

Aus dem Institut für Anatomie der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

**EINFLUSS DER ANTIGENDOSIS AUF
DIE INDUKTION UNTERSCHIEDLICHER
T-HELFER-ZELLPOPULATIONEN:
Analyse der Zytokinexpression in der
murinen Milz nach Immunisierung mit
Schafererythrozyten**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Naturwissenschaften -

vorgelegt von
Claudia Stamm
aus Celle

Lübeck 2010

1. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Westermann

2. Berichtstatter: Prof. Dr. rer. nat. Tamás Laskay

Tag der mündlichen Prüfung: 6.Mai 2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 20.Mai 2011

*Every great scientific truth goes through three stages.
First people say it conflicts with the bible.
Next they say it had been discovered before.
Lastly they say they always believed it.*

Louis Agassiz (1807-1873)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	ANGEBORENE UND ERWORBENE IMMUNANTWORT.....	1
1.2	AUSLÖSUNG DER ERWORBENEN IMMUNANTWORT IN DEN EINZELNEN KOMPARTIMENTEN DER MILZ.....	2
1.3	VORAUSSETZUNGEN ZUR AKTIVIERUNG UND DIFFERENZIERUNG VON T-ZELLEN.....	3
1.4	DIE ZYTOKINPRODUKTION – EIN ENTSCHEIDENDER FAKTOR IN DER DIFFERENZIERUNG VON TH-ZELLPOPULATIONEN.....	5
1.5	DAS DTH-MODELL.....	8
1.6	DOSISABHÄNGIGKEIT BEI DER AUSLÖSUNG EINER SRBC-INDUZIERTEN DTH-REAKTION.....	9
1.7	FRAGESTELLUNG.....	11
2	MATERIALIEN UND METHODEN.....	12
2.1	MATERIALIEN.....	12
2.1.1	<i>Antikörper.....</i>	<i>12</i>
2.1.2	<i>Kits.....</i>	<i>12</i>
2.1.3	<i>Medien und Puffer.....</i>	<i>13</i>
2.1.4	<i>Chemikalien und andere Reagenzien.....</i>	<i>13</i>
2.1.5	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>15</i>
2.1.6	<i>Operationsmaterialien.....</i>	<i>16</i>
2.1.7	<i>Geräte.....</i>	<i>16</i>
2.1.8	<i>Software.....</i>	<i>17</i>
2.1.9	<i>Oligonukleotide.....</i>	<i>18</i>
2.2	METHODEN.....	20
2.2.1	<i>Tierversuche.....</i>	<i>20</i>
2.2.2	<i>Applikations- und Messmethoden mit SRBC.....</i>	<i>21</i>
2.2.3	<i>Operative Eingriffe an Mäusen.....</i>	<i>22</i>
2.2.4	<i>Markierung von SRBC mit CFSE.....</i>	<i>23</i>
2.2.5	<i>Aufarbeitung von Milzzellen.....</i>	<i>23</i>
2.2.6	<i>Histologische Methoden.....</i>	<i>24</i>
2.2.7	<i>Molekularbiologische Methoden.....</i>	<i>27</i>
2.2.8	<i>Statistische Auswertung.....</i>	<i>29</i>
2.2.9	<i>Immunologische Methoden.....</i>	<i>30</i>
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	REPRODUKTION DES SRBC-SPEZIFISCHEN DTH-MODELLS.....	33
3.2	REGULATION DER IMMUNANTWORT IN DER MILZ.....	38
3.3	VERHALTEN SICH NIEDRIGDOSIS- UND HOCHDOSIS-INDUZIERTE ZELLEN NACH AUSLÖSUNG DER DTH IN DER HAUT UNTERSCHIEDLICH?.....	51
3.4	TH-ZELLEN HOCHDOSIS-INDUZIERTER TIERE SIND NICHT IN DER MILZ GEFANGEN.....	59
3.5	SRBC-DOSISABHÄNGIG BESTIMMT DIE PRIMÄR INDUZIERTE TH-ZELLPOPULATION ÜBER DIE AUSLÖSUNG EINER DTH-REAKTION.....	61
3.6	DIE ROLLE DER MILZ BEI INDUKTION EINER DTH-REAKTION IN NIEDRIGDOSIS-APPLIZIERTEN TIEREN.....	64
3.7	DIE INTAKTE MIKROARCHITEKTUR DER MILZ IST ENTSCHEIDEND FÜR DIE DOSISABHÄNGIGE DTH-REAKTION.....	66
3.8	SRBC LOKALISIEREN IN DER MILZ NACH PRIMÄRER HOCHDOSIS-APPLIKATION.....	68
3.9	MASSIVE EXPANSION DER MARGINALZONE UND B-ZELLEN INFILTRATION IN NIEDRIGDOSIS-TIEREN.....	73

4	DISKUSSION.....	75
4.1	DER NACHWEIS EINES DIFFERENZIERTEN ZYTOKIN- UND CHEMOKINPROFILS IST IN DEN EINZELNEN MILZ-KOMPARTIMENTEN NAIVER TIERE MÖGLICH.....	76
4.2	DER VERLAUF DER IMMUNANTWORT IST NICHT DURCH DIE ALLEINIGE EXPRESSION TH1- ODER TH2-TYPISCHER ZYTOKINE IN DER MILZ VORHERSAGBAR	77
4.3	DIE INDUKTION EINER ZELLULÄREN ANTWORT IST NACH NIEDRIGDOSIS-APPLIKATION TROTZ SCHWACHER T-ZELLPROLIFERATION MÖGLICH.....	80
4.4	DIE SRBC-DOSIS VERÄNDERT NICHT DAS CHEMOKINPROFIL IN DEN KOMPARTIMENTEN DER MILZ.....	81
4.5	DIE EXPRESSION SPEZIFISCHER ZELLMARKER, ZYTOKINE UND CHEMOKINE IN DER HAUT KONTROLLIERT DIE IMMIGRATION VON TH-ZELLEN.....	82
4.6	DIE PRIMÄR IN DER MILZ INDUZIERTER TH-ZELLPOPULATION STEUERT DIE IMMUNANTWORT.....	88
4.7	DIE MORPHOLOGIE DER MILZ - ESSENTIELL FÜR KEIMZENTRUMSBILDUNG UND INDUKTION EINER ADAPTIVEN IMMUNANTWORT.....	91
4.8	DIE LOKALISATION VON ANTIGEN UND B-ZELLEN IN DER MILZ BEEINFLUSST DEN VERLAUF DER IMMUNANTWORT.....	94
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	100
	LITERATUR.....	103
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	115
	ANHANG.....	116
	<i>A. Ergänzende Daten.....</i>	<i>116</i>
	<i>B. Publikationen und Kongresse</i>	<i>119</i>
	<i>C. Danksagung.....</i>	<i>120</i>
	<i>D. Erklärung</i>	<i>121</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung(en)
Ag	Antigen
APAAP	Alkalische Phosphatase anti-alkalische Phosphatase
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen-presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
BCR	B cell receptor (B-Zellrezeptor)
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BZ	B-Zellzone (Follikel)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CFSE	5(6) Carboxylfluorescein diacetate N-succinimidyl ester
ct	Cycle of Threshold (Schwellenwert)
d	Tage (Einheit)
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Exp.	Experiment
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal Calf Serum (fötales Kälberserum)
FDC	Follikuläre dendritische Zelle
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
g	Gravitation (Einheit)
h	Stunde (Einheit)
HD	Hochdosis
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
kDA	Kilo-Dalton
KLH	Keyhole limpet hemocyanin (Protein einer Schneckenart)
KO	Knockout
LPS	Lipopolysaccharid
LT β	Lymphotoxin beta
mAK	monoklonaler Antikörper
MACS	Magnetic Adhesion Cell Sorting (magnetische Zellseparation)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MHV	Murine Hepatitis Virus (Mäuse Hepatitis Virus)
min	Minute

mg	Milligramm
ml, µl	Millimeter, Mikrometer
mM, M	Millimolar, Molar
MS	Mäuseserum
mRNA	messenger RNA
MZ	Marginalzone
neg.	negativ
n.d.	nicht detektierbar
ND	Niedrigdosis
NK	Natürliche Killerzelle
NK-T	Natürliche T-Killerzelle
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
OVA	Ovalbumin
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post injection (nach Injektion)
pLK	poplitealer Lymphknoten
pos.	Positiv
qRT-PCR	quantitative real-time Reverse Transkription-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Rote Pulpa
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTII	Reverse Transkriptase II
s.	siehe
S.	Seite
s.c.	Subcutaneous (subkutan)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sek	Sekunde
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
SRBC	sheep red blood cells (Schafererythrozyten)
Tab.	Tabelle(n)
TBS-T	Tris-Buffered Saline Tween 20 (Tris-gepufferte Salzlösung)
TCR	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
TFH	follikuläre T-Helferzelle
Th	T-Helfer
TNP	Trinitrophenyl
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZ	T-Zellzone (PALS: periarteriolar lymphoid sheath)
U	unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ün	über Nacht
v/v	volume per volume (Volumen pro Volumen)
w/v	weight per volume (Gewicht pro Volumen)

1 Einleitung

1.1 Angeborene und erworbene Immunantwort

Das Immunsystem wird funktionell in die angeborene und erworbene Immunität unterteilt und dient einem Organismus zur Abwehr fremder beziehungsweise schädlicher Substanzen (Antigene). Die angeborene Immunantwort bildet dabei die erste Verteidigungslinie und verhindert durch chemische, mikrobiologische und mechanische Barrieren, wie zum Beispiel Haut und Schleimhäute, das Eindringen des Antigens. Wurde diese erste Barriere durchbrochen, sorgen lokal phagozytierende Makrophagen und Proteine des Komplementsystems für dessen Zerstörung. So genannte PAMPs (Pathogen-associated molecular pattern) werden dabei als charakteristische Struktur motive des eindringenden Pathogens von den Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition receptors; PRRs) der Immunzellen erkannt. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Toll-like Rezeptoren (TLR), eine Untergruppe der PRR, die nachfolgend in die Auslösung einer lokalen Entzündungsreaktion involviert sind, sowie die lokale Zytokinexpression und Anreicherung weiterer Immunzellen. Schließlich können DAMP (damage-associated molecular pattern)-Signale zur lokalen Gewebeschädigung führen. Da die angeborene Immunantwort nicht in der Lage ist alle Antigene zu erkennen, wird die erworbene Immunantwort eingeleitet. Diese hat den Vorteil, dass sie über ein sehr großes Repertoire von unterschiedlichen Lymphozyten verfügt, die sich durch somatische Rekombination in der Spezifität ihrer Rezeptoren unterscheiden. Mit den spezifischen Rezeptoren können einzelne Antigene gezielt erkannt werden, Veränderungen wahrgenommen werden, welches einen höheren Schutz bei erneutem Antigenkontakt bietet.

1.2 Auslösung der erworbenen Immunantwort in den einzelnen Kompartimenten der Milz

Eine erworbene Immunantwort gegen Antigene kann nur in sekundär lymphatischen Organen, wie Lymphknoten, Tonsillen, Peyer`sche Platten und der Milz initiiert werden.¹¹⁰ Aufnahme- und Prozessierungsprozesse von Antigenen finden dabei in den unterschiedlichen Kompartimenten dieser Organe statt. Sie sind sehr wichtig bei der Steuerung der Immunantwort.

Bei der Auslösung einer erworbenen Immunantwort spielen Antigen-präsentierende Zellen (APCs) sowie T-Zellen und B-Zellen eine entscheidende Rolle. Das Antigen kann nicht direkt von T-Lymphozyten erkannt werden. Es muss ihnen durch APCs präsentiert werden. Damit diese mit T- und B-Zellen in Kontakt treten können und um diese zu aktivieren, benötigen sie ein entsprechendes Mikromilieu, das nur in bestimmten Kompartimenten des lymphatischen Organs vorliegt. Gelangen zum Beispiel APC-gebundene Antigene aus peripheren Organen wie Darm oder Haut über die afferenten Lymphe und hoch endothelialen Venulen (HEV) in den Lymphknoten, befinden sie sich zunächst im T-zellreichen Paracortex. Nach dortiger Aktivierung spezifischer T-Zellen wandern diese in den äußeren Cortex-Bereich, wo sie B-Zellen aktivieren können oder sie haben die Möglichkeit den Lymphknoten über efferente Lymphe zu verlassen. Antigen, das direkt über das Blut in den Organismus eintritt, gelangt ausschließlich in die Milz. Sie ist das einzige sekundär lymphatische Organ, das über diesen Weg erreicht wird und durch das außerdem achtmal mehr Lymphozyten zirkulieren, als durch alle Lymphknoten zusammen.^{130, 131} Morphologisch kann die Milz in Rote und Weiße Pulpa unterteilt werden. Das größte Kompartiment bildet dabei die Rote Pulpa. Sie ist ein spezialisiertes Kompartiment, das reich an Makrophagen ist, die entscheidend sind in der Elimination alternder Erythrozyten. Die Weiße Pulpa bildet Inseln aus lymphatischem Gewebe, die sich um die Endstrecken von Arteriolen anordnen. Direkt um die Arteriole befindet sich die PALS (periarteriöläre lymphatische Scheide oder T-Zellzone (TZ)), die von Follikeln, oder auch B-Zellzone (BZ) genannt, umgeben ist. Die Marginalzone umgibt die T-Zellzone und die B-Zellzone und bildet damit das äußerste Areal der weißen Pulpa. Die meisten Lymphozyten treten durch diese Zone in die Milz ein.¹¹¹ Sie ist ein wichtiger Transitbereich für Zellen, die den Blutstrom verlassen und in die Weiße Pulpa

eintreten wollen und enthält große Mengen an residenten Zellen, wie z.B. Marginalzonen-B-Zellen, zwei spezielle Marginalzonen-Makrophagen Populationen, als auch Dendritische Zellen und Lymphozyten.¹¹¹ Auch Antigen erreicht die Weiße Pulpa über die Marginalzone.⁷⁴ Es kann dort von APCs aufgenommen und prozessiert werden, dazu stehen zwei Gruppen von Makrophagen bereit. Die Marginalzonen-Makrophagen, die den äußeren Ring der Makrophagen formen und die Marginalzonen metallophilen Makrophagen. Sie lokalisieren am inneren Rand der Marginalzone und können mit spezifischen Zellmarkern identifiziert werden. Zwischen diesen beiden Makrophagen Populationen befinden sich Marginalzonen-B-Zellen und eine Population von Dendritischen Zellen (DCs).^{108, 176} Marginalzonen-B-Zellen sind darauf spezialisiert blutständige Antigene zu detektieren. Sie können entweder zu Plasmazellen differenzieren oder erlangen die Fähigkeit als APC zu fungieren.⁹⁹ Sie unterscheiden sich jedoch phänotypisch von folliculären B-Zellen.¹⁰⁸

1.3 Voraussetzungen zur Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

Nachdem Lymphozyten im Thymus entstanden sind und dann aus diesem primär lymphatischen Organ freigegeben wurden⁵⁷, zirkulieren sie durch den Körper auf der Suche nach ihrem spezifischen Antigen. Mit ihm können sie nur in Kontakt treten, wenn es ihnen mit Hilfe einer APC präsentiert wird. Dabei durchlaufen sie in wenigen Tagen viele der lymphatischen Organe. Abhängig von dem eindringenden Antigen kann nun entweder eine zelluläre Antwort initiiert werden (bei einem intrazellulären Antigen) oder eine humorale Antwort (bei einem extrazellulären Antigen) entstehen.

Der MHC-Komplex und die Diversität des TCR-Repertoires

Das Antigen wird zunächst von einer APC aufgenommen und prozessiert. Dabei wird das Antigen zu einzelnen Peptiden verdaut, die dann an den Major Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) binden können. Es entsteht ein Molekülkomplex aus Antigenpeptid und MHC, der nachfolgend zu dessen Präsentation an die Oberfläche der APC befördert wird. Handelt es sich um ein intrazelluläres Pathogen, wie zum Beispiel ein Virus, das sich im Zytoplasma vermehrt, wird es vom MHC I-Komplex an die Zelloberfläche transportiert und CD8⁺ T-Zellen präsentiert. Diese zytotoxischen T-Zellen sorgen dann für das gezielte

Abtöten der Pathogen-befallenen Zelle. Sind extrazelluläre Pathogene in den Organismus eingedrungen, wie es die meisten Bakterien sind, werden sie über den MHC II-Weg an die Zelloberfläche transportiert und dort CD4⁺ T-Zellen präsentiert. Da diese CD4⁺ T-Zellen nicht selbstständig Pathogene abtöten, werden sie auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet. Für ihre Aktivierung benötigen sie Signale über den T-Zellrezeptor (TCR), das durch die Bindung eines spezifischen TCR an Peptide des Antigen im MHC-Komplex auf der Oberfläche von APCs ausgelöst wird (Abb. 1-1, T-Zellaktivierung). Durch die vorhandene hohe Diversität des TCR-Repertoires, gibt es durchschnittlich nur eine von 1×10^5 bis 1×10^6 T-Zellen, die einen TCR mit einer ausreichenden Affinität für das applizierte Antigen besitzt und somit zu einem Aktivierungsstimulus führt.^{15, 24} Ist die Affinität des TCR zu groß, tritt ein Schutzmechanismus in Kraft, der zur gezielten Apoptose der Zelle (activation induced cell death, AICD) führt.^{123, 147} Dies ist besonders wichtig um zu verhindern, dass T-Zellen, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, aktiviert werden. Es ist auch bekannt, dass T-Zellen mit niederaffinen TCRs eine höhere Antigenmenge benötigen als T-Zellen mit hochaffinen TCRs, um aktiviert zu werden.^{64, 143} Die Effektivität der T-Zellaktivierung hängt aber nicht nur von der Bindungsaffinität des Peptid-MHC/TCR-Komplexes ab, sondern auch von kostimulatorischen Signalen und Zytokinsignalen.^{55,}

61

Die Antigenklasse und seine Applikation

Neben den genannten Faktoren sind aber auch die Antigenklasse, sowie die Applikationsroute und die Dosis des Antigen von großer Wichtigkeit bei der Initiation einer T-zellabhängigen Immunantwort. Antigenendosis und Applikationsroute sind sogar ganz entscheidend für die Entwicklung der Th-Zellen Subpopulationen.^{1, 29,}

127, 137

Unterteilt werden Antigene in eine Thymus-abhängige und Thymus-unabhängige Klasse (auch bezeichnet als T-Zellabhängigkeit). T-zellabhängige Antigene benötigen die Unterstützung von Th-Zellen um eine humorale Immunantwort zu induzieren, hingegen besitzen T-zellunabhängige Antigene die Fähigkeit eine humorale Immunantwort ohne die Kooperation von T-Zellen zu induzieren.^{77, 118} Bei den T-zellabhängigen Antigenen gibt es die Unterteilung in lösliche Antigene, wie zum

Beispiel OVA, BSA oder KLH und partikuläre, wie TNP-Lactobacillus, Liposomen mit Protein oder heterologe Erythrozyten, wie z.B. sheep red blood cells (SRBC). Beispiele für T-zellunabhängige Antigene sind LPS, Dextran als lösliche Antigene oder Streptokokken, Haptene oder Liposomen (ohne Protein) als partikuläre Antigene. Aber nicht nur die Antigenklasse, sondern auch die Applikationsstelle des Antigens können die Immunantwort beeinflussen und verändern.^{70, 89, 168} Hurltel *et al.* zeigten zum Beispiel, dass die Applikation vergleichbar hoher Mengen an SRBC (1×10^8 - 10^9) intravenös verabreicht zu einer humoralen Antwort führten, hingegen die subkutane Injektion eine zelluläre Immunantwort auslöst. Dass auch die Dosis des applizierten Antigens zur Auslösung verschiedener Immunantworten führt, wurde ausführlich anhand heterologer Erythrozyten als auch an einem Derivat des *Salmonella adelaide* Flagellins gezeigt.^{89, 134, 141}

1.4 Die Zytokinproduktion – ein entscheidender Faktor in der Differenzierung von Th-Zellpopulationen

Die Differenzierung der Th-Zellen in verschiedene Subpopulationen ist entscheidend, damit unterschiedliche Immunitäten initiiert werden und der Organismus verschiedene Pathogene optimal bekämpfen kann. Eine zelluläre Antwort wird durch die Aktivität von Th1-Zellen ausgelöst. Sie richtet sich vor allem gegen intrazelluläre Pathogene. Werden hingegen Th2-Zellen aktiviert, spricht man von einer humoralen Antwort, bei der naive B-Zellen dazu angeregt werden Immunglobuline zu sezernieren. Die gebildeten Antikörper können dann das Antigen neutralisieren, opsonisieren oder zur Aktivierung von Komplement beitragen und so extrazelluläre Pathogene gezielt eliminieren. Die Entwicklung dieser Subpopulationen von Th-Zellen hängt neben der Peptid-MHC/TCR-Bindungsaffinität, dem Antigen und dem genetischen Hintergrund des Wirts entscheidend von der Expression verschiedener Zytokine ab. Diese werden während des Differenzierungsvorgangs der Th-Zellen stimuliert und dirigieren nachfolgend die Entwicklung der verschiedenen Th-Zellen, welche dann selbst ein separates Zytokinmuster produzieren.¹²² Die Th-Zellen können dabei durch die Zytokinexpression und Zell-Zell-Interaktionen viele Aktivitäten des Immunsystems kontrollieren.²³

Kurze Zeit nach Eintritt von Pathogenen in den Organismus können APCs, wie DCs und Makrophagen, IL12 sezernieren.⁶⁹ Die biologische Aktivität von IL12 sorgt für das Wachstum und die Aktivierung von T-Zellen, die in Th1-Richtung differenzieren, aber auch für die Aktivierung von NK-Zellen. Ist das Antigen in den Organismus eingedrungen, steigt auch die Expression des T-Zellwachstumsfaktors IL2 an, um T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Durch die Expression dieser beiden Zytokine differenzieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen bevorzugt in Th1-Richtung und induzieren die pro-inflammatorische zelluläre Antwort. Die dabei neu differenzierten Th1-Zellen schütten IFN γ als Effektorzytokin aus. Makrophagen werden dadurch aktiviert und zerstören das intrazelluläre Pathogen durch Phagozytose und Lyse. Kommt es hingegen zu einer frühen IL4-Expression, die von Mastzellen, T-Zellen und Stromazellen des Knochenmarks induziert werden kann, differenzieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen.¹³⁶ Diese aktivieren durch Zytokine wie IL4, IL5, IL6, IL10 und IL13 B-Zellen, um Antikörper zu bilden und so eine anti-inflammatorische humorale Antwort zu initiieren.

Im Gegensatz zu Th2-Zellen, die durch den Transkriptionsfaktor Gata-3 gekennzeichnet sind, wird von Th1-Zellen T-bet exprimiert.^{179, 180} Neben diesem Th1/Th2-Modell (Abb. 1-1) gibt es weitere CD4⁺ T-Zellpopulationen, wie zum Beispiel regulatorische T-Zellen (Treg). Sie sind durch die Expression von IL10 als Markerzytokin gekennzeichnet und wirken immunsuppressiv, indem sie Entzündungsreaktionen unterdrücken.¹¹⁴ Charakterisiert werden Treg vor allem durch den Transkriptionsfaktor FoxP3 als auch das Antigen des IL2-Rezeptors CD25.⁵ Exprimieren Th-Zellen neben IL17 auch IL21 und IL22, handelt es sich um Th17-Zellen, die eine zellabhängige Autoimmunität induzieren.⁶² Die für diese Th-Zellpopulation typischen Transkriptionsfaktoren sind: STAT3, ROR α und ROR γ t.^{83, 112} Es gibt weitere T-Helfer-Zellpopulationen, die durch eine typische Zytokinexpression charakterisiert werden, wie zum Beispiel die erst kürzlich entdeckten Th9-Zellen, die pro-inflammatorisch als Immunantwort gegen Parasiten wirken sollen.^{6, 156} Als ihre Effektorzytokine exprimieren sie IL9 und IL10.

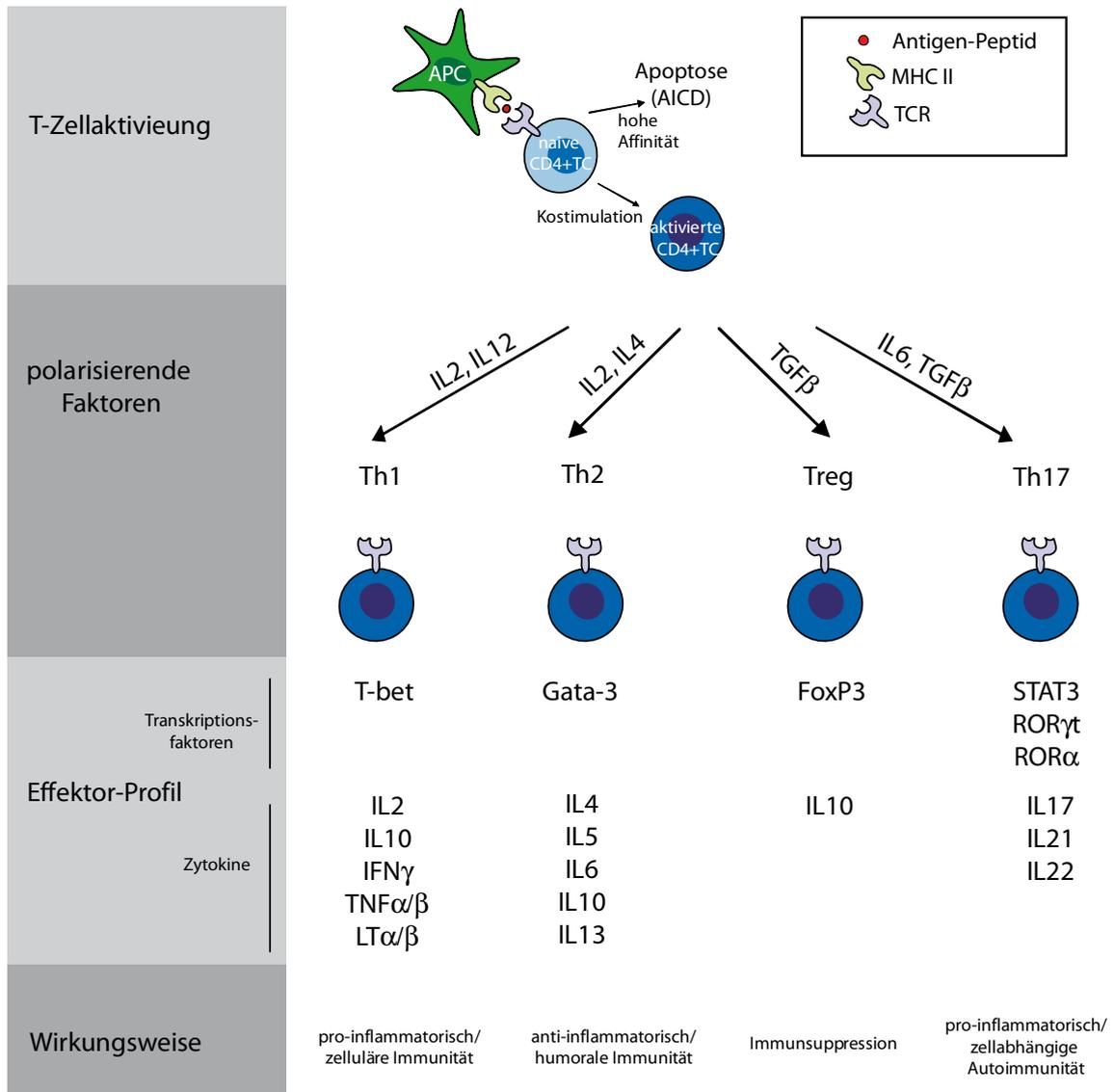


Abb. 1-1 Differenzierungsfaktoren der verschiedenen Th-Zellpopulationen

Dargestellt ist die Differenzierung der unterschiedlichen Subpopulationen aus einer naiven CD4⁺ T-Zelle (CD4⁺ TC). Nach Antigen-Präsentation, durch eine Antigen-präsentierende Zelle (APC), wird die T-Zelle aktiviert und differenziert durch unterschiedliche Zytokinstimuli (polarisierende Faktoren) in eine der Subpopulationen. Nachfolgende klonale Expansion dieser Subpopulation ist gekennzeichnet durch dessen spezifische Ausschüttung von Effektorzytokinen und Transkriptionsfaktoren, die die nachfolgende Immunantwort in eine bestimmte Richtung lenkt. Das Schema wurde in Anlehnung an Steinmann, 2007 erstellt.¹⁵⁸

Mit der Zytokinexpression können sich die einzelnen Th-Zellsubpopulationen aber auch gegenseitig in ihrer Effektorfunktion beeinflussen. Produzieren Th1-Zellen zum Beispiel IFN γ , wirkt dieses gleichzeitig inhibierend auf Th2- oder Th17-Zellen. *Vice versa* unterdrückt das von Th2-Zellen exprimierte IL10 die Th1-Funktion sowie auch das von Th17-Zellen exprimierte IL17.

1.5 Das DTH-Modell

Ein sehr beliebtes Modell um den Effekt der Differenzierung unterschiedlicher Th-Zellpopulationen darzustellen und die damit verbundene Induktion verschiedener erworbener Immunantworten, ist das so genannte DTH (delayed type hypersensitivity)-Modell. Die DTH ist eine allergische Spätreaktion, die zum Nachweis einer zellulären Immunität herangezogen werden kann. Sie wird unterteilt in eine Sensibilisierungsphase und eine Auslösephase. In der Sensibilisierungsphase hat der Organismus seinen ersten Kontakt mit dem T-zellabhängigen Antigen. Dieses wird über APCs aufgenommen, prozessiert und über den MHC II-Komplex präsentiert. Die naiven T-Zellen werden aktiviert und somit „sensibel“ für dieses Antigen (Abb. 1-1, T-Zellaktivierung). Die aktivierten T-Zellen migrieren nachfolgend durch Blut und Peripherie. In der Auslösephase gelangt das Antigen ein zweites Mal in den Organismus, diesmal direkt in die Haut. Eine lokale Entzündungsreaktion wird dort zunächst durch das Immigrieren von Granulozyten initiiert. Dabei gelangen auch einzelne Antigen-spezifische T-Zellen in die Haut. Diesen aktivierten T-Zellen wird das Antigen erneut durch lokal vorhandene APCs präsentiert und sie differenzieren zu Effektor-T-Zellen (Abb. 1-2, I). Als differenzierte T-Zellen sekretieren sie Zytokine und Chemokine, was vor allem zur Aktivierung lokaler Makrophagen führt als auch dem Mobilisieren weiterer Antigen-spezifischer T-Zellen (Abb. 1-2, II und III).

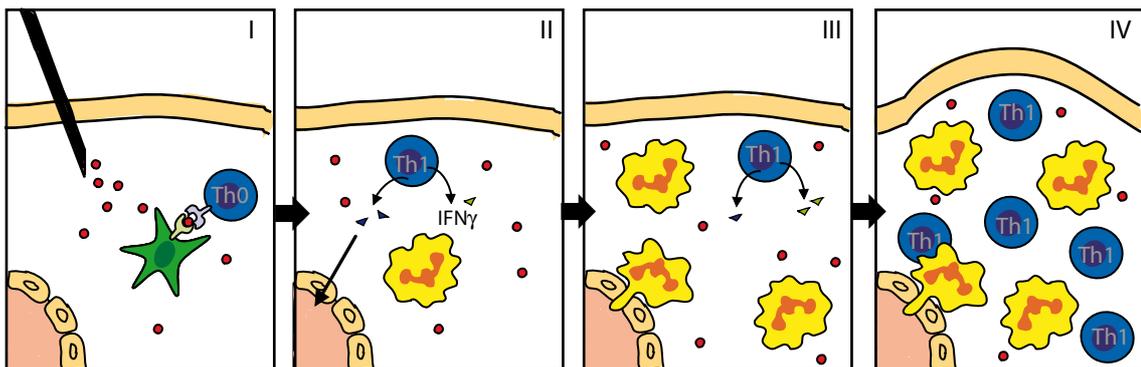


Abb. 1-2 Auslösephase der DTH-Reaktion in der Haut

Schematisch dargestellt sind die ablaufenden Vorgänge nach Auslösung der DTH durch subkutane SRBC-Injektion in die Haut. (I) Die aktivierte T-Zelle (Th0) differenziert durch erneuten Antigenkontakt über eine APC zu einer Effektor-Th1-Zelle. (II) Sie sezerniert nun Chemokine (grüne Dreiecke) und Zytokine, wie z.B. IFN γ , das Makrophagen und andere Entzündungsmediatoren des angeborenen Immunsystems an die Injektionsstelle lockt. (III) Durch Chemoattraktion immigrieren weitere Th1-Zellen als auch Entzündungszellen, die Gefäßwände permeabilisieren und es kommt zum Einstrom von Plasma. (IV) Durch den Influx von Th1-Zellen, Makrophagen und anderer Entzündungszellen wird die Reaktion weiter verstärkt. Eine lokale Schwellung ist nun als Zeichen der DTH-Reaktion deutlich zu sehen. Das Schema wurde in Anlehnung an Janeway, 2002 erstellt.

Es kommt lokal zu einer erhöhten Einwanderung von T-Zellen und Entzündungsmediatoren. Dadurch werden die ablaufenden Reaktionen verstärkt. Lokalverlaufende Gefäße werden permeabilisiert. Plasma strömt ein. Eine Schwellung wird ausgeprägt und induziert damit eine lokale DTH-Reaktion (Abb. 1-2, IV). Das in dieser Arbeit verwendete DTH-Modell wurde von Coombs und Gell als allergische Spätreaktion (Hypersensitivitätsreaktionen) des Typs IV klassifiziert.^{51, 140}

1.6 Dosisabhängigkeit bei der Auslösung einer SRBC-induzierten DTH-Reaktion

Das DTH-Modell wurde bereits in den 50er Jahren mit den T-zellabhängigen, nicht replizierenden SRBC als Modellantigen bei Meerschweinchen eingesetzt.¹³³ Nachdem es auf Ratten¹¹ und später auf Mäuse⁸⁹ übertragen wurde, konnte schon früh die inverse Beziehung zwischen zellulärer und humoraler Immunantwort abhängig von der Applikation einer unterschiedlich hohen Antigen-Dosis aufgezeigt werden.^{104, 162, 166}

Kam es nach primärer intravenöser Applikation einer Niedrigdosis von SRBC (1×10^9) in der Maus nach Auslösung der DTH in der Fußsohle zu einer Fußschwellung als Merkmal einer zellulären Immunantwort, wurde unter Verwendung der 10000fach höheren Dosis (1×10^9) eine humorale Immunantwort ausgelöst.^{89, 142} Es konnte so, abhängig von der Antigendosis und dem Applikationsweg, entweder eine DTH oder eine Antikörperreaktion ausgelöst werden.⁸⁹ Schon früh postulierte Mosmann, dass es sich bei den „Induzierern“ der DTH-Reaktion um Th1-Zellen handelt, da sie nachweislich IFN γ sekretieren, das ein potenter Stimulator für Makrophagen ist, während Th2-Zellen nicht involviert sind oder die zelluläre Immunantwort herunterregulieren.^{14, 47} Dieses Verhalten der Th2-Zellen wurde in der Auslösephase der DTH in SRBC Hochdosis-injizierten Tieren durch die Zytokinexpression von IL10 in der Haut gezeigt⁹³, als auch durch eine IL4-Expression im *Leishmania major*-abhängigen DTH-Modell.¹³⁹ Mit Hilfe dieses DTH-Modells konnte ohne Notwendigkeit eines zusätzliche Adjuvanz zum einen gezeigt werden, dass die Auslösung einer humoralen Immunantwort T-zellabhängig ist¹²¹, zum anderen bestätigte die Depletion von T-Zellen, dass nicht nur primäre sondern auch sekundäre anti-SRBC Antworten T-zellabhängig sind.¹⁷⁰ Hahn *et al.* hatten mit Untersuchungen des Entzündungsexodats der Haut in der Auslösephase herausgefunden, dass eine Th-Zellpopulation

ausschließlich nach Niedrigdosis (ND) von SRBC in der Peripherie zu finden war, nicht hingegen nach Hochdosis (HD) des gleichen Antigens.⁵⁹ Die HD-induzierte Th-Zellpopulation war jedoch in der Milz ansässig, konnte aber nicht mehr in die Peripherie gelangen, was derzeit mit dem Vorhandensein eines auf die Th-Zellen wirkenden Suppressor-Mechanismuses erklärt wurde.^{58,105, 141} Dass es sich dabei um zwei verschiedene Th-Zellpopulationen handeln könnte, die abhängig von der SRBC-Dosis induziert werden, wurde in den Experimenten von Kaufmann erstmals näher untersucht. Er ging davon aus, dass die HD-induzierte Th-Zellpopulation nicht die Bildung von DTH-induzierenden Th-Zellen unterdrückt, aber zu einem Milieu in der Milz führt, das letztere davon abhält eine periphere DTH zu vermitteln.⁷⁸

Andere Studien hingegen machten die Anwesenheit von B-Zellen für die Differenzierung von unterschiedlichen Th-Subpopulationen verantwortlich. Blieb die Aktivierung von B-Zellen nach SRBC-ND aus, wurden Th-Zellen induziert, die durch die Peripherie zirkulierten und als DTH-Effektorzellen ins Gewebe rekrutiert werden konnten. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von SRBC-HD zur Proliferation von B-Zellen. Diese wiederum waren in der Lage rezirkulierende aktivierte Th-Zellen zu rekrutieren, welche dann nicht länger in der Peripherie anzutreffen waren, um eine DTH-Reaktion zu initiieren.^{13, 41, 106, 115}

Ein weiterer Ansatz wurde von Butcher und Campbell gemacht. Sie untersuchten die Fähigkeit verschiedener Th-Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Fähigkeit ins Gewebe migrieren zu können. Ob die Th-Zellen Zutritt in periphere entzündete Gewebe haben oder doch B-Zellhilfe leisten, hängt nach ihren Untersuchungen auch von Adhäsionsmolekülen und chemoattraktiven Rezeptoren auf ihrer Oberfläche ab.^{22, 23}

1.7 Fragestellung

Abhängig von der applizierten Dosis eines T-zellabhängigen Antigens entstehen zwei T-Helfer-Zellpopulationen. Warum jedoch ein und dasselbe Antigen verschiedene Th-Populationen induziert und damit verschiedene Immunantworten auslöst, ist bisher nicht geklärt. Bekannt ist aber, dass die Differenzierung in die unterschiedlichen Th-Subpopulationen maßgeblich durch die Expression unterschiedlicher Zytokine gesteuert wird.

Die sich daraus ergebende Hypothese war, dass die Antigendosis Einfluss auf das Zytokinmilieu der Milz nimmt. Dies lässt vermuten, dass eine SRBC-Niedrigdosis ein Th1-Milieu in den Kompartimenten der Milz erzeugt und DTH-vermittelnde Th1-Zellen induziert. Im Gegensatz dazu würde die Applikation einer SRBC-Hochdosis zu einem Th2-Milieu in den Kompartimenten der Milz führen und Th2-Zellen induzieren, die B-Zellhilfe leisten. Da die Milz das einzige sekundär lymphatische Organ ist, das SRBC nach intravenöser Applikation erreichen können, muss sie der Ort sein, an dem die beiden verschiedenen T-Helfer-Zellpopulationen generiert worden sind.

Nachfolgend ergibt sich daraus die Fragestellung dieser Arbeit:

1. Gibt es Expressionsunterschiede Th1- und Th2-typischer Zytokine in den einzelnen Kompartimenten der Milz zwischen naiven, Niedrig- und Hochdosis-injizierten Tieren und kann damit die dosisabhängige Entstehung von Th1- und Th2-Zellen in Niedrigdosis- und Hochdosis-Tieren gezeigt werden?
2. Kann nach Auslösung der DTH das Zytokinprofil in der Haut zeigen, dass DTH-vermittelnde Th1-Zellen nach Niedrigdosis in die Haut gelangen und nach Hochdosis Th2-Zellen entstehen, die nicht in die Haut gelangen?
3. Nach intravenöser Applikation gelangen ND- und HD-SRBC über den Blutstrom in die Milz. In welcher Lokalisation sind die SRBC nach Injektion der unterschiedlich hohen Dosis in der Milz zu finden?

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

APAAP, Maus, Monoklonal	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Purified anti-mouse CD45R/B220 (RA3-6B2) (B220)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Polyclonal Rabbit Anti-Rat Immunoglobulins / Biotinylated (bRAR)	DakoCytomation Denmark A/S,Glostrup, Dänemark
Biotin conjugated Hamster Anti-Mouse TCR β chain Monoclonal antibody (bTCR β)	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
ExtrAvidin®-Alkaline Phosphatase (Ex Av Alkaline)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim Deutschland
ExtrAvidin®-Peroxidase (Ex Av Peroxidase)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim Deutschland
Rat Anti-Mouse Ki-67 Antigen (TEC-3)	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Streptavidin, Alexa Fluor® 555 (SAV-555)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe (Molecular Probes)
Biotin conjugated rat Anti-Mouse Murine metallophilic Macrophage Monoclonal antibody (MOMA-1)	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen
Streptavidin-Allophycocyanin (APC)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.1.2 Kits

Deoxyribonuklease I-Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Chemie GmbH, Taufkirchen
innuPREP RNA Mini Kit	analytikjena, Analytik Jena AG bio solutions, Jena, Deutschland
Mouse IgG ELISA Quantification Kit goat anti-mouse IgG-Fc HRP conjugated	Bethly, Montgomery, Texas, USA

2.1.3 Medien und Puffer

PBS	SAFC
Phosphat gepufferte Saline (PBS), ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RPMI-Medium 1640, without L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
TBS-Tween	0,05 M TRIS, 0,05 % (w/v) Tween [®] 20, 0,86 % (w/v) NaCl in Aqua bidest., pH 7,6
RPMI Puffer	200 ml RPMI, 1% (v/v) FCS
EDTA Puffer	20 ml RPMI-Puffer, 10 mM EDTA, pH 7,2
Kollagenase Waschpuffer	100 ml PBS, 2 mM EDTA, 1% (v/v) FCS, pH 7,2
MACS Waschpuffer	1000 ml PBS, 2 mM EDTA, 0,5% (w/v) BSA
FACS Waschpuffer	1000 ml PBS, 2 mM CaCl ₂ x 2H ₂ O, 1,7 mM
ELISA Blockpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, in A. bidest, pH 8,0
ELISA Probenpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween [®] 20, in A. bidest, pH 8,0
ELISA Waschpuffer	50 mM Tris, 0,14 M NaCl, 0,05% Tween [®] 20, in A. bidest, pH 8,0, MgCl ₂ , 1% (w/v) BSA
Schwinzerlyse	8,3 g NH ₄ Cl, 0,1% (w/v) EDTA, 1 g KHCO ₃ in 1000 ml aqua dest.
Hammelblut in Alsever Puffer, 50%	Labor Dr. Merk & Kollegen, Ochsenhausen, Deutschland

2.1.4 Chemikalien und andere Reagenzien

qPCR MasterMix Plus	Eurogentec, Seraing, Belgien
qPCR MasterMix Plus for Sybr [®] Green I	Eurogentec, Seraing, Belgien
5x First Strand Buffer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aceton, p.a.	C. C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe GmbH & Co. KG, Karlsruhe
APAA PAA Laboratories GmbH, Cölbe	
P-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 Chemie GmbH, Taufkirchen Chemie GmbH, Taufkirchen
Chloroform	C. C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe GmbH & Co. KG, Karlsruhe
CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka Analytical), Taufkirchen
Dako liquid DAB + substrate chromogen System	Dako North America, Carpinteria, CA

Materialien und Methoden

DEPC-H ₂ O	0,1 % DEPC (v/v) in Aqua bidest.
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Chemie GmbH, Taufkirchen
Dithiothreitol (DTT), 0,1 M	BD Biosciences, Heidelberg
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTP-Mix (10 mM)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
EDTA disodium	Serva GmbH, Heidelberg
Einbettmedium, Tissue-Tek®	Leica Instruments GmbH, Nussloch
Eindeckmittel, AQUATEX®	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol, 70%, 75%, 100%	C. C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Flow™	BD Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fast Blue BB, Fast Red TR	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Chemie GmbH, Taufkirchen
Foetal Calf Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Chemie GmbH, Taufkirchen
Kollagenase D (aus Clostridium histolyticum)	Roche Diagnostics, Mannheim
Levamisole	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Mastermix für reverse Transkription	4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP-Mix (10mM), 250 ng Random-Primer in 1 µl DEPC-H ₂ O, 0,5µl Reverse Transkriptase(200U/µl)
Mausserum, normal	Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA
Methanol, p.a.	C. C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe GmbH & Co. KG, Karlsruhe
MicroBeads (CD19, CD11b, CD11c)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
N,N-Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck KGaA, Darmstadt
NaCl-Lösung 0,9%, steril	Berlin-Chemie AG, Berlin
NaN ₃	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt
Naphtol AS-MX Phosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Chemie GmbH, Taufkirchen
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
PFA 4%	4 % PFA (v/v) in PBS
Primer und TaqMan®-Sonden	biomers.net GmbH, Ulm.
Random-Primer (hexamers_rand)	MWG Biotech AG, Ebersberg
Reverse Transkriptase (BD PowerScript™)	BD Biosciences, Heidelberg

Materialien und Methoden

SDS-Natriumlaurylsulfat	C. C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sodium Pyruvate Solution	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
TMB single solution	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Toluidinblau	Waldeck GmbH & Co., Münster
Toluidinblau-Lösung (0,1%)	0,1 % Toluidinblau (w/v), 1 % (v/v) Methanol, 15 % (v/v) Ethanol in DEPC-H ₂ O
Trinatrium	C. C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan,	Serva GmbH, Heidelberg
Tween®20	Serva GmbH, Heidelberg
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen Chemie GmbH, Taufkirchen
Ketaminhydrochlorid, Ketanest®S	Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

96 Well Multiply®-PCR-Platten, Polypropylen mit Klebefolie	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Combitips (unsteril)	Eppendorf AG, Hamburg
Cryogefäße	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
FACS-Röhrchen (Test Tube, no cap, nonsterile)	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon®-Gefäße, 15 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Folienobjektträger, PALM® Polyethylen naphthalat, 1 mm MembraneSlides,	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
Glasobjektträger Superfrost Iso - Norm 8037	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH und Co. KG, Braunschweig
Injektions-Kanüle Gr.18, 100 Sterican	B. Braun Melsung AG, Melsung
Klebefolien, optisch klar	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
MS, LS Columns (MACS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Omnifix-Feindosierungsspritze 1 ml	B. Braun Melsung AG, Melsung
Peha-soft powderfree	Hartmann, Heidenheim
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße Safe Seal 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 0,5 und 1,5 ml, Polypropylen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Safe Look Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Serologische Pipetten (1,2,5,10,25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzenfilter PET 0,2 µm	C. C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe GmbH & Co. KG, Karlsruhe

2.1.6 Operationsmaterialien

Einmalskalpelle, Klinge 11	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Einwegspritzen, 1 ml, steril; (BD Plastipak™)	BD Biosciences, Heidelberg
Injektionskanülen, 0,45 x 13 mm; (BD Microlance™ 3)	BD Biosciences, Heidelberg
Instrumente aus hochlegiertem Edelstahl	Präparierschere, fein; Pinzette, anatomisch; Pinzette, chirurgisch; Uhrmacherpinzette
Tupfer, 10 x 10 cm, steril (Vliwasoft®)	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Rengsdorf
chirurgisches Nahtmaterial, resorbierbar, SERAPID	Serag-Wiessner KG, Naila

2.1.7 Geräte

ACCU BLOCK, Digital Dry Bath	Labnet International Inc., Windsor, Berkshire, UK
Außenmessgerät Oditest 0-10 mm	Kroepelin GmbH, Schlüchtern
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
Heiz-Block	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Digitaler Blocktermostat	Axon Labortechnik, Kaiserslautern
Eppendorf Multipipette 4780	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
FACS Calibur Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
Laser-Scanning Konfokalmikroskop LSM 510 Meta	Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
Magnetrührer IKA-Combimag RET	Janke & Kunkel GmbH&Co.KG, Staufen
Mikrodissektion, PALM® MicroBeam	P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
Mikroskop Wilovert®	Will, Wetzlar
Neubauer improved (Tiefe 0,02 mm)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim
Neubauer improved (Tiefe 0,1 mm)	Paul Marienfeld GmbH & CoKG, Lauda- Königshofen
Pipetten Eppendorf Research (2,10, 20, 200, 1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH&Co.KG, Eberstadt
Real-Time PCR ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler, Titramax 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Serienschnittmikrotom, CM300 Kryostat	Leica Instruments GmbH, Nussloch, Jung
Sicherheitswerkbank Modell 51424/3	MDH Limited, Hampshire, UK
Test Tube Shaker VWR1719	VWR International GmbH, Darmstadt

Materialien und Methoden

Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International GmbH, Darmstadt
UV-Licht G 30 Watt Sylvana	Bauhaus, Hamburg
Vakuumkonzentrations-Zentrifuge, Concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer Merck Eurolab	Merck KGaA, Darmstadt
Vortexer	C. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Waage, Kern 440-51N, Messgenauigkeit 1 g	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Waage, OHAUS® Adventurer™ AR0640, Messgenauigkeit 0,1 mg	Ohaus GmbH, Giessen
Wasserbad Typ3048	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze/Hänigsen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Digifuge GL 2200	Heraeus Instruments GmbH, Hannover
Zentrifuge Megafuge 1.0 R /2.0 R Heraeus	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Zentrifuge, MiniSpin®Plus	Eppendorf AG, Hamburg

2.1.8 Software

Adobe® Acrobat® 8.0 Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe® Illustrator Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Adobe® Photoshop® 6.0 Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Axiovert 4.2 software (microscope) Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
AxioVision, Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
CellQuest Pro® v4.0.2 CellQuest. Software, BD, Heidelberg
Clone Manager 7.01 S & D Software, Cyry, NC, USA
GraphPad Prism 3.00, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
KCjunior. Data Analysis Software 1.41.8 BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
LSM 510 Meta 3.2 Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
LSM Image Browser Release 4.2 Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen
Microsoft® Excel, Version 2002 Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
Microsoft® Word, Version 2002 Microsoft Cooperation, Mountain View, CA, USA
PALM® RoboSoftware P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried
SDS 2.2.1 RQ Software Applied Biosystems, Darmstadt
SPSS® 12.0 G für Windows Version 12.0.1, SPSS Incorporated, Chicago, USA

2.1.9 Oligonukleotide

Oligoname	Sequenz 5' > 3'	Produkt (Bp)	Primer/Sonden Endkonz. [mM]	Accession Nummer
CD3ε for	ataggaaggccaaggccaag	145	0,5	NM_007648.3
CD3ε rev	tcagccagaatacaggtc		0,5	
CD11c for	ccactgtctgccttcatattc	96	0,5	NM_021334.2
CD11c rev	gacggccatggtctagag		0,5	
CD19 for	gaaaatgcagatgaggagctgg	145	0,5	NM_009844.1
CD19 rev	gctgcatagaggatccctctc		0,5	
CD49b for	gtggtaaacgaagtgcagaag	93	0,5	NM_008396 XM
CD49b rev	gatgtccacacgcagatcc		0,5	
CXCL9 for	ttgggcatcatcttctggag	72	0,9	NM_008599.3
CXCL9 probe	cttactactagggttctcgaactccacac		0,2	
CXCL9 rev	gcaggagcatcgtgcattc		0,9	
CXCL10 for	gagggccataggaagcttg	106	0,9	NM_021274.1
CXCL10 probe	catcgtggcaatgatctcaacacgtgg		0,2	
CXCL10 rev	cggattcagacatctctgctc		0,9	
EBI3 for	cagcagcctctagcctttg	157	0,9	NM_015766.2
EBI3 probe	ctgagcgaatcgtcaagccggaccctc		0,2	
EBI3 rev	gcggagtcggtacttgagag		0,9	
Gr-1 for	gcgttgctctggagatagaag	128	0,25	XM_909927.2
Gr-1 rev	cttcacgttgacagcattacc		0,25	
IFNγ for	gcaaggcgaaaaaggatgc	98	0,5	NM_008337.2
IFNγ rev	gaccactcggatgagctcattg		0,5	
IL2 for	tccccaggatgctcaccttc	98	0,5	NM_008366.2
IL2 rev	atgccgcagaggtccaag		0,5	
IL4 for	gagactcttcgggcttttcg	96	0,9	NM_021283.1
IL4 probe	cctggattcatcgataagctgcacatg		0,2	
IL4 rev	aggctttccaggaagtctttcag		0,9	
IL10 for	tccttggtgagaagctgaag	96	0,5	NM_010548.1
IL10 rev	caactgctccactgccttg		0,5	
IL12p40 for	gagcactccccattcctacttctc	140	0,5	NM_008352.2
IL12p40 rev	tgattggacttcggtagatgac		0,5	
IL27p28 for	catcttccaatgtttccctgac	82	0,5	NM_145636.1
IL27p28 rev	gtgtgtagcgaggaagcag		0,5	
KC for	cagaccatggctgggattc	142	0,9	NM_008176.2
KC probe	cctcgcgaccattcttgagtgtggctatgac		0,2	
KC rev	gaaccaaggagcttcag		0,9	
Klra-1 for	cagacctgccagagtccag	99	0,5	NM_016659.3
Klra-1 rev	aaccagcaactgtctgaagg		0,5	
Mac1 for	cttcacggcttcagatgac	109	0,5	NM_001082960.1
Mac1 rev	ctgaacagggatccagaagac		0,5	

Materialien und Methoden

Oligoname	Sequenz 5' > 3'	Produkt (Bp)	Primer/Sonden Endkonz. [mM]	Accession Nummer
MIP1 α for	cactctgcaaccaagtcttc	138	0,9	NM_011337.2
MIP1 α probe	ccatatggagctgacaccccgactgc		0,2	
MIP1 α rev	cacctggctgggagcaaag		0,9	
MLN51 for	ccaagccagccttcattcttg	134	0,9	NM_138660.2
MLN51 probe	cacgggaacttcgaggtgtgcctaac		0,2	
MLN51 rev	taacgcttagctcgaccactctg		0,9	
RANTES for	gctgcttgcctacctctcc	121	0,9	NM_013653.3
RANTES probe	caaacacgactgcaagattggagcac		0,2	
RANTES rev	cacactggcgggtccttcg		0,9	
CCL19 CW for	tgatgcggaagactgctg	67	0,9	NM_011888.2
CCL19 CW rev	ctttcacgatgttccaggg		0,9	
CCL21 CW for	aggcagtgatggaggggt	149	0,9	NM_011124.4
CCL21 CW rev	gcttagagtcttccggggtg		0,9	
CXCL13 CW for	catagatcggattcaagttacgcc	71	0,9	NM_018866.2
CXCL13 CW rev	tcttggccagatcacaacttca		0,9	

Alle verwendeten Oligonukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der S & D Software Clone Manager 7.01 entworfen und von den kommerziellen Herstellern biomers.net GmbH (Ebersberg) und MWG Biotech AG (Ulm) bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Tierversuche

2.2.1.1 Tiere

C57BL/6NCrl	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld
C57BL/6-Ly 5.1	Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld
LT β RKO	Prof. Dr. Klaus Pfeffer, TU München

2.2.1.2 Haltungsbedingungen

Für alle Versuche wurden weibliche Labormäuse der Stämme C57BL/6, C57BL/6Ly5.1, und Lymphotoxin- β -Rezeptor-Knockout (LT β R-KO) eingesetzt, die zwischen 8 und 14 Wochen alt waren. In Einzelfällen konnte ihr Alter jedoch bis zu 24 Wochen betragen. Die Versuchstiere der Stämme LT β R-KO und C57BL/Ly5.1 stammen aus eigener Zucht, die in der spezifischen pathogenfreien Barrierehaltung (SPF) der zentralen Tierhaltung der Universität zu Lübeck durchgeführt wurde. Bei diesen Stämmen wurden sowohl männliche und weibliche Tiere im Alter bis zu eineinhalb Jahren für die Versuche eingesetzt, nach Möglichkeit aber vor allem Tiere in einem Alter zwischen 10 bis 20 Wochen. Die Haltung erfolgte möglichst in Gruppen von 5-6 Tieren pro Käfig, um Einzelhaltung zu vermeiden. Eingesetzte Standardkäfige (425 x 266 x 155 mm) aus transparentem Polycarbonat mit Abdeckgittern aus Edelstahl (E. Becker & Co. GmbH, Castrop-Rauxel, Deutschland) wurden verwendet. Einstreu aus Holzspänen (Altromin GmbH, Lage, Deutschland) wurde wöchentlich gewechselt. Wasser und Standard-Pelletfutter (altromin 1430, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. In den klimatisierten Räumen wurde ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden (Hellphase 06:00 – 18:00 Uhr) eingehalten. Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche wurden die Tiere für die Versuche eingesetzt.

2.2.1.3 Tierversuchsgenehmigung

Die Durchführung der Versuche wurde vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein am 11.07.2007 unter dem Aktenzeichen V312-72241.1221-1 (53-5/07), Versuchsnummer 23/x/07 erteilt.

2.2.2 Applikations- und Messmethoden mit SRBC

2.2.2.1 Immunisierung mit SRBC

Die 50%ige Vollblut-Suspension von Schafblut in Alsever-Puffer wurden zweifach in 30 ml 0,9%iger Kochsalzlösung unter sterilen Bedingungen gewaschen, zentrifugiert (1400 x g, 7 min) und ausgezählt. Anschließend wurden die Erythrozyten in steriler Kochsalzlösung (0,9% NaCl) auf 1×10^9 oder 1×10^5 Zellen pro 200 μ l eingestellt. Die Tiere wurden etwa 3 bis 5 min unter Infrarotlicht gesetzt und anschließend immobilisiert. Jedes Tier erhielt eine Injektion von den in 200 μ l 0,9%iger Kochsalzlösung enthaltenen Erythrozyten intravenös in die Schwanzvene.

2.2.2.2 Injektion von Milzzellen-Homogenat und CFSE-markierten SRBC

Die Applikation erfolgte intravenös in die Schwanzvene. Die gewünschte Konzentration wurde in einem Volumen von 200 μ l appliziert (Durchführung siehe 2.2.2.1 Immunisierung mit SRBC).

2.2.2.3 Auslösung der DTH

Zur Auslösung der DTH wurde den Tieren 5 Tage nach der Immunisierung 1×10^9 SRBC in 40 μ l Kochsalzlösung subkutan in die rechte Fußsohle injiziert.

2.2.2.4 Bestimmung der DTH

Die Dicke des behandelten und unbehandelten Fußballens wurde vor Auslösung der DTH gemessen und 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Applikation (wenn nicht anders angegeben). Die Differenz zwischen beiden Messwerten in 0,1 mm-Einheiten ergab den Wert der DTH.

2.2.3 Operative Eingriffe an Mäusen

2.2.3.1 Entnahme von Organen und Haut

Die Eingriffe erfolgten unter sauberen, jedoch nicht sterilen Bedingungen in den für operative Eingriffe vorgesehenen Räumen der Tierhaltung. Die Tiere wurden durch Inhalation von CO₂ getötet. Die entnommenen Organe wurden entweder sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann in speziellen Kryoröhrchen bei -80°C eingelagert, in 4% PFA dunkel fixiert oder für weitere Untersuchungen in gekühltem RPMI 1640 auf Eis gelagert. Das Operationsbesteck wurde vor jedem Operationstag speziell gereinigt, um RNAsen zu entfernen und zwischen den Eingriffen an einzelnen Tieren mit 70%igem Ethanol gereinigt.

2.2.3.2 Splenektomie

Die operative Entfernung der Milz erfolgte in den Räumen der SPF-Haltung. Die Tiere wurden zunächst mit 150 µl Ketanest®S intraperitoneal narkotisiert und der Bauch mit 70%igem Ethanol eingesprüht und abgewischt. Die Haut wurde mit einer chirurgischen Pinzette angehoben und mit einer Schere etwa 1,5 cm unterhalb des Sternums ein kleiner Einschnitt gesetzt. Nach Öffnen der Haut konnte die Bauchmuskulatur mit Peritoneum gegriffen und ebenfalls eingeschnitten werden. Aus dem etwa 2 cm langen Einschnitt wurden die Magen und Milz verdeckenden Teile des Darms mit einer anatomischen Pinzette herausgezogen und abgelegt. Durch Anhebung des Magens folgte die Milz über die Verbindung durch das Ligamentum gastrosplenicum nach, welches milznah mit der Schere durchtrennt wurde. Die großen Gefäße der Milz wurden durch Elektroagulation verschlossen, durchtrennt und die Milz konnte entfernt werden. Nachfolgend wurden Magen und Darm reponiert. Die Bauchhöhle wurde mit resorbierbaren Polyglykolsäurefäden durchgetrennte, jeweils fortlaufende Nähte für Bauchmuskulatur und Haut verschlossen. Die Wunden wurden mit Sprühpflaster abgedeckt und die Tiere in die Haltungskäfige zurückgelegt.

2.2.4 Markierung von SRBC mit CFSE

1×10^9 oder 1×10^5 SRBC wurden aus der Vollblut-Suspension in Alsever-Puffer entnommen und nach Zugabe von 1 ml PBS 7min bei 400 x g bei 4°C in einem dunklen Reaktionsgefäß zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Reaktionsgefäße wurden bei 37°C vorgewärmt. 7,5 µl CFSE (5 mM in DMSO) wurde zu 1,5 ml PBS pipettiert. Diese 25 µM CFSE-Lösung wurde zu den SRBC pipettiert, das Pellet durch mehrfaches Invertieren gelöst und 30 min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Zweimaliges Waschen erfolgte mit PBS/ 1%FCS und Zentrifugation bei 400 x g bei 4°C. Die markierten SRBC wurden auf 200 µl PBS aufgefüllt und zügig appliziert. Der vollständige Arbeitsgang erfolgte möglichst unter Lichtausschluss um einen Fluoreszenzverlust zu verhindern.

2.2.5 Aufarbeitung von Milzzellen

2.2.5.1 Mechanischer Aufschluss von Milzhomogenat

Die Tiere wurden durch Inhalation von CO₂ getötet und die Milz entnommen. Mit Hilfe von zwei Pinzetten wurde die Milz in kleine Stücke zerzupft und in ein 100 µm feines Nylonsieb gegeben. Nach Zugabe von 2 ml eisgekühltem RPMI 1640 wurden die Zellen schonend homogenisiert und in 50 ml Falcon-Behältnis aufgefangen. Mit weiteren 2 ml wurde nachgespült. Das Homogenat wurde 7min bei 400 x g zentrifugiert und wieder sofort auf Eis gelagert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet wurde erneut vorsichtig in RPMI 1640 resuspendiert und bis zur weiteren Aufarbeitung auf Eis gelagert.

2.2.5.2 Enzymatischer Zellaufschluss: Kollagenaseverdau

Um einzelne Zellen aus dem Gewebeverband der Milz zu isolieren, wurde zunächst die Milz entnommen (siehe 2.2.3.1 Entnahme von Organen und Haut), mit zwei Pinzetten in kleine Stücke gezupft und in 7,5 ml eines auf 37°C vorgewärmten RPMI-Puffers gegeben, der bereits 40 mg gelöste Kollagenase D enthielt. Es folgte eine Inkubation von 30 min schüttelnd bei 37°C im Wasserbad. Um den enzymatischen Aufschluss des Milzgewebes voranzutreiben, wurde fortlaufend der Puffer mit dem darin befindlichen Gewebe mit einer Plastikblutpipette durchmischt. In den letzten 5 min der

Inkubationszeit wurden 1,5 ml EDTA Puffer langsam eingetroppt. Die verbleibenden Gewebereste und die Zellsuspension wurden über ein 100 µm Nylonnetz gegeben und homogenisiert. Zentrifugation bei 200 x g, 10 min folgte. Der Überstand wurde verworfen. Erythrozytenlyse wurde durchgeführt (siehe 2.2.5.3 Erythrozytenlyse) mit anschließendem Waschschrift in 10 ml Kollagenase Waschpuffer (Zentrifugationseinstellungen, siehe oben). Die Resuspension der Einzelzellsuspension erfolgte in MACS Puffer und wurde bis zur weiteren Analyse auf Eis gelagert.

2.2.5.3 Erythrozytenlyse

Um Erythrozyten aus dem Milzhomogenat zu entfernen, wurde es im 20fachen Volumen Schwingerlyse vorsichtig resuspendiert und 10 min auf Eis gelagert, gelegentlich wurde invertiert. Eine anschließende Zentrifugation bei 1100 x g für 10 min folgte. Der Überstand wurde verworfen und das gereinigte Zellpellet im gewünschten Puffer resuspendiert.

2.2.5.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl von Schafererythrozyten und Lymphozyten wurde mit der Neubauer (improved) Zählkammer bestimmt. Die Zahl vitaler Lymphozyten wurde mittels Trypanblau-Exklusion bestimmt.

2.2.6 Histologische Methoden

2.2.6.1 Kryosektion

Um die Morphologie, das Ausmaß der Proliferation und die Lokalisation von SRBC in der Milz zu bestimmen, wurden immunhistologische und fluoreszenzgefärbte Gefrierschnitte hergestellt. Dazu wurden entnommene Organe und Haut bei -22°C auf einem Objektisch in Einbettmedium fixiert und mit einem Serienschnittmikrotom 14µm dick geschnitten. Die Gefrierschnitte wurden entweder im Ganzen in ein Reaktionsgefäß mit 700 µl Lysispuffer überführt oder einzeln auf einfache Objektträger (Immunhistologie, Fluoreszenzfärbung) bzw. Folienobjektträger (für Mikrodissektion) aufgebracht und zwei Stunden bei Raumtemperatur (für Fluoreszenzfärbung zusätzlich im Dunkeln) getrocknet. Die mit Puffer lasierten

Schnitte wurden eine Minute gevortext, abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren. Die Folienobjektträger wurden mit Toluidinblau gefärbt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren. Die anderen Objektträger wurden immunhistologisch oder fluoreszenzgefärbt.

2.2.6.2 Färbungen

Für die histologischen Färbungen kamen die in 2.1.2 aufgeführten Antikörper zur Anwendung. Antikörper wurden in der Regel in TBS-Tween angesetzt, Ausnahmen sind gekennzeichnet. Fast Red und Fast Blue wurden in APAAP-Substrat angesetzt. Spülschritte mit TBS-Tween und die Färbungen mit Fast Red oder Fast Blue wurden schüttelnd durchgeführt, Inkubationen mit Antikörpern erfolgten in der dunklen Feuchtkammer.

Toluidinblau

Für die Mikrodisektion wurde der Folienobjektträger Toluidinblau gefärbt. Dazu wurde das Präparat zwei Minuten in 75% Ethanol fixiert, dann zwei Minuten in DEPC-Wasser gespült und schließlich für 10 min mit 0,1% Toluidinblau inkubiert. Anschließend wurde zweimal 15 sek in DEPC-Wasser schwenkend gespült und erneut zweimal für 15 sek schwenkend in 100% Ethanol entwässert. Nach kurzem Trocknen wurde das Präparat bei -80°C eingefroren.

MOMA-1/B220

Zur eindeutigen Identifikation der Marginalzone und der Follikel in der Milz wurde ein weiterer Glasobjektträger mit anti-MOMA-1 (färbt die Marginalzonen metallophilen Makrophagen) und anti-B220 (B-Zellrezeptor) gefärbt. Dazu wurde der Objektträger bei -20°C in Methanol/Aceton (1:1, v/v) fixiert und nachfolgend zweimal für 5 min gespült. Der biotinylierte Primärantikörper gegen MOMA-1 (1:500) wurde dunkel inkubiert (1 h), der Objektträger dann gespült und 30 min mit ExtrAvidin®-Peroxidase (1:100) inkubiert. Der Objektträger wurde erneut gespült, 5 min mit Diaminobenzyl (DAB) die Farbreaktion fand statt und es wurde zweimal gespült. Für die nachfolgende B220-Färbung wurde zunächst 1 h mit anti-CD45R/B220 (1:100) inkubiert, dann gespült (10 min). Nun wurde der Objektträger mit dem biotinylierten polyklonalen Antikörper (bRAR) (1:500 mit 5% Mäuseserum) 30 min inkubiert. Die

Objektträger wurden mit ExtraAvidin®-Alkaliner Phosphatase markiert (1:100) (30 min) und die Farbentwicklung mit Fast Blue (25 min) dargestellt. Zwischen den Inkubationen wurde 10 min gespült. Die Präparate wurden mit Aquatex® eingedeckt.

MOMA-1/SAV-555 (Fluoreszenzfärbung)

Um Milzschnitte von CFSE-markierten Tieren genauer hinsichtlich der Lokalisation der markierten SRBC zu untersuchen, wurden dazu 12 µm dicke Milz-Schnitte auf Glasobjektträger aufgebracht. Die Fixierung als auch die Inkubation von MOMA-1 wurde wie bei der MOMA-1/B220 Färbung durchgeführt. Es wurde nachfolgend gespült. Dann wurde sofort ein Inkubationsschritt mit dem fluoreszierenden Streptavidin, Alexa Fluor® 555 (SAV-555) für eine Stunde durchgeführt. Optional wurde nach weiterem Spülen eine Färbung mit dem fluoreszierenden Hoechstfarbstoff (Invitrogen, Deutschland) angeschlossen, der die Markierung von Zellkernen ermöglicht (1:10000) (5 min). Die Schnitte wurden anschließend mit Mowiol eingedeckelt und getrocknet, Lichteinfluss sollte bei allen Schritten so minimal wie möglich gehalten werden. Alle Waschschriffe erfolgten 10 min. Die Verdünnungen wurden in TBS-Tween angesetzt.

Ki67/B220

Zur Bestimmung proliferierender T-Zellen in der T-Zellzone als auch der Ermittlung der Keimzentrengröße wurde Ki67, ein Protein, das während aller Phasen des aktiven Zellzyklus exprimiert wird, angefärbt.

Die Objektträger wurden aufgetaut (10 min) und fixiert: Chloroform (10 min, Raumtemperatur (RT)), Aceton (10 min, RT), spülen (2x 5 min) und abschließend 4% Paraformaldehyd (PFA) (45 min, 4°C). Der Anti-Ki67-Antikörper wurde über Nacht inkubiert (RT) (1:100 in PBS-1%BSA-0,1%NaN₃). Die Objektträger wurden in biotinyliertem polyklonalem Antikörper (bRAR) (1:500 mit 5% Mäuseserum) (30 min) inkubiert und dann mit ExtraAvidin®-Alkaliner Phosphatase markiert (1:100) (30 min). Für die Farbentwicklung (Ki67) wurde Fast Red (25 min) eingesetzt. Für die B220-Färbung wurde zunächst 1 h anti-CD45R/B220 (1:100 in PBS-1%BSA- 0,1%NaN₃), dann mit bRAR (1:500 mit 5% Mäuseserum) (30 min) inkubiert. Die Markierung der Objektträger erfolgte mit ExtraAvidin®-Alkaliner Phosphatase (1:100) (30 min) und

die Farbentwicklung wurde mit Fast Blue (25 min) dargestellt. Zwischen den Inkubationen wurde 10 bis 15 min gespült. Die Präparate wurden mit Aquatex® eingedeckt.

2.2.6.3 Auswertung Histologie

Die Auswertung der immunhistologisch gefärbten Schnitte erfolgte unter dem Lichtmikroskop, die der Fluoreszenz-gefärbten Schnitte mittels Laserfluoreszenzmikroskopie.

Die Auswertung der Ki67-Färbung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Dazu wurden die proliferierenden Zellen in der PALS auf einer Fläche von 100 Kleinquadraten ($81000 \mu\text{m}^2$) durch Zählen ermittelt.

2.2.7 Molekularbiologische Methoden

2.2.7.1 Lasermikrodissektion

Durch den Vergleich von immunologisch B220/MOMA-1 gefärbten mit Toluidin-gefärbten Kryostatschnitten konnten Marginalzone, PALS und Follikel sowie die Rote Pulpa eindeutig voneinander unterschieden werden. Die einzelnen Kompartimente konnten mit der PALM® RoboSoftware markiert werden und anschließend mit dem gepulsten, ultravioletten Laser der Mikrodissektionsanlage ausgeschnitten werden ($3,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). Die ausgeschnittenen Gewebestücke wurden durch den Laser in die, mit inertem Mineralöl benetzte, Verschlusskappe des Reaktionsgefäßes katapultiert. Die Probe wurde dann durch Zugabe von 350 μl Lysispuffer und einminütigem Vortexen aufgeschlossen und denaturiert, gefolgt von Abzentrifugieren zum Einfrieren der Probe bei -20°C .

2.2.7.2 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Aus den Proben wurde die vollständige RNA mit dem innuPREP RNA Mini Kit (Analytik Jena AG, Jena) isoliert. Dazu wurden die in 350 μl Lysis-Puffer RL lysierten Proben für 1 min gevortext und dann 10 sek zentrifugiert. Anschließendes mehrmaliges Aufziehen der Proben mit einer Einwegspritze lässt die genomische DNA scherem. Nach Zugabe von Ethanol (70%) im Verhältnis 1:1 (v/v) wurde die Probe verdünnt, um später eine bessere Bindung der Nukleinsäure an der Säule zu erzielen.

Das Gemisch wurde über eine Spin Filter R Säule im Receiver-Tube gegeben und für 2 min bei 10000 x g zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Aufeinander folgend wurde mit 500 µl Washing Solution HS sowie 700 µl Washing Solution LS jeweils 1 min bei 10000 x g gewaschen und das Filtrat verworfen. Abschließend wurde die Säule für 2 min bei 10000 x g getrocknet. Die Eluierung der RNA aus der Säule erfolgte mit 60 µl DEPC-H₂O für 1 min bei 6000 x g in einem 1,5 ml Elutions-Tube, dessen Deckel vorher viermal mit einer Nadel durchstoichen wurde. Das erste Eluat wurde ein zweites Mal über die Säule gegeben, um die DNA/RNA-Konzentration um 15-30% zu erhöhen. Die Säule wurde nun verworfen und das Eluat für 20-24 min bei 60°C in der Vakuumzentrifuge auf 8 µl reduziert.

Die so vorbereiteten Proben wurden mit je 1 µl 10xDNase-Puffer und DNase-I-Enzym [1 U/µl] versetzt und 15 min bei 20°C inkubiert, um die verbliebene genomische DNA zu verdauen. Nach Zugabe von 1,5 µl Stop-Solution [15 mM] wurde für 10 min auf 70°C erhitzt und damit der Verdauungsprozess beendet und Sekundärstrukturen denaturiert. Auf Eis wurden der Probe 8,5 µl des Master-Mixes für Reverse Transkriptase zugesetzt. Die Ansätze wurden aufeinander folgend für 10 min bei 25°C (Bindung des Random-Primers), 50 min bei 42°C (Reverse Transkription der mRNA in cDNA) und 15 min bei 70°C (Reaktionsstopp) inkubiert. Für die Lagerung bis zur Durchführung der Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurden die cDNA-Proben bei -20°C eingefroren.

2.2.7.3 Quantitative Real-Time (RT)-PCR

Die qRT-PCR wurde mit dem ABI PRISM® 7900 Sequence Detection System durchgeführt. Zur Detektion des PCR-Produkts dienten hierbei zum einen der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SybrGreen I und zum anderen Sonden mit dem Signalfluorochrom Fluorescein (FAM, Emission: 520 nm) und dem Quencherfluorochrom Tetramethylrhodamin (TAMRA). Die für die Zytokine, Chemokine, Zellmarker und das House Keeping Gen MLN 51 verwendeten Primer und SONDENSEQUENZEN (Clone Manager 7.01, S & D Software, Cary, NC, USA), sowie die Fragmentgrößen der PCR-Produkte sind in 2.1.9 Oligonukleotide aufgeführt. Für die Bestimmung in der PCR wurden 0,625 µl der cDNA-Probe mit einfachem qPCR MasterMix und 2 µl Primer-(Sonden)-Mix pro 20 µl Reaktionsansatz eingesetzt. Die

verwendeten Konzentrationen von Sense- und Antisense-Primern und der zugehörigen Sonden können aus 2.1.9 Oligonukleotide entnommen werden. Es wurde jeweils eine Doppelbestimmung von jedem cDNA-Ansatz in der PCR durchgeführt. Das Programm begann mit einem 10-minütigen Schritt bei 95°C, zur Aktivierung der Polymerase, gefolgt von 50 Zyklen mit 45 sek 95°C (Aufschmelzen der cDNA-Doppelstränge) und einer 1-minütigen Abkühlungsphase bei 60°C (Anlagerung von Primern und Sonden, sowie der Strangverlängerung durch die Polymerase). Die Datenerfassung erfolgte im 60°C Schritt. Ein zusätzlicher Dissoziationsschritt (95°C/15 sek, 60°C/15 sek, 95°C/15 sek) am Ende der Zyklen war bei Verwendung von SybrGreen zur Bestimmung der produkt-spezifischen Schmelztemperatur notwendig. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der ABI PRISM® 7900 und der SDS 2.2.2 RQ Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), um den *ct* (Cycle of threshold) für jede Probe zu bestimmen. Die Expression der untersuchten mRNA wurde dann für jede Probe mit der Formel:

$$2^{-(ct \text{ Zytokin} - ct \text{ MLN51})}$$

in Kopien pro Kopie MLN51 umgerechnet. Lag der erreichte *ct* für MLN51 über 37, wurden diese Werte von der Auswertung ausgeschlossen. Eine zuverlässige Auswertung ist in diesem Detektionsbereich in diesem System nicht mehr sichergestellt. Werte, die als nicht detektierbar eingestuft wurden, sind in den Abbildungen auf Null gesetzt. Methodische und präparative Schwankungen der erhobenen Daten lassen sich nicht vermeiden und können in der PCR zu einer Differenz von einem *ct* führen, was der Verdopplung der cDNA-Menge entspricht, deshalb werden bis zu zweifache Veränderungen der mRNA-Expression bezüglich des Kontrollwertes als nicht relevant angesehen.

2.2.8 Statistische Auswertung

Bei Überprüfung der Daten auf Gaußsche Normalverteilung (KOLMOGOROFF-SMIRNOV Test) ergaben sich für die hier dargestellten Befunde keine signifikanten Abweichungen. Die Darstellung der Daten erfolgte deshalb in Form von Mittelwert und Standardabweichung oder Standardfehler. Aufgrund der teilweise kleinen

Stichprobengröße wurden dennoch ausschließlich nicht-parametrische Testverfahren für die Analyse herangezogen. Beim Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde der MANN-WHITNEY U-Test als Folgetest herangezogen und bei abhängigen Stichproben der WILCOXON-Test durchgeführt. Innerhalb der Abbildungen wurde zwischen $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) als Signifikanzniveau unterschieden. Alle statistischen Tests wurden mit dem Programm GraphPad Prism 3 oder SPSS® 12.0G für Windows (Version 12.0.1, SPSS Incorporated) durchgeführt.

2.2.9 Immunologische Methoden

2.2.9.1 SRBC-spezifischer Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der Nachweis von Gesamt-IgG im Serum von SRBC-injizierten Mäusen wurde mit Detergenzien aus einem Quantifizierungskit der Firma Bethly durchgeführt. Dazu wurden 96-Well Flachbodenmikrotiterplatten mit 1×10^8 SRBC/ 100 μ l PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Um das Anhaften der SRBC an den Seitenwänden zu verhindern, wurde die Platte kurz anzenrifugiert und die SRBC vorsichtig resuspendiert. Am nächsten Tag erfolgte fünfmaliges Waschen (zweimal mit 300 μ l, dann mit 200 μ l ELISA Waschpuffer) gefolgt von einem Blockierungsschritt für 1 h mit 200 μ l ELISA Blockpuffer. Anschließend wurde dreimal mit 200 μ l ELISA Waschpuffer gewaschen. Das Auftragen von 100 μ l Serumprobe folgte (eingesetzte Verdünnungsstufen: 1:100, 1:500, 1:2500, 1:12500 in ELISA Probenpuffer) und Inkubation für 1 h. Danach wurde fünfmal gewaschen bevor 100 μ l des an Horse raddish peroxidase (HRP) gekoppelten Sekundärantikörpers für 1 h aufgetragen wurden. Nach fünfmaligem Waschen wurde der ELISA mit 100 μ l TMB entwickelt und die Farbreaktion mit weiteren 100 μ l 20%iger Schwefelsäure gestoppt. Die photometrische Auswertung der Farbreaktion erfolgte bei 450 nm.

Zur Auswertung wurde die 1:500 Verdünnung herangezogen, weil hier im Gegensatz zur 1:100 Verdünnung die Messwerte noch nicht im Sättigungsbereich der Farbreaktion lagen. Um Messungen verschiedener Platten und Messtage miteinander vergleichen zu können, wurden zur Normierung der Messdaten pro Platte sowohl

naives als auch infiziertes (von MHV-erkrankten mit SRBC injizierten 10d-Tieren) Referenzserum eingesetzt. Die OD-Werte wurden mit Hilfe folgender Formel normiert:

$$\frac{OD_{\text{Probe}} - OD_{\text{Referenz naiv}}}{OD_{\text{Referenz infiziert}} - OD_{\text{Referenz naiv}}}$$

Für das naive als auch das infizierte Referenzserum wurde das Serum von jeweils 6 Tieren gepoolt.

2.2.9.2 Durchflusszytometrie

Um den Verbleib an intravenös-injizierten SRBC zu verfolgen, wurden SRBC mit CFSE markiert (Durchführung siehe 2.2.4 Markierung von SRBC mit CFSE) und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 min, 1 h) der Prozentsatz an fluoreszierenden SRBC in Blut und Milzhomogenat im Durchflusszytometer verfolgt. Als Negativkontrolle wurde Blut und Milzhomogenat aus NaCl-injizierten Tieren verwendet. Zusätzlich wurde die Konzentration an CFSE-markierten SRBC titriert (10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9), um die Detektionsgrenze der Konzentration an fluoreszierenden SRBC zu bestimmen. Es wurde eine Gesamtanzahl von 50000 Ereignissen, in dem auf SRBC gesetzten Gate, analysiert. Anschließend wurde der Prozentsatz an CFSE-positiven SRBC ermittelt.

2.2.9.3 Magnetic Adhesion Cell Sorting (MACS)

Um eine Einzelzellsuspension aus Milzgewebe (Herstellung siehe 2.2.5.1) in ihre einzelnen Zelltypen zu separieren (Durchführung für B-Zellen, Makrophagen und Dendritische Zellen), wurde zunächst die Zellzahl bestimmt und auf eine Endkonzentration von 1×10^7 Zellen/MACS-Ansatz eingestellt. Nun erfolgte die magnetische Markierung mit Microbeads (CD19, CD11b, CD11c) nach Herstellerangaben von Miltenyi Biotec. Alle weiteren Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4°C durchgeführt, Inkubationen im Kühlschrank. Zur magnetischen Separation der einzelnen Zelltypen wurde der Midi MACS-Säulhalter und LS-Säulen verwendet (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Nach dem Herausspülen der positiven Zellpopulation wurde dessen Zellzahl ermittelt und die gewünschte

Materialien und Methoden

Zellkonzentration bei 200 x g, 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 700 µl Lysis-Puffer resuspendiert und bis zur Isolation der RNA bei -20°C eingefroren.

3 Ergebnisse

T-zellabhängige Immunantworten induzieren bei Einsatz unterschiedlich hoher Antigen-Dosis verschiedene Immunantworten. Mit dem Modell der delayed type hypersensitivity (DTH) konnte dies bereits in den 70iger Jahren mit dem Einsatz unterschiedlicher Schaferythrozyten-Dosen als Modell-Antigen gezeigt werden. Bei einer intravenösen Schaferythrozyten-Applikation entwickeln primär Niedrigdosis (ND)-injizierte Tiere nach sekundärer SRBC-Hochdosis in die Fußsohle eine lokale DTH-Reaktion als zelluläre Immunantwort. Bei primär Hochdosis (HD)-injizierten Tieren bleibt diese Reaktion in der Haut aus. Es entsteht eine humorale Antwort bei der Keimzentren und erhöhte Antikörpertiter im Blutserum nachzuweisen sind. Analysen von Milon und Kaufmann haben gezeigt, dass dabei abhängig von der applizierten SRBC-Konzentration zwei verschiedene T-Helfer-Zellpopulationen entstehen.^{78, 115} Die eine zirkuliert und kann nach zweitem SRBC-Kontakt die lokale DTH-Reaktion in der Haut auslösen. Hingegen entsteht nach SRBC-Hochdosis Applikation eine Population, die nicht zirkuliert und eine DTH verhindert. In dieser Arbeit soll aufgeklärt werden, warum ausschließlich abhängig von einer 10000-fach höheren SRBC-Dosis verschiedene Th-Zellpopulationen generiert werden. Dies soll anhand der Zytokin- und Chemokinexpression in den einzelnen Kompartimenten der Milz und der Haut gezeigt werden.

3.1 Reproduktion des SRBC-spezifischen DTH-Modells

Zunächst war es das Ziel die typischen Ergebnisse des SRBC-abhängigen DTH-Modells in unserem Tiermodell zu etablieren und unter Anpassung der verschiedenen Parameter zu reproduzieren. Primär wurden dazu Mäuse mit einer Niedrigdosis (1×10^5 SRBC) oder Hochdosis (1×10^9 SRBC) intravenös in die laterale Schwanzvene injiziert (Abb. 3-1A). Nach Injektion der SRBC gelangten diese über das Blut direkt in die Milz, welches für sie das einzige zu erreichende sekundär-lymphatische Organ ist. Dort wurden sie am ersten „Checkpoint“ von Antigen-präsentierenden Zellen phagozytiert und prozessiert, anschließend als T-zellabhängiges Antigen naiven T-Zellen

präsentiert, die wiederum aktiviert wurden.⁴² Fünf Tage nach der intravenösen SRBC-Applikation wurde die DTH mit einer Dosis von 1×10^9 SRBC subkutan in der rechten Fußsohle ausgelöst (Abb. 3-1A). Dann wurde alle 24 Stunden die Differenz der Fußdicke zwischen dem rechten injizierten und dem linken nicht-injizierten Fußballen ermittelt (Abb. 3-1B, C).

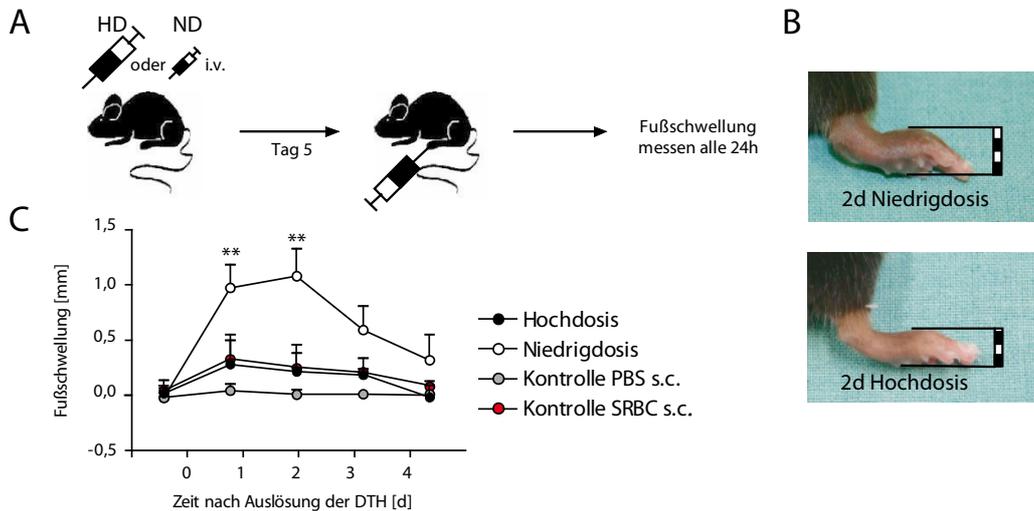


Abb. 3-1 Fußschwellung nach Auslösung der DTH-Reaktion

Dargestellt ist die Ausprägung der DTH-Reaktion nach subkutaner SRBC-Injektion in die Fußsohle.

A: Applikationsschema der SRBC-Injektion. B: die gemessene Fußschwellung an Tag 2 nach s.c. Injektion von SRBC ist im Niedrigdosis-Tier höher (Abb. oben) als im Hochdosis-Tier (Abb. unten). C: zeitlicher Verlauf der Fußschwellung nach s.c. SRBC-Injektion, dargestellt sind Mittelwerte + Standardabweichung (SD), n= 6-9, Kontrollen n= 3 (Werte von Tag 3 und 4 sind Mittelwerte von den Tagen 0 – 2), Mann-Withney-U *p<0,5, **p<0,01.

Eine signifikante Fußschwellung war in den ersten zwei Tagen nach Auslösung der DTH (subkutaner Injektion) nur in primär ND-injizierten Tieren vorhanden. Die maximale Fußschwellung wurde an Tag 2 erreicht (Abb. 3-1B). Hingegen in HD-injizierten Tieren wurde keine DTH-Reaktion induziert. Sie hatten im Vergleich zu den Kontrolltieren, die entweder nur s.c. mit PBS injiziert wurden oder ausschließlich eine s.c. SRBC-Injektion erhielten, keine signifikant erhöhte Fußschwellung ausgebildet. Die Reproduktion der Ergebnisse war somit erfolgreich. ND-injizierte Tiere entwickelten eine DTH-Reaktion, HD-Tiere hingegen nicht.

3.1.1 SRBC-Hochdosis induziert Keimzentrenformation in der B-Zellzone und erhöhte IgG-Mengen im Serum von Hochdosis-Tieren

Wird eine T-zellabhängige humorale Immunantwort durch SRBC induziert, kommt es in der B-Zellzone zu vermehrter Aktivierung und Proliferation von B-Zellen, die dabei am zweiten „Checkpoint“ durch Kontakt mit aktivierten T-Zellen am Rand der B-Zellzone aktiviert wurden.⁴² Die darauf folgende Proliferation Antigen-spezifischer B-

Zellen findet in den primären Lymphfollikeln (der B-Zellzone) dem dritten „Checkpoint“ unter der Bildung von Keimzentren statt. Quantitative Daten zur Entwicklung von Keimzentren fehlen jedoch bis heute in dem hier verwendeten DTH-Modell. In dieser Arbeit wurde deshalb die prozentuale Vergrößerung der Keimzentren im Vergleich zur Gesamtfläche der Follikel nach primärer ND- und HD-Gabe betrachtet. Die deutlichen Unterschiede in der Keimzentrumsformation nach SRBC-Applikation sind in Abb. 3-2A gezeigt.

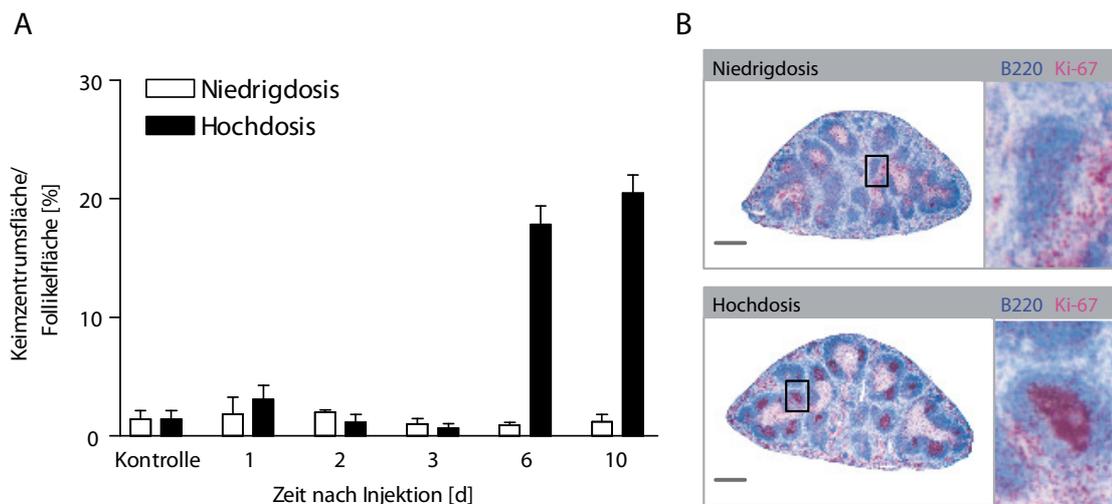


Abb. 3-2 Keimzentrumsformation in den Follikeln der Milz

Gezeigt ist die Ausbildung der Keimzentrumsfläche A: nach primärer i.v. HD- oder ND-Applikation, angegeben in % der Follikelgesamtfläche als Mittelwert + SD, n = 6 und B: 12µm dicke Milzquerschnitte, Ki-67/B220 gefärbt, oben: ND-Tier, unten: HD-Tier (Tag 10 nach primärer Applikation), grauer Balken entspricht 1mm.

In ND-Tieren wurden keine Keimzentren ausgebildet (Abb. 3-2A, B oben). Nur in HD-injizierten Tieren hat sich ab Tag 6 eine erhöhte Anzahl an Keimzentren ausgebildet. Dieses wurde auch besonders am Milzschnitt eines 10 d HD-injizierten Tieres in Abb. 3-2B (unten) deutlich.

Humorale Immunantworten führen im Gegensatz zu zellulären Antworten zur Antikörperbildung, wobei es zur Bildung von Immunglobulinen durch die Aktivierung von B-Zellen kommt und im weiteren zu ihrem Isotypwechsel von IgM zu IgG. Aus Studien von Temple *et al.* weiß man bereits, dass es nach Applikation von SRBC-HD zu einer schnellen IgM-Bildung nach Applikation kommt (erreichen nach 5 Tagen ihr Maximum).¹⁶⁵ Auch Daten aus hämatolytischen Plaque-Assays, die die Menge an Plaque-formenden Zellen (PFC) messen, sind vorhanden.⁵⁸ Für eine genaue und effiziente Endpunktbestimmung wurde hier deshalb die relative Konzentration von

Gesamt-IgG im Blutserum primär injizierter Tiere im SRBC-spezifischen ELISA detektiert und in Relation zum Serum aus Kontrolltieren betrachtet. ND-Tiere zeigten keine vom Kontrollserum abweichend erhöhten IgG-Werte (Abb. 3-3), HD-injizierte Tiere hingegen erreichten in Relation zum Kontrollserum 5, 6 und 10 Tage nach primärer Injektion eine signifikant erhöhte Konzentration an IgG im Serum (Abb. 3-3).

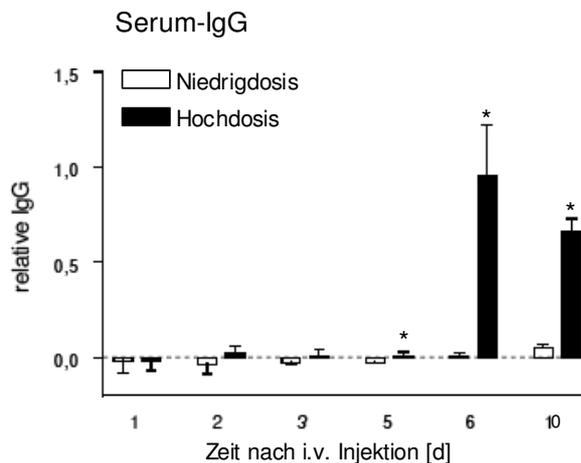


Abb. 3-3 Relative IgG-Mengen im Blutserum

Dargestellt sind relative IgG-Gesamt mengen im Serum von ND- oder HD-injizierten Tieren im Vergleich zu einem Serumpool aus NaCl-injizierten Kontrolltieren. Die Serumentnahme erfolgte nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach primärer SRBC-Injektion, n= 3-6, dargestellt sind Mittelwerte + SD, Mann-Whitney-U * p<0,05.

Diese erzielten Werte korrelierten mit den an Tag 6 und 10 entstandenen Keimzentren in HD-Tieren. Neben den bekannten qualitativen Daten konnten mit der hier gemessenen Keimzentrumsvergrößerung und der Gesamt-IgG Endpunktbestimmung im Blutserum, die deutlich erhöhten Werte in HD-Tieren nach 6 d und 10 d gezeigt werden.

3.1.2 Starke Erhöhung der IL-2 Expression und Proliferation in der T-Zellzone Hochdosis-injizierter Tiere

Da für die Auslösung T-zellabhängiger Immunantworten viele T-Helfer-Zellen benötigt werden, wurde nachfolgend untersucht, ob es dosisabhängig Unterschiede in der T-Zellproliferation gab. Wie bereits in 3.1 gezeigt, induzierte eine ND-Applikation nach Auslösung der DTH eine zelluläre Immunantwort, dabei ging man davon aus, dass auch vermehrt T-Zellen in der Milz dieser Tiere proliferierten. Dieses sollte in der T-Zellzone der Milz, als einziges erreichbares sekundär lymphatisches Organ für die SRBC, nachgewiesen werden.

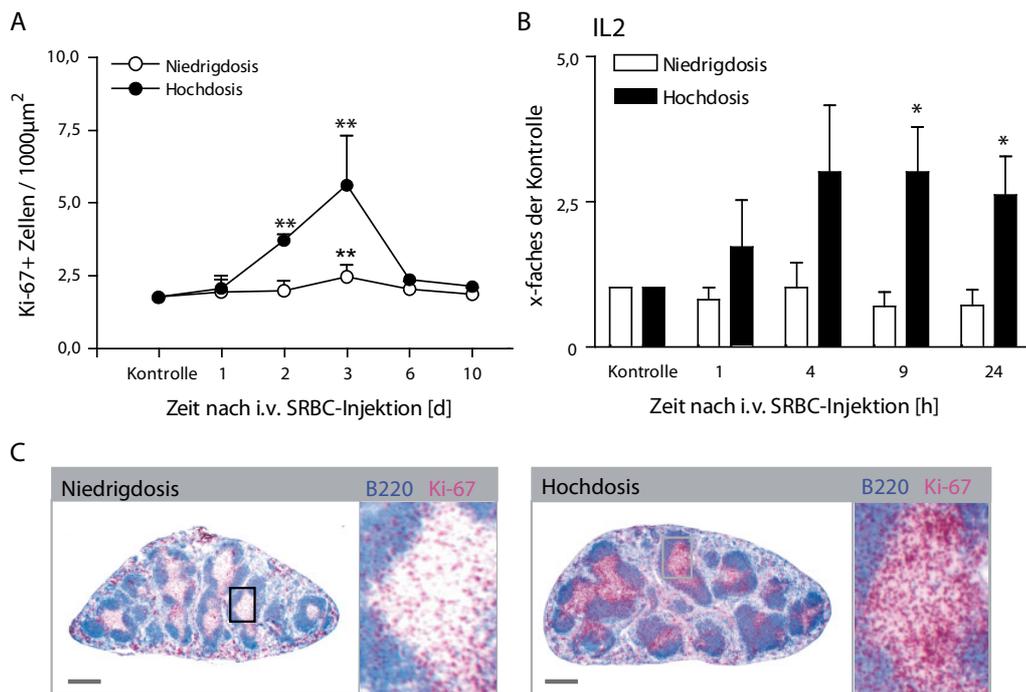


Abb. 3-4 Proliferation und IL2 Expression in der T-Zellzone nur in HD-injizierten Tieren stark erhöht

Dargestellt sind die T-Zellproliferation und die IL2-Expression in der T-Zellzone. A: Proliferation in der T-Zellzone, ermittelt wurde die Anzahl an Ki-67+ Zellen/1000µm² in diesem Bereich, Mittelwerte + SD, n= 3-6. Signifikanzen wurden zwischen ND- und HD ermittelt, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01 (und ***p<0,01 zwischen Kontrolle und ND). B: IL-2 mRNA-Expression in der T-Zellzone, dargestellt als x-fache Expression der Kontrolle, Mittelwerte + SD, n=5-6, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01 zur Kontrolle. Unter C sind 12µm dicke Milzschnitte aus ND- und HD-injizierten Tieren an Tag 3 dargestellt, B220/Ki-67 gefärbt, verwendete Objektiv-Vergrößerung 1,25x, grauer Balken 1mm.

Bis heute gibt es keine quantitativen Daten der T-Zellproliferation im murinen SRBC-abhängigen DTH-Modell, deshalb wurde hier zunächst die Anzahl an proliferierenden Zellen in der T-Zellzone ermittelt. Dazu wurden Ki-67-positive Zellen auf 12 µm dicken Milzschnitten ausgezählt (Abb. 3-4A). Bei ND-Tieren kam es ausschließlich an Tag 3 nach intravenöser Applikation zu einer signifikant erhöhten Anzahl proliferierender Zellen in der T-Zellzone im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 3-4A und C). HD-Tiere hatten bereits nach 2 d eine signifikant erhöhte Anzahl an proliferierenden Zellen in der T-Zellzone, welches ihr Maximum an Tag 3 erreichte (Abb. 3-4A und C). Nach 6 d war die Proliferationsstärke in HD-Tieren wieder auf Kontrollniveau herabgefallen (Abb. 3-2A).

Auch über die frühe mRNA-Expression von IL2, einem T-Zellwachstumsfaktor, der in der T-Zellzone eine wesentliche Rolle bei der Induktion der T-Zellproliferation spielt, gibt es bisher keine Daten. Die Ergebnisse in Abb. 3-4B zeigten, dass in der T-Zellzone von ND-Tieren keine erhöhte IL2 mRNA-Expression nachweisbar war. In HD-Tieren

hingegen konnte eine signifikante Erhöhung der IL2-Expression nach 9 h und 24 h detektiert werden. Nur in HD-Tieren waren demnach naive T-Zellen durch Antigenkontakt und Zytokinexpression aktiviert worden. Eine klonale Expansion von T-Zellen wurde in diesen Tieren eingeleitet. Diese Ergebnisse zeigten wider Erwarten, dass es in ND-Tieren nur in einem geringen Ausmaß zur Proliferation von T-Zellen kam, dieses konnte anhand der Anzahl Ki-67 positiver Zellen in der T-Zellzone und der nicht erhöhten IL2-Expression gezeigt werden. Die klonale Expansion von T-Zellen hatte nur in kleinem Umfang stattgefunden (nach 3 d). Im Gegensatz dazu standen die Ergebnisse der HD-Tiere. Bei ihnen konnte eine starke IL2-Expression und auch massive T-Zellproliferation in der T-Zellzone nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass der gewünschte Effekt des DTH-Versuchs in dieser Arbeit reproduziert werden konnte. ND-Tiere induzierten nach Auslösung der DTH eine Fußschwellung 1-2 Tage nach subkutaner SRBC-Applikation. Darüber hinaus konnten hier durch die Vermessung der Keimzentrengröße und der Bestimmung der relativen IgG-Blutserumkonzentrationen nach primärer HD-Applikation auch neue qualitative Ergebnisse in Mäusen mit diesem System gezeigt werden, dass HD-Injektion zu einer humoralen Immunantwort führt. Große Keimzentren entstanden nach 6 bis 10 Tagen sowie signifikant erhöhte IgG-Konzentrationen. Im Gegensatz dazu zeigten ND-injizierte Tiere weder Keimzentrenformation noch vom Kontrollniveau abweichende IgG-Konzentrationen im Blutserum. Erstmals haben auch die qualitative Analyse der T-Zellproliferation und der IL2-Expression gezeigt, dass es nur in HD-Tieren zu einer deutlich erhöhten Proliferation und einer vorgelagerten IL2-Expression in der T-Zellzone dieser Tiere kam. In ND-Tieren war nur an Tag 3 eine leicht erhöhte T-Zellproliferation zu verzeichnen.

3.2 Regulation der Immunantwort in der Milz

Die Ergebnisse aus 3.1 haben gezeigt, dass sowohl die B-Zellzone als auch die T-Zellzone entscheidende Areale sind, in denen T-zellabhängige Immunantworten abhängig vom intravenös applizierten Antigen unterschiedliche Immunantworten initiieren. Da es nach ND-Applikation nur zu einer schwachen T-Zellproliferation kam, wurden in diesen Tieren wahrscheinlich zu wenig T-Zellen für die Induktion von

Keimzentren aktiviert, nach HD hingegen proliferierten sehr viele T-Zellen, die die Unterdrückung der DTH bedingen könnten. Die Expression unterschiedlicher Zytokine bestimmt die Differenzierung in verschiedene Th-Zellpopulationen, demzufolge induziert eine ND-Applikation zelluläre Th1-Zellen, die bei erneutem Antigenkontakt in der Haut eine Th1-vermittelte DTH-Reaktion auslösen. In HD-injizierten Tieren hingegen werden vermutlich die vielen aktivierten T-Zellen zu Th2-Zellen, die Keimzentren und die Produktion von Immunglobulinen durch die Aktivierung von B-Zellen induzieren (Abb. 3-2 und Abb. 3-3), sowie für die Unterdrückung der lokalen DTH-Reaktion verantwortlich sein könnten. Da es bisher keine *in vivo*-Daten über die lokale Zytokin- und Chemokin-Regulation in den verschiedenen Kompartimenten der Milz nach primärer Applikation gibt, die die Th-Zelldifferenzierung dokumentiert, wurde zunächst die mRNA-Expression typischer Th1- und Th2-Zytokine und Chemokine in den Kompartimenten der Milz analysiert. Dabei sollte herausgefunden werden, ob deren Expressionsstärke dosisabhängig variiert.

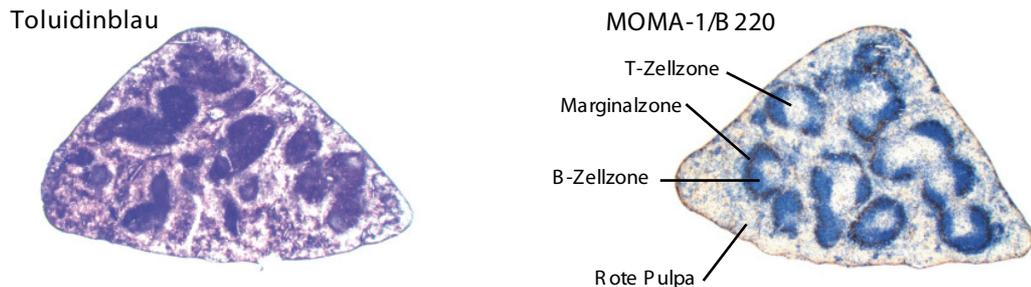
3.2.1 Differenzierung der einzelnen Kompartimente der Milz

Eine genaue Differenzierung der nach SRBC-Gabe entstehenden T-Zellpopulationen durch Analyse der Zytokin- und Chemokin-mRNA in der murinen Milz gibt es bis dato nicht. Bisher war dieses nur nach Zellisolation und *in vitro*-Stimulation möglich. Damit hier eine separate Analyse der einzelnen Kompartimente erfolgen kann, ist es besonders wichtig, dass die einzelnen Kompartimente präzise voneinander getrennt werden, ohne dabei die Mikroarchitektur der Milz zu zerstören. Dazu wurde die Methode der Lasermikrodissektion eingesetzt, die ein exaktes Ausschneiden der Kompartimente ermöglichte. Zur Überprüfung der Sensitivität dieser Methode wurden zunächst ausschließlich Kontrolltiere analysiert. Nach Lasermikrodissektion erfolgte eine quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR). Um einzelne Kompartimente auf einem Milzschnitt zu differenzieren, wurden zunächst parallele Färbungen mit MOMA-1/B220 und Toluidinblau angefertigt (Abb. 3-5A). Visuell konnten auf den MOMA-1/B220-Schnitten deutlich die braun-angefärbten Marginalzonen metallophilen Makrophagen (MOMA-1), die den inneren Rand der Marginalzone auskleiden, von denen in blau angefärbten B220-markierten B-Zellen getrennt werden

Ergebnisse

(siehe Abb. 3-5A, rechts). Dieses Vorgehen ermöglichte nicht nur die Abgrenzung der Marginalzone, sondern auch die Unterteilung in T- und B-Zellzone. Zum anderen wurde als Kontrolle auf den Toluidinblau-gefärbten Schnitten das T-Zellareal vom B-Zellareal und der Marginalzone durch die dort entsprechend erhöhte Expression von CD3 ϵ (Teil des TCR, T-Zellzone) und CD19 (als Untereinheit des BCR, B-Zellzone) durch ihre Expressionsstärke voneinander abgegrenzt (Abb. 3-5B).

A



B

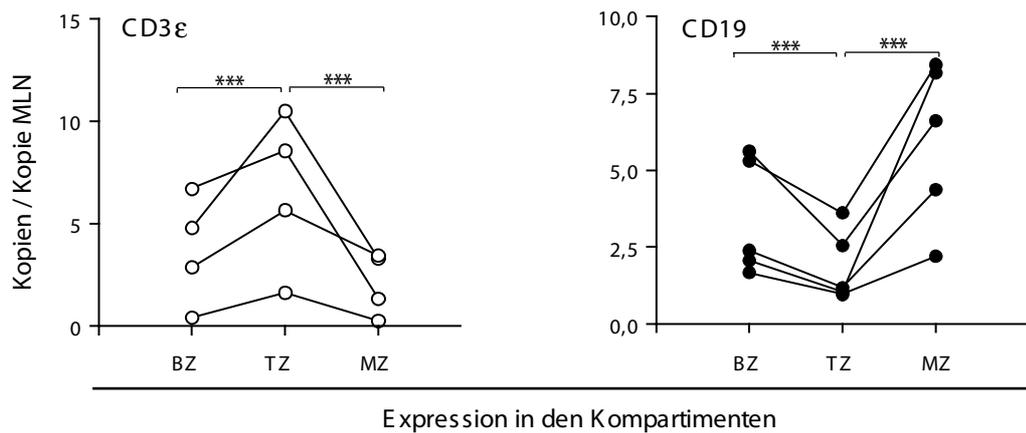


Abb. 3-5 Lasermikrodissektion ermöglicht die saubere Trennung der einzelnen Kompartimente

Dargestellt sind in A: mit dem Kryostaten geschnittene 12 μ m dicke Milzschnitte, links: Toluidin gefärbt, rechts: MOMA-1/B220 gefärbt. Verwendete Objektiv-Vergrößerung ist 1,25x. Darunter sind die Ergebnisse einer qRT-PCR aus einzelnen Kompartimenten gezeigt. B: CD3 ϵ und CD19 mRNA-Expression in B-Zellareal (BZ), T-Zellareal (TZ) und Marginalzone (MZ) von Kontrolltieren, verbundene Einzelwerte gehören je zu einem analysierten Tier, Wilcoxon-Test ***p<0,001.

Die Expression von CD3 ϵ war signifikant in der T-Zellzone erhöht gegenüber der B-Zellzone und Marginalzone. CD19 zeigte eine signifikant höhere Expression in der B-Zellzone als in der T-Zellzone, aber in der Marginalzone war die Anzahl an B-Zellen vergleichsweise am Höchsten. Dort befanden sich besonders viele Marginalzonen-B-Zellen. Diese Untersuchung hat ergeben, dass das Ausschneiden der einzelnen Kompartimente korrekt stattgefunden hat.

3.2.2 Kompartimentspezifische Expressionsunterschiede von Zytokinen und Chemokinen in naiven Kontrolltieren

Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob bereits in nicht SRBC-applizierten Kontrolltieren, die ausschließlich eine intravenöse Injektion mit 0,9%iger Natriumchloridlösung erhielten, Expressionsunterschiede von Zytokinen und Chemokinen zwischen den einzelnen Kompartimenten detektiert werden konnten. Bei ihrer Analyse wurden die einzelnen Kompartimente in folgender Reihenfolge untersucht: Rote Pulpa, Marginalzone, T-Zellzone und B-Zellzone (RP, MZ, TZ, BZ). Untersucht wurden IL12p40, das von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen und Dendritischen Zellen (DCs) exprimiert wird und eine CD4⁺ T-Zelldifferenzierung zu Th1-Zellen induziert. Als zweites Th1-typisches Zytokin wurde IFN γ untersucht, das von Th1-Zellen nach Differenzierung exprimiert wird und besonders die Phagozytoseaktivität von Makrophagen unterstützt. Es wurden zwei weitere Zytokine untersucht. IL10 als regulatorisches Zytokin, das der Makrophagenaktivität entgegenwirkt und IL4, als typisches Th2-Zytokin, welches zur Aktivierung von B-Zellen benötigt wird und zur Ausbildung einer humoralen Immunantwort beiträgt (Abb. 3-6A, Zytokine). Neben den genannten Zytokinen wurde auch die Expression dreier Chemokine untersucht (Abb. 3-6A, Chemokine). CCL21, das unter anderem von fibroblastisch retikulären Zellen (FRCs) in der T-Zellzone exprimiert wird und eine effektive Interaktion zwischen Dendritische Zellen (DCs) und T-Zellen ermöglicht. Als zweites Chemokin wurde CCL19 untersucht, welches auch für die Chemoattraktion von T-Zellen verantwortlich ist und von DCs der T-Zellzone aber vor allem von dort befindlichen Stromazellen sekretiert wird.¹⁰³ Als drittes wurde die Expression des Chemokin-Liganden CXCL13 analysiert. Er wird auf follikulär Dendritischen Zellen (FDCs) im Follikel exprimiert, sorgt für die vollständige Abwanderung von follikulären T-Helferzellen (T_{FH}) und B-Zellen in die B-Zellzone einiger sekundär lymphatischer Organe, darunter die Milz.^{48, 103, 120} Diese Chemokine haben einen indirekten Effekt auf die T-Zelldifferenzierung, indem sie auf die Zytokinexpression oder Wanderung von APCs einwirken.¹⁰² Die Expression aller genannten Zytokine und Chemokine wurde in Kopien pro Kopie des eingesetzten Housekeeping-Gens MLN51 (Metastatic lymphnode 51) gemessen, dass in allen Geweben in gleicher Stärke exprimiert wird. Aus Abb. 3-6A wird ersichtlich, dass die

Ergebnisse

Expression von Zytokinen im Vergleich zu Chemokinen um ein 10-100 faches geringer war. Betrachtet man die Expression der Zytokine wird deutlich, dass es auch hier bereits in Kontrolltieren deutliche Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen einzelnen Zytokinen im gleichen Kompartiment gab. Besonders hervorzuheben ist der signifikante Expressionsunterschied zwischen IL12p40 und IL10 in MZ, TZ und BZ.

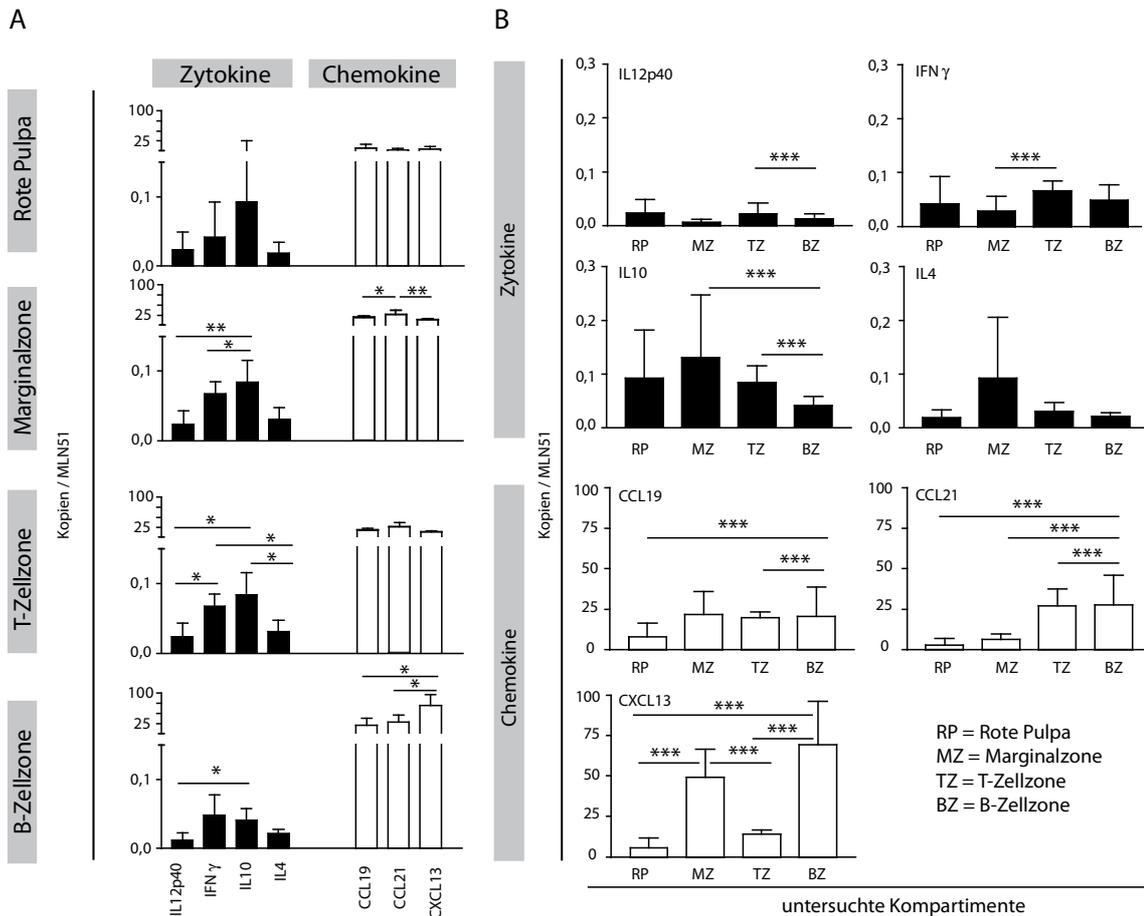


Abb. 3-6 Expressionslevel von Zytokinen und Chemokinen in einzelnen Kompartimenten naiver Kontrolltieren

Gemessen wurde die Expression von einzelnen Zytokinen und Chemokinen in Kopien/MLN51 vergleichsweise zwischen den untersuchten Zytokinen und Chemokinen sowie in den einzelnen Kompartimenten. Neben den Zytokinen IL12p40, IFN γ , IL10 und IL4 wurde auch die Expression der T- und B-Zellzonen Chemokine CCL19, CCL21 und CXCL13 analysiert. Aufgetragen sind in A: von oben nach unten die Expressionswerte in den einzelnen Kompartimenten. In B: wurden Einzelwerte eines Zytokins oder Chemokins zwischen den einzelnen Kompartimenten verglichen, dargestellt sind Mittelwerte + SD, n=4-5, Signifikanzen wurden zwischen Einzelwerten gleicher Tiere in unterschiedlichen Kompartimenten bestimmt, Wilcoxon-Test ***p<0,001.

Auch zwischen der Expression der Chemokine in einzelnen Kompartimenten gab es signifikante Unterschiede. Es fällt besonders der signifikante Unterschied in der B-Zellzone zwischen CXCL13 und den beiden T-zelltypischen Chemokinen CCL19 und CCL21 auf. Betrachtet man nur die Expression eines einzelnen Zytokins oder Chemokins bestanden auch Unterschiede in der Expressionsstärke zwischen den

einzelnen Kompartimenten (Abb. 3-6B). Die Th1-typischen Zytokine IL12p40 und IFN γ wurden in Kontrolltieren signifikant in der T-Zellzone erhöht exprimiert. Die Expression von IL10 war überraschenderweise nicht in der B-Zellzone, sondern in der Marginalzone am Stärksten exprimiert. Die geringste Expressionsstärke wurde in der B-Zellzone gefunden. Korreliert man die Expressionsstärke der Th1-typischen Chemokine CCL19 und CCL21 zwischen den einzelnen Kompartimenten, wird deutlich, dass es innerhalb eines Tieres in der T-Zellzone höher als in der B-Zellzone exprimiert wurde. Das Th2-typische CXCL13, das für die Abwanderung von Lymphozyten in die B-Zellzone verantwortlich ist, zeigte eine signifikant erhöhte Expressionsstärke in den B-zellreichen Kompartimenten (B-Zellzone und Marginalzone).

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Grundzustand ohne SRBC-Applikation in Kontrolltieren die Expression aller untersuchten Zytokine und Chemokine nachzuweisen war. Chemokinen wurden dabei deutlich höher exprimiert als Zytokine. Die Th1-typischen Zytokine IL12p40 und IFN γ , sowie das chemoattraktive CCL19 und CCL21 der T-Zellzone wurden grundsätzlich in der T-Zellzone höher exprimiert als in den B-Zellarealen (B-Zellzone und Marginalzone). Dieses galt für CXCL13 *vice versa*. IL10 hingegen, als Th2-Zytokin, wurde im Grundzustand ausschließlich in der Marginalzone, jedoch nicht in der B-Zellzone, als B-zellreiches Areal, deutlich erhöht exprimiert. Bei IL4 kam es kompartimentspezifisch zu keiner erhöhten Expression.

3.2.3 Niedrigdosis-Tiere zeigen keine Th1-induzierende Zytokinexpression

Nachfolgend sollte nun die Zytokinexpression nach SRBC-Applikation untersucht werden, zunächst in ND-injizierten Tieren. Es wurden dazu Tiere in einer zeitlichen Kinetik von 1 h bis zu 144 h nach primärer intravenöser SRBC-Applikation untersucht. Zurückgreifend auf die Fragestellung, gehen wir davon aus, dass nach ND-Applikation in der Milz ein Th1-Milieu entsteht, das bei einer weiteren SRBC-Injektion in der Fußsohle zu einer Th1-vermittelten DTH-Reaktion führt. Somit wird eine erhöhte Expression der Th1-induzierenden Zytokine IL12p40 und IFN γ , die bekannterweise für die Auslösung einer zellulären Immunantwort mit verantwortlich sind, erwartet.

Betrachtet man die Ergebnisse der Th1-typischen Zytokine IL12p40 und IFN γ nach primärer intravenöser ND-Applikation (Abb. 3-7, Th1) in der Roten Pulpa, war keine signifikant erhöhte Expression im untersuchten Zeitraum bis zu 144 h nach Injektion zu verzeichnen. Gleiches galt für die Th2-typischen Zytokine IL10 und IL4, was bei der Induktion einer zellulären Immunantwort auch nicht erwartet wurde.

Auch bei der Untersuchung der Expression in der Marginalzone ließ sich bei keinem der Zytokine eine erhöhte Expression nachweisen. Zu beachten ist jedoch, dass es nach 9 h bei IL12p40 und nach 72 h bei IL10 zu einer signifikant reduzierten Expressionsrate in der Marginalzone kam (Abb. 3-7, Marginalzone). Sie könnte auf die Abwanderung von Zellen in diesem Bereich zurück zu führen sein. Entgegen der Erwartungen konnte keine erhöhte Expression von IL12p40 oder IFN γ in der T-Zellzone detektiert werden (Abb. 3-7, T-Zellzone), auch nicht nach Einsetzen der T-Zellproliferation nach 72 h. Die Analyse der Th2-typischen Zytokine in diesem Kompartiment zeigte erneut eine reduzierte Expressionsrate nach 9 h bzw. 24 h, diesmal für IL10. Abschließend wurde die B-Zellzone untersucht. Unabhängig vom untersuchten Zytokin, wurde auch hier kein Expressionsanstieg detektiert. Die erhöhten Werte von IFN γ in der Roten Pulpa und Marginalzone, von IL10 nach 9 h in der Marginalzone, sowie IL4 nach 4 h in der B-Zellzone (Abb. 3-7, Th1 und Th2), waren ausschließlich auf die starke Schwankungen einzelner Werte zurück zu führen.

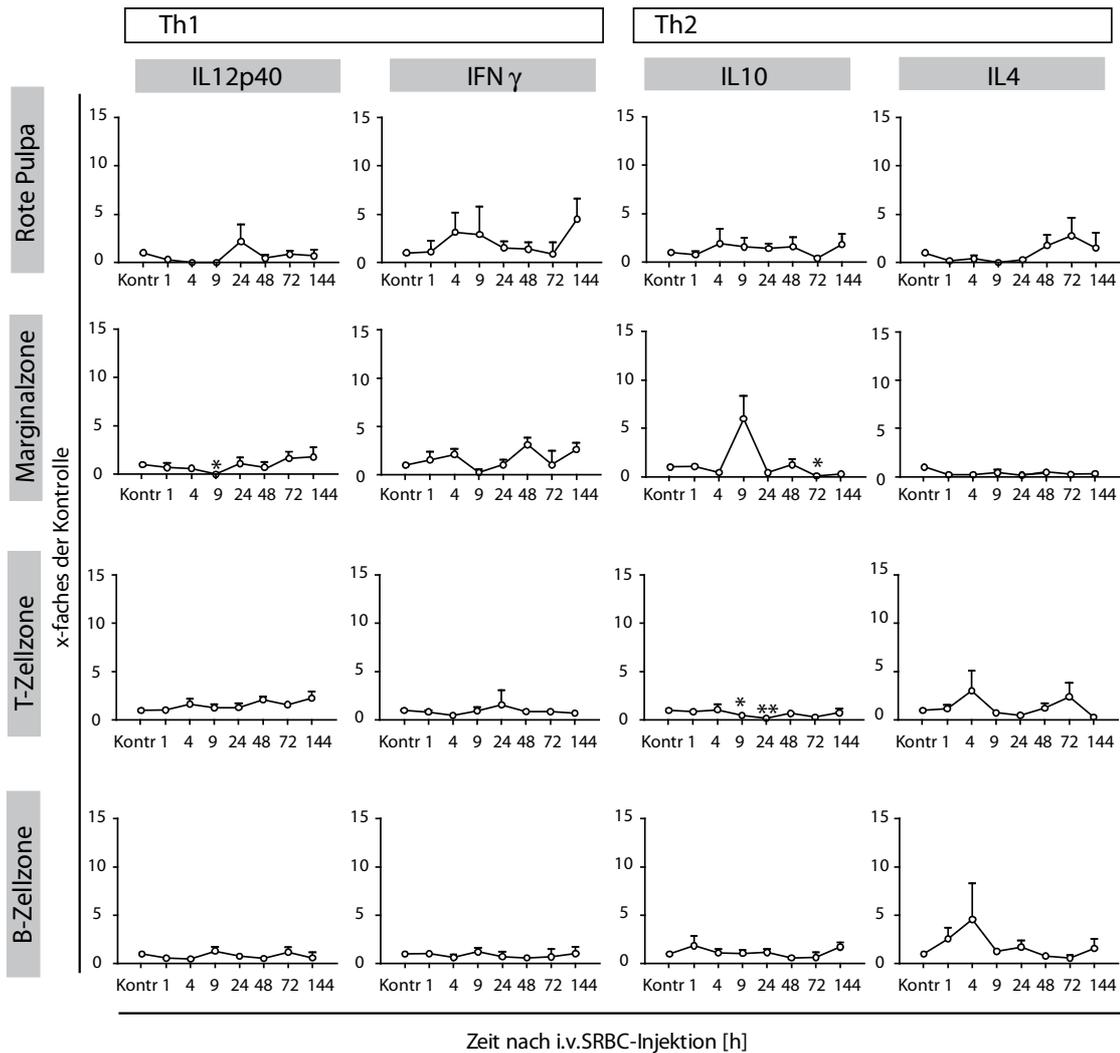


Abb. 3-7 SRBC-Niedrigdosis induziert keine eindeutige Th1-Zytokinexpression

Die Untersuchung der mRNA-Expression (IL12p40, IFN γ , IL10, IL4) erfolgte in primär ND-injizierten Tieren. Kontrollen erhielten NaCl (Kontr), gemessen wurde das x-fache der Kontrolle, Mittelwerte + SD, n=5-6, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ermittelt zur Kontrolle.

Obwohl unterschiedliche Expressionsstärken der untersuchten Zytokine im Ruhezustand (in Kontrolltieren) mit Hilfe der sehr sensitiven Methode der Lasermikrodissektion messbar waren (Abb. 3-6), konnten in ND-injizierten Tieren keine erhöhten Expressionswerte detektiert werden. Die Th1-induzierenden Zytokine IL12p40 und IFN γ wurden in ND-Tieren nicht erhöht exprimiert. Durch die Induktion der zellulären Immunantwort nach ND-Applikation müssten aber Th1-Zellen entstanden sein. Die hier verwendete Methode war demnach nicht sensitiv genug, um die Expression von Th1-Zytokinen zu erfassen. Das signifikant reduzierte Expressionsniveau von IL12p40 und IL10 in der Marginalzone und der T-Zellzone

gaben einen Hinweis darauf, dass es zu einer Abwanderung von Zellen in diesen Kompartimenten gekommen sein könnte. Im nächsten Schritt wurden nun die entsprechenden Proben aus HD-injizierten Tieren untersucht.

3.2.4 Hochdosis-Applikation induziert frühe Th1- und späte Th2-Zytokinexpression

Um auf Zytokinebene zu bestätigen, dass eine humorale Immunantwort durch die Expression der Th2-typischen Zytokine IL10 und IL4 initiiert wurde, untersuchten wir die SRBC-HD-injizierten Tiere hinsichtlich ihrer Zytokinexpression in den einzelnen Kompartimenten (Roter Pulpa, Marginalzone, T-Zellzone und B-Zellzone). Zunächst wurden, wie bei ND-injizierten Tieren, die Zytokine IL12p40 und IFN γ als Th1-Zytokine analysiert. Die Expression von IL12p40 in der Roten Pulpa war nach 4 h signifikant zur Kontrolle erhöht (Abb. 3-8, Th1). Die erhöhten Werte der IFN γ -Expression in der Roten Pulpa waren auf eine starke Schwankungsbreite der einzelnen Werte zurück zu führen und nicht signifikant. Auch die IL12p40-Expression in der Marginalzone führte zu einem unerwarteten Ergebnis. Nach 1 h war die Expression von IL12p40 (Abb. 3-8, Th1) signifikant erhöht. Dieser Expressionsanstieg fiel langsam in den folgenden Stunden bis 24 h wieder ab. Im Gegensatz dazu kam es bei IFN γ zu keinem signifikanten Anstieg, weder in der Marginalzone, noch in einem der anderen Kompartimente im untersuchten Zeitraum. In der T-Zellzone setzte sich die erhöhte Expression von IL12p40 fort. Dort hielt die signifikant erhöhte Expression bis zu 24 h nach HD-Injektion an und dessen Expressionsmaximum wurde nach 9 h erreicht. In der B-Zellzone kam es zu keinem erhöhten IL12p40-Anstieg (Abb. 3-8, B-Zellzone).

Als nächstes wurde die Expression der Th2-typischen Zytokine IL10 und IL4 analysiert (Abb. 3-8, Th2). Die IL10-Expression war 4 h nach Injektion signifikant in der Roten Pulpa erhöht, aber war vorher bereits nach 1 h in der Marginalzone signifikant hoch reguliert. In der T-Zellzone war keine erhöhte IL10-Expression im untersuchten Zeitraum zu verzeichnen. In der B-Zellzone war zwischen 4 h und 9 h eine signifikant erhöhte IL10-Expression zu messen. Zum Schluss wurde die Expressionsstärke von IL4 betrachtet (Abb. 3-8, Th2). Die erhöhten Werte in Roter Pulpa, T-Zellzone und B-Zellzone nach 1 h, waren durch die Schwankungsbreite einzelner Werte entstanden,

Ergebnisse

aber nicht signifikant. Ganz im Gegenteil kam es nach 4 h in Marginalzone und B-Zellzone, als B-zellenreiche Kompartimente, zu einer signifikanten Expressionsreduktion. Eine Abwanderung von Zellen ist zu vermuten. Nach 72 h war IL4 in B-Zellzone aber auch T-Zellzone signifikant erhöht. Das spricht neben der erhöhten Expression von IL10 in der B-Zellzone für die Induktion der erwarteten Th2-Antwort.

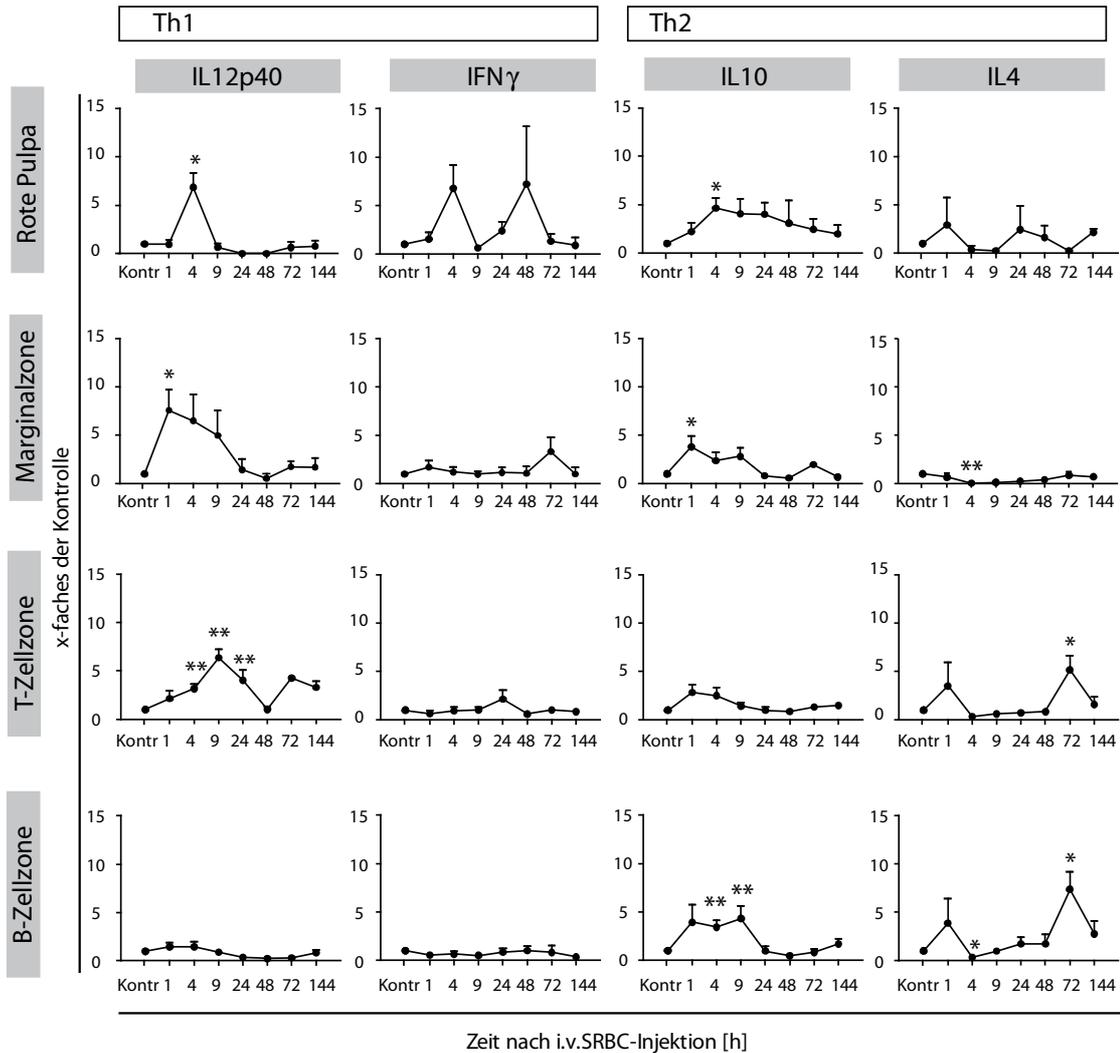


Abb. 3-8 Hochdosis-injizierte Tiere induzieren die Expression von Th1- und Th2-typischen Zytokinen

Die Untersuchung der mRNA-Expression (IL12p40, IFN γ , IL10, IL4) erfolgte in primär HD-injizierten Tieren. Kontrollen erhielten NaCl (Kontr), gemessen wurde das x-fache der Kontrolle, Mittelwerte + SD, n=5-6, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ermittelt zur Kontrolle.

Fasst man die Ergebnisse der Zytokinexpression in HD-Tieren zusammen, wird deutlich, dass die induzierte humorale Antwort in diesen Tieren (siehe 3.1.1) nicht einfach auf die ausschließliche Expression Th2-typischer Zytokine zurück geführt werden konnte. Die Zytokinexpression, die in diesen Tieren zu einer humoralen Antwort führte, ist differenzierter zu betrachten. Es kam zu einer frühen Th1-typischen Expression von IL12p40 in Marginalzone, Roter Pulpa und T-Zellzone und einer späten Th2-typischen Expression von IL4 in T- und B-Zellzone. Es wäre also möglich, dass die frühe Th1-typische Expression zur Bildung von Th1-Zellen führt, die späte Th2-typische Expression hingegen zu Th2-Zellen und somit zwei unterschiedliche T-Zellpopulationen in diesen Tieren differenzieren. Dass jedoch keine DTH-Reaktion ausgelöst wurde und stattdessen Keimzentren und Antikörper entstanden sind, könnte mit der bereits früh einsetzenden parallelen Expression von IL12p40 und IL10 zusammenhängen (Abb. 3-8, Marginalzone). Um herauszufinden, von welchen Zellen diese Zytokine nach 1 h in der Marginalzone exprimiert wurden und sich damit gegenseitig beeinflusst haben, wurde eine magnetische Adhäsions-Zellseparation und Durchflusszytometrie-Analyse durchgeführt.

3.2.4.1 Frühes IL12p40 und IL10 wird von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert

Zur Analyse der Zelltypen, die 1 h nach HD-Applikation in der Marginalzone eine erhöhte IL12p40- und IL10-Expression induzierten, wurde das vollständige Milzhomogenat aus 1 h-HD-Tieren und Kontrolltieren mit Kollagenase verdaut und so die verschiedenen Zelltypen (wie z.B. Lymphozyten, Dendritische Zellen, Makrophagen) aus dem Gewebeverband isoliert. Diese wurden anschließend durch magnetische Adhäsions-Zellseparation (MACS) voneinander getrennt. Es bestand die Vermutung, dass es sich bei dem IL10-exprimierenden Zelltyp um Marginalzonen-B-Zellen handeln könnte. Daraufhin erfolgte das magnetische Behaften mit B-Zellenspezifischen Beads (CD19 beads). Einzelne B-Zellen konnten mit dieser Methode mit einem hohen Reinheitsgrad aus der Milzzellensuspension in einer Positiv-Fraktion von dem Rest (Negativ-Fraktion) getrennt werden. Zur Überprüfung des Reinheitsgrades der MACS-Methode wurde exemplarisch die Aufreinigung von der CD19-positiven B-Zellfraktion durch Messung im Durchflusszytometer (FACS) an einem Kontrolltier untersucht (Abb. 3-9A, obere Reihe).

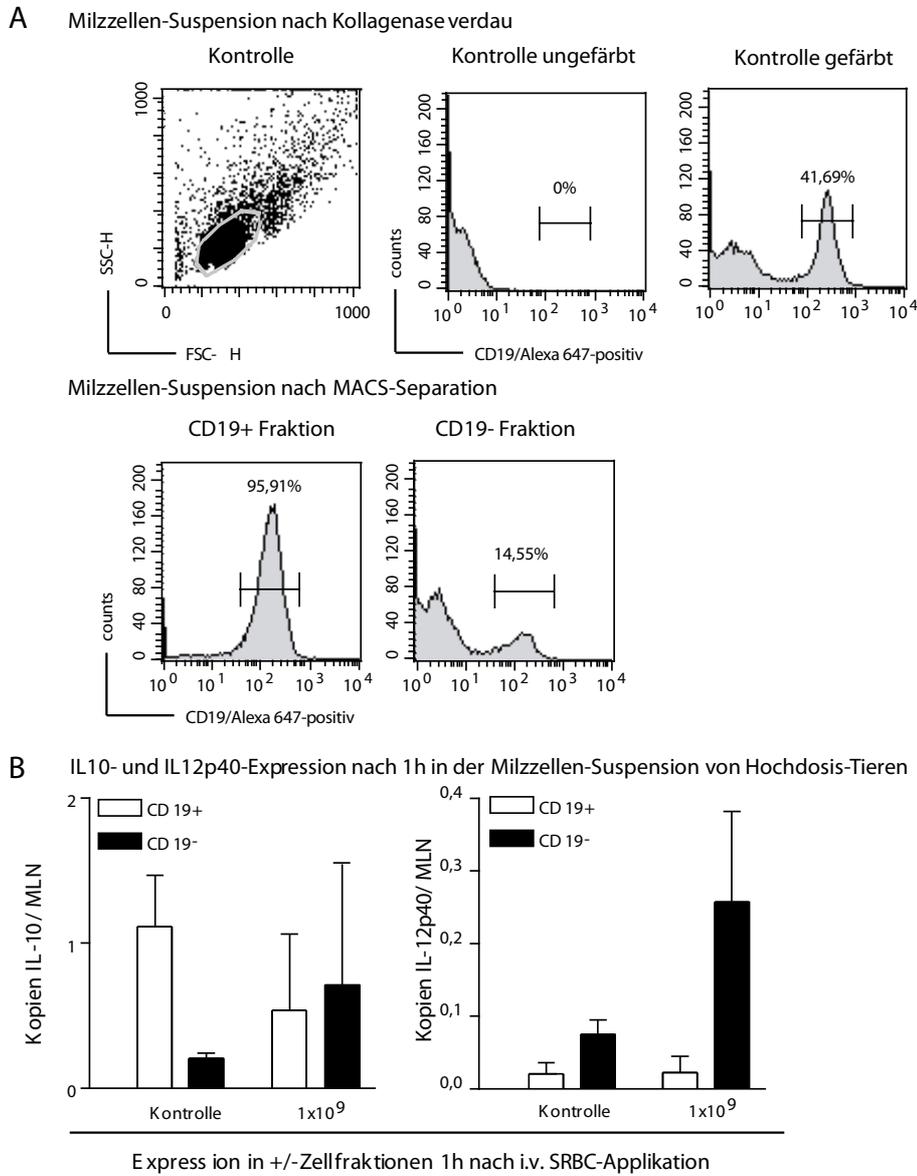


Abb. 3-9 Das MACS ermöglicht die Analyse der IL12p40- und IL10-produzierenden Zelltypen.

Gezeigt sind A: Exemplarische FACS-Ergebnisse einer B-Zellen-Isolation aus Milzzellen-Homogenat eines NaCl-injizierten Kontrolltieres mittels Kollagenaseverdau (obere Reihe) und anschließender MACS-Separation (untere Reihe), oben: Punkt-Wolken-Diagramm: Milzzellensuspension-Gesamtzellenpopulation mit dem definierten Messbereich (grau) für Lymphozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen (dargestellt sind 20% der im Messbereich untersuchten 50000 Ereignisse), Histogramme: ungefärbte Kontrolle, gefärbte Kontrolle (CD19/Alexa 647); unten: Histogramme: links CD19-pos. Fraktion nach MACS-Separation (CD19/Alexa 647) und rechts CD19-neg. Fraktion (CD19/Alexa 647).

B: Dargestellt sind Ergebnisse der IL10- und IL12p40-Expression aus einer qRT-PCR von Zellfraktionen aus NaCl-Kontrolltieren oder 1x10⁹ SRBC-injizierten Tieren, die 1h nach i.v. HD-Applikation entnommen wurden. Das Homogenat wurde nach Entnahme mit Kollagenase verdaut und durch MACS-Separation mit magnetischen CD19-neg. Beads in pos. und neg. Zellfraktionen aufgetrennt. CD19: Mittelwerte + SD, n = 3.

Die Reinheit von 41,69%, direkt nach dem Kollagenaseverdau, konnte auf 95,91% in der Positiv-Fraktion nach MACS-Separation erhöht werden (Abb. 3-9A, untere Reihe). Nach der Separation wurden die beiden einzelnen Zellfraktionen in einer qRT-PCR mit IL10- und IL12p40-spezifischen Oligonukleotiden analysiert. Zunächst wurden B-Zellen hinsichtlich ihrer IL10-Produktion untersucht. Da sich CD19, als Teil des B-Zellrezeptors, nicht nur auf der Oberfläche von Marginalzonen B-Zellen befindet, sondern auch auf follikulären B-Zellen, wurden diese bei der Auswertung der 1 h-HD-Tiere mit erfasst. IL10 wurde in der B-Zellzone von HD-Tieren 1 h nach SRBC-Applikation noch nicht signifikant erhöht exprimiert (siehe Abb.3-9), daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der hier gesuchten Zellpopulation nicht um follikuläre B-Zellen handelt, sondern die Expression wahrscheinlich ausschließlich auf Marginalzonen B-Zellen zurückzuführen sein könnte.

In Kontrolltieren wurde in der CD19-positiven Fraktion im Vergleich zur negativen Fraktion eine höhere IL10-Expressionsrate erzielt. In 1 h-HD-Tieren erreichte die Expression etwa die gleiche Stärke (Abb. 3-9B, links). Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur B-Zellen nach 1 h für die IL10-Expression verantwortlich sind. Die Untersuchung der IL12p40-Expression (Abb. 3-9B, rechts) zeigte, dass IL12p40 in der CD19-negativen Fraktion bei Kontrolltieren höher exprimiert wurde als in der positiven Fraktion. Das Ergebnis wurde auch in 1 h HD-Tieren detektiert. In ihnen war die IL12p40-Expression zusätzlich in der CD19 Negativ-Fraktion erhöht, damit konnten B-Zellen als IL12p40-Produzenten ausgeschlossen werden.

Erste Test-Separationsversuche lassen vermuten, dass Makrophagen und Dendritische Zellen für die IL12p40-Expression so kurz nach HD-Applikation verantwortlich sind (siehe Anhang Tab.A-3). Für die eindeutige Bestimmung des IL12p40- und IL10-produzierenden Zelltyps sind aber weitere Separationen und qRT-PCRs notwendig.

3.2.5 Unterschiedliche Antigen-Dosis verändert nicht die Expression der Chemokine in den einzelnen Kompartimenten der Milz

Neben den Zytokinen spielt auch die Expression von Chemokinen eine entscheidende Rolle bei der Regulation einer Immunantwort. Chemokingradienten sind wichtig, um Zellen in bestimmte Kompartimente oder Gewebe zu locken, damit sie dort ihre Funktion ausüben können. In dieser Arbeit wurde deshalb die Expression von CCL19, CCL21 und CXCL13 in allen bisher untersuchten Kompartimenten (Rote Pulpa,

Marginalzone, T-Zellzone und B-Zellzone) analysiert. CCL19 und CCL21 sind wichtig bei der Zirkulation und Anheftung von T-Lymphozyten an das Epithel. Sie sorgen durch Chemoattraktion für die Migration von Lymphozyten in die T-Zellzone. CXCL13 hingegen unterstützt die Migration in die B-Zellzone. Die vorausgegangenen Ergebnisse der Zytokinexpression lassen vermuten, dass die starke Zytokinexpression in den einzelnen Kompartimenten der HD-Tiere auch zu einer erhöhten Chemokinexpression in diesen Tieren führt. Die Ergebnisse aus ND- und HD-injizierten Tieren wiesen keine signifikant veränderten Expressionsanstiege in den untersuchten Kompartimenten im Vergleich zu Kontrolltieren als auch zueinander auf, daher sind die Ergebnisse im Anhang Abb. A-2 aufgeführt.

3.3 Verhalten sich Niedrigdosis- und Hochdosis-induzierte Zellen nach Auslösung der DTH in der Haut unterschiedlich?

Damit in der Haut eine DTH-Reaktion ausgelöst werden kann, müssen aktivierte Th1-Zellen in die Haut migrieren. Trotz sensitiver Analysemethoden konnte die Entstehung von Th1-Zellen in der Milz von ND-Tieren noch nicht nachgewiesen werden. In HD-induzierten Tieren hingegen konnte nicht nur die Expression von Th2-Zytokinen, sondern auch die Generation einer großen Anzahl an T-Zellen in der Milz gezeigt werden. Es stellt sich somit die Frage, ob das Zytokinprofil in der Haut von ND- und HD-induzierten Tieren nach Auslösung der DTH zeigen kann, dass zum einen DTH-vermittelnde Th1-Zellen nach ND in die Haut gelangen konnten. Zum anderen sollte das Schicksal der vielen nach HD-Applikation generierten T-Zellen geklärt werden. Handelt es sich bei ihnen um Th2-Zellen, die nicht in die Haut immigrieren können?

Um dies zu untersuchen, wurde die Haut von primär ND- und HD-injizierten Tieren nach Auslösung der DTH-Reaktion analysiert. Dazu wurde die mRNA-Expression von Zytokinen, Chemokinen und verschiedenen Markern in der Fußhaut nach Auslösung der DTH-Reaktion untersucht. Zur Aufklärung der Dosis-Abhängigkeit primär applizierter SRBC bei den in der Haut ablaufenden Vorgängen, wurde 24 h bzw. 48 h nach subkutaner SRBC-Injektion die Fußhaut entnommen und die mRNA-Expression in einer qRT-PCR gemessen.

3.3.1 Dosis-unabhängig locken KC und MIP-1 α Granulozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen als frühe Entzündungsmediatoren in die Haut

Ein Blick auf die injizierten Füße von ND- und HD-Tieren, direkt nach Auslösung der DTH durch subkutane SRBC-Injektion, machte deutlich, dass das hohe Volumen von 1×10^9 SRBC bei der subkutanen Injektion zu einer initialen Schwellung im Fuß geführt hatte (siehe dazu DTH-Grundversuch, Abb. 3-1). Daraus ergab sich die Frage, ob nicht nur in ND-Haut, sondern auch in HD-Haut eine Entzündungsreaktion induziert wurde. In entzündetem Gewebe werden verschiedene Mediatoren ausgeschüttet, deren Aufgabe es ist weitere Immunzellen anzulocken, um die injizierten SRBC zu entfernen. Um dies genauer zu analysieren, wurde zum einen die Expression von KC (CXCL1) untersucht, einem Chemokin, das neutrophile und basophile Granulozyten anlockt und aktiviert und von Makrophagen und Neutrophilen sezerniert wird.³⁴

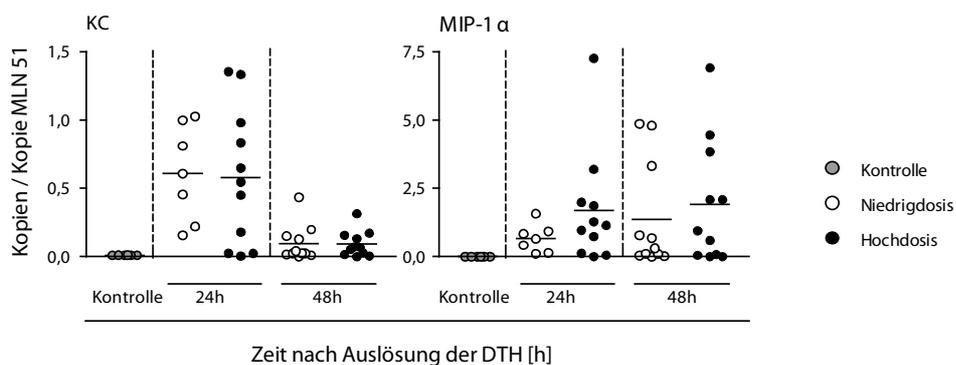


Abb. 3-10 Dosis-unabhängig wird die Expression von Chemokinen in der Haut verstärkt.

Ermittelt wurde die mRNA-Expression der Chemokine KC und MIP-1 α . Dargestellt sind Einzelwerte + Mittelwerte als Balken, n=6-8, Signifikanzen wurden zwischen ND- und HD bestimmt, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, alle Werte sind signifikant zu den entsprechenden Kontrollen erhöht (siehe dazu Tab. 1, Anhang).

Das Ergebnis der Expressionsuntersuchung zeigte, dass KC 24 h und 48 h nach subkutaner SRBC-Injektion signifikant zur Kontrolle erhöht war, besonders stark jedoch nach 24 h (Abb. 3-10, oben links). MIP1 α (CCL3), als weiteres untersuchtes Chemokin, wirkt nicht nur auf eosinophile Granulozyten chemoattraktiv, sondern auch auf Monozyten und Makrophagen, CD8⁺T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und unreife Dendritische Zellen.^{38, 109} Auch die Expression dieses Chemokins war signifikant aber Dosis-unabhängig nach 24 h und 48 h zur Kontrolle erhöht (Abb. 3-10, oben rechts und Tab. 1) und sorgte somit für das Anlocken weiterer Granulozyten und Makrophagen.

Ergebnisse

Ob die Chemoattraktion dieser beiden Chemokine ausgereicht hat, um typische Entzündungszellen anzulocken, wurde im weiteren an der Expressionsrate der Zelloberflächenmarker Gr-1 (neutrophile Granulozyten), CD11c (Dendritische Zellen) und Mac-1 (CD11b) (Makrophagen) in der Haut untersucht. Alle drei Zelloberflächenmarker zeigten das gleiche Expressionsprofil (Abb. 3-11, unten). Sie wurden dosisunabhängig signifikant nach 24 h und 48 h erhöht zur Kontrolle exprimiert. Das heißt, es kam unabhängig von der primären intravenösen Applikationsdosis nach subkutaner Injektion zu einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten, Dendritischen Zellen und Makrophagen in der Haut.

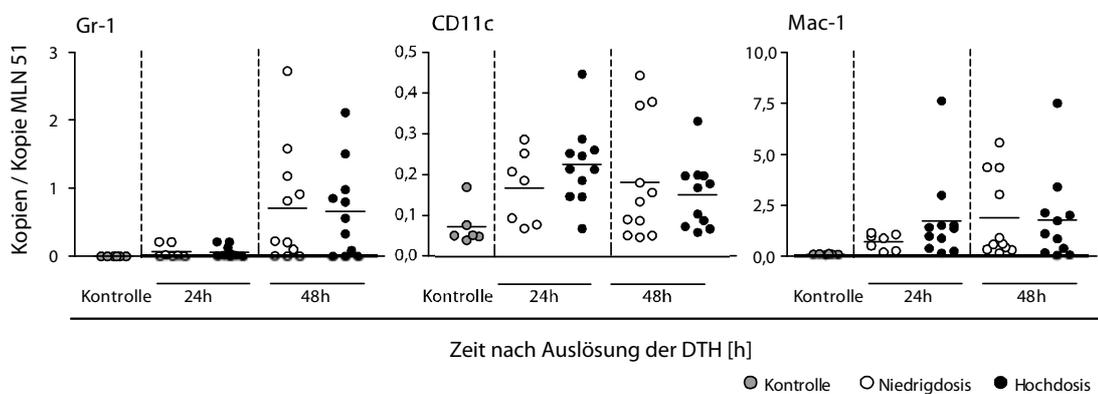


Abb. 3-11 Dosis-unabhängig wird die Expression von Zelloberflächenmarkern in der Haut verstärkt.

Ermittelt wurde die mRNA-Expression der Zelloberflächenmarker Gr-1, CD11c und Mac-1. Dargestellt sind Einzelwerte + Mittelwerte, n=6-8, Signifikanzen wurden zwischen ND- und HD bestimmt, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, alle Werte sind signifikant zu den entsprechenden Kontrollen erhöht (siehe dazu Tab. 1, Anhang).

Die Zelloberflächenmarker wiesen aber keine Expressionsunterschiede zwischen ND- und HD auf (siehe Tab. 1, Anhang). Daraus lässt sich schließen, dass Dosis-unabhängig nach subkutaner SRBC-Injektion entzündungsfördernde Zellen des angeborenen Immunsystems durch KC und MIP-1 α angelockt wurden. Gleichzeitig akkumulierten sowohl in ND- als auch HD-Haut neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen und auch Makrophagen, deren Aufgabe es war die SRBC aus der Haut zu entfernen. Ihre Anwesenheit führte bei HD-Tieren jedoch nicht zur Ausprägung einer DTH-Reaktion.

3.3.2 Eine erhöhte IFN γ -Expression in der Haut von Niedrigdosis-Tieren verweist auf die Anwesenheit von Th1-Zellen

Im nächsten Schritt sollte auf Zytokinebene untersucht werden, ob sich die anfangs aufgestellte Hypothese: Niedrigdosis induziert Th1-Zellen, Hochdosis induziert Th2-Zellen im Gegensatz zu den Ergebnissen aus der Milz (siehe 3.2.4) in der Haut bestätigen ließ. Als erstes wurde dazu, wie schon in der Milz, die Expression der Th1-typischen Zytokine IL12p40 und IFN γ 24 h und 48 h nach subkutaner SRBC-Injektion in der Haut analysiert. Die Expressionsrate von IL12p40 zwischen ND- und HD-Tieren führte dabei unabhängig von der Dosis zu keiner signifikanten Veränderung (Abb. 3-12, oben links). Bereits 24 h nach Auslösung der DTH konnte aber in ND-Tieren eine signifikante Erhöhung der IFN γ -Expression festgestellt werden (Abb. 3-12, oben rechts). Dann wurde die Expression der Heterodimere p28 (ein IL12p35-abhängiges Polypeptid) und EBI3 (Epstein-Barr Virus induziertes Gen 3)⁹⁰, die zusammen als Mitglieder der IL12-Familie IL27 bilden, betrachtet. Die Untersuchung von IL27p28 zeigte ausschließlich in der Haut von ND-Tieren eine erhöhte Expression nach 48 h (Abb. 3-12, Mitte links). Im Gegensatz dazu wurde EBI3 nicht erhöht exprimiert (Abb. 3-12, Mitte rechts). IL27 wird in Synergie mit IL12p40 gebildet und von Makrophagen und Antigen-präsentierenden Zellen sekretiert, das die Differenzierung von Th0 (naiven) zu Th1-Zellen vorantreibt. Anschließend wurden die Th2-Zytokine IL4 und IL10 untersucht. Die Analyse der IL4-Expression zeigte zwar, dass die Expression in HD-injizierten Tieren, 24 h und 48 h nach subkutaner Injektion, signifikant zur Kontrolle erhöht war (siehe Tab. 1, Anhang), es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen ND- und HD-injizierten Tieren gab (Abb. 3-12, unten links). Unerwartet war auch das Expressionsniveau von IL10. 48h nach Auslösung der DTH war es in der Haut von ND-Tieren signifikant zu HD-Tieren erhöht (Abb. 3-12, unten rechts).

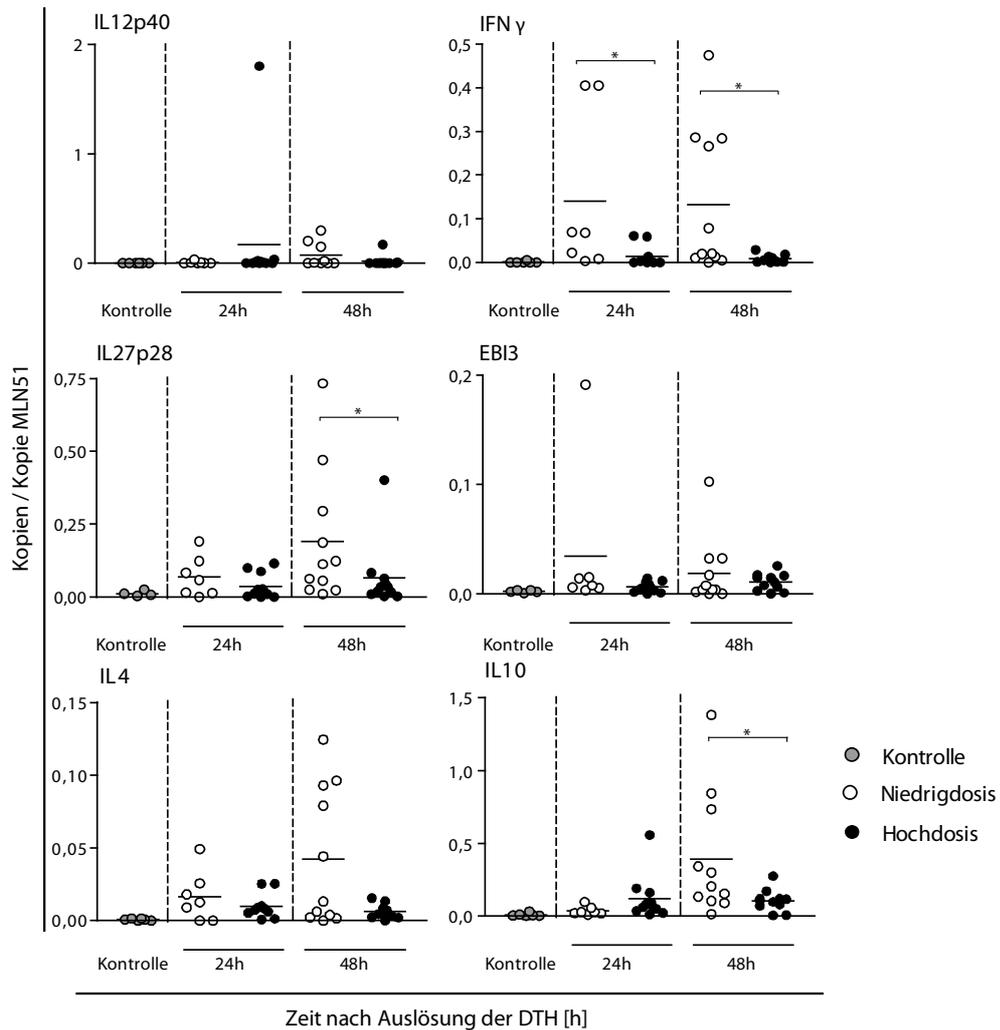


Abb. 3-12 mRNA Expression von Th1- und Th2-Zytokinen in der Haut nach Auslösung der DTH

Dargestellt ist die mRNA-Expression verschiedener Th1- und Th2-Zytokine in der Haut 24 h und 48 h nach Auslösung der DTH in primär ND- und HD-injizierten Tieren. Kontrollen erhielten NaCl, dargestellt sind Einzelwerte + Mittelwert als Balken, n=6-8, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Signifikanzen wurden zwischen entsprechenden ND- und HD-Tieren ermittelt.

Obwohl in der Milz von HD-Tieren die Th2-typische Zytokinexpression nachgewiesen werden konnte, war sie in der Haut durch Analyse von IL4 und IL10 nicht wieder zu finden. Im Gegensatz dazu kam es in ND-Tieren zu einer Th1-induzierenden Zytokinexpression als auch einer erhöhten IL10 Expression nach 48 h (Abb. 3-12, unten).

3.3.3 Nach Niedrigdosis-Applikation immigrieren Th-Zellen in die Haut

Die Ergebnisse des vorhergehenden Abschnitts 3.3.2 zeigen, dass in der Haut von HD-Tieren keine Th2-Zytokine erhöht exprimiert wurden, obwohl in der Milz dieser Tiere viele T-Zellen aktiviert wurden und es dort zu einem deutlichen Expressionsanstieg der Th1- und Th2-Zytokine kam. Es ergibt sich daraus die Frage, ob die HD-induzierten T-Zellen dieser Tiere überhaupt in die Haut einwandern konnten?

Hierzu wurde die Expression des Markers CD3 ϵ in der Haut von ND- und HD-Tieren 24 h und 48 h nach Auslösung der DTH untersucht. CD3 ϵ ist eine Untereinheit des TCR und wird damit auf allen Zellen gefunden, die den TCR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da auch NK-T-Zellen den TCR auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde zunächst die Expression zweier typischer NK-T-Zellmarker analysiert, um sie als Verantwortliche der DTH-Induktion auszuschließen. Zum einen wurde die Expression des typischen NK-T-Zellmarkers CD49b (Integrin α_2) untersucht, welches auf der Oberfläche von NK-T-Zellen exprimiert wird.²⁵ Zum anderen wurde die Expression von Klra-1 (killer cell lectin-like receptor, superfamily A, auch Ly49 genannt) untersucht, ein Mitglied der C-Typ Lectin-Rezeptor Familie, das auf NK- und NK-T-Zellen exprimiert wird und inhibierend auf die zytolytische Funktion von NK- und NK-T-Zellen wirkt.^{60,173} Die Ergebnisse zeigten, dass es weder in ND- noch in HD-Tieren zu einer erhöhten Expression kam (Abb. A-1, Anhang). Damit konnte bestätigt werden, dass NK-T-Zellen als Hauptakteure in der Induktion der lokalen DTH-Reaktion ausfallen. Bei der anschließenden Untersuchung der CD3 ϵ -Expression konnte ein signifikanter Unterschied zwischen ND- und HD-Tieren 24 h und vor allem 48 h nach subkutaner SRBC-Injektion detektiert werden (Abb. 3-13). Die Expression in ND-Tieren war signifikant zu HD-Tieren erhöht, das heißt, dass in die Haut dieser Tiere Antigen-spezifische T-Zellen eingewandert waren.

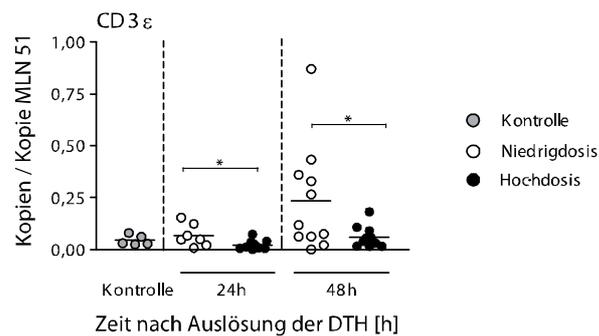


Abb. 3-13 Signifikant erhöhte mRNA-Expression von CD3ε in der Haut von Niedrigdosis-Tieren

Untersucht wurde die mRNA-Expression von CD3ε in der Haut 24 h und 48 h nach Auslösung der DTH in primär ND- und HD-injizierten Tieren. Kontrollen erhielten NaCl, dargestellt sind Einzelwerte + Mittelwert als Balken, n=6-8, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Signifikanzen wurden zwischen entsprechenden ND- und HD-Tieren ermittelt.

Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich also um Th1-Zellen, die als DTH-vermittelnde Zellen in großer Anzahl in die Haut von ND-Tieren nach zweitem Antigenkontakt immigrieren konnten. Nach HD-Applikation war keine erhöhte CD3ε-Expression zu verzeichnen. Es lässt sich daraus schließen, dass die vielen in der Haut generierten Th-Zellen nicht in die Haut einwandern konnten.

3.3.4 Th-Zellen benötigen RANTES, CXCL9 und CXCL10 zur Migration in die Haut

Um neben der Expression von CD3ε einen weiteren Beweis zu haben, dass keine Th-Zellen in die Haut von HD-Tieren einwandern, wurde die SRBC-injizierte Haut von ND- und HD-Tieren hinsichtlich ihrer Expression der Chemokine RANTES (CCL5), CXCL9 und CXCL10 untersucht. RANTES wirkt chemoattraktiv auf Monozyten und Makrophagen, Memory T-Zellen, NK-Zellen, Basophile und Eosinophile und wird neben Fibroblasten und Endothelzellen vor allem von aktivierten T-Zellen gebildet.^{149,}
¹⁵¹ CXCL9, welches von Makrophagen als auch Neutrophilen sezerniert wird, sorgt besonders für das Anlocken von Th1-Zellen. Die T-Zell-Adhäsion auf endothelialen Zellen wird von CXCL10 unterstützt. Es wird nicht nur von Monozyten und Makrophagen sekretiert, sondern auch von NK-Zellen, Dendritischen Zellen und besonders T-Zellen.^{101, 128} Alle drei Chemokine (RANTES, CXCL9 und CXCL10) dienen also hier als Indikator für die in die Haut immigrierten T-Zellen.

Ergebnisse

Betrachtete man die Expression von RANTES (Abb. 3-14, links), zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression ausschließlich in ND-injizierten Tieren 48 h nach DTH-Auslösung. In HD-Tieren war RANTES nicht erhöht exprimiert. Die Expression von CXCL9 und CXCL10 (Abb. 3-14, Mitte und rechts) war bereits nach 24 h in der Haut von ND-injizierten Tieren signifikant erhöht. Auch bei diesen Chemokinen war keine erhöhte Expression in HD-Tieren wieder zu finden. Durch die erhöhte Expression von CXCL9 nach 24 h, könnten also vermehrt Th1-Zellen in die Haut gelockt werden. Die Expression von CXCL10 hingegen war ein Indiz dafür, dass Th1-Zellen zu diesem Zeitpunkt durch das Endothel in die Haut von ND-Tieren immigriert waren.

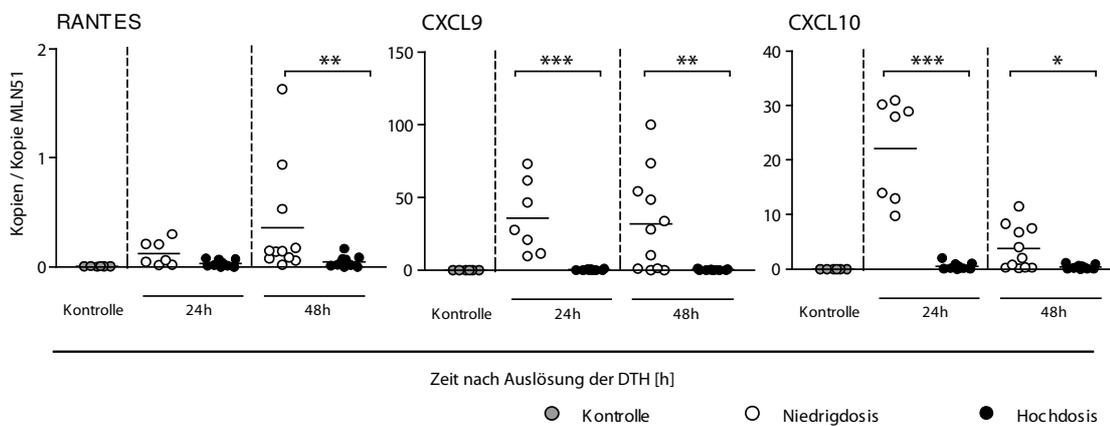


Abb. 3-14 Signifikant erhöhte mRNA-Expression von RANTES, CXCL9 und CXCL10 in der Haut von Niedrigdosis-Tieren

Die mRNA-Expression von RANTES, CXCL9 und CXCL10 wurde 24h und 48h nach Auslösung der DTH in primär ND- und HD-injizierten Tieren in der Haut untersucht. Kontrollen erhielten NaCl, dargestellt sind Einzelwerte + Mittelwert als Balken, n=6-8, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

RANTES wurde erst nach weiteren 24 h erhöht exprimiert, wobei es zu diesem Zeitpunkt von schon in der Haut aktivierten T-Zellen selbst sekretiert worden sein könnte und weitere Th1-Zellen rekrutieren könnte. Eine erhöhte Anzahl an T-Zellen ist damit nach 24 h in die Haut dieser Tiere gelockt worden, welche dann selbst weitere Effektor-Th1-Zellen anlocken könnten.

RANTES, CXCL9 und CXCL10 spielen somit eine entscheidende Rolle in der Entzündungspathologie und haben nur in der Haut von ND-Tieren einen erhöhten chemotaktischen Gradienten ausgebildet. Diese Untersuchung hat auch bestätigt, dass keine Th-Zellen in die Haut von HD-Tieren nach Auslösung der DTH gelockt wurden.

3.3.5 Niedrigdosis-induzierte Th-Zellen sind nach Auslösung der DTH in der Haut zu detektieren– Hochdosis-induzierte hingegen nicht

Zusammenfassend haben die Untersuchungen aus 3.3 gezeigt, dass sowohl Th1- als auch Th2-typische Zytokine in der Fußhaut nach ND-Applikation exprimiert wurden. Anhand der erhöhten Expression von IFN γ , IL27p28 und IL10 konnte dies gezeigt werden. Durch die erhöhte Expression des T-Zellmarker CD3 ϵ sowie der Chemokine RANTES, CXCL9 und CXCL10 wurde deutlich, dass vermehrt Th1-Zellen in die Fußhaut von Niedrigdosis-Tieren eingewandert waren, um die Th1-vermittelte DTH-Reaktion auszulösen. Die Zytokinexpression war aber erst nach dem zweiten Antigenkontakt (Auslösung der DTH), in der Haut zu detektieren. Nach HD-Applikation wurden viele Th-Zellen in der Milz aktiviert. Dort wurden sowohl Th1- aber vor allem Th2-typische Zytokine exprimiert. Diese Ergebnisse konnten jedoch nicht, wie erwartet, in der Fußhaut nach Auslösung der DTH bestätigt werden, weder IL4 noch IL10 wurden im Vergleich zu ND-Tieren erhöht exprimiert. Darüber hinaus waren in diesen Tieren auch nicht die Expression von CD3 ϵ und der untersuchten T-zell-chemoattraktiven Chemokine erhöht exprimiert. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Hahn⁵⁸ und Milon¹¹⁵ konnten die in der Milz aktivierten Th2-Zellen nicht in der Haut wieder gefunden werden.

3.4 Th-Zellen Hochdosis-induzierter Tiere sind nicht in der Milz gefangen

Wie die Expressionsergebnisse der untersuchten Zytokine und Chemokine in der Haut von HD-Tieren gezeigt haben, kommt es dort nicht zu einer Akkumulation von Th-Zellen, wie es nach ND-Applikation gezeigt werden konnte. Die HD-Th-Zellen konnten nicht in die Haut gelangen. In diesem Abschnitt sollte deshalb untersucht werden, warum die vielen, in der Milz generierten, Th-Zellen nicht in der Lage waren, nach Auslösung der DTH-Reaktion in die Haut zu migrieren. Eine zweite Hypothese ist deshalb, dass die vielen generierten Th-Zellen in der Milz gefangen sind und nicht in die Haut migrieren können.

Durch den Einsatz eines passiven adoptiven Milzzellen-Transfers wurde zunächst untersucht, ob die nach erster intravenöser Applikation aktivierten HD-Th-Zellen in der Milz verweilen oder diese verlassen. Dazu wurden Milzzellen entweder aus primär

Ergebnisse

ND- oder HD-injizierten Tieren an Tag 5 nach i.v. Injektion isoliert und in naive Empfängertiere transferiert (Applikationsschema siehe Abb. 3-15). Nach sofortiger Auslösung der DTH im Empfängertier wurde alle 24 h die Fußschwellung gemessen. Die Ergebnisse der Empfängertiere, die eine Milzzellensuspension aus einem ND-injizierten Spendertier erhielten (Abb. 3-15 links), dienten dabei als zusätzliche Kontrolle. Es konnte auch in den Transfertieren eine DTH-Reaktion ausgelöst werden. Sie war signifikant zur Kontrollgruppe erhöht von 1-3 d nach Auslösung der DTH ($p < 0,05$), aber dennoch signifikant zu direkt SRBC-ND-injizierten Tieren reduziert ($p < 0,01$). Das Schwellungsmaximum wurde außerdem, verglichen mit direkt ND-injizierten Tieren, bereits nach 1 d erreicht, statt nach 2 d. Betrachtete man im Gegensatz dazu die Fußschwellung bei Empfängertieren, die eine Milzzellensuspension aus einem HD-injizierten Spendertier erhielten (Abb. 3-15, rechts), entsprach sie den Ergebnissen der direkt SRBC-injizierten HD-Tiere. Es wurde keine DTH-Reaktion initiiert. Eine Fußschwellung blieb in den HD-Empfängertieren aus.

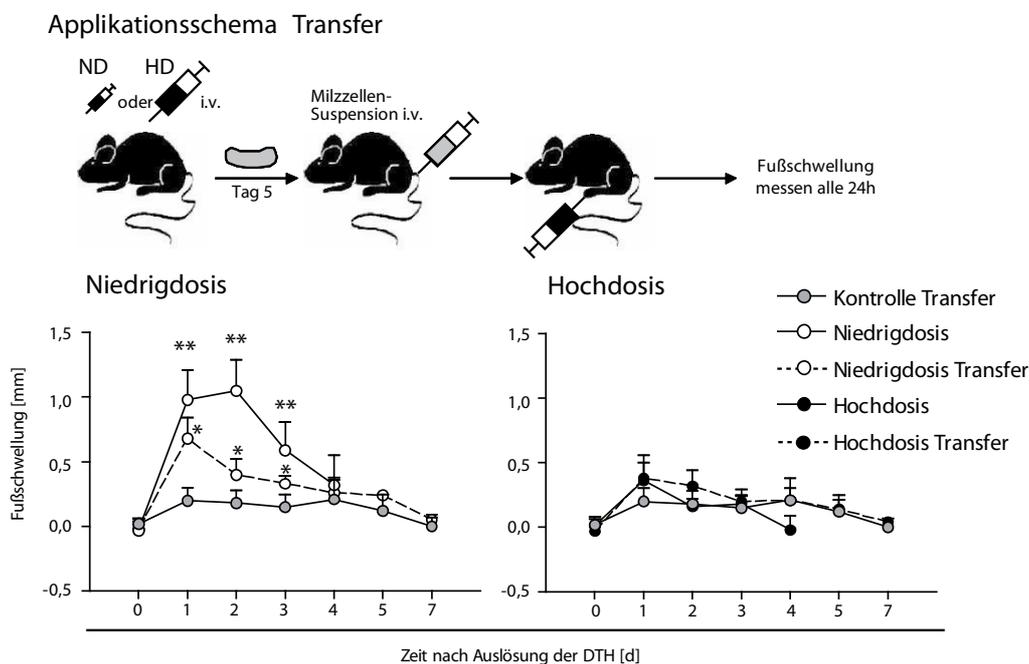


Abb. 3-15 Transferierte Hochdosis-Milzzellen können in naiven Empfängertieren keine DTH auslösen

Das Applikationsschema zeigt die Vorgehensweise beim Milzzellentransfer und der SRBC- bzw. Milzzellen-Injektion (SRBC-Applikation, Milz-Entnahme an Tag 5, sofortige Applikation der Milzzellen-Suspension in ein naives Empfängertier, anschließende s.c. Auslösung der DTH im Empfänger-Tier). Unten: Ergebnisse der Fußschwellung des Transfer-Versuchs, dargestellt sind Mittelwerte+ SD, $n = 5-8$ (Transfer), $n = 6-9$ (Grundversuch), Mann-Whitney-U * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ gilt für alle Tiere ermittelt zur Kontrolle.

Um diese Ergebnisse auf mRNA-Ebene zu untermauern, wurde die Expression verschiedener Zytokine, Chemokine und Zellmarker in der Haut von Empfängertieren 24 h und 48 h nach Auslösung der DTH untersucht. Die reduzierte Fußschwellung in ND-Empfängern im Vergleich zu direkt SRBC-ND-injizierten Tieren spiegelte sich auch in den Ergebnissen der qRT-PCR wieder. Die Expressionsrate in Empfängertieren war zum Teil bis zu 100-fach geringer im Vergleich zu direkt applizierten Tieren oder nur auf Höhe der Kontrollen exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Das Ergebnis des Hochdosis-Experiments des Transferversuchs hat gezeigt, dass die in der Milz generierten Th-Zellen nicht in der Milz eingeschlossen waren. Anhand des Kontrolllexperiments mit Niedrigdosis konnte gezeigt werden, dass die DTH auf naive Empfängertiere übertragen werden konnte. Dieser Transferversuch lieferte damit die gleichen Ergebnisse wie der Grundversuch und zeigte, dass grundsätzlich die transferierten Th-Zellen die Milz verlassen konnten.

3.5 SRBC-dosisabhängig bestimmt die primär induzierte Th-Zellpopulation über die Auslösung einer DTH-Reaktion

In den bisherigen Untersuchungen wurden Tiere ausschließlich einmal intravenös mit Hoch- oder Niedrigdosis injiziert. Was passiert jedoch, wenn beide Th-Zellpopulationen nacheinander im gleichen Tier induziert werden durch erneute intravenöse SRBC-Applikation? Bestimmt dann die primär induzierte Population die Immunantwort und kann die sekundär induzierte Th-Zellpopulation diese Antwort revertieren?

Experimentell wurden dazu Tiere primär intravenös mit SRBC-HD oder -ND injiziert. Die DTH wurde nach 5 Tagen in diesen Tieren ausgelöst. Anschließend verblieben die Tiere 23 Tage in ihren Käfigen. Erneut wurde den Tieren eine zweite intravenöse SRBC-Dosis appliziert. Wieder erfolgte am fünften Tag die Auslösung der DTH mit nachfolgender Messung der Fußschwellungen alle 24 h (siehe Abb. 3-16, Applikationsschema).

Verglichen wurde zunächst der Unterschied der Fußschwellung zwischen Tieren, die bei erster intravenöser Applikation HD erhielten und eine unterschiedlich hohe Zweitapplikation (Abb. 3-16, links). Tiere, die bei zweiter Applikation nach drei Wochen eine ND erhielten, waren nicht mehr in der Lage eine DTH auszulösen. Dieses

war besonders gut 48 h nach Auslösung der DTH zu erkennen. Erhielten die Tiere bei der ersten intravenösen Applikation ND und dann eine unterschiedlich hohe Zweitapplikation nach drei Wochen, kam es dosisunabhängig in beiden Fällen zu einer erhöhten Fußschwellung (Abb. 3-16, rechts).

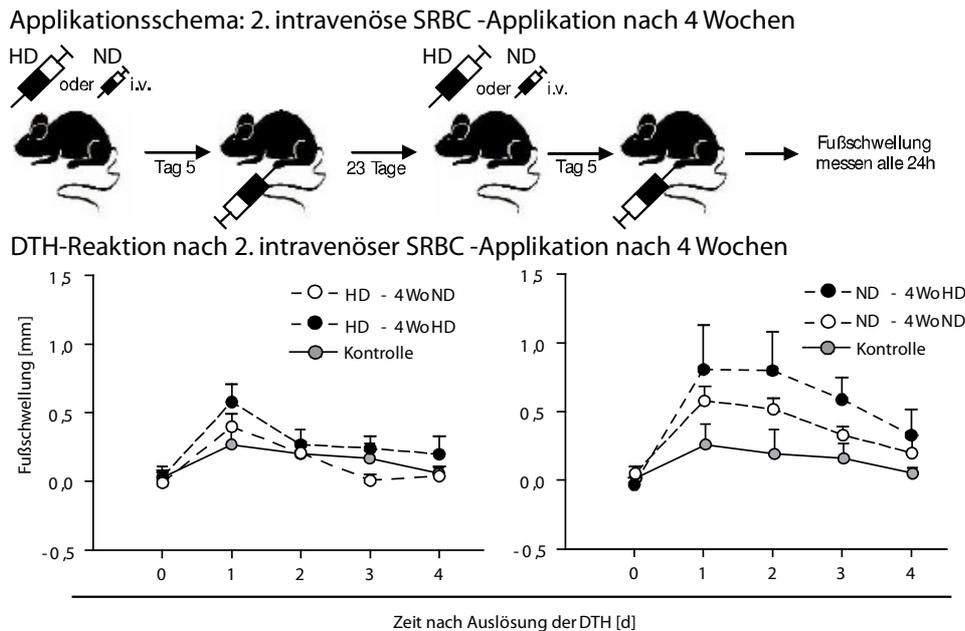


Abb. 3-16 Die zuerst induzierte Th-Zellpopulation bestimmt über die Auslösung einer DTH-Reaktion

Nach durchgeführtem SRBC-Applikationsschema (oben) ist das Ausmaß der Fußschwellung nach sekundärer i.v. Applikation und Auslösung der DTH nach einem Zeitraum von 4 Wochen dargestellt. Links: Vergleich zwischen Tieren, die bei erster i.v. Applikation HD erhielten. Rechts: Tiere, die zuerst ND erhielten, dargestellt als Mittelwerte + SD, n=3-4, Mann-Whitney-U * p<0,05 (bestimmt zwischen Gruppen mit unterschiedlicher i.v.-Primärapplikation). Kontrollen: Tiere, die Milzzellen durch Transfer von NaCl-injizierten Tieren erhielten.

Diese Untersuchung hatte deutlich gemacht, dass die zuerst generierte Th-Zellpopulation die Immunantwort bestimmt. Eine primäre HD-Applikation induzierte unabhängig von der Dosis der zweiten i.v. Applikation keine DTH. Eine primäre ND-Applikation führte hingegen unabhängig von der Dosis der Zweitapplikation immer zu einer erhöhten Fußschwellung und damit zu einer DTH-Reaktion. Die durch HD- oder ND primär „geprimte“ Th-Zellpopulation bestimmt damit den Verlauf der Immunantwort. Dieser Vorgang konnte nicht durch eine nachfolgende Applikation der entsprechend anderen SRBC-Dosis und damit verbundenen Initiation der zweiten Th-Zellpopulation revertiert werden.

Daraus ergab sich die weiterführende Frage, wie wichtig sind zum Zeitpunkt der Induktion der zweiten Th-Zellpopulation durch intravenöse SRBC-Applikation möglicherweise Stroma der Milz und bereits vorhandene Antikörper (im Fall von

Ergebnisse

primärer Hochdosis)? Kann durch den Verlust der ursprünglichen Milz die Funktion von primär induzierten HD-Th-Zellen revertiert werden, so dass wieder eine DTH ausgelöst wird?

Dazu wurde ein Milzzellen-Transfer von direkt SRBC-injizierten Tieren durchgeführt. Naive Empfängertiere erhielten Milzzellen-Suspensionen aus den ND- oder HD-injizierten Tieren. Durch den Transfer wurden zwar Antigen-spezifische Th-Zellen sowie B-Zellen übertragen, jedoch keine SRBC. Anschließend wurde in den Empfängertieren die DTH ausgelöst. Nach weiteren 23 Tagen erhielten die Tiere ihre erste intravenöse SRBC-Applikation (Applikationsschema siehe Abb. 3-17).

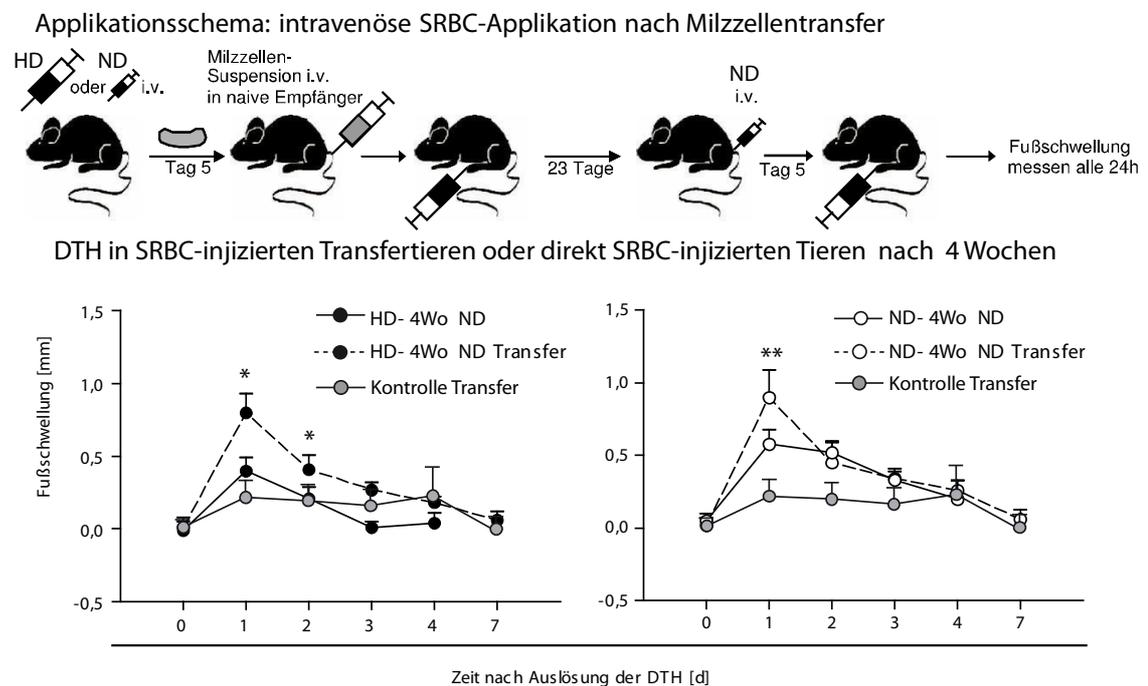


Abb. 3-17 Entfernen von Stroma und vorhandenen Antikörpern induziert DTH in HD-geprägten Transfertiern

Gezeigt ist die Ausprägung der DTH in zweifach direkt SRBC-injizierten Tieren im Vergleich zu einfach injizierten Transfertiern. Oben: Applikationsschema, unten: Fußschwellung nach Auslösung der DTH in direkt SRBC-injizierten Tieren nach 4 Wochen und Transfertiern mit i.v. SRBC-Applikation nach 4 Wochen, dargestellt als Mittelwert + SD, n=3-8. Signifikanzen wurden zwischen Tieren des Transfers und Tieren mit direkter zweiter SRBC-Injektion bestimmt. Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, Kontrollen: Tiere, die Milzzellen durch Transfer von NaCl-injizierten Tieren erhielten.

Tiere, die einen Milzzellen-Transfer aus HD-injizierten Tieren erhielten und nach 4 Wochen ihre erste intravenöse SRBC-ND Injektion bekamen, zeigten nach 24 h und 48 h eine signifikant höhere Fußschwellung (p<0,05) gegenüber entsprechend direkt injizierten Tieren, die keinen Transfer erhielten (Abb. 3-17, links). Eine DTH-Reaktion

wurde ausgelöst. Die Kontrollgruppe von Empfängertieren (Abb. 3-17, rechts), die Zellen aus ND-Tieren erhielten, prägten im Vergleich zu Tieren, die wiederholten direkten SRBC-ND-Kontakt hatten, wieder eine DTH aus. Sie wiesen aber eine signifikant erhöhte Fußschwellung nach 24 h auf ($p < 0,01$). Die hier induzierte DTH-Reaktion war im Vergleich zu direkt ND-injizierten Tieren deutlich stärker ausgeprägt.

Durch den Transfer von Milzzellen aus HD-injizierten Tieren kam es sowohl zum Verlust des Stromas der Ausgangsmilz, als auch von Antikörpern in den naiven Empfängertieren.

Dieser Verlust hat in den Empfängertieren dazu geführt, dass eine nachfolgende intravenöse ND-Applikation ungehindert die Auslösung einer DTH-Reaktion initiieren konnte. Die direkt injizierte SRBC-ND konnte in den Transfertieren ungehindert zur Generation DTH-induzierender Th1-Zellen führen. Betrachtete man die DTH-Reaktion aus transferierten ND-Tieren zu primär direkt applizierten, fiel auf, dass der Verlust des Stromas der ursprünglichen Milz die Ausprägung der DTH-Reaktion noch verstärkte.

Fasst man die Ergebnisse der letzten beiden DTH-Versuche zusammen, konnte gezeigt werden, dass die primär intravenös induzierte Th-Zellpopulation den Verlauf der Immunantwort bestimmt. Eine primär ND-induzierte Population löst eine DTH-Reaktion aus, eine primär HD-induzierte eine humorale Antwort. Dies kann nicht durch eine weitere intravenöse SRBC-Applikation revertiert werden. Werden jedoch Stroma der Ausgangsmilz und vorhandene Antikörper in einem primär HD-induzierten Tier durch adoptiven Milzzellen-Transfer entfernt, kann eine nachfolgende ND-Applikation wieder eine DTH-Reaktion initiieren.

3.6 Die Rolle der Milz bei Induktion einer DTH-Reaktion in Niedrigdosis-applizierten Tieren

Wie bereits gezeigt wurde, ist die Milz für HD-induzierte Th-Zellen essentiell damit sie in der Milz dieser Tiere eine humorale Immunantwort initiieren können. Was geschieht jedoch, wenn die Milz als Generierungsort der HD- und ND-T-Zellpopulation von Anfang an nicht vorhanden ist? Ist dann die Auslösung einer DTH-Reaktion noch möglich? Wird die Milz als Filterorgan von Erythrozyten entfernt, ist dann die

Initiation der Immunantwort nach SRBC-Gabe an anderer Stelle möglich? Dazu wurde ein DTH-Versuch mit splenektomierten Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse in Abb. 3-18 zeigten, dass HD-applizierte splenektomierte Tiere eine signifikant erhöhte Fußschwellung 24 h nach Auslösung der DTH zur Kontrolle ausprägten. Bei ihnen schien der Verlust der Milz die Induktion einer vollständig ablaufenden humoralen Immunantwort zu verhindern. Stattdessen wurde eine DTH-Reaktion ausgelöst. Splenektomierte Tiere, die nach Entfernung der Milz eine SRBC-ND erhielten und in denen dann die DTH ausgelöst wurde, waren nicht mehr in der Lage eine DTH-Reaktion zu induzieren. Eine Fußschwellung blieb während der ersten 3 d aus.

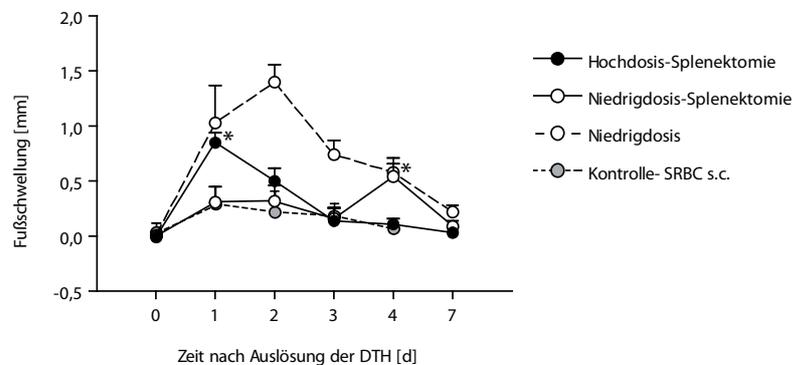


Abb. 3-18 Die Milz wird für die DTH-Entwicklung in Niedrigdosis-Tieren benötigt

Gezeigt ist die Fußschwellung nach Auslösung der DTH in splenektomierten C57BL/6 Tieren. Kontrollgruppen: nicht splenektomierte Tiere, Negativ-Kontrollen: Tiere, die nur SRBC subkutan erhielten (grau), Positiv-Kontrollen: Tiere, die intravenös primär ND erhielten (weiß-gestrichelte Linie). Dargestellt sind Mittelwerte + SD, n=3-5, Mann-Whitney U * $p < 0,5$. Signifikanzen wurden bei HD- und ND-injizierten splenektomierten Tieren zur Kontrolle bestimmt, Kontrollwerte der Tage 3-4 sind Mittelwerte aus den Tagen 1-2 bzw. 0-2.

Die Splenektomie löst damit einen entgegengesetzten Effekt bei der Ausprägung der DTH-Reaktion aus, im Vergleich zu nicht-splenektomierten Kontrolltieren. Die Gründe für diesen umgekehrten Effekt bedeuten jedoch nicht, dass in ND-Tieren nun eine humorale Immunantwort abläuft. Die Analyse in splenektomierten Tieren konnte damit zeigen, dass der Verlust der Milz in ND-Tieren die Initiation einer DTH-Reaktion verhindert und damit die Auslösung einer Immunantwort. In HD-Tieren hat der Verlust dazu geführt, dass keine vollständige humorale Immunantwort mehr abgelaufen ist. Im Gegensatz dazu wurde eine DTH-Reaktion in diesen Tieren ausgeprägt.

3.7 Die intakte Mikroarchitektur der Milz ist entscheidend für die dosisabhängige DTH-Reaktion

Die Untersuchungen der DTH-Ausprägung an splenektomierten Tieren haben gezeigt, dass die Milz für die Initiation einer humoralen Antwort nach Hochdosis-Applikation und einer zellulären Antwort nach Niedrigdosis-Applikation essentiell ist. Da in splenektomierten Niedrigdosis-Tieren keine Immunantwort mehr ablaufen konnte, ergab sich die Frage, ob auch Tiere, die eine veränderte Morphologie der Milz aufweisen, noch in der Lage sind eine DTH-Reaktion auszuprägen?

Um diese Frage aufzuklären, wurden Lymphotoxin β -Rezeptor Knockout Tiere (LT β R-KO) untersucht. Durch die fehlende Funktion von Lymphotoxin- β in der Organogenese dieser Tiere, kommt es zu einer Desorganisation der einzelnen Kompartimente der Milz. Eine Marginalzone wird in diesen Tieren nicht ausgeprägt, T-Zellzone und B-Zellzone sind kaum vorhanden. Wenn sie auftreten, geschieht dies vor allem in großen Überlappungszonen. Diese Knockout-Tiere bilden außerdem keine Keimzentren aus, die jedoch benötigt werden, da in ihnen Plasmazellen heranreifen, die für die humorale Antwort notwendige Antikörper produzieren. Um eine DTH-Reaktion auszuprägen, müssen Th1-Zellen in der Milz aktiviert werden. Dazu muss die Antigen-Präsentation über APCs in entsprechenden Kompartimenten gewährleistet sein. Die Analyse von LT β R-KO Tieren und C57BL/6 Wildtyp-Tieren ließ eindeutige morphologische Unterschiede auf den MOMA-1/B220-gefärbten Milzschnitten in Abb. 3-19A erkennen. Konnten bei Wildtyp-Tieren die Kompartimente eindeutig voneinander getrennt werden (Abb. 3-19A, links), war diese Unterteilung in LT β R-KO Tieren nicht mehr gegeben (Abb. 3-19A, rechts).

Als wir nachfolgend die Ausprägung der DTH-Reaktion von primär ND-injizierten LT β R-KO Tieren nach Auslösung der DTH untersuchten, zeigte sich ein gegensätzliches Bild der Fußschwellung im Vergleich zum C57BL/6 Wildtyp (Abb. 3-19B). Die Auslösung der DTH nach primärer ND-Injektion in LT β R-KO Tieren induzierte keine erhöhte Fußschwellung (Abb. 3-19B, links). Die DTH-induzierende T-Zellpopulation konnte nicht in der Milz dieser Tiere generiert werden.

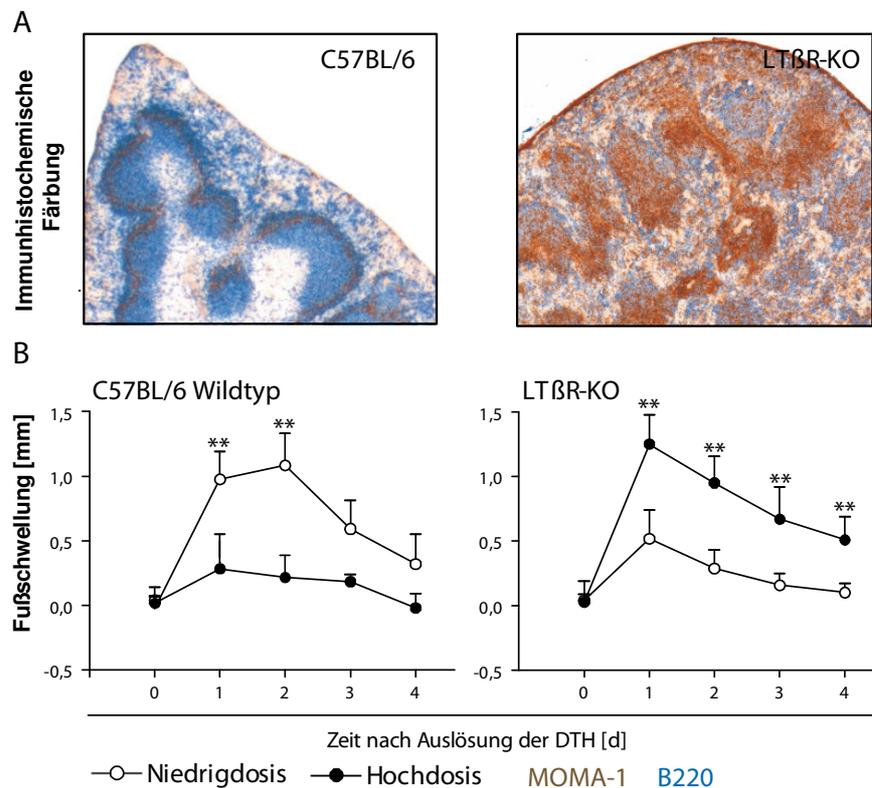


Abb. 3-19 Die Milzarchitektur entscheidet über die dosisabhängige Auslösung der DTH

Untersucht wurde die Ausprägung der DTH-Reaktion nach primärer SRBC-HD oder -ND Applikation in C57BL/6 Wildtyp-Tieren (links) oder LTβR-KO Tieren (rechts), welche eine veränderte Milzstruktur aufweisen. A: Abgebildet ist die Morphologie der Milz von 12 μm dicken Milzschnitten, Objektiv-Vergrößerung 1,25x, MOMA-1/B220 gefärbt. B: Gezeigt ist die Fußschwellung nach Auslösung der DTH, n=5-9, dargestellt als Mittelwerte + SD, Mann-Whitney-U **p<0,01. Signifikanzen wurden zwischen entsprechenden ND- und HD-injizierten Tieren ermittelt.

Einen zweiten Beweis sollte die Ausprägung der DTH in HD-injizierten LTβR-KO Tieren liefern (Abb. 3-19A). In HD-Tieren wurde eine DTH-Reaktion ausgelöst (Abb. 3-19A, links). Diese Tiere bildeten eine signifikant erhöhte Fußschwellung von 1 d bis 4 d nach Auslösung der DTH im Vergleich zu ND-injizierten aus ($p < 0,01$). In diesen Tieren wurden keine Keimzentren ausgebildet und somit auch keine Antikörper gebildet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Morphologie der Milz intakt sein muss, damit nach HD-Applikation eine humorale Immunantwort und nach ND-Applikation eine DTH-Reaktion initiiert werden kann. Die intakte Struktur scheint so wichtig zu sein, dass eine SRBC-Niedrigdosis ausreicht, um eine DTH-Reaktion zu induzieren. Wird diese zerstört, ist die Auslösung einer Immunantwort nicht mehr möglich.

3.8 SRBC lokalisieren in der Milz nach primärer Hochdosis-Applikation

Die Milz, als auch die Morphologie ihrer einzelnen Kompartimente, ist entscheidend dafür, dass nach HD-Applikation eine Th2-Antwort ausgelöst werden kann bzw. nach ND überhaupt eine DTH-Reaktion initiiert wird. Um herauszufinden welche Kompartimente maßgeblich daran beteiligt sind, dass heißt, wo sich bevorzugt die applizierten SRBC ansammeln, sollte ihre Lokalisation in der Milz bestimmt werden. Um zunächst ihre Eintrittsstelle als auch den Weg ihrer Ausbreitung zu analysieren, wurden CFSE-markierte SRBC in ND bzw. HD in die laterale Schwanzvene injiziert und nach verschiedenen Zeitpunkten die Milzen entnommen und unter dem LaserScanning-Konfokalmikroskop untersucht. In Abb. 3-20A ist ein 12 µm dicker Milzschnitt eines Kontrolltieres abgebildet. Dem Tier wurde ausschließlich Natriumchlorid injiziert. Die Marginalzonen waren deutlich rot-fluoreszierend zu erkennen. In Abb. 3-20B (links) ist der nach 1 h entnommene Milzschnitt eines ND-injizierten Tieres zu sehen. Es sind auf dem Schnitt keine SRBC zu visualisieren. Hingegen auf dem Schnitt rechts daneben, eines 1 h-HD-injizierten Tieres, können deutlich grün-fluoreszierende SRBC, hauptsächlich in der Marginalzone, beobachtet werden. Der Lokalisationsverlauf der SRBC in HD-Tieren ist weiter in Abb. 3-20C zu verfolgen. Links ein 2 h-HD-Tier, bei dem sich die SRBC weit über die Rote Pulpa ausgebreitet haben. In der Mitte ein 9 h-HD-Tier, in dem einige SRBC auch in der T-Zellzone lokalisierten (siehe dazu besonders die Vergrößerung in Abb. 3-20C). 24 h nach SRBC-Applikation (Abb. 3-20C, rechts) waren jedoch keine CFSE-fluoreszierenden SRBC mehr in der Milz von HD-injizierten Tieren zu finden. ND-injizierte SRBC konnten mit dieser Methode nicht detektiert werden. Sie müssen jedoch in die Milz gelangt sein, da sonst die Initiation der zellulären Immunantwort nicht möglich gewesen wäre.

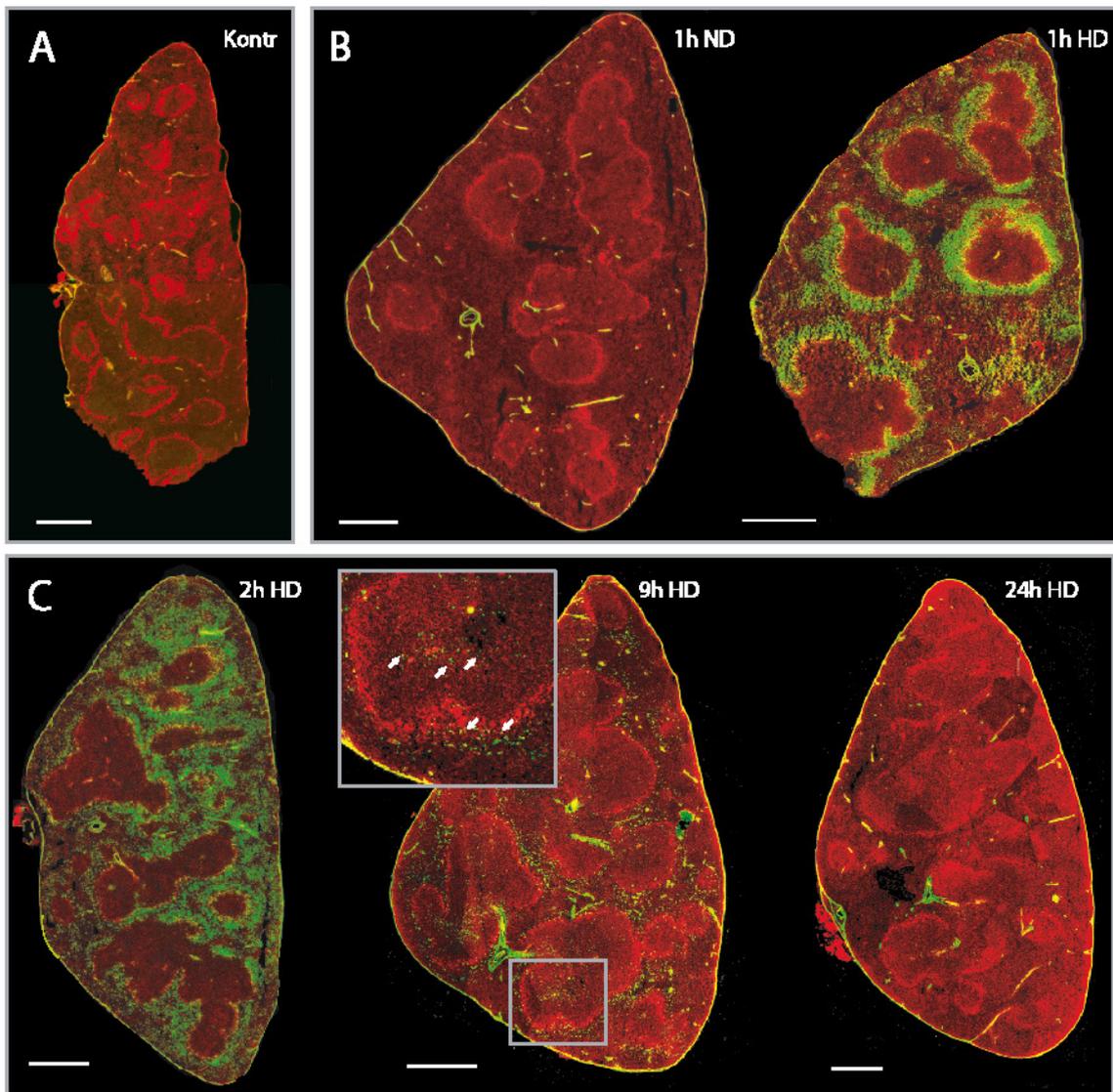


Abb. 3-20 CFSE-markierten SRBC lokalisieren nur in Milzen Hochdosis-injizierter Tiere

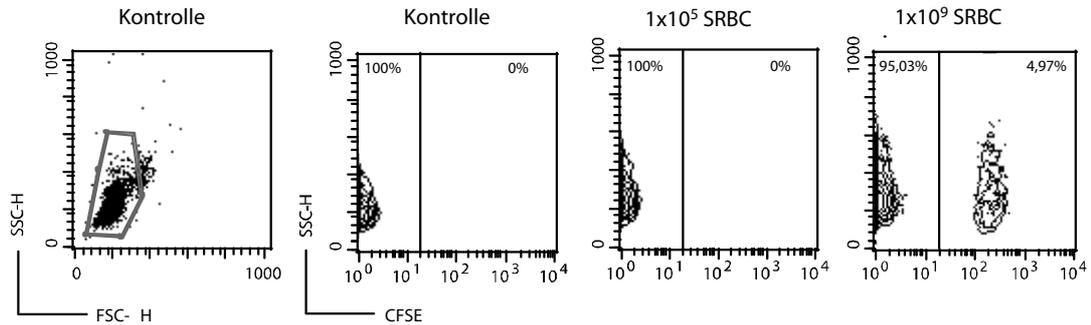
Abgebildet sind hier Laser-Scanningkonfokalmikroskopische Aufnahmen von MOMA-1-biotinylierten/Steptavidin-555 gefärbten Milz-Kryoschnitte (12 μm). A: Der Milzschnitt eines Kontrolltieres, das i.v. 200 μl NaCl erhielt, B: 1 h Tiere. Links: Ein Niedrigdosis-Tier, das 1×10^5 CFSE-markierte SRBC erhielt, rechts: ein Hochdosis-Tier, das 1×10^9 CFSE-markierte SRBC bekam. In C sind Milzschnitte von Hochdosis-injizierten Tieren, 2 h, 9 h und 24 h (von links nach rechts) nach Injektion abgebildet. Im 20-fach vergrößerten Ausschnitt (grau-markiertes Feld in C, Mitte) zeigt mit Pfeilen markierte SRBC in TZ und MZ. Objektivvergrößerung 10x, wobei die Milzquerschnitte aus bis zu 64 Einzelbildern mit der in Adobe Photoshop befindlichen Funktion Photomerge zu Gesamtmilzschnitten zusammengefügt wurden, die weiße Balken entsprechen 100 μm .

Im Gegensatz dazu kann die Lokalisation von SRBC in HD-Tieren über die Marginalzone (1 h), weiter über die Rote Pulpa (2 h) bis in die T-Zellzone (9 h) verfolgt werden, bevor die SRBC nach 24 h nicht mehr zu detektieren waren. Diese Ergebnisse korrelieren mit der Zytokinexpression in den entsprechenden Kompartimenten aus HD-Tieren (Abb. 3-8).

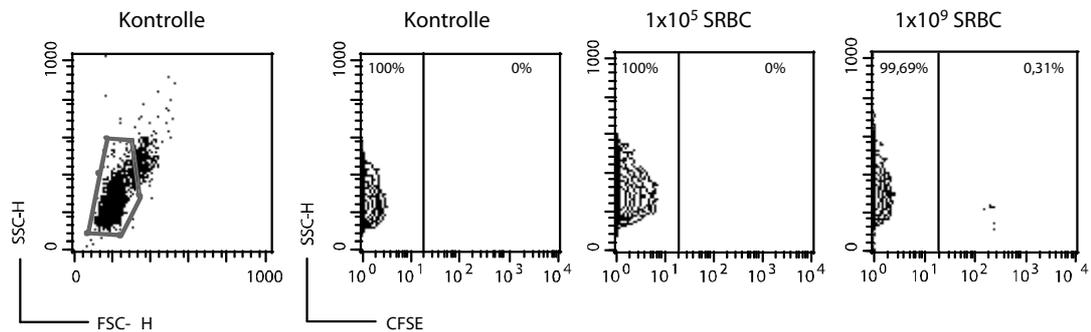
3.8.1 Verbleib von Niedrigdosis-SRBC in Blut und Homogenat

SRBC, die in ND appliziert wurden, konnten nicht auf Milzschnitten detektiert werden. Eine andere Gruppe, die stattdessen Bakterien injizierte, die in gleicher Konzentration appliziert wurden, konnte diese deutlich in der Marginalzone nachweisen.² Daraus ergibt sich die Frage, ob SRBC in ND aufgrund der geringen Konzentration nicht zu lokalisieren sind oder sich nicht wie Bakterien in der Marginalzone ansammeln. Die im Vergleich zur HD 10000-fach geringere SRBC-Konzentration könnte dadurch an die Sensitivitätsgrenzen dieser Methode in den 12 µm dicken Milzschnitten stoßen. Um dieses zu analysieren, wurde Maus-Vollblut und ganzes Milzhomogenat auf den Anteil an CFSE-positiven SRBC im FACS untersucht. Dies wurde exemplarisch in den Konturdiagrammen in Abb. 3-21 gezeigt. Nach Eingrenzen des Fluoreszenzmessbereichs auf die SRBC-Population im FACS (Abb. 3-21, erste Spalte) konnten deutliche Fluoreszenzunterschiede zwischen den Proben aus SRBC ND- und HD-applizierten Tieren festgestellt werden. Im Blut aus ND-Tieren war kein Signal zu detektieren. In den entsprechenden Proben aus HD-Tieren konnte nach 1 min (4,97%) und 1 h (0,31%) ein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 3-21, Blut 4. Spalte). Die Signalstärke in HD-Tieren war nach 1 min höher als nach 1 h, das heißt, dass die SRBC schnell vom Blut aufgenommen wurden. Die FACS-Ergebnisse des Homogenats zeigten, dass auch hier kein signifikantes Fluoreszenzsignal der CFSE-markierten SRBC in ND-Tieren, weder nach 1 min noch 1 h, nachzuweisen waren (Abb. 3-21, Homogenat 3. Spalte). Die Signalstärke in HD-Tieren hingegen stieg von 1 min bis zu 1 h von 7,76% auf 18,94% an (Abb. 3-21, Homogenat 4. Spalte). An den Konturdiagrammen der Kontrolltiere des untersuchten Homogenats wurde sichtbar, dass es zu einem deutlichen Hintergrundsignal kam. Dies wurde vermutlich durch im Homogenat befindliche autofluoreszierende Makrophagen verursacht.

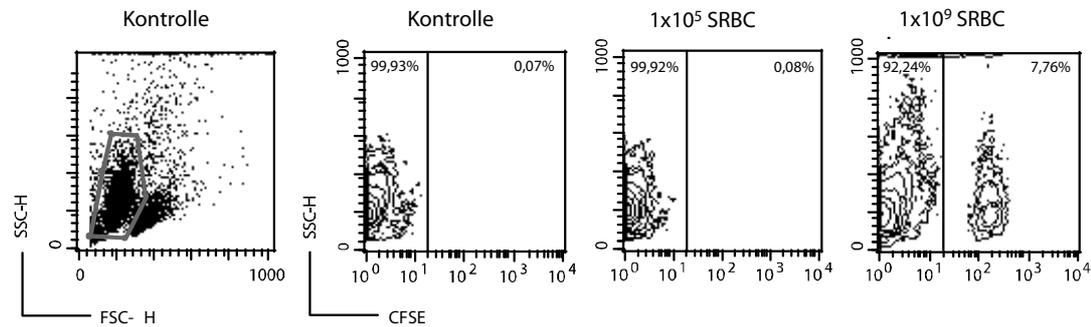
Blut: 1min



Blut: 1h



Milz-Homogenat: 1min



Milz-Homogenat: 1h

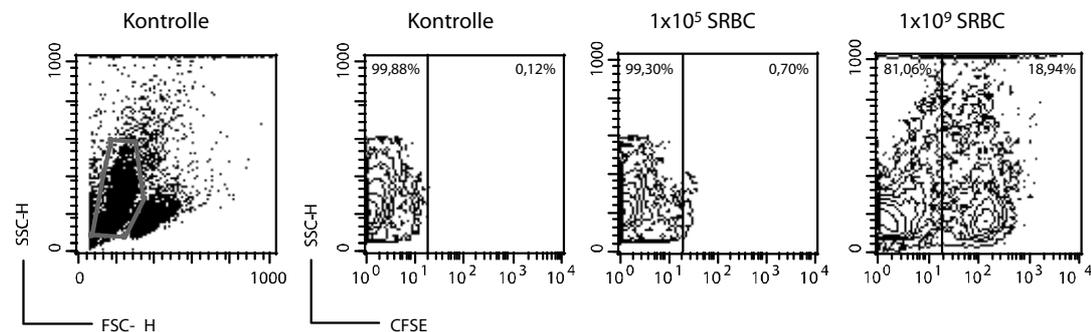


Abb. 3-21 FACS-Messung: Blut und Milzhomogenat aus Tieren mit injizierten CFSE-markierten SRBC

Exemplarisch sind typische FACS-Messungen dargestellt, vertikal von links nach rechts jeweils ein Punkt-Wolken-Diagramm der Gesamtpopulation, im weiteren Konturdiagramme der NaCl-Kontrolle und Proben von ND- und HD-injizierten Tieren. Der im Punkt-Wolken-Diagramm gesetzte Messbereich (grau) umfasst die SRBC-Population. Es sind 20% der Ereignisse dargestellt. In den Konturdiagrammen sind 50% der im Messbereich gemessenen Ereignisse (linear density) gezeigt, dabei wurde eine Gesamtzahl von 50.000 Ereignissen im Messbereich zugrunde gelegt.

Ergebnisse

Um bei dem geringen Prozentsatz an fluoreszierenden SRBC in den Proben eine genauere Aussage zu treffen, hätte eine höhere Anzahl an Fluoreszenz-Ereignissen gemessen werden müssen. Eine Titration der injizierten CFSE-markierten SRBC machte deutlich, dass im Blut erst ab einer Konzentration von 1×10^8 nach 1 min und sogar 1×10^9 nach 60 min fluoreszierende SRBC im FACS zu detektieren waren (Abb. 3-22, links). Nach 1 min entsprach das im Vollblut nach HD-Injektion einem Prozentsatz von durchschnittlich 1,908% an CFSE-positiven SRBC, wo hingegen nach 60 min nur noch 0,177% zu finden waren. Folglich verließen SRBC schnell das Blut nach intravenöser Injektion. Die Analyse des Milzhomogenats zeigte (Abb. 3-22, links), dass dort SRBC bereits ab einer Konzentration von 1×10^7 detektiert werden konnten. Waren nach HD-Injektion nach 1 min 4,297% positive SRBC im Homogenat zu finden, stieg die Konzentration nach 60 min auf durchschnittlich 17,21% an.

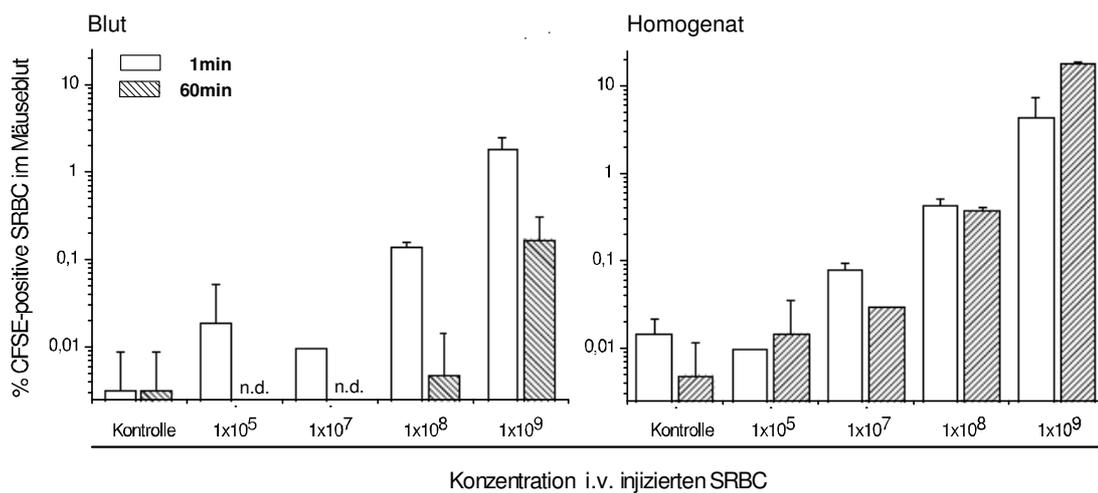


Abb. 3-22 Titration CFSE-markierter SRBC in Blut und Milzhomogenat

Zur Ermittlung der Detektionsgrenze an CFSE-markierten SRBC in Vollblut und Milzhomogenat wurden 1×10^5 - 1×10^9 SRBC intravenös appliziert und nach 1 min bzw. 1 h der prozentuale Anteil an CFSE-positiven Zellen der Gesamtzellzahl ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD (wenn möglich), n.d. (nicht detektierte Probe), n= 2-5.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Konzentration von CFSE-markierten ND-SRBC zu gering ist, um sie in Blut, Homogenat und auch auf Milzschnitten nachzuweisen. Sie müssen jedoch in der Milz vorhanden sein, da sonst die Initiation der zellulären Immunantwort nicht möglich wäre. HD-SRBC waren schnell im Blut zu detektieren und wurden nachfolgend in die Milz transportiert. Dort sammelten sie sich in den verschiedenen Kompartimenten an (siehe Abb. 3-20).

3.9 Massive Expansion der Marginalzone und B-Zellen Infiltration in Niedrigdosis-Tieren

Nach SRBC-ND Applikation wurde keine erhöhte Expression Th1-typischer Zytokine in der Milz induziert, trotzdem wurde in diesen Tieren eine zelluläre Immunantwort initiiert. Es ist bekannt, dass die Marginalzone der bevorzugte Eintrittsweg für viele Antigene und Zellen ist und dabei als erste Verteidigungslinie dient.^{31, 177} Die konfokalmikroskopischen Untersuchungen in Abschnitt 3.8 an HD-Tieren haben das bestätigt. Obwohl in ND-Tieren keine fluoreszierenden SRBC in der Marginalzone detektiert werden konnten, blieb die Frage offen, welche Rolle die Marginalzone für die Initiation einer Th1-Antwort bei ND-Applikation spielt?

Die Untersuchung von immunhistochemisch gefärbten Milzschnitten wurde dazu durchgeführt. Eine MOMA-1/B220-Färbung kennzeichnete deutlich die Marginalzonen auf 12µm dicken Milzschnitten. Die Marginalzonen auf Schnitten von ND-injizierten Tieren waren im Vergleich zu HD-injizierten bereits 1 h nach Injektion signifikant ausgedehnt (Abb. 3-23B). Der größte Unterschied in der Ausdehnung der Marginalzone war dabei zwischen ND- und HD-Tieren nach 4 h zu verzeichnen (Abb. 3-23A). Dieser Unterschied hielt durchgängig bis zu 24 h nach Applikation an. Des Weiteren war deutlich zu erkennen, dass die Ausdehnung der Marginalzone durch eine hohe Anzahl dort befindlicher B-Zellen verursacht wurde, sichtbar an den in blau B220-markierten B-Zellen in Abb. 3-23A. Diese sichtbare morphologische Veränderung in ND-Tieren zeigte, dass auch in der Milz dieser Tiere eine Reaktion durch die Injektion einer SRBC-ND stattgefunden hatte.

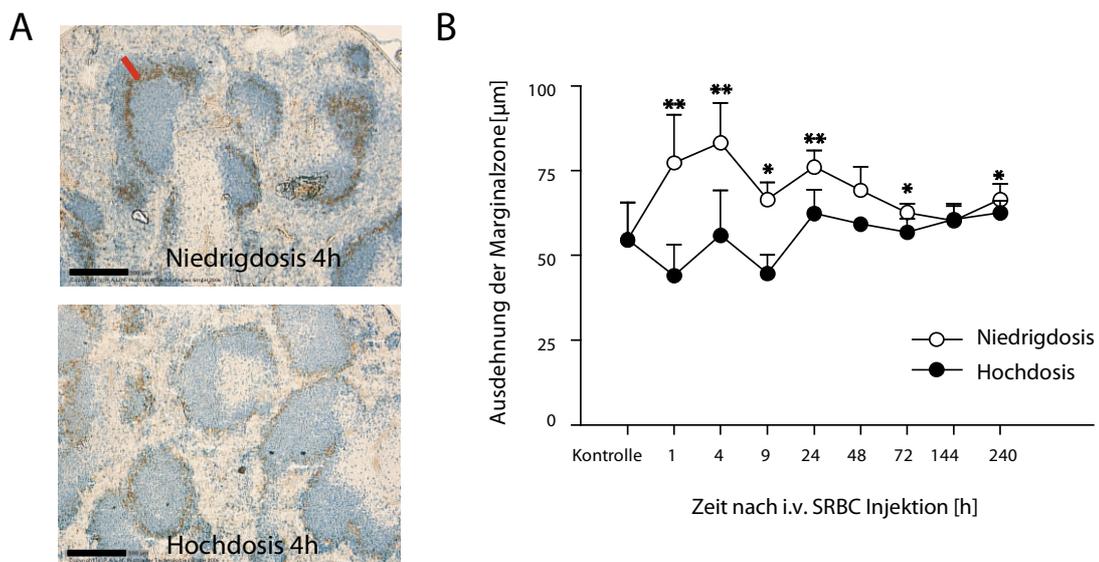


Abb. 3-23 Ausdehnung der Marginalzone und erhöhtes B-Zellaufkommen erfolgt ausschließlich in ND-Tieren

Analysiert wurde die Ausdehnung der Marginalzone gemessen vom inneren Rand (braun-gefärbte Marginalzonen metallophilen Makrophagen) bis zum äußeren Rand (Übergang zum lockeren Rote Pulpa Gewebe) [µm]. Dargestellt sind in (A) 12µm dicke Milzquerschnitte von einem 4 h ND-Tier (oben) und HD-Tier (unten). Die MOMA-1/B220-gefärbten Milzschnitte zeigen deutliche Unterschiede in der Ausdehnung der Marginalzone. Die vergrößerte Ausdehnung im ND-Tier ist durch einen roten Balken gekennzeichnet. Die Anzahl an B-Zellen ist in diesem Tier nach ND-Injektion erhöht (5x Objektiv-Vergrößerung, schwarzer Balken = 300 µm). In (B) ist die Ausdehnung der Marginalzone nach Injektion einer ND- oder HD gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte + SD, n = 3-4, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01.

Durch die erzielten Ergebnisse aus HD-Tieren lassen sich Rückschlüsse über die ablaufenden Vorgänge in ND-Tieren ziehen. Die in diesem Versuchsteil erhaltenen Daten der immunhistologischen Untersuchung zeigen, dass auch nach Injektion einer SRBC-ND eine Reaktion in der Milz stattgefunden hat. Sie expandiert während der ersten 24 h nach intravenöser SRBC-ND und weist eine erhöhte Anzahl an B-Zellen auf. Somit scheint die Morphologie der Milz einen wichtigen Einfluss bei der Regulation einer nachfolgenden Immunantwort zu haben.

4 Diskussion

Bei blutständigen Infektionen hat die Milz, als einziges sekundär lymphatisches Organ eine entscheidende Rolle bei der Steuerung und Initiation einer Immunantwort. Mit dem Phänomen, das die Injektion ein und desselben Antigens dabei zu verschiedenen Immunantworten führt, wenn ausschließlich dessen Dosis verändert wird, haben sich schon intensiv verschiedene Gruppen in den 70er und 80er Jahren beschäftigt.^{70, 78, 89, 95}

Wurden Schaferythrozyten (SRBC) als T-zellabhängiges partikuläres Modellantigen eingesetzt, konnte eine inverse Beziehung zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort durch Auslösung einer DTH-Reaktion demonstriert werden.^{104, 162, 166}

Welche Richtung dabei die Immunantwort einschlägt, hängt von vielen unterschiedlichen Faktoren ab, wie z.B. der Bindungsaffinität des Peptid-MHC/TCR-Komplexes, dem umgebenden Zytokin- und Chemokinmilieu und dem applizierten Antigen.

In dieser Arbeit wurde dazu die dosisabhängige Induktion von unterschiedlichen Immunantworten auf Zytokinebene durch Einsatz von SRBC Niedrig- und Hochdosis im DTH-Modell untersucht. Bei vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass nach SRBC-ND und -HD zwei verschiedene Th-Zellpopulationen generiert werden.^{78, 115} Da sich frühere Daten aber vorrangig auf die Untersuchung der schon entstandenen Th-Zellpopulationen beschränkten, sollte hier bereits bei der Differenzierung der Th-Zellen angesetzt werden, die maßgeblich durch die Expression von Zytokinen beeinflusst ist. Die Analyse des exprimierten Zytokinmusters in den einzelnen Kompartimenten der Milz von naiven, Niedrig- und Hochdosis-induzierten Tieren sollte eine Vorhersage über die entstehende Th-Zellpopulation und damit dem Verlauf der Immunantwort ermöglichen. Die Untersuchungen erfolgten daher zum einen in den Kompartimenten der Milz, als einziges für SRBC zugängiges sekundär-lymphatisches Organ nach intravenöser Applikation und in der lokal injizierten Fußhaut nach Auslösung der DTH.

Da sich bisherige Ergebnisse nur auf *in vitro*-Daten⁴⁰ oder Ergebnisse aus vollständigem Milzhomogenat stützen⁷⁸, wurde in dieser Arbeit die Methode der Lasermikrodissektion genutzt. Sie bietet die Möglichkeit Daten der mRNA-Zytokinexpression aus den einzelnen Kompartimenten der Milz, als auch des geschwollenen Bereichs der Fußhaut zu ermitteln, ohne dabei dessen Mikroarchitektur zu zerstören.

4.1 Der Nachweis eines differenzierten Zytokin- und Chemokinprofils ist in den einzelnen Milz-Kompartimenten naiver Tiere möglich

Erstmals sollte die Expression ausgewählter Zytokine (IL12p40, IFN γ , IL4, IL10) und Chemokine (CCL19, CCL21, CXCL13) in den Kompartimenten naiver Kontrolltiere analysiert werden. Da diese aber häufig nur in sehr kleinen Mengen produziert werden, ist ihre Analyse sehr schwierig. Mit Hilfe von Lasermikrodissektion und anschließender qRT-PCR war die Untersuchung der mRNA-Expression jedoch in den einzelnen Kompartimenten der Milz möglich.^{45, 96} Erhöhte Anzahlen an mRNA-Kopien konnten dabei aber zweierlei bedeuten. Zum einen, dass es in dem untersuchten Kompartiment entweder zu einer erhöhten mRNA-Expression einer einzelnen Zellpopulation kommt oder zum anderen, dass es dort zu einer Akkumulation oder Zellmigration kommt, die dadurch bedingt zu einer erhöhten mRNA-Kopienanzahl führt.

Zunächst wurde die korrekte Isolation der einzelnen Kompartimente (RP, MZ, TZ, BZ) mit Hilfe der Marker CD3 ϵ und CD19 durch ihre unterschiedlich hohe mRNA-Expression belegt (Abb.3-5B). Die Ergebnisse der Expression in naiven Tieren machten deutlich, dass erstens alle untersuchten Zytokine als auch Chemokine nachzuweisen waren und dabei die Chemokine im Vergleich zu den Zytokinen in allen Kompartimenten um ein 10- bis 100-faches höher exprimiert werden (Abb.3-6A). Zweitens wird bereits das Th1-typische IL12p40, IFN γ , als auch CCL19 und CCL21 in der T-Zellzone erhöht exprimiert (Abb.3-6B) und drittens wird CXCL13 als B-zelltypisches Chemokin im Grundzustand in den B-Zellarealen (Marginalzone und B-Zellzone) erhöht exprimiert. Für IL10 trifft dies jedoch nicht zu. Es wird ausschließlich in der Marginalzone erhöht exprimiert, was möglicherweise von dort befindlichen Marginalzonen-B-Zellen sezerniert wird.

4.2 Der Verlauf der Immunantwort ist nicht durch die alleinige Expression Th1- oder Th2-typischer Zytokine in der Milz vorhersagbar

Die Generation von Niedrigdosis-induzierten Th1-Zellen ist auf Zytokinebene mittels Lasermikrodissektion in der Milz nicht zu detektieren

Die Untersuchung der Zytokinexpression in den einzelnen Kompartimenten primär intravenös applizierter ND- oder HD-Tieren sollte nachfolgend zeigen, inwieweit eine veränderte Zytokinexpression im Vergleich zu den Kontrolltieren die Initiation einer zellulären bzw. humoralen Antwort vorhersagen kann. Obwohl nach SRBC-ND Gabe eine zelluläre Immunantwort initiiert wird, was in dieser Arbeit durch die Auslösung einer DTH-Reaktion nach sekundärem direkten Ag-Kontakt reproduziert werden konnte (Abb.3-1)^{95, 106}, waren in diesen Tieren keinerlei erhöhte mRNA-Mengen der untersuchten Th1-typischen Zytokine IL12p40 und IFN γ in den einzelnen Kompartimenten zu detektieren (Abb.3-7). Die hier eingesetzte Detektionsmethode der Lasermikrodissektion ist in Bezug auf die Tiere der ND-Gruppe nicht sensitiv genug, was auf die zu geringe Expressionsrate in diesen Tieren zurückzuführen ist. Um die Detektionsgrenze dieser Methode weiter herab zu setzen, könnte zukünftig eine Einzelzellisolation mittels Mikrodissektion als Alternative in Betracht gezogen werden.

Nur Hochdosis induziert eine erhöhte Th1- und Th2-typische Zytokinexpression in der Milz – sie ist Indiz für die Generation von Th2-Zellen

In der Gruppe der HD-Tiere hätte man eine ausschließlich erhöhte Expression der Th2-typischen Markerzytokine IL10 und IL4 erwartet. Mit den zu Beginn durchgeführten Reproduktionsversuchen konnte nämlich nicht nur qualitativ, wie auch schon andere Gruppen zeigen konnten^{105, 160, 162, 165, 166}, sondern auch quantitativ bestätigt werden, dass Tiere der HD-Gruppe eine deutliche Keimzentrumsformation als auch erhöhte IgG-Antikörperkonzentrationen induzieren (Abb.3-2 und 3-3) als Zeichen einer humoralen Antwort. Entgegen der Erwartungen zeigte sich in dieser Gruppe aber bereits nach 1 h eine erhöhte Expression von Th1-typischem IL12p40 in der Marginalzone (Abb.3-8). Die Expression dieses Zytokins war fortlaufend nach 4 h in der RP zu finden und von da ab bis 24 h nach Injektion in der T-Zellzone. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den HD-Tieren auch Th1-Zellen induziert wurden.

In der Marginalzone konnte neben der IL12p40-Expression zum gleichen Zeitpunkt auch die erhöhte Expression von regulatorischem IL10 beobachtet werden (Abb.3-8), das möglicherweise von MZ-Makrophagen oder DCs stammt (Abb.3-9B). Diese frühe erhöhte Expressionsrate in der Marginalzone ist nicht verwunderlich, da sie das Kompartiment ist, in der blutständige Antigene zuerst auflaufen (Abb.3-10B, rechts).² Zu diesen Beobachtungen passen die Ergebnisse von Hsieh *et al.*, die er an IL10-exprimierenden APCs gezeigt hat. Die von ihm gefundene frühe IL10-Expression stammt von Makrophagen oder DCs und lässt naive T-Zellen in Th2-Richtung differenzieren.⁶⁶ Auch die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse des IL12p40- und IL10-exprimierenden Zelltyps (Test-Separationen Abb.3-9, Tab.A-3) weisen darauf hin. Mit einer weiteren Untersuchung im OVA-System machte er deutlich, dass die Balance zwischen IL12- und IL10-Expression von Ag-präsentierenden Makrophagen entscheidend ist, ob eine T-Zelle zur Th1- oder Th2-Zelle differenziert.^{50, 67}

Es ist also durchaus denkbar, dass die frühe IL12p40-Expression in Marginalzone und Roter Pulpa durch die gleichzeitige Expression von IL10 die weitere Initiation einer Th1-Antwort verhindert. Die ausbleibende erhöhte Expression von IL10 in der T-Zellzone verweist darauf, dass dort keine regulatorischen T-Zellen entstanden sind, die im Weiteren die DTH-Reaktion nach Auslösung der DTH supprimieren könnten. Nach 4 h und 9 h war in der B-Zellzone dann ausschließlich IL10 zu detektieren. Das lässt darauf schließen, dass die IL10-sekretierenden T-Zellen von der MZ über die RP in die BZ auswandern und zur B-Zellaktivierung in den Follikeln führen. IL10 kann also viele Effekte während der Immunantwort induzieren abhängig von Zeitpunkt und Kompartiment der Expression.¹¹⁹ Es könnte somit entweder als Aktivator oder Suppressor fungieren, früh in der MZ und regulatorisch für T und B-Zellen in der BZ.⁷⁴ Es erhöht außerdem die Antikörperantwort in einer Primär- als auch Sekundärantwort bei Analyse im SRBC-System.¹⁰⁰ Die erhöhte Expression von IL4 konnte erst 72 h nach primärer HD-Applikation in T-Zellzone und B-Zellzone gemessen werden (Abb.3-8). Es wurde möglicherweise von follikulären T-Zellen sekretiert, die ihre IL4-Kompetenz in der T-Zellzone durch Interaktion mit Ag-beladenen DCs erhalten haben und nachfolgend die Formation von Keimzentren und Antikörper-Produktion unterstützen können.^{71, 145} Durch die frühe parallele Expression von IL12p40 und IL10 in HD-Tieren kam es wahrscheinlich zu einem

Wettkampf zwischen generierenden Th1- und Th2-Zellen. Dieser wurde jedoch durch die anhaltende IL10-Expression von Th2-Zellen gewonnen und zu späteren Zeitpunkten durch eine erhöhte Expression von IL4 unterstützt. Für die „Th2-Theorie“ in HD-Tieren sprechen auch die Untersuchungen von Jacysyn *et al.*. Sie haben im OVA-System gezeigt, dass Th2-Klone in einem frühen IL4-reichen Milieu, wie es auch hier 72 h nach SRBC-HD Gabe vorliegt, zu einer Inhibierung der zellulären Antwort führen.⁷²

Das bei der Induktion einer humoralen Immunantwort hervorgerufene Zytokinmuster ist nicht allgemeingültig und übertragbar auf das Rattenmodell

Analog zu diesem Versuch wurden bereits 2008 Untersuchungen in Lewis-Ratten in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.⁷⁴ Bei den Ratten wurde die gleiche Dosis von SRBC eingesetzt, dass vergleichsweise zur Maus einer Endkonzentration von 1×10^8 SRBC entspricht. Diese Dosis kann anhand vorangegangener Versuche in der Maus immer noch als Hochdosis gewertet werden.^{70, 88, 89, 95, 105} Auch die Keimzentrumsbildung in den untersuchten Ratten bestätigt die Initiation einer humoralen Immunantwort. Obwohl in den Ratten auch die Expression von IL10 und IL12p40 in der Marginalzone erfolgte, geschah dies nicht parallel. IL10 wurde wie in der Maus nach 1 h erhöht exprimiert, IL12p40 jedoch erst nach 9 h. Auch die erzielten Ergebnisse aus der T-Zellzone stimmten nicht überein, da IL12p40 nicht wie in der Maus zwischen 4 h und 24 h signifikant erhöht exprimiert wird, sondern ausschließlich nach 9 h. Darüber hinaus ist in der Ratte auch eine starke IFN γ -Expression nach 24 h in diesem Kompartiment zu verzeichnen. Die Expression von IL10 in der B-Zellzone, ist in der Ratte ausschließlich nach 9 h zu detektieren.

Eine HD-Applikation im Maus-Modell führt also trotz früher Th1-typischer IL12p40-Expression in der Marginalzone, durch gleichzeitig exprimiertes IL10 zur Generation von Th2-Zellen in der Milz. Dieses wird unterstützt durch die Expression von IL10 als auch der späteren IL4-Expression in T- und B-Zellzone. Das in ND-injizierten Mäusen vorhergesagte Th1-Milieu konnte hingegen auf mRNA-Ebene anhand der untersuchten IL12p40- und IFN γ -Expression nicht in den einzelnen Kompartimenten nachgewiesen werden.

Insgesamt macht der Vergleich der Expression zwischen Ratte und Maus deutlich, dass die Steuerung der Immunantwort durch die Expression von Zytokinen, erstens nicht einfach durch die ausschließliche Expression Th1- bzw. Th2-typischer Zytokine erklärt werden kann und zweitens das erwartete Zytokinmuster nicht 1:1 auf einen anderen Organismus, in diesem Fall von Maus auf Ratte, übertragen werden kann.

4.3 Die Induktion einer zellulären Antwort ist nach Niedrigdosis-Applikation trotz schwacher T-Zellproliferation möglich

Bei einer zellulären Immunantwort wird zur lokalen Bekämpfung einer Infektion eine Vielzahl von Th1-Zellen am Ort der Infektion benötigt. Um das zu gewährleisten, müssen viele Th1-Zellen generiert werden. In ND-injizierten Tieren konnten aber nur wenige proliferierende Th-Zellen in der T-Zellzone detektiert werden (Abb.3-4). Im Gegensatz dazu war in den HD-injizierten Tieren eine massive T-Zellproliferation zu verzeichnen. Dieses wurde qualitativ als auch quantitativ ermittelt.

Möglicherweise kann die deutlich unterschiedlich ausgeprägte T-Zellproliferation zwischen ND und HD durch Unterschiede bei der Präsentation des Antigens erklärt werden. Liegt bei der Injektion der SRBC-ND eine geringe Epitop-Dichte bei den APCs vor, führt das durch die Ag-Präsentation zu einer reduzierten SRBC-Anzahl in der Milz, eine Epitop-spezifische Antwort kann ablaufen. Bei SRBC-HD gibt es einen Überschuss an Antigen im Vergleich zu vorhandenen APCs. Es kommt zu einer hohen Epitop-Dichte. Einzelne Epitope werden dadurch maskiert, eine Epitop-spezifische Antwort kann nicht mehr initiiert werden.⁵² Ein anderer entscheidender Faktor bei der T-Zellaktivierung ist auch die Effektivität des Peptid-MHC/TCR-Komplexes. Dazu haben Hendrikson *et al.* gezeigt, dass eine niedrige Ag-Dosis zu wenigen Peptid-MHC-Komplexen führt, die dazu auch instabil sind und nur zu kurzen Kontakten zwischen APCs und T-Zellen führen. Bei Einsatz einer hohen Ag-Dosis entstehen längere APC-T-Zell-Kontakte und es wird mehr Ag über den Peptid-MHC-Komplex präsentiert. In diesem Fall kommt es zu einer vollständigen T-Zellaktivierung und Differenzierung, es entstehen APC-T-Zellcluster, die zu einer starken T-Zellproliferation führen.^{17, 63, 178} Ferner könnten diese Untersuchungen also erklären, warum nach ND-Applikation nur wenige Th-Zellen proliferieren, hingegen nach HD sehr viele. In HD-Tieren wären dabei lange APC-T-Zell-Kontakte entstanden, die zu der starken T-Zellproliferation

führen. Auch die Bindungsfähigkeit des CD2 SRBC-Rezeptor-Antigens könnte dabei eine Rolle spielen, was von Yang *et al.* untersucht wurde.¹⁷⁵ Die in ND-injizierten Tieren ausschließlich leichte Erhöhung an proliferierenden T-Zellen in der T-Zellzone könnte damit durch kurze und nicht so häufige Kontakte zwischen APCs und T-Zellen zu erklären sein.

Neben der Proliferation konnte auch die ausschließliche Expression des T-Zellwachstumsfaktors IL2 in HD-Tieren zwischen 9 h und 24 h in der TZ wieder gefunden werden (Abb.3-4B). Frühere Studien haben bestätigt, dass es nur in einem sehr kleinen Zeitraum nach Ag-Applikation sekretiert wird und die Differenzierung verschiedener CD4⁺ T-Zellen beeinflusst.¹⁵⁴ Außerdem wurde in Zellkultur-Versuchen herausgefunden, dass eine große Menge an applizierten SRBC vergleichsweise zu einer deutlich erhöhten Generation des IL-2 Rezeptors führt.⁴⁰ Die wenigen proliferierenden T-Zellen in ND-Tieren, die bei zweitem Ag-Kontakt in der Haut als „Pionier-Zellen“ nachfolgende Effektor-T-Zellen rekrutieren können, scheinen dennoch auszureichen, um ihre Effektorfunktion in der zellulären Antwort vollständig ausüben zu können.⁵³

4.4 Die SRBC-Dosis verändert nicht das Chemokinprofil in den Kompartimenten der Milz

Da die Zytokinexpression in den Kompartimenten ND-injizierter Tiere keinen Aufschluss über die Induktion der zellulären Immunantwort lieferte, sollte die lokale Untersuchung der Chemokinexpression Aufschluss darüber geben, ob vielleicht Zellen abhängig von der applizierten SRBC-Dosis unterschiedlich in den Kompartimenten lokalisieren. Dazu wurde die mRNA-Expression der Chemokine CCL19, CCL21 und CXCL13 in den Kompartimenten der Milz untersucht, die konstitutiv in bestimmten Kompartimenten zur Bildung des stationären Grundzustandes beitragen.³² Besonders CCL21 aber auch CCL19 werden benötigt für die Lokalisation von MZ-Makrophagen in der Marginalzone.⁹ Damit diese an der richtigen Stelle positionieren und es zur entsprechenden Signalübertragung kommt, müssen sie durch die Chemoattraktivität dieser beiden Chemokine an richtiger Stelle zur Verfügung gestellt werden.¹⁴⁴ CCL21 wird auch von fibroblastischen retikulären Zellen (FRCs) in der T-Zellzone exprimiert. Es ermöglicht neben CCL19 die Migration und somit die Interaktion zwischen DCs⁸⁰

und T-Zellen⁵⁶, hingegen erfolgt die Expression von CXCL13 auf follikulär Dendritischen Zellen (FDCs) und leitet B-Zellen und follikuläre T-Helferzellen in die B-Zellzonen.^{7, 46, 132} Die Ergebnisse der Chemokinexpression in der ND- und HD-Gruppe zeigten, dass es in Abhängigkeit von der Dosis keine Unterschiede im Expressionsprofil dieser Chemokine gab (Anhang, Abb.A-2).

Die Tatsache, dass in ND-Tieren keine erhöhte Zytokin- und Chemokinexpression in den einzelnen Kompartimenten der Milz nachgewiesen werden konnte, könnte auch auf die nur minimal ansteigende T-Zellproliferation in der T-Zellzone der Milz zurückzuführen sein (Abb.3-4A und C). Durch eine geringe T-Zellaktivierung bedingt, wird nur ein sehr schwacher Expressionsstimulus von Zytokinen als auch Chemokinen hervorgerufen, der für die Detektion in der qRT-PCR nicht ausreichend war, um die Unterschiede in der Milz nachzuweisen.

4.5 Die Expression spezifischer Zellmarker, Zytokine und Chemokine in der Haut kontrolliert die Immigration von Th-Zellen

Die Messung der Zytokin- und Chemokinexpression in der Milz von ND-Tieren erzielte keine messbaren Veränderungen im Vergleich zu Kontrolltieren, dennoch wurde eine DTH-Reaktion nach sekundärem SRBC-Kontakt in der Fußhaut initiiert. Die Tatsache, dass nach HD-Applikation eine deutliche Zytokinexpression vor allem Th2-typischer Zytokine detektiert wurde, veranlasste uns zu der Hypothese, dass entstandene Th2-Zellen nicht in die Haut migrieren können und deshalb keine DTH-Reaktion auslösen können. Zur Klärung dieser Hypothese wurde die Expressionsstärke verschiedener Zellmarker, Zytokine und Chemokine untersucht. Um zunächst sicher zu stellen, dass es sich bei dem hier verwendeten DTH-Modell um eine T-zellvermittelte DTH handelt, wurde die Anwesenheit von T-Zellen in der Haut untersucht.

Das konnte durch die ausschließlich in ND-Tieren signifikant erhöhte Expression des T-Zellmarkers CD3ε nachgewiesen werden (Abb.3-11). Damit war aber noch nicht eindeutig geklärt, ob T-Zellen in die Haut immigriert sind oder es sich um NK-T-Zellen handelt, da auch sie CD3ε als Untereinheit des TCR auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die zusätzliche Untersuchung der NK-T-Zellmarker CD49b und Klra-1 konnte diese beiden aber als Hauptvermittler der DTH ausschließen (Anhang, Abb. A-1).

Nach Auslösung der DTH locken Chemokine dosisunabhängig Zellen des angeborenen Immunsystems an und lösen eine initiale Fußschwellung aus

Obwohl es in HD-Tieren zu keiner erhöhten Anzahl an T-Zellen in der Haut kam, konnte in diesen Tieren nach Auslösung der DTH eine initiale Fußschwellung beobachtet werden, die bis zu 24 h nach SRBC-Injektion anhielt (Abb.3-1).¹⁵² Viele Gruppen, die die DTH-Reaktion nach SRBC-Gabe untersucht haben, nutzten vor allem den 24 h-Zeitpunkt für ihre Untersuchungen.^{78, 95, 113, 162, 166} Da die initiale Schwellung in HD-Tieren aber bis zu 24 h nach Injektion anhielt, zumindest unter Verwendung unserer Versuchsparameter, erscheint uns dieser Zeitpunkt für die Analyse der DTH im Grundversuch als weniger gut geeignet. In dieser Arbeit wurde deshalb besonders der 48 h-Wert als deutlicher Indikator der DTH-Reaktion betrachtet. Um die initiale Schwellung in HD-Tieren zu erklären, bedurfte es der Analyse verschiedener Entzündungsmarker. Die mRNA-Expression der Oberflächenmarker Gr-1, CD11c und Mac-1 war 24 h und 48 h nach subkutaner SRBC-Injektion unabhängig von der primären SRBC-Dosis in beiden Gruppen hoch reguliert (Abb.3-14). Dieses zeigt, dass Zellen des angeborenen Immunsystems wie Granulozyten, Dendritische Zellen und Makrophagen dosisunabhängig an der Injektionsstelle akkumulieren. Dabei sind die drei Marker für Adhäsion und Migration von Leukozyten zuständig und spielen eine zentrale Rolle bei der Entzündungsreaktion.¹⁵⁵ Auch die Untersuchung der Chemokine KC (CXCL1) und MIP-1 α (CCL3) führte zu einer dosisunabhängigen mRNA-Expressionserhöhung in der Haut (Abb.3-13). Dabei wirkt MIP-1 α nicht nur chemoattraktiv auf Makrophagen, sondern dient auch als dessen Coaktivator^{38, 155} und hat somit einen indirekten Effekt auf APCs, kann aber auch direkt auf die Differenzierung von T-Zellen einwirken.¹⁰² KC wird von Gewebe-Makrophagen synthetisiert, die sich sehr früh im Bereich der injizierten Fußhaut befinden und chemoattraktiv auf Neutrophile wirken.^{21, 34, 163} Diese Ergebnisse zeigen, dass unabhängig von der primären SRBC-Dosis Zellen des angeborenen Immunsystems angelockt werden und sich auch in der Haut ansammeln, was die initiale Schwellung erklärt.

RANTES, CXCL9 und CXCL10 sind notwendige Chemokine für die Immigration von Th1-Zellen in die SRBC-injizierte Haut

Da es sich in dem hier verwendeten Modell um eine Th1-vermittelte DTH-Reaktion handeln soll, wurde nachfolgend die Expression Th1-attraktiver Chemokine untersucht. Dabei konnte ausschließlich in ND-Tieren eine erhöhte Expression von RANTES, CXCL9 und CXCL10 nachgewiesen werden (Abb.3-12). Molesworth-Kenyon *et al.* haben in einer Studie gezeigt, dass Neutrophile eine Quelle der T-Zell-rekrutierenden Chemokine CXCL9 und CXCL10 während einer DTH-Antwort gegen das Herpes Simplex Virus 1 sind.¹¹⁷ Dieses Ergebnis könnte auch auf das SRBC-Modell übertragbar sein, denn Neutrophile sind schnell an lokalen Entzündungsstellen zu finden, so dass sie diese Chemokine nach subkutaner SRBC-Injektion sezernieren könnten. Die Expression von CXCL10 beschränkt sich exklusiv auf aktivierte Lymphozyten, das heißt T-Zellen und NK-(T)-Zellen, und führt zur ihrer gezielten Rekrutierung.^{97, 153} Das Ausbleiben einer erhöhten Expression von RANTES in HD-Tieren könnte durch die Aktivität des Chemokin-Rezeptor DARC erklärt werden. Dieser Rezeptor wird von Erythrozyten, also dem hier eingesetzten Ag exprimiert, und dient der Adsorption von bindenden Proteinen auf ihrer Oberfläche.⁶⁵ Möglicherweise kann dadurch auch das Immigrieren von Ag-spezifischen T-Zellen in HD-Tieren verhindert werden. Da CXCL10 auch „Interferon gamma induzierendes Protein-10“ genannt wird, lässt es eine erhöhte IFN γ -Expression in der Haut von ND-Tieren vermuten. Wird kein IFN γ exprimiert, ist auch die Expressionsrate von CXCL9 und CXCL10 reduziert und es können nur wenige CD4⁺ T-Zellen rekrutiert werden.³⁹

Die erhöhte Zytokinexpression bestätigt die ausschließliche Immigration von Th1-Zellen in Niedrigdosis-injizierte Haut

MIP-1 α bildet zusammen mit RANTES und IFN γ eine funktionelle Einheit und leitet so eine Ag-spezifische Th1-Antwort ein.⁷³ Das zeigt, dass das Zusammenspiel von Chemokinen und Zytokinen entscheidend ist für die Regulation der unterschiedlichen Th-Zellpopulationen.^{30, 38}

Der Beweis dazu sollte durch die Untersuchung der Zytokinexpression Th1- und Th2-typischer Zytokine in der Haut angetreten werden. Nur in ND-Tieren konnte eine erhöhte IFN γ -Zytokinexpression beobachtet werden (Abb.3-10). IFN γ kann zum einen die Suppression einer humoralen Antwort unterstützen^{18-20, 27}, zum anderen aber auch

der weiteren Ausprägung der DTH-Reaktion in der Haut bei einer Th1-Antwort entgegenwirken. Ist nämlich die IFN γ -Produktion gestört, kommt es zu einer weiteren Erhöhung der Fußschwellung.⁴⁴ Die Untersuchung von IL4 zeigte (Abb.3-10, Tab-1 im Anhang), dass es nur in HD-Tieren 24 h und 48 h nach Auslösung der DTH signifikant zur Kontrolle erhöht ist (bei ND nur nach 24 h) und somit inhibierend auf die Ausprägung der DTH wirken könnte. IL10 als auch IL27p28, die hingegen nur in ND-Tieren nach 48 h zum Zeitpunkt der maximalen Fußschwellung signifikant erhöht sind, scheinen eine regulatorische Wirkung auf die Entwicklung der Fußschwellung zu haben. Diesen Sachverhalt hat auch schon Miyazaki *et al.* für IL27p28 gezeigt.¹¹⁶ Li *et al.* vertreten die Theorie, dass es einen Zusammenhang zwischen der Entwicklung der DTH-Reaktion und der Zytokinsynthese von IL10 gibt, denn es supprimiert die Th1-Zytokinexpression und kann dadurch eine weitere Ausprägung der Fußschwellung verhindern.⁹³ Da in der Haut von HD-Tieren weder erhöhte IL10-Werte (Abb.3-10), noch eine erhöhte Expression von CD3 ϵ gemessen wurde, kann man davon ausgehen, dass keine Th2-Zellen in der Haut der Hochdosis-induzierten Tiere anwesend waren. Es sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass neben den hier untersuchten Faktoren eine DTH-Reaktion auch von Komplement und Mastzellen-Aktivität abhängt.¹⁶¹ Analysen von Szczepanik *et al.* haben ergeben, dass schnell aktivierte B-1 B-Zellen spezifische IgM-Antikörper produzieren, die nach lokaler Auslösung der DTH Ag-Antikörper-Komplexe formen. Diese Komplexe führen zur Komplementaktivierung und Generierung von C5a, welches für C5a Rezeptor-Stimulation auf Mastzellen sorgt und die lokale Rekrutierung von DTH-induzierenden Th-Zellen in die Haut erlaubt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der Haut, dass dosisunabhängig Zellen in das injizierte Gewebe gelockt werden. Zellen des angeborenen Immunsystems akkumulieren dort und rufen eine initiale Schwellung hervor. Obwohl in der Milz von ND-Tieren keine erhöhte Zytokin- und Chemokinexpression detektiert werden konnte, sind ausschließlich in der Haut von ND-Tieren erhöhte Expressionsraten der Th1-attraktiven Chemokine CXCL9 und CXCL10 sowie RANTES zu finden, wie es auch von verschiedenen Gruppen postuliert wurde.^{92, 146} Sind diese Chemokine in HD-Tieren nicht vorhanden, wird ein weiteres Rekrutieren aktivierter Lymphozyten und APCs in

die Haut unterlassen. Das zeigt auch die ausschließlich in ND-Tieren erhöhte Expression von CD3ε. Fasst man die Expressionsraten der untersuchten Th1- und Th2-typischen Zytokine zusammen, wird deutlich, dass in ND-Tieren Th1-Zytokine erhöht exprimiert werden.

Die ausbleibende Expression von CD3ε und Th2-Zytokinen in HD-Tieren zeigt klar, dass die vielen generierten Th2-Zellen der Milz nicht in die Haut gelangen können. Überraschenderweise konnte darüber hinaus eine erhöhte Th2-typische Expression von IL10 in der Haut von ND-Tieren nach 48 h detektiert werden, die mit aller Wahrscheinlichkeit einen weiteren Anstieg der Fußschwellung verhindert.

Th-Zellen sind in der Lage die Milz nach primärem SRBC-Kontakt zu verlassen

Die Analyse der Zytokinexpression und des T-Zellmarkers CD3ε in HD-injizierter Haut demonstrierten zwar, dass keine Th-Zellen in die Haut migrieren konnten, diese Untersuchung aber dafür keine ausreichende Begründung lieferte. Mit der Durchführung eines adoptiven Milzzellentransfers bot sich die Möglichkeit herauszufinden, ob die HD-induzierten Th-Zellen nicht in die Haut migrierten, weil sie in der Milz gefangen waren (Abb.3-15, rechts). Nach Entnahme und Aufreinigung der Milzzellen aus HD-injizierten Tieren, waren unter den vielen verschiedenen isolierten Immunzellen auch die „befreiten“ HD-Th-Zellen. Diese waren jedoch auch nach Transfer im naiven Empfängertier immer noch nicht in der Lage eine DTH-Reaktion zu induzieren. Dass dieses jedoch grundsätzlich möglich ist, haben die Ergebnisse eines entsprechenden ND-Transfers als Kontrollgruppe gezeigt (Abb.3-15, links). Die Fußschwellung in diesen Tieren war jedoch vergleichsweise zu direkt SRBC-injizierten Tieren reduziert, was auf einen Verlust an Zellen bei der Aufreinigung zurück zu führen sein musste. Damit lässt sich auch die minimale mRNA-Expression von untersuchten Markern, Chemokinen und Zytokinen in der Haut dieser Transfertiere erklären. Der adoptive Milzzellentransfer kann damit indirekt beweisen, dass die ausbleibende Immigration von HD-Th-Zellen in die Haut nicht dadurch bedingt ist, dass generierte Th-Zellen in der Milz gefangen werden.

Selektine auf der Oberfläche von Th-Zellen sind von entscheidender Bedeutung bei ihrer Migration in die Haut

Th-Zellen sind grundsätzlich in der Lage die Milz nach ihrer Aktivierung zu verlassen. Mit dieser Beobachtung kommt die Frage auf, ob HD-induzierten Th-Zellen der Weg in die Haut versperrt bleibt und sie dadurch bedingt nicht in der Haut wieder zu finden sind.

Diese Hypothese beschäftigte bereits Kaufmann *et al.* Anfang der 80er Jahre. Er vermutete, dass Veränderungen auf der Zelloberfläche von Lymphozyten ihre Zirkulation und Auslösbarkeit einer DTH beeinflussen könnten.⁷⁹ Durch Zelladhäsions-Assays wurde bereits 1997 herausgefunden, dass die P-Selektin-bindende Form des PSGL-1 Liganden zwischen Th1- und Th2-Zellen unterscheidet und Th1-Zellen den Eintritt in die Haut ermöglicht.¹⁶ Th2-Zellen hingegen fehlt der korrekte Mediator für die DTH, beziehungsweise können sie aufgrund fehlender Stimulation im Hautmilieu keine DTH induzieren.²⁶ Bei Untersuchungen in der Lunge konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von entscheidenden Adhäsionsmolekülen bei Th2-Zellen ihre Anheftung an das Epithel verhindert.¹⁵⁰ Auch andere Gruppen verdeutlichten, dass fehlendes L-Selektin auf der Oberfläche der Leukozyten einen Schutz vor einer pathologischen Entzündungsreaktion bieten kann, wie es nach HD-Gabe der Fall ist.^{36,}

¹⁶⁴ Ein weiteres Modell führt bei ND-Tieren durch die Behandlung mit Pertussis Toxin zu den gleichen Effekten, wie die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse durch Hochdosis-Applikation. Die Migration von Th-Zellen ins Gewebe wird unterbunden¹⁶², was auch in weiteren Versuchen gezeigt werden konnte.^{105,141} Die Notwendigkeit von Selektinen für die Induktion einer DTH-Reaktion wurde auch mit Transferversuchen im OVA-System untersucht.²³ Dafür wurden entweder OVA-spezifische Effektor-T-Zellen transferiert, die P-Ligand L-Selektin hoch exprimiert haben oder dafür nur schwache Expression zeigten. Nur Transferiere mit hoch exprimiertem P-Ligand L-Selektin konnten eine DTH induzieren. Das Ziel weiterführender Experimente könnte es sein, herauszufinden, ob HD-induzierten Th2-Zellen tatsächlich der PSGL-1 Ligand oder ein anderes Adhäsionsmolekül für die Anheftung fehlt und damit die nicht stattfindende Immigration in die Haut erklärt werden kann.

Eine weitere Erklärung, warum HD-induzierte Th2-Zellen nicht in die Haut migrieren, könnte mit ihrer Helferfunktion in der B-Zellaktivierung zusammenhängen. Nach

Milon *et al.* soll die Anwesenheit von B-Zellen dafür verantwortlich sein, dass die HD-induzierte T-Zellpopulation nicht zirkuliert. Wird eine niedrige Antigen-Dosis injiziert, werden keine B-Zellen aktiviert.^{13,41} Unter diesen Bedingungen zirkulieren bereits stimulierte T-Zellen und können als DTH-Effektor-T-Zellen in periphere Gewebe rekrutiert werden. Wenn im Gegensatz dazu eine hohe Antigendosis injiziert wurde, sind aktivierte B-Zellen in der Lage rezirkulierende aktivierte T-Zellen zu rekrutieren¹¹⁵, womit die Immigration in die Haut nicht mehr im Vordergrund steht und ausgeschlossen werden kann.

4.6 Die primär in der Milz induzierte Th-Zellpopulation steuert die Immunantwort

Wie zuvor schon gezeigt, induziert SRBC-ND Gabe Th1-Zellen, die in die Haut einwandern und dort eine DTH induzieren und SRBC-HD Th2-Zellen, die keinen Zutritt in die Haut erlangen. Da der Ausgang einer Immunantwort maßgeblich von der Homöostase verschiedener Th-Zellen abhängt^{37,172}, widmete sich eine Untersuchung dieser Arbeit der Fragestellung, welchen Einfluss die beiden Th-Zellpopulationen auf die Induktion der Immunantwort haben, wenn sie nacheinander im selben Tier durch intravenöse Applikation induziert werden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die hintereinander folgende Applikation zweier gleicher SRBC-Dosen im Abstand von 4 Wochen zu keiner grundlegenden Veränderungen bei der Initiation der DTH führt (Abb.3-16), so dass die beim ersten SRBC-Kontakt „geprimte“ Th-Zellpopulation erneut angesprochen wird. Zwar war die DTH nach erneuter ND-Applikation reduziert, dennoch die Fußschwellung deutlich zu Kontrolltieren erhöht. Das könnte damit zusammenhängen, dass SRBC bei erneutem Kontakt erkannt werden und schneller abgebaut werden können, so dass eine verstärkte Proliferation von Th1-Zellen und eine erhöhte DTH-Reaktion ausbleiben. Erfolgt nach erster ND-Applikation eine Injektion von Hochdosis-SRBC, werden nach der Theorie von Milon Ag-spezifische B-Zellen aktiviert.¹¹⁵ Demzufolge würden ND-induzierte Th1-Zellen dann nicht mehr rezirkulieren, sondern wie HD-induzierte Th-Zellen in der Milz akkumulieren, da sich dort das applizierte Antigen befindet. Die Ausprägung der DTH in der Haut wäre damit nicht mehr möglich. Anhand der Ergebnisse wird aber deutlich, dass bei der zweiten intravenösen Gabe in Form von SRBC-Hochdosis, die

dabei induzierten HD-Th-Zellen keinen Einfluss auf die nachfolgende Auslösung der DTH-Reaktion hatten. Durch die SRBC-ND wurde erneut das Antigen präsentiert und die Th1-Zellen aktiviert. Dies geschah unabhängig von der zweiten intravenös applizierten SRBC-Dosis. Wurde zuerst eine ND appliziert und dann eine HD, war sofort die Wirkung der vielen injizierten HD Th-Zellen ersichtlich. Den Tieren ging es nach der zweiten Injektion sehr schlecht. Sie löste möglicherweise einen systemischen Schock bei den Tieren aus, wobei dessen Immunsystem mit der plötzlichen massiven Menge an SRBC nicht umgehen konnte und nicht in der Lage war, eine humorale Antwort zu initiieren. Auch die Entwicklung einer Hämagglutination bei diesen Tieren wäre denkbar. Da einige Tiere dieser Gruppe verstarben, wäre das Verklumpen des Blutes eine mögliche Erklärung für diese Tatsache. Im Gegenversuch, bei dem zunächst eine HD appliziert wurde und als zweites ND, wurde die DTH inhibiert (Abb.3-16). Die Vermutung liegt nahe, dass durch die primäre HD-Applikation schnell Antikörper gebildet wurden, die die SRBC der zweiten Applikation sofort opsonisiert haben. Eine Aktivierung von Th1-Zellen wäre damit nicht mehr möglich und eine DTH-Reaktion kann als Indikator für eine zelluläre Immunantwort nicht mehr ausgeprägt werden. Das Ausbleiben der DTH, 48 h nach Auslösung der DTH ist ein Indiz für diese Annahme.

Die Steuerung der Immunantwort ist abhängig vom Stroma der Milz und zur Verfügung stehendem Antigen im Organismus

Das lymphatische Gewebe ist charakterisiert durch eine komplex organisierte Architektur, die durch ein Netzwerk von Stromazellen unterstützt wird. Diese Stromazellen haben viele wichtige Funktionen. Lymphatische Stromazellen, wie spezialisierte fibroblastische retikuläre Zellen (FRCs) und follikulär Dendritische Zellen (FDCs) exprimieren Chemokine, Zytokine, Adhäsionsmoleküle und andere Faktoren, die für die Migration, Homöostase und das Überleben von Immunzellen von großer Bedeutung sind.^{4, 33, 76, 124} Die FDCs, die für lange Zeit Immunkomplexe auf ihrer Oberfläche binden können und an der Bildung von Keimzentren und der Affinitätsreifung von Antikörperantworten beteiligt sind, gelten als Stromazellen der B-Zellzone.^{85, 181} Die Initiation einer humoralen Immunantwort ist abhängig vom Zusammentreffen von B-Zellen und aktivierten T-Zellen, ihrer Proliferation und Differenzierung in niederaffine Plasmazellen, oder nach ihrer Organisation in

Keimzentren zu hochaffinen Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen.¹³⁸ Das Entfernen des umgebenden Stromas der Milz mittels eines adoptiven Milzzellentransfers sollte zeigen, wie entscheidend das Stroma auf die Auslösung einer humoralen und auch zellulären Immunantwort im SRBC-Modell einwirken kann. Auch sollte anhand dieses Transfer-Modells die Notwendigkeit von vorhandenem Antigen (SRBC) im System untersucht werden.

Die in der Arbeit erzielten Ergebnisse des Transfers einer HD-induzierten Milzzellensuspension in naive Empfängertiere, löste bei nachfolgender ND-Applikation im Transfertier eine DTH-Reaktion aus (Abb.3-17). Das Transfertier reagiert damit wie ein naives Tier auf die Applikation der SRBC-Niedrigdosis und induzierte eine zelluläre Immunantwort. Dafür sind zwei Gründe denkbar. Zum einen kann das Ausbleiben einer direkt intravenös applizierten SRBC-Hochdosis verhindern, dass das Antigen im Transfertier vorhanden ist und damit eine fortlaufende Aktivierung von T- und B-Zellen in dessen Milz gewährleistet. Darüber hinaus besteht auch nicht die Möglichkeit, dass bereits gebildete Antikörper, die mit dem Transfer in das naive Empfängertier überführt wurden, Antigen-Antikörper-Komplexe ausbilden und damit die Aktivität von nachfolgenden induzierten Th1-Zellen unterbinden.¹⁴¹ Die durch den Transfer übertragenen aktivierten Zellen gehen mit großer Wahrscheinlichkeit schnell in Apoptose über, ohne dass die HD-induzierten Th2-Zellen eine humorale Immunantwort im Empfängertier auslösen konnten.⁵⁴ Zum anderen könnte der Verlust des Stromas durch den Transfer dazu führen, dass die transferierten aktivierten Zellen nicht in die entsprechenden Kompartimente geleitet werden können. Eine Zellinteraktion bleibt aus und die Entstehung von Keimzentren und Bildung von Antikörpern verhindert.

Beim Betrachten der Fußschwellung zwischen den Gruppen zweifach direkt ND-injizierter Tiere und ND-Transfertieren (Abb.3-16 und 3-17) fällt auf, dass die direkt ND-injizierten Tiere eine geringere Fußschwellung ausprägen als die Transfertiere. In der vorhandenen Milz von direkt applizierten ND-Tieren könnten sich Th1-Gedächtniszellen gebildet haben. Diese regulieren die Expression von Selektinen auf ihrer Oberfläche herunter und können damit nicht mehr in die Haut immigrieren.¹⁵⁰ Da in ND-Transfertieren aufgrund fehlender SRBC somit keine Th1-Gedächtniszellen

gebildet wurden, können nach Transfer aktivierte Th1-Zellen nicht durch diese behindert werden, dieses könnte ein Grund für die erhöhte DTH in diesen Tieren sein. Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass nicht ausschließlich das stromale Netzwerk oder vorhandenes Antigen im System für das Ausbleiben der Initiation einer humoralen Immunantwort in Transfertieren verantwortlich ist. Beide Faktoren haben eine wichtige Funktion, um eine weitere Aktivierung von Immunzellen zu erhalten und diese in die entsprechenden Kompartimente zu leiten.

4.7 Die Morphologie der Milz - essentiell für Keimzentrumsbildung und Induktion einer adaptiven Immunantwort

Das Fehlen lymphatischer Organe führt zu einer starken Beeinträchtigung der Immunantwort.⁷⁵ Inwieweit diese Aussage auch auf das in dieser Arbeit verwendete SRBC-Modell übertragbar ist, wurde durch das hier verwendete DTH-Modell in splenektomierten Mäusen untersucht. Schon eine Studie von Lagrange *et al.* untersuchte dazu die DTH-Reaktion im SRBC-Modell bei CD-1 Mäusen, die zuvor splenektomiert wurden.⁸⁹ Davon ausgehend, dass in der Milz als Filterorgan alle SRBC ankommen, sollte nach ihrer Entfernung die Aktivierung der HD- und ND-Th-Zellpopulation in einem anderen Organ ausgelöst werden. Die Ergebnisse in Abb. 3-18 zeigen, dass splenektomierte HD-applizierte Tiere eine signifikant erhöhte Fußschwellung 24 h nach Auslösung der DTH zur Kontrolle ausprägten. Bei ihnen schien der Verlust der Milz die Induktion einer vollständig ablaufenden humoralen Immunantwort zu verhindern, so dass keine Keimzentren und Antikörper gebildet wurden. Stattdessen wurde eine DTH-Reaktion ausgelöst. Die Initiation der zellulären Immunantwort muss also durch Aktivierung von Th-Zellen in einem anderen Organ z.B. im Knochenmark⁴³ oder den Lymphknoten initiiert worden sein. Die Ergebnisse splenektomierter ND-induzierter Tiere zeigen, dass die Milz bei ND-Applikation benötigt wird, um nach subkutaner Zweitinjektion eine DTH zu induzieren (Abb.3-18).¹⁷¹ Die typische Fußschwellung nach 24 - 48 h blieb aus. Bei diesen Tieren konnte aber eine leichte Schwellung nach 4 d verzeichnet werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine erste Reaktion des drainierenden poplitealen Lymphknotens zurück zu führen war.¹¹³ Sie wurde jedoch nicht durch die direkte SRBC-Injektion im Fuß ausgelöst.

Das Entfernen der Milz führt damit zum Verlust der Lokalisation und Struktur der einzelnen lymphatischen Kompartimente der Milz, die im naiven Tier entscheidend für die Generation von Th-Zellen, spezifische Zellkontakte zwischen APCs, Th-Zellen und B-Zellen sind. Aufgrund dieser beeinträchtigenden Gegebenheiten ist damit in HD-injizierten Tieren offensichtlich nur noch die Generation von DTH-induzierenden Th1-Zellen in einer anderen Lokalisation möglich, in ND-Tieren sogar vollständig eingestellt.

Ein wesentlicher Gesichtspunkt beim Zustandekommen von Zellkontakten zwischen einzelnen Immunzellen ist die korrekte Mikroarchitektur der Milz oder des lymphatischen Organs.^{73, 148} Eine unserer Analysen war deshalb darauf ausgelegt, zu belegen, dass allein die Zerstörung der intakten Mikroarchitektur der Milz ausreicht, um nach HD-Applikation eine vollständig ablaufende humorale Immunantwort zu verhindern und nach ND die Auslösung einer DTH-Reaktion. Es wurden dafür DTH-Versuche an Lymphotoxin- β Rezeptor Knockout (LT β R-KO) Mäuse durchgeführt (Abb.3-19). Wie man bereits weiß, ist Lymphotoxin- β (LT β) in der Organogenese der Milz notwendig, damit eine korrekte Unterteilung der Kompartimente in der Milz stattfinden kann.^{49, 169} Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Abwesenheit von LT β zum Verlust von primären B-Zellfollikeln und follikulär Dendritischen Zellen führt, sowie der Zerstörung der Stromalen Struktur und einer Reduktion der Chemokinexpression.^{3, 35, 49, 84, 87, 91, 135} Darüber hinaus können Tiere mit vollständigem LT β -Knockout keine IgG-Antikörper mehr gegen SRBC produzieren, verursacht durch einen beeinträchtigten IgG-Isotypenwechsel und Affinitätsreifung.^{3, 82} Westermann *et al.* (in Vorbereitung) haben außerdem herausgefunden, dass zwar T- und B-Zellzonen in LT β R-KO Tieren in geringem Ausmaß angelegt sind, diese jedoch nicht deutlich voneinander getrennt sind, sondern stark überlappen. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der DTH-Versuche mit LT β R-KO Tieren haben gezeigt, dass das Fehlen des LT β -Rezeptors bei Injektion einer primären SRBC-HD zur Ausprägung einer DTH-Reaktion führt (Abb.3-19B, rechts).

Die ausbleibende Formation von Keimzentren in diesen Tieren lieferte eine mögliche Erklärung, warum keine humorale Immunantwort initiiert werden kann, denn ohne Keimzentren ist auch die gezielte Antikörperbildung nicht mehr möglich. Außerdem tragen zur Entwicklung von FDC-Vorläufern in der Milz hauptsächlich B-Zellen bei,

die durch ein LT-Signalkaskade von T-Zellen und anderen Zelltypen unterstützt wird.¹⁶⁹ Da FDCs bei der Induktion einer humoralen Immunantwort wichtig sind, kann die eingeschränkte LT-Signalkaskade in LT β R-KO Tieren mit dazu beitragen, dass das Einleiten der humoralen Immunantwort verhindert wird. Die Milz hat in diesem Fall ausschließlich eine Restfunktion¹⁵⁷ und kann nur noch eine lokale Th1-Antwort nach sekundärer SRBC-Applikation in der Fußhaut auslösen. Im Fall der ND-Applikation in LT β R-KO Tieren wurde keine DTH induziert (Abb.3-19B, rechts). Zum einen kann die geringe Anzahl an SRBC vermutlich nicht zur Aktivierung der entsprechenden Effektorzellen führen. Die Desorganisation der einzelnen Kompartimente verhindert wahrscheinlich das Aufeinandertreffen zwischen APCs und naiven T-Zellen. Da nur eine von 1×10^5 bis 1×10^6 naiven T-Zellen einen TCR mit einer ausreichenden Affinität für die injizierten SRBC besitzt um einen Aktivierungsstimulus zu übertragen, bleibt ihre Aktivierung in ND-injizierten Tieren aus.^{15,24} Zum anderen führt das Fehlen von LT und auch LT β zum Verlust von NK T-Zellen⁸⁶, denen auch eine Rolle in der Initiierung der DTH-Reaktion zugesprochen wird. Um in Tieren mit nicht intakter Morphologie herauszufinden, welche Zelltypen benötigt werden und in welchen Kompartimenten sie Interaktionen mit anderen Immunzellen oder dem Antigen eingehen müssen damit sie eine humorale Antwort oder nur eine DTH-Reaktion auslösen können, werden weitere Studien benötigt. Dabei könnten gezielt die Makrophagen der Marginalzone durch den Einsatz von Chlodronat-Liposomen entfernt werden.^{2,81} Verwendet man ein Modell, dem Pertussis Toxin zugesetzt wird, kann die Funktion von DCs als APCs inhibiert werden und auch der Transport von beladenen DCs und Antigen in die T-Zellzone unterbunden werden.⁸ Eine andere Möglichkeit wäre es, die Entstehung von Keimzentren zu verhindern, zum Beispiel durch den Einsatz von microRNA-155¹⁶⁷ oder das Migrieren von Marginalzonen-B-Zellen in den Follikel durch das Entfernen der Sphingosin-Phosphat Rezeptoren 1 und 3 zu unterbinden.²⁸ Einzelne Zelltypen und Vorgänge könnten so identifiziert werden, die für die Initiation einer humoralen bzw. zellulären Immunantwort in und zwischen den einzelnen Kompartimenten grundlegend notwendig sind.

Die Ergebnisse der Versuche an splenektomierten und LT β R-KO Tieren lassen den Schluss zu, dass nicht nur die Milz essentiell ist, sondern schon ihre korrekte Mikroarchitektur, damit nach HD-Applikation ein vollständige Immunantwort

induziert werden kann und nach ND eine DTH ausgelöst wird. Bereits eine veränderte Struktur und Aufteilung der einzelnen Kompartimente und nicht gebildete Keimzentren können ausreichende Zellkontakte und damit die Generation entsprechender Th-Zellpopulationen verhindern. In splenektomierten und LT β R-KO HD-Tiere kann dann nur noch eine DTH-Reaktion ausgelöst werden und in entsprechenden ND-Tieren ist die Initiation einer zellulären Immunantwort nicht mehr möglich.

4.8 Die Lokalisation von Antigen und B-Zellen in der Milz beeinflusst den Verlauf der Immunantwort

SRBC lokalisieren in Marginalzone, Roter Pulpa und T-Zellzone der Milz nach Hochdosis-Applikation

Die Struktur und die richtige Anordnung der einzelnen Kompartimente der Milz sind entscheidend dafür, ob eine humorale oder nur zelluläre Immunantwort ausgelöst werden kann, was im Wesentlichen von der Aktivierung von Th-Zellen abhängt. Damit die Aktivierung stattfinden kann, muss Antigen in die Milz gelangen und nachfolgende Zellkontakte zwischen Ag-beladenen APCs und naiven Th0-Zellen müssen gegeben sein. Das ist an die Mikroarchitektur der einzelnen Kompartimente und das dort befindliche Milieu gebunden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass abhängig von der SRBC-Dosis Unterschiede bei der Lokalisation der SRBC nach intravenöser Applikation bestehen. Die Fluoreszenzmarkierung mit CFSE machte deutlich, dass bei Einsatz der ND keine SRBC auf den Milzschnitten visualisiert werden konnten (Abb.3-20B, links), dies gelang erst bei einer Konzentration von 1×10^8 durch Titration (Abb.3-22). Vergleicht man die in dieser Arbeit eingesetzte Konzentration von 1×10^5 injizierten SRBC mit Versuchen, bei denen stattdessen Parasiten (*Leishmania major*) in gleicher Konzentration eingesetzt wurden, sind diese deutlich in der Marginalzone bereits nach 30 min zu detektieren.⁸ Aichele *et al.* hingegen injizierten CFSE-markierte Bakterien (*Listeria monocytogenes*) intravenös mit einer Konzentration von 5×10^6 . Auch diese Studie lieferte vergleichbare Ergebnisse, bei der nach 30 min die Bakterien in der Marginalzone lokalisierten.² Dass ND-SRBC in der Milz nicht zu visualisieren sind, könnte zum einen daran liegen, dass sich die Anzahl auf nur etwa 78 SRBC pro 12 μ m dickem Milzschnitt beläuft. Bei einem murinen Milzvolumen von etwa 80 μ l ist die

eingesetzte Konzentration zu gering, um sie mit der hier verwendeten Methode zu detektieren.¹²⁶ Zum andern besteht die Möglichkeit, dass SRBC nicht wie Bakterien oder Parasiten nach Applikation in der Marginalzone angereichert werden. Sie lösen keine „Fangfunktion“ (trapping) von in der Marginalzone befindlichen APCs aus. Diese beiden Punkte könnten erklären, warum ND-SRBC durch Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse nicht visualisiert werden konnten (Abb. 3-20 und Abb. 3-21).

Die Ergebnisse, die nach Applikation von Fluoreszenz-markierten HD-SRBC erzielt wurden, spiegelten die Ergebnisse wieder, die in den 80er Jahren durch FITC-Markierung von HD-SRBC im Rattenmodell erzielt wurden.¹⁵⁹ Damit scheint die Lokalisation von SRBC in Ratten auf das hier eingesetzte Mausmodell übertragbar zu sein und entsprechend abzulaufen. In unserem Versuch lokalisierten die HD-SRBC bereits nach 1 h in der Marginalzone und waren nach einer weiteren Stunde in der Roten Pulpa zu finden. Einzelne fluoreszierende SRBC konnten nach 9 h in der T-Zellzone detektiert werden (Abb.3-20C, Mitte).

Die Lokalisation von HD-SRBC verläuft damit nach Eintritt in die Milz von der Marginalzone über die Rote Pulpa in die T-Zellzone. Dieser Verlauf entspricht nicht nur dem von Parasiten⁸ und Bakterien², sondern auch dem des Murinen Cytomegalovirus (MCMV).⁶⁸ Vergleicht man den Detektionszeitraum der SRBC mit Bakterien, Parasiten als auch Viren, ist dieser wesentlich kürzer, was vermutlich daraus resultiert, dass SRBC, als nicht replizierbares Antigen, schnell in der Milz abgebaut werden.

Obwohl es in der Milz von ND-Tieren weder zu einer erhöhten Zytokine- noch Chemokinexpression in den einzelnen Kompartimenten kam, müssen dort naive Th-Zellen aktiviert worden sein, denn eine anschließende DTH-Reaktion wurde durch einen zweiten Antigenkontakt induziert. Es liegt also nahe zu vermuten, dass ND-SRBC, obwohl sie nicht zu detektieren waren, an gleicher Stelle wie HD-SRBC lokalisieren und somit über die Marginalzone in die Milz eintreten und in der T-Zellzone naiven Th-Zellen präsentiert werden.

Akkumulierende B-Zellen in der Marginalzone haben einen Einfluss auf die Antigen-dosis-abhängige Immunantwort

Weder Zytokin- und Chemokinexpression, noch die Lokalisation von ND-SRBC in den Kompartimenten der Milz konnten zeigen, wo genau die Generation der DTH-induzierenden Th1-Zellen initiiert wird. Dass sie in der T-Zellzone aktiviert worden sein müssen, bestätigt die induzierte DTH-Reaktion nach zweitem Antigenkontakt, die hingegen bei splenektomierten Tieren ausbleibt. Das einzige Ergebnis dieser Arbeit, das darauf hinweist, dass die Applikation einer SRBC-ND eine Reaktion in der Milz auslöst, war die signifikant zu HD-Tieren ausgedehnte Marginalzone, die immunhistologisch auf MOMA-1/B220-gefärbten Milzschnitte zwischen 1 h und 24 h zu sehen war (Abb.3-23A). Diese Ausdehnung wurde wahrscheinlich durch die massive Menge an dort befindlichen B-Zellen verursacht, vermutlich Marginalzonen-B-Zellen. Diese Ergebnisse haben uns zu der Hypothese veranlasst, dass ND- und HD-SRBC zwar beide über die Marginalzone in die Milz eintreten, aber dann unterschiedlich prozessiert werden und damit andere Th-Zellpopulationen induzieren. Wir vermuten, dass ND-SRBC in der Marginalzone vollständig von MZ-B-Zellen phagozytiert, prozessiert und präsentiert werden. Dadurch würden Th-Zellen generiert, die einen PSGL-1 Liganden (auch ein anderer Selektin-Ligand wäre denkbar) besitzen und damit in die Haut migrieren könnten¹⁶, um dort eine DTH-Reaktion zu initiieren. HD-SRBC würden vergleichsweise von vielen verschiedenen APCs phagozytiert werden, was daran liegt, dass sie nicht nur in der MZ, sondern auch bis in die RP und TZ vordringen. Die Präsentation von anderen APCs würde zu einem Verlust der Aktivierung von PSGL-1 führen und ihnen damit den Weg in die Haut versperren. Es würden so nach sekundärem SRBC-Kontakt Th2-Zellen entstehen, die in der Milz eine humorale Immunantwort initiieren könnten.

Es ist bekannt, dass MZ-B-Zellen zusammen mit anderen Zellen des angeborenen Immunsystems die erste Verteidigungslinie gegen blutständige Pathogene in der Marginalzone bilden. Sie haben dadurch eine entscheidende Rolle in der Marginalzone¹²⁵, können direkt T-Zellen aktivieren aber auch mit anderen APCs interagieren, um Ag zu transportieren, was für den weiteren Verlauf der T-zellabhängigen Immunantwort notwendig ist.^{98, 99} Schon Martin und Kearney haben anhand eines Thymus-unabhängigen Antigens nach intraperitonealer Injektion einer

Niedrigdosis herausgefunden, dass die erste und fast ausschließlich antwortende Zellpopulation MZ-B-Zellen in der Milz sind.⁹⁴ Durch Injektion von 2×10^6 toten *Streptococcus pneumoniae* konnten Balazs *et al.* zeigen, dass partikuläres Antigen bereits im Blut neben Neutrophilen bevorzugt von dort befindlichen CD11c^{low} exprimierenden DCs aufgenommen wird. Erreichen diese die Marginalzone der Milz, bilden sie Cluster mit MZ-B-Zellen und führen zu deren Aktivierung.¹² Dieser Vorgang könnte auch eine mögliche Erklärung sein, warum im Blut und Milzhomogenat nach ND-Applikation keine SRBC detektiert werden konnten. Es wurde *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass MZ-B-Zellen schnell und effizient Ag fangen, prozessieren und T-Zellen präsentieren können, als auch kostimulierende Signale an T-Zellen weiterleiten.^{10, 129,}

177

Im Gegensatz dazu haben folliculäre B-Zellen, die nach SRBC-HD für die Bildung von Antikörpern verantwortlich sind, eine reduzierte Kapazität, um Effektorzellen in den frühen Stadien der Immunantwort gegen partikuläre Antigene in diesem anatomischen Bereich effizient zu generieren.¹⁰⁷ Nach Injektion gelangen die HD-SRBC direkt in die Marginalzone der Milz. Da es in diesen Tieren aber nicht zur Ausdehnung der Marginalzone, noch zu einer erhöhten Anzahl an MZ-B-Zellen gekommen ist (Abb.3-19B), kann man davon ausgehen, dass das Antigen nicht bevorzugt MZ-B-Zellen, sondern über andere APCs zur T-Zellaktivierung führt. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der Lokalisation der HD-SRBC (Abb.3-16B und C) haben deutlich gemacht, dass die große Anzahl an SRBC nicht ausschließlich in der Marginalzone angesammelt werden konnte, sondern bis in die Rote Pulpa vorrückte. Die Ag-Aufnahme ist damit nicht ausschließlich auf die Marginalzone beschränkt. Betrachtet man dazu Untersuchungen von Cinamon *et al.* wird klar, dass MZ-B-Zellen nicht nur in der Marginalzone resident sind, sondern auch in Follikel migrieren können. Dieses so genannte „Shutteln“ ist abhängig von der Balance zwischen Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor (S1P₁) und dem Chemokinrezeptor CXCR5. Positionieren sich die MZ-B-Zellen in der B-Zellzone, können sie das Komplementopsonierte Antigen auf folliculär Dendritische Zellen (FDCs) übertragen.²⁸

Eine SRBC-ND würde zur Expansion der Marginalzone durch Akkumulation der MZ-B-Zellen führen, eine HD zur Abwanderung der B-Zellpopulation aus der Marginalzone in andere Kompartimente. Auch ein Rückschluss auf die Bindungsstärke des BCR-

Diskussion

Signals bei der Entwicklung noch nicht reifer B-Zellen wäre denkbar. ND-Antigen würde zu einem stärkeren BCR-Bindungssignal führen und so zur Entwicklung einer reifen MZ-B-Zelle, wohingegen HD-Antigen diese Entwicklung nicht unterstützt und stattdessen zur Reifung einer folliculären B-Zelle führt.¹⁷⁴

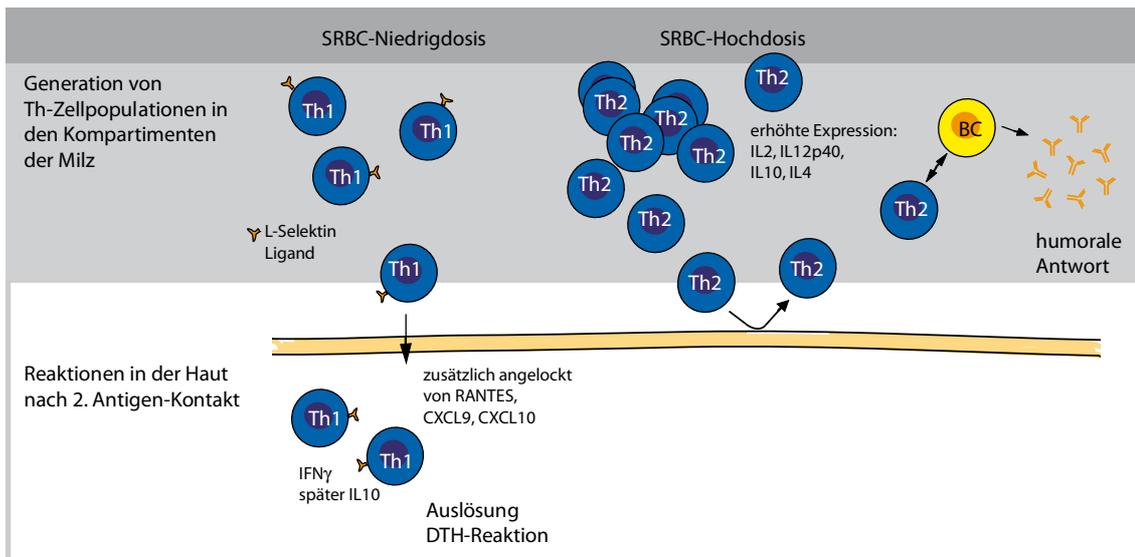


Abb. 4-1 Modell zur SRBC-Dosis abhängigen Steuerung einer T-zellabhängigen Immunantwort

Das Modell zeigt die Vorgänge, die sich nach primärer intravenöser Injektion in den Kompartimenten der Milz abspielen könnten: Abhängig von der injizierten Dosis entstehen nach ND Th1-Zellen, die einen Selektin-Liganden auf ihrer Oberfläche hochexprimieren und ihnen damit das Eintreten ins Gewebe ermöglichen. Nach HD-Applikationen werden deutlich vermehrt Zytokine exprimiert, die zur Generation sehr vieler Th2-Zellen führen (hellgrau hinterlegter Bereich). Nach sekundärem subkutanem SRBC-Kontakt gelangen Th1-Zellen in die Haut, was durch die Chemoattraktion von RANTES, CXCL9 und CXCL10 unterstützt wird. Eine DTH-Reaktion kann lokal ausgelöst werden (weiß hinterlegter Bereich). Th2-Zellen hingegen bleibt der Zutritt in die Haut versperrt, sie können in der Milz B-Zellen (BC) aktivieren und so durch deren Antikörpersekretion eine humorale Antwort induzieren.

Alle Ergebnisse zusammenfassend lässt sich folgende Vorstellung über die SRBC-Dosis abhängige Auslösung der unterschiedlichen Immunantworten im Mausmodell konstruieren:

Ausschließlich abhängig von der intravenös applizierten SRBC-Dosis werden zwei verschiedene Immunantworten induziert: eine zelluläre nach ND-Gabe, eine humorale nach HD-Gabe. Die unterschiedliche Regulation beginnt bereits nach Eintritt der SRBC in die Milz. Vermutlich werden die wenigen SRBC in der Marginalzone bereits vollständig von MZ-B-Zellen aufgenommen, prozessiert und präsentiert. Das führt

dazu, dass Th1-Zellen aktiviert werden, die einen L-Selektin Liganden (dabei handelt es sich möglicherweise um PSGL-1) auf ihrer Oberfläche besitzen und damit nach sekundärem Antigenkontakt in die Haut immigrieren können. Aufgrund ihrer geringen Anzahl sind sie jedoch nicht visuell und auf Zytokinexpressionsebene zu detektieren. Hingegen werden HD-SRBC nicht nur in der MZ, sondern auch in RP und TZ von verschiedenen APCs aufgenommen. Dadurch werden Th-Zellen aktiviert, die keinen L-Selektin Liganden auf ihrer Oberfläche besitzen und gelangen nicht in die Haut. Die Zytokinexpression hat gezeigt, dass in diesen Tieren zunächst Th1-typische, aber später Th2-typische Zytokine exprimiert werden, die zur Induktion von Th2-Zellen führen. Diese sorgen nachfolgend durch Interaktion mit B-Zellen zu deren Aktivierung, sodass sie in den B-Zellzonen Keimzentren bilden und im weiteren Verlauf durch Antikörper-Sekretion eine humorale Antwort initiieren (siehe dazu auch das Modell in Abb.4-1). Viele in dieser Diskussion angestellten Überlegungen sind hypothetischer Natur. Diese gilt es durch weitere Analysen und Experimente zu verwerfen oder zu verifizieren, um durch das Ineinanderrücken einzelner Bausteine ein grundlegendes Verständnis der immunologischen Vorgänge im gesunden Organismus zu ermöglichen und dieses Wissen auf Erkrankungen des Immunsystems und deren Heilung anwenden zu können.

5 Zusammenfassung

Th-Zellen spielen bei der Induktion einer erworbenen Immunantwort zur Protektion gegen verschiedene intrazelluläre und extrazelluläre Pathogene eine entscheidende Rolle. Sie differenzieren aus naiven $CD4^+$ T-Zellen zu unterschiedlichen Th-Zellen, was durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst wird und vor allem von der Expression verschiedener Zytokine abhängt.

Frühe Studien mit dem murinen DTH (delayed type hypersensitivity)-Modell haben gezeigt, dass einzig und allein die Dosiserhöhung eines applizierten Antigens ausreicht, damit verschiedener Th-Zellpopulationen induziert werden. Das Injizieren einer intravenösen Niedrigdosis des T-zellabhängigen Modellantigens SRBC (sheep red blood cells) in diesem Modell, löste nach sekundärem Antigenkontakt in der Haut eine DTH-Reaktion aus, die sich durch eine lokale Schwellung des Fußballens äußerte. Diese zelluläre Antwort wurde auf die Entstehung von Th1-Zellen zurückgeführt. Nach Applikation einer SRBC-Hochdosis blieb hingegen die DTH-Reaktion nach sekundärer SRBC-Applikation in der Haut aus, stattdessen entstanden Keimzentren in den Follikeln und die Antikörperbildung konnte anhand eines erhöhten IgG-Spiegels im Serum nachgewiesen werden. Da die Milz das einzige sekundär lymphatische Organ dieser Tiere ist, in das die intravenös applizierten SRBC mit dem Blutstrom gelangen konnten, musste sie der Generierungsort der Th-Zellen sein.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb erstmals die Unterschiede in der Zytokinexpression in den einzelnen Kompartimenten der Milz Aufschluss darüber geben, warum ausschließlich die Dosiserhöhung des Antigens verschiedene Th-Zellpopulationen induziert und wie die Differenzierung dieser Th-Zellen auf Zytokinebene in der murinen Milz gesteuert wird. Unter Zuhilfenahme der sehr sensitiven Methode der Lasermikrodissektion konnte zunächst in naiven Tieren gezeigt werden, dass Expressionsunterschiede zwischen einzelnen Zytokinen und auch Kompartimenten zu detektieren sind. Entgegen der Erwartungen wurde in Niedrigdosis-Tieren jedoch keine erhöhte Th1-typische Zytokinexpression gemessen, in Hochdosis-Tieren hingegen konnte eine signifikante Expression Th2-typischer

Zytokine (IL10 und IL4) gezeigt werden. Da dennoch in der Haut von Niedrigdosis-Tieren eine DTH-Reaktion initiiert werden konnte und damit Th1-Zellen entstanden sein mussten, erfolgte eine Analyse der Haut sowohl der Niedrig- als auch Hochdosisgruppe hinsichtlich ihres Zytokin-, Chemokin- und Zellmarkerprofils. Obwohl in beiden Gruppen allgemeine Entzündungsmediatoren hochreguliert wurden (Gr-1, CD11c, Mac-1, KC, MIP-1 α), war nur in der Haut von Niedrigdosistieren das Th1-typische IFN γ exprimiert, was bestätigte, dass ausschließlich in die Haut von Niedrigdosis-Tieren die DTH-vermittelnden Th-Zellen immigrieren konnten.

Die histologischen Untersuchungen der Milzen beider Gruppen nach intravenöser Applikation machten deutlich, dass signifikant mehr T-Zellen in den T-Zellzonen der Hochdosis-Tiere entstanden waren. Dies veranlasste uns zu der Frage, ob die vielen entstandenen T-Zellen in der Milz gefangen waren. Die Ergebnisse nachfolgender DTH-Versuche in Tieren, die Zellen durch adoptiven Milzzellen-Transfer aus Hochdosis-induzierten Tieren erhalten haben, zeigten, dass die T-Zellen in der Lage waren die Milz zu verlassen. Sie unterstützt außerdem die Hypothese, dass ihnen wichtige Mediatoren fehlen, um in die Haut einzuwandern. In weiterführenden Studien sollten daher die durch Hochdosis induzierten Th-Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle untersucht werden. Es ist zu erwarten, dass ihnen entscheidende Selektine auf ihrer Oberfläche fehlen, die dieser Th-Zellpopulation das Immigrieren in die Haut ermöglicht.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die Notwendigkeit der intakten Milzstruktur für die Auslösung der DTH-Reaktion untersucht. Lymphotoxin β -Knockout Tiere, die eine zerstörte Milzstruktur aufweisen, induzierten nach SRBC-Hochdosisapplikation eine deutliche DTH-Reaktion. Dieses Ergebnis zeigte, dass bei zerstörter Milzstruktur keine humorale Immunantwort mehr eingeleitet werden kann. Die Differenzierung von Th2-Zellen ist nicht mehr möglich, stattdessen werden Th1-Zellen induziert, die eine DTH-Reaktion initiiert haben.

Die Entstehung von Th1-Zellen und Th2-Zellen kann nach den in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen nicht, wie erwartet, direkt auf die Expression Th1- bzw. Th2-typischer Zytokine zurückgeführt werden. Wie die hier erzielten Ergebnisse zeigen, scheint die Regulation der Differenzierung von Th-Zellpopulationen durch

Zusammenfassung

Zytokine wesentlich komplexer zu sein als gedacht. Um diese grundlegenden Vorgänge der Steuerung durch Zytokine genauer zu verstehen, bedarf es in der Zukunft weiterer Untersuchungen.

Literatur

1. Abbas, A. K., K. M. Murphy, and A. Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*. 383:787-793, 1996.
2. Aichele, P., J. Zinke, L. Grode, R. A. Schwendener, S. H. Kaufmann, and P. Seiler. Macrophages of the splenic marginal zone are essential for trapping of blood-borne particulate antigen but dispensable for induction of specific T cell responses. *J Immunol*. 171:1148-1155, 2003.
3. Alimzhanov, M. B., D. V. Kuprash, M. H. Kosco-Vilbois, A. Luz, R. L. Turetskaya, A. Tarakhovskiy, K. Rajewsky, S. A. Nedospasov, and K. Pfeffer. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin beta-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:9302-9307, 1997.
4. Allen, C. D. and J. G. Cyster. Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol*. 20:14-25, 2008.
5. Anderson, C. F., M. Oukka, V. J. Kuchroo, and D. Sacks. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 204:285-297, 2007.
6. Annunziato, F. and S. Romagnani. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. *Arthritis Res Ther*. 11:257, 2009.
7. Ansel, K. M., V. N. Ngo, P. L. Hyman, S. A. Luther, R. Forster, J. D. Sedgwick, J. L. Browning, M. Lipp, and J. G. Cyster. A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. *Nature*. 406:309-314, 2000.
8. Aoshi, T., B. H. Zinselmeyer, V. Konjufca, J. N. Lynch, X. Zhang, Y. Koide, and M. J. Miller. Bacterial entry to the splenic white pulp initiates antigen presentation to CD8+ T cells. *Immunity*. 29:476-486, 2008.
9. Ato, M., H. Nakano, T. Kakiuchi, and P. M. Kaye. Localization of marginal zone macrophages is regulated by C-C chemokine ligands 21/19. *J Immunol*. 173:4815-4820, 2004.
10. Attanavanich, K. and J. F. Kearney. Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells. *J Immunol*. 172:803-811, 2004.
11. Axelrad, M. A. Suppression of delayed hypersensitivity by antigen and antibody. Is a common precursor cell responsible for both delayed hypersensitivity and antibody formation? *Immunology*. 15:159-171, 1968.
12. Balazs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. Kearney. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity*. 17:341-352, 2002.
13. Biozzi, G., C. Stiffel, D. Mouton, Y. Bouthillier, and C. Deceusefond. A kinetic study of antibody producing cells in the spleen of mice immunized intravenously with sheep erythrocytes. *Immunology*. 14:7-20, 1968.
14. Black, C. A. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. *Dermatol Online J*. 5:7, 1999.
15. Blattman, J. N., R. Antia, D. J. Sourdive, X. Wang, S. M. Kaech, K. Murali-Krishna, J. D. Altman, and R. Ahmed. Estimating the precursor frequency of naive antigen-specific CD8 T cells. *J Exp Med*. 195:657-664, 2002.

16. Borges, E., W. Tietz, M. Steegmaier, T. Moll, R. Hallmann, A. Hamann, and D. Vestweber. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on T helper 1 but not on T helper 2 cells binds to P-selectin and supports migration into inflamed skin. *J Exp Med.* 185:573-578, 1997.
17. Bousso, P. and E. Robey. Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat Immunol.* 4:579-585, 2003.
18. Braun, W. and H. B. Levy. Interferon preparations as modifiers of immune responses. *Proc Soc Exp Biol Med.* 141:769-773, 1972.
19. Brodeur, B. R. and T. C. Merigan. Mechanism of the suppressive effect of interferon on antibody synthesis in vivo. *J Immunol.* 114:1323-1328, 1975.
20. Brodeur, B. R. and T. C. Merigan. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. *J Immunol.* 113:1319-1325, 1974.
21. Brown, C. R., V. A. Blaho, and C. M. Loiacono. Susceptibility to experimental Lyme arthritis correlates with KC and monocyte chemoattractant protein-1 production in joints and requires neutrophil recruitment via CXCR2. *J Immunol.* 171:893-901, 2003.
22. Butcher, E. C. and L. J. Picker. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 272:60-66, 1996.
23. Campbell, D. J., C. H. Kim, and E. C. Butcher. Separable effector T cell populations specialized for B cell help or tissue inflammation. *Nat Immunol.* 2:876-881, 2001.
24. Casrouge, A., E. Beaudoin, S. Dalle, C. Pannetier, J. Kanellopoulos, and P. Kourilsky. Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naive mouse splenocytes. *J Immunol.* 164:5782-5787, 2000.
25. Chen, H. and W. E. Paul. A population of CD62L^{low} Nk1.1- CD4⁺ T cells that resembles NK1.1+ CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol.* 28:3172-3182, 1998.
26. Cher, D. J. and T. R. Mosmann. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. *J Immunol.* 138:3688-3694, 1987.
27. Chester, T. J., K. Paucker, and T. C. Merigan. Suppression of mouse antibody producing spleen cells by various interferon preparations. *Nature.* 246:92-94, 1973.
28. Cinamon, G., M. A. Zachariah, O. M. Lam, F. W. Foss, Jr., and J. G. Cyster. Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol.* 9:54-62, 2008.
29. Constant, S. L. and K. Bottomly. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol.* 15:297-322, 1997.
30. Cook, D. N. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leukoc Biol.* 59:61-66, 1996.
31. Cyster, J. G. B cells on the front line. *Nat Immunol.* 1:9-10, 2000.
32. Cyster, J. G. Chemokines, sphingosine-1-phosphate, and cell migration in secondary lymphoid organs. *Annu Rev Immunol.* 23:127-159, 2005.
33. Cyster, J. G., K. M. Ansel, K. Reif, E. H. Ekland, P. L. Hyman, H. L. Tang, S. A. Luther, and V. N. Ngo. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev.* 176:181-193, 2000.
34. De Filippo, K., R. B. Henderson, M. Laschinger, and N. Hogg. Neutrophil chemokines KC and macrophage-inflammatory protein-2 are newly synthesized

- by tissue macrophages using distinct TLR signaling pathways. *J Immunol.* 180:4308-4315, 2008.
35. De Togni, P., J. Goellner, N. H. Ruddle, P. R. Streeter, A. Fick, S. Mariathasan, S. C. Smith, R. Carlson, L. P. Shornick, J. Strauss-Schoenberger, and et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science.* 264:703-707, 1994.
36. Doebis, C., K. Siegmund, C. Loddenkemper, J. B. Lowe, A. C. Issekutz, A. Hamann, J. Huehn, and U. Syrbe. Cellular players and role of selectin ligands in leukocyte recruitment in a T-cell-initiated delayed-type hypersensitivity reaction. *Am J Pathol.* 173:1067-1076, 2008.
37. Dorhoi, A. and S. H. Kaufmann. Fine-tuning of T cell responses during infection. *Curr Opin Immunol.* 21:367-377, 2009.
38. Dorner, B. G., A. Scheffold, M. S. Rolph, M. B. Huser, S. H. Kaufmann, A. Radbruch, I. E. Flesch, and R. A. Kroczyk. MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:6181-6186, 2002.
39. Dufour, J. H., M. Dziejman, M. T. Liu, J. H. Leung, T. E. Lane, and A. D. Luster. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol.* 168:3195-3204, 2002.
40. Ebert, E. C. Sheep red blood cells enhance T-lymphocyte proliferation. *Clin Immunol Immunopathol.* 37:203-212, 1985.
41. Falkoff, R. and J. Kettman. Differential stimulation of precursor cells and carrier-specific thymus-derived cell activity in the in vivo response to heterologous erythrocytes in mice. *J Immunol.* 108:54-58, 1972.
42. Fazilleau, N., L. J. McHeyzer-Williams, and M. G. McHeyzer-Williams. Local development of effector and memory T helper cells. *Curr Opin Immunol.* 19:259-267, 2007.
43. Feuerer, M., P. Beckhove, N. Garbi, Y. Mahnke, A. Limmer, M. Hommel, G. J. Hammerling, B. Kyewski, A. Hamann, V. Umansky, and V. Schirmacher. Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med.* 9:1151-1157, 2003.
44. Feuerer, M., K. Eulenburg, C. Loddenkemper, A. Hamann, and J. Huehn. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol.* 176:2857-2863, 2006.
45. Fink, L., W. Seeger, L. Ermert, J. Hanze, U. Stahl, F. Grimminger, W. Kummer, and R. M. Bohle. Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med.* 4:1329-1333, 1998.
46. Fogg, D. K., C. Sibon, C. Miled, S. Jung, P. Aucouturier, D. R. Littman, A. Cumano, and F. Geissmann. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science.* 311:83-87, 2006.
47. Fong, T. A. and T. R. Mosmann. The role of IFN-gamma in delayed-type hypersensitivity mediated by Th1 clones. *J Immunol.* 143:2887-2893, 1989.
48. Forster, R., A. E. Mattis, E. Kremmer, E. Wolf, G. Brem, and M. Lipp. A putative chemokine receptor, BLR1, directs B cell migration to defined lymphoid organs and specific anatomic compartments of the spleen. *Cell.* 87:1037-1047, 1996.

49. Fütterer, A., K. Mink, A. Luz, M. H. Kosco-Vilbois, and K. Pfeffer. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*. 9:59-70, 1998.
50. Gallo, P., R. Goncalves, and D. M. Mosser. The influence of IgG density and macrophage Fc (gamma) receptor cross-linking on phagocytosis and IL-10 production. *Immunol Lett*. 133:70-77, 2010.
51. Gell, P. H. G. and R. A. A. Coombs. Clinical Aspects in Immunology. *Blackwell, Oxford*, 1968.
52. Getahun, A. and B. Heyman. Studies on the mechanism by which antigen-specific IgG suppresses primary antibody responses: evidence for epitope masking and decreased localization of antigen in the spleen. *Scand J Immunol*. 70:277-287, 2009.
53. Ghani, S., M. Feuerer, C. Doebis, U. Lauer, C. Loddenkemper, J. Huehn, A. Hamann, and U. Syrbe. T cells as pioneers: antigen-specific T cells condition inflamed sites for high-rate antigen-non-specific effector cell recruitment. *Immunology*. 128:e870-880, 2009.
54. Gray, D. and P. Matzinger. T cell memory is short-lived in the absence of antigen. *J Exp Med*. 174:969-974, 1991.
55. Greenwald, R. J., G. J. Freeman, and A. H. Sharpe. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 23:515-548, 2005.
56. Gunn, M. D., K. Tangemann, C. Tam, J. G. Cyster, S. D. Rosen, and L. T. Williams. A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:258-263, 1998.
57. Gutman, G. A. and I. L. Weissman. Lymphoid tissue architecture. Experimental analysis of the origin and distribution of T-cells and B-cells. *Immunology*. 23:465-479, 1972.
58. Hahn, H., S. H. Kaufmann, F. Falkenberg, M. Chahinin, and W. Horn. Peritoneal exudate T lymphocytes with specificity to sheep red blood cells. II. Inflammatory helper T cells and effector T cells in mice with delayed-type hypersensitivity and in suppressed mice. *Immunology*. 38:51-55, 1979.
59. Hahn, H., S. H. Kaufmann, T. E. Miller, and G. B. Mackaness. Peritoneal exudate T lymphocytes with specificity to sheep red blood cells. I. Production and characterization as to function and phenotype. *Immunology*. 36:691-698, 1979.
60. Hao, L., J. Klein, and M. Nei. Heterogeneous but conserved natural killer receptor gene complexes in four major orders of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:3192-3197, 2006.
61. Haring, J. S., V. P. Badovinac, and J. T. Harty. Inflaming the CD8+ T cell response. *Immunity*. 25:19-29, 2006.
62. Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy, and C. T. Weaver. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 6:1123-1132, 2005.
63. Henrickson, S. E., T. R. Mempel, I. B. Mazo, B. Liu, M. N. Artyomov, H. Zheng, A. Peixoto, M. P. Flynn, B. Senman, T. Junt, H. C. Wong, A. K. Chakraborty, and U. H. von Andrian. T cell sensing of antigen dose governs

- interactive behavior with dendritic cells and sets a threshold for T cell activation. *Nat Immunol.* 9:282-291, 2008.
64. Holler, P. D. and D. M. Kranz. Quantitative analysis of the contribution of TCR/pepMHC affinity and CD8 to T cell activation. *Immunity.* 18:255-264, 2003.
65. Horuk, R., C. E. Chitnis, W. C. Darbonne, T. J. Colby, A. Rybicki, T. J. Hadley, and L. H. Miller. A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor. *Science.* 261:1182-1184, 1993.
66. Hsieh, C. S., A. B. Heimberger, J. S. Gold, A. O'Garra, and K. M. Murphy. Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6065-6069, 1992.
67. Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra, and K. M. Murphy. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science.* 260:547-549, 1993.
68. Hsu, K. M., J. R. Pratt, W. J. Akers, S. I. Achilefu, and W. M. Yokoyama. Murine cytomegalovirus displays selective infection of cells within hours after systemic administration. *J Gen Virol.* 90:33-43, 2009.
69. Hunter, C. A. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 5:521-531, 2005.
70. Hurtrel, B., M. A. Maire, M. Hurtrel, and P. H. Lagrange. Different time course patterns of local expression of delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in mice. *Cell Immunol.* 142:252-263, 1992.
71. Itano, A. A., S. J. McSorley, R. L. Reinhardt, B. D. Ehst, E. Ingulli, A. Y. Rudensky, and M. K. Jenkins. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity.* 19:47-57, 2003.
72. Jacysyn, J. F., I. A. Abrahamsohn, and M. S. Macedo. IL-4 from Th2-type cells suppresses induction of delayed-type hypersensitivity elicited shortly after immunization. *Immunol Cell Biol.* 81:424-430, 2003.
73. Junt, T., E. Scandella, and B. Ludewig. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol.* 8:764-775, 2008.
74. Kalies, K., P. Konig, Y. M. Zhang, M. Deierling, J. Barthelmann, C. Stamm, and J. Westermann. Nonoverlapping expression of IL10, IL12p40, and IFNgamma mRNA in the marginal zone and T cell zone of the spleen after antigenic stimulation. *J Immunol.* 180:5457-5465, 2008.
75. Karrer, U., A. Althage, B. Odermatt, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. Immunodeficiency of alymphoplasia mice (aly/aly) in vivo: structural defect of secondary lymphoid organs and functional B cell defect. *Eur J Immunol.* 30:2799-2807, 2000.
76. Katakai, T., H. Suto, M. Sugai, H. Gonda, A. Togawa, S. Suematsu, Y. Ebisuno, K. Katagiri, T. Kinashi, and A. Shimizu. Organizer-like reticular stromal cell layer common to adult secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 181:6189-6200, 2008.
77. Katz, D. H. and B. Benacerraf. The regulatory influence of activated T cells on B cell responses to antigen. *Adv Immunol.* 15:1-94, 1972.

78. Kaufmann, S. H., J. S. Ahmed, M. Chahin, and H. Hahn. Peritoneal exudate T lymphocytes with specificity to sheep red blood cells. III. High dose of antigen induces suppressor T cells which influence the appearance in exudates of effector T cells for delayed-type hypersensitivity and helper T cells for humoral immune responses. *Immunology*. 38:613-619, 1979.
79. Kaufmann, S. H., R. Schauer, and H. Hahn. Carbohydrate surface constituents of T cells mediating delayed-type hypersensitivity that control entry into sites of antigen deposition. *Immunobiology*. 160:184-195, 1981.
80. Kellermann, S. A., S. Hudak, E. R. Oldham, Y. J. Liu, and L. M. McEvoy. The CC chemokine receptor-7 ligands 6CKine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *J Immunol*. 162:3859-3864, 1999.
81. Kirby, A. C., L. Beattie, A. Maroof, N. van Rooijen, and P. M. Kaye. SIGNR1-negative red pulp macrophages protect against acute streptococcal sepsis after *Leishmania donovani*-induced loss of marginal zone macrophages. *Am J Pathol*. 175:1107-1115, 2009.
82. Koni, P. A., R. Sacca, P. Lawton, J. L. Browning, N. H. Ruddle, and R. A. Flavell. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins alpha and beta revealed in lymphotoxin beta-deficient mice. *Immunity*. 6:491-500, 1997.
83. Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 27:485-517, 2009.
84. Korner, H., M. Cook, D. S. Riminton, F. A. Lemckert, R. M. Hoek, B. Ledermann, F. Kontgen, B. Fazekas de St Groth, and J. D. Sedgwick. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. *Eur J Immunol*. 27:2600-2609, 1997.
85. Kosco-Vilbois, M. H. Are follicular dendritic cells really good for nothing? *Nat Rev Immunol*. 3:764-769, 2003.
86. Kronenberg, M. and L. Gapin. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol*. 2:557-568, 2002.
87. Kuprash, D. V., M. B. Alimzhanov, A. V. Tumanov, A. O. Anderson, K. Pfeffer, and S. A. Nedospasov. TNF and lymphotoxin beta cooperate in the maintenance of secondary lymphoid tissue microarchitecture but not in the development of lymph nodes. *J Immunol*. 163:6575-6580, 1999.
88. Lagrange, P. H. and G. B. Mackaness. A stable form of delayed-type hypersensitivity. *J Exp Med*. 141:82-96, 1975.
89. Lagrange, P. H., G. B. Mackaness, and T. E. Miller. Influence of dose and route of antigen injection on the immunological induction of T cells. *J Exp Med*. 139:528-542, 1974.
90. Larousserie, F., E. Bardel, S. Pflanz, B. Arnulf, C. Lome-Maldonado, O. Hermine, L. Bregeaud, M. Perennec, N. Brousse, R. Kastelein, and O. Devergne. Analysis of interleukin-27 (EBI3/p28) expression in Epstein-Barr virus- and human T-cell leukemia virus type 1-associated lymphomas: heterogeneous expression of EBI3 subunit by tumoral cells. *Am J Pathol*. 166:1217-1228, 2005.
91. Le Hir, M., H. Bluethmann, M. H. Kosco-Vilbois, M. Muller, F. di Padova, M. Moore, B. Ryffel, and H. P. Eugster. Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. *J Exp Med*. 183:2367-2372, 1996.

92. Lebre, M. C., T. Burwell, P. L. Vieira, J. Lora, A. J. Coyle, M. L. Kapsenberg, B. E. Clausen, and E. C. De Jong. 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.
93. Li, L., J. F. Elliott, and T. R. Mosmann. IL-10 inhibits cytokine production, vascular leakage, and swelling during T helper 1 cell-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol.* 153:3967-3978, 1994.
94. Li, X., F. Martin, A. M. Oliver, J. F. Kearney, and R. H. Carter. Antigen receptor proximal signaling in splenic B-2 cell subsets. *J Immunol.* 166:3122-3129, 2001.
95. Liew, F. Y. Regulation of delayed-type hypersensitivity. I. T suppressor cells for delayed-type hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice. *Eur J Immunol.* 7:714-718, 1977.
96. Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 25:402-408, 2001.
97. Loetscher, M., B. Gerber, P. Loetscher, S. A. Jones, L. Piali, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 184:963-969, 1996.
98. Lopes-Carvalho, T., J. Foote, and J. F. Kearney. Marginal zone B cells in lymphocyte activation and regulation. *Curr Opin Immunol.* 17:244-250, 2005.
99. Lopes-Carvalho, T. and J. F. Kearney. Development and selection of marginal zone B cells. *Immunol Rev.* 197:192-205, 2004.
100. Luo, W., J. Fine, M. Garg, A. M. Kaplan, and S. Bondada. Interleukin-10 enhances immune responses to pneumococcal polysaccharides and sheep erythrocytes in young and aged mice. *Cell Immunol.* 195:1-9, 1999.
101. Luster, A. D. and J. V. Ravetch. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med.* 166:1084-1097, 1987.
102. Luther, S. A. and J. G. Cyster. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2:102-107, 2001.
103. Luther, S. A., H. L. Tang, P. L. Hyman, A. G. Farr, and J. G. Cyster. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:12694-12699, 2000.
104. Mackaness, G. B. and P. H. Lagrange. Restoration of cell-mediated immunity to animals blocked by a humoral response. *J Exp Med.* 140:865-870, 1974.
105. Mackaness, G. B., P. H. Lagrange, T. E. Miller, and T. Ishibashi. Feedback inhibition of specifically sensitized lymphocytes. *J Exp Med.* 139:543-559, 1974.
106. Marchal, G., G. Milon, B. Hurtrel, and P. H. Lagrange. Titration and circulation of cells mediating delayed type hypersensitivity in normal and cyclophosphamide treated mice during response to sheep red blood cells. *Immunology.* 35:981-987, 1978.
107. Martin, F. and J. F. Kearney. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev.* 175:70-79, 2000.

108. Martin, F. and J. F. Kearney. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol.* 2:323-335, 2002.
109. Maurer, M. and E. von Stebut. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1882-1886, 2004.
110. McMaster, P. D. and S. S. Hudack. The Formation of Agglutinins within Lymph Nodes. *J Exp Med.* 61:783-805, 1935.
111. Mebius, R. E. and G. Kraal. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol.* 5:606-616, 2005.
112. Miller, S. A. and A. S. Weinmann. Common themes emerge in the transcriptional control of T helper and developmental cell fate decisions regulated by the T-box, GATA and ROR families. *Immunology.* 126:306-315, 2009.
113. Miller, T. E., G. B. Mackaness, and P. H. Lagrange. Immunopotential with BCG. II. Modulation of the response to sheep red blood cells. *J Natl Cancer Inst.* 51:1669-1676, 1973.
114. Mills, K. H. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol.* 4:841-855, 2004.
115. Milon, G., G. Marchal, M. Seman, P. Truffa-Bachi, and V. Zilberfarb. Is the delayed-type hypersensitivity observed after a low dose of antigen mediated by helper T cells? *J Immunol.* 130:1103-1107, 1983.
116. Miyazaki, Y., Y. Shimanoe, S. Wang, and H. Yoshida. Amelioration of delayed-type hypersensitivity responses by IL-27 administration. *Biochem Biophys Res Commun.* 373:397-402, 2008.
117. Molesworth-Kenyon, S. J., J. E. Oakes, and R. N. Lausch. A novel role for neutrophils as a source of T cell-recruiting chemokines IP-10 and Mig during the DTH response to HSV-1 antigen. *J Leukoc Biol.* 77:552-559, 2005.
118. Mond, J. J. and M. Brunswick. A role for IFN-gamma and NK cells in immune responses to T cell-regulated antigens types 1 and 2. *Immunol Rev.* 99:105-118, 1987.
119. Moore, K. W., R. de Waal Malefyt, R. L. Coffman, and A. O'Garra. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 19:683-765, 2001.
120. Mori, S., H. Nakano, K. Aritomi, C. R. Wang, M. D. Gunn, and T. Kakiuchi. Mice lacking expression of the chemokines CCL21-ser and CCL19 (plt mice) demonstrate delayed but enhanced T cell immune responses. *J Exp Med.* 193:207-218, 2001.
121. Mosier, D. E., F. W. Fitch, D. A. Rowley, and A. J. Davies. Cellular deficit in thymectomized mice. *Nature.* 225:276-277, 1970.
122. Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin, and R. L. Coffman. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol.* 136:2348-2357, 1986.
123. Mountz, J. D., T. Zhou, X. Su, J. Wu, and J. Cheng. The role of programmed cell death as an emerging new concept for the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol Immunopathol.* 80:S2-14, 1996.
124. Mueller, S. N. and R. Ahmed. Lymphoid stroma in the initiation and control of immune responses. *Immunol Rev.* 224:284-294, 2008.

125. Nolte, M. A., R. Arens, M. Kraus, M. H. van Oers, G. Kraal, R. A. van Lier, and R. E. Mebius. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J Immunol.* 172:3620-3627, 2004.
126. Nutter, R. L., D. S. Gridley, J. M. Slater, and P. J. McMillan. Responses of mouse spleen morphology to the growth of subcutaneously injected virally transformed cells. *Anat Rec.* 197:363-368, 1980.
127. O'Garra, A., L. M. McEvoy, and A. Zlotnik. T-cell subsets: chemokine receptors guide the way. *Curr Biol.* 8:R646-649, 1998.
128. Ohmori, Y. and T. A. Hamilton. A macrophage LPS-inducible early gene encodes the murine homologue of IP-10. *Biochem Biophys Res Commun.* 168:1261-1267, 1990.
129. Oliver, A. M., F. Martin, and J. F. Kearney. IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol.* 162:7198-7207, 1999.
130. Pabst, R. The spleen in lymphocyte migration. *Immunol Today.* 9:43-45, 1988.
131. Pabst, R. and J. Westermann. The unique role of the spleen and its compartments in lymphocyte migration. *Res Immunol.* 142:339-342, 1991.
132. Palframan, R. T., S. Jung, G. Cheng, W. Weninger, Y. Luo, M. Dorf, D. R. Littman, B. J. Rollins, H. Zweerink, A. Rot, and U. H. von Andrian. Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues. *J Exp Med.* 194:1361-1373, 2001.
133. Pappenheimer, A. M., S. B. Salvin, and J. W. Uhr. Delayed hypersensitivity. II. Induction of hypersensitivity in guinea pigs by means of antigen-antibody complexes. *J Exp Med.* 105:11-24, 1957.
134. 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.
135. Pasparakis, M., L. Alexopoulou, V. Episkopou, and G. Kollias. Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med.* 184:1397-1411, 1996.
136. Paul, W. E. Interleukin-4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood.* 77:1859-1870, 1991.
137. Paul, W. E. and R. A. Seder. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell.* 76:241-251, 1994.
138. Pereira, J. P., L. M. Kelly, and J. G. Cyster. Finding the right niche: B-cell migration in the early phases of T-dependent antibody responses. *Int Immunol.* 22:413-419.
139. Powrie, F., S. Menon, and R. L. Coffman. Interleukin-4 and interleukin-10 synergize to inhibit cell-mediated immunity in vivo. *Eur J Immunol.* 23:3043-3049, 1993.
140. Rajan, T. V. The Gell-Coombs classification of hypersensitivity reactions: a re-interpretation. *Trends Immunol.* 24:376-379, 2003.
141. Ramshaw, I. A., P. A. Bretscher, and C. R. Parish. Regulation of the immune response. I. Suppression of delayed-type hypersensitivity by T cells from mice expressing humoral immunity. *Eur J Immunol.* 6:674-679, 1976.

142. Ramshaw, I. A., P. A. Bretscher, and C. R. Parish. Regulation of the immune response. II. Repressor T cells in cyclophosphamide-induced tolerant mice. *Eur J Immunol.* 7:180-185, 1977.
143. Rees, W., J. Bender, T. K. Teague, R. M. Kedl, F. Crawford, P. Murrack, and J. Kappler. An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:9781-9786, 1999.
144. Reif, K., E. H. Ekland, L. Ohl, H. Nakano, M. Lipp, R. Forster, and J. G. Cyster. Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature.* 416:94-99, 2002.
145. Reinhardt, R. L., H. E. Liang, and R. M. Locksley. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol.* 10:385-393, 2009.
146. Ritter, U. and H. Korner. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 24:295-301, 2002.
147. Ryan, K. R., D. McCue, and S. M. Anderton. Fas-mediated death and sensory adaptation limit the pathogenic potential of autoreactive T cells after strong antigenic stimulation. *J Leukoc Biol.* 78:43-50, 2005.
148. Scandella, E., B. Bolinger, E. Lattmann, S. Miller, S. Favre, D. R. Littman, D. Finke, S. A. Luther, T. Junt, and B. Ludewig. Restoration of lymphoid organ integrity through the interaction of lymphoid tissue-inducer cells with stroma of the T cell zone. *Nat Immunol.* 9:667-675, 2008.
149. Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy, and D. V. Goeddel. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature.* 347:669-671, 1990.
150. Schuyler, M., K. Gott, and B. Edwards. Th1 cells that adoptively transfer experimental hypersensitivity pneumonitis are activated memory cells. *Lung.* 177:377-389, 1999.
151. Siveke, J. T. and A. Hamann. T helper 1 and T helper 2 cells respond differentially to chemokines. *J Immunol.* 160:550-554, 1998.
152. Smith, M. J. and K. L. White. Establishment and comparison of delayed-type hypersensitivity models in the B(6)C(3)F(1) mouse. *J Immunotoxicol.* 7:308-317, 2010.
153. Soejima, K. and B. J. Rollins. A functional IFN-gamma-inducible protein-10/CXCL10-specific receptor expressed by epithelial and endothelial cells that is neither CXCR3 nor glycosaminoglycan. *J Immunol.* 167:6576-6582, 2001.
154. Sojka, D. K., D. Bruniquel, R. H. Schwartz, and N. J. Singh. IL-2 secretion by CD4+ T cells in vivo is rapid, transient, and influenced by TCR-specific competition. *J Immunol.* 172:6136-6143, 2004.
155. Solovjov, D. A., E. Pluskota, and E. F. Plow. Distinct roles for the alpha and beta subunits in the functions of integrin alphaMbeta2. *J Biol Chem.* 280:1336-1345, 2005.
156. Soroosh, P. and T. A. Doherty. Th9 and allergic disease. *Immunology.* 127:450-458, 2009.
157. Spahn, T. W., H. P. Eugster, A. Fontana, W. Domschke, and T. Kucharzik. Role of lymphotoxin in experimental models of infectious diseases: potential benefits and risks of a therapeutic inhibition of the lymphotoxin-beta receptor pathway. *Infect Immun.* 73:7077-7088, 2005.

158. Steinman, L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med.* 13:139-145, 2007.
159. Steven, W. M. Distribution of sheep erythrocytes as antigens in rat spleen. *Acta Anat (Basel).* 125:201-207, 1986.
160. Steven, W. M. Effects of antigen dosage on early localization of specific antibodies in rat splenic germinal centers. *Anat Rec.* 198:503-511, 1980.
161. Szczepanik, M., M. Akahira-Azuma, K. Bryniarski, R. F. Tsuji, I. Kawikova, W. Ptak, C. Kiener, R. A. Campos, and P. W. Askenase. B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *J Immunol.* 171:6225-6235, 2003.
162. Tamura, S., H. Tanaka, R. Takayama, H. Sato, Y. Sato, and N. Uchida. Break of unresponsiveness of delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells by pertussis toxin. *Cell Immunol.* 92:376-390, 1985.
163. Tanimoto, N., M. Terasawa, M. Nakamura, D. Kegai, N. Aoshima, Y. Kobayashi, and K. Nagata. Involvement of KC, MIP-2, and MCP-1 in leukocyte infiltration following injection of necrotic cells into the peritoneal cavity. *Biochem Biophys Res Commun.* 361:533-536, 2007.
164. Tedder, T. F., D. A. Steeber, and P. Pizcueta. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. *J Exp Med.* 181:2259-2264, 1995.
165. Temple, L., T. T. Kawabata, A. E. Munson, and K. L. White, Jr. Comparison of ELISA and plaque-forming cell assays for measuring the humoral immune response to SRBC in rats and mice treated with benzo[a]pyrene or cyclophosphamide. *Fundam Appl Toxicol.* 21:412-419, 1993.
166. Terashita, M., C. Kudo, T. Yamashita, I. Gresser, and F. Sendo. Enhancement of delayed-type hypersensitivity to sheep red blood cells in mice by granulocyte colony-stimulating factor administration at the elicitation phase. *J Immunol.* 156:4638-4643, 1996.
167. Thai, T. H., D. P. Calado, S. Casola, K. M. Ansel, C. Xiao, Y. Xue, A. Murphy, D. Friendewey, D. Valenzuela, J. L. Kutok, M. Schmidt-Suppryan, N. Rajewsky, G. Yancopoulos, A. Rao, and K. Rajewsky. Regulation of the germinal center response by microRNA-155. *Science.* 316:604-608, 2007.
168. Tsuru, S., H. Fujisawa, S. Aiso, Y. Zinnaka, and K. Nomoto. Contradictory responses in induction of delayed type hypersensitivity in orally immunized mice. *J Clin Lab Immunol.* 23:91-94, 1987.
169. Tumanov, A. V., S. I. Grivennikov, A. N. Shakhov, S. A. Rybtsov, E. P. Koroleva, J. Takeda, S. A. Nedospasov, and D. V. Kuprash. Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunol Rev.* 195:106-116, 2003.
170. Van den Eertwegh, A. J., W. J. Boersma, and E. Claassen. Immunological functions and in vivo cell-cell interactions of T cells in the spleen. *Crit Rev Immunol.* 11:337-380, 1992.
171. van der Kwast, T. H. and R. Benner. Distribution of cells mediating delayed type hypersensitivity responses of mice to sheep red blood cells. *Ann Immunol (Paris).* 128C:833-840, 1977.
172. Wan, Y. Y. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology.* 130:166-171, 2010.

173. Watte, C. M., T. Nakamura, C. H. Lau, J. R. Ortaldo, and J. Stein-Streilein. Ly49 C/I-dependent NKT cell-derived IL-10 is required for corneal graft survival and peripheral tolerance. *J Leukoc Biol.* 83:928-935, 2008.
174. Wen, L., J. Brill-Dashoff, S. A. Shinton, M. Asano, R. R. Hardy, and K. Hayakawa. Evidence of marginal-zone B cell-positive selection in spleen. *Immunity.* 23:297-308, 2005.
175. Yang, S. Y., S. Chouaib, and B. Dupont. A common pathway for T lymphocyte activation involving both the CD3-Ti complex and CD2 sheep erythrocyte receptor determinants. *J Immunol.* 137:1097-1100, 1986.
176. Yu, P., Y. Wang, R. K. Chin, L. Martinez-Pomares, S. Gordon, M. H. Kosco-Vibois, J. Cyster, and Y. X. Fu. B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. *J Immunol.* 168:5117-5123, 2002.
177. Zandvoort, A. and W. Timens. The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens. *Clin Exp Immunol.* 130:4-11, 2002.
178. Zheng, H., B. Jin, S. E. Henrickson, A. S. Perelson, U. H. von Andrian, and A. K. Chakraborty. How antigen quantity and quality determine T-cell decisions in lymphoid tissue. *Mol Cell Biol.* 28:4040-4051, 2008.
179. Zhou, M. and W. Ouyang. The function role of GATA-3 in Th1 and Th2 differentiation. *Immunol Res.* 28:25-37, 2003.
180. Zhu, J., H. Yamane, J. Cote-Sierra, L. Guo, and W. E. Paul. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res.* 16:3-10, 2006.
181. Zlotnik, A. and O. Yoshie. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12:121-127, 2000.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1 Differenzierungsfaktoren der verschiedenen Th-Zellpopulationen	7
Abb. 1-2 Auslösephase der DTH-Reaktion in der Haut.....	8
Abb. 3-1 Fußschwellung nach Auslösung der DTH-Reaktion	34
Abb. 3-2 Keimzentrumsformation in den Follikeln der Milz.....	35
Abb. 3-3 Relative IgG-Mengen im Blutserum.....	36
Abb. 3-4 Proliferation und IL2 Expression in der T-Zellzone nur in HD-injizierten Tieren stark erhöht	37
Abb. 3-5 Lasermikrodissektion ermöglicht die saubere Trennung der einzelnen Kompartimente	40
Abb. 3-6 Expressionslevel von Zytokinen und Chemokinen in einzelnen Kompartimenten naiver Kontrolltieren ..	42
Abb. 3-7 SRBC-Niedrigdosis induziert keine eindeutige Th1-Zytokinexpression	45
Abb. 3-8 Hochdosis-injizierte Tiere induzieren die Expression von Th1- und Th2-typischen Zytokinen	47
Abb. 3-9 Das MACS ermöglicht die Analyse der IL12p40- und IL10-produzierenden Zelltypen.	49
Abb. 3-10 Dosis-unabhängig wird die Expression von Chemokinen in der Haut verstärkt.....	52
Abb. 3-11 Dosis-unabhängig wird die Expression von Zelloberflächenmarkern in der Haut verstärkt.....	53
Abb. 3-12 mRNA Expression von Th1- und Th2-Zytokinen in der Haut nach Auslösung der DTH.....	55
Abb. 3-13 Signifikant erhöhte mRNA-Expression von CD3ε in der Haut von Niedrigdosis-Tieren	57
Abb. 3-14 Signifikant erhöhte mRNA-Expression von RANTES, CXCL9 und CXCL10 in der Haut von Niedrigdosis-Tieren	58
Abb. 3-15 Transferierte Hochdosis-Milzzellen können in naiven Empfängertieren keine DTH auslösen	60
Abb. 3-16 Die zuerst induzierte Th-Zellpopulation bestimmt über die Auslösung einer DTH-Reaktion	62
Abb. 3-17 Entfernen von Stroma und vorhandenen Antikörpern induziert DTH in HD-geprägten Transfertieren ..	63
Abb. 3-18 Die Milz wird für die DTH-Entwicklung in Niedrigdosis-Tieren benötigt.....	65
Abb. 3-19 Die Milzarchitektur entscheidet über die dosisabhängige Auslösung der DTH.....	67
Abb. 3-20 CFSE-markierten SRBC lokalisieren nur in Milzen Hochdosis-injizierter Tiere	69
Abb. 3-21 FACS-Messung: Blut und Milzhomogenat aus Tieren mit injizierten CFSE-markierten SRBC	71
Abb. 3-22 Titration CFSE-markierter SRBC in Blut und Milzhomogenat.....	72
Abb. 3-23 Ausdehnung der Marginalzone und erhöhtes B-Zellaufkommen erfolgt ausschließlich in ND-Tieren	74
Abb. 4-1 Modell zur SRBC-Dosis abhängigen Steuerung einer T-zellabhängigen Immunantwort	98

Abbildungen und Tabellen im Anhang

Abb. A- 1 Die NK-(T)-Zellmarker CD49b und Klr-1 zeigen keine erhöhte Expression nach SRBC-Injektion	116
Abb. A- 2 T- und B-zelltypische Chemokine zeigen dosisunabhängig keine erhöhte Expression	117
Abb. A- 3 IL12p40 und IL10 Expression in Zellfraktionen SRBC-injizierter Hochdosistiere.....	118
Tab. 1 Signifikante Expressionsunterschiede in der Haut	116

Anhang

A. Ergänzende Daten

Tab. 1 Signifikante Expressionsunterschiede in der Haut

Zellmarker	24h nach Auslösung der DTH	48h nach Auslösung der DTH
CD11c	Kontrolle-ND P<0,05	Kontrolle-ND P<0,05
	Kontrolle-HD P<0,01	Kontrolle-HD P<0,05
CD11b (Mac-1)	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,001
	Kontrolle-HD P<0,001	Kontrolle-HD P<0,05
Gr-1	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,01
	Kontrolle-HD P<0,01	Kontrolle-HD P<0,01
CCL3 (MIP1- α)	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,01
	Kontrolle-HD P<0,001	Kontrolle-HD P<0,001
CXCL1 (KC)	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,05
	Kontrolle-HD P<0,01	Kontrolle-HD P<0,05
CCL5 (RANTES)	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,001
	Kontrolle-HD P<0,05	Kontrolle-HD P<0,05
CXCL9	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,001
	Kontrolle-HD P<0,01	Kontrolle-HD P<0,01
CXCL10	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,001
	Kontrolle-HD P<0,001	Kontrolle-HD P<0,001
IL2	Kontrolle-HD P<0,01	
IFN γ	Kontrolle-ND P<0,01	Kontrolle-ND P<0,01
	Kontrolle-HD P<0,05	Kontrolle-HD P<0,01
IL12p40	Kontrolle-HD P<0,05	Kontrolle-HD P<0,01
EBI3	Kontrolle-ND P<0,05	
IL27p28		Kontrolle-HD P<0,05
IL10	Kontrolle-ND P<0,05	Kontrolle-ND P<0,001
	Kontrolle-HD P<0,001	Kontrolle-HD P<0,01
IL4		Kontrolle-ND P<0,01
	Kontrolle-HD P<0,01	Kontrolle-HD P<0,01

Keine signifikante Erhöhung bei CD3 ϵ im Vergleich zur Kontrolle.

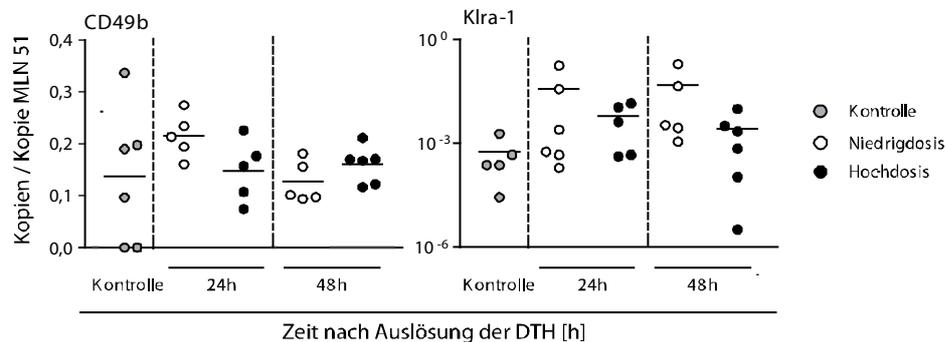


Abb. A- 1 Die NK-(T)-Zellmarker CD49b und Klr-1 zeigen keine erhöhte Expression nach SRBC-Injektion

Untersucht wurde die mRNA-Expression der beiden NK-(T)-Zellmarker CD49b und Klr-1 in der Haut 24 h und 48 h nach Auslösung der DTH in primär ND- und HD-injizierten Tieren, Kontrollen erhielten NaCl, dargestellt sind Einzelwerte + Mittelwert als Balken, n=6-8, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, es bestehen keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen entsprechenden ND- und HD-Tieren.

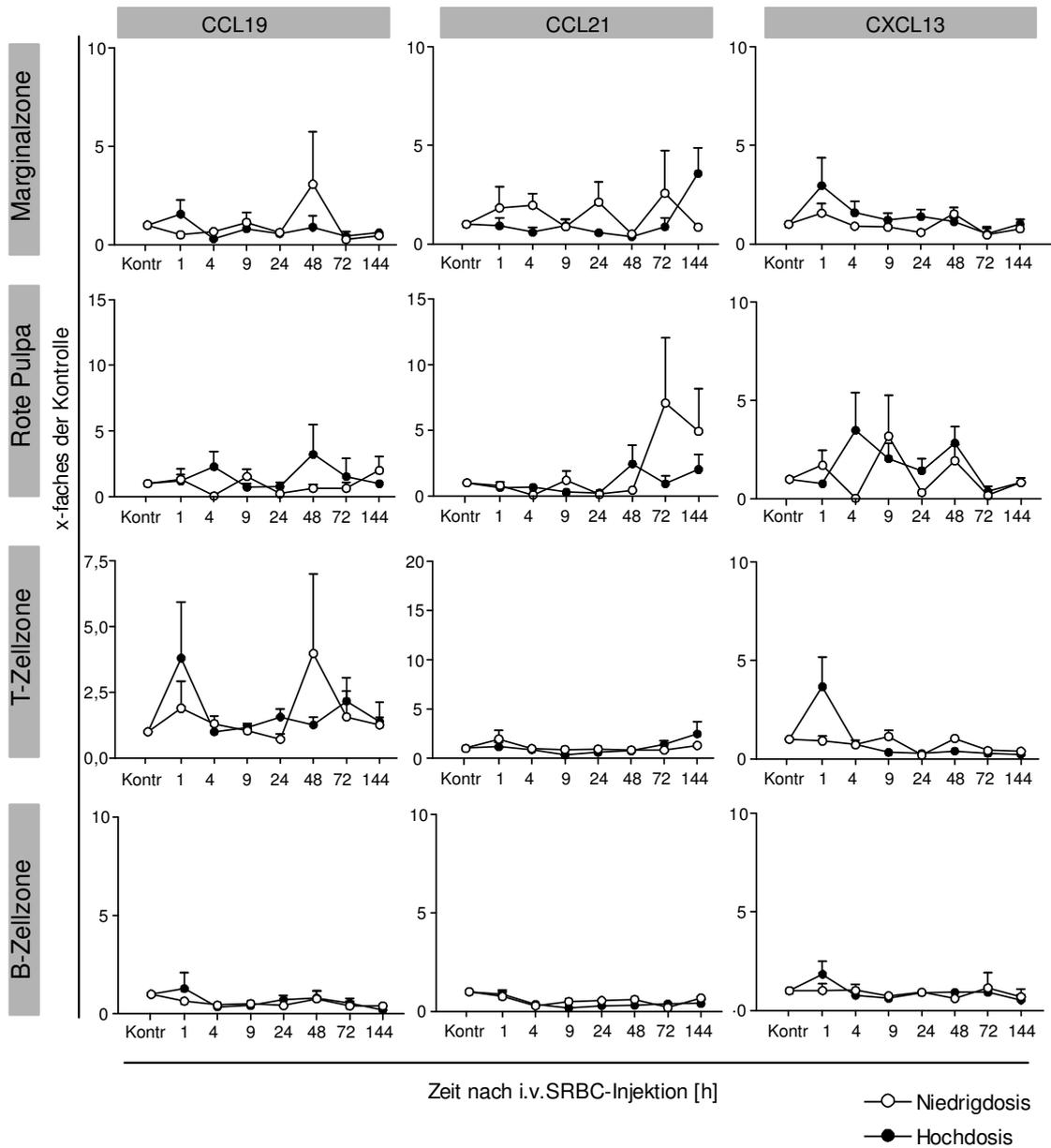


Abb. A- 2 T- und B-zelltypische Chemokine zeigen dosisunabhängig keine erhöhte Expression

Untersuchung der mRNA-Expression der T-zelltypischen Chemokine CCL19 und CCL21 sowie des B-zelltypischen CXCL13 in primär injizierten Tieren, Kontrollen erhielten NaCl (Kontr), gemessen wurde das x-fache der Kontrolle, Mittelwerte + SD, n=5-6, Mann-Whitney-U * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 ermittelt zur Kontrolle.

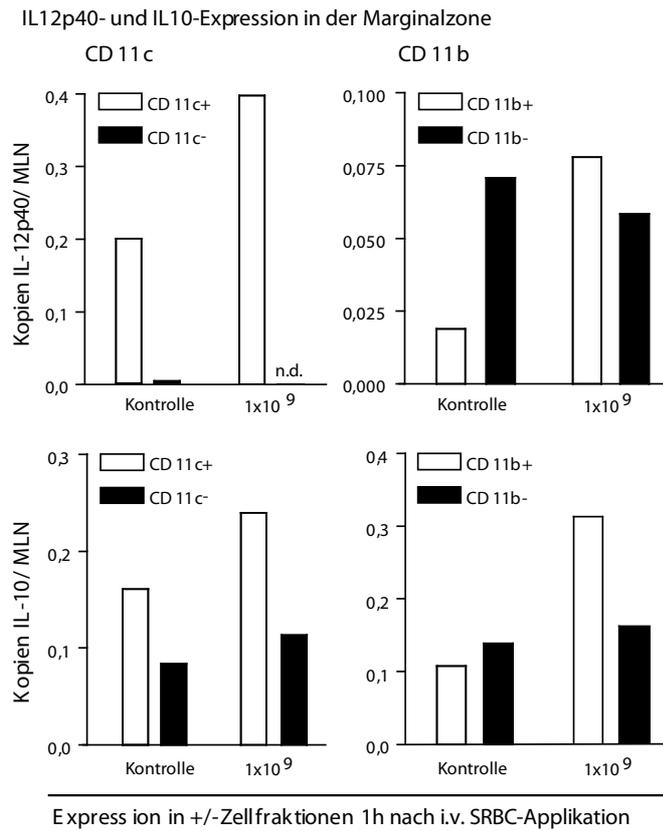


Abb. A- 3 IL12p40 und IL10 Expression in Zellfraktionen SRBC-injizierter Hochdosistiere

Dargestellt sind Ergebnisse der IL10 und IL12p40 Expression aus einer qRT-PCR von Zellfraktionen aus NaCl-Kontrolltieren oder 1x10⁹ SRBC-injizierten Tieren, die 1 h nach i.v. Applikation entnommen wurden. Das Homogenat wurde nach Entnahme Kollagenase verdaut und durch MACS Separation mit den magnetischen Beads CD19, CD11c und CD11b in pos. und neg. Zellfraktionen aufgetrennt. CD19: Mittelwerte, n =3, CD11c/CD11b: n=1.

B. Publikationen und Kongresse

Publikationen

- Kalies K, König P, Zhang YM, Deierling M, Barthelmann J, Stamm C, Westermann J
Nonoverlapping expression of IL10, IL12p40, and IFN-gamma mRNA in the marginal zone and T cell zone of the spleen after antigenic stimulation.
J Immunol 180, 8(2008), 5457-65.
- Stamm C, Töllner KM, Westermann J, Kalies K
Influence of antigen dose on the induction of different T helper cell populations: Analysis of cytokine expression in the murine spleen after immunization of sheep red blood cells
(Manuskript in Vorbereitung)

Nationale und internationale Kongresse

- 2nd European Congress of Immunology, Berlin, Deutschland (September 2009).
Cellular versus humoral immune response – high and low antigen doses determine the direction of the immune response in the murine spleen (Poster).
- 13. Minisymposium Infektion und Immunabwehr, Burg Rothenfels, Deutschland (März 2009).
Delayed type hypersensitivity versus humoral immune response – Influence of high and low antigen doses on the cytokine expression within splenic compartments (Vortrag).
- Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies (ÖGAI, DGfI), Wien, Österreich (September 2008).
Cytokines are expressed quickly after immunisation: Tracking immune responses based on the expression of marker cytokines in different compartments of the spleen (Poster).
- 12. Minisymposium Infektion und Immunabwehr, Burg Rothenfels, Deutschland (März 2008).
Cytokines are expressed quickly after immunisation: Tracking immune responses based on the expression of marker cytokines in different compartments of the spleen (Vortrag).

C. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Prof. Dr. med. Jürgen Westermann für die Bereitstellung des Themas und der Aufnahme als Doktorandin im Institut für Anatomie.

Dr. rer. nat. Kathrin Kalies danke ich nicht nur für die Betreuung dieser Arbeit, sondern auch für die motivierende Zusprache und der Geduld bei Fragen und Problemen. Auch die außeruniversitären Unternehmungen wie die Surfkurse oder Grillabende im Hause Kalies ließen mich schnell in Lübeck ankommen.

Weiterer Dank geht an meine ehemalige Kollegin Maïke Blessenohl, die mich schnell und trotz immer wiederkehrender Fragen in die Geheimnisse der Tierzucht und dessen Buchhaltung einführte. Nicht zu vergessen sei dabei die tatkräftige Unterstützung von Marie-Luise Leppin.

Für jegliche Hilfestellung im Laboralltag bedanke ich mich bei Lidija Gutjahr, Petra Lau, Marie-Luise Leppin und Karola von Lingelsheim. Den beiden zuletzt genannten gilt besonderer Dank für die unaufhaltsame Unterstützung, besonders nach dem „Neustart“ im Januar 2009.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mädels und Jungs aus den Doktorandenzimmern im ersten und zweiten Stock bedanken. Claudia, David, Christoph, Babsi, Babett, Ilka, Anna, Sarah, Torsten und René, haben nicht nur meinen Arbeitsalltag bereichert, sondern mir auch das Abschalten vom Labor nach getaner Arbeit leicht gemacht.

Besonderer Dank gilt Katja Bieber, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, und mir mit Tipps und Tricks nicht nur den Laboralltag erleichtert hat. Die gemeinsamen Freizeitunternehmungen und Urlaube waren super, danke!

Der größte Dank gebührt meinen beiden „Mitreiterinnen“ Julia Barthelmann und Frauke Borcharding. Nicht aus der Ruhe zu bringen war Julia trotz meinem Unverständnis für Excel, hiermit sei ihr offiziell das „Excel-Bienchen“ verliehen, Danke für die Geduld und Hilfe! Frauke hat mich immer wieder aufgebaut und für die erforderliche Abwechslung nach der Arbeit gesorgt, sie ist nicht nur eine Kollegin, sondern auch eine gute Freundin geworden.

Schließlich danke ich meiner Familie für all ihre Unterstützung. Dafür, dass sie mir die nötigen Gene mitgegeben haben, jederzeit Vertrauen in mich hatten und dass sie mich sowohl in seelischer als auch finanzieller Hinsicht immer unterstützt haben.

DANKE!

D. Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe und keine weiteren als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ich habe diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt und habe zuvor keine anderen Promotionsversuche unternommen.

München, den 10. Dezember 2010

Claudia Stamm