

**Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck**

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Westermann

vertreten in der TNF durch Professor Dr. med. Jürgen Westermann

**Die frühe Chemokin- und Zytokinexpression nach einer Infektion
mit *Leishmania major* im T-Zellareal des drainierenden Lymph-
knotens ist nicht entscheidend für den späteren Krankheitsverlauf**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät -

vorgelegt von

Julia Nietsch

aus Hamburg

Lübeck 2010

Vorsitzender: Professor Dr. N. Tautz

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Westermann

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2010

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 31.07.2010

Ich versichere, dass diese Arbeit ohne fremde Hilfe angefertigt wurde und keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt wurden.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die angeborene und die erworbene Immunabwehr	1
1.2	Der Ablauf einer Immunantwort am Beispiel des Infektionsmodells <i>Leishmania major</i>	3
1.3	Die Bedeutung der Zytokinexpression für den Verlauf der Krankheit	5
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	10
2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Material	11
2.2	Methoden	18
3	ERGEBNISSE	29
3.1	Der Krankheitsverlauf einer kutanen <i>L. major</i> Infektion in empfänglichen Balb/c- und resistenten C57BL/6- Tieren	29
3.2	Bestimmung der Zytokinexpression in der Haut	30
3.2.1	Keine Unterschiede in der konstitutiven Zytokinexpression zwischen empfänglichen Balb/c- und resistenten C57BL/6-Mäusen	30
3.2.2	Empfängliche Balb/c-Mäuse und resistente C57BL/6-Mäuse unterscheiden sich in der frühen Chemokinexpression am Infektionsort	32
3.2.3	Die Parasitenlast am Infektionsort ist in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit <i>L. major</i> bei Balb/c- und C57BL/6-Mäusen gleich	33
3.3	Bestimmung der Zytokinexpression im T- und B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens	34
3.3.1	Die Kombination aus Laser-Mikrodissektion und Real Time RT-PCR ermöglicht die differentielle Analyse der Kompartimente des drainierenden Lymphknotens	35
3.3.2	Die konstitutive Zytokinexpression ist in beiden Stämmen unterschiedlich im T- und B-Zellbereich der poplitealen Lymphknoten verteilt	37
3.3.3	Kinetischer Unterschied in der Chemokin- und Zytokinexpression zwischen empfänglichen Balb/c-Mäusen und resistenten C57BL/6-Tieren im T-Zellareal	39

3.3.4	Die Immunantwort beginnt in beiden Stämmen an der T-/B-Zellgrenze des drainierenden Lymphknotens	42
3.3.5	Kein Unterschied in der T-Zell-Aktivierung zwischen Balb/c- und C57BL/6-Mäusen im drainierenden Lymphknoten	45
3.3.6	In den empfänglichen Balb/c-Mäusen beginnt die Immunantwort im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens	47
3.4	C3H-Mäuse zeigen sowohl im T- als auch im B-Zellareal eine verstärkte Chemokin- und Zytokinexpression	50
3.5	Kein Unterschied in der Parasitenlast im drainierenden Lymphknoten bei Balb/c-, C57BL/6- und C3H-Mäusen	54
3.6	Sechs Wochen nach der Infektion mit <i>L. major</i> ist die Differenzierung in T _H 1- bzw. T _H 2-zytokinproduzierende Zellen abgeschlossen	55
4	DISKUSSION	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	70
6	LITERATUR.....	71
7	DANKSAGUNG	86
8	ANHANG.....	87

1 Einleitung

1.1 Die angeborene und die erworbene Immunabwehr

Alle Lebewesen sind fortwährend davon bedroht, dass schädliche Stoffe oder Mikroorganismen in ihren Organismus eindringen, wo sie zu Funktionsstörungen und Krankheiten führen können. Typische Krankheitserreger sind Bakterien, Viren und Pilze sowie einzellige (z.B. Protozoen wie Plasmodien) und mehrzellige Parasiten (z.B. Helminthen). Im Laufe der Evolution hat sich ein funktionstüchtiges und vielseitiges Abwehrsystem entwickelt, das sofort Krankheitserreger und körperfremde Stoffe oder auch entartete körpereigene Zellen erkennt und bekämpft. Dem Organismus stehen dabei die angeborene und die erworbene Immunabwehr zur Verfügung, die auf verschiedenen Funktionsweisen basieren und die sich bei einer Immunantwort gegenseitig ergänzen. Zu der angeborenen Immunabwehr zählen anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, aber auch zellvermittelte Gegenwehr durch Phagozytose sowie allgemein entzündliche Reaktionen und das Komplementsystem.^[1] Schafft es ein Mikroorganismus, die Epithelbarriere zu überwinden, wird er sofort von verschiedenen Zellen wie den Makrophagen, natürlichen Killerzellen und neutrophilen Zellen angegriffen, die ihn durch ihre speziellen Rezeptoren, zu denen die „*Toll-like Receptors*“ (TLRs) gehören, erkennen und von körpereigenen Zellen unterscheiden können.^[2] Durch die Entwicklung dieser speziellen Rezeptoren, die an stark konservierte Strukturen der Erreger binden, können die Zellen der angeborenen Immunität ein breites Spektrum an mikrobiellen Erregern erkennen. Diese sogenannten pathogen-assoziierten mikrobiellen Muster (engl. „*pathogen-associated microbial patterns*“, PAMP) sind so eng mit dem Überleben und/oder den krankmachenden Eigenschaften des Erregers verbunden, dass dieser sie nicht einfach ändern kann, um der Immunreaktion zu entgehen. Die angeborene Immunabwehr unterscheidet zudem körpereigene von körperfremden Zellen. Hierfür verfügt praktisch jede Zelle im Körper über den so genannten *major histocompatibility complex* (MHC).^[3] Körperfremde oder erkrankte Zellen, die nicht über den MHC verfügen, werden so zwangsläufig erkannt und das Ziel einer Abwehrreaktion. Es wird angenommen, dass circa 90 Prozent aller Infektionen durch die angeborene Immunabwehr erkannt und erfolgreich bekämpft werden können. Die übrigen 10 Prozent der Pathogene wären aber ohne die erworbene Immunabwehr in der Lage, den Organismus nachhaltig zu schädigen. Die erworbene oder adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch ihre Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder

veränderten Krankheitserregern aus. Erkennen die Zellen der erworbenen Immunabwehr spezifische Antigene der Krankheitserreger, werden zelluläre Abwehrmechanismen aktiviert und Antikörper gebildet. Neben den antigenpräsentierenden Zellen (APC) wie den dendritischen Zellen stellen die T- und B-Lymphozyten die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunität dar. Die T-Lymphozyten werden anhand ihrer Oberflächenmoleküle CD4 und CD8, die Korezeptoren des T-Zell-Rezeptors darstellen, in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unterteilt. Naive CD4⁺-T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung durch dendritische Zellen zu unterschiedlichen Subtypen von T-Helferzellen. Je nach sezerniertem Zytokinmuster und der Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren und Transkriptionsfaktoren werden vier Subtypen von CD4⁺-T-Zellen unterschieden: T-Helfer-1-Zellen (T_H1), T_H2-Zellen, regulatorische T-Zellen und T_H17-Zellen. T_H1-Zellen aktivieren Makrophagen, die mit intrazellulären Erregern infiziert wurden. T_H2-Zellen werden für die Aktivierung von B-Zellen benötigt.^[4] Regulatorische T-Zellen besitzen immunsuppressive Mechanismen, während IL-17-exprimierende T-Helferzellen die Expression weiterer entzündungsfördernder Zytokine in unterschiedlichen Zelltypen induzieren.^[5] Naive CD8⁺-T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu zytotoxischen T-Zellen, die das Potential haben, virusinfizierte oder entartete Zellen durch die Einleitung der Apoptose zu töten.^[6] B-Lymphozyten sind für die humorale Immunität verantwortlich. Nach ihrer Aktivierung differenzieren sie zu Plasmazellen, die große Mengen spezifischer Antikörper sezernieren.^[7]

1.2 Der Ablauf einer Immunantwort am Beispiel des Infektionsmodells *Leishmania major*

Als Leishmaniose wird eine Infektionserkrankung bezeichnet, die durch obligat intrazelluläre protozoische Parasiten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen wird. Leishmanien werden durch weibliche Schmetterlingsmücken (Familie Psychodidae) der Gattungen *Phlebotomus* (Asien und Afrika) sowie *Lutzomyia* (Mittel- und Südamerika) übertragen. Leishmanien sind intrazelluläre Parasiten, die einen Wirtswechsel zwischen Insekten und Wirbeltieren vollziehen. Durch den Stich einer infizierten Mücke bei der Blutmahlzeit erfolgt die Übertragung von etwa 100 bis 3000 Parasiten in den Wirt.^[8] Nach Schätzungen der WHO sind weltweit etwa 12 Millionen Menschen von Leishmaniosen betroffen. Die klinische Manifestation reicht von einer einfachen kutanen Läsion bis hin zu einer tödlich verlaufenden viszeralen Form der Krankheit. Die kutane Form der Krankheit, die von *L. major*, *L. tropica* und *L. aethiopica* (Alte Welt) und *L. mexicana*, *L. braziliensis* und *L. amazonensis* (Neue Welt) übertragen wird, verläuft im Allgemeinen selbstheilend und ist mit lebenslanger Immunität verbunden. An der Übertragungsstelle entwickeln sich innerhalb von Wochen bis Monaten Hautläsionen. Unbehandelt können die Läsionen für Monate bis Jahre bestehen bleiben, bevor sie spontan abheilen und atropische Narben zurücklassen.^[9] Die Krankheit verläuft meist nicht tödlich, wenn die Erreger jedoch in innere Organe eindringen und dort Makrophagen befallen, kann es zu krankhaften Vergrößerungen der Milz und Leber kommen, die unbehandelt in 90 % der Fälle durch Störungen der Blutgerinnung und zusätzliche Sekundärinfektionen tödlich verlaufen.

Die mukokutane Leishmaniose, die von *L. braziliensis* übertragen wird, betrifft neben der Haut auch die Schleimhäute. Klinisch zeigen sich schwer verlaufende, destruirende Hautläsionen, die nicht spontan abheilen. Bei der viszeralen Leishmaniose werden die inneren Organe (lateinisch viscera = Eingeweide) befallen. Die Erreger hierfür sind *L. donovani* und *L. infantum*.

Als obligat intrazelluläre Pathogene befallen die *L. major* Promastigoten Phagozyten als Wirtszellen. Die ersten phagozytierenden Zellen, die den Ort der Infektion infiltrieren, stellen polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) dar. Ein chemotaktischer Faktor (*Leishmania chemotactic factor*, LCF), der von den Leishmanien freigesetzt wird, unterstützt dabei die Rekrutierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten an den Ort der

Infektion,^[10] wo sie die Leishmanien phagozytieren. In den neutrophilen Granulozyten verharren die Parasiten im Promastigoten-Stadium,^[11] ohne sich zu vermehren, so dass die neutrophilen Granulozyten damit die Rolle eines Zwischenwirtes einnehmen. Die Mechanismen, mit denen der Parasit die antimikrobiellen Effektorfunktionen der neutrophilen Granulozyten blockiert, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Das normalerweise auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen gefundene antiinflammatorische Phosphatidylserin scheint eine wichtige Rolle zu spielen, indem es den oxidativen Burst der Granulozyten ausschaltet, so dass kein Töten und kein Abbau der lebenden Erreger erfolgt.^[12] Die natürliche Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten beträgt durchschnittlich sechs bis zehn Stunden, danach treten sie in die Apoptose ein. Durch die Infektion mit *L. major* wird die Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten verlängert. In dieser Zeit werden die Granulozyten durch die Parasiten dazu veranlasst, Chemoattraktoren wie MIP-1 β freizusetzen, durch das die Rekrutierung von Makrophagen an den Ort der Infektion unterstützt wird.^[13] Etwa zwei Tage nach der Infektion^[11] werden infizierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten apoptotisch, was zu ihrer Beseitigung durch die Makrophagen führt, die den Endwirt der *L. major* Parasiten darstellen.^[13] Da die Makrophagen gegenüber apoptotischen Zellen nicht ihre kompletten antimikrobiellen Abwehrmechanismen einsetzen, resultiert dieser „silence entry“ darin, dass es in den Makrophagen zu einer starken Vermehrung der Leishmanien durch Teilung kommt. Nach circa drei Wochen werden die Wirtszellen durch ein regelrechtes Aufplatzen zerstört und es wird eine große Anzahl an Amastigoten frei, die weitere Makrophagen befallen.^[14]

Im Labor wird den Versuchstieren eine große Anzahl (10^4 - 10^7) Parasiten subkutan in die Fußsohle, die Ohren oder die Schwanzwurzel injiziert. Werden Mäuse unterschiedlicher Stämme mit *L. major* infiziert, so führt das in resistenten Mausstämmen wie C3H und C57BL/6 zu einer vorübergehenden Schwellung der Haut, die von allein wieder zurückgeht. Im empfänglichen Mausstamm Balb/c führt die Infektion hingegen zu schweren Hautgeschwüren an der Infektionsstelle und wird zu einer chronischen und tödlich verlaufenden Krankheit.^[15] In resistenten Mausstämmen wie C57BL/6 und C3H entwickelt sich eine schützende T_H1-Antwort, die durch die Produktion von IFN γ und IL-12 charakterisiert wird.^[15] Das von den T_H1-Zellen gebildete IFN γ aktiviert die Makrophagen, die daraufhin Stickoxid produzieren, welches für die Leishmanien tödlich ist und vermittelt so die Resistenz gegenüber der Infektion mit *L. major*. Im empfänglichen Mausstamm Balb/c wird stattdessen eine T_H2-Antwort generiert, die durch die Produktion von IL-4 und IL-10 gekennzeichnet

ist.^[15] Beide Zytokine verhindern die Produktion von $\text{IFN}\gamma$, wodurch die Makrophagen nicht aktiviert werden und damit die Vermehrung der intrazellulären Parasiten und das Fortschreiten der Krankheit nicht aufgehalten werden können.

1.3 Die Bedeutung der Zytokinexpression für den Verlauf der Krankheit

Die Zytokine, deren Expression entscheidend für den Verlauf der Krankheit sind, scheinen auf den ersten Blick bereits identifiziert und beschrieben zu sein. So ist seit langem bekannt,^[16;17] dass die Anwesenheit von $\text{IFN}\gamma$ und IL-12 eine zentrale Rolle für die Ausprägung einer schützenden $\text{T}_{\text{H}1}$ -Antwort spielt. IL-12, ein Heterodimer, das aus den beiden Untereinheiten p40 und p35 besteht, wird von Phagozyten wie Monozyten, Makrophagen oder Neutrophilen, sowie von B-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen gebildet und unterstützt die Ausbildung einer $\text{T}_{\text{H}1}$ ausgerichteten adaptiven Immunantwort. IL-12 induziert die Produktion von $\text{IFN}\gamma$ in T-Zellen und natürlichen Killerzellen, wobei $\text{IFN}\gamma$ wiederum die Fähigkeit der Phagozyten, IL-12 und andere proinflammatorische Zytokine zu produzieren, verstärkt, so dass IL-12 und $\text{IFN}\gamma$ in einem positiven Feedback-Mechanismus agieren, der wichtig für die inflammatorische Reaktion auf Infektionen ist.^[18]

IL-2 wurde ursprünglich ebenfalls als $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zytokin beschrieben, doch zeigen Studien,^[19-21] dass IL-2 vor allem für die Aktivierung der naiven CD4^+ -T-Zellen essentiell ist. Die Proliferation und Differenzierung der aktivierten CD4^+ -T-Zellen hängt von der Produktion vom T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 ab. IL-2 wird von den aktivierten T-Zellen selbst gebildet und bindet auf den aktivierten T-Zellen an einen hochaffinen Rezeptor. Das für die Aktivierung der naiven CD4^+ -T-Zellen benötigte IL-2 wird von aktivierten dendritischen Zellen während ihrer Interaktion mit den naiven T-Zellen zur Verfügung gestellt. Erst nach dieser Aktivierung erfolgt die Proliferation der T-Zellen und ihre Differenzierung zu T-Effektorzellen.^[22]

Als das Zytokin, das für die Empfänglichkeit gegenüber der Infektion mit *L. major* verantwortlich ist, wird IL-4 beschrieben. Die Expression von IL-4 führt zu der Ausbildung einer $\text{T}_{\text{H}2}$ -Antwort, die die Ausbildung von $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen verhindert und damit die verstärkte Sekretion des für die Aktivierung der Makrophagen unbedingt erforderlichen $\text{IFN}\gamma$ unterdrückt.^[15]

IL-10 wurde ursprünglich ebenfalls als ein spezifisches T_H2-Zytokin beschrieben, das die Zytokinsynthese insbesondere von IFN γ in T_H1-Zellen hemmen kann.^[23] Jüngere Studien^[24;25;26] beweisen hingegen, dass IL-10 sowohl von T_H1- als auch von T_H2-Zellen sowie von vielen anderen Zelltypen wie B-Zellen, Makrophagen, dendritischen Zellen und bestimmten Populationen regulatorischer T-Zellen gebildet wird. Es wird angenommen,^[27] dass IL-10 wichtig für die Limitierung von Immunreaktionen ist, indem das von T_H1-Zellen gebildete IL-10 hilft, die möglichen Schäden zu limitieren, die durch eine übertriebene Immunreaktion verursacht werden. Diese Kontrolle scheint aber auch die Effektivität der Immunreaktion zu vermindern, was dazu führt, dass die Parasiten nicht vollständig beseitigt werden. IL-10 defiziente Balb/c-Mäuse sind resistenter gegenüber der Infektion mit *L. major* als Wildtyp-Balb/c-Tiere, was durch eine geringere Größe der Läsionen und einer geringeren Anzahl von Parasiten in den Läsionen gekennzeichnet ist.^[28] Es wurde aber auch gezeigt^[29], dass als Reaktion auf die Infektion mit *L. major* in den C57BL/6-Tieren T_H1-Zellen gebildet werden, die sowohl IFN γ als auch IL-10 produzieren, was auch in der resistenten C57BL/6-Maus zu der Ausprägung von nichtheilenden dermalen Läsionen führt.

Bei der gründlichen Auseinandersetzung mit der Literatur wird jedoch auffällig, dass die Mechanismen, die in die Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen in T_H1- und T_H2-Zellen involviert sind, kontrovers diskutiert werden. Der wichtigste Faktor, der die Richtung der Differenzierung bestimmt, scheint das unmittelbare Zytokinmilieu zu sein, das während der Aktivierung der T-Zellen im drainierenden Lymphknoten vorherrscht. So weisen die Ergebnisse einiger Studien darauf hin, dass die Gabe von IL-12, IFN γ oder IL-4 bzw. ihrer korrespondierenden Antikörper kurz vor bzw. innerhalb der ersten Tage nach der Infektion mit *L. major* die Entwicklung einer T_H1- bzw. T_H2-gerichteten Immunantwort beeinflussen. Im Widerspruch zu der Annahme, dass bereits die initiale Zytokinexpression im drainierenden Lymphknoten die endgültige Differenzierung in T_H1- bzw. T_H2-Zellen bestimmt, steht jedoch die häufige Beobachtung, dass die durch die Behandlungen erzielten Veränderungen der Immunantwort transient sind und nicht ausreichen, um den Phänotyp der normalerweise resistenten C57BL/6- bzw. empfänglichen Balb/c-Mäuse auf lange Sicht umzukehren.

Für den gegenüber einer Infektion mit *L. major* resistenten Mausstamm C3H wurde gezeigt,^[16] dass die Neutralisierung von IL-12 durch Antikörper bei der C3H-Maus einen empfänglichen Phänotyp induziert, während die Behandlung von Balb/c-Tieren mit exogenem IL-12 während der ersten sieben Tage nach der Infektion die Beherrschung der Krankheit

ermöglichte.^[30] Eine andere Studie zeigt hingegen, dass, obwohl die Injektion von anti-IL-12-Antikörpern zum Zeitpunkt der Infektion eine starke T_H2-Antwort in den C3H-Tieren fördert, diese Antwort transient ist und nicht ausreicht, um den normalerweise resistenten Phänotyp auf lange Sicht umzukehren.^[31] In dem ebenfalls resistenten Stamm C57BL/6 und dem empfänglichen Stamm Balb/c scheint die frühe Produktion von IL-12 sogar gleich zu sein, obwohl die Krankheit ihren unterschiedlichen Verlauf nimmt.^[32] Auch wurde gezeigt, dass die Behandlung mit anti-IL-12-Antikörpern in der C57BL/6-Maus am wirkungsvollsten ist, wenn sie sieben Tage nach der Infektion begonnen wird.^[33;34] IL-12p40 defiziente C57BL/6-Tiere, die mit IL-12 behandelt wurden, waren anfänglich in der Lage, eine schützende T_H1-Antwort zu entwickeln. Einige Wochen nach Beendigung der IL-12-Gabe generierten die Tiere hingegen eine T_H2-Antwort.^[35] Für IFN γ wurden ebenfalls widersprüchliche Ergebnisse erhalten. Einerseits wurde für den resistenten Stamm C3H gezeigt,^[36] dass die Versuchstiere nach einer einzelnen Injektion von anti-IFN γ zwei Tage vor der Infektion empfänglich für die Krankheit wurden und zwischen zehn und fünfzehn Wochen nach der Infektion starben. Auch C3H-Tiere, die während der ersten 48 Stunden nach der Infektion mit Antikörpern gegen IFN γ behandelt wurden,^[37] zeigten noch diese erhöhte Empfänglichkeit gegenüber dem Ausbruch der Krankheit, während hingegen Tiere, die am dritten Tag nach der Infektion oder später mit anti-IFN γ -Antikörpern behandelt wurden, die Krankheit beherrschten. Wurde der empfänglichen Balb/c-Maus zum Zeitpunkt der Infektion IFN γ verabreicht,^[36] so stieg die IFN γ -Expression in den ersten drei Tagen um das Fünf- bis Sechsfache an, während die Expression von IL-4 und IL-5 signifikant reduziert wurde. Diese veränderte initiale Zytokinexpression verzögerte jedoch nur die Ausbildung der Läsionen, langfristig konnten diese Versuchstiere keine Kontrolle über die Läsionen gewinnen.

Auch die Untersuchung von IL-4 zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* zeigt kontroverse Ergebnisse. So wurden für IL-4 transgene Tiere vom Stamm C3H empfänglich gegenüber der Infektion mit *L. major*,^[38] während in infizierten Balb/c-Mäusen, die zum Zeitpunkt der Infektion Antikörper gegen IL-4 erhielten^[39] bzw. für IL-4 defizient waren,^[40] der Ausbruch der Krankheit verhindert wurde. Andererseits konvertierten die Balb/c-Mäuse durch das Fehlen von IL-4 allein nicht zu einem vollständig resistenten Phänotyp^[41] und auch in den resistenten C57BL/6-Mäusen konnte eine frühe aber transiente IL-4-Expression nachgewiesen werden.^[42]

Neben den Zytokinen scheinen auch Faktoren wie die Antigenmenge und die Art der Kostimulation die Differenzierung zu beeinflussen.^[43;44;45] Auch die Ausbreitung der *L. major*

Parasiten vom Infektionsort aus in den Körper der infizierten Tiere scheint eine wichtige Rolle für den nachfolgenden Infektionsverlauf zu spielen. So wurde gezeigt,^[12] dass die frühe Ausbreitung der Parasiten im Körper in den infizierten Tieren der beiden Stämme unterschiedlich verläuft.

Die bisherigen Forschungsergebnisse liefern somit kein übereinstimmendes Bild von der genauen Zusammensetzung und dem Einfluss des Zytokinmilieus im drainierenden Lymphknoten zum Zeitpunkt der T-Zellaktivierung auf die Differenzierung der naiven CD4⁺-T-Zellen in T_H1- bzw. T_H2-Zellen. Da die Analyse von Zytokinen *in vivo* schwierig ist, weil sie schnell gebildet werden, sich aber auch schnell im Gewebe verteilen, wurden viele Studien, in denen bisher die Expression von Zytokinen untersucht wurde, *in vitro* mit Hilfe von Zellkulturen durchgeführt. Ein großer Nachteil bei Verwendung von Zellkulturen besteht jedoch darin, dass immer eine Restimulation der isolierten Zellen entweder mit Zytokinen oder dem Antigen erfolgen muß. Dieses kann zu einem Verlust von wertvollen Informationen oder sogar zu verfälschten Ergebnissen führen, da eine manipulierte Immunreaktion beobachtet wird und nicht die, die unter natürlichen Bedingungen im Organismus stattfinden würde. Viele Studien zur Zytokinexpression wurden darüber hinaus an Homogenaten ganzer lymphatischer Organe durchgeführt. Dabei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass Lymphknoten aus unterschiedlichen Kompartimenten bestehen, also eine hochorganisierte Struktur aufweisen. Eine Studie unserer Arbeitsgruppe^[46] unterstreicht die Bedeutung einer kompartimentspezifischen Untersuchung von lymphatischem Gewebe, indem herausgefunden wurde, dass die Differenzierung der CD4⁺-T-Zellen in der Milz lokal innerhalb des T-Zellkompartiments stattfindet. Die Veränderungen in der Zytokinexpression, die im T-Zellareal nachgewiesen werden konnten, waren bei der Analyse des ganzen Organs nicht sichtbar. Um quantitative Daten über die kompartimentspezifische mRNA-Expression einer Reihe von Zytokinen *in vivo* in der Haut am Infektionsort und im drainierenden Lymphknoten zu erhalten, wurde für diese Arbeit eine Kombination von Laser-Mikrodissektion und quantitativer Real Time RT-PCR eingesetzt. Die Kombination dieser beiden Methoden mit immunhistologischen Färbungen weist entscheidende Vorteile zu bisherigen Verfahren auf: Zum ersten erlaubt sie die Untersuchung des lymphatischen Gewebes unter natürlichen Bedingungen, so dass keine Restimulation der Zellen erforderlich ist. Dieses ist bisher nur bei der Verwendung von genetisch manipulierten Tieren, den sogenannten bicistronischen Mäusen, möglich. In Studien von Mayer *et al.*^[47] und Mohrs *et al.*^[48] wurden bicistronische

IFN γ -enhanced yellow fluorescent protein (IFN γ -eYFP) bzw. bicistronische IL-4-enhanced green fluorescent protein (IL-4-eGFP) Reporter-Mäuse verwendet, die es erlauben, IFN γ - bzw. IL-4-produzierende Zellen im Gewebe zu detektieren. Der Nachteil dieser Methode besteht allerdings darin, dass nur ein Gen zur gleichen Zeit sichtbar gemacht werden kann. Der zweite Vorteil der Kombination von Laser-Mikrodissektion mit quantitativer Real Time RT-PCR besteht darin, dass quantitative Unterschiede in der Zytokinexpression auf Kompartimentebene dargestellt werden können, so dass auch Veränderungen in der Zytokinexpression, die bei der Analyse des ganzen Organs bisher nicht nachgewiesen werden konnten, nun sichtbar gemacht werden können.^[49;50] Der dritte bedeutende Vorteil der in dieser Arbeit eingesetzten Methode liegt darin, dass durch die exponentielle Amplifikation der mRNA während der PCR selbst geringste Veränderungen in der Zytokinexpression detektiert werden können. Ein Anstieg der Anzahl von mRNA-Transkripten in einem bestimmten Kompartiment kann dabei entweder auf die Initiation der RNA-Transkription bei einer in diesem Kompartiment lokalisierten Zellpopulation sein oder von Zellen verursacht werden, die die spezifische mRNA exprimieren und im Verlauf der Infektion in das jeweilige Kompartiment eingewandert sind. Für viele Zytokine wurde dabei bereits gezeigt,^[51] dass die mRNA-Expression signifikant mit der Proteinproduktion korreliert, so dass die kompartimentspezifische Analyse der RNA-Transkription eine detaillierte Betrachtung des Verlaufes einer Immunantwort *in vivo* ermöglicht.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Um Informationen über die Zusammensetzung des Zytokinmilieus im drainierenden Lymphknoten zum Zeitpunkt der T-Zellaktivierung zu erhalten, wurde in dieser Arbeit zunächst der Zeitpunkt der T-Zellproliferation in Verbindung mit der Parasitenlast bestimmt. Im Folgenden wurde das Zytokinmilieu der Haut und des T- und B-Zellareals des drainierenden Lymphknotens mit Hilfe von Low Density Arrays unmittelbar vor und während der T-Zellaktivierung untersucht. In diesem Screening wurde die mRNA-Expression von 47 Genen analysiert, die mit der inflammatorischen Antwort auf eine Infektion assoziiert werden. Die untersuchten Gene umfassen Chemokine, Interleukine, Zytokine, TGF- und TNF-Liganden und ihre Rezeptoren.

Folgende Fragestellung sollte damit in dieser Arbeit beantwortet werden:

- A Unterscheiden sich die empfänglichen Balb/c-Mäuse und die resistenten C57BL/6-Mäuse bereits in der Ausgangssituation in ihrer Zytokinausstattung?

Hierzu wurden gesunde Kontrolltiere beider Stämme auf ihre Zytokinexpression in der Haut am Infektionsort und im T- und B-Zellareal des poplitealen Lymphknotens untersucht.

- B Wird die Zytokinexpression in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* in den empfänglichen Balb/c-Mäusen und den resistenten C57BL/6-Mäusen unterschiedlich reguliert? Wenn ja, geben die Unterschiede einen Hinweis auf die Krankheitsentwicklung und die damit verbundene T_H1/T_H2 -Polarisierung im weiteren Verlauf der Infektion?

Hierzu wurde die Zytokinexpression in der Haut am Infektionsort und im T- und B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens zu vier frühen Zeitpunkten (acht Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden) nach der Infektion mit *L. major* untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Medien und Kits

Aceton, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
APAAP-Substrat	2 % (v/v) N,N-Dimethylformamid, 0,02 % Naphtol AS-MX Phosphat, 0,1 mM Levamisole in 0,1 M TRIS, pH 8,2
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland
Chloroform	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC (v/v) in Aqua bidest.
Deoxyribonuklease I-Kit	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Diaminobenzidin (DAB), (Liquid DAB + Substrate)	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

dNTP-Mix (10 mM)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Einbettmedium, Tissue-Tek®	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland
Eindeckmittel, AQUATEX®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol, 70 %, 75 %, 100 %	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fast Blue BB, Fast Red TR	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
5x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Hämalaun	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Levamisole	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Mastermix für reverse Transkription	4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP-Mix, 250 ng Random-Primer in 1 µl DEPC-H ₂ O
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Methanol, p.a.	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mausserum, normal	Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
Mineralöl	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

NaCl	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaCl-Lösung 0,9 %, steril	Berlin-Chemie AG, Berlin, Deutschland
NaN ₃	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylformamid,	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Naphtol AS-MX Phosphat	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Novy-Nicolle-McNeal Blut-Agar-Medium	50 ml Kaninchenblut + 50 ml PBS + 2 ml Penicillin/Streptomycin + 200 ml Brain Heart Infusion (BHI)-Medium (10,4 g in 200 ml H ₂ O bidest)
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PFA 4 %	4 % PFA in PBS
Phosphat gepufferte Saline (PBS) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Primer und TaqMan®-Sonden	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
Random-Primer (hexamers_rand)	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
Reverse Transkriptase (BD PowerScript™)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RPMI-1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

SDS - Natriumlaurylsulfat	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Silan	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Silan-Lösung, 2 %	2 % (v/v) Silan in Aceton 100 %
2x TaqMM, qPCR® Mastermix Plus	Eurogentec, Seraing, Belgien
TBS-Tween	0,05 M TRIS, 0,05 % (w/v) Tween®20, 0,86 % (w/v) NaCl in Aqua bidest., pH 7,6
Trinatrium	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan,	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
Toluidinblau	Waldeck GmbH & Co., Münster, Deutschland
Toluidinblau-Lösung (0,1 %)	0,1 % Toluidinblau (w/v), 1 % (v/v) Methanol, 15 % (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O
Tween®20	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland

2.1.2 Operationsmaterialien

Einmalskalpelle, Klinge 11	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Einwegspritzen, 1 ml, steril (BD Plastipak™)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Injektionskanülen, 0,45 x 13 mm (BD Microlance™ 3)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Instrumente aus hochlegiertem Edelstahl	Präparierschere, fein; Pinzette, anatomisch; Pinzette, chirurgisch; Uhrmacherpinzette
---	--

Tupfer, 10 x 10 cm, steril (Vliwasoft®)	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Rengsdorf, Deutschland
---	---

2.1.3 Glas- und Plastikmaterialien

Falcon®-Gefäße, 15 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
------------------------------	---

96 Well Multiply®-PCR-Platten, Polypropylen mit Klebefolie	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
---	---

Reaktionsgefäße, 0,5 und 1,5 ml, Polypropylen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
--	---

Cryogefäße	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
------------	------------------------------

Folienobjektträger, PALM® MembraneSlides, Polyethylen- naphthalat, 1mm	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland
--	---

Glasobjektträger Superfrost Iso - Norm 8037	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH und Co. KG, Braunschweig, Deutschland
--	---

Spritzenfilter PET 0,2 µm	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
---------------------------	--

2.1.4 Geräte

Real-Time PCR, ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
---	--

Real-Time PCR, ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Mikrodissektion, PALM® MicroBeam mit PALM® RoboSoftware	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland
Schüttler, Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Serienschnittmikrotom, CM300 Kryostat	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Jung Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
UV-Licht G 30 Watt Sylvana	Bauhaus, Hamburg, Deutschland
Vakuumkonzentrations-Zentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Waage, OHAUS® Adventurer™ AR0640, Messgenauigkeit 0,1 mg	Ohaus GmbH, Giessen, Deutschland
Waage, Kern 440-51N,	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Wärmeschrank, Heraeus Typ ST 5060	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Heraeus Megafuge 2.0R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau, Deutschland

Zentrifuge, MiniSpin®Plus

Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.5 Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden

<i>Oligoname</i>	<i>5'Nukleotidsequenz</i>	<i>Größe</i>	<i>Accession- Nummer</i>
mMLN51 probe	5' CACGGGAACTTCGAGGTGTGCCTAAC		
mMLN51 for	5' CCAAGCCAGCCTTCATTCTTG	134 bp	NM_138660.2
mMLN51 rev	5' TAACGCTTAGCTCGACCACTCTG		
mIFN γ probe	5' TGCCAAGTTTGAGGTCAACAACCCACAG		
mIFN γ for	5' GCAAGGCGAAAAAGGATGC	98 bp	NM_008337.2
mIFN γ rev	5' GACCACTCGGATGAGCTCATTG		
mIL-1 β probe	5'CATCTTTGAAGAAGAGCCCATCCTCTGTGAC		
mIL-1 β for	5'CTTCCAGGATGAGGACATGAG	99 bp	NM_008361.3
mIL-1 β rev	5'CACACCAGCAGGTTATCATC		
mIL-2 probe	5' CTTGCCCAAGCAGGCCACAGAATTG		
mIL-2 for	5' TCCCCAGGATGCTCACCTTC	98 bp	NM_008366.2
mIL-2 rev	5' ATGCCGCAGAGGTCCAAG		
mIL-4 probe	5' CCTGGATTCATCGATAAGCTGCACCATG		
mIL-4 for	5' GAGACTCTTTCGGGCTTTTCG	96 bp	NM_021283.1
mIL-4 rev	5' AGGCTTTCAGGAAGTCTTTCAG		
mIL-10 probe	5' CTGAGGCGCTGTCATCGATTTCTCCC		
mIL-10 for	5' TCCCTGGGTGAGAAGCTGAAG	96 bp	NM_010548.1
mIL-10 rev	5' CACCTGCTCCACTGCCTTG		
mIL-12p40 probe	5' CTCTACGAGGAACGCACCTTTCTGGTTACAC		
mIL-12p40 for	5' GAGCACTCCCCATTCCTACTTCTC	140 bp	NM_008352.2
mIL-12p40 rev	5' TGCATTGGACTTCGGTAGATGTC		
mIL-21 probe	5'CTGCATGCTCACAGTGCCCCTTTACATC		
mIL-21 for	5'TCGCCTCCTGATTAGACTTCG	159 bp	NM_021782.2
mIL-21 rev	5'GGCTTGAGTTTGGCCTTCTG		
mIL-27p28 probe	5' CAGGCATGGCATCACCTCTCTGACTCTGAG		
mIL-27p28 for	5' CATCTTCCCAATGTTTCCCTGAC	82 bp	NM_145636.1
mIL-27p28 rev	5' GTGTGGTAGCGAGGAAGCAG		
mCXCL-9 probe	5' CTTATCACTAGGGTTCCTCGAACTCCACAC		
mCXCL-9 for	5' TTGGGCATCATCTTCCTGGAG	131 bp	NM_008599.4
mCXCL-9 rev	5' GCAGGAGCATCGTGCATTC		
mCXCL-10 probe	5' CATCGTGGCAATGATCTCAACACGTGG		
mCXCL-10 for	5' GAGGGCCATAGGGAAGCTTG	131 bp	NM_021274.1
mCXCL-10 rev	5' CGGATTCAGACATCTCTGCTC		
mXCL-1 probe	5' CTAGGACTTCAGTCCCCACACCTTCCACAAC		
mXCL-1 for	5' GAGACTTCTCCTCCTGACTTTC	131 bp	NM_008510.1
mXCL-1 rev	5' CGCTGGGTTTGTAAAGTTCAC		
CD3 probe	5' CCAGACTATGAGCCCATCCGCAAAGG		
CD3 for	5' ATAGGAAGGCCAAGGCCAAG	145 bp	NM_007648.3
CD3 rev	5' TCAGGCCAGAATACAGGTC		
CD19 probe	5'CAACCAGTTGGCAGGATGATGGACTTCTCCT		
CD19 for	5'GAAAATGCAGATGAGGAGCTGG	146 bp	NM_009844.1
CD19 rev	5'GCTGCATAGAGGATCCCTCTC		

BDNF probe	5' TCACACACGCTCAGCTCCCCACGG		
BDNF for	5' CCTGGATGCCGCAAACATGTC	107 bp	NM_007540.4
BDNF rev	5' CTGCCGCTGTGACCCACTC		
L.m. Kp for	5' CCTATTTTACACCAACCCCCAGT	116 bp	EU370908.1
L.m. Kp rev	5' GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA		

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere und Haltungsbedingungen

Für die Infektionsversuche wurden weibliche Labormäuse vom Stamm C57BL/6, C57BL/6 Ly5.1, Balb/c und C3H verwendet. Die Mäuse vom Stamm C57BL/6, Balb/c und C3H wurden von der Charles River GmbH (Sulzfeld, Deutschland) in einem Alter von sechs bis acht Wochen bezogen. Die Mäuse vom Stamm C57BL/6 Ly5.1 stammen aus der Nachzucht von Zuchtpaaren, die ursprünglich von der Charles River GmbH bezogen wurden und in der spezifisch pathogenfreien Barrierehaltung der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck nachgezüchtet werden. Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen von drei bis sechs Tieren in Standardkäfigen (425 x 266 x 155 mm) aus transparentem Polycarbonat mit einem Abdeckgitter aus Edelstahl (E.Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland). Die Einstreu aus Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) wurde wöchentlich gewechselt und standardisiertes Pelletfutter (altromin 1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) sowie Wasser stand ohne Begrenzung zur Verfügung. Den Tieren wurde ein künstlicher Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden (Hellphase: 06:00 – 18:00 Uhr) vorgegeben. Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche und in einem Alter von acht bis zwölf Wochen zu Versuchsbeginn wurden die Tiere für die Infektionsversuche mit *L. major* eingesetzt.

Tierversuchsantrag V 312-72241.122-1 / 93-8/06.

2.2.2 Infektion mit *L. major*

Die *L. major* Parasiten, mit denen in dieser Arbeit die Infektionsversuche durchgeführt wurden, gehören zu dem Stamm MHOM/IL/81/FEBNI (Laskay *et al.*, 1995)^[12] und wurden uns freundlicherweise von Dr. Ger van Zandbergen (Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Lübeck) zur Verfügung gestellt. Die Leishmanien-Promastigoten werden *in vitro* in biphasischem Novy-Nicolle-McNeal (NNN) Blutagar-Medium bei 27°C in einer feuchten

Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert, bis sie die stationäre Wachstumsphase erreicht haben. Dann werden sie in frisches Medium transferiert. Nach jeder zwölften Passage wird eine neue *L. major* Kultur angelegt, indem die *L. major* Parasiten aus den poplitealen Lymphknoten infizierter Balb/c-Mäuse isoliert und dann kultiviert werden. Die Ernte der Leishmanien erfolgt in der stationären Phase. Die Leishmanien werden mit einer Pipette abgesaugt und in RPMI-Medium überführt. Nach Bestimmung der Zellzahl werden sie für zehn Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgossen und das entstandene Pellet in RPMI-Medium resuspendiert. Bei der Infektion mit *L. major* wurden die Hinterfüße der Versuchstiere mit *L. major* Promastigoten inokuliert. Dazu wurden 2×10^6 Parasiten in 50 µl RPMI-Medium in eine Einwegspritze aufgezogen und langsam subkutan in die Fußsohlen der Versuchstiere injiziert. Kontrolltiere wurden nur im linken Fuß inokuliert. Bei diesen Tieren erfolgte die Dokumentation des Infektionsverlaufs durch die wöchentliche Messung der Fußballen, wobei die Läsionsgröße als Quotient zwischen dem Wert des infizierten und des uninfizierten Fuß ermittelt wurde. Eine exakte Messung der Fußballendicke war zum Teil nur innerhalb der ersten 5 Wochen möglich, bevor die Läsionen zu ulzerieren begannen und die Tiere getötet wurden.

2.2.3 Organentnahme

Die Tiere wurden durch die Einleitung von CO₂ in das geschlossene Gefäß, in dem sie sich befanden, getötet. Die Entnahme von Milz, Lymphknoten und Haut erfolgte mit sterilem Operationsbesteck. Die entnommenen poplitealen Lymphknoten wurden vorsichtig von Fett befreit und sofort in flüssigen Stickstoff überführt. Die Haut der infizierten Hinterfüße wurde um die Infektionsstelle herum abgetrennt und ebenfalls tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte in Kryogefäßen bei -80°C.

2.2.4 Kryosektion

Von den bei der Organentnahme eingefrorenen und bei -80°C gelagerten poplitealen Lymphknoten und Hautproben wurden Kryoschnitte angefertigt. Zu diesem Zweck wurden die gefrorenen Organe bei einer Temperatur von -20°C auf einem Objektisch in Einbettmedium fixiert und mit einem Serienschneidmikrotom 10 µm dick geschnitten. Die Gefrierschnitte wurden entweder im Ganzen in ein Reaktionsgefäß mit 700 µl RLT-Puffer (RNeasy® Mini

Kit) gegeben oder einzeln auf silanbeschichtete Folienobjektträger (für die Mikrodissektion) aufgebracht. Jeder zehnte Schnitt wurde für die spätere immunhistologische Färbung auf einem Glasobjektträger fixiert. Die Schnitte wurden zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte auf den Folienobjektträgern wurden für die bessere Unterscheidung der Kompartimente bei der Mikrodissektion mit Toluidinblau gefärbt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die Schnitte auf den Glasobjektträgern wurden immunhistologisch gefärbt. Die Schnitte im Puffer wurden eine Minute gevortext, abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.5 Immunhistologie

Silanbeschichtung der Folienobjektträger

Die Folienobjektträger wurden vor Gebrauch mit Silan beschichtet. Dazu wurden sie zuerst für zwei Minuten in 100 % Aceton inkubiert und danach für ca. zehn bis 15 Minuten getrocknet. Die Objektträger wurden dann für fünf Minuten mit je 150 μl frisch angesetzter 2 %iger Silanlösung beschichtet. Nachfolgend wurden sie zweimal für je eine Minute mit 100 % Aceton und zweimal für eine Minute mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Abschließend wurden die Objektträger für ca. 30-45 Minuten bei 40°C im Wärmeschrank getrocknet und weitere 60 Minuten mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm bestrahlt.

Toluidinblau-Färbung

Für die Toluidinblau-Färbung wurden die Schnitte auf die mit Silan beschichteten Folienobjektträger aufgebracht und für zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden sie für zwei Minuten in Ethanol (75 %) fixiert und anschließend für zwei Minuten mit DEPC- H_2O gespült. Nachfolgend wurde die Toluidinblau-Lösung (0,1 %) durch einen Spritzenfilter auf die Schnitte aufgetropft und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte zweimal für zehn Sekunden in DEPC- H_2O gespült und in zwei aufeinanderfolgenden Schritten für jeweils zehn Sekunden in Ethanol (100 %) entwässert. Die Präparate wurden kurz getrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

T-Zell-Färbung

Für die eindeutige Identifikation der unterschiedlichen Kompartimente des drainierenden Lymphknotens wurden immunhistologisch gefärbte Gefrierschnitte hergestellt. Für die T-Zellfärbung wurde der T-Zellrezeptor mit anti- β TCR gefärbt. Jeder zehnte Gefrierschnitt wurde auf einen Glasobjektträger aufgebracht, bei Raumtemperatur für zwei Stunden getrocknet und danach für zehn Minuten bei -20°C in Methanol-Aceton (1:1 (v/v) Gemisch) fixiert. Danach wurden die Schnitte für zweimal fünf Minuten mit TBS-Tween auf dem Schüttler bei 150 rpm gespült. Für die T-Zellfärbung wurde der biotinylierte Primärantikörper gegen TCR β (bTCR β) 1:100 in TBS-Tween verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer dunkel gehaltenen, feuchten Kammer mit anschließendem Spülen in TBS-Tween. Extra Avidine Alkaline wurde 1:100 in TBS-Tween verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Nach der Inkubation von 30 Minuten in der Feuchtkammer und anschließendem Spülen mit TBS-Tween wurde für 5 Minuten mit Diaminobenzyl (DAB) die Farbreaktion entwickelt. Nach zweimaligem Spülen mit TBS-Tween wurde zur besseren Kontrastierung für 15 Sekunden Hämalaun auf die Schnitte gegeben und danach erneut gespült. Die Hämalaunfärbung führt in erster Linie zur kontrastreichen Darstellung der Zellkerne in blauem oder violetter Farbton, sie ist im Wesentlichen eine Kernfärbung. Die Schnitte wurden dann mit Aquatex® eingedeckt und über Nacht getrocknet.

B-Zellfärbung

Die B-Zellfärbung wurde anhand des Oberflächenmarkers B220 durchgeführt. Jeder zehnte Gefrierschnitt wurde auf einen Glasobjektträger aufgebracht, bei Raumtemperatur für zwei Stunden getrocknet und danach für zehn Minuten bei -20°C in Methanol-Aceton (1:1 (v/v) Gemisch) fixiert. Danach wurden die Schnitte für zweimal fünf Minuten mit TBS-Tween auf dem Schüttler bei 150 rpm gespült. Der Antikörper B220 (anti-CD45R/B220) wurde 1:100 in TBS-Tween verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer dunkel gehaltenen, feuchten Kammer mit anschließendem Spülen in TBS-Tween. Der biotinylierte Antikörper RARat (Rabbit anti Rat) wurde 1:1000 in TBS-Tween, 5 % Mäuseserum verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten in der Feuchtkammer mit anschließendem Spülen der Schnitte in TBS-Tween. Extra Avidine Alkaline wurde 1:100 in TBS-Tween verdünnt und auf die

Schnitte gegeben. Nach der Inkubation von 30 Minuten in der Feuchtkammer und anschließendem Spülen in TBS-Tween wurden die Schnitte für 25 Minuten bei 150 rpm mit Fast Red gefärbt. Nach dem Spülen mit TBS-Tween wurde zur besseren Kontrastierung für 15 Sekunden Hämalaun auf die Schnitte gegeben und danach erneut gespült. Die Schnitte wurden dann mit Aquatex® eingedeckt und über Nacht getrocknet.

Ki-67- und B-Zell-Färbung

Zur Bestimmung proliferierender T-Zellen im T-Zellareal wurde das Ki-67-Antigen, ein Protein, das während aller Phasen des aktiven Zellzyklus exprimiert wird, mit TEC-3 angefärbt. Zur besseren Orientierung im Schnitt wurden auch in diesen Präparaten die B-Zellen mit B220 angefärbt. Vor Beginn des Färbeprozesses wurden die Schnitte für ca. zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und getrocknet. Die Fixierung erfolgte durch die aufeinanderfolgende Inkubation der Schnitte für jeweils zehn Minuten in Chloroform und Aceton. Danach wurden die Schnitte für zweimal fünf Minuten mit TBS-Tween auf dem Schüttler bei 150 rpm gewaschen. Es erfolgte eine weitere Fixierung in 4 %igem PFA bei 4°C für 45 Minuten mit anschließendem Spülen mit TBS-Tween. Nun wurde der Antikörper TEC-3 (anti-Ki-67) 1:100 in PBS, 1 % BSA und 0,1 % NaN_3 verdünnt und auf den Objektträger getropft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur in einer dunkel gehaltenen, feuchten Kammer mit anschließendem Spülen mit TBS-Tween. Der biotinylierte Antikörper bRARat (Rabbit anti Rat) wurde 1:500 in TBS-Tween, 5 % Mäuseserum verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Es erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten in der Feuchtkammer mit anschließendem Spülen der Schnitte mit TBS-Tween. Extra Avidine Alkaline wurde 1:100 in TBS-Tween verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Nach der Inkubation von 30 Minuten in der Feuchtkammer und anschließendem Spülen mit TBS-Tween wurden die Schnitte für 25 Minuten mit Fast Red gefärbt. Nach dem erneuten Spülen wurde der Antikörper B220 (anti-CD45R/B220) 1:100 in PBS, 1 % BSA, 0,1 % NaN_3 verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten in der Feuchtkammer. Nach erneutem Spülen mit TBS-Tween erfolgte eine Inkubation mit dem 1:500 verdünnten biotinylierten RARat-Antikörper für 30 Minuten in der Feuchtkammer mit anschließendem Spülen der Schnitte. Extra Avidine Alkaline wurde 1:100 in TBS-Tween verdünnt und auf die Schnitte gegeben. Nach der 30minütigen Inkubation in der Feuchtkammer und anschließendem Spülen in TBS-Tween wurden die Schnitte für 25 Minuten bei 150 rpm mit Fast Blue gefärbt. Nach dem Spülen mit TBS-Tween wurde zur besseren Kontrastierung für 15 Sekunden Hämalaun auf

die Schnitte gegeben und erneut gespült. Die Schnitte wurden mit Aquatex® eingedeckt und über Nacht getrocknet.

In Tabelle 1 sind die bei den immunhistologischen Färbungen eingesetzten Antikörper aufgeführt.

<i>Abkürzung</i>	<i>Name</i>	<i>Firma</i>
bTCRβ	Biotin conjugated Hamster Anti-Mouse TCR β chain monoclonal antibody	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
B220	Purified anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2)	BD Biosciences Pharmingen™, Heidelberg, Deutschland
bRAR	Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins / Biotinylated	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Ex Av Alkaline	ExtrAvidine®-Alkaline Phosphatase	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
TEC-3	Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen (Clone TEC-3)	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Tabelle 1: In der Immunhistologie verwendete Antikörper

2.2.6 Bestimmung der Anzahl proliferierenden T-Zellen

Die Zahl proliferierender Zellen im T-Zellareal wurde am Lichtmikroskop (Leitz Laborlux 12, Leitz, Wetzlar, Deutschland) ermittelt. Dafür wurde eine Fläche von 100 Kleinquadraten, die einer Fläche von 81.768 μm^2 entsprachen, über den Bereich des T-Zellareals gelegt, der die höchste Dichte an proliferierenden T-Zellen aufwies und die Anzahl der proliferierenden T-Zellen bestimmt.

2.2.7 Laser Mikrodissektion

Durch den Vergleich der immunhistologisch gefärbten Schnitte mit den mit Toluidinblau-gefärbten Schnitten konnten die Kompartimente der untersuchten Lymphknoten eindeutig identifiziert werden. Die Kompartimente wurden mit Hilfe der PALM® RoboSoftware markiert und anschließend mit dem gepulsten, ultravioletten Laser der Mikrodissektionsanlage ausgeschnitten. Die Proben wurden in den Verschlusskappen von Reaktionsgefäßen in inertem Mineralöl gesammelt und nach Beendigung des Einsammelns in 350 μl einer 1:100

Mischung aus β -Mercaptoethanol und RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit) durch einminütiges Vortexen aufgeschlossen und denaturiert. Nach dem Abzentrifugieren für eine Minute bei 12.000 U/Min wurden die Proben bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Von jedem Kompartiment wurden so drei bis sechs Millionen Quadratmikrometer Gewebe für die mRNA-Analyse isoliert.

2.2.8 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Aus den Proben wurde die Gesamt-RNA mit dem RNeasy® Mini Kit nach Angaben des Herstellers isoliert. Dazu wurden die in RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit) befindlichen Proben aufgetaut, eine Minute gevortext und für zehn Sekunden bei 12.000 U/Min zentrifugiert. Die Proben wurden mit RLT-Puffer auf 700 μl aufgefüllt. Durch zehnmaliges Aufziehen der Probe mit einer Einwegspritze wurde die genomische DNA geschert. Nach der Zugabe von Ethanol (70 %) im Verhältnis 1:1 (v/v) wurden die Proben für eine gründliche Durchmischung zehnmal mit einer Pipettenspitze aufgezogen und dann auf die Säulen (RNeasy® Mini Kit) gegeben (RNA bindet an die Säulenmatrix). Die Proben wurden für 15 Sekunden bei 10.000 U/Min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Bei den aufeinanderfolgenden Waschschrritten wurden mit 700 μl RW1-Puffer (RNeasy® Mini Kit) sowie 500 μl RPE-Puffer (RNeasy® Mini Kit) jeweils für 15 Sekunden und mit 500 μl RPE-Puffer für zwei Minuten bei 10.000 U/Min nichtgebundene Zellbestandteile und Ethanolreste aus der Säule gewaschen. Abschließend wurden die Säulen für eine Minute bei 14.000 U/Min getrocknet. Die Elution der RNA aus den Säulen erfolgte mit 30 μl DEPC- H_2O für eine Minute bei 10.000 U/Min, wobei das erste Eluat für eine bessere Ausbeute ein zweites Mal auf die Säulen gegeben und der Elutionsschritt wiederholt wurde. Die Säulen wurden nun verworfen und das Volumen der Proben in einer Vakuumzentrifuge in 15 Minuten bei 60°C auf maximal acht Mikroliter reduziert. Handelte es sich bei den Proben um ganze Schnitte des poplitealen Lymphknotens, wurden vor der Reduktion in der Vakuumzentrifuge sechs Mikroliter zur Bestimmung der Leishmanienlast entnommen. Das Volumen der Proben wurde mit einer Pipette ausgemessen und gegebenenfalls mit DEPC- H_2O auf acht Mikroliter ergänzt. Zum Verdau genomischer DNA wurden die Proben mit je einem Mikroliter 10 x DNase-Puffer und DNase-I-Enzym (beides Deoxyribonuklease I-Kit) versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von 1,5 Mikroliter 15 mM EDTA-Stopplösung (Deoxyribonuklease I-Kit) wurde die Reaktion in einer zehnminütigen Inkubation bei 70°C

durch die Komplexierung des Enzymkofaktors Mg^{2+} gestoppt und RNA-Sekundärstrukturen denaturiert. Um die Renaturierung der Sekundärstrukturen zu unterbinden, wurden die Proben sofort danach auf Eis gekühlt und alle nachfolgenden Schritte auf Eis pipettiert. Die Proben wurden zur reversen Transkription mit je 8,5 Mikroliter gekühltem Reaktionsmix, bestehend aus vier Mikrolitern 5x First Strand Puffer, zwei Mikrolitern 0,1 M DTT, einem Mikroliter dNTP-Mix, einem Mikroliter Random-Primer (250 ng/ μ l) und 0,5 Mikrolitern Reverser Transkriptase II (RT II, SuperScript™ II RNase H Reverse Transkriptase, 200 U/ μ l) versetzt und aufeinanderfolgend für zehn Minuten bei 25°C (Bindung des Random-Primers an die RNA-Sequenz), 50 Minuten bei 42 °C (Reverse Transkription der mRNA in cDNA) und 15 Minuten bei 70°C (Reaktionsstopp) inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

2.2.9 Quantitative Real Time RT-PCR

Die Real Time RT-PCR-Technologie erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Zum PCR-Ansatz wird neben den spezifischen Primern auch eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben. Die Sonde ist am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff und am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff markiert. Wenn die intakte Sonde durch Licht einer Wellenlänge von 488 nm angeregt wird, so wird die Fluoreszenz-Emission des Reporterfarbstoffs durch die räumliche Nähe zu dem Quencherfarbstoff unterdrückt (Fluoreszenz-Energietransfer, FRET). Während der PCR-Reaktion wird die hybridisierte DNA-Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase zerschnitten. Durch die Sondenhydrolyse wird die räumliche Nähe zwischen Reporter und Quencher unterbrochen, und der Reporterfarbstoff kann das Fluoreszenzlicht emittieren. Eine Hydrolyse der Sonde durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität kann nur dann erfolgen, wenn es zu einer sequenzspezifischen Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz kommt. Entsprechend der Amplifikation des spezifischen PCR-Fragmentes steigt das Fluoreszenzsignal an. Dabei ist die Fluoreszenzzunahme dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional. Die Auswertung der Analyse erfolgt über den sogenannten Ct-Wert (cycle of treshold). Der Ct-Wert drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über das Grundrauschen ermittelt wird. Die Quantitativen Real Time RT-PCR Experimente wurden zum Teil mit Microfluidic Cards (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Diese Karten bestehen aus 384

Reaktionskammern mit einem Reaktionsvolumen von je einem Mikroliter. In diesen Kammern befinden sich in lyophilisierter Form die TaqMan[®]-Sonden- und Primersets, die aus einer Datenbank individuell ausgewählt werden konnten. Die Experimente erfolgten mit der Konfiguration 8x48, d.h. es konnten pro Karte acht Proben auf die Expression von 48 Genen hin untersucht werden.

Folgende 48 Gene wurden untersucht:

Housekeeping Gene:

MLN51 Metastatic lymph node 51
 HPRT-1 Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1

Chemokine

CCL-2 Chemokin (C-C motif) Ligand 2
 CCL-3 Chemokin (C-C motif) Ligand 3
 CCL-5 Chemokin (C-C motif) Ligand 5
 CCL-7 Chemokin (C-C motif) Ligand 7
 CCL-17 Chemokin (C-C motif) Ligand 17
 CXCL-2 Chemokin (C-X-C motif) Ligand 2
 CXCL-9 Chemokin (C-X-C motif) Ligand 9
 CXCL-10 Chemokin (C-X-C motif) Ligand 10
 XCL-1 Chemokin (C motif) Ligand 1

Chemokin-Rezeptoren

CCR-2 Chemokin (C-C motif) Rezeptor 2
 CCR-7 Chemokin (C-C motif) Rezeptor 7

Interleukine

IL-1 α	Interleukin 1 alpha	IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin 2	IL-3	Interleukin 3
IL-4	Interleukin 4	IL-5	Interleukin 5
IL-6	Interleukin 6	IL-7	Interleukin 7
IL-9	Interleukin 9	IL-10	Interleukin 10
IL-11	Interleukin 11	IL-12p35	Interleukin 12p35
IL-12p40	Interleukin 12p40	IL-13	Interleukin 13
IL-15	Interleukin 15	IL-16	Interleukin 16
IL-17	Interleukin 17	IL-17b	Interleukin 17b
IL-17e	Interleukin 17e	IL-18	Interleukin 18
IL-20	Interleukin 20	IL-21	Interleukin 21
IL-23 α	Interleukin 23alpha	IL-27	Interleukin 27

TGF Liganden

TGF α	Transforming growth factor alpha
TGF β 1	Transforming growth factor beta 1
TGF β 2	Transforming growth factor beta 2
TGF β 3	Transforming growth factor beta 3

TNF Liganden und Rezeptoren

LTA	Lymphotoxin A
TNF	Tumor necrosis factor
TNFRSF 6	Tumor necrosis factor receptor super family member 6 (FAS)

Interferone

IFN β 1	Interferon beta 1
IFN γ	Interferon gamma

Weitere Gene

PRF 1	Perforin 1 (pore forming protein)
-------	-----------------------------------

Für die Analyse wurden die cDNA-Proben mit H₂O_{bidest} auf 45 μ l aufgefüllt und mit 45 μ l qPCRTM Mastermix versetzt. Nach Zugabe der Proben in die Befüllungskanäle wurden sie durch zweimaliges Zentrifugieren mit 1200g/min für je eine Minute über das Kapillarsystem gleichmäßig in die 48 Kammern verteilt. Das System wurde verschlossen und 384 Reaktionen wurden gleichzeitig im ABI 7900 gemessen. Nach den Screening-Experimenten mit den Micro Fluidic Cards wurden die weiteren Quantitativen Real Time RT-PCR Experimente in 96 Well Platten durchgeführt. Die dafür ausgewählten Zytokine und das House Keeping Gen MLN51 sind mit ihren Primer- und Sondensequenzen (ermittelt mit Clone Manager 7.01, S&D Software, Cyry, NC, USA) im Materialteil aufgeführt.

Zur besseren Vergleichbarkeit erfolgte die Quantifizierung für die Gene IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-12p40, IL-21, IL-27p28 und XCL-1 mit dem ABI PRISM[®] 7000 und für die Gene IFN γ , IL-10, CXCL-9, CXCL-10, CD3 und CD19 mit dem ABI PRISM[®] 7900 Sequence Detection System. Primer wurden mit einer Endkonzentration von 900 pM, Sonden mit 200 pM und der qPCRTM Mastermix einfach eingesetzt. Pro Reaktion wurden 0,625 μ l cDNA in 25 μ l Reaktionsansatz (ABI PRISM[®] 7000) oder in 20 μ l Reaktionsansatz (ABI PRISM[®] 7900) eingesetzt. In beiden Geräten wurden die Proben zunächst zur Aktivierung der Taq-Polymerase für sechs Minuten auf 95°C erhitzt. Es folgten 50 Zyklen mit 95°C (30s) zum Denaturieren der doppelsträngigen cDNA und 60°C (1 min) zum Primerannealing und die

Elongation durch die Taq-Polymerase. Die Bestimmung des Ct-Wertes erfolgte für das PCR-Gerät ABI-PRISM® 7000 mit der SDS 1.1 RQ Software, für das ABI PRISM 7900 Gerät mit der SDS 2.2.1 RQ Software (beides Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Der Schwellenwert der PCR-Daten wurde bei allen Genen auf 0,20 gesetzt. Für jede Probe wurde die Kopienanzahl eines Zytokins pro Kopie MLN51 mit der Formel $2^{\text{CtMLN51}-\text{CtZytokin}}$ bestimmt.^[49] Wurde für MLN51 ein Ct von 36, für ein Zytokin ein Ct von 38 überschritten, wurden die Proben von der Auswertung ausgeschlossen, da in diesen Bereichen eine zuverlässige Detektion in dem hier angewandten System nicht mehr sichergestellt werden konnte.

2.2.10 Bestimmung der Leishmanienlast

Für die Bestimmung der Leishmanienlast wurden die sechs Mikroliter umfassenden Proben, die nach der RNA-Isolation bei den ganzen Schnitten vor der Reduktion durch die Vakuumentrifuge abgenommen wurden, mit DEPC-H₂O auf sieben Mikroliter ergänzt. Die Quantifizierung erfolgte mit dem ABI PRISM® 7900. Die Primer für BDNF wurden mit einer Endkonzentration von 500 pM, die Sonde mit 200 pM und der qPCR™ Mastermix einfach eingesetzt. Pro Reaktionsansatz wurde ein Mikroliter des Eluats in 20 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Für die Quantifizierung der Kinetoplasten-DNA wurden die Primer in einer Endkonzentration von 250 pM eingesetzt. Anstatt einer Sonde wurde für diese Quantifizierung SYBR-Green Mastermix einfach eingesetzt. Das PCR-Programm entspricht dem aus Abschnitt 2.2.9. Wurde für BDNF ein Ct von 36, für die Kinetoplasten ein Ct von 38 überschritten, wurden die Proben von der Auswertung ausgeschlossen, da in diesen Bereichen eine zuverlässige Detektion in dem hier angewandten System nicht mehr sichergestellt werden konnte.

2.2.11 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit SPSS 15.0 für Windows ausgewertet. Es wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt sowie Signifikanzen mit nichtparametrischen Tests für zwei unabhängige Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet. Dabei galt es als signifikant, wenn der p-Wert unter 0,05 lag. Die Graphiken wurden mit SigmaPlot® 2001 für Windows erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Der Krankheitsverlauf einer kutanen *L. major* Infektion in empfänglichen Balb/c- und resistenten C57BL/6- Tieren

Der Krankheitsverlauf einer kutanen *L. major* Infektion hängt von der Menge der injizierten Parasiten sowie dem Ort der Applikation ab. Die Inokulation der Fußsohlen von Versuchstieren mit *L. major* Parasiten führt im empfänglichen Mausstamm Balb/c zu einer Schwellung der Fußsohle, die als Parameter für den Krankheitsverlauf herangezogen werden kann. Bei resistenten Stämmen wie C57BL/6 und C3H hingegen nimmt die Fußdicke nach der Injektion der Parasiten nicht zu. Zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* ist der unterschiedliche Krankheitsverlauf im empfänglichen und resistenten Mausstamm optisch hingegen noch nicht erkennbar. Um zu zeigen, dass die für das Experiment verwendeten *L. major* Parasiten in den empfänglichen Balb/c-Mäusen eine Schwellung des infizierten Fußes hervorrufen, wurde die Fußdicke von infizierten Tieren beider Stämme über einen Zeitraum von sechs Wochen hinweg dokumentiert.

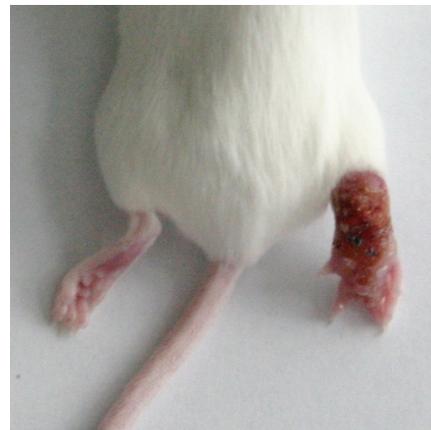
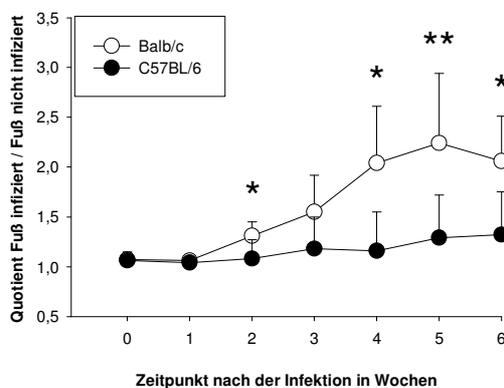


Abbildung 1:

Links: Relative Fußdicke der Versuchstiere nach der Infektion mit *L. major*. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus zwei Infektionsversuchen (Balb/c: n = 6-8; C57BL/6: n = 4). Für die Infektion wurden die rechten Hinterfüße der Versuchstiere mit 2×10^6 Parasiten infiziert. Die Messung der Fußdicke erfolgte in wöchentlichen Abständen. Gezeigt ist die relative Zunahme der Fußdicke des infizierten Fußes bezogen auf den nicht infizierten Fuß. *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; Mann-Whitney U Test; p zeigt einen signifikanten Unterschied in der Fußdicke zwischen C57BL/6- und Balb/c-Tieren.

Rechts: Dargestellt ist ein mit 2×10^6 *Leishmania major* Promastigoten infizierter Fuß einer Balb/c-Maus fünf Wochen nach der Infektion. Die Fußschwellung mit beginnender Nekrose des infizierten Fußes ist deutlich sichtbar.

Abbildung 1 zeigt übereinstimmend mit den Literaturdaten, dass die Injektion von 2×10^6 *L. major* Promastigoten in die Fußsohle der Versuchstiere bei den Balb/c-Tieren im Verlauf der Infektion zu einer Schwellung der Fußsohle führte. Bei den C57BL/6-Mäusen nahm die Fußdicke hingegen nach der Injektion der Parasiten nicht zu.

3.2 Bestimmung der Zytokinexpression in der Haut

3.2.1 Keine Unterschiede in der konstitutiven Zytokinexpression zwischen empfänglichen Balb/c- und resistenten C57BL/6-Mäusen

Um herauszufinden, ob die Empfänglichkeit der Balb/c-Mäuse gegenüber der Infektion mit *L. major* damit zusammenhängt, dass sich die Zytokinausstattung der Haut der Balb/c-Mäuse von der der resistenten C57BL/6-Mäuse unterscheidet, wurde die mRNA-Expression der Chemokine CXCL-2, CXCL-9, CXCL-10, XCL-1 und CCL-3, der T_H1-Zytokine IFN γ , IL-2, IL-12p40, IL-1 β und IL-27p28, des T_H2-Zytokins IL-4 sowie der homeostatischen Zytokine IL-10 und IL-21 in der Haut der Fußsohle von den Kontrolltieren beider Stämme mit quantitativer Real Time RT-PCR untersucht.

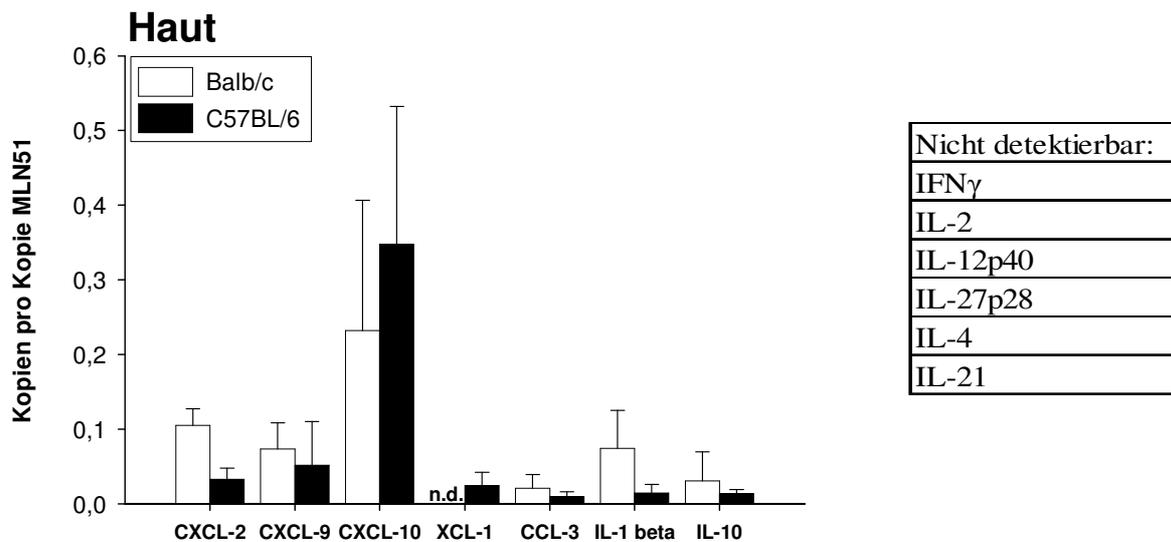


Abbildung 2:

Links: Expression der Chemokin- und Zytokingene in der Haut von Balb/c- und C57BL/6-Kontrolltieren. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der cDNA-Kopien, normalisiert auf das Housekeeping-Gen MLN51 (n = 3-6). Nur die Chemokine CXCL-2, CXCL-9, CXCL-10, XCL-1 und CCL-3 sowie das T_H1-Zytokin IL-1 β und das regulatorische Zytokin IL-10 werden konstitutiv in der Haut exprimiert.

Rechts: Eine konstitutive mRNA-Expression der T_H1-Zytokine IFN γ , IL-2, IL-12p40 und IL-27p28 sowie des T_H2-Zytokins IL-4 und des regulatorischen Zytokins IL-21 konnte in der Haut der gesunden Tiere in beiden Stämmen nicht nachgewiesen werden.

In Abbildung 2 wird gezeigt, dass in der Haut der gesunden Tiere nicht für alle der untersuchten Gene eine konstitutive mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte. So wurde in der Haut bevorzugt die konstitutive mRNA-Expression von Chemokinen, jedoch nur von wenigen Zytokinen nachgewiesen. Die Chemokine CXCL-2, CXCL-9, CXCL-10 und CCL-3, sowie die Zytokine IL-1 β und IL-10 wurden von den Kontrolltieren beider Stämme konstitutiv exprimiert. Signifikante Unterschiede in der mRNA-Expression dieser Zytokine konnten zwischen den beiden Stämmen nicht detektiert werden. Eine Grundexpression des Chemokins XCL-1 konnte nur in den C57BL/6-Kontrolltieren, nicht aber in den Balb/c-Kontrolltieren festgestellt werden. Eine konstitutive mRNA-Expression der T_H1-Zytokine IFN γ , IL-2, IL-12p40 und IL-27p28 sowie des T_H2-Zytokins IL-4 und des regulatorischen Zytokins IL-21 konnte in der Haut der gesunden Tiere in beiden Stämmen nicht nachgewiesen werden.

3.2.2 Empfängliche Balb/c-Mäuse und resistente C57BL/6-Mäuse unterscheiden sich in der frühen Chemokinexpression am Infektionsort

Die Untersuchung der Haut der Fußsohle von gesunden Tieren der Stämme Balb/c und C57BL/6 zeigte, dass sich die Tiere in ihrer konstitutiven Zytokinexpression nicht unterscheiden. Ob die empfänglichen Balb/c-Tiere und die resistenten C57BL/6-Tiere möglicherweise nach der Inokulation mit *L. major* an der Infektionsstelle Unterschiede in der Zytokinexpression aufweisen, sollte die Untersuchung der Haut zu frühen Zeitpunkten (vier Stunden, acht Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden) nach der Infektion mit *L. major* zeigen. Tatsächlich konnten bei drei Chemokinen Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen beiden Stämmen nachgewiesen werden.

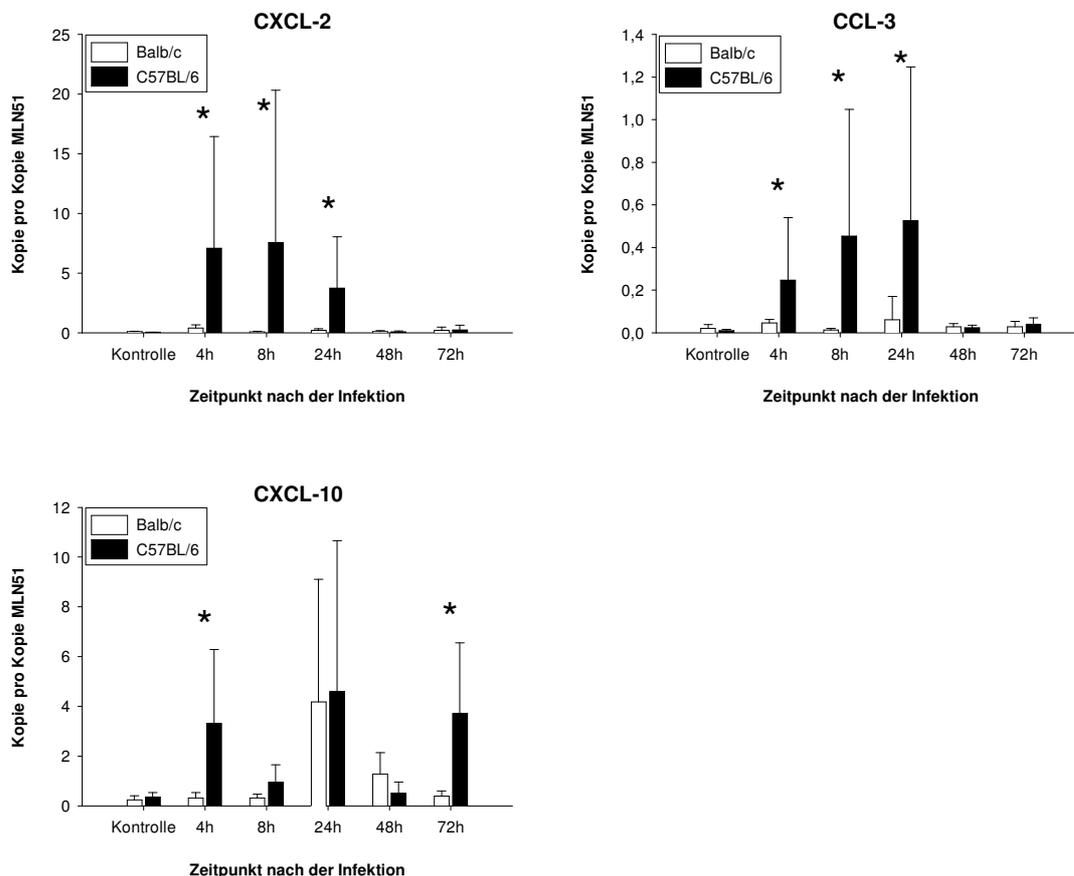


Abbildung 3:

Expression der mRNA der Chemokine CXCL-2, CCL-3 und CXCL-10 in der Haut infizierter Balb/c- und C57BL/6-Mäuse in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major*. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der cDNA-Kopien, normalisiert auf das Housekeeping-Gen MLN51 (n = 3-6). Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der quantitativen Real Time RT-PCR untersucht. *: $p \leq 0,05$; Mann-Whitney U Test; p zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen C57BL/6- und Balb/c-Mäusen.

Die mRNA-Expression der beiden Chemokine CXCL-2 und CCL-3 wurde von den C57BL/6-Mäusen bereits nach vier Stunden deutlich verstärkt. Beide Gene wurden bis 24 Stunden nach der Infektion auf diesem erhöhten Niveau exprimiert, bevor ihre mRNA-Expression nach 48 Stunden wieder auf das Ausgangsniveau herunterreguliert wurde. In der Haut der Balb/c-Mäuse wurden beide Chemokine im Gegensatz dazu nicht verstärkt exprimiert. Die mRNA-Expression von CXCL-10 stieg dagegen in beiden Stämmen an, jedoch zeitversetzt. Während von den C57BL/6-Mäusen bereits nach vier Stunden die Expression verstärkt wurde, konnte bei den Balb/c-Mäusen erst nach 24 Stunden ein Anstieg der mRNA-Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den Balb/c-Mäusen, in denen die mRNA-Expression von CXCL-10 nach 48 Stunden wieder reduziert wurde, konnte in der Haut der C57BL/6-Mäuse auch noch 72 Stunden nach der Infektion eine verstärkte mRNA-Expression von CXCL-10 nachgewiesen werden.

3.2.3 Die Parasitenlast am Infektionsort ist in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* bei Balb/c- und C57BL/6-Mäusen gleich

Um herauszufinden, ob die unterschiedliche Chemokin-Expression in der Haut zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* mit einer unterschiedlichen Parasitenlast am Infektionsort korreliert, wurde die Leishmanienlast in der Haut der Kontrolltiere zu vier frühen Zeitpunkten (acht Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach der Infektion) anhand der Minicircle-DNA der Kinetoplasten bestimmt. Die PCR zur Amplifikation der Kinetoplasten-DNA gilt als sensitivste molekulare Nachweismethode einer Leishmaniose, da ca. 10.000 DNA-Minicircle-Moleküle in jeder Leishmanie vorliegen.^[52] Normalisiert wurden die Werte auf das Housekeeping-Gen BDNF, welches als single-copy-Gen nur einmal pro Mauszelle vorliegt.

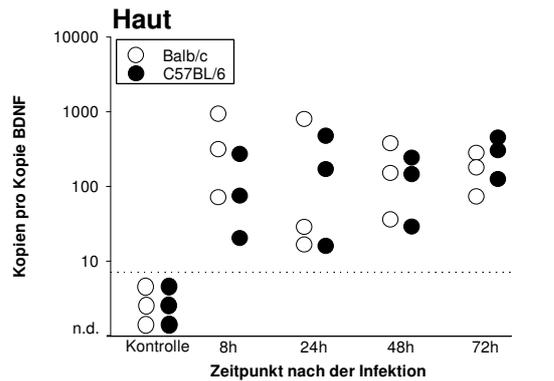


Abbildung 4:

Bestimmung der Leishmanienlast in der Haut am Infektionsort infizierter Balb/c- (weiße Kreise) und C57BL/6-Mäuse (schwarze Kreise) in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major*. Für die Bestimmung der Leishmanienlast wurden fünf ganze Schnitte der infizierten Haut mit quantifizierender Real Time RT-PCR untersucht. Als Housekeeping-Gen wurde BDNF verwendet, ein single-copy-Gen im Mausgenom. Die Anzahl der untersuchten Tiere beträgt bei beiden Stämmen $n = 3$. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Stämmen konnte nicht festgestellt werden.

In der Haut der infizierten Fußballen war kurze Zeit nach der Infektion mit *L. major* in beiden Stämmen eine große Anzahl von Parasiten nachweisbar (Abb. 4). Signifikante Unterschiede in der Leishmanienlast am Infektionsort konnten zwischen beiden Stämmen nicht nachgewiesen werden, so dass es keinen Hinweis darauf gibt, dass die unterschiedliche mRNA-Expression der Chemokine CXCL-2, CCL-3 und CXCL-10 durch Unterschiede in der Höhe der Leishmanienlast am Infektionsort hervorgerufen wurde.

3.3 Bestimmung der Zytokinexpression im T- und B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens

Die Bestimmung der Zytokinexpression in der Haut hat gezeigt, dass die resistenten C57BL/6-Mäuse und die empfänglichen Balb/c-Mäuse die Chemokine CXCL-2, CCL-3 sowie CXCL-10 unterschiedlich exprimieren. Diese differentielle Expression von Chemokinen am Infektionsort kann einen Einfluss auf den Influx von frühen Effektorzellen wie Granulozyten und NK-Zellen ausüben, die wiederum weitere Zellen wie z. B. Makrophagen rekrutieren. Dieses führt möglicherweise zu einem lokal unterschiedlichen Zytokinmilieu mit Folgen für die T-Zellaktivierung. Da angenommen wird, dass das Zytokinmilieu, das während der T-Zellaktivierung im drainierenden Lymphknoten vorherrscht, entscheidend für die T_H1 - bzw. T_H2 -Polarisierung der naiven $CD4^+$ -T-Zellen ist, wurde als nächstes das Zytokinmilieu

im poplitealen Lymphknoten empfänglicher Balb/c-Mäuse und resistenter C57BL/6-Mäuse zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* bestimmt. Bei dieser Untersuchung wurde berücksichtigt, dass sich die Zytokinexpression lokal in den einzelnen Kompartimenten des drainierenden Lymphknotens verändert und deshalb Unterschiede in der Zytokinexpression bei der Analyse von ganzen Lymphknotenschnitten oft verborgen bleiben. Aus diesem Grund wurden das T- und das B-Zellareal separat untersucht.

3.3.1 Die Kombination aus Laser-Mikrodissektion und Real Time RT-PCR ermöglicht die differentielle Analyse der Kompartimente des drainierenden Lymphknotens

Die Kombination aus Laser-Mikrodissektion und Real Time RT-PCR verbunden mit immunhistologischen Färbungen erlaubt die Untersuchung des lymphatischen Gewebes unter natürlichen Bedingungen, da keine Restimulation der Zellen erforderlich ist. Durch die differentielle Analyse der Kompartimente des drainierenden Lymphknotens wird zudem die lokale Information über die Zytokinexpression im jeweiligen Kompartiments erhalten. Die kompartimentspezifische Analyse des drainierenden Lymphknotens setzt jedoch voraus, dass die einzelnen Kompartimente des Lymphknotens eindeutig erkannt und getrennt voneinander isoliert werden können. Dieses wurde erreicht, indem jeder zehnte Schnitt eines zu untersuchenden Lymphknotens histologisch angefärbt wurde.

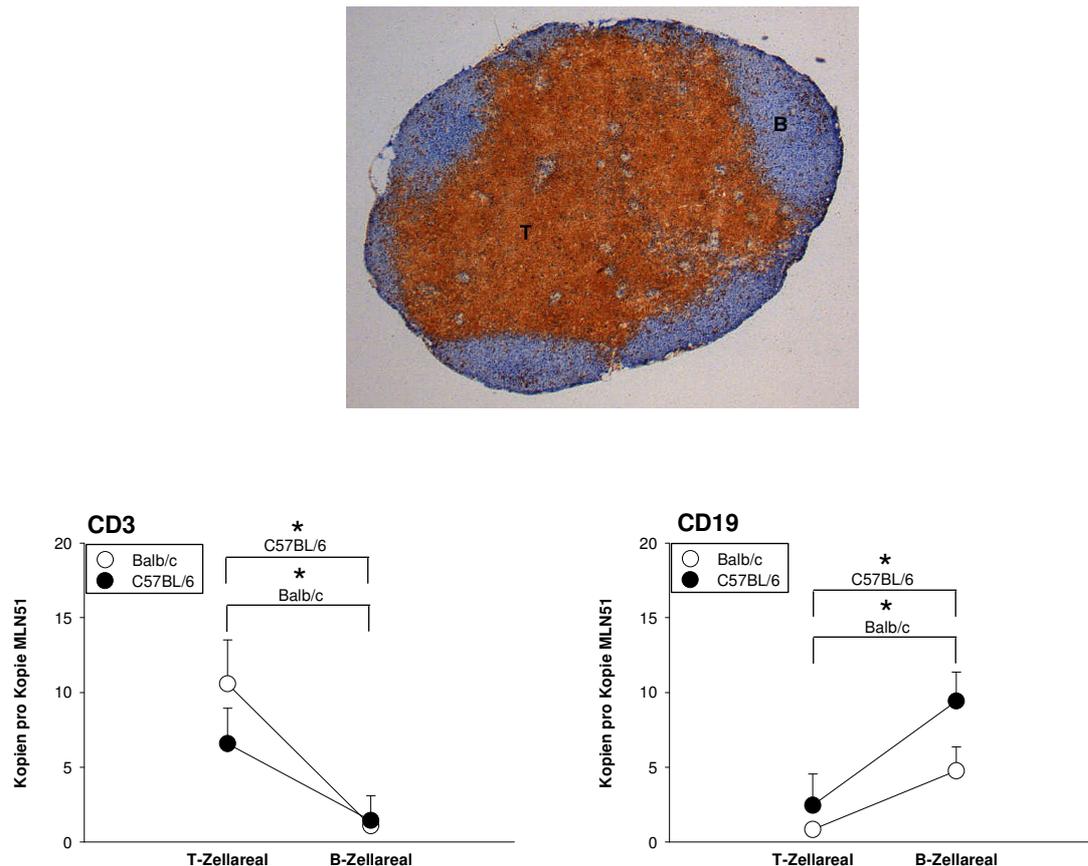


Abbildung 5:

Oben: Dargestellt ist der popliteale Lymphknoten einer Balb/c-Maus vor der Infektion mit *L. major*. Der Lymphknotenschnitt wurde doppelt angefärbt. Die B-Zellen wurden mit anti-B-220 angefärbt und erscheinen blau. Die T-Zellen wurden mit anti-TCR β angefärbt, sie erscheinen im Präparat braun. Durch die Doppelfärbung wird die deutliche Unterteilung des Lymphknotens in T- und B-Zellkompartiment sichtbar.

Unten: Mit Hilfe der Oberflächenmarker CD3 und CD19 wurde mittels quantitativer Real Time RT-PCR die exakte Trennung von T- und B-Zellareal überprüft. Während im T-Zellbereich vor allem die mRNA-Expression von CD3 nachgewiesen werden konnte, wurde im B-Zellbereich wie erwartet mRNA von CD19 exprimiert.

*: $p \leq 0,01$; Mann-Whitney U Test; p zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen T- und B-Zellareal

Abbildung 5 zeigt einen Lymphknotenschnitt, in dem die B-Zellen blau und die T-Zellen braun angefärbt wurden, wodurch das T- und B-Zellareal gut erkennbar dargestellt werden konnten. Durch den mikroskopischen Vergleich solcher immunhistologisch gefärbten Schnitte mit toluidinblaugefärbten Schnitten konnten die T- und B-Zellareale in den zu untersuchenden Lymphknotenschnitten eindeutig identifiziert und unter Verwendung der Mikrodissektion aus kryofixierten Schnitten getrennt voneinander isoliert werden. In der nachfolgenden quantifizierenden Real Time RT-PCR wurde die Expression von CD3 und CD19 bestimmt. Es zeigte sich (Abbildung 5, unten), dass CD3 vor allem im T-Zellareal, CD19 vor allem im B-Zellareal nachgewiesen werden konnte. CD3 und CD19 sind Oberflächenmarker,

die einen Teil des T- bzw. B-Zellrezeptor-Komplexes darstellen. Durch ihre spezifische Lokalisation auf den T- bzw. B-Zellen kann ihre mRNA-Expression als Parameter für die exakte Trennung von T- und B-Zellareal herangezogen werden. Das Ergebnis bestätigt, dass das T- und das B-Zellareal des Lymphknotens mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion exakt voneinander getrennt werden konnten.

3.3.2 Die konstitutive Zytokinexpression ist in beiden Stämmen unterschiedlich im T- und B-Zellbereich der poplitealen Lymphknoten verteilt

Es ist noch nicht bekannt, ob in der Maus eine konstitutive Expression der Zytokingene im drainierenden Lymphknoten vor Beginn einer Immunantwort erfolgt und ob diese kompartimentspezifisch ist. Ebenfalls unbekannt ist, ob sich die mRNA-Expression der Chemokine und Zytokine schon vor Beginn der Infektion in den beiden Stämmen C57BL/6 und Balb/c im Lymphknoten unterscheidet. Aus diesem Grund wurde die konstitutive mRNA-Expression der Chemokine CXCL-9, CXCL-10 und XCL-1, der T_H1-Zytokine IFN γ , IL-2, IL-12p40, IL-1 β und IL-27p28, des T_H2-Zytokins IL-4 sowie der homeostatischen Zytokine IL-10 und IL-21 im T- und B-Zellareal des poplitealen Lymphknotens von Kontrolltieren beider Stämme mit quantitativer Real Time RT-PCR untersucht.

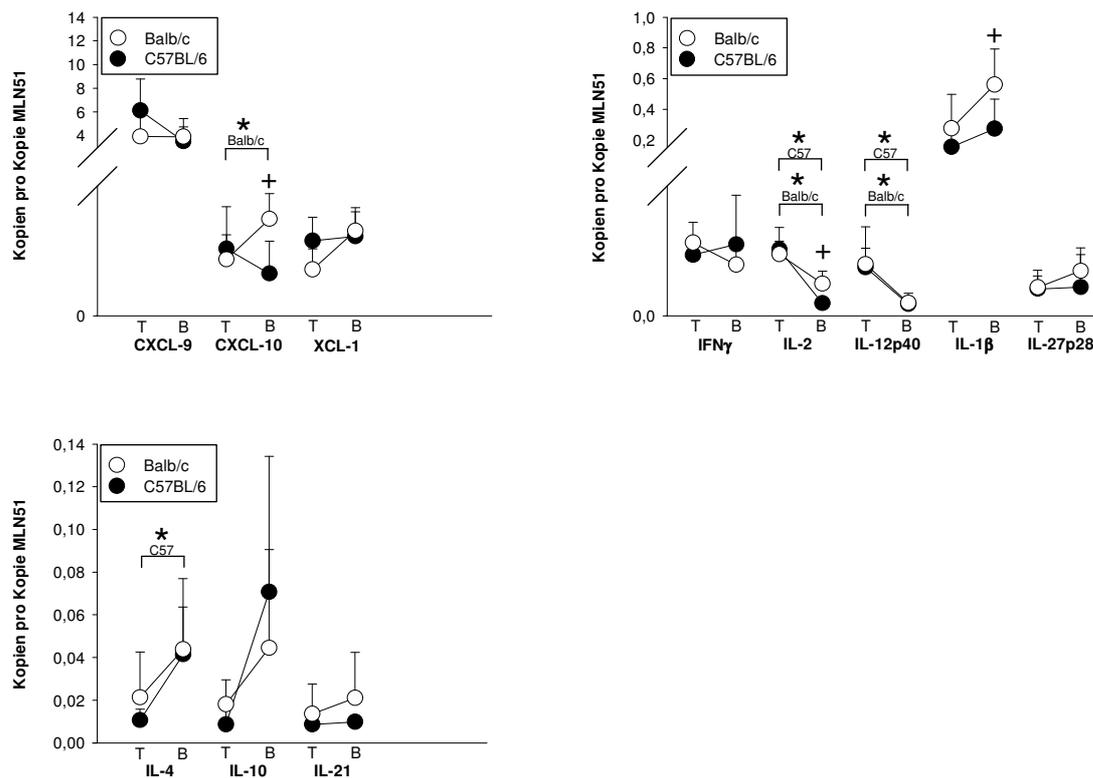


Abbildung 6:

Expression der Chemokine und der T_H1 -, T_H2 - und regulatorischen Zytokine im T- und B-Zellareal poplitealer Lymphknoten von Kontrolltieren beider Mausstämmen. Die T- (T) und B- (B) Zellzonen wurden mit Hilfe der Mikrodissektion aus gefrorenen, toluidinblau-gefärbten Lymphknoten-Schnitten für die mRNA-Analyse isoliert. Die Abbildung zeigt die mRNA-Expression der Chemokine CXCL-9, CXCL-10 und XCL-1, der T_H1 -Zytokine IFN γ , IL-2, IL-12p40, IL-1 β und IL-27p28, des T_H2 -Zytokins IL-4 und der regulatorischen Zytokine IL-10 und IL-21. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der cDNA-Kopien, normalisiert auf das House-keeping-Gen MLN51 (n = 3-6).

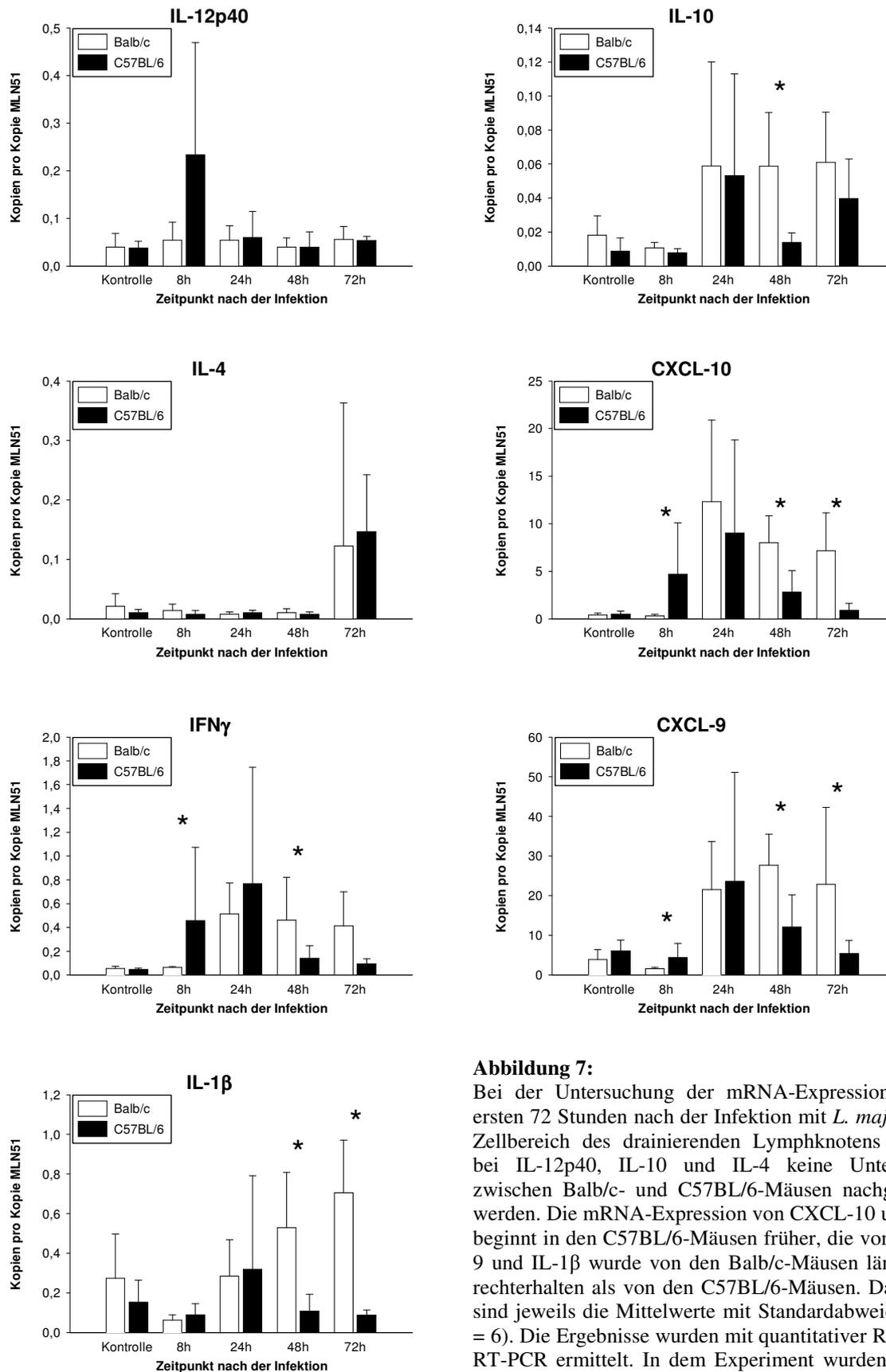
T: T-Zellareal, B: B-Zellareal, +: $p \leq 0,05$; Mann-Whitney U Test; p zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen C57BL/6-Mäusen und Balb/c-Mäusen auf Kompartimentebene. *: $p \leq 0,05$; Mann-Whitney U Test; p zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen dem T- und B-Zellareal eines Stammes.

Die Ergebnisse zeigen, dass im poplitealen Lymphknoten in beiden untersuchten Mausstämmen alle betrachteten Chemokine und Zytokine vor Beginn einer Immunantwort konstitutiv exprimiert werden (Abb. 6). Interessant ist, dass in beiden Stämmen einige Zytokine unterschiedlich im T- und B-Zellareal des Lymphknotens der Kontrolltiere verteilt sind. So sind die T_H1 -Zytokine IL-2 und IL-12p40 in beiden Stämmen bevorzugt im T-Zellareal lokalisiert. Das T_H2 -Zytokin IL-4 und das regulatorische Zytokin IL-10 sind in beiden Stämmen bevorzugt im B-Zellareal der Lymphknoten lokalisiert, diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant. In den Balb/c-Mäusen wird zusätzlich das Chemokin CXCL-10 bevorzugt im B-Zellareal exprimiert. Bei den anderen untersuchten Zytokinen sowie den betrachteten Chemokinen konnte hingegen keine bevorzugte Lokalisation nachgewiesen werden. Auffällig ist, dass die Anzahl der jeweiligen Transkripte zwischen den Chemokin- und den Zytokingenen

sehr stark variiert. Die Chemokingene werden etwa zehn- bis hundertfach stärker exprimiert als die Zytokingene. Die Untersuchung ergab, dass sich die Zytokinexpression im T-Zellareal zwischen den beiden Stämmen nicht unterscheidet. Im B-Zellareal ist die Grundexpression von CXCL-10, IL-2 und IL-1 β in den Balb/c-Mäusen hingegen höher als in den C57BL/6-Mäusen.

3.3.3 Kinetischer Unterschied in der Chemokin- und Zytokinexpression zwischen empfänglichen Balb/c-Mäusen und resistenten C57BL/6-Tieren im T-Zellareal

Es wird angenommen, dass das unmittelbare Zytokinmilieu im drainierenden Lymphknoten, das während der Aktivierung der naiven CD4⁺-T-Zellen vorherrscht, den entscheidenden Faktor darstellt, der die Richtung der Differenzierung in T_H1- oder T_H2-Zellen bestimmt. Die meisten Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Fragestellung an Lymphknoten-Homogenaten durchgeführt. Da sich die Zytokinexpression aber möglicherweise nur lokal in den einzelnen Kompartimenten des drainierenden Lymphknotens verändert und deshalb Unterschiede in der Zytokinexpression in den Kompartimenten bei der Analyse von ganzen Lymphknoten verborgen bleiben, wurde in dieser Arbeit zunächst das T-Zellareal des drainierenden Lymphknoten betrachtet. Die Untersuchung der Kontrolltiere zeigte, dass sich empfängliche Balb/c-Mäuse und resistente C57BL/6-Mäuse im T-Zellareal des poplitealen Lymphknotens nicht in ihrer konstitutiven mRNA-Expression der betrachteten Chemokine und Zytokine unterscheiden. Um herauszufinden, ob sich das Zytokinmilieu im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens nach der Infektion mit *L. major* zwischen beiden Mausstämmen unterscheidet, wurde in dieser Arbeit das T-Zellareal der poplitealen Lymphknoten von beiden Mausstämmen in einem Screening mit quantitativer Real Time RT-PCR auf die mRNA-Expression von 47 Genen hin untersucht, die mit der inflammatorischen Antwort auf eine Infektion assoziiert werden. Es zeigte sich, dass bei 25 der betrachteten Gene in beiden Mausstämmen keine Veränderungen in der mRNA-Expression im T-Zellareal der drainierenden Lymphknoten in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* nachgewiesen werden konnten. Bei weiteren 18 Genen konnten Veränderungen in der mRNA-Expression detektiert werden, doch wurden diese Gene in beiden Mausstämmen vergleichbar reguliert. Bei vier der 47 untersuchten Gene konnten im T-Zellbereich hingegen kinetische Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen C57BL/6- und Balb/c-Mäusen festgestellt werden.

**Abbildung 7:**

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* im T-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens konnten bei IL-12p40, IL-10 und IL-4 keine Unterschiede zwischen Balb/c- und C57BL/6-Mäusen nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ beginnt in den C57BL/6-Mäusen früher, die von CXCL-9 und IL-1 β wurde von den Balb/c-Mäusen länger aufrechterhalten als von den C57BL/6-Mäusen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 6). Die Ergebnisse wurden mit quantitativer Real Time RT-PCR ermittelt. In dem Experiment wurden 2×10^6 Leishmanien subkutan in die Fußsohle der Versuchstiere appliziert. Mann-Whitney U Test; *: $p \leq 0,05$; p zeigt

signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression zwischen C57BL/6- und Balb/c-Mäusen im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens.

Stellvertretend für die Gene, bei denen in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* keine Veränderungen in der mRNA-Expression im T-Zellareal nachgewiesen werden konnten, wird auf Abbildung 7 die mRNA-Expression des T_H1-Zytokins IL-12p40 gezeigt. Für IL-12p40 konnten in beiden Mausstämmen im beobachteten Zeitraum keine signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression nachgewiesen werden. Als Beispiel für die Gene, die in den ersten 72 Stunden nach der Infektion in beiden Mausstämmen vergleichbar reguliert wurden, wird auf Abbildung 7 das regulatorische Zytokin IL-10 und das T_H2-Zytokin IL-4 gezeigt. Die mRNA-Expression von IL-10 stieg bei beiden Stämmen nach 24 Stunden an und blieb auch bis 72 Stunden nach der Infektion auf diesem erhöhten Niveau. Die mRNA-Expression von IL-4 wurde 72 Stunden nach der Infektion sowohl in den empfänglichen Balb/c-Mäusen als auch in den resistenten C57BL/6-Mäusen verstärkt.

Bei der mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ konnte ein kinetischer Unterschied zwischen beiden Stämmen nachgewiesen werden. Die mRNA Expression beider Gene stieg in den C57BL/6-Mäusen bereits nach acht Stunden an, während in den Balb/c-Mäusen für CXCL-10 und IFN γ erst nach 24 Stunden eine erhöhte mRNA-Expression nachgewiesen werden konnte. Beide Gene wurden von den resistenten C57BL/6-Mäusen bereits 48 Stunden nach der Infektion wieder herunterreguliert, während sie von den empfänglichen Balb/c-Mäusen auch 72 Stunden nach der Infektion noch auf erhöhtem Niveau exprimiert wurden.

Die mRNA-Expression von CXCL-9 und IL-1 β wurde hingegen von beiden Mausstämmen nach 24 Stunden verstärkt. Während in der C57BL/6 jedoch wiederum bereits 48 Stunden nach der Infektion ein Rückgang der mRNA-Expression bei beiden Genen festgestellt werden konnte, wurde ihre Expression in den Balb/c-Mäusen auf dem erhöhten Niveau beibehalten, bzw. die mRNA-Expression von IL-1 β noch weiter verstärkt.

Die isolierte Untersuchung des T-Zellareals zeigt damit, dass zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* keine klare T_H1/T_H2-Polarisierung von C57BL/6- und Balb/c-Mäusen erkennbar ist. Die frühe Chemokin- und Zytokinexpression unterscheidet sich zwischen den beiden Stämmen nur geringfügig voneinander. Nur die enge zeitliche Überwachung der ersten 72 Stunden nach der Infektion ermöglichte es, Unterschiede überhaupt nachweisen zu können. Bei der isolierten Betrachtung des 24-Stunden-Zeitpunkts sind keine Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen beiden Stämmen nachweisbar. Die Zytokine, die zeitlich begrenzt unterschiedlich reguliert werden, wurden von den C57BL/6-Mäusen früher

hochreguliert als von den Balb/c-Mäusen, die wiederum die verstärkte mRNA-Expression dieser Gene länger aufrechterhielten.

3.3.4 Die Immunantwort beginnt in beiden Stämmen an der T-/B-Zellgrenze des drainierenden Lymphknotens

Die Untersuchung des T-Zellareals zeigte, dass zwischen dem resistenten und dem empfänglichen Stamm kinetische Unterschiede bei der mRNA-Expression der Chemokine CXCL-9 und CXCL-10 sowie der Zytokine IFN γ und IL-1 β nachgewiesen werden konnten. Während in den C57BL/6-Mäusen IFN γ und CXCL-10 schneller hochreguliert wurde als in den Balb/c-Mäusen, wurde die Expression dieser beiden Gene und von CXCL-9 und IL-1 β von den Balb/c-Mäusen länger aufrechterhalten. Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion wurden die Zytokine hingegen von beiden Stämmen gleich reguliert, so dass keine klare T_H1/T_H2-Polarisierung von C57BL/6- und Balb/c-Mäusen zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion erkennbar war. Unbekannt ist, ob die Veränderungen in der mRNA-Expression homogen im ganzen T-Zellareal auftreten oder ob die verstärkte mRNA-Expression möglicherweise nur im inneren Bereich des T-Zellareals oder an der T-/B-Zellgrenze lokalisiert ist. Die Bedeutung der T-/B-Zellgrenzzone ist bekannt und liegt zum einen darin, dass in diesem Bereich des Lymphknotens bevorzugt dendritische Zellen akkumulieren und dort mit hoher Frequenz T-Zellen kontaktieren.^[53] Des Weiteren wurde gezeigt,^[54] dass auch B-Zellen aus dem B-Zellareal an die Grenze zum T-Zellareal wandern, um dort mit T-Zellen zu interagieren, die durch dendritische Zellen im T-Zellareal aktiviert wurden und danach ebenfalls in diese Grenzregion wandern. Möglicherweise blieben bisher Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen in der frühen Zytokinexpression dieser Zellen, die an der T-/B-Zellgrenze akkumulieren, bei der Analyse der mRNA-Expression des gesamten T-Zellbereiches verborgen. Um dieses auszuschließen, wurde der T-Zellbereich in zwei weitere Unterkompartimente unterteilt, den inneren T-Zellbereich und die T-/B-Zellgrenze, die beide separat auf ihre mRNA-Expression untersucht wurden.

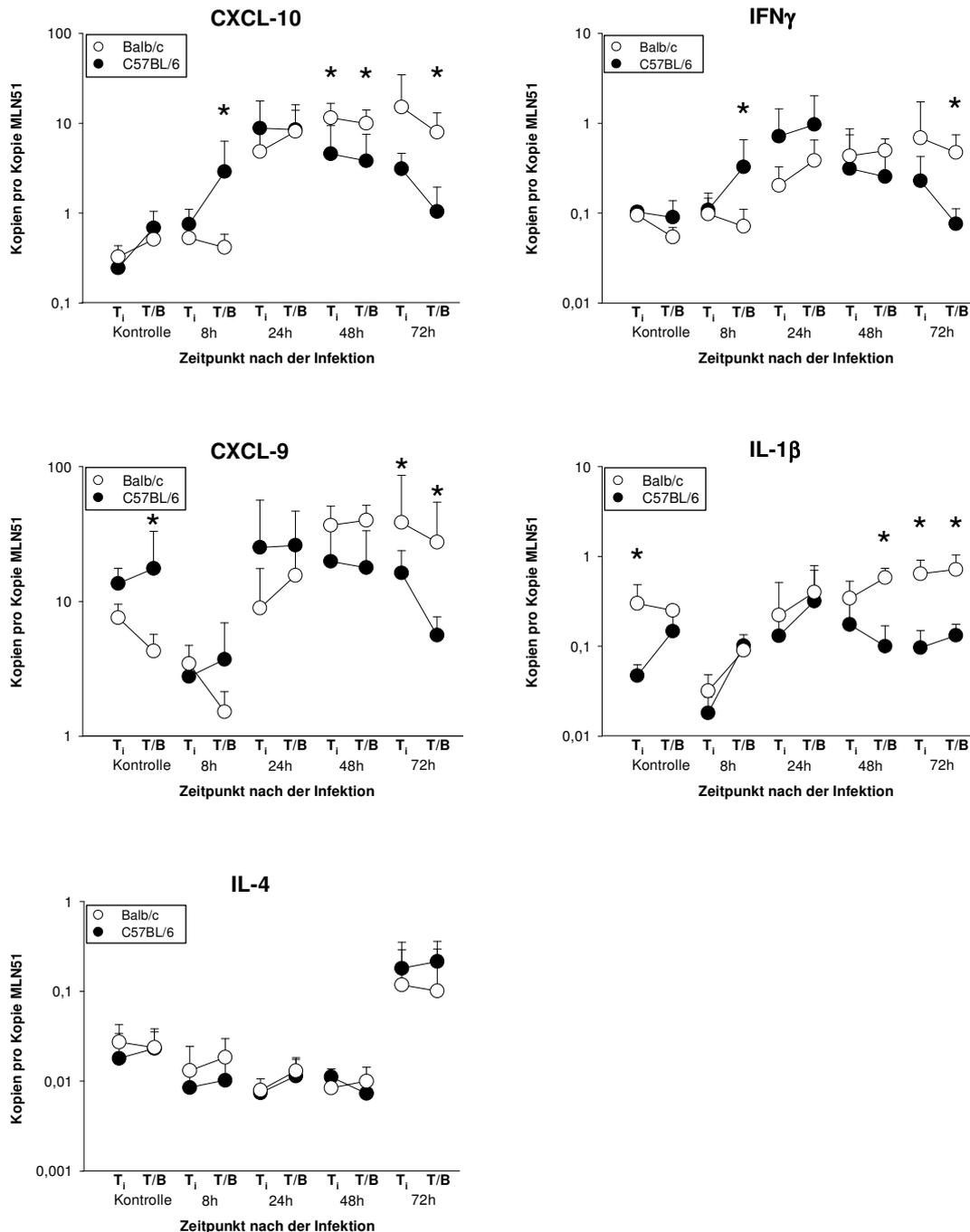


Abbildung 8:

Ergebnis der Untersuchung der mRNA-Expression von CXCL-10, IFN γ , CXCL-9, IL-1 β und IL-4 im inneren T-Zellareal und an der T-/B-Zellgrenze der poplitealen Lymphknoten infizierter C57BL/6- (schwarze Kreise) und Balb/c-Mäuse (weiße Kreise) in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major*. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 6). Für die Untersuchung wurden durchschnittlich 3,5-7,0 Mio μm^2 Material des jeweiligen Kompartiments mit der Mikrodissektion eingesammelt und mit der quantitativen Real Time RT-PCR analysiert. Auffällig ist, dass die resistenten C57BL/6/c-Mäuse bereits acht Stunden nach der Infektion ihre mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ an der T-/B-Zellgrenze verstärkten, während dieses in den Balb/c-Mäusen erst nach 24 Stunden erfolgte. Mann-Whitney U Test; *: $p \leq 0,05$; p zeigt signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression zwischen C57BL/- und Balb/c-Mäusen an der T-/B-Zellgrenze bzw. im inneren T-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens.

Die detaillierte Untersuchung des T-Zellareals bestätigt die Ergebnisse, die bei der Untersuchung des gesamten T-Zellbereiches erhalten wurde. Die in den C57BL/6-Mäusen acht Stunden nach der Infektion im T-Zellareal beobachtete Zunahme der mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ ist an der T-/B-Zellgrenze des drainierenden Lymphknotens lokalisiert. Nur dort konnte ein Anstieg der mRNA-Expression nachgewiesen werden, während im inneren T-Zellbereich zu diesem Zeitpunkt noch keine Veränderungen in der mRNA-Expression auftraten. Vierundzwanzig Stunden nach der Infektion wurde die mRNA-Expression von IFN γ und CXCL-10 in den C57BL/6-Mäusen an der T-/B-Zellgrenze noch weiter verstärkt, zu dieser Zeit konnte aber auch im inneren Bereich des T-Zellareals eine Zunahme der mRNA-Expression nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden wurden IFN γ und CXCL-10 in den C57BL/6-Mäusen homogen im ganzen T-Zellbereich exprimiert, bevor ihre mRNA-Expression nach 72 Stunden zuerst an der T-/B-Zellgrenze herunterreguliert wurde.

In den Balb/c-Mäusen konnten erst 24 Stunden nach der Infektion Veränderungen in der mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ detektiert werden. Die Zunahme erfolgte anders als in den C57BL/6-Mäusen gleichzeitig in beiden Kompartimenten des T-Zellareals, wobei aber an der T/B-Zellgrenze eine etwas stärkere Zunahme der mRNA-Expression gemessen werden konnte. Nach 48 Stunden wurden in den Balb/c-Mäusen beide Zytokine gleichmäßig im ganzen T-Zellareal exprimiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden von den Balb/c-Mäusen in beiden Bereichen des T-Zellareals mehr mRNA von CXCL-10 exprimiert als von den C57BL/6-Mäusen. Nach 72 Stunden blieb die mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ bei den Balb/c-Mäusen auf hohem Niveau, auch zu diesem Zeitpunkt war die mRNA-Expression dieser beiden Zytokine in den Balb/c-Mäusen höher als in den C57BL/6-Mäusen.

Die mRNA-Expression von CXCL-9 wurde in beiden Stämmen 24 Stunden nach der Infektion verstärkt. In den C57BL/6-Mäusen erfolgte die Zunahme der mRNA-Expression im gesamten T-Zellareal, während in den Balb/c-Mäusen nach 24 Stunden tendentiell mehr mRNA an der T-/B-Zellgrenze nachgewiesen werden konnte. Nach 48 Stunden wurde die mRNA-Expression in beiden Stämmen im gesamten T-Zellareal verstärkt exprimiert, während 72 Stunden nach der Infektion in den C57BL/6-Mäusen ein starker, in den Balb/c-Mäusen nur ein geringer Rückgang der mRNA-Expression an der T-/B-Zellgrenze erfolgte.

Die mRNA-Expression von IL-1 β wurde in beiden Stämmen nach 24 Stunden an der T-/B-Zellgrenze hochreguliert. Im weiteren Verlauf der Infektion stieg die mRNA-Expression in den Balb/c-Mäusen auch im inneren T-Zellbereich an, so dass 72 Stunden nach der Infektion im gesamten T-Zellbereich eine verstärkte mRNA-Expression von IL-1 β nachgewiesen

werden konnte. In den C57BL/6-Mäusen wurde die mRNA-Expression von IL-1 β an der T-/B-Zellgrenze hingegen 48 Stunden nach der Infektion wieder herunterreguliert, so dass die Balb/c-Mäuse 48 und 72 Stunden nach der Infektion eine signifikant höhere mRNA-Expression von IL-1 β zeigten als die C57BL/6-Mäuse.

Die Zunahme der mRNA-Expression von IL-4 erfolgte in beiden Stämmen 72 Stunden nach der Infektion im gesamten T-Zellareal.

Die detaillierte Untersuchung des T-Zellbereiches zeigt damit, dass die Immunantwort gegen eine Infektion mit *L. major* in den C57BL/6-Mäusen früher als in den Balb/c-Mäusen mit einer verstärkten mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ an der T-/B-Zellgrenze des drainierenden Lymphknotens beginnt. In den Balb/c-Mäusen wurde die mRNA-Expression dieser beiden Gene erst 24 Stunden nach der Infektion in beiden Bereichen des T-Zellareals verstärkt. Während die mRNA-Expression sowohl dieser beiden Gene als auch von CXCL-9 und IL-1 β in den resistenten C57BL/6-Mäusen jedoch bereits 72 Stunden nach der Infektion an der T-/B-Zellgrenze wieder herunterreguliert wurde, konnte in den empfänglichen Balb/c-Mäusen zu diesem Zeitpunkt noch eine erhöhte mRNA-Expression nachgewiesen werden. Unbekannt ist, ob diese beobachteten Unterschiede einen Einfluss auf die T-Zellproliferation haben.

3.3.5 Kein Unterschied in der T-Zell-Aktivierung zwischen Balb/c- und C57BL/6-Mäusen im drainierenden Lymphknoten

Die Untersuchung der Chemokin- und Zytokinexpression unmittelbar vor und während der T-Zellaktivierung zeigte, dass die mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ von den C57BL/6-Mäusen etwas schneller initiiert wird als von den Balb/c-Mäusen. Nach 24 Stunden können keine Unterschiede mehr in der Zytokinexpression nachgewiesen werden, die Balb/c-Mäusen halten die mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ sowie die von CXCL-9 und IL-1 β aber länger auf einem erhöhten Niveau aufrecht. Um herauszufinden, ob diese kinetischen Unterschiede einen Einfluss auf die Proliferationsrate der T-Zellen im poplitealen Lymphknoten in den ersten 72 Stunden nach einer Infektion mit *L. major* haben, wurde die T-Zellproliferation im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens immunhistologisch durch die Färbung des Proliferationsmarkers Ki-67 bestimmt. Ki-67 ist ein Protein, das von proliferierenden Zellen während aller Phasen des Zellzyklus gebildet wird. Die Zahl der proli-

ferierenden Zellen im T-Zellareal wurde am Lichtmikroskop ermittelt. Dafür wurde eine Fläche von 100 Kleinquadraten, die einer Fläche von $81.768 \mu\text{m}^2$ entsprechen, über den Bereich des T-Zellareals gelegt, der die höchste Dichte an proliferierenden T-Zellen aufwies und dort die Anzahl der proliferierenden T-Zellen bestimmt.

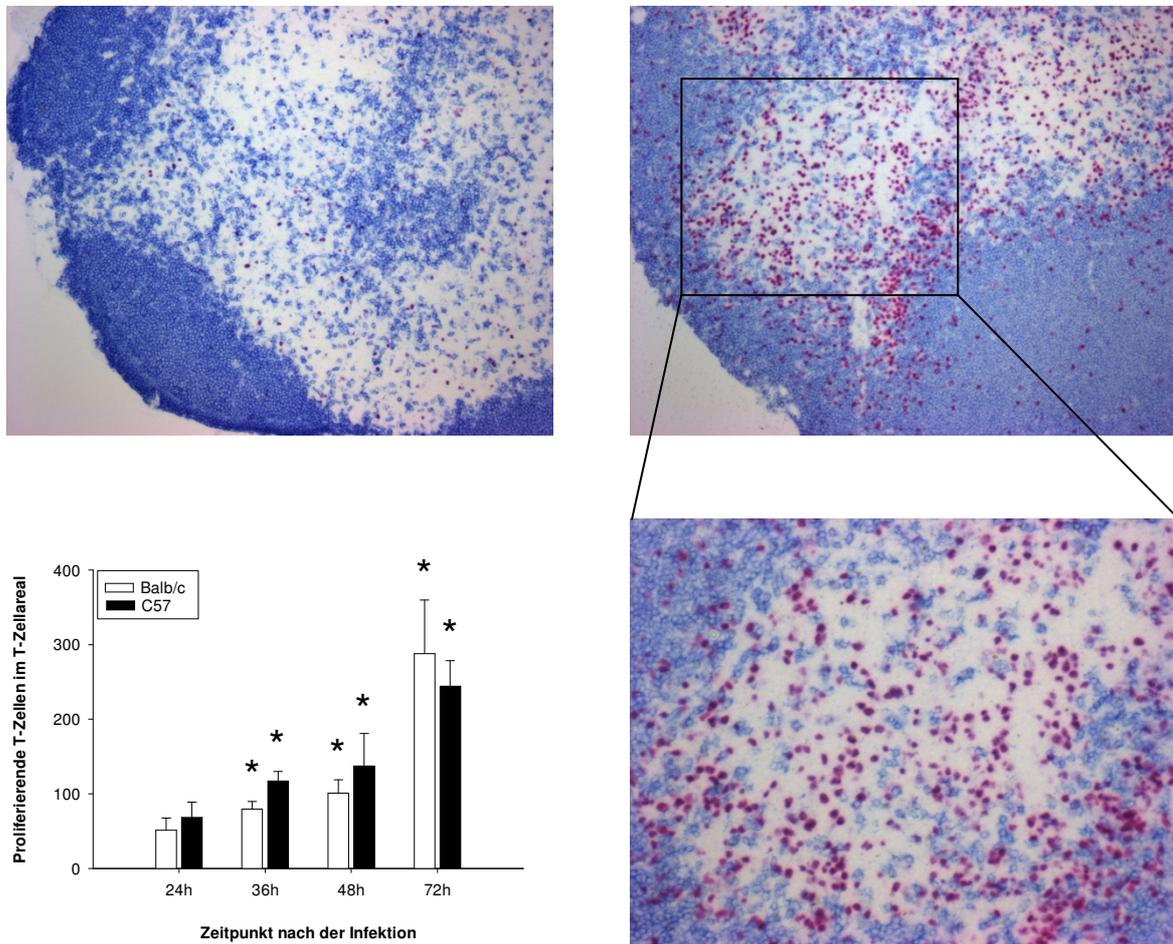


Abbildung 9:

Oben Links: Dargestellt ist der Ausschnitt aus einem ruhenden poplitealen Lymphknoten einer Balb/c-Kontrollmaus. Der Lymphknotenschnitt wurde doppelt angefärbt. Die B-Zellen wurden mit anti-B220 angefärbt, sie erscheinen im Präparat blau. Proliferierende Zellen wurden mit Ki-67 angefärbt, sie erscheinen rot. Durch die Doppelfärbung war es möglich, proliferierende T- und B-Zellen voneinander zu unterscheiden. In den Kontroll-Lymphknoten konnten nur wenige proliferierende T-Zellen nachgewiesen werden.

Oben und unten rechts: Ausschnitt aus einem poplitealen Lymphknoten einer Balb/c-Maus drei Tage nach der Infektion mit *L. major*. Dargestellt ist der Bereich des Lymphknotens, in dem die meisten proliferierenden T-Zellen detektiert werden konnten. Dieser Bereich wird als Hot Spot bezeichnet. Über den Bereich des Hot Spots wurde unter dem Mikroskop ein Gitter mit einer Fläche von $81.768 \mu\text{m}^2$ gelegt und die darin liegenden proliferierenden Zellen ausgezählt.

Unten links: Bestimmung der Anzahl proliferierender T-Zellen im T-Zellareal der drainierenden Lymphknoten infizierter Balb/c- und C57BL/6-Mäuse in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major*. Die Proliferationsrate wurde in Hot-Spots ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung (Balb/c: $n = 3-9$; C57BL/6: $n = 3-11$) Mann-Whitney U Test; *: $p \leq 0,05$. p zeigt einen signifikanten Unterschied der Proliferationsrate des jeweiligen Stammes zu seiner Proliferationsrate nach 24 Stunden.

Abbildung 9 zeigt, dass drei Tage nach der Infektion mit *L. major* proliferierende T-Zellen in den poplitealen Lymphknoten von Tieren beider Stämme nachgewiesen werden konnten. Das Ergebnis der Hot-Spot-Auszählung zeigt, dass die T-Zellen in beiden Stämmen nach 36 Stunden begannen zu proliferieren. Eine deutliche Zunahme der proliferierenden Zellen war in beiden Stämmen nach 72 Stunden nachweisbar. Ein Unterschied in der T-Zellproliferation zwischen beiden Stämmen konnte im untersuchten Zeitraum nicht detektiert werden. Es konnte somit kein Hinweis dafür festgestellt werden, dass die beobachteten Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen Balb/c- und C57BL/6-Mäusen einen Einfluss auf den Beginn und die Höhe der T-Zellproliferation haben.

3.3.6 In den empfänglichen Balb/c-Mäusen beginnt die Immunantwort im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens

Die detaillierte Analyse der Chemokin- und Zytokinexpression im T-Zellareal konnte einen kinetischen Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den empfänglichen Balb/c-Mäusen und den resistenten C57BL/6-Mäusen detektieren. Einen Einfluss auf den Beginn der Proliferation oder die Proliferationsrate konnte indessen nicht nachgewiesen werden. Neben der Bedeutung des T-Zellareals weist eine Studie^[55] auf die Involvierung des B-Zellareals zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* hin. Da in der vorliegenden Arbeit bereits die Untersuchung der Kontrolltiere gezeigt hat, dass drei Zytokine (CXCL-10, IL-2 und IL-1 β) im B-Zellareal des poplitealen Lymphknotens in den Balb/c-Mäusen höher exprimiert wurden als in den C57BL/6-Mäusen, wurde zusätzlich zum T-Zellbereich auch der B-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens auf die mRNA-Expression der beschriebenen Zytokine untersucht.

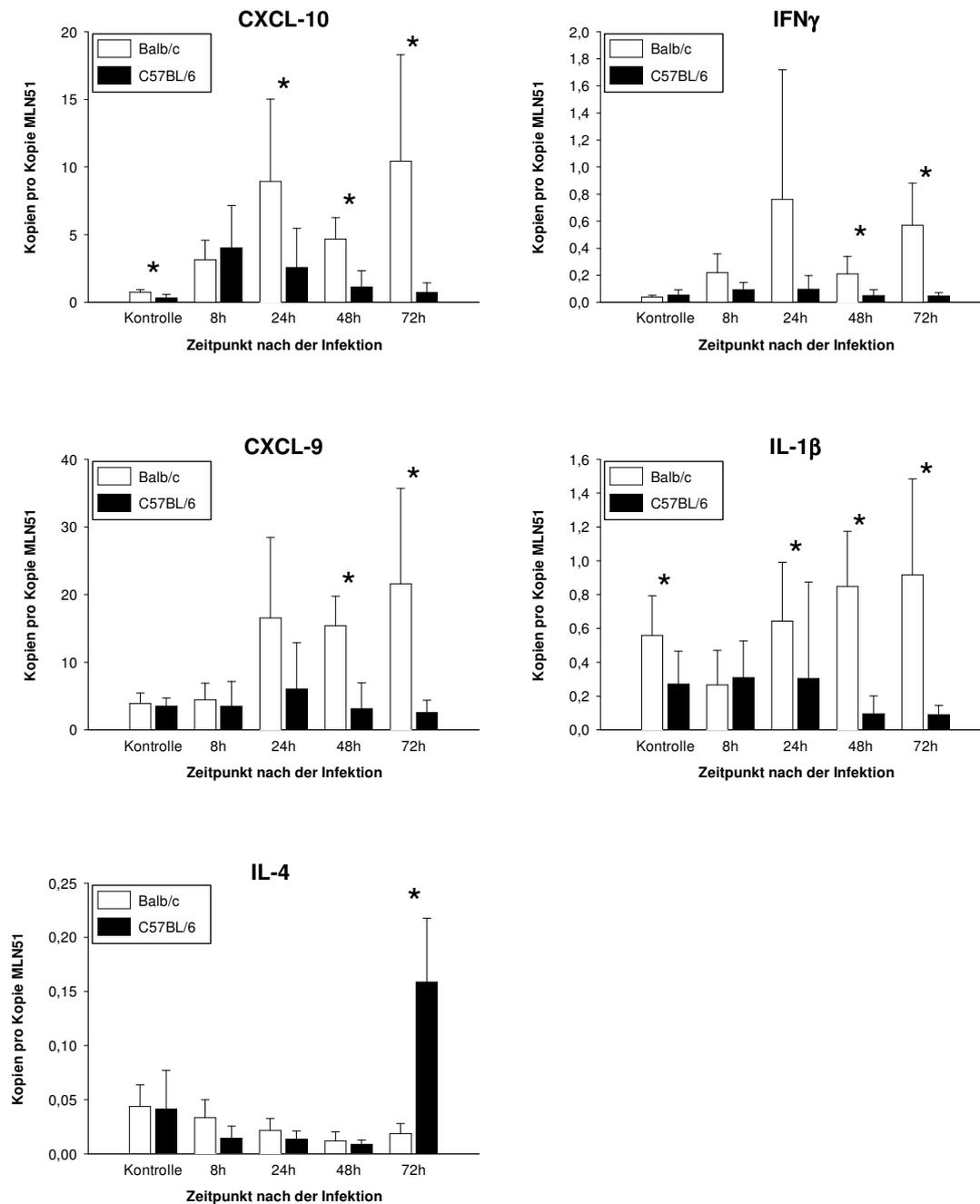


Abbildung 10:

Ergebnis der Untersuchung der mRNA-Expression von CXCL-10, IFN γ , CXCL-9, IL-1 β und IL-4 im B-Zellareal der poplitealen Lymphknoten infizierter Balb/c- und C57BL/6-Mäuse in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major*. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 3-6). Für die Untersuchung wurden durchschnittlich 3,5-7,0 Mio μm^2 Material des jeweiligen Kompartiments mit der Mikrodissektion eingesammelt und mit der quantitativen Real Time RT-PCR analysiert. Auffällig ist, dass die empfänglichen Balb/c-Mäuse ihre mRNA-Expression bereits acht Stunden nach der Infektion im B-Zellareal des Lymphknotens verstärken. Nach 48 Stunden weisen die empfänglichen Balb/c-Mäuse für diese vier betrachteten Zytokine eine signifikant größere Menge an mRNA-Transkripten auf als die resistente C57BL/6. Mann-Whitney U Test; *: $p \leq 0,05$. p zeigt einen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens zwischen Balb/c- und C57BL/6-Mäusen.

Abbildung 10 zeigt, dass die mRNA-Expression von CXCL-10 sowohl in den Balb/c- als auch in den C57BL/6-Mäusen acht Stunden nach der Infektion im B-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens hochreguliert wurde. Während in den C57BL/6-Mäusen keine weitere Steigerung der mRNA-Expression von CXCL-10 im B-Zellbereich erfolgte, konnte in den Balb/c-Mäusen 24 Stunden nach der Infektion ein weiterer Anstieg der mRNA-Expression beobachtet werden. Auch 48 und 72 Stunden nach der Infektion zeigten die Balb/c-Mäuse im B-Zellareal eine höhere mRNA-Expression als die C57BL/6-Mäuse.

Bei der mRNA-Expression von IFN γ und CXCL-9 zeigte sich ein ähnliches Bild. Während für IFN γ und CXCL-9 im B-Zellareal der C57BL/6-Mäuse nur geringe Veränderungen in der mRNA-Expression nachgewiesen werden konnten, stieg die mRNA-Expression beider Zytokine in den Balb/c-Mäusen bereits acht Stunden nach der Infektion mit *L. major* im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens an. Auch 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion konnte eine verstärkte mRNA-Expression von IFN γ und CXCL-9 im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens detektiert werden.

Bei der Untersuchung von IL-1 β im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens unterschieden sich bereits die Kontrolltiere beider Stämme in ihrer mRNA-Expression. Im Verlauf der Infektion stieg die mRNA-Expression von IL-1 β im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens in den Balb/c-Mäusen leicht an, während in den C57BL/6-Mäusen eher ein Rückgang der Expression zu beobachten war. Dadurch war 48 Stunden nach der Infektion ein signifikanter Unterschied in der mRNA-Expression von IL-1 β zwischen den beiden Stämmen zu beobachten.

Die mRNA-Expression von IL-4 im B-Zellareal unterscheidet sich zwischen den beiden untersuchten Stämmen. Nur in den C57BL/6-Mäusen konnte 72 Stunden nach der Infektion eine verstärkte mRNA-Expression im B-Zellareal nachgewiesen werden, die Expression von IL-4 in der Balb/c war dagegen auf das T-Zellareal beschränkt.

Die Ergebnisse der Untersuchung des B-Zellareals zeigen, dass die empfänglichen Balb/c-Mäuse schon zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* eine höhere Zytokinexpression im B-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens aufweisen als die resistenten C57BL/6-Mäuse. Besonders 48 Stunden nach der Infektion mit *L. major* konnte in den Balb/c-Mäusen für CXCL-10, IFN γ , CXCL-9 und IL-1 β eine signifikant höhere mRNA-Expression als in den C57BL/6-Mäusen beobachtet werden. IL-4 wurde im B-Zellareal hingegen nur von der C57BL/6 verstärkt exprimiert. Ob die stärkere Chemokin- und Zytokin-

expression im B-Zellareal einen Grund für die Empfänglichkeit der Balb/c-Mäuse gegenüber der Infektion mit *L. major* darstellt, soll der Vergleich der mRNA-Expression mit Tieren des resistenten Stammes C3H zeigen.

3.4 C3H-Mäuse zeigen sowohl im T- als auch im B-Zellareal eine verstärkte Chemokin- und Zytokinexpression

Um herauszufinden, ob die verstärkte Zytokinexpression im B-Zellareal zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit der Empfänglichkeit der Balb/c-Mäuse gegenüber der Infektion mit *L. major* zusammenhängt bzw. die schnellere Aktivierung der mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens in den C57BL/6-Mäusen zu der Resistenz dieses Stammes gegenüber der Infektion mit *L. major* beiträgt, wurden zusätzlich Tiere des resistenten Stammes C3H auf ihre frühe Zytokinexpression untersucht.

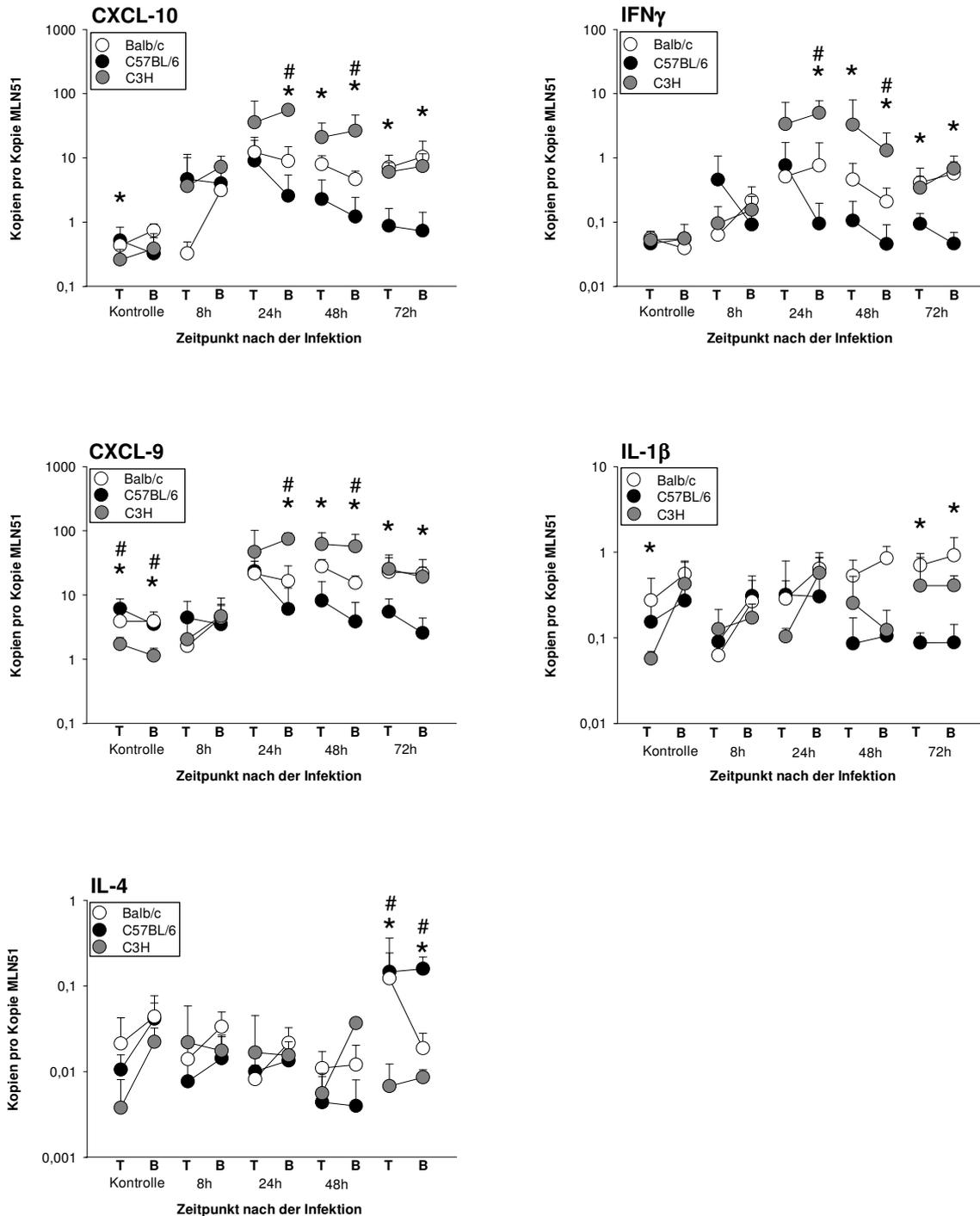


Abbildung 11:

Vergleich der mRNA-Expression von CXCL-10, IFN γ , CXCL-9, IL-1 β und IL-4 im T- und B-Zellareal des poplitealen Lymphknotens infizierter C57BL/6-Mäuse (schwarze Kreise) und Balb/c-Mäuse (weiße Kreise) mit der mRNA-Expression von resistenten C3H-Mäusen (graue Kreise) in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major*. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 3-6). Auffällig ist, dass auch in den resistenten C3H-Mäusen eine starke Chemokin- und Zytokinexpression im B-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens stattfindet. Eine verstärkte mRNA-Expression von IL-4 kann in den C3H-Mäusen hingegen nicht beobachtet werden. Mann-Whitney U Test *: p \leq 0,05. # zeigt einen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den beiden resistenten Stämmen C57BL/6 und C3H. #: p \leq 0,05. p zeigt einen signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression zwischen den Stämmen C3H und Balb/c.

Auch in den Tieren vom Stamm C3H wurde zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion eine starke mRNA-Expression der Chemokine und Zytokine im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens festgestellt. Es konnte beobachtet werden, dass die mRNA-Expression von CXCL-10 von den C3H-Mäusen ebenso wie von den C57BL/6-Mäusen bereits acht Stunden nach der Infektion in beiden Kompartimenten des drainierenden Lymphknotens verstärkt wurde. Während 24 Stunden nach der Infektion bei den C57BL/6-Mäusen aber tendentiell mehr mRNA von CXCL-10 im T-Zellareal exprimiert wurde, wurde von den C3H-Mäusen ähnlich wie von den Balb/c-Mäusen in beiden Kompartimenten die mRNA-Expression von CXCL-10 weiter verstärkt. Zu diesem Zeitpunkt wurde im B-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens von den C3H-Mäusen mehr CXCL-10 transkribiert als von den Tieren der anderen beiden Stämme. Nach 48 und 72 Stunden konnte in den C3H-Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen sowohl im T- als auch im B-Zellareal eine höhere mRNA-Expression von CXCL-10 beobachtet werden.

Ebenso deutliche Unterschiede konnten zwischen den beiden resistenten Stämmen in der mRNA-Expression von IFN γ gefunden werden. Während in den C57BL/6-Mäusen die mRNA-Expression von IFN γ bereits acht Stunden nach der Infektion im T-Zellbereich verstärkt wurde und auch 24 Stunden nach der Infektion eine bevorzugte Lokalisation der mRNA-Expression für das T-Zellareal beobachtet werden konnte, wurde die mRNA-Expression von IFN γ in den C3H-Mäusen ähnlich wie in den Balb/c-Mäusen acht Stunden nach der Infektion zuerst im B-Zellareal verstärkt. Nach 24 Stunden stieg die mRNA-Expression in beiden Kompartimenten deutlich an. Zu diesem Zeitpunkt exprimierten die C3H-Mäuse im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens im Vergleich zu den Balb/c- und C57BL/6-Mäusen signifikant mehr IFN γ -mRNA. Nach 48 und 72 Stunden konnte in den C3H-Mäusen im Vergleich zu den C57BL/6-Mäusen sowohl im T- als auch im B-Zellareal eine höhere mRNA-Expression von IFN γ beobachtet werden. Die C3H-Mäuse ähneln in ihrer mRNA-Expression von IFN γ damit sehr stark den Balb/c-Mäusen, ihre IFN γ -Expression ist im B-Zellbereich sogar noch höher als in den anfälligen Mäusen.

Die mRNA-Expression von CXCL-9 wurde von den C3H-Mäusen wie von den C57BL/6-Mäusen und Balb/c-Mäusen acht Stunden nach der Infektion zuerst im B-Zellareal verstärkt. Nach 24 Stunden stieg die mRNA-Expression von CXCL-9 in den C3H-Mäusen in beiden Kompartimenten des Lymphknotens stark an. Diese verstärkte mRNA-Expression von CXCL-9 wurde in den C3H-Mäusen ähnlich wie in den empfänglichen Balb/c-Mäusen auch

48 und 72 Stunden nach der Infektion aufrechterhalten, so dass die C3H-Mäusen zu diesen Zeitpunkten auch CXCL-9-mRNA signifikant höher exprimierten als die C57BL/6-Mäuse.

Bei der mRNA-Expression von IL-1 β konnten in den C3H-Mäusen hingegen nur geringe Veränderungen festgestellt werden. Die mRNA-Expression stieg in den ersten 72 Stunden nach der Infektion in beiden Kompartimenten leicht an, 72 Stunden nach der Infektion wurde in den C3H-Mäusen ähnlich wie in den Balb/c-Mäusen in beiden Kompartimenten des drainierenden Lymphknotens eine signifikant stärkere mRNA-Expression von IL-1 β beobachtet als in den C57BL/6-Mäusen.

Bei der mRNA-Expression von IL-4 stellte sich ein deutlicher Unterschied zwischen C57BL/6-, Balb/c- und C3H-Mäusen heraus. Während in den C57BL/6- und den Balb/c-Mäusen 72 Stunden nach der Infektion eine verstärkte mRNA-Expression von IL-4 detektiert wurde, konnte in den C3H-Mäusen keine veränderte mRNA-Expression von IL-4 beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reaktion auf eine Infektion mit *L. major* in den zwei resistenten Stämmen C57BL/6 und C3H komplett unterschiedlich ausfällt. Zum einen zeigen die C3H-Mäuse eine viel stärkere Zytokinexpression im T-Zellareal als die ebenfalls resistenten C57BL/6-Mäuse. Zum anderen zeigen die C3H-Mäuse wie die empfänglichen Balb/c-Mäuse eine verstärkte Zytokinexpression im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion. Damit bleibt unklar, ob die verstärkte Aktivität im B-Zellareal in den Balb/c-Mäusen mit der Empfänglichkeit dieses Stammes gegenüber der Infektion mit *L. major* im Zusammenhang stehen kann. Unklar bleibt die Bedeutung von IL-4, welches in den empfänglichen Balb/c-Mäusen, aber auch in den resistenten C57BL/6-Mäusen 72 Stunden nach der Infektion verstärkt exprimiert wurde, während in Tieren des resistenten Stammes C3H keine IL-4-Expression nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse zeigen, dass die Resistenz von C57BL/6- und C3H-Mäusen auf unterschiedliche Weise vermittelt werden muß.

3.5 Kein Unterschied in der Parasitenlast im drainierenden Lymphknoten bei Balb/c-, C57BL/6- und C3H-Mäusen

Um herauszufinden, ob die kinetischen Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen den drei Stämmen möglicherweise daraus resultieren, dass die Leishmanien-Parasiten unterschiedlich schnell in die drainierenden Lymphknoten gelangen, wurde die Leishmanienlast der poplitealen Lymphknoten in den C57BL/6-, Balb/c- und C3H-Mäusen in den ersten 72 Stunden nach der Infektion untersucht.

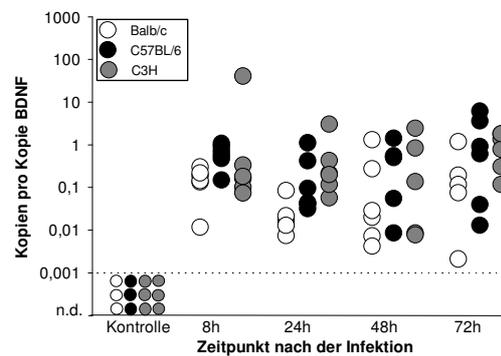


Abbildung 12:

Bestimmung der Leishmanienlast in den drainierenden Lymphknoten infizierter Balb/c-Mäuse (weiße Kreise) C57BL/6-Mäuse (schwarze Kreise) und C3H-Mäuse (graue Kreise) in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major*. Für die Bestimmung der Leishmanienlast wurden fünf ganze Schnitte des poplitealen Lymphknotens mit quantifizierender Real Time RT-PCR untersucht. Als Housekeeping-Gen wurde BDNF verwendet, ein single-copy-Gen im Mausgenom. Die Anzahl der untersuchten Tiere beträgt sechs Tiere pro Stamm.

Auf Abbildung 12 wird gezeigt, dass bereits acht Stunden nach der Infektion mit Hilfe der Bestimmung der Kinetoplasten-DNA Leishmanien im drainierenden Lymphknoten aller drei Stämme nachgewiesen werden konnten. Das Auftreten der Leishmanien erfolgte nicht in Wellen, sondern blieb über den beobachteten Zeitraum hinweg im Wesentlichen konstant. Trotz der unterschiedlichen Chemokin- und Zytokinexpression von Balb/c, C57BL/6 und C3H konnte kein Unterschied in der Leishmanienlast zwischen den drei Stämmen im untersuchten Zeitraum festgestellt werden.

3.6 Sechs Wochen nach der Infektion mit *L. major* ist die Differenzierung in T_H1- bzw. T_H2-zytokinproduzierende Zellen abgeschlossen

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben keinen eindeutigen Hinweis dafür, dass die Zytokinexpression zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion entscheidend für die Differenzierung der naiven CD4⁺-T-Zellen in T_H1- bzw. T_H2-Effektorzellen ist. Um zu zeigen, dass die unterschiedliche Differenzierung im Verlauf der Krankheit stattfindet, wurde die mRNA-Expression der T_H1/T_H2-Markerzytokine IFN γ , IL-4 und IL-10 zu einem sehr späten Zeitpunkt, nämlich sechs Wochen nach der Infektion mit *L. major*, in den ganzen Lymphknoten infizierter Tiere der Stämme C57BL/6 und Balb/c bestimmt.

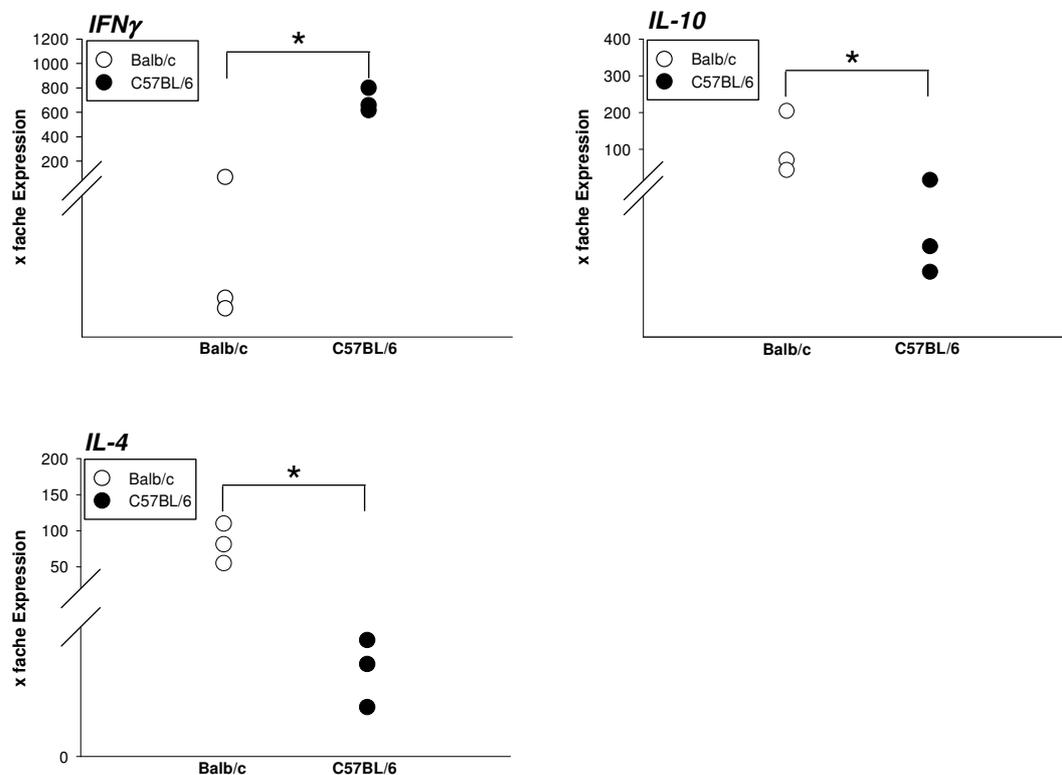


Abbildung 13:

Expression der mRNA des T_H1-Zytokins IFN γ und der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-10 in ganzen Schnitten poplitealer Lymphknoten infizierter Balb/c-Mäuse (weiße Kreise) und C57BL/6-Mäuse (schwarze Kreise) sechs Wochen nach der Infektion mit *L. major*. Dargestellt ist die relative Zunahme der mRNA-Expression sechs Wochen nach der Infektion bezogen auf die mRNA-Expression in den Kontrolltieren. Die Anzahl der untersuchten Tiere beträgt drei Tiere pro Stamm. Die mRNA-Expression wurde mit Hilfe der quantitativen Real Time RT-PCR mit Low Density Arrays untersucht. In den C57BL/6-Mäusen konnte sechs Wochen nach der Infektion mit *L. major* eine verstärkte mRNA-Expression von IFN γ nachgewiesen werden, während in den Balb/c-Mäusen eine erhöhte mRNA-Expression von IL-4 und IL-10 detektiert wurde. *: $p \leq 0,05$; Mann-Whitney U Test; p zeigt signifikanten Unterschied in der mRNA-Expression zwischen C57BL/6- und Balb/c-Mäusen.

Abbildung 13 zeigt, dass die Resistenz der C57BL/6-Mäuse gegenüber *L. major* sechs Wochen nach der Infektion mit einer T_H1-Antwort im drainierenden Lymphknoten verbunden ist, die durch die Produktion großer mRNA-Mengen von IFN γ charakterisiert ist. Die empfänglichen Balb/c-Mäuse zeigten im drainierenden Lymphknoten nach sechs Wochen hingegen eine T_H2-Antwort, gekennzeichnet durch eine hohe mRNA-Produktion von IL-4 und IL-10 im drainierenden Lymphknoten. Die Differenzierung in T_H1- bzw. T_H2-zytokinproduzierende Zellen ist zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen.

Zusammenfassung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Zusammensetzung des Zytokinmilieus in der Haut und im drainierenden Lymphknoten von empfänglichen Balb/c-Mäusen und resistenten C57BL/6-Mäusen zu frühen Zeitpunkten nach einer Infektion mit *L. major* kompartiment-spezifisch und *in vivo* zu bestimmen, um herauszufinden, ob die frühe Chemokin- und Zytokinexpression einen Rückschluss auf die nachfolgende Krankheitsentwicklung zulässt. Dafür wurde die Haut am Infektionsort sowie der popliteale Lymphknoten mit Hilfe quantitativer Real Time RT-PCR auf die mRNA-Expression von 47 Genen untersucht, die an der inflammatorischen Antwort auf eine Infektion beteiligt sind. Es zeigte sich, dass in der Haut zwischen gesunden Kontrolltieren beider Stämme keine Unterschiede im Zytokinmilieu festgestellt werden konnten. Kurz nach der Infektion mit *L. major* konnten hingegen Unterschiede in der Chemokinexpression festgestellt werden. Diese konnten nicht auf eine unterschiedliche Leishmanienlast in der Haut zurückgeführt werden.

Da angenommen wird, dass das Zytokinmilieu, das während der T- Zellaktivierung im drainierenden Lymphknoten vorherrscht, entscheidend für die T_H1- bzw. T_H2-Polarisierung der naiven CD4⁺-T-Zellen ist, wurde als nächstes das Zytokinmilieu im poplitealen Lymphknoten von Balb/c- und C57BL/6-Mäusen in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* bestimmt. Da Unterschiede in der Chemokin- und Zytokinexpression auf Kompartimentebene bei der Analyse von ganzen Lymphknotenschnitten verborgen bleiben können, wurden die Kompartimente getrennt voneinander untersucht. Dabei wurden für vier Gene kinetische Unterschiede in der Chemokin- und Zytokinexpression zwischen dem empfänglichen und dem resistenten Stamm festgestellt. Bereits acht Stunden nach der Infektion wurde im T-Zellbereich der resistenten C57BL/6-Mäuse eine verstärkte mRNA-Expression von CXCL-10

und IFN γ nachgewiesen, während in den empfänglichen Balb/-Mäusen diese Gene erst nach 24 Stunden verstärkt transkribiert wurden. 24 Stunden nach der Infektion konnten keine Unterschiede in der Chemokin- und Zytokinexpression zwischen beiden Stämmen detektiert werden. Die mRNA-Expression von CXCL-10, IFN γ , CXCL-9 und IL-1 β wurde von den Balb/c-Mäusen länger auf einem erhöhten Niveau gehalten als von den C57BL/6-Mäusen. Die mRNA von IL-4 wurde von beiden Stämmen 72 Stunden nach der Infektion verstärkt exprimiert. Um herauszufinden, ob die unterschiedliche mRNA-Expression homogen im ganzen T-Zellbereich erfolgt oder ob eine unterschiedliche Verteilung von zytokinexprimierenden Zellen an der T-/B-Zellgrenze und im inneren T-Zellbereich vorliegt, wurde der T-Zellbereich in zwei weitere Unterkompartimente unterteilt, die separat auf ihre Zytokinexpression untersucht wurden. Es zeigte sich, dass in beiden Stämmen die Immunantwort an der T-/B-Zellgrenze beginnt und erst etwas später auch im inneren Bereich des Lymphknotens sichtbar wird. Doch auch bei der differenzierten Analyse des T-Zellareals konnte nur ein kinetischer Unterschied zwischen beiden Stämmen nachgewiesen werden. Die anschließende Untersuchung der Proliferationsrate der T-Zellen in sog. Hot Spots, die vor allem an der T-/B-Zellgrenze lokalisiert waren, machte deutlich, dass die schnellere mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ von den C57BL/6-Mäusen nicht mit einem früheren Beginn der Proliferation der T-Zellen korreliert. Ebenso wenig konnten Unterschiede in der Parasitenlast festgestellt werden. Die Untersuchung der Kontrolltiere ergab hingegen, dass drei Chemokine- und Zytokine im B-Zellareal des poplitealen Lymphknotens von den Balb/c-Mäusen höher exprimiert wurden als von den C57BL/6-Mäusen. Die Analyse der frühen Chemokin- und Zytokinexpression im B-Zellbereich des drainierenden Lymphknotens ergab, dass die Chemokin- und Zytokin-mRNA in den untersuchten Stämmen in unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert ist. So wurde die mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ auch von den Balb/c-Mäusen bereits acht Stunden nach der Infektion verstärkt, jedoch nicht im T-Zellareal wie von den C57BL/6-Mäusen, sondern im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens. Auch im weiteren Verlauf (24 bis 72 Stunden nach der Infektion) zeigte sich in den Balb/c-Mäusen eine deutlich stärkere Beteiligung des B-Zellbereiches des Lymphknotens an der mRNA-Expression der genannten Gene. IL-4-mRNA konnte im B-Zellareal hingegen nach 72 Stunden nur bei den C57BL/6-Tiere nachgewiesen werden. Um herauszufinden, ob die verstärkte Chemokin- und Zytokinexpression im B-Zellareal zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit der Empfänglichkeit der Balb/c-Mäuse gegenüber der Infektion mit *L. major* zusammenhängt bzw. die frühere Chemokin- und Zytokinexpression

im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens in den C57BL/6-Mäusen zu der Resistenz dieses Stammes gegenüber der Infektion mit *L. major* beiträgt, wurden zusätzlich Tiere des -resistenten Stammes C3H untersucht. Die C3H-Mäuse ließen in der Verteilung ihrer Chemokin- und Zytokinexpression in den Kompartimenten des drainierenden Lymphknotens in den frühen Zeitpunkten nach der Infektion viele Übereinstimmungen mit den empfänglichen Balb/c-Mäusen erkennen, zeigten allerdings in beiden Kompartimenten eine bedeutend höhere mRNA-Expression als die Balb/c-Mäuse. In den C3H-Mäusen konnte hingegen keine verstärkte Expression von IL-4 festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit, dass die frühe Chemokin- und Zytokinexpression im T-Zellareal keinen Rückschluss auf die nachfolgende Krankheitsentwicklung zulässt. Unklar bleibt noch, ob die verstärkte Aktivität im B-Zellareal in den Balb/c-Mäusen mit der Empfänglichkeit dieses Stammes gegenüber der Infektion mit *L. major* im Zusammenhang steht.

4 Diskussion

In dieser Studie wurde die Zusammensetzung des Zytokinmilieus untersucht, welches während der adaptiven Immunantwort im drainierenden Lymphknoten vorherrscht und von der angenommen wird, dass sie einen Einfluss auf die Differenzierung naiver CD4⁺-T-Zellen in T_H1- bzw. T_H2-Zellen hat. Die Bedeutung der Zytokine auf die T-Zell-Differenzierung zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* wird kontrovers diskutiert. Ein Grund dafür ist sicher, dass Informationen über das lokale Zytokinmilieu bisher oft anhand von Experimenten mit Zellkulturen gewonnen wurden, die mit dem Antigen restimuliert wurden, um die mRNA-Expression der Zytokine zu induzieren.^[56;57] Es ist jedoch bekannt, dass das Zytokinmuster nach einer Restimulation Abweichungen zu dem Zytokinmuster zeigen kann, das nach dem ersten Antigenkontakt exprimiert wird.^[58] In anderen Studien wurden nur ganze lymphatische Organe untersucht. Die erhaltenen Informationen sind unvollständig, da die Bedeutung der hochstrukturierten Unterteilung der lymphatischen Organe in T- und B-Zellareal für die Differenzierung der T-Zellen unbeachtet bleibt. Dabei ermöglicht erst diese Struktur die größtmögliche Interaktion zwischen den verschiedenen Zelltypen, die im Lymphknoten anwesend sind. So wurde gezeigt,^[59;60] dass für die Aktivierung von T-Zellen im T-Zellareal ein konstanter Kontakt zwischen dendritischen Zellen und T-Zellen erforderlich ist. Zum anderen ist der Kontakt von B-Zellen mit aktivierten T-Zellen eine Voraussetzung für die Aktivierung der B-Zellen. Die getrennte Analyse von T- und B-Zellareal ist zusätzlich von so großer Bedeutung, da der popliteale Lymphknoten zu frühen Zeitpunkten nach einer Infektion zu etwa 80% aus T-Zellen besteht. Die Bestimmung der Zytokinexpression einer Mischung von Zellen, die aus dem ganzen Lymphknoten gewonnen wurden, spiegelt dadurch hauptsächlich das Expressionsmuster der T-Zellen wider. Im Gegensatz dazu erlaubt der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz, die Vorgänge, die nach einer Infektion mit *L. major* im T-Zellareal stattfinden, von denen zu unterscheiden, die im B-Zellareal ablaufen. Bedeutend ist dieses, da noch weitgehend unbekannt ist, welche Prozesse zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion im B-Zellareal stattfinden und welchen Einfluss sie auf den Verlauf der Krankheit haben. Unzureichend untersucht ist auch, wie die Prozesse der angeborenen Immunabwehr in der Haut am Infektionsort möglicherweise die nachfolgende T_H1-/T_H2-Polarisation im drainierenden Lymphknoten beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde für die Analyse der T-Zell-Differenzierung die experimentelle Infektion von Mäusen mit *L. major* eingesetzt. Diese stellt für die Fragestellung ein geeignetes Tiermodell dar, weil die Infektion mit *L. major* in verschiedenen Mausstämmen eine unterschiedliche Entwicklung der naiven T-Zellen in T_H1- oder T_H2-Zellen auslöst. Da bisher noch keine quantitativen Informationen über das Chemokin- und Zytokinmilieu im T-Zellareal zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* im Vergleich zu den anderen Organ-Kompartimenten verfügbar sind, wurde die mRNA von 47 Zytokinen, die an der inflammatorischen Antwort auf eine Infektion beteiligt sind, quantitativ im T- und B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens sowie in der Haut am Infektionsort von empfänglichen Balb/c-Mäusen und resistenten C57BL/6-Mäusen untersucht. Um die Chemokin- und Zytokinexpression von Zellen in ihrer natürlichen Umgebung untersuchen zu können und jede Manipulation zu vermeiden, wurde eine Kombination von Laser-Mikrodissektion und quantitativer Real Time RT-PCR für die Untersuchungen eingesetzt. Die exponentielle Amplifikation während einer PCR stellt im Moment die einzige Möglichkeit dar, minimale und frühe Veränderungen der mRNA-Expression vieler Gene gleichzeitig *in vivo* wahrzunehmen. Mit dem Vergleich der Expression von CD3 und CD19, die Teile des T- bzw. B-Zellrezeptorkomplexes darstellen, wurde der Beweis dafür erbracht, dass die Kompartimente akkurat voneinander getrennt werden konnten. Obwohl erhöhte mRNA-Level von Zytokinen nicht generell mit der Proteinsekretion korrelieren, geben sie doch einen wertvollen Hinweis darauf, wie für IFN γ gezeigt wurde.^[47] Es ist deshalb angemessen anzunehmen, dass Veränderungen in der mRNA-Expression im Zusammenhang mit der Expression des jeweiligen Proteins stehen. Die verwendete Methode ermöglicht dadurch die sensitive Detektion von biologisch relevanten Veränderungen in der Zytokin-Expression an definierten Stellen. Der Anstieg der mRNA-Expression kann dabei entweder bedeuten, dass eine Zellpopulation, die in dem jeweiligen Kompartiment lokalisiert ist, damit beginnt, mRNA zu produzieren, oder, dass eine Einwanderung mRNA-produzierender Zellen in das Kompartiment stattgefunden hat. Der in dieser Arbeit verfolgte Ansatz erlaubt damit, die frühe Phase einer Immunantwort *in vivo* zu studieren.

Die Untersuchung der Haut am Infektionsort zeigte, dass sich die konstitutive Chemokin- und Zytokinexpression zwischen Tieren des empfänglichen Stammes Balb/c und des resistenten Stammes C57BL/6 nicht unterscheidet. Bereits vier Stunden nach der Infektion mit *L. major* konnten hingegen Unterschiede in der mRNA-Expression von CXCL-2 und CCL-3 nachge-

wiesen werden. Für CXCL-2 (früher MIP-2) wurde gezeigt,^[61] dass es ein funktionelles Homologon zu IL-8 im Menschen darstellt. IL-8 wird von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten während der Koinkubation mit Leishmanien Promastigoten freigesetzt, woraus abgeleitet wurde,^[10] dass es einen chemotaktischen Faktor darstellt, dessen Freisetzung zu einer vermehrten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten an die Infektionsstelle führt und die Apoptose der neutrophilen Granulozyten verzögert.^[62] In dem Zeitraum zwischen 24 und 48 Stunden nach der Infektion konnte hingegen keine verstärkte CXCL-2-Produktion mehr beobachtet werden. Für diesen Zeitraum wurde zum einen gezeigt, dass die mit Leishmanien Promastigoten koinkubierten neutrophilen Granulozyten apoptotisch wurden. Zum anderen wurde herausgefunden,^[63] dass in den resistenten Tieren innerhalb weniger Stunden nach der Inokulation neutrophile Granulozyten an den Infektionsort rekrutiert werden, ihr Level aber innerhalb der ersten drei Tage wieder auf 1-2 % des zellulären Infiltrates absinkt. Von dem ebenfalls nur in den ersten 24 Stunden hochregulierten CCL-3 ist bekannt,^[64] dass es zusammen mit CCL-4 hauptsächlich von infizierten neutrophilen Granulozyten gebildet wird, wodurch Monozyten bzw. Makrophagen an den Infektionsort gelockt werden. Die verstärkte mRNA-Expression von CXCL-2 und CCL-3 am Infektionsort in den C57BL/6-Mäusen ist möglicherweise der Grund für die Beobachtung von Sunderkötter *et al.*,^[65] dass zwei Tage nach der Infektion mit 2×10^7 Leishmanien im Infiltrat von C57BL/6-Mäusen mehr reife F4/80-positive Makrophagen als in dem von Balb/c-Mäusen gefunden wurden. CCL-3 ist zudem für die Rekrutierung dendritischer Zellen, die sich von Monozyten ableiten, an den Infektionsort verantwortlich.^[66] Diese scheinen einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung einer schützenden T_H1-Immunreaktion zu spielen.^[67]

Bei der mRNA-Expression von CXCL-10 am Infektionsort konnte ein kinetischer Unterschied zwischen beiden Stämmen festgestellt werden. Für die Leishmaniose wurde gezeigt,^[68] dass die frühe Einwanderung von Granulozyten und NK-Zellen mit der Expression von CXCL-10 (IP-10) in der infizierten Haut korreliert. NK-Zellen erschienen in den C57BL/6-Mäusen bereits 24 Stunden nach der Infektion in der infizierten Haut. Die große Bedeutung der NK-Zellen liegt darin, dass sie das frühe IFN γ bereitstellen, welches erforderlich für die Makrophagenaktivierung ist. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede in der Zytokinexpression in der Haut könnten damit einen Hinweis darauf geben, dass es in den C57BL/6-Mäusen zu einem stärkeren Influx von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen an die Infektionsstelle in den C57BL/6-Mäusen kommt, was zu einer effizienteren Beseitigung der Parasiten durch die Anwesenheit des Makrophagen-aktivierenden IFN γ durch

NK-Zellen führen könnte, auch wenn in den ersten 72 Stunden noch keine Unterschiede in der Leishmanienlast zwischen den beiden Stämmen detektiert werden konnten.

Von unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt,^[46] dass in der Ratte eine konstitutive mRNA-Expression der untersuchten Zytokine in den lymphatischen Organen stattfindet und dass diese kompartimentspezifisch ist. So konnte im T-Zellbereich des axillären Lymphknotens eine verstärkte mRNA-Expression von T_H1-Zytokinen wie IL-12p40, IL-2 und IFN γ nachgewiesen werden, während im B-Zellareal die mRNA-Expression von T_H2-Zytokinen wie IL-4 und IL-10 dominierte. Auch für die Maus konnte in der vorliegenden Arbeit eine kompartimentspezifische konstitutive mRNA-Expression der betrachteten Zytokine festgestellt werden. Wie bei der Ratte wurde auch in den Kontrolltieren der Mausstämmen Balb/c und C57BL/6 IL-2 und IL-12p40 bevorzugt im T-Zellbereich des Lymphknotens exprimiert, während die mRNA von IL-4, IL-10 und IL-1 β bevorzugt im B-Zellbereich des poplitealen Lymphknotens nachgewiesen werden konnte. Der Vergleich zeigt, dass sich Ratte und Maus in der Kompartimentspezifität der konstitutiven mRNA-Expression im Lymphknoten gleichen.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass sich bei der mRNA-Expression von 47 untersuchten Zytokinen, die möglicherweise einen Einfluss auf die unterschiedliche T_H1/T_H2-Differenzierung im T-Zellareal des drainierenden Lymphknoten haben, zwischen den beiden unterschiedlichen Mausstämmen nur bei vier Zytokinen kinetische Unterschiede in der mRNA-Expression nachweisen lassen:

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von IL-12p40 in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* konnte weder im T-Zellbereich der drainierenden Lymphknoten der resistenten C57BL/6-Mäuse noch in denen der anfälligen Balb/c-Mäuse eine verstärkte mRNA-Expression nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist überraschend, da IL-12 als eines der wichtigsten Zytokine gilt, welches die Immunantwort in Richtung einer T_H1-Antwort polarisiert, indem es die IFN γ -Synthese von T-Zellen induziert.^[69] Es wurde gezeigt,^[35] dass normalerweise resistente Mäuse nach einer Behandlung mit anti-IL-12-Antikörpern anfällig gegenüber einer Infektion mit *L. major* werden, während anfällige Balb/c-Mäuse, die mit IL-12 behandelt werden, eine T_H1-Antwort entwickeln und resistent werden. Die Beobachtung in dieser Arbeit stimmt jedoch mit den Ergebnissen der Arbeit von Pearlman *et al.*^[33] überein, in der die Gabe von anti-IL-12 gerichteten Antikörpern in

C57BL/6-Mäusen zu einer verstärkten Fußdickenschwellung verbunden mit der Entwicklung von ulzerierenden Läsionen führte. Interessanterweise war der Effekt der Antikörpergabe sieben Tage nach der Infektion mit *L. major* am effektivsten. Diese zeitliche Verzögerung der IL-12-Produktion wurde auch in der Studie von Locksley *et al.*^[34] beobachtet und konnte darauf zurückgeführt werden, dass frühestens sieben Tage nach der Infektion mit *L. major* intrazelluläre Leishmania Amastigoten im Lymphknoten detektiert werden können, von denen *in vitro* nachgewiesen wurde, dass sie im Gegensatz zu Leishmania Promastigoten die Bildung von IL-12p40 mRNA induzieren. Die Beobachtung, dass Leishmanien Promastigoten die Induktion der mRNA Expression von IL-12p40 unterdrücken können, wird als eine wirkungsvolle Strategie betrachtet, die es den Leishmanien erlaubt, in die Makrophagen einzudringen, ihre Effektorfunktionen herunterzuregulieren und damit in ihnen überleben zu können.

Für IL-10 wurde in dieser Arbeit in beiden untersuchten Stämmen im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens eine verstärkte mRNA-Expression nachgewiesen. Dieses Ergebnis stimmt mit vielen aktuellen Studien^[70;71;72] überein, in denen die Hypothese, dass IL-10 vor allem für die Polarisierung von naiven T-Zellen in T_H2-Zellen verantwortlich ist, verworfen wurde und stattdessen eine regulative Rolle für IL-10 beschrieben wird. Als Quelle des frühen IL-10 kommen viele unterschiedliche Zellen in Frage, denn es wurde gezeigt,^[71] dass IL-10 von vielen Zelltypen wie B-Zellen, Mastzellen, Eosinophilen, Makrophagen, dendritischen Zellen, CD8⁺-T-Zellen, aktivierten CD4⁺-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen gebildet wird. Aufgrund der beobachteten mRNA-Expression von IL-10 zu sehr frühen Zeitpunkten der Infektion liegt die Vermutung nahe, dass dendritische Zellen für die beobachtete mRNA-Expression von IL-10 in den drainierenden Lymphknoten verantwortlich sind.

Auch für IL-4 konnte in beiden Stämmen eine übereinstimmende mRNA-Expression 72 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden. Über diese frühe IL-4-Produktion ist bekannt,^[73] dass sie auf eine oligoklonale Population von CD4⁺-T-Zellen beschränkt ist, die einen V β 4V α 8-T-Zellrezeptor tragen, der das Leishmanien-Antigen LACK erkennt. Diese Zelllinie wurde sowohl in Balb/c- als auch in C57BL/6-Mäusen gefunden,^[74] was die frühe, aber transiente IL-4-Produktion in dem resistenten Stamm erklärt. Während IL-4 für die Balb/c-Mäuse das bedeutenste Zytokin für die Entwicklung einer T_H2-Antwort darstellt, ist die Funktion von IL-4 in den resistenten C57BL/6-Mäusen noch nicht bekannt. Es wird daher angenommen, dass der entscheidende Faktor einer erfolgreichen Immunantwort gegen *L.*

major resistenter Tiere darin liegt, die frühe T_H2 -Antwort, die durch die Expression von IL-4 charakterisiert wird, in eine T_H1 -Antwort umzuwandeln.^[15]

Bei der Untersuchung der mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* konnten kinetische Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den beiden Stämmen nachgewiesen werden. Zu diesem frühen Zeitpunkt wird vor allem lösliches Antigen, das durch lebende, verletzte oder tote Parasiten in der Haut freigesetzt wird und mit der Lymphe in den Lymphknoten gelangt, von residenten dendritischen Zellen des Lymphknotens aufgenommen und präsentiert.^[75] DCs aus der Haut und Langerhans-Zellen scheinen zu diesem Zeitpunkt noch keine Rolle beim Transport der Parasiten, der Antigenpräsentation und der Aktivierung der T-Zellen zu spielen. Erst zwei bis vier Tage nach der Infektion mit *L. major* konnten Langerhans-Zellen im drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden, die lebensfähige Parasiten enthielten.^[76]

Auffällig ist, dass die mRNA-Expression von CXCL-10 und IFN γ von den resistenten C57BL/6-Mäusen im T-Zellareal bereits acht Stunden nach der Infektion verstärkt wurde, während dieses im T-Zellareal der anfälligen Balb/c-Mäuse erst 24 Stunden nach der Infektion erfolgte. Als Quelle dieser frühen Expression von IFN γ wurden natürliche Killerzellen identifiziert, die kurz nach der Infektion mit *L. major* verstärkt im Lymphknoten nachgewiesen werden konnten.^[77] Diese frühe Produktion von IFN γ in resistenten Stämmen scheint eine wichtige Rolle für die schnelle Entwicklung von T_H1 -Zellen zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass NK-Zell-depletierte C3H-Mäuse eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit *L. major* aufweisen. So konnten die NK-Zell-depletierten Tiere erst nach einigen Wochen eine T_H1 -Antwort entwickeln und damit die Krankheit beherrschen. Es wurde gezeigt,^[78] dass nach einer Infektion mit *L. major* eine schnelle Rekrutierung der NK-Zellen aus dem Blut via den HEV's und ihre Akkumulation unterhalb der B-Zell-Follikel im T-Zellareal erfolgt, wo sie IFN γ produzieren. Diese strategische Kolokalisation von NK- und T-Zellen während der Initiation einer Immunantwort erlaubt dem von NK-Zellen stammenden IFN γ , die $CD4^+$ -T-Zelldifferenzierung zu beeinflussen. Kürzlich konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden,^[60] dass die Interaktion von T-Zellen mit dendritischen Zellen an der Grenze der T-Zellzone zu einem größeren Anteil an T-Zellen führt, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, verglichen mit Interaktionen von T-Zellen und dendritischen Zellen in der inneren T-Zellzone. Zusätzlich scheint bei der Infektion mit *L. major* für den Verlauf der Krankheit entscheidend zu sein, ob das Antigen im äußeren oder inneren T-Zellareal präsentiert wird.^[55] Auch die vorliegende Arbeit zeigt, dass die untersuchten Tiere

im äusseren Bereich des T-Zellareals die höchste Konzentration an Transkripten aufweisen. Dieses gibt einen Hinweis darauf, dass die T-Zell-Aktivierung und -Differenzierung vor allem im äusseren Bereich des T-Zellareal an der Grenze zum B-Zellbereich stattfindet.

Für CXCL-10 wurde ebenfalls gezeigt,^[79] dass es für das Anlocken von NK-Zellen und von naiven T-Zellen in das T-Zellareal verantwortlich ist. Die Hauptquelle dieses Chemokins stellen T_H1-fördernde dendritische Zellen dar.^[80] CXCL-10 unterstützt die Bildung von Zellclustern, die aus dendritischen Zellen und T-Zellen bestehen. Zusätzlich scheint CXCL-10 für das Zurückhalten der CD4⁺-T-Lymphozyten während ihrer Differenzierung zu T_H1-Zellen im T-Zellareal der drainierenden Lymphknoten verantwortlich zu sein.^[81]

CXCL-9 wurde im Gegensatz zu CXCL-10 und IFN γ hingegen in beiden Stämmen zur gleichen Zeit im T-Zellareal des drainierenden Lymphknotens verstärkt exprimiert. Auch CXCL-9 ist für die Rekrutierung von NK-Zellen^[82] verantwortlich, es wird durch die Lymphgefäße zum drainierenden Lymphknoten transportiert, wo es im Lumen der HEV's nachgewiesen werden konnte und dort für die Rekrutierung der CXCR3-exprimierenden Zellen aus dem Blut in den Lymphknoten sorgt.^[83]

Eine erhöhte mRNA Expression von IL-1 β konnte in dieser Arbeit nur im T-Zellareal der drainierenden Lymphknoten von Balb/c-Mäusen nachgewiesen werden.

Widersprüchlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde in einer anderen Studie^[84] gezeigt, dass IL-1, das durch infizierte dendritische Zellen freigesetzt wird, eine wichtige Rolle in der Ausprägung einer effizienten T_H1-Antwort spielt. Es wurde herausgefunden, dass die dendritischen Zellen im resistenten Stamm C57BL/6 höhere Mengen an IL-1 produzieren, während in anfälligen Balb/c-Mäusen die Fähigkeit der DCs, IL-1 zu bilden, reduziert ist. Die Gabe von IL-1 α führt in Balb/c-Mäusen zu einer verstärkten T_H1- und entsprechend verminderten T_H2-Zytokin-Expression, wobei die Funktion von IL-1 α strikt IL-12-abhängig ist.^[32] In der Arbeit von Filippi *et al.*^[85] wurde gezeigt, dass die Fähigkeit der dendritischen Zellen aus anfälligen Balb/c-Mäusen und resistenten B10D2-Mäusen, naive T-Zellen in T_H1- bzw. T_H2-Zellen zu polarisieren, durch die unterschiedliche Produktion von IL-1 β verursacht wird. Weiterhin wurde gezeigt,^[85] dass die Behandlung von der Balb/c mit IL-1 β zu einem signifikant reduzierten T_H2-Phänotyp führte, charakterisiert durch eine geringere Produktion von IL-4 und einer 20fach reduzierten Anzahl von Parasiten im drainierenden Lymphknoten. Die widersprüchlichen Ergebnisse, die für die mRNA-Expression von IL-1 nach einer Infektion mit *L. major* erhalten wurden, sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass IL-1 nicht auf mRNA-Ebene reguliert wird, sondern beide Untereinheiten von IL-1 als

Vorstufen-Zytokine synthetisiert werden und erst durch die Prozessierung durch die Proteasen Calpain (für IL-1 α) und Caspase-1 (für IL-1 β) aktiviert werden. Aus diesem Grund könnte eine noch detailliertere Untersuchung von IL-1 ein interessantes Projekt für eine weiterführende Forschungsarbeit darstellen.

Trotz der kinetischen Unterschiede in der Chemokinexpression von CXCL-9 und CXCL-10 und in der Zytokinexpression von IFN γ und IL-1 β zwischen den beiden Stämmen konnte kein Unterschied beim Zeitpunkt der T-Zellaktivierung festgestellt werden. In beiden Stämmen begannen die T-Zellen bereits 36 Stunden nach der Infektion zu proliferieren. Die Beobachtung, dass das Zytokinmilieu 24 Stunden nach der Infektion, also unmittelbar bevor dem Beginn der T-Zellproliferation, keinen Unterschied zwischen den empfänglichen Balb/c-Mäusen und den resistenten C57BL/6-Mäusen aufweist, lässt die Behauptung zu, dass die unterschiedliche Differenzierung der naiven CD4⁺-T-Zellen in T_H1- bzw. T_H2- Zellen nicht in den ersten 72 Stunden nach der Infektion mit *L. major* erfolgt. Um diese Vermutung zu verifizieren, wäre es möglich, drei Tage nach der Erstinfektion eine DTH-Reaktion (delayed type hypersensitivity) am nicht-infizierten Fußballen der Versuchstiere mit Leishmanien-Lysat durchzuführen.

Eine Studie,^[55] in der eGFP-exprimierenden Leishmanien verwendet wurden, weist neben der Bedeutung des T-Zellareals auf die Involvierung des B-Zellareals zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* hin. Die Studie zeigt, dass sich das Leishmanien-Antigen vier Stunden nach der Infektion als ein Gradient im Lymphknoten ausbreitet, der sich vom Marginalsinus aus bis in das B-Zellareal erstreckt. Nach 16 Stunden wurde das Leishmanien-Antigen vor allem im B-Zellareal nachgewiesen. Quantitative Daten über die Zytokinexpression in den unterschiedlichen Kompartimenten zu diesen frühen Zeitpunkten gibt es hingegen noch nicht.

Im Unterschied zur Expression im T-Zellareal unterscheidet sich die frühe Expression der Chemokine und Zytokine im B-Zellareal deutlich zwischen C57BL/6- und Balb/c-Mäusen. Während die „T_H1-dominierten“ C57BL/6-Mäuse bevorzugt das für eine T_H2-Antwort charakteristische IL-4 produzieren, exprimieren die „T_H2-dominierten“ Balb/c-Mäuse IFN γ und CXCL-10, die charakteristische Zytokine für eine T_H1-Antwort darstellen.

Durch die kompartimentspezifische Untersuchung der mRNA-Expression zu frühen Zeitpunkten kann in dieser Arbeit damit erstmals gezeigt werden, dass es zu frühen Zeitpunkten

nach der Infektion mit *L. major* Unterschiede zwischen den beiden Stämmen in der Lokalisation ihrer Chemokin- und Zytokinexpression gibt. Während in den resistenten C57BL/6-Mäusen die verstärkte mRNA-Expression von CXCL-10, IFN γ und CXCL-9 auf das T-Zellareal begrenzt war, konnte bei den Balb/c-Mäusen eine Zunahme der mRNA-Expression auch im B-Zellareal des Lymphknotens nachgewiesen werden. mRNA von IL-4 konnte hingegen nach 72 Stunden nur im B-Zellareal der C57BL/6-Tiere nachgewiesen werden.

Die verstärkte mRNA-Expression von CXCL-9 und CXCL-10 im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens der Balb/c-Mäuse führt möglicherweise dazu, dass IFN γ -produzierende NK-Zellen in den C57BL/6-Mäusen nur in das T-Zellareal des drainierenden Lymphknoten wandern, während sie hingegen in den Balb/c-Mäusen auch in das B-Zellareal gelockt werden, wo sie mit den B-Zellen interagieren können. In der Arbeit von Gao *et al.*^[86] wurde gezeigt, dass NK-Zellen zwar nicht die IgM-Produktion der B-Zellen induzieren können, aber eine begrenzte Differenzierung von ruhenden B-Zellen initiieren. NK-Zellen induzieren demnach die Bildung von Keimbahn-Transkripten für IgG2a (I γ 2a), was den ersten Schritt für den Klassenwechsel zu IgG2a darstellt.

Die Bedeutung der verstärkten IL-4-Produktion im T- und B-Zellareal der drainierenden Lymphknoten der C57BL/6-Mäuse ist bisher unbekannt. Möglicherweise trägt sie zu der Resistenz des C57BL/6-Stammes gegenüber der Infektion mit *L. major* bei. So führte bei Balb/c-Mäusen, die mit *L. major* infiziert wurden, die Gabe von rekombinantem IL-4 zum Zeitpunkt der initialen Aktivierung der dendritischen Zellen dazu, dass die dendritischen Zellen stimuliert wurden, IL-12 zu produzieren und damit die Entwicklung einer schützenden T_H1-Antwort unterstützten.^[87]

Die erhöhte Chemokinproduktion der dendritischen Zellen im B-Zellareal der drainierenden Lymphknoten der Balb/c-Mäuse könnte auf zwei Ursachen zurückzuführen sein: Zum einen wäre möglich, dass sich die Anzahl der dendritischen Zellen im B-Zellareal des drainierenden Lymphknoten zwischen beiden Stämmen unterscheidet. In der Studie von Baldwin *et al.*^[88] wurde beobachtet, dass die drainierenden Lymphknoten der Balb/c-Mäuse eine größere Anzahl an plasmazytoiden prä-dendritischen Zellen (PDCs) aufweisen als die der C57BL/6-Mäuse. Für diese Art der dendritischen Zellen konnte gezeigt werden,^[89] dass sie Antigen aufnehmen, welches sie naiven B-Zellen präsentieren, die daraufhin die Produktion von antigenspezifischen Antikörpern initiieren.

Die weiterführenden Experimente unserer Arbeitsgruppe zeigen hingegen, dass die verstärkte Zytokinexpression im B-Zellareal des Lymphknotens möglicherweise darauf zurückzuführen ist, dass in Balb/c-Mäusen mehr apoptotische Parasiten im B-Zellareal des Lymphknotens akkumulieren. [K. Kalies, persönliche Mitteilung]. Die Anwesenheit dieser apoptotischen Parasiten führt in den Balb/c-Mäusen zu der Produktion von leishmanienspezifischem IgG1. Der zweite Kontakt der spezifischen T-Zellen mit den Leishmanien einige Wochen nach der Infektion findet dadurch in Anwesenheit von leishmanienspezifischem IgG1 statt, was zu einer Erhöhung der Empfänglichkeit gegenüber der Krankheit führt. Als ein möglicher Grund dafür, dass die Antikörperproduktion zu einer erhöhten Empfänglichkeit gegenüber der Krankheit führt, wird diskutiert, dass in den C57BL/6-Mäusen eine geringere Opsonisierung der Leishmanien Amastigoten erfolgt. Nichtopsonierte Parasiten werden bevorzugt von Monozyten aufgenommen.^[90] Damit übereinstimmend wurde gezeigt,^[91] dass Monozyten in die infizierte Haut von C57BL/6-Mäusen einwandern, danach in den Lymphknoten rekrutiert werden und drei Wochen nach der Infektion eine T_H1-Antwort induzieren. Im Gegensatz dazu könnte der höhere Grad an Opsonierung in Balb/c-Mäusen dazu führen, dass hauptsächlich dendritische Zellen für die Antigenpräsentation zuständig sind. Diese unterschiedliche Rekrutierung von antigenpräsentierenden Zellen führt möglicherweise zu den beobachteten Unterschieden in der Parasitenlast drei Wochen nach der Infektion im drainierenden Lymphknoten. Während in den Balb/c-Mäusen eine große Menge an Parasiten im drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden konnte, war die Zahl der Parasiten in den C57BL/6-Mäusen niedriger. Als Folge einer Immunisierung mit einer hohen Dosis an Antigen wurde bereits beschrieben, dass diese eine humorale Antwort auslöst, während niedrige Dosen eine zelluläre Immunreaktion hervorrufen.^[92;93]

Die Einbeziehung von Tieren des ebenfalls resistenten Stammes C3H in die Untersuchung der Zytokinexpression zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion mit *L. major* zeigt, dass in C3H-Mäusen sowohl im T-Zellareal auch im B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens eine hohe mRNA-Expression von IFN γ , CXCL-10 und CXCL-9 gemessen werden kann. Nicht bekannt ist bis jetzt, ob die verstärkte mRNA-Expression dieser Zytokine im B-Zellareal auch mit einer Akkumulierung der Parasiten im B-Zellareal und einer Produktion von leishmanienspezifischen Antikörpern im Zusammenhang steht. Damit bleibt unklar, ob die verstärkte Aktivität im B-Zellareal in den Balb/c-Mäusen mit der Empfänglichkeit dieses Stammes gegenüber der Infektion mit *L. major* im Zusammenhang steht. Interessant ist in diesem Kontext, dass bei den C3H-Mäusen im Gegensatz zu den Balb/c-Mäusen eine äußerst geringe

mRNA-Expression von IL-4 im Lymphknoten festgestellt wurde. Von IL-4 ist bekannt, dass es die B-Zellproliferation verstärkt und den Ig-Klassenwechsel zu IgG1 und IgE induziert.^[94;95] IFN γ hingegen unterstützt den Ig-Klassenwechsel zu IgG2a.^[96] Die Bestimmung der IgG-Antikörper in der C3H-Maus stellt damit eine sehr interessante Fragestellung für weitere Studien dar.

Die Beobachtung, dass sich die beiden resistenten Stämme C57BL/6 und C3H in der Zytokinexpression im T- und B-Zellareal deutlich voneinander unterscheiden, zeigt, dass die Resistenz gegenüber der Infektion mit *L. major* in den beiden Stämmen auf unterschiedliche Weise vermittelt wird.

Schlussfolgerung und Ausblick

Mit der Untersuchung der mRNA-Expression von 47 Chemokinen und Zytokinen im T- und B-Zellareal des drainierenden Lymphknotens zu frühen Zeitpunkten der Infektion mit *L. major* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es zwischen den Mäusen des gegenüber der Infektion resistenten Stammes C57BL/6 und des empfänglichen Stammes Balb/c im T-Zellareal keinen Unterschied im Zytokinmilieu zum Zeitpunkt der T-Zell-Differenzierung gibt. Im Gegensatz dazu wurde beobachtet, dass sich die frühe B-Zell-Antwort zwischen beiden Stämmen unterscheidet. Dieses Ergebnis stellt einen maßgeblichen Unterschied zwischen den beiden Stämmen dar, der für die Empfänglichkeit der Balb/c-Mäuse gegenüber einer Infektion mit *L. major* mitverantwortlich sein könnte. Unklar ist bisher die Bedeutung dieser frühen B-Zell-Aktivierung. Eine interessante Fragestellung für weiterführende Experimente ist, ob die frühe B-Zell-Aktivierung zu einer unterschiedlichen Antikörperproduktion in den beiden Stämmen führt und welche Auswirkung die Anwesenheit von leishmanien-spezifischen Antikörpern zu dem Zeitpunkt, an dem die Leishmanien den T-Zellen zum zweiten Mal präsentiert werden, auf den Verlauf der Krankheit hat. Ebenfalls unbekannt ist, ob die frühe B-Zellaktivierung in der hochresistenten C3H ebenfalls zu einer verstärkten Antikörperproduktion führt oder ob möglicherweise das Fehlen von IL-4 die Antikörperproduktion hemmt. Das Wissen um die Bedeutung der frühen B-Zell-Aktivierung könnte neue Möglichkeiten in der Therapie von Leishmaniosen bieten, für die bisher nur zwei Impfungen und nur wenige Medikamente zur Verfügung stehen, gegen die die Erreger bereits Resistenzen entwickeln.^[97]

5 Zusammenfassung

Es wird angenommen, dass das Zytokinmilieu, das während der T-Zellaktivierung im drainierenden Lymphknoten vorherrscht, einen der wichtigsten Faktoren darstellt, der die unterschiedliche Differenzierung von naiven CD4⁺-T-Zellen in T_H1- bzw. T_H2-Zellen beeinflusst. Da eine Infektion mit *L. major* in unterschiedlichen Mausstämmen eine T_H1- bzw. T_H2-Antwort hervorruft, ist diese Infektion ein hilfreiches Modell, um die Mechanismen, die zu einer T_H1- oder T_H2-Antwort führen, aufzuklären. Die kompartimentspezifische Untersuchung des drainierenden Lymphknotens *in vivo* mit der Kombination aus Mikrodissektion und quantitativer Real Time RT-PCR erlaubt dabei, die Vorgänge, die im T-Zellareal stattfinden, von denen zu unterscheiden, die im B-Zellareal ablaufen.

Die kompartimentspezifische Untersuchung ergab, dass sich die Zytokinexpression im T-Zellareal zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion kaum zwischen den Tieren des resistenten Stammes C57BL/6 und denen des empfänglichen Stammes Balb/c unterscheidet. Es konnte lediglich ein kinetischer Unterschied zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden. 24 Stunden nach der Infektion, also unmittelbar bevor die ersten proliferierenden Zellen nachgewiesen werden konnten, wiesen die Lymphknoten keine Unterschiede im Zytokinmilieu auf.

Durch die zusätzliche separate Untersuchung des B-Zellareals konnte erstmals gezeigt werden, dass in den Balb/c-Mäusen im Gegensatz zu C57BL/6-Mäusen schon zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion eine deutlich stärkere Aktivität im B-Zellbereich des Lymphknotens stattfindet. Doch Tiere des hochresistenten Stammes C3H zeigen sowohl im T- als auch im B-Zellareal eine bedeutend höhere mRNA-Expression als die C57BL/6-Mäuse. In den C3H-Mäusen konnte hingegen keine verstärkte Expression von IL-4 festgestellt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen damit, dass die frühe Zytokinexpression im T-Zellareal keinen Rückschluss auf die nachfolgende Krankheitsentwicklung zulässt, die verstärkte Aktivierung von B-Zellen im B-Zellareal in den Balb/c-Mäusen aber möglicherweise mit der Empfänglichkeit dieses Stammes gegenüber der Infektion mit *L. major* im Zusammenhang steht.

6 Literatur

- [1] Frank, M.M. & Fries, L.F.
The role of complement in inflammation and phagocytosis.
Immunol Today 12:322-326 (1991).
- [2] Medzhitov R. & Janeway C. Jr.
The Toll receptor family and microbial recognition.
Trends Microbiol; 8(10):452-6 (2000).
- [3] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M.
Immunbiologie
Spektrum Akademischer Verlag, 5. Auflage (2002).
- [4] Liew, F.Y.
T_H1 and T_H2-cells: a historical perspective.
Nat Rev Immunol 2: 55-60 (2002).
- [5] Wynn, T.A.
T_H-17: a giant step from T_H1 and T_H2.
Nat Immunol 6: 1069-70 (2005).
- [6] Borgulya, P., Kishi, H., Müller, U., Kirberg, J., von Boehmer, H.
Development of the CD4 and CD8 lineage of T cells: instruction versus selection.
EMBO J. 10(4): 913-8 (1991).
- [7] Liu, Y.J., Zhang, J., Lane, P.J., Chan, E.Y. & MacLennan I.C.
Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-
dependent and T cell-independent antigens.
Eur J Immunol 21(12): 2951-62 (1991).

- [8] Warburg, A. & Schlein, Y.
The effect of post-bloodmeal nutrition of *Phlebotomus papatasi* on the transmission of *Leishmania major*.
Am J Trop Med Hyg 35: 926-930 (1986).
- [9] von Stebut, E. & Udey, M.
Requirements for Th1-dependent immunity against infection with *Leishmania major*.
Microbes and Infection 6: 1102-1109 (2004).
- [10] van Zandbergen, G., Hermann, N., Laufs, H., Solbach, W. & Laskay, T.
Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes.
Infect Immun 70 (8): 4177-84 (2002).
- [11] Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J.C., Solbach, W. & Laskay, T.
Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors.
Infect Immun 70 (2): 826-35 (2002).
- [12] Laskay, T., Diefenbach, A., Rollinghoff, M. & Solbach, W.
Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection.
Eur J Immunol 25: 2220–2227 (1995).
- [13] van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W. & Laskay, T.
Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages.
J Immunol 173: 6521-6525 (2004).

-
- [14] Solbach, W. & Laskay T.
The host response to *Leishmania* infection.
Adv Immunol 74: 275-317 (2000).
- [15] Sacks, D. & Noben-Trauth, N.
The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice.
Nat Rev Immunol 2: 845–858 (2002).
- [16] Scharon-Kersten, T., Afonso, L.C., Wysocka, M., Trinchieri, G. & Scott, P.
IL-12 is required for Natural Killer cell activation and subsequent T helper1 cell
development in experimental *Leishmaniasis*.
J Immunol 154: 5320-30 (1995).
- [17] Seder, R.A., Gazzinelli, R., Sher, A. & Paul, W.E.
Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon γ
production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming.
Proc Natl Acad Sci USA 90: 10188-92 (1993).
- [18] Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R. &
Trinchieri, G. The Interleukin 12p40 Gene Promoter is primed by Interferon gamma in
monocytic cells.
J Exp Med 183(1): 147-57 (1996).
- [19] Butcher, E.C. & Picker, L.J.
Lymphocyte homing and homeostasis.
Science 272: 60–66 (1996).
- [20] Muller, G., Hopken, U.E. & Lipp M.
The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic
immunity.
Immunol Rev 195: 117–135 (2003).

- [21] Itano, A.A. & Jenkins, M.K.
Antigen presentation to naïve CD4 T cells in the lymph node
Nat Immunol 4: 733–739 (2003).
- [22] Granucci, F., Zanoni, I., Feau, S. & Ricciardi-Castagnoli P.
Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity.
EMBO J. 22 (11): 2546-51 (2003).
- [23] Sad, S. & Mosmann, T.R.
Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype.
J Immunol 153: 3514-3522 (1994).
- [24] O'Garra, A. et al.
Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B-cell derived interleukin 10.
Eur J Immunol 22: 711-717 (1992).
- [25] Boonstra, A. et al.
Macrophages and myeloid DC, but not plasmacytoid DC, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals.
J Immunol 177: 7551-7558 (2006).
- [26] Roncarolo, M. G. et al.
Interleukin-10 secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.
Immunol Rev 212: 28-50 (2006).
- [27] Trinchieri, G.
Interleukin-10 production by effector T cells: T_H1 cells show self control.
J Exp Med 204: 239-243 (2007).

- [28] Kane, M. & Mosser, D. M.
The role of IL-10 in promoting disease progression in *Leishmaniasis*.
J Immunol 166: 1141-1147 (2001).
- [29] Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V.J., Sacks, D.
CD4⁺CD25-Foxp3- T_H1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous *Leishmaniasis*.
J Exp Med 204: 285-297 (2007).
- [30] Heinzl, F.P., Schoenhaut, D.S., Rerko, R.M., Rosser, L.E. & Gately, M.K.
Recombinant IL-12 cures mice infected with *L. major*.
J Exp Med 177: 1505-1509 (1993).
- [31] Hondowicz, B.D., Scharon-Kersten, T.M., Jones, D.E. & Scott P.
Leishmania major-infected C3H mice treated with anti-IL-12 mAb develop but do not maintain a Th2 response.
J Immunol 159(10): 5024-31 (1997).
- [32] von Stebut, E., Belkaid, Y., Nguyen, B.V., Cushing, M., Sacks, D. & Udey, M.C.
Leishmania major-infected murine langerhans cell like dendritic cells from susceptible mice release IL-12 after infection and vaccinate against experimental cutaneous *Leishmaniasis*.
Eur J Immunol. 30: 3498-3506 (2000).
- [33] Heinzl, F., Rerko, R., Ahmed, F. & Pearlman, E.
Endogenous IL-12 is required for control of T_H2 cytokine responses capable of exacerbating *Leishmaniasis* in normally resistant mice.
J Immunol 155: 730-739 (1995).
- [34] Reiner, S.L., Zheng, S., Qang, Z., Stowring, L. & Locksley, R.M.
Leishmania promastigotes evade Interleukin 12 Induction by Macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4⁺ T cells during initiation of infection.
J Exp Med 179: 447-456 (1994).

- [35] Park, A.Y., Hondowicz, B.D. & Scott P.
IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection.
J Immunol 165(2): 896-902 (2000).
- [36] Scott, P.
IFN γ modulates the early development of T_H1 and T_H2 responses in a murine model of cutaneous *Leishmaniasis*.
J Immunol 147: 3149-3155 (1991).
- [37] Leiby, D.A, Schreiber, R.D. & Nacy, C.A.
IFN γ produced by in vivo during the first two days is critical for resolution of murine *Leishmania major* infections.
Microbial Pathogenesis 14: 495-500 (1993).
- [38] Erb, K.J., Blank, C. & Moll, H.
Susceptibility to *Leishmania major* in IL-4 transgenic mice is not correlated with the lack of a Th1 immune response.
Immunol Cell Biol 74(3): 239-44 (1996).
- [39] Chatelain, R., Varkila, K. & Coffmann, R.L.
IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major* infected mice.
J Immunol 148: 1182-87 (1992).
- [40] Kopf, M., Brombacher, F., Köhler, G., Kienzle, G., Widmann, K.H., Lefrang, K., Humborg, C., Ledermann, B. & Solbach, W.
IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*.
J Exp Med 184(3): 1127-36 (1996).
- [41] Noben-Trauth, N., Paul, W.E. & Sacks, D.L.
IL-4 and IL-4 Receptor deficient Balb/c mice reveal differences in susceptibility to *Leishmania major* parasite substrains.
J Immunol 162(10): 6132-40 (1999).

- [42] Scott P.
Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*.
Exp Parasitol 84: 178-187 (1996).
- [43] Pfeiffer, C., Stein, J., Southwood, S. *et al.*
Altered peptide ligands can control CD4 T lymphocyte differentiation *in vivo*.
J Exp Med 181: 1569–1574 (1995).
- [44] Bretscher, P.A., Wei, G., Menon, J.N. *et al.*
Establishment of stable, cellmediated immunity that makes ‘susceptible’ mice resistant to *Leishmania major*.
Science 257: 539–542 (1992).
- [45] Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A. *et al.*
Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naïve CD4⁺ T cells.
J Exp Med 182: 1591–1596 (1995).
- [46] Kalies, K., Blessenohl, M., Nietsch, J. & Westermann, J.
T cell zones of lymphoid organs constitutively express Th1 cytokine mRNA: specific changes during the early phase of an immune response.
J Immunol 176(2): 741-749 (2006).
- [47] Mayer, K.D., Mohrs, K., Crowe, S.R., Johnsson, L.L., Rhyne, P., Woodland, D.L. & Mohrs, M.
The functional heterogeneity of type I effector T cells in response to infection is related to the potential for IFN γ -production.
J Immunol 174: 7732-7739 (2005).
- [48] Mohrs, M, Shinkai, K., Mohrs, K. and Locksley, R.M.
Analysis of type 2 immunity *in vivo* with a bicistronic IL-4 reporter.
Immunity 15: 303-311 (2001).

- [49] Livak, K. J. & Schmittgen, T.D.
Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.
Methods 25: 402-8 (2001).
- [50] Freeman, W.M., Walker, S. J. & Vrana, K. E.
Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential.
Biotechnology 26: 112-22 (1999).
- [51] Kruse, N., Moriabadi, N.F., Toyka, K.V. & Rieckmann, P.
Characterization of early immunological responses in primary cultures of differentially activated human peripheral mononuclear cells.
J Immunol Methods 247(1-2): 131-9 (2001).
- [52] Nicolas, L., Prina, E., Lang, T. and Milon, G.
Real-Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues.
J Clin Microbiol. 40 (5): 1666–1669 (2002).
- [53] Katakai, T., Hara, T., Lee, J.H., Gonda, H., Sugai, M. & Shimizu, A.
A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells.
Int Immunol 16:1133–1142 (2004).
- [54] Garside, P., Ingulli, E., Merica, R.R., Johnson, J.G., Noelle, R.J. & Jenkins, M.K.
Visualization of specific B and T lymphocyte interactions in the lymph node.
Science 281: 96–99 (1998).
- [55] Misslitz, A. C., Bonhagen, K., Harbecke, D., Lippuner, C., Kamradt, T. & Aebischer, T.
Two waves of antigen-containing dendritic cells *in vivo* in experimental *Leishmania major* infection.
Eur J Immunol 34: 715–725 (2004).

- [56] Morris, L., Troutt, A.B., Handman, E. & Kelso, A.
Changes in the precursor frequencies of IL-4 and IFN-gamma secreting CD4+ cells correlate with resolution of lesions in murine cutaneous leishmaniasis.
J. Immunol. 149: 2715-21 (1992).
- [57] Moll, H. & Rollinghoff, M.
Resistance to murine cutaneous leishmaniasis is mediated by TH1 cells, but disease-promoting CD4+ cells are different from TH2 cells
Eur J Immunol. 20: 2067-74 (1990).
- [58] Mohrs, K., Wakil, A.E., Killeen, N., Locksley, R.M. & Mohrs, M.
A two-step process for cytokine production revealed by IL-4 dual reporter mice.
Immunity 23: 419-29 (2005).
- [59] Lindquist, R.L., Shakhar, G., Dudziak, D., Wardemann, H., Eisenreich, T., Dustin, M.L. & Nussenzweig, M.C.
Visualizing dendritic cell networks in vivo.
Nat Immunol 5(12): 1243-50 (2004).
- [60] Westermann, J., Bode, U., Sahle, A., Speck, U., Karin, N., Bell, E.B., Kalies, K., Gebert, A. Naive, effector, and memory T lymphocytes efficiently scan dendritic cells in vivo: contact frequency in T cell zones of secondary lymphoid organs does not depend on LFA-1 expression and facilitates survival of effector T cells.
J Immunol 174(5): 2517-24 (2005).
- [61] Luan, J., Furuta, Y., Du, J. & Richmond, A.
Developmental expression of two CXC chemokines, MIP-2 and KC, and their receptors. *Cytokine* 14: 253–263 (2001).
- [62] Kettritz, R., Gaido, M.L., Haller, H., Luft, F.C., Jennette, C.J. & Falk, R.J.
Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis of human neutrophils.
Kidney Int 53(1): 84-91 (1998).

- [63] Charmony, M., Auderset, F., Allenbach, C. & Tacchini-Cottier, F.
The Prominent Role of Neutrophils during the Initial Phase of Infection by Leishmania Parasites.
J Biomed Biotechnol (2010).
- [64] Scapini, P., Lapinet-Vera, J.A., Gasperini, S., Calzetti, F., Bazzoni, F. & Cassatella, M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines.
Immunol Rev 177: 195-203 (2000).
- [65] Sunderkötter, C., Kunz, M., Steinbrink, K., Meinardus-Hager, G., Goebeler, M., Bildau, H. & Sorg, C.
Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages in vitro and in vivo.
J Immunol 151(9): 4891-901 (1993).
- [66] Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E. & Tacchini-Cottier F.
Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice.
PLoS Pathog. 6 (2): e1000755 (2010).
- [67] León, B., López-Bravo, M., Ardavín, C.
Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania.
Immunity 26(4): 519-31 (2007).
- [68] Müller, K., van Zandbergen, G., Hansen, B., Laufs, H., Jahnke, N., Solbach, W. & Laskay, T.
Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice.
Med Microbiol Immunol 190: 73-6 (2001).

- [69] Scott, P.
IL-12: initiation cytokine for cell-mediated immunity.
Science 260: 496-97 (1993).
- [70] Groux, H., Cottrez, F., Rouleau, M., Mauze, S., Antonenko, S., Hurst, S., McNeil, T., Bigler, M., Roncarolo, M. & Coffman, R.L.
A Transgenic Model to Analyze the Immunoregulatory Role of IL-10 Secreted by Antigen-Presenting Cells.
J Immunol 162: 1723–1729 (1999).
- [71] O'Garra, A. & Vieira, P.
T_H1 cells control themselves by producing Interleukin-10.
Nat Rev Immunol 7: 425-428 (2007).
- [72] Jankovic, D. & Trinchieri, G.
IL-10 or not IL-10: that is the question.
Nat Immunol 8: 1281-1283 (2007).
- [73] Launois, P. et al.
IL-4 rapidly produced by V β 4 V α 8 CD4⁺ T cells instructs T_H2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice.
Immunity 6: 541–549 (1997).
- [74] Scott, P., Eaton, A., Gause, W. C., di Zhou, X. & Hondowicz, B.
Early IL-4 production does not predict susceptibility to *Leishmania major*.
Exp Parasitol 84: 178–187 (1996).
- [75] Iezzi, G., Fröhlich, H., Ernst, B., Ampenberger, F., Saeland, S., Glaichenhaus, N. & Kopf, M.
Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after *Leishmania major* infection.
J Immunol 177: 1250-1256 (2006).

- [76] Moll, H., Fuchs, H., Blank, C. & Röllinghoff, M.
Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells.
Eur J Immunol 23: 1595-1601 (1993).
- [77] Schariton, T. M. & Scott, P.
Natural Killer Cells Are a Source of Interferon γ That Drives Differentiation of CD4 + T Cell Subsets and Induces Early Resistance to *Leishmania major* in Mice.
J Exp Med 178: 567-577 (1993).
- [78] Bajénoff, M., Breart, B., Huang, A.Y.C, Qi, H., Cazareth, J., Braud, V. M., Germain, R. N. & Glaichenhaus, N.
Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging.
J Exp Med 203(3): 619–631 (2006).
- [79] Maghazachi, A. A., Skalhegg, B. S., Rolstad, B. & Al-Aoukaty, A.
Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G-proteins.
FASEB J. 11: 765–774 (1997).
- [80] Lebre, M.C., Burwell, T., Vieira, P.L., Lora, J., Coyle, A.J., Kapsenberg, M.L., Clausen, B.E. & De Jong, E.
Differential expression of inflammatory chemokines by Th1- and Th2-cell promoting dendritic cells: A role for different mature dendritic cell populations in attracting appropriate effector cells to peripheral sites of inflammation.
Immunol Cell Biol 83: 525–535 (2005).
- [81] Yoneyama, H., Narumi, S., Zhang, Y., Murai, M., Baggiolini, M., Lanzavecchia, A., Ichida, T., Asakura, H. & Matsushima, K.
Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes.
J Exp Med 195: 1257–66 (2002).

- [82] Martin-Fontechal, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F.
Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for T_H1 priming.
Nat Immunol 5(12): 1260-5 (2004).
- [83] Janatpour, M.J., Hudak, S., Sathe, M., Sedgwick, J.D. & McEvoy, L.M.
Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment.
J Exp Med 194: 1375–1384 (2001).
- [84] Von Stebut, E., Ehrchen, J.M., Belkaid, Y., Kostka, S.L., Molle, K., Knop, J., Sunderkotter, C., Udey, M.C.
Interleukin 1 α promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice.
J Exp Med 198(2):191-9 (2003).
- [85] Filippi, C., Hugues, S., Cazareth, J., Julia, V., Glaichenhaus, N. & Ugolini, S.
CD4 T cell polarization in mice is modulated by strain-specific major histocompatibility complex-independent differences within dendritic cells.
J Exp Med 198: 201–209 (2003).
- [86] Gao, N., Dang, T. & Yuan, D.
IFN- γ -dependent and -independent initiation of switch recombination by NK-cells.
J Immunol 167: 2011-2018 (2001).
- [87] Biederman, T. et al
IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible Balb/c mice.
Nat Immunol 2: 1054-60 (2001).

- [88] Baldwin, T., Henri, S., Curtis, J., O'Keeffe, M., Vremec, D., Shortman, K. & Handman, E.
Dendritic cell populations in *Leishmania major*-infected skin and draining lymph nodes. *Infect Immun* 72(4): 1991-2001 (2004).
- [89] Steinman, R.M.
Some interfaces of dendritic cell biology.
APMIS 111: 675-97 (2003).
- [90] Woelbing, F., Lopez Kostka, S., Moelle, K., Belkaid, Y., Sunderkoetter, C., Verbeek, S., Waismann, A., Nigg, A.p., Knop, J., Udey, M. & von Stebut, E.
Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity.
J Exp Med 203: 177-88 (2006).
- [91] Leon, B., Lopez-Bravo, M., & Ardavin, C.
Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*.
Immunity 26: 519-31 (2007).
- [92] Lagrange, P.H., Mackaness, G.B. & Miller, T.E.
Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells.
J Exp Med 139: 528-42 (1974).
- [93] Parish, C.R.
Immune response to chemically modified flagellin. II. Evidence for a fundamental relationship between humoral and cell-mediated immunity.
J Exp Med 134: 21-47 (1971).

-
- [94] Hasbold, J., Lyons, A. B., Kehry, M. R. & Hodgkin, P. D.
Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4.
Eur J Immunol 28: 1040-51 (1998).
- [95] Rush, J.S., Hasbold, J. & Hodgkin, P.D.
Cross-Linking Surface Ig Delays CD40 Ligand- and IL-4-Induced B Cell IgClass Switching and Reveals Evidence for Independent Regulation of B Cell Proliferation and Differentiation.
J Immunol 168: 2676-2682 (2002).
- [96] Hasbold, J., J Sui-Yin Hong, J., Kehry, M. R. & Hodgkin, P. D.
Integrating Signals from IFN-g and IL-4 by B Cells: Positive and Negative Effects on CD40 Ligand-Induced Proliferation, Survival, and Division-Linked Isotype Switching to IgG1, IgE, and IgG2a1.
J Immunol 163: 4175–4181 (1999).
- [97] El-On, J.
Current Status and Perspectives of the Immunotherapie of Leishmaniasis.
IMAJ 11: 623-628 (2009).

7 Danksagung

Ich möchte Herrn Prof. Dr. Jürgen Westermann für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für seine persönliche Betreuung, seine Geduld und sein großes Interesse an meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Laskay danke ich für seine Bereitschaft, als zweiter Gutachter meine Arbeit zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Kathrin Kalies, die durch ihre intensive wissenschaftliche Betreuung, ihre konstruktiven Anregungen und das geduldige Korrekturlesen wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Bei allen Mitarbeitern des Arbeitsbereiches möchte ich mich herzlich für die mir gewährte Unterstützung und die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bedanken. Ein ganz lieber Dank geht dabei an Marie-Luise Leppin, Petra Lau, Lidija Gutjahr, Karola von Lingelsheim, Julia Barthelmann und Katja Bieber.

Ein spezieller Dank geht an meine Eltern, meinen Mann und meine Kinder, die mich von Beginn an bis zum Ende dieser Doktorarbeit unterstützt und motiviert haben. Ich liebe Euch von ganzem Herzen.

8 Anhang

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl. bovine serum albumine)
CCL C-C	Chemokin-Ligand
CD	Oberflächenmarker (engl. cluster of differentiation)
cDNA	komplementäre (engl. complementary) Desoxyribonukleinsäure
ct	engl. cycle of threshold
CXCL C-X-C	Chemokin-Ligand
CXCR C-X-C	Chemokin-Rezeptor
DAB	Diaminobenzidin
DC	Dendritische Zelle (engl. dendritic cell)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleic acid)
DTH	allergische Reaktion vom verzögerten Typ (engl. delayed type hypersensitivity)
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
for	vorwärts gerichtet (engl. forward)
g	Gramm
IFN	Interferon
IL	Interleukin
L. major	Leishmania major
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histokompatibility complex)
ml	Milliliter
mm	Millimeter

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
M	Molar
Min	Minute
MIP	engl. Macrophage inflammatory protein
MLN	engl. metastatic lymph node
mRNA	Boten (engl. messenger) Ribonukleinsäure
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
N	Anzahl (engl. number)
rev	rückwärts gerichtet (engl. revers)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. rounds per minute)
RT	Reverse Transkription
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p.a.	per analysem
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate buffered saline)
TGF	engl. Transforming growth factor
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
U/Min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. World Health Organisation)

Ergebnis des Screenings des T-Zellbereiches des drainierenden Lymphknotens mit Low Density Arrays

	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	Mittelwert	Stabw								
CCL-2										
Balb/c	5,5286	1,61	11,8275	9,97	5,9090	4,59	15,2267	11,82	6,3794	2,61
C57BL/6	2,5318	1,38	3,9624	2,57	12,3216	4,08	8,0307	5,36	8,5786	3,73
CCL-3										
Balb/c	0,0542	0,02	0,0502	0,06	0,0333	0,02	0,1403	0,10	0,1228	0,03
C57BL/6	0,0587	0,06	0,0438	0,03	0,1706	0,14	0,1564	0,10	0,1199	0,05
CCL-5										
Balb/c	476,01	260,19	339,42	153,16	172,15	76,14	390,74	388,44	245,37	103,46
C57BL/6	596,57	287,94	238,09	142,37	230,06	103,10	310,43	64,84	273,92	103,21
CCL-7										
Balb/c	0,5069	0,24	1,0913	1,33	0,4385	0,27	2,7735	2,56	0,3999	0,16
C57BL/6	0,2133	0,12	0,6030	0,49	1,9484	1,20	1,0613	0,78	1,2123	0,69
CCL-17										
Balb/c	4,8549	3,03	14,0115	9,42	4,6900	3,22	17,3458	12,63	10,0406	4,06
C57BL/6	8,6683	3,64	15,6210	8,40	20,0623	12,26	23,2874	11,09	15,1130	13,32
CXCL-2										
Balb/c	0,0701	0,05	0,0803	0,05	0,0313	0,04	0,1313	0,16	0,0757	0,06
C57BL/6	0,1188	0,10	0,0248	0,02	0,0672	0,07	0,0770	0,09	0,0365	0,02
CXCL-9										
Balb/c	21,46	12,93	105,04	126,99	51,43	32,91	355,63	216,25	127,54	84,42
C57BL/6	51,71	23,59	80,41	44,65	565,15	299,61	478,19	312,77	174,62	111,08
CXCL-10										
Balb/c	2,9043	0,74	65,4225	75,51	26,5098	16,01	88,0120	82,77	20,3724	16,61
C57BL/6	4,2558	2,07	31,6477	18,84	120,4590	68,13	49,6696	35,55	54,5489	54,18

XCL-1

Balb/c	2,6934	2,01	4,9268	4,96	2,3495	0,73	4,1323	2,69	2,1607	0,71
C57BL/6	5,5914	2,18	6,3938	4,80	13,3196	5,87	7,4634	3,92	5,9810	2,89

CCR-2

Balb/c	18,9017	6,71	11,2643	6,75	9,5347	3,13	29,5939	13,81	22,4048	2,66
C57BL/6	12,4591	5,99	9,0344	7,36	18,9959	6,52	31,0187	14,60	18,9522	7,20

CCR-7

Balb/c	57,0065	28,24	41,6171	29,50	35,5861	18,21	62,3431	34,38	44,5382	11,22
C57BL/6	96,4811	37,66	35,3862	23,22	49,2490	27,62	56,9144	29,19	56,1264	40,10

IL-1 α

Balb/c	0,7217	0,25	1,3610	1,18	0,6158	0,25	1,5080	0,36	1,0434	0,19
C57BL/6	0,7379	0,37	0,9571	0,59	0,6982	0,24	0,9859	0,60	0,7787	0,39

IL-1 β

Balb/c	0,7590	0,33	0,6225	0,58	0,5597	0,27	2,8102	1,94	1,3696	0,32
C57BL/6	0,2221	0,17	0,2957	0,25	0,5732	0,25	0,7635	0,45	0,7329	0,46

IL-2

Balb/c	0,6087	0,43	1,3343	1,33	1,2800	1,02	1,5360	0,68	3,2456	1,43
C57BL/6	0,6594	0,41	1,4129	0,86	2,4913	0,49	1,4824	1,56	3,3949	2,74

IL-3

Balb/c	0,0053	0,01	0,0102	0,02	0,0205	0,02	0,2582	0,18	0,0555	0,03
C57BL/6	0,0018	0,00	0,0228	0,03	0,1108	0,14	0,1371	0,16	0,0200	0,02

IL-4

Balb/c	0,0509	0,07	0,0478	0,08	0,0251	0,02	0,0977	0,13	2,3881	1,99
C57BL/6	0,0434	0,04	0,0399	0,04	0,0971	0,07	0,1204	0,11	3,6698	3,62

IL-5

Balb/c	0,0138	0,01	0,1433	0,23	0,0295	0,03	0,2981	0,35	0,0410	0,02
C57BL/6	0,0120	0,02	0,0429	0,04	0,0437	0,04	0,0438	0,02	0,0112	0,01

IL-6

Balb/c	0,2762	0,20	0,2951	0,25	0,1188	0,10	0,8261	0,69	0,2478	0,08
C57BL/6	0,1171	0,16	0,2967	0,30	0,7400	0,30	0,4991	0,46	0,2843	0,11

IL-7

Balb/c	3,8856	1,87	1,5123	1,29	0,5235	0,41	0,9606	1,18	0,6620	0,35
C57BL/6	3,6425	2,56	0,9654	0,75	0,5201	0,58	0,2103	0,19	0,8105	0,86

IL-9

Balb/c	0,0481	0,10	0,1968	0,26	0,1009	0,14	0,1222	0,30	0,0613	0,12
C57BL/6	0,0467	0,07	0,1226	0,11	0,0195	0,03	0,0155	0,03	0,0236	0,04

IL-10

Balb/c	0,1408	0,15	0,1764	0,17	0,1426	0,20	0,5683	0,50	0,4420	0,14
C57BL/6	0,0668	0,08	0,0948	0,07	1,0653	1,15	0,3502	0,31	0,3389	0,10

IL-11

Balb/c	0,0022	0,00	0,0012	0,00	0,0008	0,00	0,0018	0,00	0,0004	0,00
C57BL/6	0,0042	0,01	0,0022	0,00	0,0018	0,00	0,0022	0,00	0,0006	0,00

IL-12p35

Balb/c	3,5770	1,44	1,9939	1,08	0,9604	0,60	4,5218	4,10	1,6701	0,32
C57BL/6	1,7420	0,75	2,5369	2,79	1,6498	1,33	1,6540	0,77	1,4618	0,41

IL-12p40

Balb/c	0,0022	0,00	0,0012	0,00	0,0045	0,01	0,0018	0,00	0,0014	0,00
C57BL/6	0,0017	0,00	0,0018	0,00	0,0018	0,00	0,0027	0,00	0,0007	0,00

IL-13

Balb/c	0,4433	0,24	0,7066	0,59	0,2076	0,12	2,5152	2,22	0,3665	0,13
C57BL/6	0,1118	0,09	0,4728	0,23	0,7308	0,42	0,4422	0,47	0,1651	0,16

IL-15

Balb/c	7,3264	2,96	7,7668	4,06	4,3352	1,98	9,0290	7,94	4,9966	1,71
C57BL/6	15,7714	5,91	10,2411	5,24	11,1314	3,59	9,1584	4,28	9,6728	4,15

IL-16

Balb/c	112,32	36,06	84,73	47,34	84,01	29,03	112,71	25,22	142,19	21,86
C57BL/6	143,99	44,09	81,12	34,24	90,50	33,47	104,70	42,01	120,64	44,35

IL-17

Balb/c	0,0148	0,02	0,0012	0,00	0,0008	0,00	0,0018	0,00	0,0102	0,01
C57BL/6	0,0075	0,01	0,0212	0,03	0,0095	0,01	0,0347	0,05	0,0006	0,00

IL-17b

Balb/c	0,0022	0,00	0,0012	0,00	0,0009	0,00	0,0018	0,00	0,0004	0,00
C57BL/6	0,0042	0,01	0,0018	0,00	0,0018	0,00	0,0022	0,00	0,0006	0,00

IL-17e

Balb/c	0,0022	0,00	0,0012	0,00	0,0007	0,00	0,0018	0,00	0,0011	0,00
C57BL/6	0,0017	0,00	0,0026	0,00	0,0018	0,00	0,0022	0,00	0,0006	0,00

IL-18

Balb/c	1,7650	0,91	1,3253	1,14	0,6920	0,38	2,0597	2,23	3,4334	1,27
C57BL/6	2,7302	0,98	1,4942	0,90	1,2310	0,53	1,8873	0,63	3,6998	2,06

IL-20

Balb/c	0,0022	0,00	0,0012	0,00	0,0008	0,00	0,0018	0,00	0,0004	0,00
C57BL/6	0,0042	0,01	0,0018	0,00	0,0018	0,00	0,0022	0,00	0,0006	0,00

IL-21

Balb/c	0,6314	0,73	0,5078	0,28	0,1992	0,06	0,2441	0,13	0,9392	0,44
C57BL/6	0,3912	0,38	0,3875	0,36	0,3925	0,38	0,8992	0,72	1,7992	1,03

IL-23 α

Balb/c	0,0128	0,02	0,0012	0,00	0,0067	0,01	0,0081	0,02	0,0145	0,01
C57BL/6	0,0171	0,02	0,0018	0,00	0,0021	0,00	0,0120	0,01	0,0036	0,00

IL-27

Balb/c	0,5037	0,36	0,7037	0,38	0,6216	0,41	0,8570	0,54	0,5588	0,16
C57BL/6	0,6423	0,62	0,7522	0,29	2,4939	2,49	0,8410	0,53	0,7812	0,57

TGF α

Balb/c	1,6171	1,58	0,1770	0,09	0,1968	0,12	0,9083	1,11	0,1677	0,07
C57BL/6	0,3120	0,22	0,1516	0,19	0,2450	0,10	0,3379	0,31	0,1623	0,11

TGF β 1

Balb/c	9,9505	5,54	6,8363	4,79	4,6642	2,22	11,9085	6,80	13,4732	5,44
C57BL/6	17,3101	8,17	6,0738	4,56	9,8190	3,37	11,2561	5,06	18,8909	13,33

TGF β 2

Balb/c	0,1632	0,09	0,1130	0,09	0,0626	0,04	0,2071	0,34	0,1109	0,05
C57BL/6	0,2109	0,14	0,0820	0,03	0,0477	0,04	0,0646	0,07	0,0801	0,05

TGF β 3

Balb/c	2,9732	0,91	2,2540	1,37	1,2617	1,25	1,8533	1,01	3,7978	0,74
C57BL/6	3,2648	2,14	1,3139	0,66	1,2698	0,72	2,4425	2,01	3,7900	1,80

LTA

Balb/c	0,0049	0,00	0,0065	0,01	0,0029	0,00	0,0034	0,00	0,0022	0,00
C57BL/6	0,0073	0,01	0,0035	0,00	0,0035	0,00	0,0040	0,00	0,0027	0,00

TNF

Balb/c	7,8348	2,81	8,2953	4,67	5,5866	2,91	9,3893	5,14	7,6046	1,53
C57BL/6	9,3813	3,73	10,5614	6,77	9,3690	2,15	8,2258	4,75	8,0616	2,94

**TNFRSF
6**

Balb/c	2,9256	1,88	3,5081	3,26	2,8415	1,64	4,5410	3,32	2,3842	0,61
C57BL/6	3,1325	1,29	2,4486	1,73	2,6199	1,34	2,1347	1,45	2,4414	1,25

IFN β 1

Balb/c	0,1725	0,26	0,0445	0,06	0,0533	0,04	0,0883	0,15	0,0029	0,01
C57BL/6	0,0074	0,01	0,0010	0,00	0,0078	0,01	0,3185	0,47	0,0931	0,10

IFN γ

Balb/c	0,2013	0,15	2,3017	3,50	1,5161	1,81	1,5591	1,83	0,6184	0,59
C57BL/6	0,2370	0,21	1,5617	1,06	8,2576	8,60	1,0261	0,68	0,4538	0,21

PRF-1

Balb/c	8,9951	5,80	8,6629	6,48	8,8183	2,41	14,7158	5,82	10,7426	0,90
C57BL/6	12,3959	5,19	5,6742	3,69	10,3817	4,41	8,8425	4,90	9,3019	4,63

Ergebnis des Screenings der Haut am Infektionsort mit Low Density**Arrays**

	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw	Mittelwert	Stabw
CCL-2										
Balb/c	1,5905	0,83	1,4825	1,99	7,8362	10,68	2,2079	1,49	8,3335	14,60
C57BL/6	1,0591	0,35	4,8832	4,69	10,1451	12,43	1,3784	1,10	6,1535	7,81
CCL-3										
Balb/c	0,0206	0,02	0,0130	0,01	0,0615	0,11	0,0280	0,02	0,0281	0,03
C57BL/6	0,0099	0,01	0,4537	0,59	0,5252	0,72	0,0237	0,01	0,0412	0,03
CCL-5										
Balb/c	0,5314	0,60	0,7068	1,20	0,7327	0,41	0,4538	0,29	0,6689	0,80
C57BL/6	0,1731	0,15	0,3818	0,26	0,4502	0,26	0,4216	0,52	0,5193	0,37
CCL-7										
Balb/c	0,1452	0,12	0,0962	0,09	0,4835	0,62	0,2821	0,20	0,5998	0,88
C57BL/6	0,2236	0,22	0,1968	0,22	0,7910	0,73	0,1912	0,16	0,7044	0,88
CCL-17										
Balb/c	0,1198	0,10	0,6265	0,61	0,2643	0,36	0,1961	0,08	0,1976	0,19
C57BL/6	0,1337	0,24	0,8333	0,88	0,3153	0,36	0,2286	0,16	0,7016	1,05
CXCL-2										
Balb/c	0,1047	0,06	0,0690	0,05	0,1972	0,14	0,1076	0,08	0,1979	0,27
C57BL/6	0,0328	0,02	7,5581	12,76	3,7397	4,30	0,0877	0,07	0,2552	0,39
CXCL-9										
Balb/c	0,0733	0,40	0,8006	1,50	0,1771	0,15	0,6499	0,66	0,0550	0,06
C57BL/6	0,0519	0,06	0,1416	0,08	0,2175	0,24	0,2382	0,40	0,2301	0,27

CXCL-10

Balb/c	0,2317	0,18	0,3182	0,16	4,1856	4,92	1,2754	0,86	0,3935	0,21
C57BL/6	0,3474	0,18	0,9466	0,71	4,5920	6,06	0,5143	0,44	3,6975	2,85

XCL-1

Balb/c	0,0011	0,00	0,0067	0,01	0,0010	0,00	0,0028	0,00	0,0011	0,00
C57BL/6	0,0239	0,02	0,0216	0,02	0,0207	0,02	0,0672	0,08	0,0691	0,10

CCR-2

Balb/c	2,3107	1,02	1,3662	0,62	3,1701	3,04	5,8262	4,39	9,6764	15,48
C57BL/6	2,3014	1,61	2,9750	2,03	5,1655	3,50	3,0023	1,34	6,6666	5,20

CCR-7

Balb/c	0,0864	0,10	0,2517	0,27	0,1450	0,24	0,0922	0,05	0,0814	0,08
C57BL/6	0,0884	0,13	0,1451	0,09	0,2448	0,28	0,0832	0,13	0,1181	0,12

IL-1 α

Balb/c	5,3254	3,95	4,4550	4,52	3,2236	1,59	5,9778	1,51	5,0698	2,05
C57BL/6	4,9562	2,31	4,5575	1,93	6,7571	4,27	7,1925	3,08	7,3084	4,10

IL-1 β

Balb/c	0,0741	0,05	0,2821	0,39	0,7944	1,35	0,1503	0,09	0,1626	0,24
C57BL/6	0,0146	0,01	2,9457	5,16	1,0272	0,82	0,0242	0,02	0,1355	0,15

IL-2

Balb/c	0,0175	0,03	0,0030	0,00	0,0011	0,00	0,0102	0,01	0,0015	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0020	0,00	0,0030	0,00	0,0098	0,02	0,0152	0,02

IL-3

Balb/c	0,0018	0,00	0,0030	0,00	0,0010	0,00	0,0028	0,00	0,0009	0,00
C57BL/6	0,0005	0,00	0,0020	0,00	0,0017	0,00	0,0023	0,00	0,0021	0,00

IL-4

Balb/c	0,0016	0,00	0,0030	0,00	0,0010	0,00	0,0028	0,00	0,0009	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0020	0,00	0,0046	0,01	0,0023	0,00	0,0021	0,00

IL-5

Balb/c	0,0086	0,01	0,0124	0,02	0,0243	0,01	0,0461	0,05	0,0291	0,04
C57BL/6	0,0089	0,01	0,0146	0,02	0,0365	0,05	0,0330	0,04	0,0181	0,03

IL-6

Balb/c	0,0861	0,09	0,0761	0,11	0,4312	0,54	0,0485	0,05	0,0864	0,06
C57BL/6	0,0560	0,04	0,1293	0,18	0,3546	0,28	0,1047	0,08	0,1221	0,21

IL-7

Balb/c	0,7233	0,63	0,2169	0,18	0,4090	0,35	1,2432	0,41	0,6283	0,21
C57BL/6	0,4358	0,53	0,3257	0,37	0,1793	0,15	0,5825	0,34	0,5144	0,20

IL-9

Balb/c	0,0016	0,00	0,0030	0,00	0,0010	0,00	0,0028	0,00	0,0009	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0020	0,00	0,0017	0,00	0,0023	0,00	0,0021	0,00

IL-10

Balb/c	0,0305	0,04	0,0033	0,00	0,0194	0,03	0,0133	0,03	0,0368	0,01
C57BL/6	0,0137	0,01	0,0340	0,05	0,0798	0,09	0,0396	0,03	0,0633	0,06

IL-11

Balb/c	0,0064	0,01	0,0038	0,01	0,0097	0,01	0,0100	0,01	0,0076	0,01
C57BL/6	0,0049	0,00	0,0058	0,00	0,0043	0,00	0,0050	0,00	0,0116	0,01

IL-12p35

Balb/c	0,1102	0,13	0,1239	0,22	0,0585	0,04	0,0359	0,05	0,0651	0,06
C57BL/6	0,0154	0,02	0,1238	0,15	0,1039	0,16	0,0126	0,03	0,0610	0,06

IL-12p40

Balb/c	0,0016	0,00	0,0030	0,00	0,0010	0,00	0,0028	0,00	0,0009	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0020	0,00	0,0017	0,00	0,0023	0,00	0,0021	0,00

IL-13

Balb/c	0,0403	0,04	0,0529	0,06	0,0862	0,07	0,0613	0,06	0,0266	0,02
C57BL/6	0,0726	0,12	0,0199	0,03	0,0491	0,03	0,1335	0,05	0,0507	0,08

IL-15

Balb/c	0,8921	0,45	0,1844	0,07	0,8310	0,48	1,2986	0,56	1,5408	1,10
C57BL/6	1,9090	0,21	1,4617	0,72	2,4301	1,60	1,8857	0,65	1,6689	0,66

IL-16

Balb/c	6,7207	2,31	6,0612	4,18	5,8081	2,59	11,0550	6,64	7,1937	2,82
C57BL/6	7,4687	1,61	9,9573	3,74	10,4360	7,23	5,9455	1,64	9,5982	4,78

IL-17

Balb/c	0,0016	0,00	0,0030	0,00	0,0055	0,01	0,0028	0,00	0,0009	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0014	0,00	0,0017	0,00	0,0029	0,00	0,0020	0,00

IL-17b

Balb/c	0,2243	0,16	0,1914	0,10	0,3523	0,23	0,3997	0,26	0,2761	0,11
C57BL/6	0,2928	0,12	0,1291	0,08	0,3363	0,14	0,1637	0,12	0,4381	0,77

IL-17e

Balb/c	0,0848	0,11	0,0349	0,04	0,0463	0,05	0,2317	0,19	0,0616	0,08
C57BL/6	0,0398	0,02	0,0075	0,01	0,0214	0,02	0,0244	0,02	0,0236	0,04

IL-18

Balb/c	17,30	14,33	17,50	24,48	13,07	12,50	23,14	6,51	31,55	18,77
C57BL/6	18,17	9,90	13,62	9,08	24,00	13,08	29,68	21,65	37,84	36,53

IL-20

Balb/c	0,1070	0,10	0,2916	0,31	0,6937	0,62	0,9640	0,55	0,6241	0,62
C57BL/6	0,4287	0,62	0,1954	0,17	0,3047	0,48	0,5983	1,03	0,0470	0,05

IL-21

Balb/c	0,0016	0,00	0,0035	0,00	0,0010	0,00	0,0028	0,00	0,0009	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0020	0,00	0,0017	0,00	0,0023	0,00	0,0021	0,00

IL-23 α

Balb/c	0,0489	0,05	0,0178	0,02	0,0160	0,01	0,0799	0,11	0,0346	0,02
C57BL/6	0,0314	0,03	0,0605	0,10	0,0178	0,02	0,0184	0,03	0,0030	0,00

IL-27

Balb/c	0,0034	0,00	0,0418	0,08	0,0275	0,03	0,0466	0,06	0,0366	0,06
C57BL/6	0,0040	0,01	0,0165	0,02	0,0708	0,06	0,0250	0,02	0,0416	0,03

TGF α

Balb/c	10,8544	5,37	9,9332	6,86	10,0159	5,28	11,4089	0,94	11,4926	4,97
C57BL/6	7,1526	2,05	9,1874	3,46	12,3478	7,34	10,3098	4,64	10,7375	6,30

TGF β 1

Balb/c	3,6856	2,88	1,5592	1,52	2,6659	2,90	4,4374	1,83	4,9062	2,26
C57BL/6	2,3687	1,34	2,6108	2,60	3,5125	1,76	3,3079	0,57	5,1865	3,61

TGF β 2

Balb/c	5,6790	2,51	4,4994	4,29	5,2891	4,12	7,0388	4,22	6,6413	2,80
C57BL/6	8,0068	2,42	4,4131	3,02	8,0819	4,72	5,9172	2,83	8,2773	4,75

TGF β 3

Balb/c	22,4315	14,83	7,8748	6,36	22,1165	20,96	24,4809	16,52	22,3084	12,55
C57BL/6	25,5992	13,09	20,9313	12,46	27,4144	23,53	13,6942	4,45	35,1808	51,31

LTA

Balb/c	0,0016	0,00	0,0030	0,00	0,0010	0,00	0,0028	0,00	0,0009	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0020	0,00	0,0017	0,00	0,0023	0,00	0,0021	0,00

TNF

Balb/c	1,7391	1,48	1,2879	0,89	1,7147	0,83	1,7287	1,24	1,3204	0,77
C57BL/6	0,5243	0,44	1,6485	1,58	1,8123	1,70	1,0539	0,59	1,3988	1,25

TNFRSF 6

Balb/c	0,5903	0,39	0,5509	0,55	0,6302	0,50	1,0100	0,24	1,0346	1,21
C57BL/6	0,5501	0,34	0,9633	0,84	0,8691	0,35	0,5748	0,15	0,7545	0,35

IFN β 1

Balb/c	0,0034	0,00	0,0968	0,19	0,0684	0,08	0,0173	0,02	0,0197	0,02
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0019	0,00	0,0700	0,10	0,0284	0,04	0,0500	0,05

IFN γ

Balb/c	0,0045	0,01	0,0056	0,01	0,0049	0,01	0,0067	0,01	0,0024	0,00
C57BL/6	0,0006	0,00	0,0030	0,00	0,0017	0,00	0,0104	0,02	0,0021	0,00

PRF-1

Balb/c	0,0273	0,03	0,0058	0,01	0,0218	0,02	0,0457	0,07	0,0138	0,02
C57BL/6	0,0336	0,05	0,0399	0,02	0,0149	0,02	0,1249	0,12	0,0572	0,04

Ergebnisse der kompartimentspezifischen mRNA-Analyse des drainierenden Lymphknotens mit quantifizierender Real Time RT-PCR

CXCL-9	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	3,909	2,51	1,607	0,31	21,59	12,09	27,73	7,80	22,93	19,29
C57BL/6	6,107	2,68	4,451	3,54	23,61	27,49	12,09	8,16	5,49	3,27
C3H	1,718	0,49	2,046	1,75	47,12	54,26	61,91	31,86	25,43	12,96
B-Zellbereich										
Balb/c	3,903	1,53	4,456	2,46	16,54	11,92	15,38	4,40	21,61	14,10
C57BL/6	3,509	1,21	3,485	3,69	6,05	6,87	3,11	3,86	2,58	1,81
C3H	1,138	0,34	4,685	4,38	74,47	18,39	57,24	30,96	19,30	8,06
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	4,267	1,42	1,513	0,63	15,56	11,19	39,93	11,53	27,46	26,97
C57BL/6	17,553	15,61	3,702	3,22	26,06	20,70	17,81	15,69	5,60	2,06
C3H	1,378	0,55	1,458	0,47	45,06	42,78	62,52	29,10	28,44	10,81
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	7,556	1,99	3,449	1,28	8,92	8,56	36,64	14,16	38,49	47,54
C57BL/6	13,571	4,07	2,770	0,73	25,14	31,18	19,80	19,76	16,22	7,52
C3H	2,738	1,89	2,224	0,36	85,44	138,19	59,81	54,35	23,25	11,39

CXCL-10	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,4335	0,19	0,3261	0,17	12,3097	8,57	8,0079	2,83	7,1528	3,98
C57BL/6	0,5169	0,32	4,7083	5,39	9,0306	9,77	2,8082	2,28	0,8759	0,76
C3H	0,2612	0,12	3,6470	7,79	35,8438	41,25	21,0694	13,84	6,0679	2,41
B-Zellbereich										
Balb/c	0,7451	0,19	3,1500	1,44	8,9540	6,06	4,6620	1,59	10,4338	7,88
C57BL/6	0,3241	0,25	4,0292	3,14	2,5736	2,90	1,1194	1,22	0,7359	0,69
C3H	0,3851	0,27	7,2560	3,38	55,6724	11,09	26,4794	20,13	7,4323	4,15
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,5096	0,20	0,4153	0,17	8,1079	5,85	9,9787	4,11	7,9427	5,09
C57BL/6	0,6865	0,36	2,8937	3,40	8,5059	7,48	3,8030	3,74	1,0410	0,91
C3H	0,2623	0,07	0,7189	0,68	36,1796	39,80	24,5489	17,95	5,6500	2,06
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,3261	0,11	0,5291	0,19	4,8420	4,09	11,4598	5,23	15,0885	19,62
C57BL/6	0,2444	0,07	0,7521	0,35	8,7977	8,93	4,5630	4,86	3,1046	1,52
C3H	0,3727	0,23	1,9887	2,11	52,0466	80,31	24,1309	30,73	4,3231	2,96
XCL-1										
XCL-1	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,3559	0,16	0,3579	0,14	0,8265	0,31	0,54745	0,26	0,4262	0,20
C57BL/6	0,5773	0,18	1,5941	0,99	2,7439	3,50	0,6964	0,47	0,5621	0,08
C3H	0,6456	0,10	1,34535	0,86	1,90021	0,98	1,63006	0,73	1,06854	0,81
B-Zellbereich										
Balb/c	0,6526	0,18	0,65732	0,47	0,7995	0,31	0,45129	0,22	0,3196	0,21
C57BL/6	0,6108	0,19	0,62398	0,74	0,55501	0,58	0,33093	0,32	0,31571	0,20
C3H	3,50481	3,31	1,29138	0,86	4,14641	2,57	1,90528		2,15988	1,77
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,3972	0,06	0,39103	0,07	0,8496	0,33	0,6394	0,14	0,4727	0,16
C57BL/6	1,0844	0,60	1,59712	0,96	2,15452	1,56	0,73702	0,56	0,68074	0,11
C3H	0,7174	0,24	1,158	0,42	2,41815	1,70	2,52487	1,11	1,70605	1,85
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,8043	0,26	0,43319	0,15	0,56907	0,23	0,65649	0,24	0,44423	0,44
C57BL/6	1,65748	0,23	0,7239	0,38	1,86236	1,18	1,01216	0,89	1,03005	0,72
C3H	2,48042	2,52	0,66325	0,38	2,84691	2,95	0,73204		1,5911	0,57

IFN γ	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,0562	0,02	0,0632	0,01	0,5135	0,26	0,4613	0,36	0,4129	0,29
C57BL/6	0,0467	0,01	0,4578	0,62	0,7668	0,98	0,1410	0,11	0,0940	0,04
C3H	0,0528	0,02	0,0960	0,08	3,3834	3,98	3,2980	4,76	0,3441	0,17
B-Zellbereich										
Balb/c	0,0392	0,01	0,2182	0,14	0,7598	0,96	0,2095	0,13	0,5705	0,31
C57BL/6	0,0549	0,04	0,0920	0,05	0,0952	0,10	0,0489	0,05	0,0462	0,02
C3H	0,0555	0,01	0,1558	0,10	5,0214	2,73	1,3107	1,14	0,6825	0,40
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,0542	0,02	0,0715	0,04	0,3850	0,27	0,4969	0,17	0,4723	0,27
C57BL/6	0,0897	0,05	0,3263	0,33	0,9639	1,05	0,2548	0,30	0,0758	0,04
C3H	0,0513	0,02	0,0857	0,04	6,3381	7,82	2,8332	2,86	0,4174	0,21
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,0946	0,02	0,0978	0,05	0,2032	0,12	0,4331	0,43	0,6869	1,04
C57BL/6	0,1030	0,02	0,1083	0,06	0,7134	0,74	0,3123	0,43	0,2286	0,20
C3H	0,0663	0,05	0,0714	0,02	7,9247	13,73	1,3642	1,37	0,3573	0,34

IL-2	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,0473	0,01	0,0785	0,05	0,1124	0,09	0,09189	0,07	0,1487	0,05
C57BL/6	0,0510	0,02	0,25571	0,28	0,27641	0,33	0,10364	0,04	0,19699	0,05
C3H	0,0313	0,01	0,05649	0,03	0,13017	0,05	0,12492	0,08	0,06769	0,04
B-Zellbereich										
Balb/c	0,0246	0,01	0,0393	0,05	0,0306	0,02	0,03852	0,05	0,0831	0,10
C57BL/6	0,00963	0,00	0,01522	0,03	0,01207	0,01	0,04148	0,06	0,05535	0,02
C3H	0,0288	0,02	0,0178	0,01	0,03988	0,02	0,0318		0,0407	0,02
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,0439	0,01	0,07747	0,03	0,1024	0,05	0,0935	0,04	0,1566	0,06
C57BL/6	0,0515	0,02	0,24176	0,22	0,15656	0,07	0,09685	0,03	0,19432	0,04
C3H	0,0317	0,01	0,05828	0,02	0,10723	0,05	0,12556	0,07	0,06461	0,06
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,0587	0,01	0,07829	0,04	0,08214	0,04	0,08747	0,04	0,1376	0,07
C57BL/6	0,09973	0,12	0,0566	0,04	0,12201	0,04	0,14962	0,09	0,27097	0,21
C3H	0,07171	0,03	0,03259	0,02	0,07195	0,03	0,04559		0,10664	0,01

IL-12p40	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,0397	0,03	0,0545	0,04	0,0541	0,03	0,0399	0,02	0,0556	0,03
C57BL/6	0,0373	0,01	0,2337	0,24	0,0600	0,05	0,0389	0,03	0,0535	0,01
C3H	0,0511	0,01	0,0935	0,05	0,1690	0,18	0,0786	0,05	0,0816	0,13
B-Zellbereich										
Balb/c	0,0100	0,01	0,0360	0,05	0,0399	0,03	0,0203	0,02	0,0389	0,04
C57BL/6	0,0091	0,00	0,0082	0,01	0,0095	0,01	0,0086	0,01	0,0188	0,02
C3H	0,0868	0,09	0,0208	0,01	0,1304	0,07	0,0318		0,0442	0,02
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,0299	0,00	0,0651	0,05	0,0557	0,04	0,0463	0,03	0,0509	0,03
C57BL/6	0,0773	0,02	0,1855	0,15	0,0480	0,04	0,0359	0,03	0,0529	0,02
C3H	0,0568	0,01	0,1014	0,04	0,1214	0,05	0,0964	0,07	0,0702	0,09
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,0416	0,02	0,0335	0,03	0,0355	0,04	0,0528	0,02	0,0601	0,04
C57BL/6	0,0542	0,03	0,0425	0,02	0,0705	0,05	0,0502	0,04	0,0798	0,06
C3H	0,0679	0,05	0,0578	0,03	0,1012	0,13	0,0188		0,0553	0,02

IL-27p28	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,0218	0,01	0,0772	0,06	0,1317	0,10	0,0868	0,03	0,1212	0,12
C57BL/6	0,0207	0,01	0,1292	0,10	0,0972	0,08	0,0199	0,01	0,0265	0,01
C3H	0,0463	0,01	0,0761	0,05	1,0364	1,92	0,6906	0,44	0,2411	0,20
B-Zellbereich										
Balb/c	0,0346	0,02	0,0098	0,01	0,0514	0,04	0,0380	0,03	0,0692	0,08
C57BL/6	0,0220	0,03	0,0276	0,04	0,0252	0,02	0,0178	0,02	0,0146	0,01
C3H	0,0946	0,09	0,0565	0,06	0,3642	0,41	0,2774		0,1562	0,09
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,0259	0,01	0,0526	0,03	0,1086	0,07	0,1819	0,12	0,1335	0,07
C57BL/6	0,0474	0,02	0,1514	0,08	0,0827	0,06	0,0269	0,02	0,0399	0,02
C3H	0,0408	0,02	0,0477	0,01	0,3231	0,52	0,5454	0,26	0,2155	0,14
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,0775	0,02	0,0821	0,05	0,0989	0,06	0,1577	0,10	0,0964	0,08
C57BL/6	0,0428	0,03	0,0528	0,02	0,0880	0,05	0,0595	0,05	0,0523	0,03
C3H	0,1094	0,08	0,0885	0,10	0,5267	0,91	0,3276		0,2098	0,13

IL-1 β	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,2741	0,22	0,0624	0,03	0,2852	0,18	0,5302	0,28	0,7053	0,26
C57BL/6	0,1535	0,11	0,0903	0,06	0,3192	0,47	0,1084	0,09	0,0878	0,03
C3H	0,0572	0,01	0,1266	0,09	0,1034	0,03	0,2541	0,27	0,4073	0,46
B-Zellbereich										
Balb/c	0,5588	0,23	0,2659	0,20	0,6426	0,35	0,8496	0,33	0,9184	0,57
C57BL/6	0,2716	0,19	0,3082	0,22	0,3036	0,57	0,0954	0,11	0,0883	0,06
C3H	0,4267	0,34	0,1712	0,08	0,5721	0,29	0,1237		0,4095	0,12
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,2504	0,03	0,0899	0,03	0,4006	0,30	0,5801	0,16	0,7152	0,32
C57BL/6	0,1469	0,11	0,1011	0,03	0,3172	0,48	0,1001	0,07	0,1319	0,04
C3H	0,1109	0,07	0,1447	0,10	0,1731	0,10	0,3153	0,21	0,3382	0,23
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,2993	0,19	0,0318	0,02	0,2216	0,29	0,3421	0,19	0,6402	0,27
C57BL/6	0,0471	0,02	0,0181	0,01	0,1301	0,08	0,1743	0,14	0,0964	0,05
C3H	0,0978	0,09	0,0690	0,03	0,0943	0,08	0,0220		0,3505	0,10

IL-4	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,0213	0,02	0,0140	0,01	0,0082	0,00	0,0110	0,01	0,1228	0,24
C57BL/6	0,0106	0,01	0,0077	0,01	0,0101	0,00	0,0075	0,00	0,1467	0,10
C3H	0,0038	0,00	0,0220	0,04	0,0168	0,03	0,0056	0,00	0,0068	0,01
B-Zellbereich										
Balb/c	0,0438	0,02	0,0335	0,02	0,0217	0,01	0,0121	0,01	0,0188	0,01
C57BL/6	0,0414	0,04	0,0143	0,01	0,0135	0,01	0,0088	0,00	0,1586	0,06
C3H	0,0223	0,01	0,0176	0,01	0,0155	0,01	0,0369		0,0086	0,00
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,0237	0,01	0,0184	0,01	0,0130	0,01	0,0100	0,00	0,1010	0,19
C57BL/6	0,0231	0,02	0,0102	0,01	0,0114	0,01	0,0073	0,00	0,2141	0,15
C3H	0,0026	0,00	0,0076	0,00	0,0048	0,00	0,0061	0,00	0,0052	0,00
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,0272	0,02	0,0131	0,01	0,0079	0,00	0,0084	0,00	0,1181	0,23
C57BL/6	0,0179	0,02	0,0085	0,01	0,0074	0,00	0,0111	0,00	0,1802	0,11
C3H	0,0115	0,02	0,0109	0,01	0,0031	0,00	0,0035		0,0037	0,00

IL-10	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,0181	0,01	0,0107	0,00	0,0589	0,06	0,0587	0,03	0,0610	0,03
C57BL/6	0,0087	0,01	0,0077	0,00	0,05323	0,06	0,0138	0,01	0,03975	0,02
C3H	0,0034	0,00	0,03884	0,05	0,05148	0,07	0,09431	0,07	0,06888	0,03
B-Zellbereich										
Balb/c	0,0445	0,05	0,0408	0,02	0,0382	0,02	0,0272	0,01	0,0605	0,02
C57BL/6	0,07073	0,06	0,11817	0,09	0,03481	0,02	0,01247	0,01	0,05248	0,01
C3H	0,02354	0,01	0,09727	0,04	0,08319	0,05	0,07888	0,05	0,09991	0,05
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,0104	0,00	0,0142	0,01	0,0694	0,09	0,0717	0,04	0,0642	0,02
C57BL/6	0,0330	0,05	0,00677	0,01	0,04743	0,04	0,0167	0,01	0,03888	0,01
C3H	0,0044	0,00	0,0140	0,01	0,04054	0,06	0,0805	0,05	0,08823	0,06
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,0094	0,00	0,01986	0,01	0,0297	0,02	0,0538	0,04	0,0776	0,04
C57BL/6	0,0272	0,03	0,01025	0,00	0,03291	0,03	0,0254	0,03	0,05456	0,02
C3H	0,0293	0,04	0,00684	0,01	0,06247	0,09	0,06685	0,05	0,03657	0,01

IL-21	Kontrolle		8 Stunden		24 Stunden		48 Stunden		72 Stunden	
	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw	MW	Stabw
T-Zellbereich										
Balb/c	0,0136	0,01	0,0109	0,00	0,0073	0,01	0,0045	0,00	0,0393	0,03
C57BL/6	0,0087	0,01	0,0051	0,00	0,0046	0,00	0,0043	0,00	0,0396	0,02
C3H	0,0042	0,00	0,0189	0,04	0,0053	0,00	0,0375	0,04	0,1282	0,22
B-Zellbereich										
Balb/c	0,0211	0,02	0,0058	0,00	0,0092	0,01	0,0044	0,01	0,0616	0,03
C57BL/6	0,0098	0,00	0,0054	0,01	0,0028	0,00	0,0022	0,00	0,0484	0,02
C3H	0,0058	0,00	0,0055	0,00	0,0035	0,00	0,0318		0,1860	0,05
T/B-Zellgrenze										
Balb/c	0,0076	0,01	0,0076	0,00	0,0104	0,00	0,0039	0,00	0,0447	0,04
C57BL/6	0,0116	0,01	0,0047	0,00	0,0040	0,00	0,0052	0,01	0,0478	0,02
C3H	0,0032	0,00	0,0058	0,00	0,0034	0,00	0,0267	0,02	0,1464	0,13
innerer T-Zellbereich										
Balb/c	0,0119	0,00	0,0127	0,01	0,0141	0,01	0,0081	0,01	0,0445	0,02
C57BL/6	0,0176	0,02	0,0077	0,01	0,0059	0,00	0,0064	0,01	0,0241	0,02
C3H	0,0121	0,02	0,0108	0,01	0,0025	0,00	0,0738		0,1230	0,03