</sub>-spezifischen Zytokinen, wie IL-4 und IL-10, maßgeblich an der Pathogenese der Leishmaniasis beteiligt sind. Da sich die meisten Autorengruppen mit der kutanen Leishmaniasis (*L. major*) beschäftigten, ist es unser Anliegen, die Bedeutung von IL-4 bei der viszeralen Leishmaniasis näher zu untersuchen. Hierzu wurde zunächst die IL-4-Synthese von Milzzellen ex vivo sowie der IL-4-Serumspiegel über einen Infektionszeitraum von acht Wochen bestimmt.

In den Milzzellkulturüberständen war bis zum 20. Tag p. i. ein starker Anstieg der spontanen IL-4-Aktivität zu beobachten. Bereits am 30. Tag p. i. befand sich der IL-4-Titer wieder im Normalbereich. Auffällig war dabei, daß eine zusätzliche in vitro-Stimulation durch Con A außer bei der Kontrolle nicht möglich war (Abb. 2A). Ähnlich sah das Ergebnis im Serum aus, wo ausschließlich zum Zeitpunkt 20 Tage p. i. IL-4 nachweisbar war (Abb. 3A).

Kinetik der IFN- $\gamma$ -Konzentration über einen Zeitraum von 60 Tagen p. i.

Die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Milzzellüberständen war zu allen untersuchten Infektionszeitpunkten, mit einem Maximum am Tag 30 p. i., erhöht.

Neben TNF- $\alpha$  ist IFN- $\gamma$  maßgeblich für die Makrophagenaktivierung verantwortlich. Das Ausbleiben der Aktivierung ist aller Wahrscheinlichkeit nach die Hauptursache für die Suszeptibilität von non-healer-Mausstämmen wie BALB/c. Aus diesem Grund wurde die IFN- $\gamma$ -Sekretionsleistung von Milzzellen des healer-Stammes C57Bl/6 untersucht. Unser Ergebnis zeigte einen Anstieg der IFN- $\gamma$ -Konzentration bis zum Tag 30 p. i., an dem ein Wert von 239 pg/ml ermittelt wurde. Bis zum Tag 60 p. i. zeigte sich dann ein allmählicher Abfall der IFN- $\gamma$ -Konzentration auf 156 pg/ml. Eine zusätzliche Aktivierung in vitro durch Con A war immer möglich (Abb. 2B).

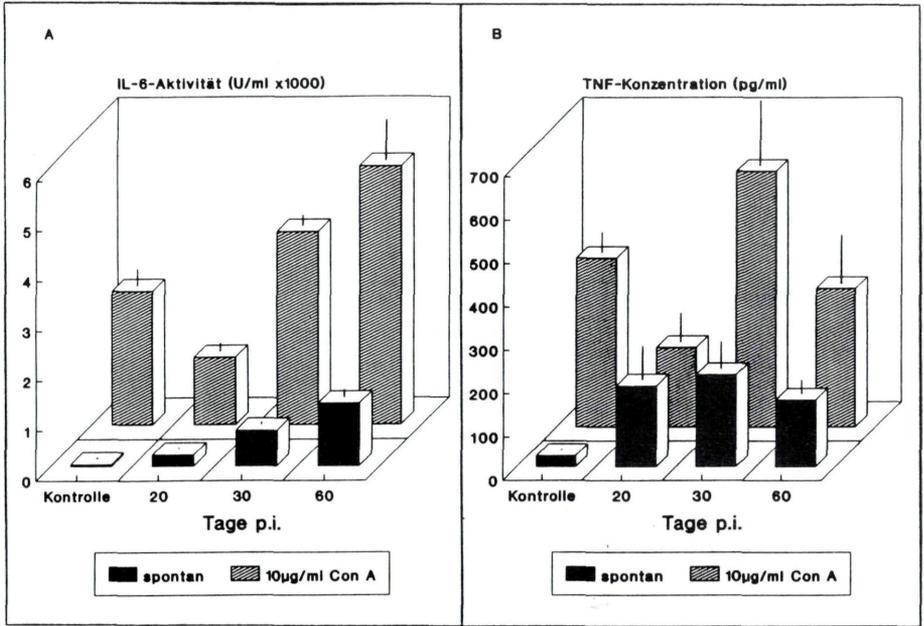


Abb. 1:

Kinetik der IL-6- (A) und TNF- $\alpha$ -Aktivität (B) in Kulturüberständen von Milzzellen *L. donovani*-infizierter C57Bl/6-Mäuse ex vivo, spontan und nach Stimulation mit 10 µg/ml Con A.

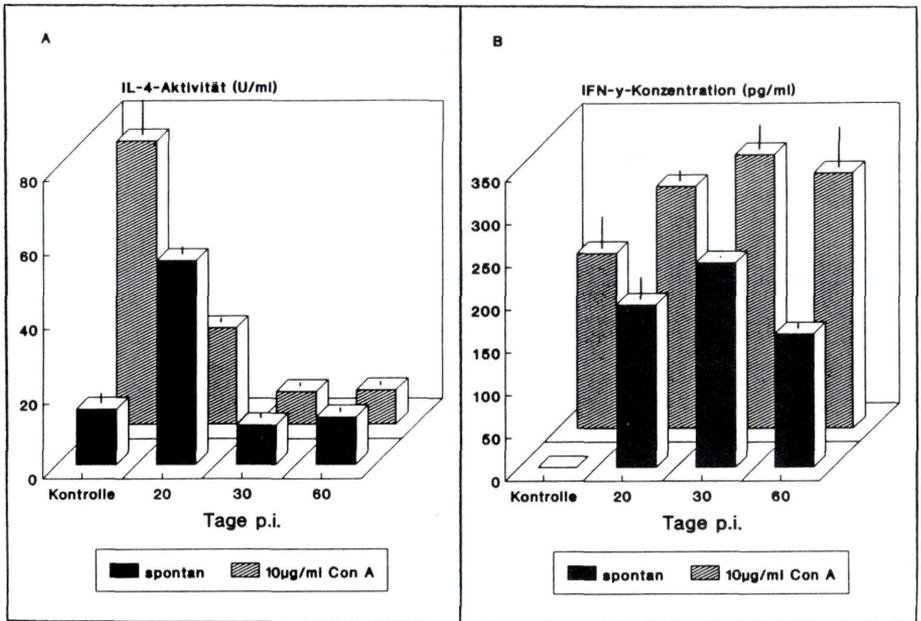


Abb. 2:

Kinetik der IL-4-Aktivität (A) und der IFN- $\gamma$ -Konzentration (B) in Kulturüberständen von Milzzellen *L. donovani*-infizierter C57Bl/6-Mäuse ex vivo, spontan und nach Stimulation mit 10 µg/ml Con A.

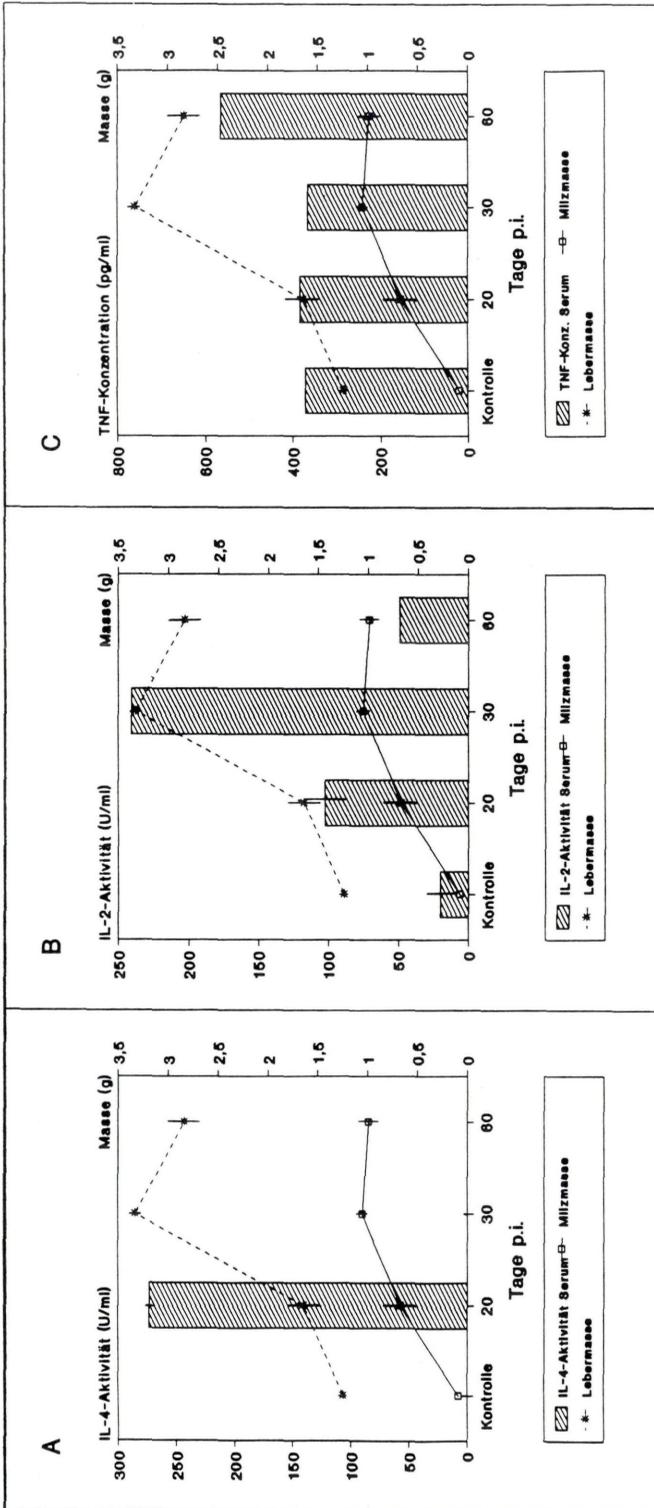


Abb. 3:

Vergleich der IL-4- (A), IL-2- (B) und TNF- $\alpha$ -Kinetiken (C) im Serum *L. donovani*-infizierter C57Bl/6-Mäuse mit dem symptomatischen Verlauf der Infektion gemessen an den Milz- und Lebermassen der Tiere.

Das im Serum ermittelte IFN- $\gamma$ -Resultat läßt keine präzise Aussage zu und wird deshalb hier nicht dargestellt.

Kinetik der IL-2-Aktivität über einen Zeitraum von 60 Tagen p. i.

Um ein zusätzliches Indiz für eine wachsende Rekrutierung von TH<sub>2</sub>-Zellen während des Infektionsverlaufes zu erhalten, wurde die IL-2-Aktivität in Milzzellüberständen (nicht dargestellt) und im Serum (Abb. 3B) bestimmt. Ähnlich wie bei IFN- $\gamma$  zeigte sich auch ein Anstieg der IL-2-Aktivität in Milzzellüberständen und im Serum infizierter Tiere bis zum Zeitpunkt 30 Tage p. i. Zwischen dem 30. und 60. Tag p. i. war ein deutlicher Abfall der IL-2-Aktivität im Serum festzustellen (Abb. 3B), während in den Milzzellkulturüberständen auch nach 60 Tagen p. i. ähnlich hohe Werte wie zum Zeitpunkt 30 Tage p. i. gemessen werden konnten (nicht dargestellt).

## Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen deutliche Änderungen im Sekretionsmuster der untersuchten Zytokine bei *Leishmania donovani*-infizierten C57Bl/6-Mäusen gegenüber nicht infizierten Kontrolltieren. Die zu verschiedenen Infektionszeitpunkten auftretenden Maxima der einzelnen Zytokine implizieren differente Wirkungen, die mit dem jeweils entsprechenden Krankheitsstadium in Beziehung stehen könnten.

Die vorrangig von Makrophagen produzierten Zytokine IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-1 fungieren als endogene Pyrogene (5), außerdem bewirkt ein erhöhter IL-6-Serumspiegel eine hepatische Akute-Phase-Antwort, die mit der Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie CRP (8) und Leukozytose verbunden ist. In diesem Sinne könnte die erhöhte IL-6- und TNF- $\alpha$ -Sekretion bei der *Leishmania donovani*-Infektion als Mechanismus zur Verstärkung der unspezifischen Abwehr verstanden werden. Eine Steigerung der spontanen IL-6- und TNF- $\alpha$ -Sekretion ex vivo durch Con A war in der akuten Phase (20 Tage p. i.) nur eingeschränkt bzw. überhaupt nicht möglich, woraus man schließen kann, daß zu diesem Zeitpunkt bereits die in vivo-Synthese maximal stimuliert und deshalb in vitro nicht zu verstärken war. Zwar erscheinen die Makrophagen in vivo maximal stimuliert, so daß sie sich in vitro, jedenfalls im Zellverband der Milzzellen, nicht zusätzlich stimulieren lassen, jedoch liegen die maximal erreichten Stimulationswerte deutlich unter denen der nicht infizierten Kontrolle. Die Makrophagen sind also am Tag 20 des Infektionsverlaufes in ihrer Aktivierbarkeit deutlich eingeschränkt. Im weiteren Infektionsverlauf steigen die IL-6- und schwächer die TNF- $\alpha$ -Synthese ex vivo weiter an, jedoch ist die Zytokinsynthese hier deutlich durch Con A steigerbar. Der Grund hierfür ist sehr wahrscheinlich in einem Anstieg der IL-6- und TNF- $\alpha$ -produzierenden Zellen zu suchen, denn der Makrophagenanteil innerhalb der Milzzellpopulation wächst über den untersuchten Infektionszeitraum proportional zur Milzmasse.

Darüberhinaus spielt IL-6 als B-Zell-Stimulationsfaktor-2 (BSF-2) eine wichtige Rolle bei der B-Lymphozytenreifung und -differenzierung (21) und könnte demzufolge auch eine wichtige Rolle für die Immunglobulinsynthese spielen (9).

Über die Rolle von IL-4 bei der Leishmaniasis gab es zunächst widersprüchliche Daten. Die überwiegende Zahl der Autoren, die sich mit dieser Problematik befassen und fast ausschließlich mit dem *Leishmania major*-System arbeiten, ist der Auffassung, daß die Leishmanieninfektion in non-healer Mausmodellen wie BALB/c mit einer starken Expansion von TH<sub>2</sub>-Zellen und folglich mit einer übermäßigen Produktion von IL-4 in den lymphatischen Organen der betroffenen Tiere assoziiert ist. Die Folge des erhöhten IL-4-Spiegels ist eine Inhibition der TH<sub>1</sub>-Antwort, also eine relativ oder absolut verminderte IL-2- und IFN- $\gamma$ -Produktion (11, 23, 32). Das Ausbleiben oder die Hemmung der Makrophagenaktivierung und damit das intrazelluläre Überleben der Parasiten könnten nach dieser Auffassung eine Folge der Blockierung der IFN- $\gamma$ -Wirkung sein (11).

Diese Hypothese wurde maßgeblich durch Experimente bekräftigt, in denen infizierten Tieren Anti-IL-4-Antikörper appliziert worden waren, was zu einer Besserung der Krankheitssymptome in 100% der untersuchten Fälle und zu einer vollständigen Heilung in 85% der Fälle führte (26).

Unsere Ergebnisse demonstrieren, daß auch im *Leishmania donovani*-System der TH<sub>1</sub>/TH<sub>2</sub>-Regulation eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Infektion zukommt. Im healer-Mausmodell C57Bl/6 war lediglich in der akuten Phase der Infektion (in den ersten drei Wochen) ein Ansteigen der IL-4-Sekretion der Milzzellen *ex vivo* sowie ein Ansteigen des IL-4-Serumspiegels zu beobachten. Eine Steigerung durch Con A-Stimulation *ex vivo* war nicht möglich, was auf eine maximale *in vivo*-Aktivierung deutet. Ab der vierten Infektionswoche befanden sich die Werte wieder im Kontrollbereich, was durch eine Blockierung der IL-4-Synthese und sukzessive Freisetzung verursacht worden sein könnte. Die Tatsache, daß die *ex vivo*-Stimulation mit Con A in dieser Phase völlig erfolglos blieb, spricht für diese Vermutung. Die offenbar in diesem healer-Mausmodell schon sehr zeitig induzierte IFN- $\gamma$ -Sekretion könnte eine solche Inhibition der Zytokinsynthese in TH<sub>2</sub>-Zellen bewirken (11, 12, 20). Die gefundene erhöhte IL-2-Aktivität mit einem Maximum zum Zeitpunkt 30 Tage *p. i.* könnte diesen Effekt begünstigen. IL-2 inhibiert die Proliferation von TH<sub>2</sub>-Zellen (16) und induziert die Differenzierung von TH-Vorläuferzellen zu TH<sub>1</sub>-Zellen im Thymus (12). Dieser Prozeß führt letztlich zur Überrepräsentation IFN- $\gamma$ -produzierender TH<sub>1</sub>-Zellen.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Frage, ob im Verlauf einer progressiven Leishmaniasis (z. B. non-healer-Mausmodell BALB/c) IL-4 direkt an der Unterdrückung der Makrophagenaktivierung beteiligt ist oder ausschließlich indirekt über die Blockierung der TH<sub>1</sub>-Zellreifung, nicht eindeutig zu klären. Weitere Experimente im *Leishmania donovani*-System mit non-healer-Mäusen sollen zeigen, ob dort die hohen IL-4-Spiegel persistieren und parallel dazu die Aktivität der Makrophagen über den gesamten Krankheitsverlauf eingeschränkt bleibt.

Es gibt auf der anderen Seite auch eine Reihe von Autoren die zeigen, daß IL-4 nicht generell als Antagonist von IFN- $\gamma$  bzw. als Inhibitor der Makrophagenaktivierung wirkt. IL-4 ist offenbar in der Lage, durch Induktion der MHC-Klasse II-Antigen-Expression auf Makrophagen (3) sowie durch Hochregulation des Komplementrezeptors CR3, eines Makrophagenrezeptors, an den promastigote Leishmanien binden und der für die Phagozytose der Parasiten verantwortlich ist (29), selbst zur Aktivierung der Makrophagen beizutragen.

CARTER et al. (1) konnten schließlich sogar eine Immunität gegen *Leishmania major* in BALB/c-Mäusen durch eine spezielle IL-4-Therapie erzielen.

Unsere Daten lassen darauf schließen, daß auch im *Leishmania donovani*-System eine frühe Expansion der TH<sub>2</sub>-Zellpopulation zu einem starken Anstieg des IL-4-Spiegels und zu einer direkten oder indirekten Hemmung der Makrophagenzytotoxizität gegen die Parasiten führen kann. Im healer-Modell C57Bl/6 geht die hohe IL-4-Produktion zwischen dem 20. und 30. Tag *p. i.* zurück und die Infektion kann ausheilen. Zum Zeitpunkt des hohen IL-4-Spiegels in spontanen *ex vivo*-Milzzellüberständen und im Serum war die Aktivierbarkeit der Milzzellen zur Sekretion von IL-6 und TNF- $\alpha$  deutlich eingeschränkt (Abb. 1). Diese IL-6- und TNF- $\alpha$ -Daten legen die Annahme nahe, daß die Produzentenzellen *in vivo* maximal aktiviert sind, und daß eine weitere Stimulation verhindert wird, möglicherweise durch die Anwesenheit von IL-4 in den Milzzellkulturüberständen (Abb. 2A). Die Vermutung anderer Autoren, daß neben IFN- $\gamma$  auch TNF- $\alpha$  für die Makrophagenaktivierung und damit für die Heilung erforderlich ist (29), steht mit unseren Ergebnissen im Einklang.

Abschließend sollen noch zwei methodische Aspekte erwähnt werden. Beträchtliche Schwierigkeiten traten beim Zytokinnachweis mittels Bioassay im Serum auf. Es

scheint dabei zu störenden Interaktionen zwischen bestimmten Serumfaktoren und den Indikatorzellen des Bioassays zu kommen, so daß ein Zytokinnachweis nur in sehr hohen Serumverdünnungen möglich war, in denen dann einige der zu bestimmenden Zytokine ebenfalls nur noch in nicht mehr nachweisbaren Aktivitäten zu finden waren. Aus diesem Grund war ein Nachweis von IL-6 im Serum überhaupt nicht möglich. In diesen Fällen wäre der Einsatz von entsprechenden Enzym-Immuno-Assays oder Western-Blot-Analysen eine Alternative.

Durch eine vom Hersteller ausgewiesene Kreuzreaktivität des TNF- $\alpha$ -ELISA mit Lymphotoxin (TNF- $\beta$ ) ist nicht auszuschließen, daß sich die gemessenen TNF-Werte aus TNF- $\alpha$  und TNF- $\beta$  zusammensetzen.

## Zusammenfassung

IL-6-, TNF-, IL-4-, IL-2- und IFN- $\gamma$ -Aktivitäten wurden in Milzzellkulturüberständen und im Serum *Leishmania donovani*-infizierter C57Bl/6-Mäuse untersucht. 20 Tage p. i., auf dem Höhepunkt der Infektion, ließ sich ein erheblicher Anstieg der spontanen IL-6- und TNF-Aktivität in den Milzzellüberständen der infizierten Mäuse feststellen. Eine zusätzliche Stimulation dieser Milzzellen mit Con A zur Produktion von IL-6 und TNF war zu diesem Zeitpunkt nur eingeschränkt oder gar nicht möglich, was auf eine maximale Aktivierung in vivo hindeutet. Diese in vitro gemessene in vivo-Aktivierung lag allerdings weit unter der maximalen in vitro-Stimulierbarkeit der Milzzellen von Kontrollmäusen. Zu demselben Zeitpunkt (20 Tage p. i.) ließ sich eine stark erhöhte IL-4-Aktivität in den Milzzellüberständen und im Serum nachweisen, die im weiteren Infektionsverlauf auf Kontrollwerte zurückging. Diese hohen Spiegel des Makrophagenaktivierung-hemmenden IL-4 sind möglicherweise für die deutlich eingeschränkte Aktivierbarkeit der IL-6- und TNF-produzierenden Milzzellen verantwortlich. Die IFN- $\gamma$ -Sekretion der Milzzellen war während des gesamten Infektionsverlaufes erhöht. Eine zusätzliche Stimulierung durch Con A war zu jedem untersuchten Zeitpunkt möglich. Entsprechend waren die Verhältnisse bei IL-2. Diese Daten unterstützen die Vorstellung, daß es auch bei der *Leishmania donovani*-Infektion in healer-Mausmodellen nach einer initialen TH<sub>2</sub>-Phase mit IL-4-Produktion, während der die Infektion sich etabliert, im späteren Verlauf der Infektion zu einem Überwiegen der TH<sub>1</sub>-Population kommt, wodurch dann die Heilung ermöglicht wird. Dabei dürfte IFN- $\gamma$  für die Hemmung von IL-4 und gemeinsam mit TNF- $\alpha$  für die Aktivierung der Makrophagen verantwortlich sein, während IL-2 die Differenzierung von TH-Vorläuferzellen zu TH<sub>1</sub>-Zellen im Thymus begünstigen könnte.

## Schlüsselwörter

Leishmaniasis, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ .

## Summary

### Secretion of immunoregulatory potent cytokines in experimental murine visceral Leishmaniasis

Cytokine activities (IL-6, TNF, IL-4, IL-2 and IFN- $\gamma$ ) were monitored in spleen cell supernatants and sera of healer C57Bl/6 mice infected with *Leishmania donovani* parasites, the pathogen of visceral Leishmaniasis. At the peak of the infection (around day 20) strong spontaneous secretion of IL-6 and TNF was detected in spleen cell supernatants, which could hardly be further stimulated in vitro by Con A. Inspite of the

high level of spontaneous secretion the total amount of cytokines produced after stimulation was clearly significantly lower than in untreated control mice. At the same time (day 20 p. i.) a high spontaneous activity of IL-4 was present in spleen cell supernatants and also in the sera of the mice which decreased over the following weeks. The high level of IL-4, which has been shown to inhibit macrophage activation, may be responsible for the decreased total production of IL-6 and TNF by spleen cells of the infected mice.

Secretion of IFN- $\gamma$  and IL-2 by spleen cells was elevated throughout the course of the infection, both spontaneously and after stimulation. These results favor the assumption, that also in the *Leishmania donovani* system an initial TH<sub>2</sub> phase with elevated production of IL-4 correlates with the take and spreading of the infection. In the later course of the infection, in the healer mouse strain C57Bl/6, the TH<sub>1</sub> population dominates. Concomitantly IFN- $\gamma$  produced by TH<sub>1</sub> cells may be responsible for the inhibition of further IL-4 production and for macrophage activation, presumably in synergism with TNF, whereas IL-2 promotes the differentiation of TH precursors to the TH<sub>1</sub> phenotype in the thymus.

### Key words

Leishmaniasis, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$ .

### Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Dr. Edgar Schmitt für die freundlich gewährte Unterstützung und die Bereitstellung von Zelllinien und Antikörpern.

### Literatur

1. CARTER, K. C., GALLAGHER, G., BAILLIE, A. J., ALEXANDER, J. (1989):  
The induction of protective immunity to *Leishmania major* in the BALB/c mouse by interleukin 4 treatment.  
Eur. J. Immunol. 19, 779-782.
2. CILLARI, E., DIELI, M., MALTESE, E., MILANO, S., SALERNO, A., LIEW, F. Y. (1989):  
Enhancement of macrophage IL-1 production by *Leishmania major* infection in vitro and its inhibition by IFN- $\gamma$ .  
J. Immunol. 143, 2001-2005.
3. CRAWFORD, G. D., WYLER, D. J., DINARELLO, C. A. (1985):  
Parasite-monocyte interactions in human leishmaniasis: production of interleukin-1 in vitro.  
J. Infect. Dis. 152, 315-322.
4. CRAWFORD, R. M., FINBLOOM, D. S., OHARA, J., PAUL, W. E., MELTZER, M. S. (1987):  
B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) activates macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens.  
J. Immunol. 139, 135-141.
5. DINARELLO, C. A. (1989):  
The endogenous pyrogens in host-defense interactions.  
Hosp. Pract. 24, 111-121.
6. FIORENTINO, D. F., BOND, M. W., MOSMANN, T. R. (1989):  
Two types of mouse T helper cell. VI. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.  
J. Exp. Med. 170, 2081-2095.
7. FIORENTINO, D. F., ZLOTNIK, A., VIEIRA, P., MOSMANN, T. R., HOWARD, M., MOORE, K. W., O'GARRA, A. (1991):  
IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.  
J. Immunol. 146, 3444-3451.

8. GAULDIE, J., RICHARDS, C., NORTHEMANN, W., FEY, G., BAUMANN, H. (1989):  
IFN $\beta$ 2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes.  
Ann. NY Acad. Sci. 557, 46-59.
9. GRAU, G. E., FREI, K., PIGUET, P. F., FONTANA, A., HEREMANNS, H., BILLIAU, A., VASSALLI, P., LAMBERT, P. H. (1990):  
Interleukin 6 production in experimental cerebral malaria: modulation by anticytokine antibodies and possible role in hypergammaglobulinemia.  
J. Exp. Med. 172, 1505-1508.
10. HANSEN, M. B., NIELSEN, S. E., BERG, K. (1989):  
Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill.  
J. Immunol. Methods 119, 203-210.
11. HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., HOLADAY, B. J., COFFMAN, R. L., LOCKSLEY, R. M. (1989):  
Reciprocal expression of interferon or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis.  
J. Exp. Med. 169, 59-72.
12. HEINZEL, F. P., SADICK, M. D., MUTHA, S. S., LOCKSLEY, R. M. (1991):  
Production of interferon  $\gamma$ , interleukin 2, interleukin 4 and interleukin 10 by CD4<sup>+</sup> lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7011-7015.
13. HOCKERTZ, S.:  
Funktion der Zellen des Makrophagensystems bei der Leishmania donovani Infektion.  
Dissertation, Universität Hannover, 1988.
14. HÜLTNER, L., MOELLER, J., SCHMITT, E., JÄGER, G., REISBACH, G., RING, J., DÖRMER, P. (1989):  
Thiol-sensitive mast cell lines derived from mouse bone marrow respond to a mast cell growth-enhancing activity different from both IL-3 and IL-4.  
J. Immunol. 142, 3440-3446.
15. LIEW, F. Y., PARKINSON, C., MILLOTT, S., SEVERN, A., CARRIER, M. (1990):  
Tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) in leishmaniasis. I. TNF- $\alpha$  mediates host protection against cutaneous leishmaniasis.  
Immunology 69, 570-573.
16. LOCKSLEY, R. M., SCOTT, P. (1991):  
Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function.  
In: Immunoparasitology Today (Ash, C. and Callagher, R. B., eds)  
A 58 - A 61, Elsevier Trend Journals, Cambridge.
17. MOSMANN, T. (1983):  
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.  
J. Immunol. Methods 65, 55-63.
18. MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A., COFFMAN, R. L. (1986):  
Two types of murine helper T cell clone. I. Definition According to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.  
J. Immunol. 136, 2348-2357.
19. MOSMANN, T. R., MOORE, K. W. (1991):  
The role of IL-10 in crossregulation of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 responses.  
In: Immunoparasitology Today (Ash, C. and Gallagher, R. B., eds)  
A 49 - A 58, Elsevier Trend Journals, Cambridge.
20. MOSMANN, T. (1991):  
The role of IL-10 and IFN- $\gamma$  in cross-regulation of cytokine synthesis.  
J. Interferon Res. 11, 142 (abstract).
21. MURAGUCHI, A., HIRANO, T., TANG, B., MATSUDA, T., HORII, Y., NAKAJIMA, K., KISHIMOTO, T. (1988):  
The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells.  
J. Exp. Med. 167, 332-344.
22. OHARA, J., PAUL, W. E. (1985):  
Production of a monoclonal antibody to and molecular characterisation of B cell stimulatory factor 1.  
Nature 315, 33.

23. PELEMAN, P., WU, J., FARGEAS, C., DELESPESE, G. (1989):  
Recombinant interleukin 4 suppresses the production of interferon  $\gamma$  by human mononuclear cells.  
J. Exp. Med. 170, 1751-1756.
24. PISA, P., GENNENE, M., SÖDER, O., OTTENHOFF, T., HANSSON, M., KIESSLING, R. (1990):  
Serum tumor necrosis factor levels and disease dissemination in leprosy and leishmaniasis.  
J. Infect. Dis. 161, 988-991.
25. REINER, N. E. (1987):  
Parasite accessory cell interactions in murine leishmaniasis. I. Evasion and stimulus-dependent suppression of the macrophage interleukin 1 response by *Leishmania donovani*.  
J. Immunol. 138, 1919-1925.
26. SADICK, M. D., HEINZEL, F. P., HOLADAY, B. J., PU, R. T., DAWKINS, R. S., LOCKSLEY, R. M. (1990):  
Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody.  
J. Exp. Med. 171, 115-127.
27. SCUDERI, P., LAM, K. S., RYAN, K. J., PETERSEN, E., STERLING, K., FINLEY, P. R., RAY, C. G., SLYMEN, D. J., SALMON, S. E. (1986):  
Raised serum levels of tumor necrosis factor in parasitic infections.  
Lancet ii, 1364-1365.
28. TE VELDE, A. A., KLOMP, J. P. G., YARD, B. A., DE VRIES, J. E., FIGDOR, C. G. (1988):  
Modulation of phenotypic and functional properties of human peripheral blood monocytes by IL-4.  
J. Immunol. 140, 1548-1554.
29. TITUS, R. G., SHERRY, B., CERAMI, A. (1989):  
Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis.  
J. Exp. Med. 170, 2097-2104.
30. TITUS, R. G., SHERRY, B., CERAMI, A. (1991):  
The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites.  
In: Immunoparasitology Today (Ash, C. and Gallagher, R. B., eds)  
A 13 - A 16, Elsevier Trend Journals, Cambridge.
31. VAN SNICK, J., CAYPHAS, S., VINK, A., UYTENHOVE, C., COULIE, P. G., RUBIRA, M. R., SIMPSON, R. J. (1986):  
Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell-hybridomas.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9679-9683.
32. VERCELLI, D., JABARA, H. H., LAUENER, R. P., GEHA, R. S. (1990):  
IL-4 inhibits the synthesis of IFN- $\gamma$  and induces the synthesis of IgE in human mixed lymphocyte cultures.  
J. Immunol. 144, 570-573.

## Abkürzungen

HEPES	=	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]
MTT	=	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MTT-Formazan	=	1-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylphormazan
SDS	=	Sodium Dodecyl Sulfate
DMF	=	N,N-Dimethylformamide
CRP	=	C-reaktives Protein

## KORRESPONDENZADRESSE:

Dipl.-Biol. Jörg Lehmann  
Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung,  
Abteilung Immunbiologie

Nikolai-Fuchs-Straße 1  
D-W 3000 Hannover 61 · Bundesrepublik Deutschland

# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Mitteilungen der Österreichischen Gesellschaft für Tropenmedizin und Parasitologie](#)

Jahr/Year: 1992

Band/Volume: [14](#)

Autor(en)/Author(s): Lehmann Jörg, Lohmann-Matthes Marie-Luise, Hockertz S.

Artikel/Article: [Sekretion immunregulatorisch wirksamer Zytokine bei der experimentellen murinen visceralen Leishmaniasis. 21-32](#)