

**Die Rolle Langerin⁺ Zellen für die Induktion
einer humoralen Immunantwort gegen
*Leishmania major***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Christian Florian
aus Zwiesel

2011

Mentoren der internationalen Regensburger Graduiertenschule für
Lebenswissenschaften:

Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann (Universität Regensburg)

PD Dr. rer. nat. Uwe Ritter (Universität Regensburg)

PD Dr. rer. nat. Richard Weiss (Universität Salzburg)

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht: 24.01.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. med. Karl Kunzelmann

PD Dr. rer. nat. Uwe Ritter

Unterschrift:

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	2
1.2 Dendritische Zellen	4
1.2.1 Antigenpräsentation durch dendritische Zellen	5
1.2.2 Heterogenität der dendritischen Zellen	7
1.2.3 Dendritische Zellen in der Haut und der Haut-drainierenden Lymphknoten	8
1.2.4 Mausmodelle zur Untersuchung von Langerin ⁺ dendritischer Zellen	11
1.3 T-Zellen	12
1.3.1 CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen	13
1.3.2 Follikuläre T-Helfer-Zellen	15
1.4 Die B-Zelle	19
1.4.1 Die Entwicklung der Plasmazelle	19
1.4.2 Das Keimzentrum	20
1.5 Der „cortical ridge“	22
1.6 Die beiden Transkriptionsfaktoren BCL-6 und BLIMP-1 und ihre Bedeutung für die T-Zellen und B-Zellen	23
1.6.1 Die Bedeutung von BCL-6 für T- und B-Zellen	23
1.6.2 Die Bedeutung von BLIMP-1 für T- und B-Zellen	24
1.7 Die Leishmaniose	25
1.7.1 Die Leishmaniose des Menschen	25
1.7.2 Der Parasit und sein Lebenszyklus	26
1.7.3 Die Immunantwort gegen <i>Leishmania major</i>	27
1.7.4 Das experimentelle Modell der Leishmaniose	28
1.7.4.1 Die humorale Immunantwort während einer Leishmaniose	30
1.8 Zielstellung dieser Arbeit	31
2. Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Laborgeräte	33
2.1.2 Glas- und Plastikwaren	34
2.1.3 Chemikalien und Lösungen	35
2.1.4 Mausstämme und Leishmanien-Stamm	35
2.1.5 Antikörper und Detektionsreagenzien	36
2.1.6 Material für zellbiologische Arbeiten	37
2.1.7 Material für molekularbiologische Arbeiten	40
2.1.8 Oligonukleotide	41
2.1.9 Software	42
2.2 Methoden	43
2.2.1 Zellbiologische Methoden	43
2.2.1.1 Leishmanien-Kultur	43
2.2.1.2 Herstellung von Leishmanien-Antigen	44
2.2.1.3 Immunisierung von Kaninchen	44
2.2.1.4 Zellzählung	44
2.2.1.5 Blutentnahme	45
2.2.1.6 Isolierung von Zellen aus Milz oder Lymphknoten	45
2.2.1.7 Durchflusszytometrie (FACS – Analyse)	46
2.2.1.8 Enzyme – linked immunosorbant assay (ELISA)	49
2.2.1.9 Immunfluoreszenz (IF-) Färbung	50
2.2.1.10 Histologische Untersuchung von <i>epidermal sheets</i>	55
2.2.2 Tierversuche	55
2.2.2.1 Behandlung der Tiere mit DT	56
2.2.2.2 Infektion	56

2.2.2.3 <i>In vivo</i> – Proliferationsnachweis während einer <i>L. major</i> – Infektion	56
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	57
2.2.3.1 Isolierung genomischer DNS aus Schwänzen von Lang-DTR-EGFP Mäusen.....	57
2.2.3.2 RNA Isolierung.....	57
2.2.3.2.1 Sortierte Zellen	57
2.2.3.2.2 Zellsuspensionen aus Lymphknoten.....	58
2.2.3.3 Bestimmung der RNA – Konzentration	58
2.2.3.4 Reverse Transkription	58
2.2.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	59
2.2.3.6 Analyse der PCR – Produkte.....	61
2.2.3.7 Quantitative Real Time PCR (qPCR)	61
2.3 Statistik.....	64
3. Ergebnisse	65
3.1 Genotypisierung und Kontrolle der Depletion von Langerhans Zellen nach DT-Gabe	65
3.2 <i>In situ</i> Nachweis proliferierender Zellen und deren Charaktersistierung.....	68
3.2.1 Detektion von proliferierten Zellen <i>in situ</i>	68
3.2.2 Charakterisierung proliferierter Zellen <i>in situ</i>	69
3.3 Struktur eines naiven Lymphknotens.....	72
3.4 Der „cortical ridge“ während einer Infektion mit Leishmanien.....	73
3.4.1 Die retikuläre Struktur im Lymphknoten am Tag 3 nach Infektion	73
3.4.2 Charakterisierung der Zellen im CR am Tag 3 nach Infektion.....	75
3.5 Die Entwicklung im Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion.....	78
3.5.1 Die Struktur des Lymphknotens am Tag 6 nach einer Infektion	78
3.5.2 Die zelluläre Zusammensetzung des CR am Tag 6 nach einer Infektion	79
3.5.3 Charakterisierung BrdU ⁺ Zellaggregate	81
3.6 Der CR am Tag 10 nach einer Infektion mit Leishmanien	84
3.7 Der Vergleich von Lymphknoten aus Tieren mit DT-Behandlung und DT unbehandelten Tieren	85
3.8 Die Keimzentrumsreaktion nach einer Infektion	88
3.8.1 Der Einfluß von Langerin ⁺ Zellen auf die Keimzentrumsreaktion am Tag 6 nach Infektion	88
3.8.2 Das Keimzentrum nach Depletion von Langerin ⁺ Zellen am Tag 10 nach einer Infektion	90
3.9 Leishmanien-spezifische Immunglobuline.....	93
3.10 Genexpressionsanalysen	94
3.10.1 Genexpressionsanalyse von AID im ganzen Lymphknoten	94
3.10.2 Genexpressionsanalysen in B-Zellen	96
3.10.3 Genexpressionsanalysen in CD4 ⁺ T-Zellen	99
3.10.4 Analyse der Expression von IL-4-mRNA in CD4 ⁺ T-Zellen.....	101
3.11 Die Anzahl CD4 ⁺ T-Zellen in infizierten Lymphknoten in Abhängigkeit von Langerin ⁺ Zellen	103
3.12 Die B-Zellproliferation in Haut-drainierenden Lymphknoten nach einer Infektion mit <i>L. major</i> Parasiten.....	105
3.13 Analyse der Qualität Leishmanien-spezifischer IgG1-Immunglobuline	107
4. Diskussion.....	110
4.1 DT-induzierte Zelldepletion in Lang-DTR-EGFP Mäusen.....	111
4.2 Charakterisierung proliferierender Zellen <i>in situ</i>	112
4.3 Die Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel	113
4.4 Die Aktivierung von T _{FH} -Zellen während einer Immunantwort gegen <i>Leishmania major</i>	115
4.5 Die B-Zell-Antwort während einer Infektion mit Leishmanien.....	119
4.6 Die Achse dendritische Zelle – T _{FH} -Zellen – B-Zellen während einer Immunantwort gegen Leishmanien.....	123

5. Zusammenfassung	126
6. Abbildungsverzeichnis.....	128
7. Literaturverzeichnis.....	130
8. Anhang	136

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
APC	Allophycocyanin oder antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CCL	Chemokinrezeptor-Ligand
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary</i> DNA, komplementäre DNS
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cy5	ein Cyanfarbstoff
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DC	<i>dendritic cell</i> , dendritische Zelle
dDC	<i>dermal dendritic cell</i> , dermale dendritische Zelle
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DT	<i>Diphtheria</i> Toxin
DTA	A-Untereinheit des <i>Diphtheria</i> Toxins
DTR	<i>Diphtheria</i> Toxin-Rezeptor

EDTA	Ethylendiamintetraazetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbant assay</i>
FACS Durchflusszytometrie	<i>fluorescence activated cell sorting,</i>
FCS	<i>fetal calf serum, fötales Kalbserum</i>
FITC	Fluorescein–Isothiocyanat
FSC/SSC	<i>forward/side scatter, Vorwärts–/Seitwärtsstreulicht</i>
HBSS	<i>Hanks´ buffered salt solution</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
kDA	Kilodalton
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
L-Ag	Leishmanien-Antigen
Lang-DTR-EGFP	Langerin-hDTR-EGFP-Maus-Modell
LC	<i>Langerhans cell, Langerhans Zelle</i>
MHC-I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse–I/II
mRNA	<i>messenger RNA, Boten-RNA</i>
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat–gepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin–Chlorophyll–Protein
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
qPCR	quantitative PCR
REU	relative ELISA-Einheiten
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SD	<i>standard deviation</i> , Standardfehler
sog.	so genannt
TAE	Tris-acetat EDTA
T _{FH}	follikuläre T-Helfer-Zelle
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
ÜN	über Nacht
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Im Laufe seines Lebens ist der menschliche Organismus einer Vielzahl von Pathogenen wie z. B. Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten ausgesetzt. Die immunologische Forschung untersucht die Mechanismen, die notwendig sind, um Pathogene erfolgreich zu bekämpfen. Hierbei arbeitet das menschliche Immunsystem mit unterschiedlichen Wirkprinzipien: i) dem angeborenen und ii) dem adaptiven Immunsystem. Während das angeborene Immunsystem schnell, aber dafür antigenunspezifisch auf einen Erreger antwortet, benötigt die Etablierung des adaptiven Immunsystems länger, reagiert aber dafür antigenspezifisch. Dabei entwickelt sich auch ein immunologisches Gedächtnis, sowohl auf Seite der T-Zellen als auch der B-Zellen. Es zeigte sich allerdings, dass beide Teile der Immunantwort nicht abgegrenzt von einander existieren, sondern dass sie sich auch gegenseitig beeinflussen. So sind Zellen des angeworbenen Immunsystems wichtig für die Etablierung einer adaptiven Immunantwort. Folgend werden das angeborene und das adaptive Immunsystem kurz vorgestellt.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zum Schutz vor Pathogenen verfügt der Körper unter anderem über physikalische Barrieren, wie die Haut und Schleimhäute. Daneben gibt es chemische Barrieren wie Hautsekrete oder das in der Tränenflüssigkeit enthaltene Lysozym. Sind durch Traumata oder Stiche und Bisse von Insekten diese Barrieren überwunden, so können Erreger in tiefere Schichten des Organismus gelangen. Ist dies geschehen, so hat der Organismus ein kurzes Zeitfenster, um die Pathogene zu eliminieren. Hier treten die Komponenten des angeborenen Immunsystems in den Vordergrund.

Zu den Zellen des angeborenen Immunsystems zählen zur Phagozytose befähigte Zellen wie Makrophagen und Granulozyten. Daneben zählen zum angeborenen Immunsystem Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zellen

besitzen Oberflächenrezeptoren, um Pathogene erkennen zu können. Diese Rezeptoren nennt man „*pattern recognition receptors*“ (PRR), ein Beispiel hierfür sind die Toll-ähnlichen Rezeptoren (*toll like receptors*). Moleküle, welche sie erkennen sind die sog. „*pathogen-associated molecular patterns*“ (PAMPs, oder pathogenassoziierte molekulare Muster). Ein Beispiel für PAMPs ist die Lipopolysaccharid von gram-negativen Bakterien welches an TLR4 bindet.. Makrophagen und Neutrophile phagozytieren den Erreger und das entstehende Phagosom tötet den Erreger z. B. durch einen saueren pH ab. Das Phagosom kann aber auch mit einem Lysosom verschmelzen, das Enzyme enthält, die den Erreger abtöten können.

Neben diesen phagozytierenden Zellen gibt es auch die sog. natürlichen Killerzellen. Diese wirken zytotoxisch, indem sie Granulae sezernieren, die mit der Zellmembran der Zielzelle verschmelzen und so Perforine freisetzen, welche die Membran porös machen und so die Apoptose der Zielzelle einleiten. Neben diesen verschiedenen Zellen des angeborenen Immunsystems gibt es auch das Komplementsystem. Bei diesem unterscheidet man drei verschiedene Wege, den klassischen Weg, den Lektin – Weg und den alternativen Weg. Eine sehr wichtige Funktion der angeborenen Immunität ist die Freisetzung von Zytokinen, die unter anderem das adaptive Immunsystem beeinflussen (1).

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum antigenunspezifischen angeborenen Immunsystem zeichnet sich das adaptive Immunsystem durch eine hohe Antigenspezifität aus. Dabei bildet das adaptive Immunsystem auch ein immunologisches Gedächtnis aus, das wichtig bei einer erneuten Infektion mit einem Pathogen ist (1).

Die Vorläufer der bei der adaptiven Immunantwort wichtigen T- und B-Lymphozyten, werden im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen generiert (2, 3). Die weitere Reifung von T-Zellen erfolgt im Thymus, die der B-Zellen im Knochenmark, den primären lymphatischen Organen. In den sekundären lymphatischen Geweben, wie der Milz oder den Lymphknoten, findet die Antigenpräsentation und damit die Induktion einer adaptiven Immunantwort statt (1).

Wichtig für die Induktion einer adaptiven Immunreaktion sind wie bereits erwähnt, Zellen des angeborenen Immunsystems. Dabei ist die Fähigkeit, Antigen präsentieren zu können ein sehr wichtiger Faktor für die Induktion einer adaptiven Immunreaktion. Diese Fähigkeit besitzen neben den Makrophagen im besonderen dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs). Auch B-Zellen, die zum adaptiven Immunsystem gehören, besitzen diese Fähigkeit. Im Vergleich zu diesen und den Makrophagen zeichnet die DCs aus, dass sehr wenige Zellen ausreichen, um eine T-Zell-Antwort auszulösen, daher bezeichnet man DCs auch als professionelle antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) bezeichnet (4-6). Das Antigen muss von diesen APCs zuerst prozessiert werden, bevor es über den Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) präsentiert werden kann (7). Daneben bedarf es weiterer kostimulatorischer Signale der APC um eine T-Zelle zu aktivieren (8).

Bei den T-Zellen unterscheidet man nun zwischen $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Zellen. Nach Aktivierung durch eine APC expandieren antigenspezifische $CD8^+$ T-Zellen klonal. Aus diesen Zellen entstehen zum einen sogenannte Effektor-T-Zellen, die auch zytotoxische T-Zellen genannt werden. Diese zytotoxischen T-Zellen wirken ähnlich wie natürlich Killerzellen. Zum anderen bilden sich aus diesen antigenspezifischen T-Zellen langlebige Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit dem Pathogen sehr rasch wiederum klonal expandieren können und zu Effektor-T-Zellen differenzieren (9).

Bei den $CD4^+$ T-Zellen gibt es verschiedene Subpopulationen. Auch hier gibt es Effektor-T-Zellen und Gedächtniszellen (10). Die bekanntesten $CD4^+$ Effektor-T-Zellen sind die T_H1 und die T_H2 Zellen. Die Produktion von $IFN-\gamma$ durch T_H1 Zellen ist sowohl wichtig für Makrophagen als auch für $CD8^+$ T-Zellen. T_H2 Zellen dagegen zeichnen sich durch die Produktion von Interleukin (IL) 4, IL5 und IL13 aus. Damit unterstützen sie die humorale Immunantwort, die auf der Bildung antigenspezifischer Antikörper durch B-Zellen beruht. Aufgrund ihrer Rolle für die Immunantwort wurden in den letzten Jahren wurden die T_{FH} -Zellen intensiv untersucht. Auf diese Zellen wird später genauer eingegangen (11).

Die B-Zellen sind nach Aktivierung durch verschiedene genetische Prozesse in der Lage, hoch affine Antikörper zu bilden. Die geschieht in den Keimzentren (*germinal*

center, GC). In diesen GCs werden B-Zellen neben antikörpersezernierenden Plasmazellen auch zu langlebige Gedächtniszellen (12).

1.2 Dendritische Zellen

Dieser Zelltyp wurde 1973 erstmalig beschrieben. Aufgrund ihrer charakteristischen dendritischen Form nannten Steinman *et al.* sie dendritische Zellen (13).

Die Population der DCs ist sehr heterogen in ihrer Lokalisation und in der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle. DCs kommen unter anderem in der Haut, den sekundären lymphatischen Organen, den Schleimhäuten, der Lunge, den Nieren und auch in der Leber vor (14). Dabei besteht die Hauptaufgabe der DCs das Gewebe nach Pathogen abzusuchen und gegebenenfalls das Antigen zu prozessieren und zu präsentieren. Sie sind also wichtig für die Immunität und auch für die Induktion einer Toleranz. Entgegen den T-Zellen, die anhand ihres T-Zell-Rezeptors definiert werden können, oder B-Zellen mit dem B-Zell-Rezeptor, ist es allerdings schwierig, DCs anhand eines Markers zu definieren (14).

Dadurch, dass sie sehr früh während einer Infektion Antigen aufnehmen und dieses nach entsprechender Prozessierung präsentieren, sind DCs ein wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (15).

Zuerst wird die Antigenpräsentation der DCs näher erklärt, danach die verschiedenen Subpopulationen in der Haut und abschließend ihre bisher bekannten Funktionen während einer Infektion.

1.2.1 Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

Gewebsständige DCs sind in der Lage, Antigen verschiedenster Pathogene aufzunehmen, zu prozessieren und zu präsentieren, womit sie eine T-Zell-Effektor-Antwort induzieren können (14).

Verschiedene Wege der Antigenaufnahme machen die DCs so effizient. Sie können durch Makropinozytose, durch Rezeptor-vermittelte Aufnahme, z. B. mittels C-Typ-Lektin-Rezeptoren oder über Phagozytose Antigene aufnehmen. Durch die Aufnahme ändern die DCs die Expression ihrer Adhäsionsmoleküle, reduzieren die Rezeptordichte für die Antigenaufnahme und können vermehrt kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 exprimieren (15). Diese genannten kostimulatorischen Moleküle sind wichtig für die Aktivierung einer antigenspezifischen naiven T-Zelle.

Um Antigene präsentieren zu können, ist es wichtig, dass DCs Antigenfragmente (Peptide) gebunden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse – I (MHC-Klasse-I) oder Klasse – II (MHC-Klasse-II) präsentieren.

An MHC-Klasse-II gebundene Peptide stammen in der Regel von extrazellulären Erregern, wohingegen über MHC-Klasse-I präsentiertes Antigen von intrazellulären Erregern stammt. Es gibt aber auch eine dritte Möglichkeit, bei der Antigene von extrazellulären Pathogenen CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden. Dieser Weg ist bekannt als „*cross presentation*“ (16).

Phagozytierte Pathogene gelangen in das Phagosom, dessen pH-Wert infolge der Reifung sinkt. Dadurch kommt es zur Rekrutierung saurer Proteasen. Diese Proteasen spalten das Pathogen in Peptidfragmente, die strukturell und von ihrer Größe optimal auf den MHC-Klasse-II passen. Neu synthetisierte MHC Moleküle verlassen das endoplasmatische Reticulum (ER) in Vesikeln, die auf ihrem Weg an die Zelloberfläche mit dem Phagosom verschmelzen. Dabei werden sie mit dem passenden Peptid beladen und die Peptid/MHC-Klasse-II-Komplexe werden auf der Zelloberfläche präsentiert. Dadurch kann die Erkennung durch die CD4⁺ T – Zelle erfolgen (siehe Abb. 1.1A) (15).

Intrazelluläre Pathogene, bzw. ihre Peptidfragmente werden über den MHC-Klasse-I präsentiert. Dabei werden die Proteine der Pathogenen durch das Anfügen von Ubiquitinresten für die Degradation durch Proteasome markiert. Nach der Prozessierung gelangen die Peptide über den „*Transporter associated with Antigen Processing*“ (TAP) in das ER und bilden dort mit neu hergestellten MHC-Klasse-I-Molekülen einen Komplex. Diese Komplexe werden an die Zelloberfläche transportiert und können CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden (siehe Abb. 1.1B) (17, 18).

Auch gegen viele extrazelluläre Pathogene und Tumore kann eine spezifische CD8⁺ T-Zell-Antwort beobachtet werden. Das lässt darauf schließen, dass es einen Mechanismus geben muss, bei dem Peptide von diesen Pathogenen bzw. entarteten Zellen in den MHC-Klasse-I Präsentationsweg gelangen. Allerdings ist dieser als „*cross presentation*“ bezeichnete Prozess bisher noch sehr unklar (siehe Abb. 1.1C) (19). Ein Modell postuliert einen Weg, abhängig von TAP und Proteasom, bei dem Peptide aus dem Phagosom in das Zytosol gelangen und somit für den MHC-Klasse-I – Weg verfügbar sind (19-21). Ein weiterer Weg könnte sein, dass die Membran des Phagolysosoms aufgebrochen wird und so Peptide des Phagolysosoms prozessiert werden können und letztendlich in den ER transportiert werden. Eine dritte Hypothese besagt, dass MHC-Klasse-I – Moleküle außerhalb des ER beladen werden, indem sie in das Phagolysosom gelangen und darin beladen werden (19).

Die Interaktion zwischen T-Zelle und MHC-Molekül der APC reicht nicht aus, um eine adaptive Immunantwort zu induzieren. Es sind weitere Signale erforderlich, die ebenfalls von der APC stammenden kostimulatorischen Moleküle wie CD80, CD86 und CD40.

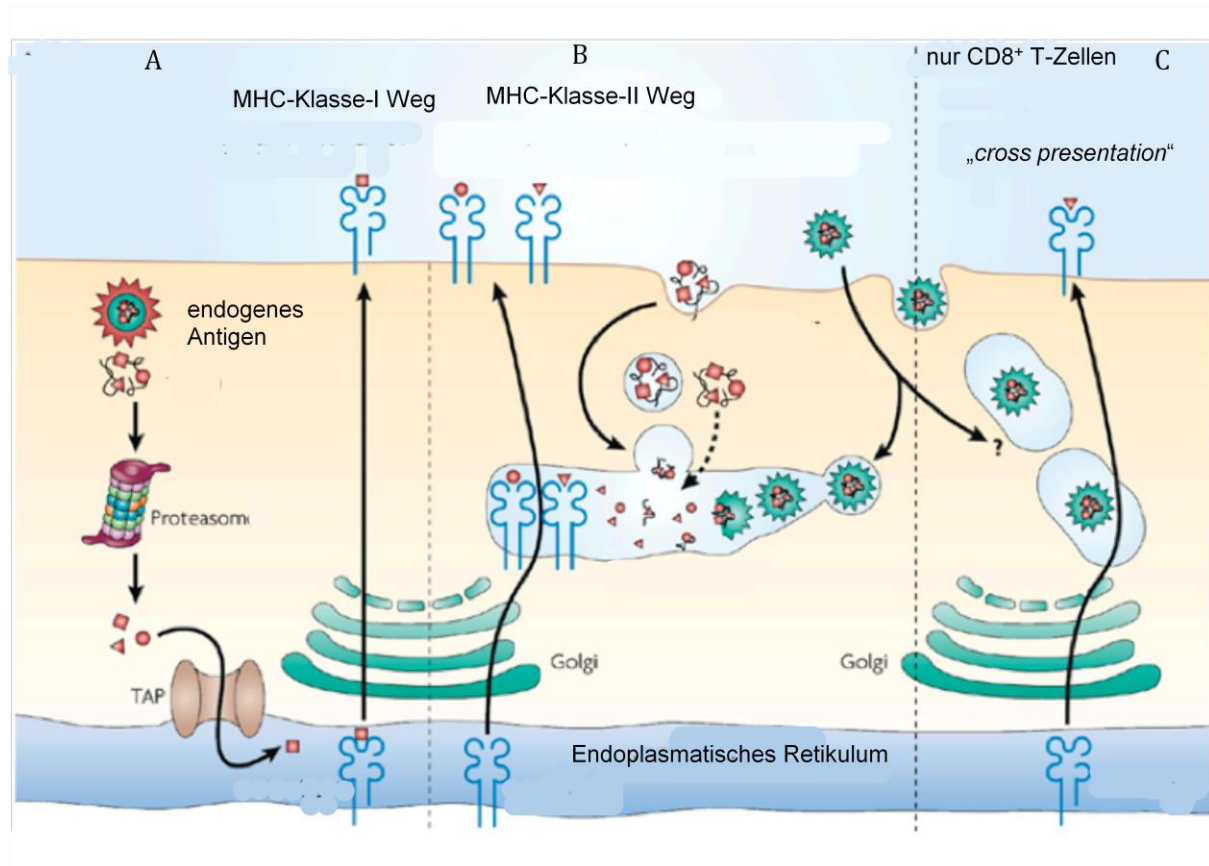


Abb. 1.1: Antigenpräsentationswege in DCs

(A) Endogene Antigene werden im Zytosol mittels Proteasom abgebaut. Anschließend gelangen sie via „*Transporter associated with Antigen Processing*“ (TAP) ins endoplasmatische Retikulum (ER). Im ER werden sie an MHC-Klasse-I – Moleküle gebunden. (B) Extrazelluläre Antigene werden durch den proteolytischen Abbauweg zu Peptiden degradiert, die an MHC-Klasse-II – Moleküle gebunden werden. (C) Exogene Antigene werden über die sog. „*cross presentation*“ CD8⁺-T-Zellen präsentiert. Dieser Weg ist bisher noch weitestgehend ungeklärt. Verändert nach Villadangos (18).

1.2.2 Heterogenität der dendritischen Zellen

Die Population der DCs besteht aus einer Vielzahl von Subpopulationen, die sich durch die Expression verschiedener Moleküle, ihre Lokalisation und ihre immunologische Funktion unterscheiden. Bei Mäusen kann man oberflächlich zwischen lymphoiden und myeloiden DCs unterscheiden. Die Expression von CD8 α ist dabei nur bei lymphoiden DCs vorhanden (15).

Mittlerweile geht man von einer gemeinsamen, hämatopoetischen, pluripotenten Stammzelle aus. Aus dieser gehen verschiedene Vorläuferzellen hervor, die sich schließlich zu den verschiedenen Subpopulationen differenzieren (15). Die DCs der

Mukosa (Lunge, *Lamina propria* und *Peyer's Patches*) werden nicht detailliert beschrieben, da sie in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden.

DCs lassen sich prinzipiell in plasmatozoide und konventionelle DCs unterteilen. Die Rolle plasmatozoider DCs bei der Antigenpräsentation und damit der Stimulation von T-Zellen ist nicht vollständig geklärt. Sie spielen durch die Produktion von Typ-1-Interferonen im Lymphknoten während einer viralen Infektion eine wichtige Rolle (22). Sie wirken auch tolerogen durch die Expression von „*programmed death 1 ligand*“ (PD-L1), welcher bei Aktivierung von regulatorischen T-Zellen involviert ist.

Die konventionellen DCs, welche in den sekundär lymphatischen Organen vorkommen, lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Zum einen gibt es DCs, welche über den Blutkreislauf in die lymphatischen Organe, wie Milz, Lymphknoten oder Thymus gelangen. Sie lassen sich weiter in $CD8\alpha^+CD4^-$, $CD8\alpha^-CD4^-$ und $CD8\alpha^-CD4^+$ DCs unterteilen (18, 23). Dabei lassen sich in der Milz zwei große Gruppen von DCs unterscheiden. Die $CD8^+CD205^+$, die vor allem in der Nähe von T-Zellen gefunden werden, und die $CD8^-33D1^+$ DCs, die in der roten Pulpa gefunden werden. Nach ihrer Aktivierung wandern beide Populationen in die T-Zellzone (14). Es gibt aber auch andere Subpopulationen von DCs, die in der Milz gefunden werden können. In Lymphknoten können ebenfalls zwei residente Populationen gefunden werden, die $CD8^+CD205^+$ DCs und $CD8^-CD11b^+$ DCs. Aber wie in der Milz so lassen sich auch im Lymphknoten weitere DC-Subpopulationen finden (14).

Die zweite Gruppe der konventionellen DCs kommt ausschließlich in den Haut-drainierenden Lymphknoten vor. Bei diesen handelt es sich um DCs, die von Haut zu den drainierenden Lymphknoten migrieren (24).

1.2.3 Dendritische Zellen in der Haut und der Haut-drainierenden Lymphknoten

Die Haut steht ständig mit der direkten Umwelt eines Organismus in Kontakt und bildet daher die erste Verteidigungslinie gegen Pathogene. In den letzten Jahren zeigte sich, dass mit einem komplexen Netzwerk an verschiedenen DC-Subpopulationen ausgestattet ist. Dabei lassen sich alleine in der Epidermis und der darunter liegenden Dermis drei Subpopulationen unterscheiden (25-27). 1868 wurden erstmal von Paul Langerhans Zellen in der Epidermis beschrieben, die nach

ihm benannt wurden. Diese Langerhans Zellen (*Langerhans cells*, LZ) machen ca. 2 – 5 % der Gesamtzellzahl der Epidermis aus, wo sie sich befinden (28). LZ zeichnen sich durch die Expression des C – Typ – Lektins Langerin (CD207) aus. Langerin kommt sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytosol vor. Im Zytosol liegt es in membranumgrenzten Organellen gespeichert vor den sog. *Birbeck – Granulae* (28).

In der Dermis liegen zwei weitere Subpopulation von DCs vor. Eine davon exprimiert ebenfalls Langerin (*Langerin⁺ dermal DC*, *Langerin⁺ dDC*), die andere ist jedoch negativ für Langerin (*Langerin⁻ dermal DC*, *Langerin⁻ dDC*). Durch diesen Unterschied können beide Subpopulationen leicht voneinander unterschieden werden (5, 27). Es gibt auch weitere Marker, wie z. B. CD103, womit sich Langerhans Zellen und *Langerin⁺ dDCs* unterscheiden lassen, siehe Tabelle 1.1.

Während einer Infektion wandern diese drei oben erwähnten Subpopulationen über afferente lymphatische Gefäße zu den drainierenden Lymphknoten (18, 28, 29).

Die Identifikation von Langerin als Marker für murine, epidermale Langerhans Zellen erfolgte bereits im Jahr 2002 (30). *Bursch et al.* entdeckten zusätzlich 2007 eine *Langerin⁺ DC Population* (25). Dabei konnten sie unter anderem auch zeigen, dass im Gegensatz zu Langerhans Zellen diese Population radiosensitiv ist und dass diese *Langerin⁺ dDCs* eine Rolle bei der Kontakthypersensitivität spielen. Dies passt zu Ergebnissen, die zeigten, dass nicht Langerhans Zellen, sondern *CD8⁻Langerin⁻ DCs* für die Induktion einer *T_H1* Antwort während einer Leishmaniose verantwortlich sind (31).

In Tabelle 1.1 ist eine Übersicht der DC Subtypen der Haut dargestellt.

DC-Subtyp	Vorkommen	Zelluläre Marker
Langerhans Zelle (LZ)	Epidermis	Langerin ⁺⁺⁺ , MHC-II ⁺⁺ , CD11b ⁺ , CD11c ⁺ , CD205 ⁺⁺ , CD103 ⁻ , EpCAM ⁺⁺ , Dectin-1 ⁺ , CD40 ⁻
	Haut-drainierender Lymphknoten	Langerin ⁺⁺ , MHC-II ⁺⁺⁺ , CD11b ⁺ , CD11c ⁺ , CD205 ⁺⁺ , CD103 ⁻ , EpCAM ⁺⁺ , Dectin-1 ⁺ , CD40 ⁺⁺
Langerin⁺ dermale DC (Langerin⁺ dDC)	Dermis	Langerin ⁺⁺ , MHC-II ⁺⁺ , CD11b ^{niedrig} , CD11c ⁺⁺ , CD205 ⁻ , CD103 ⁺⁺ , EpCAM ⁻ , Dectin-1 ⁻ , CD40 ^{niedrig}
	Haut-drainierender Lymphknoten	Langerin ⁺⁺ , MHC-II ⁺⁺⁺ , CD11b ^{niedrig} , CD11c ⁺⁺ , CD205 ⁻ , CD103 ⁺⁺ , EpCAM ^{+oder-} , Dectin-1 ⁻ , CD40 ⁺⁺
Langerin⁻ dermale DC (Langerin⁻ dDC)	Dermis	Langerin ⁻ , MHC-II ⁺⁺ , CD11b ⁺⁺ , CD11c ⁺⁺ , CD205 ⁺⁺ , CD103 ⁻ , EpCAM ⁻
	Haut-drainierender Lymphknoten	Langerin ⁻ , MHC-II ⁺⁺⁺ , CD11b ⁺⁺ , CD11c ⁺⁺ , CD205 ⁺⁺ , CD103 ⁻ , EpCAM ⁻

Tab. 1.1: Übersicht der DC – Subtypen in der Haut der Maus und der zu ihrer Identifizierung gebräuchlichen Oberflächenmoleküle

„+++“ – stark exprimiert, „-“ – nicht exprimiert, „+/-“ – nicht auf allen Zellen der Population exprimiert, DC = *dendritic cell*, dendritische Zelle; dDC = *dermal DC*, dermale DC; LC = *Langerhans cell*, Langerhans Zelle, EpCAM = *epithelial – cell adhesion molecule*, nach (25, 28)

In 2007 wurde gezeigt, dass alle drei Subpopulationen von DCs aus der Haut zum jeweiligen drainierenden Lymphknoten wandern können (25-27). 2009 konnten Brewig *et al.* zeigen, dass Langerin⁻ dDCs CD4⁺ T-Zellen aktivieren, wohingegen Langerin⁺ dDCs in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen involviert sind (5).

Es stellte sich auch heraus, dass Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs ein unterschiedliches Migrationsverhalten aufweisen. So zeigte sich, dass dDCs schon nach 24 Stunden, Langerhans Zellen hingegen erst nach 4 Tagen im Lymphknoten nachweisbar sind (25, 32). Des Weiteren sind dDCs vornehmlich an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel detektierbar (32). Dieser Bereich ist auch bekannt als „*cortical ridge*“ (33). Auf diesen Bereich wird später genauer eingegangen.

1.2.4 Mausmodelle zur Untersuchung von Langerin⁺ dendritischer Zellen

Das heterodimere Diphtheria Toxin (DT) wird von *Corynebacterium diphtheriae* gebildet. Es besteht aus zwei Untereinheiten, A und B, wobei B verantwortlich für die Rezeptorbindung ist und A die zytotoxische Einheit. Der Rezeptor für DT ist der *heparin – binding EGF – like growth factor* (HB – EGF, ab hier abgekürzt als DTR = *Diphtheria Toxin – Rezeptor*). Das murine Homolog zu diesem Rezeptor bindet nicht an die B – Untereinheit, weshalb Mauszellen weniger anfällig gegenüber DT sind. Die transgene Expression des hochaffinen DTR des Menschen in Mauszellen macht diese sensitiv gegenüber DT (34).

Diese Voraussetzungen machte man sich zunutze, um drei verschiedene Mauslinien zu generieren. Alle drei Modelle beruhen auf der Wirkung von DT und der Spezifität der Langerin-Expression auf bestimmte DC-Subtypen. Bei einem Modell wird die zytotoxische Untereinheit des DT konstitutiv unter der Kontrolle des Langerin-Promotors exprimiert. Diese Maus hat also keine Langerhans Zellen (35). Interessanterweise fehlen bei dieser transgenen Maus nur LCs, andere Langerin⁺ DCs sind nicht betroffen (36). Die beiden anderen Mausmodelle erlauben es, durch Gabe von *Diphtheria Toxin* (DT) Langerin⁺ DCs selektiv zu depletieren (5, 32, 37). Beim anderen Modell wird die zytotoxische Untereinheit des DT konstitutiv unter der Kontrolle des Langerin-Promotors exprimiert. Diese Maus hat also keine Langerhans Zellen (35). Interessanterweise fehlen bei dieser transgenen Maus nur LCs, andere Langerin⁺ DCs sind nicht betroffen (36). Alle drei Modelle beruhen auf der Wirkung von DT und der Spezifität der Langerin-Expression auf bestimmte DC-Subtypen.

Sowohl *Kissenpfennig et al.* als auch *Bennet et al.* fügten die für den humanen DTR und für das Fluoreszenzprotein *enhanced green fluorescence protein* (EGFP) kodierenden Sequenzen in das C57BL/6 – Mausgenom ein (*knock-in*). *Kissenpfennig et al.* fügten die DTR – EGFP – Expressionskassette in die 3'-untranslatierte Region des *langerin* – Gens ein, wohingegen *Bennet et al.* die Expressionskassette in das zweite Exon einfügten. In beiden Mausmodellen exprimieren alle Langerin⁺ Zellen den humanen DTR und sind somit sensitiv gegenüber DT (32, 37). Nach Injektion von 1 µg DT in Lang-DTR-EGFP Mäuse weisen beide Langerin⁺ Populationen unterschiedliche Repopulationskinetiken auf. Nach DT-Gabe kommt es zur Depletion beider DC-Populationen innerhalb von 24 – 48 Stunden. Langerin⁺ dDCs können

aber nach vier Tagen bereits wieder in der Dermis detektiert werden, Langerhans Zellen sind allerdings erst nach ungefähr zwei Wochen wieder in der Epidermis (25-27).

1.3 T-Zellen

Der Thymus, von dem sich das T der T-Zelle ableitet, bietet ein spezialisiertes Mikromilieu für die Reifung dieser Lymphozyten. Da T-Zellen MHC-abhängig sind, ist es wichtig, dass T-Zellen körpereigene MHC-Moleküle erkennen um an einer adaptiven Immunantwort teilnehmen zu können. Sie müssen also einer Selbstrestriktion unterliegen. Daher durchlaufen T-Zell-Vorläufer im Thymus sowohl eine positive als auch eine negative Selektion. Bei der positiven Selektion muss die T-Zelle mit den körpereigenen MHC-Molekülen reagieren um eine Überlebenssignal zu erhalten. Bei der negativen Selektion erhält eine T-Zelle, die mit körpereigenen Strukturen reagiert, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden, ein Todessignal. Nach erfolgreicher Selektion wandern die naiven T-Zellen über das Blut in die verschiedenen sekundären lymphatischen Organe. Die Lebensspanne einer T-Zelle hängt davon ab, ob die Zelle aktiviert wird, ob sie „ruhend“ durch den Blutkreislauf zirkuliert, ohne auf ihre entsprechendes Antigen zu treffen oder ob sich aus der Zelle eine Gedächtniszelle entwickelt (38-40).

Naive T-Zellen können über die hochendothelialen Venolen („*high endothelial venules*“, HEV) in die sekundären lymphatischen Organe wandern. Dabei tragen sie den Chemokinrezeptor 7 (CCR7) auf ihrer Oberfläche um über CCL20 aus den Blutstrom über HEVs in den T-Zellbereich zu gelangen. Ebenso exprimieren sie L-Selektin, auch bekannt als CD62L, ein weiteres Molekül das wichtig für die Migration aus den HEVs in das lymphoide Gewebe ist. In den sekundären lymphatischen Organen kann nun eine naive T-Zelle durch eine APC aktiviert werden, sofern der T-Zellrezeptor für das präsentierte Antigen spezifisch ist.

Zwischen APC und T-Zelle entsteht zur Aktivierung der T-Zelle eine immunologische Synapse. Um eine solche immunologische Synapse ausbilden zu können, kommt es zu einer Polarisierung des Zytoskeletts, verschiedenen Rezeptoren und kostimulatorischer Moleküle an der Stelle der Zell-Zell-Interaktion. Dadurch bildet

sich der supramolekulare Adhäsionskomplex aus (41). $CD8^+$ T-Zellen werden unter anderem durch auf MHC-Klasse-I – Molekülen präsentiertes Antigen aktiviert. $CD4^+$ T-Zellen werden dagegen durch Antigen, das auf MHC-Klasse-II – Molekülen präsentiert wird, aktiviert. Neben der Präsentation des Peptid/MHC-Komplexes braucht eine T-Zelle zur Aktivierung noch kostimulatorische Signale wie CD80 und CD86, die mit CD28 auf der T-Zelle wechselwirken. Erhält eine T-Zelle nur ein Signal über den T-Zell-Rezeptor, aber keine kostimulatorischen Signale, wird sie anerg, d. h. funktionell inaktiv (42).

Eine Hauptaufgabe von $CD8^+$ T-Zellen besteht darin, infizierte Wirtszellen zu eliminieren. Erkennt eine $CD8^+$ T-Zelle auf einem MHC-Klasse-I – Molekül präsentiertes wirtsfremdes Antigen, so induziert sie die Apoptose dieser Zelle. Deswegen werden $CD8^+$ T-Zellen auch zytotoxische T-Zellen genannt. $CD8^+$ T-Zellen wirken zytotoxisch über Granzym B und Perforin, indem sie diese Enzyme sezernieren (43). $CD8^+$ T-Zellen werden, sofern sie $IFN-\gamma$ produzieren und sezernieren auch Tc1-Zellen genannt. Das sezernierte $IFN-\gamma$ ist dabei z. B. während einer Infektion mit Leishmanien zur Ausbildung einer erfolgreichen Immunantwort wichtig (44).

1.3.1 $CD4^+$ T-Helfer-Zellen

$CD4^+$ T-Zellen können nach ihrer Aktivierung in verschiedene Subpopulationen differenzieren. Wichtig für diese Differenzierung sind DCs, die durch Freisetzung verschiedener Zytokine deren Differenzierung beeinflussen. So fördert IL-12 eine Differenzierung zur T_H1 T-Zelle wohingegen IL-4 die Entwicklung einer T_H2 T-Zelle fördert (45). Diese Subpopulationen können nach den von ihnen sezernierten Zytokinen unterschieden werden. Daneben trägt auch die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren zu ihrer Unterscheidung bei (11). So ist der Transkriptionsfaktor T-bet charakteristisch für T_H1 Zellen, dagegen Gata3 für T_H2 Zellen. T_H17 Zellen zeichnen sich durch die Expression von $ROR\gamma_t$ aus. Im Gegensatz zu den bisher erwähnten $CD4^+$ T-Zellen exprimieren folliculäre T-Helfer-Zellen (T_{FH} -Zellen) BCL-6.

Nach ihrer Aktivierung kommt es zu einer klonalen Expansion der aktivierten T-Zelle. Dabei gelten $CD4^+$ T-Zellen als T-Helfer-Zellen, da sie andere Zellen durch das Ausschütten von Zytokinen bei deren Aufgaben unterstützen. T_H1 Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie $IFN-\gamma$ sezernieren, welches wichtig für die zellvermittelte Immunität ist (11, 46). Dabei aktiviert $IFN-\gamma$ befallene Wirtszellen zur vermehrten Expression von MHC-Klasse-I – Molekülen. Zum anderen aktiviert von $CD4^+$ T-Zellen ausgeschüttetes $IFN-\gamma$ $CD8^+$ T-Zellen und Makrophagen (43, 45, 47).

T_H2 T-Zellen dagegen produzieren die Interleukine IL-4, IL-5 und IL-13 (46) und unterstützen B-Zellen bei der Produktion von antigenspezifischen Antikörpern (11). Diese Antikörper sind wichtig für eine erfolgreiche Immunantwort gegen Helminthen und extrazelluläre Bakterien (45). Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) sind wichtig bei der Regulation inflammatorischer Zellen zur Verhinderung von Gewebsschäden (11). T_H17 Zellen wurden durch die Produktion von IL-17 definiert. Sie wurden bei Autoimmunreaktionen sowie bei Infektionen mit Bakterien und Pilzen beschrieben (8, 48).

Neben den oben genannten T_H -Subtypen gibt es auch die folliculären T-Helfer-Zellen (T_{FH}) (8, 46). Auf diese T_H -Subpopulation wird nachfolgend näher eingegangen. Mittlerweile sind noch weitere T_H -Subpopulationen beschrieben worden, z. B. T_H9 Zellen, die bei der Abwehr von Helminthen beteiligt sind, oder T_H22 Zellen, die unter anderem bei der Wundheilung involviert sind (11). Abbildung 1.3 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen $CD4^+$ -T – Zell – Subpopulationen.

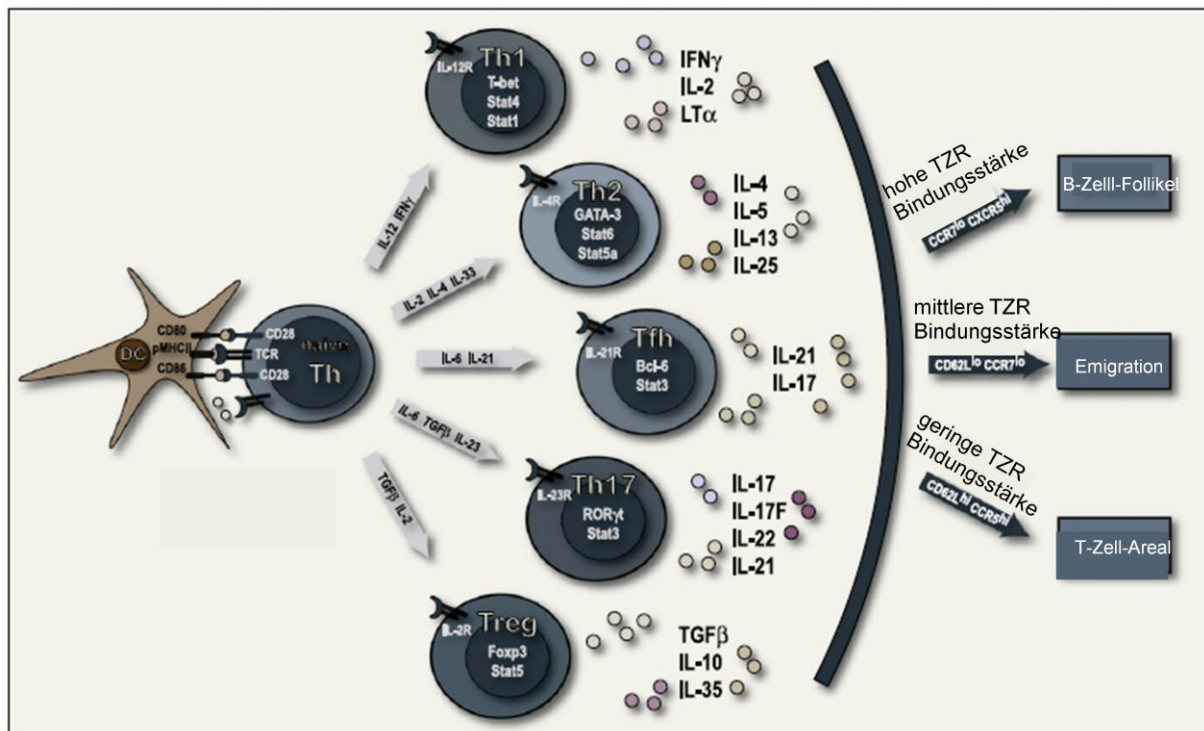


Abb. 1.2 Die verschiedenen CD4⁺ T-Helfer-Zellen

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Klassen von CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H). Eine naive T_H Zelle wird von einer DC aktiviert. Die Zytokine der DC, aber auch die Zytokine, die von der aktivierten T_H-Zelle produziert werden, bestimmen letztlich, in welche Subpopulation sich die Zelle entwickelt. Zu jeder Subpopulation sind die charakteristischen Transkriptionsfaktoren und Zytokine angegeben. Rechts, nach dem Bogen, wird eine Hypothese aufgestellt, nach der die Bindungsstärke zwischen MHC-Molekül und TZR (T-Zell-Rezeptor) dafür verantwortlich ist, was mit der T_H-Zelle passiert, nachdem sie proliferiert hat und ausdifferenziert ist. (8)

1.3.2 Follikuläre T-Helfer-Zellen

Im Jahr 2000 wurden follikuläre T-Helfer-Zellen (T_{FH}) zum ersten Mal beschrieben. Dabei handelte es sich um eine Population von CD4⁺ T-Zellen, die bei gesunden Menschen in den Tonsillen gefunden wurden und den Chemokinrezeptor CXCR5 exprimierten (8). Neben T_{FH}-Zellen tragen diesen Rezeptor auch B-Zellen. Dies ist von großer Bedeutung, da die im B-Zell-Follikel nachweisbaren follikulären DCs (FDCs) den Liganden CXCL13 exprimieren und somit zu einer Rekrutierung von T- und B-Zellen führen (11, 49). Dadurch kommt es zu einer Kompartimentierung im B-Zell-Follikel, was besonders bei einer Keimzentrumreaktion wichtig ist (12).

Diese T_{FH}-Zellen sind definiert durch die Expression verschiedener Rezeptoren. Dazu gehören neben dem bereits erwähnten CXCR5 PD-1 (*programmed death 1*) oder ICOS (*inducible costimulator*). Außerdem exprimieren sie CD40L (50), wobei

der Rezeptor, CD40, sowohl auf DCs als auch auf B-Zellen exprimiert wird. Die Expression des Transkriptionsfaktors BCL-6 ist ein weiteres Unterscheidungsmerkmal der T_{FH} -Zellen zu anderen $CD4^+$ T_H -Zellen, da andere $CD4^+$ T-Zell – Subpopulationen positiv für den auf BCL-6 antagonistisch wirkenden Transkriptionsfaktor BLIMP-1 sind (8, 50-52). Wichtig ist es, T_{FH} -Zellen von T_H2 Zellen unterscheiden zu können. Dabei sind T_{FH} -Zellen unter anderem positiv für BCL-6, zeigen eine verminderte Expression von GATA3 und exprimieren CXCR5 im Gegensatz zu T_H2 Zellen (53). Es zeigte sich auch, dass während einer Infektion mit Helminthen die Mehrheit an IL-4 Produzenten nahe dem GC lokalisiert sind und diese Marker für T_{FH} -Zellen exprimieren. Auch können diese Zellen weniger Eosinophile rekrutieren als T_H2 Zellen (52). Eine Zusammenfassung von Molekülen zur Charakterisierung von T_{FH} -Zellen zeigt Tabelle 1.2. Am wichtigsten ist aber die Lokalisation der T_{FH} -Zellen im B-Zell-Follikel (11).

Marker für T_{FH} -Zellen	
Marker	Name
BCL-6	B – cell CLL/lymphoma 6
BTLA	B – and T – cell attenuator
CD40L	CD154
CXCR5	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 5
ICOS	inducible costimulator
IL-21	Interleukin-21
OX40	CD134
PD-1	programmed death 1
SAP	SLAM – associated protein

Tab. 1.2: Übersicht der verschiedenen Marker für T_{FH} -Zellen

Die verschiedenen Marker der T_{FH} -Zellen. Nach (11)

Um in den B-Zell-Follikel migrieren zu können, exprimieren T_{FH} -Zellen vermehrt CXCR5, wohingegen naive T_H -Zellen CCR7 exprimieren (8, 46). Wie T_{FH} -Zellen jedoch induziert werden und welche besonderen Moleküle für die Induktion der Differenzierung einer naiven $CD4^+$ T-Zelle zur T_{FH} -Zelle wichtig sind ist bis heute noch relativ unklar.

Es wird in Betracht gezogen, dass mehrere Schritte benötigt werden, um eine naive $CD4^+$ T-Zelle zur Differenzierung zu einer T_{FH} -Zelle zu aktivieren. Dabei nimmt man eine initiale Aktivierung durch eine nicht näher charakterisierte DC an, wobei die nun voraktivierte T-Zelle im „*cortical ridge*“, also dem Grenzbereich zwischen T-Zell-Areal und B-Zell-Follikel, einen weiteren Stimulus durch eine B-Zelle erhält (49, 54). *Deenick et al.* konnten bei Experimenten mit SAP-defizienten Tieren zeigen, dass diese Tiere weniger antigenspezifische T_{FH} -Zellen besitzen, was eine wichtige Rolle SAP in der Entwicklung der T_{FH} -Zellen nahe legt. Des Weiteren zeigten Immunisierungen mit OVA (Ovalbumin), dass sobald das Antigen im drainierenden Lymphknoten aufgebraucht war die Antigenpräsentation durch B-Zellen für die Differenzierung neuer T_{FH} -Zellen benötigt wurde. Gab man aber den Tieren wiederholt OVA, sodass es zu keinem Mangel kam, war die Antigenpräsentation durch B-Zellen nicht mehr notwendig. Dies legt nahe, dass B-Zellen an sich weniger bedeutsam für die Induktion von T_{FH} -Zellen sind, denn als Quelle von präsentiertem Antigen. Auch konnte gezeigt werden, dass durch andauernde OVA-Applikation immer mehr T_{FH} -Zellen generiert wurden, aber die humorale Immunantwort ab einen gewissen Punkt sich nicht weiter verbesserte. Dies legt nahe, dass es einer gewissen Anzahl an T_{FH} -Zellen bedarf, um eine humorale Immunantwort zu induzieren, aber mehr Zellen keinen weiteren positiven Effekt haben (54).

In ICOS-defizienten Mäusen konnte eine reduzierte T_{FH} -Zellpopulation in Lymphknoten nachgewiesen werden (54-56). Mutationen in *ICOS* und *CD40LG* führen bei betroffenen menschlichen Patienten ebenfalls zu einer verminderten T_{FH} -Zellpopulation (56), was vermuten lässt, dass beide Moleküle entweder für die Induktion der Differenzierung oder zum Überleben dieses Zelltyps wichtig sind (54). Bisher konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von CD28 mit B7 Molekülen der DC für die initiale Aktivierung einer naiven T-Zelle zur T_{FH} -Zelle wichtig ist, während die ICOS – ICOSL – Interaktion eher bei der Aktivierung der T_{FH} -Zelle durch eine B-Zelle beteiligt scheint (11).

Nachdem T_{FH} -Zellen aktiviert wurden, exprimieren sie verstärkt CXCR5 und reduzieren dagegen die Expression von CCR7. Dadurch wandern sie in den B-Zell-Follikel, in welchen sie mit aktivierten B-Zellen Konjugate bilden (8, 11, 57). Im B-Zell-Follikel bildet sich daraufhin das Keimzentrum (*germinal center*, GC). Dabei sezernieren T_{FH} -Zellen IL-21, das die B-Zellen für ihre Reifung brauchen. IL-21 wirkt auch wiederum autokrin auf die T_{FH} -Zellen selbst, was in IL-21 – defizienten Mäusen gezeigt werden konnte (11). Durch die Hilfe von T_{FH} -Zellen wird die Größe des GC, aber auch der Isotyp sowie die Affinität des Antikörpers festgelegt (57). Dabei zeigten *Reinhardt et al.* auch, dass T_{FH} -Zellen nach einer Infektion mit *L. major* Parasiten IL-4 sezernieren (57), wobei dies auch von einer anderen Laborgruppe bei einer LMCV (*lymphocytic choriomeningitis virus*) – Infektion bestätigt werden konnte (58). In letzter Zeit mehren sich auch Hinweise, dass T_{FH} -Zellen bei Autoimmunreaktionen involviert sein können, wenn sie zu sehr akkumulieren oder ihre Regulation gestört ist (59).

Mittlerweile wurde die Theorie postuliert, dass es innerhalb der T_{FH} -Zellen verschiedene Subpopulationen gibt (8, 58). Hinweise erhielt man bei einer LMCV-Infektion, bei der Virus – spezifische T-Zellen verwendet wurden. Dadurch erhielt man auch Virus-spezifische T_{FH} -Zellen. Dabei zeigte sich aber, dass nur ungefähr 20% dieser spezifischen T_{FH} -Zellen im GC zu finden waren. Als Marker für T_{FH} -Zellen, die im GC lokalisiert waren konnte GL7 identifiziert werden. Bei diesen Experimenten zeigte sich, dass diese T_{FH} -Zellen im GC mehr IL-4 exprimierten als T_{FH} -Zellen, die negativ für GL7 waren (58).

Es ist auch bekannt, dass nach einer Infektion T_{FH} -Zellen im Blutkreislauf detektiert werden können. Dabei scheinen einige T_{FH} -Zellen nach einer Infektion zu Gedächtniszellen zu differenzieren (8, 60).

1.4 Die B-Zelle

B-Zellen entwickeln sich aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Dabei beruht die frühe Entwicklung unter anderem auf dem Transkriptionsfaktor PAX5 (*paired box protein 5*), indem er nur die Entwicklung lymphoider Vorläuferzellen hin zur B-Zelle erlaubt (61). Die genetische Neuordnung der Immunoglobulin schweren Kette (IgH) führt von der pro-B-Zelle zur pre- (*precursor*) B-Zelle. Dadurch kommt es zu einer klonalen Expansion und einer genetischen Neuordnung der Immunoglobulin leichten Kette (IgL). Die Expression von IgM auf der Zelloberfläche erlaubt nun eine negative Selektion autoreaktiver B-Zellen. Bei dieser negativen Selektion testen die B-Zellen ihre Reaktivität mit umgebenden Zellen. Nicht reaktive B-Zellen verlassen als naive B-Zellen das Knochenmark und sind definiert als B220⁺IgM⁺ (62). Ein Teil der B-Zellen bleibt danach in der marginalen Zone der Milz und rezirkuliert nicht im Blutkreislauf. Die B-Zellen der marginalen Zone können unter anderem Antigen zu follikulären B-Zellen transportieren (63). Die meisten B-Zellen zirkulieren als naive langlebige B-Zellen und durchqueren dabei die Milz, Lymphknoten und das Knochenmark. Dabei sind sie in den sekundären lymphatischen Organen in den B-Zellfollikeln zu finden, weswegen sie auch follikuläre B-Zellen genannt werden (63). Sie zirkulieren solange, bis die B-Zelle stirbt oder auf ihr passendes Antigen trifft (62). Ein wichtiges Überlebenssignal erhalten die B-Zellen in den Follikeln durch andere Zellen wie z. B. FDCs. Dabei herrscht ein Druck auf den B-Zellen, in solche Follikel zu gelangen, schafft dies eine B-Zelle nicht, so stirbt sie durch Apoptose (1).

1.4.1 Die Entwicklung der Plasmazelle

Antigen kann sowohl in löslicher Form B-Zellen in sekundär lymphatischen Geweben aktivieren, als auch präsentiert durch DCs oder Makrophagen (64). Antigen kleiner als 70 kDa kann in die Bahnen des lymphatischen Gewebes diffundieren und gelangt so in Kontakt mit naiven B-Zellen (64). Entgegen FDCs, die Antigen über Fc- und Komplementrezeptoren präsentieren, ist der Mechanismus durch DCs und Makrophagen noch sehr unklar (65). Jedoch gibt es Hinweise, dass die B-Zell-Aktivierung über gebundenes Antigen wichtiger ist als durch lösliches Antigen (66).

Durch die Aufnahme von gebundenem Antigen kommt es zum einen zum Transmembransignaling was zur Proliferation der B-Zelle führt und zum anderen zur Antigenprozessierung, um das Antigen über MHC-Klasse-II – Moleküle T-Zellen präsentieren zu können (67). Es gibt zwei verschiedene antikörpersezernierende B-Zellen nach einer Aktivierung, zum einen die kurzlebigen Plasmablasten, zum anderen die langlebigen Plasmazellen (64). Auf diese beiden Subpopulationen wird im Folgenden näher eingegangen.

Es gibt zwei Wege einer Plasmazell-Entwicklung. Die Affinität des B-Zellreptors zum präsentierten Antigen bestimmt die weitere Differenzierung der B-Zelle. Hochaffine B-Zellen werden zu kurzlebigen Plasmazellen, den Plasmablasten. B-Zellen mit einer geringeren Affinität für das Antigen können eine Keimzentrumsreaktion induzieren (66-68).

Extrafollikuläre Plasmablasten expandieren bis ungefähr acht Tage nach einer Infektion und schütten hohe Mengen an Antikörper aus. Dabei haben sie eine geringe Fähigkeit zum Isotypwechsel, sie sind allerdings nicht in der Lage eine somatische Hypermutation durchzuführen. Daher sezernieren diese extrafollikulären Plasmazellen keine hoch affinen Antikörper (69). Diese B-Zellen können sowohl T-Zell – abhängig als auch unabhängig induziert werden (62). Bei der T-Zell-abhängigen Entwicklung sind T_{FH} -Zellen involviert (69).

Dagegen resultiert die follikuläre B-Zell-Entwicklung zum einen in hoch affinen Gedächtnis-B-Zellen, zum anderen in langlebigen Plasmazellen, die in das Knochenmark auswandern (62, 64). Während der Entwicklung dieser Zellen werden die sogenannten Keimzentren gebildet, die nachfolgend näher beschrieben werden.

1.4.2 Das Keimzentrum

Nach ihrer Aktivierung bilden B-Zellen im B-Zellfollikel Keimzentren (*germinal center*, GC). In diesen sind neben B-Zellen auch die bereits beschriebenen T_{FH} -Zellen zu finden (12, 62, 64). Im GC reifen die B-Zellen, d. h. es kommt zuerst zum Wechsel des Isotyps des sezernierten Antikörpers bevor sie die somatische Hypermutation durchführen. Unter Isotypwechsel versteht man den Wechsel der Antikörperklasse. Dabei wird nicht mehr IgM sezerniert, sondern IgG, IgA oder IgE (62). Die

somatische Hypermutation betrifft die variable Region der Immunglobulin Gensequenz. Dabei verändert sich durch diese Mutation die Affinität des Immunoglobulins. Allerdings kann diese bei der somatischen Hypermutation besser, aber auch schlechter werden (59). Für diese beiden Vorgänge ist die *activation – induced cytosin deaminase* (AID) ein sehr wichtiges Protein (70). B-Zellen aus dem GC werden entweder zu Gedächtnis-B-Zellen oder zu langlebigen Plasmazellen {Shapiro-Shelef, 2005, p01151

Das GC besteht aus zwei Subkompartimenten, der hellen Zone und der dunklen Zone. Die dunkle Zone ist dem T-Zellbereich zugewandt. Darin befinden sich B-Zellen, die auf ihrer Oberfläche weniger Immunglobulin tragen, die sogenannten Zentroblasten. In dieser Zone sind auch die bereits erwähnten T_{FH}-Zellen lokalisiert, die den B-Zellen hier beim Isotypwechsel und der anschließenden somatischen Hypermutation helfen. Nachdem diese abgeschlossen ist, stoppt der Zentroblast die Proliferation und wandert in die helle Zone, wo die B-Zelle auch Zentrozyt genannt wird. Diese exprimieren hohe Mengen an membranständigem Immunglobulin. Daneben findet man in der hellen Zone die FDC, die den B-Zellen Antigen präsentieren. Mutierte B-Zellen werden selektiert nach der Affinität des Antikörpers zum Antigen, das auf FDCs präsentiert wird, wobei sie ein Überlebenssignal erhalten. Nachdem sie das prozessierte Antigen den T_{FH}-Zellen über das MHC-Klasse-II – Molekül präsentiert haben erhalten sie ebenfalls ein Signal. Das Überlebenssignal in der hellen Zone sowie das Signal der T_{FH}-Zellen führen dazu, dass die B-Zelle als Gedächtniszelle bzw. langlebige Plasmazelle aus dem Lymphknoten auswandert. B-Zellen, die kein Überlebenssignal erhalten haben, gehen entweder in Apoptose oder beginnen einen neuen Zyklus somatischer Hypermutation (12, 59). Abbildung 1.4 fasst schematisch die Vorgänge im Keimzentrum zusammen.

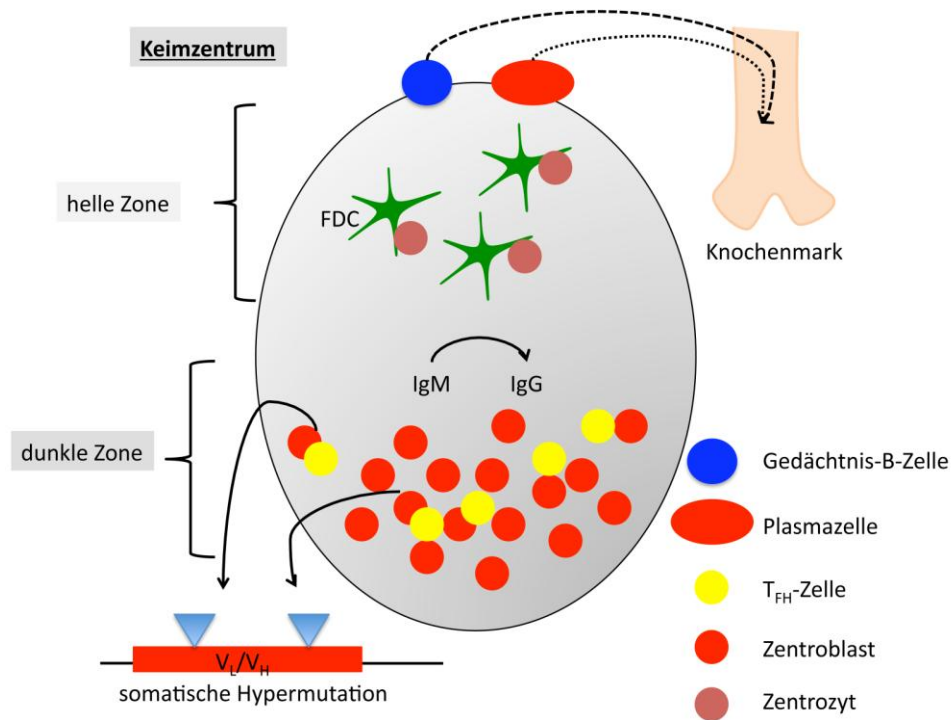


Abbildung 1.3: Die Keimzentrumsreaktion

Die Abbildung zeigt schematisch die Abläufe während einer Keimzentrumsreaktion. B-Zellen wechseln durch Hilfe von T_{FH}-Zellen den Isotyp, hier dargestellt der Wechsel von IgM zu IgG. Nach dem Isotypwechsel findet die somatische Hypermutation in den für die variablen Teile des Antikörper codierenden Gensequenzen statt. Diese Vorgänge finden in der dunklen Zone statt. Anschließend migriert die B-Zelle in die helle Zone des Keimzentrum zu den FDCs, und wird dann Zentrozyt genannt. War die Affinitätsreifung erfolgreich, entwickelt sich die B-Zelle zu Gedächtnis-B-Zellen oder langlebigen Plasmazellen, die ins Knochenmar wandern.

1.5 Der „cortical ridge“

2004 wurde im Lymphknoten eine Struktur an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel beschrieben, die „cortical ridge“ (CR) genannt wurde. Dieser Bereich weist ein dichtes retikuläres Netzwerk auf. Des Weiteren zeigten die Autoren, dass dieser Bereich reich an hochendothelialen Venolen (*high endothelial venules*, HEV) ist. Bei Migrationsversuchen konnte weiters gezeigt werden, dass DCs, unter anderem aus der Haut, bevorzugt in diese Region migrieren (32, 33). Daraufhin stellten die Autoren die These auf, dass im CR eine erste Interaktion zwischen antigenbeladenen DCs und T-Zellen stattfindet (33). Auch andere Autoren beschreiben eine distinkte immunologische Plattform, bzw. betonen den Grenzbereich zwischen T-Zell-Areal und B-Zell-Follikel als Ort der Aktivierung von sowohl T- als auch B-Zellen (8, 54, 57).

1.6 Die beiden Transkriptionsfaktoren BCL-6 und BLIMP-1 und ihre Bedeutung für die T-Zellen und B-Zellen

Die beiden Transkriptionsfaktoren „*B – cell CLL/lymphoma 6*“ (BCL-6) und „*B – lymphocyte – induced maturation protein 1*“ (BLIMP-1) haben sowohl in der T-Zell – Entwicklung als auch bei der Differenzierung von B-Zellen wichtige Funktionen (51). Dabei ist ihre Rolle bei der B-Zell-Differenzierung am besten untersucht, da man beide mit der Entstehung von Lymphomen in Verbindung brachte (51, 71). Ein wichtiges Merkmal dieser beiden Proteine ist die Fähigkeit sich gegenseitig zu supprimieren, wobei beide Proteine direkt an die jeweilig andere Gensequenz binden (51, 59). Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung von BCL-6 und BLIMP-1 für die Entwicklung von T- und B-Zellen erläutert.

1.6.1 Die Bedeutung von BCL-6 für T- und B-Zellen

Für die Ausbildung von Keimzentren ist die Hilfe von $CD4^+$ T-Zellen wichtig. Allerdings sind T_H1 , T_H2 und T_H17 Zellen dafür nicht verantwortlich (8, 54, 72). Bei der dafür verantwortlichen T-Zellsubpopulation, den T_{FH} -Zellen konnte durch Versuche mit konstitutiv BCL-6 exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen gezeigt werden, dass BCL-6 der entscheidende Transkriptionsfaktor für diese T-Zellen ist. So weisen Tiere mit konstitutiv BCL-6 exprimierenden $CD4^+$ T-Zellen vergrößerte Keimzentren auf und haben höhere Titer an antigenspezifischen Antikörpern (73, 74). Im Gegensatz dazu besitzen BCL-6^{-/-} Tiere keine T_{FH} -Zellen. $CD4^+$ T-Zellen können in diesen Tieren zwar aktiviert werden, allerdings sind sie nicht in der Lage eine Keimzentrumsreaktion zu induzieren. BCL-6 führt zu einer vermehrten Expression von ICOS, PD-1 und CXCR5 und inhibiert andererseits die Expression von z. B. GATA3 oder STAT6, die beide wichtig für die Induktion einer T_H2 -Antwort sind (59, 74). Diese Ergebnisse verdeutlichen die Rolle von BCL-6 für die Differenzierung von T_{FH} -Zellen (73, 74). BCL-6 wirkt als Dimer supprimierend auf die Expression seiner Zielgene, wie z. B. das bereits erwähnte GATA3. BCL-6 kann allerdings erst suppressorisch wirken, wenn weitere Proteine an BCL-6 gebunden haben. Dieses

Zusammenwirken mit anderen Proteinen erlaubt es BCL-6, in verschiedenen Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Differenzierung aktiv zu sein (51).

Wie bereits erwähnt zeigen BCL-6^{-/-} Tiere keine Keimzentren und somit durchlaufen die B-Zellen dieser Tiere keine Affinitätsreifung der Antikörper. Allerdings besitzen diese Tiere Plasmazellen und sezernieren Antikörper. Dagegen zeigen Tiere mit B-Zellen, die BCL-6 konstitutiv exprimieren, vergrößerte Keimzentren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (51). Bei näherer Betrachtung entdeckte man, dass BCL-6 die Proliferation der B-Zellen im Keimzentrum induziert und die Expression von Enzymen, die für die Reparatur von DNS-Schäden wichtig sind, unterdrückt. Diese Schäden der DNS sind für die B-Zellen wichtig, um hochaffine antigenspezifische Antikörper im Verlauf einer Immunantwort sezernieren zu können (51).

1.6.2 Die Bedeutung von BLIMP-1 für T- und B-Zellen

Wie bereits zuvor erwähnt ist die Expression von BCL-6 in T_{FH}-Zellen ein Unterscheidungsmerkmal zu den anderen CD4⁺ T-Zellsubpopulationen, da diese BLIMP-1 exprimieren. Allerdings wird BLIMP-1 erst sehr spät in ihrer Entwicklung exprimiert (51).

Eine Keimzentrumsreaktion kann im Gegensatz zu BCL-6⁺ T_{FH}-Zellen nicht von BLIMP-1⁺ CD4⁺ T-Zellen induziert werden (72). BLIMP-1 defiziente CD4⁺ T-Zellen differenzieren bevorzugt zu T_{FH}-Zellen, was darauf zurück zu führen ist, dass BLIMP-1 BCL-6 und damit die Entwicklung von T_{FH}-Zellen supprimiert. Diese BLIMP-1 defizienten Zellen neigen zu einer verstärkten Proliferation, wobei dies zu Autoimmunerkrankungen führen kann. BLIMP-1 ist ebenfalls wie BCL-6 ein Transkriptionsrepressor. Wie BCL-6 braucht BLIMP-1 weitere an sich gebundene Proteine für die suppressorische Wirkung (71).

BLIMP-1 defiziente Tiere zeigen vergrößerte GCs, was darauf zurückzuführen ist, dass BLIMP-1 das für die Proliferation von B-Zellen wichtige BCL-6 supprimiert. Dagegen sind in diesen Tieren keine Plasmazellen nachzuweisen, sowohl kurzlebige extrafollikuläre Plasmazellen als auch langlebige Plasmazellen, was darauf schließen lässt, dass BLIMP-1 für deren Ausbildung oder B-Zelldifferenzierung essentiell ist. Allerdings waren in diesen Tieren Gedächtnis-B-Zellen vorhanden. (51). Aufgrund

dieser Ergebnisse ist zusammenfassend anzunehmen, dass von Zellen in der dunklen Zone des Keimzentrums BCL-6 exprimiert wird, da diese Zellen eine hohe Proliferationsrate aufweisen. Bei der Entwicklung hin zur Plasmazelle jedoch wird BLIMP-1 aktiviert, welches für die Ausbildung des Sekretionsapparats zum Sezernieren von Antikörpern wichtig ist und eine weitere Proliferation der Plasmazellen unterbindet (51).

1.7 Die Leishmaniose

1.7.1 Die Leishmaniose des Menschen

Die Leishmaniose ist weltweit verbreitet und kommt besonders in den tropischen bzw. subtropischen Regionen vor. Aktuell sind ungefähr 12 Millionen Menschen infiziert mit 350 Millionen lebend in Risikogebieten. Jährlich kommt es zu ca. 2 Millionen Neuerkrankungen (75). Für die Behandlung der Leishmaniose werden neben Antimonpräparaten Amphotericin B, Miltefosin und Paromomycin verwendet, die aber zu starken Nebenwirkungen führen. Eine Impfung gibt es bisher nicht (24, 76).

Aktuell sind 20 für den Menschen pathogene Leishmanien – Arten bekannt. Je nach Symptomatik unterscheidet man kutane, mukokutane und viszerale Leishmaniose. Die kutane Leishmaniose wird unter anderem durch *L. major*, *L. tropicana*, *L. mexicana* und *L. amazonensis* verursacht. Diese kutane Leishmaniose ist die häufigste Form der Krankheit. Sie kommt in Europa, aber auch im Nahen Osten vor. Dabei verursacht der Parasit lokale, ulzerierende Hautläsionen, die innerhalb von 3 Monaten bis hin zu zwei Jahren auch ohne Behandlung ausheilen. Allerdings bleiben lebenslang Narben zurück (24). Die mukokutane Leishmaniose, unter anderem durch *L. braziliensis* verursacht, kommt in Mittel – und Südamerika vor. Dabei entstehen Läsionen der Schleimhäute der Nase, Mund des Rachens. Die schwerste Form, die viszerale Leishmaniose wird durch *L. donovani* und *L. infantum* verursacht. Diese kommt vor allem in Europa, Afrika, Mittel- und Südamerika vor. Dabei kommt es zur Schwellung von Milz und Leber, sowie Fieberschüben und Gewichtsverlust (75, 76).

1.7.2 Der Parasit und sein Lebenszyklus

Bei den Leishmanien handelt es sich um obligat intrazelluläre Erreger der Familie *Trypanosomatidae* (76). Der Parasit folgt einem zweiphasigen Lebenszyklus. Dabei kommt er im Vektor, der Sandmücke, als gestreckte, etwa 10 – 15 µm große, begeißelte, promastigote Form vor. In ihren Wirten, zu denen neben Menschen auch Hunde, Katzen und Pferde gehören, transformieren die Leishmanien in die sogenannte amastigote, 2,5 – 6,8 µm große Form. In Abbildung 1.3 ist der Lebenszyklus der Leishmanien dargestellt. Dieser beginnt damit, dass eine weibliche Sandmücke der Gattung *Phlebotomus* oder *Lutzomyia* 10 bis 100 infektiöse, metazyklische, promastigote Leishmanien durch einen Stich in die Haut des Wirtes injiziert. Im Säugetierwirt replizieren die Leishmanien in den Vakuolen von Zellen des mononukleären Systems, vor allem Makrophagen. Dort transformieren sie innerhalb von wenigen Tagen in die amastigote Form und es kommt zur massiven Vermehrung durch Teilung. Schließlich platzt die befallene Zelle und die Leishmanien befallen weitere Zellen. Dabei gelangen amastigote Leishmanien auch in Zellen des Blutkreislaufs, wie Makrophagen und Neutrophile. Bei der nächsten Blutmahlzeit einer Sandmücke kann es sein, dass sie diese befallenen Zellen aufnimmt. Im Darm der Sandmücke werden die infizierten Zellen verdaut, wodurch die amastigoten Parasiten frei werden und sich zu promastigoten Parasiten umwandeln. Der Zyklus kann somit von neuem beginnen (75, 77).

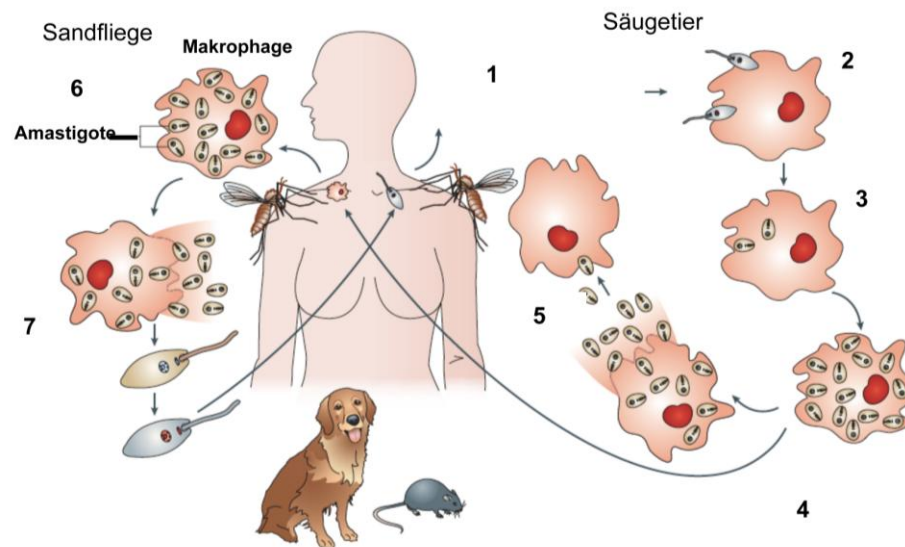


Abb.1.4 Lebenszyklus von Leishmanien

1: Eine weibliche, infizierte Sandfliege überträgt während der Blutmahlzeit Parasiten auf den Wirt. 2: Die promastigote Form des Parasiten wird von Makrophagen aufgenommen. 3: In den Makrophagen wandelt sich die promastigote Form zur amastigoten Form um. 4: Die Parasiten vermehren sich in den Wirtszellen. 5: Die Wirtszellen werden vom Parasiten zum Bersten gebracht und die Parasiten infizieren neue Zellen und gelangen so unter anderem auch in den Blutkreislauf. 6: Eine Sandfliege nimmt während ihrer Blutmahlzeit diese infizierten Zellen auf. 7: Im Darm der Sandfliege transformieren die amastigoten Leishmanien wieder in die promastigote Form und der Zyklus kann von neuem beginnen. Neben Menschen sind z. B. Hunde und Nagetiere ein Reservoir für den Parasiten (77).

1.7.3 Die Immunantwort gegen *Leishmania major*

Wie bereits erwähnt verursachen Parasiten der Gattung *L. major* ulzerierende, selbstheilende Hautläsionen. Die durch die Infektion ausgelöste Immunantwort kann in verschiedene Phasen unterteilt werden. Im ersten, auch als „stille Phase“ bezeichneten Abschnitt der Infektion kommt es zur Infektion der Makrophagen durch *L. major*. Dabei nutzt der Parasit das Komplementsystem des Wirtes. Spezielle Oberflächenmoleküle des Parasiten führen zur Aktivierung des Komplements und zur Bindung der Komplementfaktoren C3bi und C3b an die Oberfläche des Parasiten. Makrophagen besitzen den entsprechenden Komplementrezeptor (*complement receptor*, CR) 3 und es entsteht ein Kontakt zwischen Parasiten und Makrophage. Dadurch kommt es zur Phagozytose der Erreger durch den Makrophagen (24). Um im Phagolysosom der Makrophage zu überleben inhibiert der Parasit die Produktion

von antimikrobiellem Stickstoffmonoxid (NO) und von IL-12. Des Weiteren kann der Parasit die Antigenpräsentations- und Wanderungsfähigkeit der Wirtszelle negativ beeinflussen, womit er sich einen Vorteil gegenüber der Immunantwort des Wirtes verschafft. Diese Phase, in der kaum klinische Symptome zu beobachten sind, dauert vier bis fünf Wochen. In dieser Zeit repliziert sich der Parasit massiv im Wirt. Durch die Infektion weiterer Makrophagen kommt es zu einer zweiten Phase, die mit klinischen Symptomen verbunden ist. Die bereits erwähnten Hautläsionen werden durch einwandernde Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Mastzellen, Eosinophile, Neutrophile und weiteren Makrophagen ausgelöst. Vor allem Mastzellen tragen zur Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins TNF bei (78). Dies führt dazu, dass weitere Zellen des angeborenen Immunsystems angelockt werden. Diese bilden unter anderem CCL3 und CCL4, was zu einer weiteren Invasion von Makrophagen führt. Ungefähr sechs Wochen nach der Infektion kommt es schließlich zu einer adaptiven Immunantwort. Diese T_H1 -Zell-Antwort wird durch IL-12 produzierende DCs im Haut-drainierenden Lymphknoten induziert. T_H1 -Effektorzellen wandern daraufhin in die infizierte Haut ein und tragen durch die Produktion von $IFN-\gamma$ zur Aktivierung der Makrophagen bei. Dadurch sind die Makrophagen in der Lage, die Parasiten effizienter zu eliminieren. Auch $IFN-\gamma$ -produzierende $CD8^+$ T-Zellen, auch Tc 1-Zellen (*cytotoxic type 1*) genannt, werden während einer Immunantwort gegen Leishmanien induziert und unterstützen die Makrophagenaktivierung am Ort der Infektion (76). Nach einer erfolgreichen Immunantwort gegen *L. major* persistieren einige Parasiten im Organismus, was für die Ausbildung einer schützenden Gedächtnis-Antwort wichtig zu sein scheint (75-77).

1.7.4 Das experimentelle Modell der Leishmaniose

Das Modell der experimentellen Leishmaniose an Mäusen hat in den letzten Jahren viel zum Verständnis der Immunantwort beigetragen.

Für den Infektionsverlauf spielt der genetische Hintergrund der infizierten Mäuse eine wichtige Rolle. C57BL/6 Mäuse entwickeln eine T_H1 Antwort während einer Infektion und sind somit, wie oben ausführlich beschrieben in der Lage die Parasiten zu eliminieren. Dabei bilden sie wie es für eine T_H1 -Antwort typisch ist, ein

immunologisches Gedächtnis aus. Dies wird durch eine intradermale Injektion von Leishmanien-Antigen getestet wodurch es zu einer DTH-Reaktion (*delayed type hypersensitivity*) kommt. Dadurch wird eine lokale Entzündungsreaktion durch Gedächtnis-T-Zellen hervorgerufen. Dieses Phänomen nutzt man auch bei Patienten. Der Test wird Montenegro-Test genannt. Zeigt der Patient nach intradermaler Leishmanien-Antigengabe eine Reaktion, so ist eine vorangegangene Leishmanien-Infektion wahrscheinlich. Diese Reaktion wird durch Makrophagen, die durch IFN- γ von T_H1 Zellen aktiviert wurden, verursacht (79-81). Bei der DTH-Reaktion kommt es schon nach 24 Stunden zu einer lokalen Entzündungsreaktion (24).

BALB/c Mäuse dagegen entwickeln einen chronischen Krankheitsverlauf. Dabei kommt es zu einer T_H2 Antwort (79). Daher erlaubt die experimentelle Leishmaniose, zwei verschiedene Krankheitsverläufe nebeneinander zu studieren. So zeigt die Infektion bei C57BL/6 Mäusen einen selbstheilenden Verlauf, der der lokal kutanen Leishmaniose des Menschen sehr ähnlich ist.

Bei dem Hoch-Dosis-Modell werden $1-3 \times 10^6$ Parasiten intradermal oder subkutan injiziert. Näher an der natürlichen Übertragung ist die Injektion von 100-1000 Parasiten, dieses nennt man das Niedrig-Dosis-Modell. Dabei gibt es Hinweise, dass CD8⁺ T-Zellen bei diesem Infektionsmodell eine entscheidende Rolle spielen, wohingegen sie bei der Infektion mit $1-3 \times 10^6$ Parasiten nicht von Bedeutung sind (82).

Weiters ist zu beachten, dass der verwendete *L. major* – Stamm den Verlauf der Krankheit wesentlich beeinflusst (24, 83). So zeigt der *L. major*-Stamm MHOM/IL/80/FRIEDLIN eine weitaus schwächere Pathologie und Immunantwort als der in dieser Arbeit verwendete *L. major*-Stamm MHOM/IL/81/FE/BNi (83). Neben den verschiedenen Stämmen gibt es verschiedene Injektionsstrategien. Eine oft angewandte Strategie ist die Injektion der Parasiten subkutan in die Fusspfote. Dadurch ist es möglich, den Verlauf der Infektion anhand der Fussdickenschwellung gut zu verfolgen. Neben der Injektion in den Fuß werden Parasiten auch intradermal ins Ohr injiziert. Auch gibt es Arbeitsgruppen, die Parasiten in die Schwanzwurzel injizieren. Diese verschiedenen Injektionsstrategien können einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion haben, denn die zelluläre Umgebung ist wichtig für eine erfolgreiche Immunantwort.

1.7.4.1 Die humorale Immunantwort während einer Leishmaniose

Nach einer Infektion mit Leishmanien sind DCs aus der Dermis wichtig für die Induktion einer T_H1 Immunantwort (5). Dabei werden $CD4^+$ T-Zellen durch Langerin⁺ DCs aktiviert, es kommt zu einer Interaktion zwischen T-Zellrezeptor und MHC-Klasse-II-Molekül. Durch den Mechanismus der „*cross presentation*“ können auch MHC-Klasse-I retringierte $CD8^+$ T-Zellen aktiviert. Die Interaktion von DCs mit T-Zellen führt zu einer massiven klonalen Expansion der antigenspezifischen T-Zellen. Jedoch ist unklar, ob dies in speziellen immunologischen Plattformen im Haut-drainierenden Lymphknoten stattfindet. (84, 85).

Die Produktion von IL-4 durch $CD4^+$ T-Zellen ist für die Generierung hoch affiner Antikörper während einer Leishmanien-Infektion ein wichtiger Bestandteil. Diese IL4-Produzenten sind T_{FH} -Zellen und keine T_H2 Zellen, da sie kein IL-5 bilden und positiv für BCL-6 sind (58). Wie bereits beschrieben, sind diese T_{FH} -Zellen während einer Infektion im B-Zell-Follikel detektierbar und gehen derart stabile Konjugate mit B-Zellen ein, dass sie als solche aus infizierten Lymphknoten gewonnen werden können (57).

Verschiedene Arbeiten konnten zeigen, dass Leishmanien-spezifische Antikörper wichtig für eine erfolgreiche Initiierung der Immunantwort gegen Leishmanien sind (86, 87). Dabei zeigte sich, dass dendritische Zellen mit IgG-opsonierte Leishmanien über $Fc\gamma$ -Rezeptoren aufnehmen. B-Zell-defiziente Tiere weisen bei einer Infektion im Niedrig-Dosis-Modell vergrößerte Hautläsionen und eine verminderte $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zell-Antwort im Vergleich zu Wildtyp-Tieren auf (87).

$CD8^+$ T-Zellen werden während einer Infektion mit Leishmanien von Langerin⁺ dDCs aktiviert, Langerhans Zellen sind dabei unbeteiligt, wie Depletionsexperimente zeigten (5). Allerdings zeigten die Depletionsversuche keine veränderte Antwort der $CD4^+$ T-Zellen während einer Infektion mit Leishmanien (5).

1.8 Zielstellung dieser Arbeit

Nach bisherigen Stand der Forschung ist bekannt, dass Langerin⁺ dDCs während einer Leishmaniose wichtig für die Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen sind, Langerin⁻ dDCs für die Induktion von CD4⁺ T-Zellen (5, 31). Allerdings ist die Aufgabe von Langerhans Zellen und bisher noch unvollständig aufgeklärt.

Des Weiteren ist noch nicht bekannt, in welchen Mikrokompartimenten von Lymphknoten die T-Zell-Antwort nach einer Infektion induziert wird. Katakai *et al.* konnten zeigen, dass es im Lymphknoten an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel ein dichtes Netzwerk an retikulären Fibroblasten gibt, das sie als den CR bezeichneten. Sie stellten die Hypothese auf, dass der CR das Areal sei, an dem die Aktivierung von T-Zellen als auch B-Zellen durch DCs stattfindet (33). Da laut dieser Hypothese im CR T-Zellen durch DCs aktiviert werden, sollen die Subtypen von T-Zellen, die in dieser immunologischen Plattform durch DCs aktiviert werden, untersucht werden.

Eine Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen, die T_{FH}-Zellen, sind wichtig für die humorale Immunantwort. Diese CD4⁺ T_{FH}-Zellen werden zuvor durch antigenpräsentierende DCs oder B-Zellen aktiviert. Innerhalb des B-Zell-Follikels sezernieren T_{FH}-Zellen mit IL-4 ein Zytokin, das wichtig für die Generierung von langlebigen Plasmazellen sowie Gedächtnis-B-Zellen ist. Zudem stellte sich heraus, dass T_H2-Zellen, von denen man annahm, dass sie die Quelle von IL-4 wären, während einer Infektion aus dem Lymphknoten auswandern, sofern sie im CR nicht auf eine passende B-Zelle treffen (57).

Das experimentelle Modell der Leishmaniose bietet eine hervorragende Möglichkeit die Funktion von DCs aus der Haut während einer Infektion im Haut-drainierenden Lymphknoten zu untersuchen. Zusätzlich können die Aufgaben dieser Zellen bei der Induktion einer humoralen Immunantwort studiert werden. Mit Hilfe von Lang-DTR-EGFP Mäusen, in denen Langerin⁺ DCs durch die Gabe von DT depletiert werden können, sollte die Rolle der verschiedenen DC-Subpopulationen untersucht werden. Im Vordergrund standen folgende Fragen:

- (1) Existiert im Lymphknoten tatsächlich eine immunologische Plattform, in der die T-Zell-Antwort induziert wird?
- (2) Welche DC-Subtypen interagieren mit $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen?
- (3) Wirkt sich eine T-Zell-Aktivierung nahe des B-Zell-Follikels auf die B-Zell-Antwort aus?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen
CO ₂ Inkubator für Leishmanien	Labotect, Göttingen
ELISA – Reader	Molecular Devices, Ismaning
FACSCalibur Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACSAria	Becton Dickenson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop Zeiss Imager.M1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop – Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München
Fußdicken – Messgerät	Kroeplin GmbH, Schlüchtern
Heizblock / Thermomixer	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
ICycler IQ5	Bio-Rad, München
MyCycler	Bio-Rad, München
Mehrkanalpipette „Research Pro“	Eppendorf, Hamburg
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Thermo Scientific, München
Sterile Arbeitsbank (Hera Safe)	Thermo Scientific, München
SYNGENE Bio Imager	SYNGENE, Cambridge, UK

Wasserbad

Julabo Labortechnik GmbH,
Seelbach

Zentrifugen: Centrifuge 5810 R, 5417 R

Eppendorf, Hamburg

2.1.2 Glas- und Plastikwaren

Deckgläschen

Engelbrecht, Edermünde

ELISA-Platten (nunc)

Thermo Scientific, München

FACS-Röhrchen

Sarstedt, Nürnberg

Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)

Sarstedt, Nürnberg

Folie für PCR – Platten

Bio – Rad, München

Kanülen

Becton Dickinson, Heidelberg

Neubauer-Zählkammer für Leishmanien

Carl Roth GmbH + Co. KG,

(Tiefe 20 μm)

Karlsruhe

Neubauer-Zählkammer für Zellen

Carl Roth GmbH + Co. KG,

(Tiefe 100 μm)

Karlsruhe

Objektträger

A. Hartenstein Laborbedarf
GmbH, Würzburg

PCR-Platte (96 Näpfe für real-time PCR)

peqlab, Erlangen

Petrischalen

Becton Dickinson, Heidelberg

Pipettenspitzen

Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten (5 ml, 10 ml)

Sarstedt, Nümbrecht

Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)

Eppendorf, Hamburg

Spritzen (2 ml, 5 ml, 20 ml)

Becton Dickinson, Heidelberg

Sterilfilter	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturplatten (96 Näpfe, Flachboden)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten (6 Näpfe, Flachboden)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsiebe (70 μm)	Becton Dickinson, Heidelberg

2.1.3 Chemikalien und Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (München), Merck (Darmstadt), PAN (Aidenbach) oder Sigma (München) bezogen.

2.1.4 Mäusstämme und Leishmanien-Stamm

Mäusstämme:

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden am Klinikum Regensburg unter SPF (specific pathogen free) Bedingungen gehalten.

C57BL/6: Die Mäuse wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Balb/c: Die Mäuse wurden von der Firma Charles River (Sulzfeld) bezogen.

Lang-hDTR-eGFP: *knock-in* Maus auf C57BL/6 Hintergrund, hergestellt durch Einfügen einer hDTR-eGFP-Expressions-Kassette in die 3'-untranslatierte Region des *langerin*-Gens (32).

Leishmanien-Stamm:

L. major (MHOM/IL/81/FE/BNI)

Bernhard-Nocht-Institut, Hamburg
(88)

2.1.5 Antikörper und Detektionsreagenzien

Antikörper	Spezies	Fluorochrom	Verdünnung FACS	Verdünnung Histo	Isotyp	Klon	Hersteller	Konzentration
CD4	Maus	AF488	1:200	1:400	Ratte IgG2b, κ	GK1.5	eBioscience	0,1 mg/ml
CD4	Maus	Cy5	1:800	1:200	Ratte IgG2b, κ	GK1.5	eBioscience	0,5 mg/ml
CD4	Maus	PE	1:400	1:200	Ratte IgG2a, κ	RM4-5	BD Pharmingen	0,2 mg/ml
CD8	Maus	Cy5	1:800	1:200	Ratte IgG2a, κ	53-6.7	eBioscience	0,2 mg/ml
CD8	Maus	bio		1:200	Ratte IgG2a, κ	53-6.7	BD Pharmingen	0,5 mg/ml
B220	Maus	AF647	1:400	1:400	Ratte IgG2a, κ	RA3-6B2	eBioscience	0,2 mg/ml
B220	Maus	PerCP	1:200		Ratte IgG2a, κ	RA3-6B2	eBioscience	0,2 mg/ml
IgG	Maus	Cy5	1:200	1:200	polyklonal Ziege		antikörper-online	0,2 mg/ml
ER-TR7	Maus	AF647	1:400	1:100	Ratte IgG2a, κ	ER-TR7	SantaCruz, Biotechnology Inc.	0,2 mg/ml
Langerin	Maus	AF488	1:200	1:50	Ratte IgG2a, κ	eBioRMUL.2	eBioscience	0,5 mg/ml
CD19	Maus	AF647	1:800	1:200	Ratte IgG2a, κ	eBio1D3 (1D3)	eBioscience	0,2 mg/ml
PNA		bio	1:200	1:200			Vector Labs	5 mg/ml
BrdU		FITC	2,5µl		Maus IgG1	B44	BD Pharmingen	Keine Angabe
BrdU		bio		1:10	Maus IgG1	Br-3	BD Pharmingen	Keine Angabe
Streptavidin-Konjugate		Fluorochrom	Verdünnung FACS	Verdünnung Histo			Hersteller	Konzentration
Streptavidin		Cy5	1:1000	1:800			Dianova	1,8 mg/ml
Streptavidin		AF546		1:800			Invitrogen	2 mg/ml
Streptavidin		PerCP	1:500				BD Pharmingen	0,2 mg/ml
ELISA Antikörper		Konjugat	Verdünnung					Menge
IgG1	Maus	HRP	1:2000		Keine Angabe	Keine Angabe	Invitrogen	0,4 mg
IgG2a	Maus	HRP	1:2000		Keine Angabe	Keine Angabe	BD Pharmingen	1 ml
IgG2c	Maus	HRP	1:1000		Keine Angabe	Keine Angabe	Jackson Immuno Research	0,5 ml

Polyklonales Kaninchenserum wurde von Dr. Sven Mostböck laut Protokoll „*DyLight Amine-Reactive Fluors*“ (Thermo Scientific, München) mit einem DyLight 649-Fluoreszenzfarbstoff konjugiert.

Als entsprechende Kontrollen wurden Isotyp-Kontrollen der jeweiligen Antikörper von eBioscience, Frankfurt verwendet.

2.1.6 Material für zellbiologische Arbeiten

Reagenzien:

2 – Mercaptoethanol	Sigma, München
BD OptEIA Substrat Reagent A und B	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Pharmingen™-FITC BrdU Flow Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Pharmingen™-BrdU in-situ detection Kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Brain Heart Infusion Agar (BHI – Agar)	Institut für med. Mikrobiologie, Klinikum Regensburg
5´-Bromdesoxyuridin (BrdU)	Sigma, München
Cohn-II (humane IgG – Fraktion)	Sigma, München
Concanavalin A (ConA)	Sigma, München
Cytofix/Cytoperm- und Perm/Wash – Lösungen	Becton Dickinson, Heidelberg
4´, 6-Diamidino-2´-phenylindol Dihydrochlorid	Sigma, München
Diff – Quick Differential Staining Set	Dade Behring GmbH, Eschborn
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
DNase	Sigma, München
<i>Diphtheria</i> Toxin (DT)	Sigma, München
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	PAN, Aidenbach
Fettstift DakoCytomation Pen	DakoCytomation, Glostrup, DK
Fötale Kälberserum (FCS)	PAN, Aidenbach
Glutaraldehyd	PAN, Aidenbach

Hanks´ Buffered Salt Solution mit Ca^{2+} , Mg^{2+} (HBSS) PAA, Linz, Österreich

Kaninchenblut (defibriniert) Charles River, Sulzfeld

Latex-Kugeln Sigma, München

PBS (*phosphate buffered saline*) PAN, Aidenbach

Penicillin G-Streptomycin Lösung (100-fach) Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Rinderserumalbumin (BSA) PAN, Aidenbach

RPMI 1640-Medium PAN, Aidenbach

Trypanblau Sigma, München

Tween20 Sigma, München

Kulturmedium, Puffer und Stammlösungen:

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser (dH_2O) angesetzt. Für die Zellkultur wurden die Medien und Lösungen sterilfiltriert (Porengröße $0,45\ \mu\text{m}$) und der BHI – Agar für den Blutagar autoklaviert (20 min, $135\ ^\circ\text{C}$, 2 bar). Zur Inaktivierung des Komplementsystems im FCS wurde dieses vor Gebrauch für 45 min auf $56\ ^\circ\text{C}$ erwärmt.

Adjuvans für die Immunisierung

TiterMax® Gold (Sigma, München)

Ammoniumthiocyanatlösung

3,8 g NH_4SCN

ad 100 ml dH_2O

Blutagar

50 ml Kaninchenblut (defibriniert)

50 ml NaCl (0,9 % in dH₂O)

1 x Penicillin G – Streptomycin

200 ml BHI – Agar (52g / l in dH₂O)

Cohn – II – Stammlösung

10 mg / ml in PBS

Diphtheria Toxin Stammlösung

20 µg / ml in PBS

Erythrozyten – Lysepuffer

10 % 0,1 M Tris/HCl (pH 7,5)

90 % 0,16 M Ammoniumchlorid

FACS – Puffer

2 % FCS in PBS

FACS – Puffer zum Auflösen der Konjugate

2 % FCS in PBS

20 mM EDTA

Farbsubstratlösung (ELISA)

TMB substrate reagent set, beide Lösungen 1:2 vermischt

Stopp-Puffer (ELISA)

2 M H₂SO₄

Waschpuffer (ELISA und Histologie)

0,05 % Tween20 in PBS

2.1.7 Material für molekularbiologische Arbeiten

Agarose	Bio & Sell e.K., Nürnberg
Cell Lysis Solution	QIAGEN, Hilden
Collagenase D	Roche, Mannheim
DNS Standard (1 kB und 100 bp)	New England Biolabs, Frankfurt / Main
dNTP Mix (10 mM)	Promega, Mannheim
GoTaq® Green Master Mix	Promega, Mannheim
M – MLV 5x <i>reaction buffer</i>	Promega, Mannheim
NucleoSpin® RNA II	Macherey Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA XS	Macherey Nagel, Düren
Oligo – dT Primer	Fermentas, St. Leon– Roth

Protein Precipitation Solution

QIAGEN, Hilden

Proteinase K

peqlab, Erlangen

IQ™ SYBR Green Supermix

Bio-Rad, München

2.1.8 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried) synthetisiert. Die Annealingtemperaturen wurden entweder aus den entsprechenden Publikationen übernommen oder gemäß folgender Formel errechnet:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$$

Zielgen	Name	Sequenz	T _m [°C]	Fragmentlänge [bp]	Referenz
GAPDH	mGAPDH_f	AGCTTGTCATCAACGGGAAG	60	100	
	mGAPDH_r	TTTGATGRRAGTGGGGTCTCG	60		
AID	mAID-f	CGTGGTGAAGAGGAGAGATAGTG	60	110	PMID: 19252490
	mAID-r	CAGTCTGAGATGTAGCGTAGGAA	60		
BCL-6	BCL6 forward	CCTGTGAAATCTGTGGCACTCG	60	130	PMID: 19608860
	BCL6 reverse	CGCAGTTGGCTTTTGTGACG	60		
BLIMP-1	BLIMP-1 forward	ACATAGTGAACGACCACCCCTG	60	130	PMID: 19608860
	BLIMP-1 reverse	CTTACCACGCCAATAACCTCTTTG	60		
Gata3	Gata3 forward	ACAGAAGGCAGGGAGTGTGTGAAC	60	100	PMID: 19608860
	Gata3 reverse	TTTTATGGTAGAGTCCGCAGGC	60		
DT-Rezeptor	5'LangEGFP	GAATGACAGATCTGGCCTGAGCTCG	58	866	Adrian Kissenpfennig
	DToxUP4	TTCCAGCAGCTAGCCCTCTCCGAA	58		
EGFP	EGFP	CAAGTCCGCCATGCCCCAAGGCTACG	58	700	Adrian Kissenpfennig
	3'LangEGFP	GTAGCTTTTATATGGTCAGCCAAGG	58		

2.1.9 Software

Adobe Photoshop Elements 6.0	Adobe Systems GmbH, München
Axio Vision	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München
FlowJo 9.1	Tree Star Inc., Ashland, USA
GraphPad Prism 4.0a	GraphPad Software, La Jolla, USA
IQ5™ Optical System Software 2.0	Bio-Rad, München
Microsoft Excel 2008 für Mac Version 12.1.3	Microsoft Deutschland GmbH, München
Microsoft PowerPoint 2008 für Mac Version 12.1.3	Microsoft Deutschland GmbH, München
Microsoft Word 2008 für Mac Version 12.1.3	Microsoft Deutschland GmbH, München
Papers 1.9.4	Mekentosj B.V, Aalsmeer, Niederlande

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Leishmanien-Kultur

Promastigote *L. major*-Parasiten wurden in RPMI-Vollmedium auf Blutagarplatten bei 28 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Herstellung der Blutagarplatten wurden 50 µl Blutagar im 45°-Winkel in eine unbeschichtete Zellkulturplatte mit 96 Näpfen gegossen. Durch den Winkel entsteht ein sog. Schrägagar, wobei die eine Hälfte des Bodens frei von Agar ist. Die Leishmanien wuchsen im Agar-freien Bereich in 190 µl RPMI-Vollmedium innerhalb von sieben Tagen zu einer konfluenten Schicht. Nach 7 Tagen wurden, je nach Dichte der Leishmanien, aus 4 bzw. 8 Näpfen die Parasiten entnommen, in einer Petrischale mit 20 ml RPMI-Vollmedium vermischt und auf eine neue Blutagarplatte verteilt. Alle sechs bis sieben Wochen wurde eine BALB/c-Maus mit 3×10^6 *L. major*-Parasiten in die rechte Hinterpfote infiziert. Nach vier bis fünf Wochen konnten die Parasiten aus den Pfoten isoliert werden. Dazu wurde die infizierte Pfote abgetrennt, das Fleisch vom Knochen entfernt, durch einen Sieb gedrückt und die Zellsuspension bei 1000 rpm und 4 °C für 8 Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, in dem sich die Parasiten befanden, in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 4000 rpm und 4 °C wiederum für 8 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert und zur Kultur auf eine neue Blutagarplatte ausgesät. Dies geschah, um die Virulenz der Leishmanien zu gewährleisten.

2.2.1.2 Herstellung von Leishmanien-Antigen

Zur Herstellung von löslichem Leishmanien-Antigen (L-Ag) wurden promastigote *L. major*-Parasiten aus den Blutagarplatten entnommen, in einer Petrischale gepoolt und anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dreimaligem Waschen in PBS (Zentrifugation bei 4000 rpm und 4° C für 8 Minuten), wurden die Parasiten mit PBS auf eine Konzentration von 1×10^9 *L. major*-Parasiten/ml eingestellt. Diese Suspension wurde dann 20-mal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die Lagerung fand bei -80 °C statt.

2.2.1.3 Immunisierung von Kaninchen

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen *L. major* Parasiten wurden einem weiblichen Kaninchen lösliches L-Ag (1:2 TiterMax® Gold Adjuvant (Sigma – Aldrich) zu einer Wasser-Öl-Emulsion vermischt) subkutan als auch intramuskulär gespritzt. Als Kontrolle für spätere Arbeiten mit dem polyklonalen Serum wurde dem Kaninchen vor der Immunisierung Serum abgenommen (Präimmunserum) abgenommen.

2.2.1.4 Zellzählung

Die Zellzahl einer Suspension lässt sich mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmen. Dazu wurden die Zellen mit dem sauren Farbstoff Trypanblau vermischt. Dieser Farbstoff dringt in die Zelle ein und färbt diese tiefblau. Lebende Zellen können diesen Farbstoff wieder aus ihrem Zytosol transportieren während tote Zelle blaugefärbt bleiben und somit im Mikroskop erkannt werden können. Das Mischungsverhältnis richtete sich nach der Dichte der Zellsuspension. Die Verdünnung wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 100 µm) ausgezählt. Aus dem Produkt der durchschnittlichen Anzahl der Zellen aus den vier Großquadraten mit dem Kammerfaktor 1×10^4 , der Verdünnung und dem Volumen der Zellsuspension ergab sich die Gesamtzahl aller lebenden Zellen in der Suspension.

Mittelwert der Zellzahl in 4 Großquadraten x Verdünnungsfaktor x 10^4 = Zellzahl/ml

Leishmanien wurden zur Zellzählung Paraformaldehyd-Lösung fixiert und in einer Neubauer-Zählkammer (20 μ m Tiefe, Kammerfaktor 5×10^4) ausgezählt.

2.2.1.5 Blutentnahme

Um im ELISA *L.major*-spezifische Immunglobuline nachweisen zu können, wurde naiven und infizierten Mäusen Blut entnommen. Dazu wurden mit Fluran betäubten Mäusen aus dem retrobulbären Venenplexus Blut mit Hilfe einer Pasteurpipette entnommen. Das so gewonnene Blut wurde ÜN bei 4 °C gelagert. Nach vollständiger Gerinnung am nächsten Tag wurde durch zweimaliges Zentrifugieren (10 Minuten, 10000 rpm, 4 °C) das Serum gewonnen und bei -20 °C gelagert.

2.2.1.6 Isolierung von Zellen aus Milz oder Lymphknoten

Zur Gewinnung muriner Milzzellen oder Zellen aus dem poplitealen Lymphknoten wurde das jeweilige Organ nach dem Tod des Tieres entnommen und auf ein Sieb in einer Zellkulturplatte mit sechs Näpfen mit FACS-Puffer gelegt. Anschließend wurden die Organe mit der stumpfen Seite einer 2 ml-Spritze durch das Zellsieb gerieben. Nachdem sowohl die Spritze als auch das Zellsieb mit RPMI-Vollmedium gespült wurde, wurde die Zellsuspension für 5 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Die Zellen aus dem Lymphknoten konnten direkt für alle folgenden Versuche weiterverwendet werden. Milzzellen mussten mit ACK-Puffer behandelt werden um eine Erythrozyten-Lyse durchzuführen. Dazu wurden das Zellpellet in 5 ml ACK-Puffer resuspendiert und sofort 5 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Daran anschließend wurde das Pellet unverzüglich in 10 ml PBS/5 % FCS resuspendiert und nochmals 5 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert.

2.2.1.7 Durchflusszytometrie (FACS – Analyse)

Das Verfahren der Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Zellsuspensionen auf Einzelzelebene. Es beruht darauf, dass Zellen einzeln hintereinander durch eine Durchflussskammer des FACS-Gerätes den Lichtstrahl eines oder mehrerer Lasers passieren. Die Vorwärtsstreuung korreliert dabei mit der Zellgröße, während die seitliche Streuung ein Maß für die zelluläre Granularität darstellt. Mittels fluoreszenzmarkierte Antikörper kann man verschiedene Proteine auf einer Zelle oder auch innerhalb einer Zelle nachweisen. Die Fluoreszenzfarbstoffe, die mit einem FACS – Calibur analysiert werden können, werden entweder durch einen Argon – Ionen – Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm oder durch einen roten Dioden – Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm angeregt. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Fluorochrome verwendet:

1. Fluorescein – Isothiocyanat (FITC) bzw. AlexaFluor 488
2. Phycoerythrin (PE)
3. Peridinin – Chlorophyll – Protein (PerCP)
4. Allophycocyanin (APC), Cy5 oder AlexaFluor 647

Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur Anzahl der zu untersuchenden Moleküle auf oder in einer einzelnen Zelle. Ausgewertet wurden die Daten entweder in einem Histogramm (Einparameterdarstellung) oder in einem Dotplot (Zweiparameterdarstellung).

Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

In der vorliegenden Arbeit wurden Zellen aus dem poplitealen Lymphknoten mittels FACS untersucht. Dazu wurden Einzelzellsuspensionen hergestellt und aus diesen 5×10^5 Zellen in ein FACS – Röhrchen überführt und pelletiert (300g, 5 Minuten, 4 °C). Damit eventuelle Zellverluste bei der Färbung zurückgerechnet werden konnten, werden pro FACS-Röhrchen ca. 10000 Latex-Kugeln zugegeben. Um unspezifische Anlagerungen von Färbeantikörpern zu verhindern, wurden die Fc-Rezeptoren auf den Zellen mit 20 µg/ml Cohn II für 20 Minuten bei 4 °C geblockt. Zum Waschen der

Zellen wurden nach jedem Inkubationsschritt 1 ml FACS – Puffer hinzugegeben und die Proben 5 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die jeweiligen Antikörper in FACS-Puffer verdünnt zu den Proben hinzugegeben und für 20 Minuten bei 4 °C inkubiert. Bei Mehrfachfärbungen wurden alle Antikörper gleichzeitig auf die Zellen pipettiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde, falls nötig, noch einmal für 20 Minuten bei 4 °C mit einem fluoreszenten Streptavidin-Konjugat gefärbt. Nach der Färbung erfolgte die Aufnahme der Zellen mit einem FACSCalibur Flow Cytometer. Ausgewertet wurden die Ergebnisse mit der Software FlowJo.

Zur Auswertung wurden innerhalb der Zweiparameterdarstellung die Latex-Kugeln anhand ihrer Größe und somit deren Anzahl bestimmt. Aus dem Verhältnis eingesetzter Latex-Kugeln zu tatsächlich am Gerät aufgenommener Kugeln lässt sich berechnen, wie viele Kugeln während des Färbvorgangs verloren gingen. Mit diesem Prozentsatz wiederum kann man auf die im FACS-Röhrchen enthaltenen Zellen der einzelnen Populationen zurück rechnen. Da in jedes FACS-Röhrchen 500.000 Zellen pipettiert worden sind, kann man den Quotienten bilden aus Zellzahl des kompletten Organs und den in das FACS-Röhrchen pipettierten Zellen. Mit diesem Quotienten multipliziert man anschließend die Zellzahl der Population, die sich im FACS-Röhrchen befunden hat und erhält somit die Anzahl der Zellen im ganzen Organ.

Eine alternative Methode ist die prozentuale Auswertung einer Zellpopulation in Bezug zu allen in dem FACS-Röhrchen befindlichen Zellen.

Analyse des *in vivo* – BrdU – Einbaus

Zum Nachweis der Proliferation von Zellen *in vivo* kann man den Tieren über ihr Trinkwasser das Thymidinanalogon BrdU verabreichen. Dieses wird von sich teilenden Zellen in die neusynthetisierte DNS eingebaut, dieses eingebaute BrdU kann nun mittels eines Antikörpers detektiert werden und somit proliferierte Zellen bestimmt und mit einer Oberflächenfärbung charakterisiert werden.

Zuerst wurde wie oben beschrieben eine Oberflächenfärbung durchgeführt. Um einen Aufschluss der Zellen zu erreichen, damit der anti-BrdU-Antikörper in die Zelle gelangen kann, wurden die Zellen mit 100 µl Cytofix/Cytoperm für 30 Minuten im Dunkeln und bei RT inkubiert. Danach wurde mit 1 ml Perm/Wash-Puffer wie üblich

gewaschen. Zum Aufbrechen des Zellkerns wurden die Zellen mit 100 μ l PBS/1 % BSA/0,01 % Triton-X100 für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen nochmals mit 100 μ l Cytofix/Cytoperm 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Waschschrift erfolgte die Inkubation mit 30 μ g DNase / 100 μ l PBS für eine Stunde bei 37 °C. Damit wurde die DNS verdaut, um die Bindungsstellen für den Antikörper frei zu legen. Nach dem Waschen wurden 2,5 μ l FITC-konjugierter anti-BrdU-Antikörper zum Zellpellet pipettiert. Der Ansatz wurde zum Mischen geschüttelt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Zellseparation mittels Durchflusszytometrie

Zellen können mit verschiedenen Methoden in Populationen aufgetrennt werden. Eine dieser Methoden ist die Zellseparation mittels eines FACSAria Durchflusszytometers. Dabei werden die Zellen aufgrund von Oberflächenmolekülen, gegen welche eine Antikörperfärbung im Vorfeld durchgeführt wurde, separiert.

Für eine Zellseparation wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus Lymphknoten hergestellt. Diese Zellen wurden auf eine Zellzahl von 15 Millionen Zellen pro 500 μ l in einem FACS-Röhrchen eingestellt. Nach dem Blocken mit Cohn II wurde eine Antikörperfärbung mit anti-CD4 PE (1:100) und anti-CD19 AlexaFluor 647 (1:200) durchgeführt. Nachdem die Zellen nochmals mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen wurden, wurden sie in 500 μ l aufgenommen, durch ein Sieb gespült und sortiert. Dabei erfolgte eine Auftrennung der Populationen nach CD4⁺ T-Zellen, CD19⁺ B Zellen und CD4⁺ CD19⁺ doppelpositiven Konjugaten. Diese Konjugate wurden pelletiert und in einem 20 mM EDTA-haltigen FACS-Puffer aufgenommen. Dadurch kam es zur Trennung der Konjugate. Bei einer nochmaligen Zellseparation mittels Durchflusszytometer wurden die Populationen schließlich in CD4⁺ T-Zellen und CD19⁺ B Zellen aufgetrennt. Aus diesen Zellen erfolgte die Isolierung der RNA.

2.2.1.8 Enzyme – linked immunosorbant assay (ELISA)

Mit Hilfe eines ELISA können in einer Lösung enthaltene Proteine spezifisch nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diene dieser Test dem Nachweis *L. major*-spezifischer Immunglobuline im Serum infizierter Mäuse.

Für den Leishmanien-ELISA wurden promastigote *L. major* Parasiten geerntet, wie beschrieben 3-mal mit PBS gewaschen und anschließend im gleichen Puffer auf eine Konzentration von 2×10^5 / ml eingestellt. 50 µl/Napf wurden auf eine Nunc ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wurde für 8 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Um die Parasiten zu fixieren, wurden 50 µl / Napf 0,25 % Glutaraldehyd in PBS pipettiert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Nach 3-mal Waschen mit PBS wurden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 200 µl PBS/1 % BSA über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer blockiert. Erneutes 3-maliges Waschen mit PBS/0,05 % Tween20 führte zur Entfernung des Blockpuffers. Pro Napf wurden 50 µl Probelösung (1:100 in PBS verdünntes Serum) als Doppelwerte aufgetragen und wiederum über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut 3-mal gewaschen, bevor 50 µl Isotyp spezifischer Ratte-anti-Maus Antikörper (siehe 2.1.5), in PBS gelöst, hinzugefügt wurden. Nach einer Inkubation bei 37 °C und dreimaligem Waschen mit PBS/0,05 % Tween20 wurden 100 µl der Substratlösung in jeden Napf pipettiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 50 µl 2 N H₂SO₄ hinzugegeben, sobald eine Blaufärbung erkennbar war. Die anschließende Gelbfärbung wurde bei 450 nm vermessen. Die so erhaltenen Werte wurden durch den Wert eines naiven Serums dividiert, um relative ELISA-Einheiten (REUs) zu erhalten (89).

Um die Avidität von Immunglobulinen bestimmen zu können, wurden auf die Platten, wie oben beschrieben, promastigote Leishmanien aufgetragen und fixiert. In PBS 1:100 verdünnte Seren wurde aufgetragen und die Platten über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach 4-maligem Waschen wurde am darauf folgenden Tag 100 µl

Ammoniumthiocyanat in den Konzentrationen 0; 0,25; 0,5; 1; 2; 3 und 4 M aufgetragen. Nach 15 minütiger Inkubation wurden die Platten 4-mal mit PBS / 0,05 % Tween20 gewaschen. Daran anschließend wurde 50 µl Isotyp spezifischer Ratte-anti-Maus Antikörper aufgetragen. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C wurden die Platten erneut 3 mal gewaschen. Nachdem 100 µl der Substratlösungen in jeden Napf pipettiert worden waren, kam es zu einer Blaufärbung. Diese Reaktion wurde mit 50 µl 2N H₂SO₄ abgestoppt und die OD bei 450 nm vermessen. Die relativen Aviditätseinheiten (*relative affinity values*, RAV) wurden wie folgt berechnet. Zuerst wurden ODs der behandelten Proben in Prozent zu der Referenzprobe ohne Ammoniumthiocyanat berechnet. Dann wird die Differenz der Referenzprobe und der Probe, die mit 0,25 M Ammoniumthiocyanat inkubiert worden war mit 1 multipliziert. Die Differenz der Probe mit 0,25 M Ammoniumthiocyanat und der Probe mit 0,5 M Ammoniumthiocyanat wurde dann mit 2 multipliziert usw. Der Quotient aus OD der Probe mit 4 M Ammoniumthiocyanat und dem naiven Serum wurde zum Schluss mit 7 multipliziert. Die Summe dieser Produkte ergab den RAV (90).

2.2.1.9 Immunfluoreszenz (IF-) Färbung

Naive und infizierte popliteale Lymphknoten wurden im Rahmen dieser Arbeit immunhistologisch untersucht. Dabei werden dünne Gewebeschnitte hergestellt, auf denen gezielt zelluläre Strukturen oder Proteine angefärbt werden können. Dafür werden Proben entweder in Paraffin oder in einem speziellen Einfriermedium eingebettet. Letztere Methode bietet den Vorteil, dass Proteinepitope erhalten bleiben und besser mit Antikörper angefärbt werden können. Bei in Paraffin eingebetteten Organen zeigt sich außerdem, dass sie bei Immunfluoreszenzfärbungen eine sehr hohe Hintergrundfluoreszenz haben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich Kryokonservierung angewandt um Zellpopulationen oder Gewebestrukturen zu visualisieren.

Nachdem das Tier durch zervikale Dislokation getötet worden ist, wurden die entsprechenden Organe entnommen. Nach der Entnahme wurde das Gewebe auf Zellstoff etwas abgetrocknet. Anschließend wurden die Proben in Killik Einbettmedium in der Gasphase flüssigen Stickstoffs tiefgefroren. Bis zum Anfertigen der Schnitte wurden die Gewebe bei -80 °C gelagert. Um das Anhaften der Schnitte

auf dem Objektträger zu gewährleisten, bzw. damit die Schnitte des Färbens haften bleiben, wurden poly-L-Lysin beschichtete Objektträger benutzt. Es wurden 8 µm dicke Schnitte mit einem Einmalmesser angefertigt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei RT getrocknet.

Oberflächenfärbung

Nachdem die Schnitte bei RT über Nacht getrocknet waren, folgte die Fixierung in -20 °C kaltem Aceton. Daran anschließend wurden die Objektträger insgesamt 12 Minuten getrocknet, um den Fettstift auftragen zu können. Dieser verhindert nach 5 minütigem Trocknen, dass sich die Färbelösungen über den ganzen Objektträger verteilen. Um das Einbettmedium zu entfernen, wurden die Schnitte 3-mal 5 Minuten in PBS / 0,05% Tween20 gewaschen. Ab diesem Schritt musste ein Austrocknen der Schnitte verhindert werden. Deshalb wurden die Färbungen in einer feuchten Kammer durchgeführt. Nach dem Blockieren bzw. den einzelnen Färbeschritten wurden die Objektträger 3-mal 5 Minuten in PBS/0,05% Tween20 gewaschen. Die Schnitte wurden mit PBS/10% Mausserum/10% FCS für 30 Minuten bei RT blockiert. Als Färbepuffer diente PBS/10% FCS. Pro Schnitt wurde ein Flüssigkeitsvolumen von 50 µl aufgetragen. Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Objektträger 3-mal 5 Minuten in PBS/0,05% Tween20 gewaschen.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

1. Schritt: direkt konjugierte bzw. biotinylierte Antikörper, eine Stunde bei RT
2. Schritt: Streptavidin-Konjugat, 45 Minuten bei RT
3. Schritt: DAPI-Färbung, dazu wurde DAPI 1:1000 in PBS verdünnt, 10 Minuten bei RT

4', 6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) diente dabei zum Anfärben der Zellkerne, da es sich an AT-reiche DNS-Bereiche anlagert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Proben mit Permafluor eingedeckelt und über Nacht bei RT im Dunkeln getrocknet.

BrdU-Färbung und Färbung gegen BCL-6 Transkriptionsfaktor

Die Schnitte wurden auch hier über Nacht bei RT getrocknet, allerdings erfolgte die Fixierung für diese Färbungen nur 2 Minuten in -20 °C kaltem Aceton. Anschließend wurde die Schnitte wieder für 12 Minuten bei RT getrocknet und der Fettstift aufgetragen. Nachdem dieser nach 5 Minuten getrocknet war, wurde 3-mal 5 Minuten in PBS das Eindeckmedium gewaschen.

Die Färbungen wurden wie folgt durchgeführt:

1. Schritt: 30 Minuten blocken der Schnitte mit PBS/10% Mausserum/10% FCS
2. Schritt: 3-mal 5 Minuten in PBS gewaschen
3. Schritt: eine Stunde Oberflächenfärbung mit direkt konjugierten Antikörpern in PBS / 10% FCS
4. Schritt: 3-mal 5 Minuten in PBS gewaschen
5. Schritt: 10 Minuten Inkubation in Retrieval A bei 89 °C im Wasserbad, um die DNS zu entwinden, bzw. den Nukleus porös zu machen
6. Schritt: mindestens 20 Minuten die Schnitte in Retrieval A abkühlen lassen
7. Schritt: 3-mal 5 Minuten in PBS gewaschen
8. Schritt: eine Stunde Inkubation mit BrdU-Antikörper (1:10 in Diluent-Buffer verdünnt) bzw. mit rabbit anti-BCL-6 Antikörper (1:10 in PBS/10% FCS)
9. Schritt: 3-mal 2 Minuten in PBS gewaschen
10. Schritt: 30 Minuten Inkubation mit Streptavidin-AlexaFluor 546 (1:800 in PBS) bzw. goat anti-rabbit biotinyliert (1:100 in PBS / 10% FCS)
11. Schritt: 3-mal 2 Minuten in PBS gewaschen
12. Schritt: 10 Minuten DAPI-Färbung bei BrdU-gefärbten Schnitten
13. Schritt: 3-mal 2 Minuten in PBS gewaschen
14. Schritt: eindecken mit Permafluor

Für die BCL-6-Färbung wird ab Schritt 11 ein alternatives Protokoll verwendet:

12. Schritt: 30 Minuten Inkubation mit Streptavidin-AlexaFluor 546 (1:800 in PBS/10% FCS)
13. Schritt: 3-mal 2 Minuten waschen in PBS
14. Schritt: 10 Minuten DAPI-Färbung (1:1000 in PBS)
15. Schritt: 3-mal 2 Minuten waschen in PBS
16. Schritt: eindeckeln mit Permafluor

Für die Färbung mit Chromogen-Farbstoff in Abb. 3.3 wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. Schritt: Schnitte ÜN im Dunklen trocknen lassen
2. Schritt: 2 Minuten in -20 °C kaltem Aceton fixieren
3. Schritt: 12 Minuten bei RT trocknen lassen
4. Schritt: Fettstift aufgetragen und 5 Minuten trocknen lassen
5. Schritt: 2-mal 5 Minuten in PBS waschen
6. Schritt: Schnitte 10 Minuten in 0,3 % H₂O₂ in PBS blocken
7. Schritt: 3-mal 5 Minuten in PBS waschen
8. Schritt: 10 Minuten Inkubation in Retrieagen A bei 89 °C im Wasserbad, um die DNS zu entwinden, bzw. den Nukleus porös zu machen
9. Schritt: mindestens 20 Minuten die Schnitte in Retrieagen A abkühlen lassen
10. Schritt: 3-mal 5 Minuten waschen in PBS
11. Schritt: eine Stunde Inkubation mit anti-BrdU-Antikörper (1:10 in Diluent-Buffer verdünnt)
12. Schritt: dreimal 2 Minuten in PBS waschen
13. Schritt: 30 Minuten Inkubation mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase (bereits vorverdünnt geliefert)
14. Schritt: 3-mal 2 Minuten in PBS waschen
15. Schritt: 1 Tropfen 3,3' Diaminobenzidin (DAB) zu 1 ml DAB-Puffer, davon 100 µl / Schnitt und unter Mikroskop entwickeln bis gewünschte Farbintensität erreicht ist
16. Schritt: 3-mal 2 Minuten in PBS waschen

17. Schritt: 30 Sekunden Gegenfärbung mit Hämatoxylin
18. Schritt: 10 Minuten im Wasserstrahl entfärben
19. Schritt: Dehydrieren durch aufsteigende Alkoholreihe (2x 95 %, 2x 99 %)
20. Schritt: 3-mal in Xylol tauchen
21. Schritt: eindeckeln mit Entellan

Die Färbungen wurden am Zeiss Fluoreszenz-Mikroskop und mit der Software AxioVision (Version 4.6.3.0) aufgenommen.

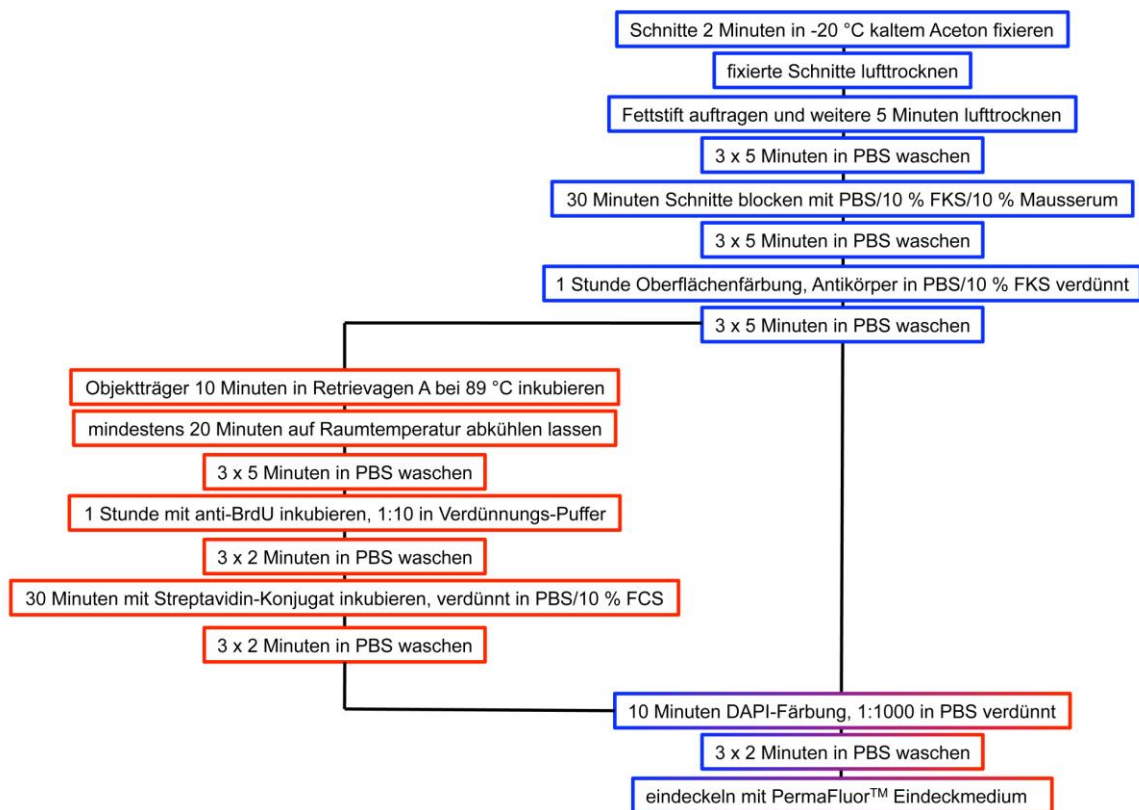


Abb. 2.1: Färbeschema für Oberflächenfärbungen und BrdU-*in-situ* Färbungen

In diesem Schema ist aufgezeigt, wie eine reine Oberflächenfärbung und eine BrdU-*in-situ* Färbung sich unterscheiden. Blau dargestellt sind die Schritte, die zur reinen Oberflächenfärbung benötigt werden, rot die Schritte für BrdU-*in-situ* Färbung und gemischt farbig die Schritte, die beide Färbungen zum Schluss gemeinsam haben (84).

2.2.1.10 Histologische Untersuchung von *epidermal sheets*

Die Kontrolle der Depletionseffizienz von DT erfolgte in regelmäßigen Abständen. Dazu wurden sog. *epidermal sheets* von den Ohren DT-behandelter Lang-DTR-EGFP-Mäusen angefertigt und immunhistochemisch untersucht. Nach dem Abtrennen der Mausohren wurden diese zunächst mindestens 15 Minuten in PBS bei 4 °C gelagert. Daran anschließend wurden die beiden Ohrhälften mit einer feinen, vorne gebogenen Pinzette auseinander gerissen und die dem Mauskörper zugewandten Seite auf einen Tropfen 3,8 % Ammoniumthiocyanat gelegt. Die Inkubation erfolgte 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank. Nachdem die Ohrhälfte auf einen frischen Tropfen PBS überführt worden waren, wurde die Epidermis vorsichtig von der Dermis abgezogen. Die Epidermis wurde mit der dem Mäusekörper abgewandten Seite auf einen Objektträger überführt. Die Objektträger wurden mit Aceton überschichtet und die Epidermis so bei RT für 30 Minuten fixiert. Die folgenden Waschschriffe erfolgten durch die Zugabe eines Tropfens PBS/0,05 % Tween20, der nach 5 Minuten Einwirkzeit wieder mit einer Pipette abgenommen wurde. Vor der Färbung wurde das *sheet* mit einem Fettstift umkreist, damit sich die Lösungen nicht vermischen. Die Färbeschriffe erfolgten bei RT in einer feuchten Kammer. Nach 30 Minuten Inkubation in Blockpuffer (PBS/1 % Mausserum/1 % FCS) und erneutem Waschen wurden die *epidermal sheets* mit dem Alexa-Fluor-488-konjugierten anti-Langerin Antikörper (1:100) gefärbt. Nach nochmaligem Waschen erfolgte die DAPI-Färbung (1:2000 in PBS). Zuletzt wurden die Objektträger mit Permafluor eingedeckelt, das über Nacht aushärtete.

2.2.2 Tierversuche

Für alle Tierversuche wurden ausschließlich weibliche Tiere im Alter von 6 bis 12 Wochen verwendet.

2.2.2.1 Behandlung der Tiere mit DT

Für die Depletion von Langerin⁺ Zellen wurde den Versuchstieren 1 µg DT in 100 µl PBS intraperitoneal injiziert. Um Langerhans Zellen zu depletieren bekamen die Tiere DT sieben Tage vor der Infektion und, falls nötig, abermals sieben Tage nach der Infektion. Um Langerin⁺ dermale dendritische Zellen zu depletieren bekamen die Tiere sieben Tage vor der Infektion, am Tag der Infektion 5 Stunden vorher und falls nötig nochmals sieben Tage nach Infektion DT. Für Langzeitexperimente bekamen die Tiere 7 Tage und 5 Stunden vor der Infektion und dann wöchentlich DT injiziert.

2.2.2.2 Infektion

Promastigote Leishmanien in der stationären Wachstumsphase wurden aus den Blutagarplatten entnommen, in einer Petrischale gesammelt und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach 3-maligem Waschen mit 50 ml sterilem PBS (Zentrifugation bei 4000 rpm und 4 °C für 10 Minuten) wurden die Parasiten in einer 1:10-Verdünnung in Paraformaldehy-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Parasiten in einer Neubauer Zählkammer (20 µm Tiefe, Kammerfaktor 5×10^4) ausgezählt. Zur Infektion wurden die Mäuse am Abdomen in einer Röhre eingeklemmt sodass ihnen 3×10^6 *L. major* – Parasiten in einem Volumen von 30 µl in die rechte Hinterpfote subkutan injiziert.

2.2.2.3 *In vivo* – Proliferationsnachweis während einer *L. major* – Infektion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Proliferation von T-Zellen *in vivo* untersucht. Dazu wurde infizierten Tieren jeweils 3 Tage vor dem Analysezeitpunkt 0,8 mg/ml des Thymidin-Analogons BrdU mit dem Trinkwasser verabreicht. Mit Hilfe eines anti-BrdU Antikörper können so Zellen detektiert werden, die BrdU während der Zellteilung in ihre DNS eingebaut haben.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Isolierung genomischer DNS aus Schwänzen von Lang-DTR-EGFP Mäusen

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde den Tieren ein Stück des Schwanzes mit einem Skalpell abgetrennt. Dieses wurde in 500 µl Lysepuffer aufgenommen und über Nacht bei 1000 rpm und 58 °C zusammen mit 10 µl Proteinkinase K verdaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Protein-Präzipitations-Puffer gestoppt. Nach Zugabe des Puffers wurde sofort scharf gevortext und 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Ausfällung der DNS in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in welches 700 µl 100 % Isopropanol vorgelegt worden waren. Nach dem Invertieren wurde die DNS wieder abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 500 µl 70 % EtOH resuspendiert. Nach abermaligem Zentrifugieren wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet 30 Minuten bei RT getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl H₂O gelöst und bei -20 °C weggefroren.

2.2.3.2 RNA Isolierung

2.2.3.2.1 Sortierte Zellen

Gesortete Zellen wurden 10 Minuten bei 300g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Danach wurde das Zellpellet in 350 µl RA1 Puffer (Macherey und Nagel, Düren) und 3,5 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen. Bei mehr als 100000 Zellen wurde die RNA laut dem NucleoSpin® RNA II Protokoll isoliert. Waren weniger Zellen vorhanden, wurde das NucleoSpin® RNA XS Protokoll befolgt. Die so isolierte RNA wurde bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 Zellsuspensionen aus Lymphknoten

Ganze Lymphknoten wurden wie bereits beschrieben auf einem Sieb zerdrückt um Einzelzellen zu gewinnen. Diese Zellen wurden dann in 350 µl RA1 Puffer und 3,5 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und die RNA laut NucleoSpin® RNA II Protokoll isoliert. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Bestimmung der RNA – Konzentration

Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die RNA-Proben in sterilem Wasser verdünnt und die optische Dichte mit Hilfe eines Spektralphotometers (Eppendorf) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei 260 nm haben die RNA – Basen ihr Absorptionsmaximum. Die Extinktion kann nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden:

$$E = \varepsilon * c * d$$

(E = Extinktion, ε = molarer Extinktionskoeffizient [cm^2 pro mol], c = Konzentration der Probe, d = Schichtdicke [cm]).

Eine Extinktion von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Zusätzlich wird die Probe bei 280 nm vermessen, um eine eventuelle Proteinkontamination zu detektieren. Das Absorptionsverhältnis $A_{260/280}$ sollte für reine RNA bei 2,0 liegen.

2.2.3.4 Reverse Transkription

RNA kann nicht als *template* für eine PCR (Polymerase Kettenreaktion) eingesetzt werden. Deswegen wird RNA zuerst mit dem Enzym Reverse Transkriptase in eine sogenannte komplementäre DNS (*copyDNA* = cDNA) umgeschrieben. Diese

Reaktion braucht, wie auch die PCR, Primer, um dem Enzym die Anlagerung an die RNA zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Oligo(dT) – Primer verwendet, diese binden an den polyA – Schwanz von mRNA.

Es wurden 250 ng der mRNA aus Lymphknoten in cDNA umgeschrieben. Bei gesorteten Zellen wurden 4 µl RNA in die Reaktion eingesetzt.

Wie folgt wurden folgende Komponenten in die Reaktion eingesetzt:

- 1 µl oligo(dT)₁₈ Primer (0,5 µg / µl)
- 5 µl M – MLV Reaction Buffer
- 1 µl dNTP Mix
- 1 µl M-MLV
- x µl total RNA
- x µl H₂O

Total RNA + H₂O ad 14 µl + 1 µl oligo(dT)₁₈ Primer wurden 5 Minuten bei 70 °C inkubiert und anschließend 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von Puffer, H₂O, dNTPs und 1 µl M-MLV Reverse Transkriptase wurde der Ansatz 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.2.3.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Standardmethode zur Amplifikation von DNS. Auf diese Weise ist es möglich, auch geringe Mengen *template* DNS analysieren zu können.

Dazu wird die DNS mit einer Taq – Polymerase, Primern und freien Nukleotiden sowie einem Puffer versetzt. Zuerst werden die Doppelstränge durch eine Temperaturerhöhung auf 95 °C aufgetrennt. Während des *Annealing*-Schrittes legen sich die Primer an die DNS an. Die Elongationsphase dient der Duplikation der DNS durch die Taq – Polymerase.

Mit der PCR wurden in dieser Arbeit Mäuse genotypisiert.

Folgende Bedingungen wurden standardmäßig genutzt:

- 1.) Vordenaturierung und Aktivierung des Enzyms: 95 °C, 5 Minuten
- 2.) Denaturierung: 95 °C, 30 Sekunden
- 3.) *Annealing*: verschiedene Temperaturen je nach Primerpaar, 30 Sekunden
- 4.) Elongation: 72°C, 30 Sekunden
- 5.) Finale Elongation: 72 °C, 5 Minuten

Die Schritte 2 bis 4 wurden in der Regel 35-mal wiederholt, beim *Housekeeper* allerdings nur 25-mal.

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend den Anweisungen des Herstellers (Promega, GoTaq® Green Master Mix) wie folgt pipettiert:

- | | |
|--|------------|
| ➤ GoTaq® Green Master Mix, 2x | 12,5 µl |
| ➤ <i>forward</i> Primer | 0,5 µl |
| ➤ <i>reverse</i> Primer | 0,5 µl |
| ➤ cDNA | 1 od. 2 µl |
| ➤ x µl Nuklease – freies H ₂ O ad 25 µl | |

Der GoTaq® Green Master Mix enthält bereits neben der GoTaq® DNS Polymerase einen 2x Green GoTaq® *Reaction Buffer* (pH 8,5), je 400 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP sowie 3 mM MgCl₂. Ebenfalls beinhaltet er bereits 2 Farbstoffe um den Fortschritt der Gelelektrophorese verfolgen zu können.

2.2.3.6 Analyse der PCR – Produkte

PCR-Fragmente können mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld, bedingt durch die unterschiedlichen Größen der Fragmente, können diese aufgetrennt werden. Das Phosphatrückrat der Nukleinsäuren liegt unter elektrophoretischen Bedingungen negativ geladen vor. Daher wandern die Fragmente im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode.

Es wurden immer 2 % (w/v) Agarose in 200 ml TAE – Puffer durch Aufkochen gelöst. Anschließend wurde noch Ethidiumbromid zugefügt.

Dieses Gemisch wurde auf einen Gelschlitten gegossen und dann in eine Gelkammer mit 1x TAE, welcher als Laufpuffer dient, gelegt. Die Kammern wurden mit den PCR-Proben befüllt, in die linke und die rechte Kammer wurden Standardproben der Größe 1 kB oder 100 bp pipettiert. Das Gell wurde bei 120 V laufen gelassen. Anschließend wurden die Fragmente in einem *Bioimager* sichtbar gemacht und über einen Thermodrucker ein Bild ausgedruckt.

2.2.3.7 Quantitative Real Time PCR (qPCR)

Bei der quantitativen Real Time PCR handelt es sich um eine Methode, bei der eine bestimmte Polynukleotidsequenz quantifiziert wird, indem die initiale Konzentration soweit amplifiziert wird, dass eine korrekte Detektion möglich ist (91-93). Dieser Punkt wird „*cycle threshold*“ (ct) (Schwellenwert-Zyklus) genannt, der Zyklus also, bei dem das Fluoreszenzsignal signifikant über das des Hintergrundsignals steigt. Die Vervielfältigung des gewünschten, durch die Primer-Sequenzen bestimmten, PCR-Produkts sollte exponentiell erfolgen. Um die Zunahme des PCR-Produkts verfolgen zu können, gibt es verschiedene Methoden. Zum einen die sog. Sonden-Methode, bei der dem Reaktionsansatz neben den Primern auch eine Sonde zugegeben wird. An diese Sonde sind zwei Farbstoffe gebunden. Zum einen der Reporterfarbstoff (5'-

Ende), zum anderen der Quencher (3'-Ende). Solange beide Farbstoffe an der Sonde gebunden sind, unterdrückt der Quencher die Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes über den sog. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET). Bei der Synthese des neuen Stranges wird der Reporterfarbstoff vom Quencher durch einen exonukleolytischen Schritt getrennt und die Fluoreszenz kann nun detektiert werden. Alternativ zum Sonden – System kann SYBR Green I verwendet werden. SYBR Green I ist ein asymmetrischer Cyanin – Farbstoff und bindet doppelsträngige DNS in der kleinen Grube. Ungebunden emittiert der Farbstoff gering, durch die Bindung an DNS wird das Fluoreszenzsignal stark erhöht (94). Der entstehende DNS-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht (494 nm) und emittiert grünes Licht (522 nm). Da SYBR Green unspezifisch an doppelsträngige DNS-Fragmente bindet, wurden Schmelzkurven-Analysen nach jedem Lauf durchgeführt. Nach 45 Amplifikationszyklen wurden die PCR-Produkte zuerst 1 Minute auf 55 °C abgekühlt. Für die Schmelzkurven-Analyse wurden die Proben in 0,5 °C-Schritten bis 95 °C aufgeheizt. Das Fluoreszenzsignal nimmt dabei langsam ab, bis die Schmelztemperatur des PCR-Produkts erreicht ist und ein starker Abfall der Fluoreszenz detektiert werden kann. Falls mehr als ein starker Abfall der Fluoreszenzintensität für das jeweilige PCR-Produkt detektiert wurde, wurde der PCR-Lauf als falsch angesehen.

Die Reaktionsansätze wurden wie folgt pipettiert:

cDNA (1:5 in Wasser verdünnt)	5 µl
5' Primer (5 pmol/µl)	1 µl
3' Primer (5 pmol/µl)	1 µl
iQ™ SYBR Green Supermix	12,5 µl
nukleasefreies Wasser	<u>5,5 µl</u>
	25 µl

Die Reaktion wurde mit folgender Programmierung des PCR-Gerätes durchgeführt:

		Temperatur	Zeit
1. Schritt	Denaturierung	95 °C	10 min
2. Schritt	Denaturierung	95 °C	15 s
(45 Zyklen):	Primer Annealing und Elongation	60 °C	1 min
3. Schritt	Termination	95 °C	1 min
4. Schritt	Vorbereitung Schmelzkurve	55 °C	1 min
5. Schritt	Schmelzkurve (in 0,5 °C Schritten)	55 °C – 95 °C	

Um die relative Menge der cDNA pro Probe bestimmen zu können, wurde die Expression des Zielgens auf ein zweites Gen bezogen, welches möglichst ubiquitär und homogen exprimiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als sog. *housekeeper* verwendet. Für jedes Gen erfolgte die Messung als Triplikat. Die Ergebnisse wurden entweder nach der delta ct Methode oder der delta delta ct Methode analysiert (95).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{infiziertes Tier}} - \Delta Ct_{\text{uninfiziertes Tier}}$$

$$\text{mRNA Expression des Zielgens}_{\text{relativ zum Referenzgen}} = E^{-\Delta Ct}$$

$$\text{mRNA Expression des Zielgens}_{\text{relativ zum uninfizierten Tier}} = E^{-\Delta\Delta Ct}$$

E steht für die Effizienz. Zur Auswertung der Daten wurde mit einer Effizienz von 2 gearbeitet.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 4.0. Für die Berechnung der Signifikanzen wurde der jeweils angegebene Test verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Genotypisierung und Kontrolle der Depletion von Langerhans Zellen nach DT-Gabe

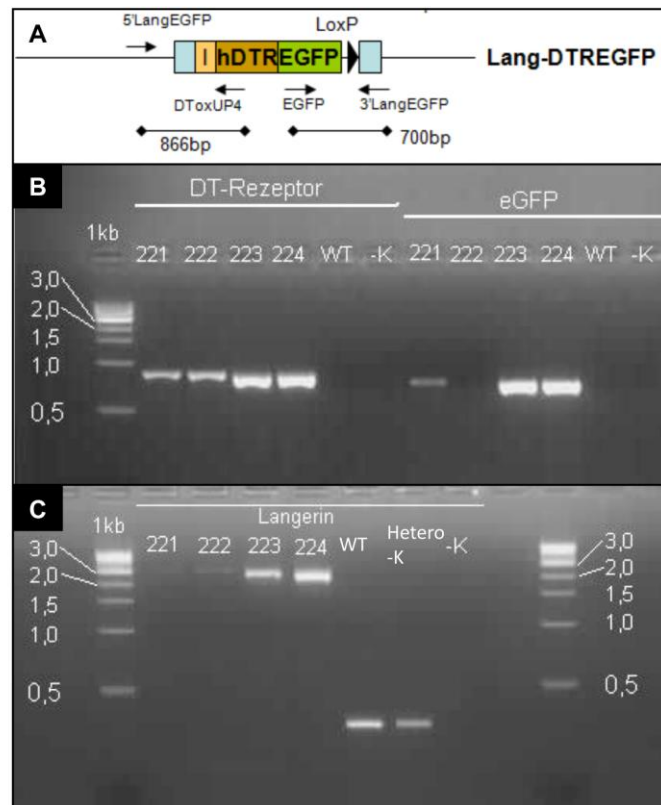


Abbildung 3.1: Genotypisierung von Lang-DTR-EGFP Mäusen

Abbildung 3 zeigt exemplarisch eine Genotypisierung von Lang-DTR-EGFP Mäusen. (A) Zeigt schematisch die Genotypisierungsstrategie. Mit der Primerpaarung 5'LangEGFP und DToxUP4 ist es möglich, den humanen DT-Rezeptor im Genom nachzuweisen. Das Primerpaar EGFP und 3'LangEGFP erlaubt den Nachweis von EGFP in der gewünschten Sequenz. Des Weiteren kann man mittels der Paarung 5'LangEGFP und 3'LangEGFP die Tiere auf ihre Homozygotie hin untersuchen. Abbildung (B) Hier ist gezeigt, dass alle Tiere den DT-Rezeptor tragen und die entsprechenden Kontrollen negativ sind. Tier #222 ist entgegen den anderen untersuchten Tieren negativ für EGFP. (C) In dieser Abbildung ist zu sehen, dass alle getesteten Tiere homozygot sowohl für den DT-Rezeptor als auch EGFP sind. Als Kontrolle für die Homozygotie wurde die genomische DNS eines Kontrolltieres mit der genomischen DNS eines zu untersuchenden Tieres vermischt (Hetero/-K). WT: Wildtyp / C57BL/6 Maus; -K: Wasserkontrolle; EGFP: *enhanced green fluorescent protein*; DTR: Diphtherie Toxin Rezeptor; Standard 1kb.

Um zu gewährleisten, dass die in den Experimenten verwendeten Tiere wirklich transgen für den humanen DT-Rezeptor sind, wurde von jedem neuen Zuchtpaar der erste Wurf genotypisiert. Wie unter 2.2.3.1 in Material und Methoden beschrieben, wurde die genomische DNS aus Schwanzbiopsien von Lang-DTR-EGFP Mäusen

gewonnen. Zur Genotypisierung der Tiere nutze man verschiedene Primerkombinationen. Mit Hilfe des Paares 5'LangEGFP und 3'DToxUP4 kann sichergestellt werden, dass der DT-Rezeptor in der richtigen Sequenz eingefügt wurde, da der Primer 5'LangEGFP in der Langerin-Sequenz bindet, und der 3'DToxUP4 in der DT-Rezeptor-Sequenz. Die Paarung 5'EGFP mit 3'LangEGFP erlaubt somit den Nachweis für EGFP. Mit der Kombination 5'LangEGFP und 3'LangEGFP kann untersucht werden, ob das jeweilige Tier für die eingefügte Sequenz homo- oder heterozygot ist.

Wie in Abbildung 3.1B dargestellt, waren die auf diesem Agarosegel untersuchten Tiere positiv für den DT-Rezeptor. Die Banden befinden sich alle auf der Höhe von ca. 866bp, was am Standard abgelesen werden kann. Jedoch zeigt das Agarosegel, dass das Tier #222 negativ für EGFP war, die anderen aber eine Bande bei ca. 700 bp aufwiesen und somit positiv für EGFP waren. Dies bedeutet, dass alle Tiere außer #222 sowohl transgen für DTR als auch EGFP waren. Als Kontrolle für die Homozygotie wurde die genomische DNS einer C57BL/6 mit der genomischen DNS eines der untersuchten Tiere vermischt, was zwei Banden geben sollte. Da aber hier zuwenig genomische DNS des zu untersuchenden Tieres eingesetzt wurde, fehlte hier die obere Bande. Da die obere Bande bei allen untersuchten Tieren vorhanden war, eine untere Bande außer bei den Kontrollen nicht vorhanden war, kann man sagen, dass alle hier untersuchten Tiere homozygot bzgl. der Sequenz für den DT-Rezeptor und EGFP (Abb. 3.1C) waren. Das Tier #222 war negativ für EGFP. Daher wurde es weder für einen Versuch verwendet, noch in der Zucht eingesetzt. Alle in der vorliegenden Dissertation verwendeten Tiere waren homozygot für das in 3.1A dargestellte Konstrukt.

In Lang-DTR-EGFP Mäusen exprimieren alle Langerin⁺ Zellen den hochaffinen humanen DT-Rezeptor. Dadurch kann man Langerin⁺ Zellen durch die intraperitoneale Gabe von DT depletieren (32). Bei jedem Experiment wurde die erfolgreiche Depletion der Langerin⁺ Zellen überprüft. Als Kontrolle wurde von einem unbehandelten Tier ein Stück der Epidermis am Ohr präpariert und mit anti-Langerin Antikörper gefärbt. Wie in Abbildung 3.2A dargestellt, zeigen Tiere, denen kein DT appliziert wurde, ein dichtes Netzwerk von Langerin⁺ Langerhans Zellen. In Abbildung 3.2B ist die typische dendritische Morphologie der Langerhans Zellen

dargestellt. Die intraperitoneale Injektion von DT führte, wie in Abbildung 3.2C und 3.2D gezeigt, zur vollständigen Depletion von Langerin⁺ Langerhans Zellen in der Epidermis. Mit der oben genannten Technik wurde die Effizienz der DT-induzierten Depletion von Langerin⁺ Zellen bei den in der Arbeit vorgestellten Daten kontrolliert und bestätigt.

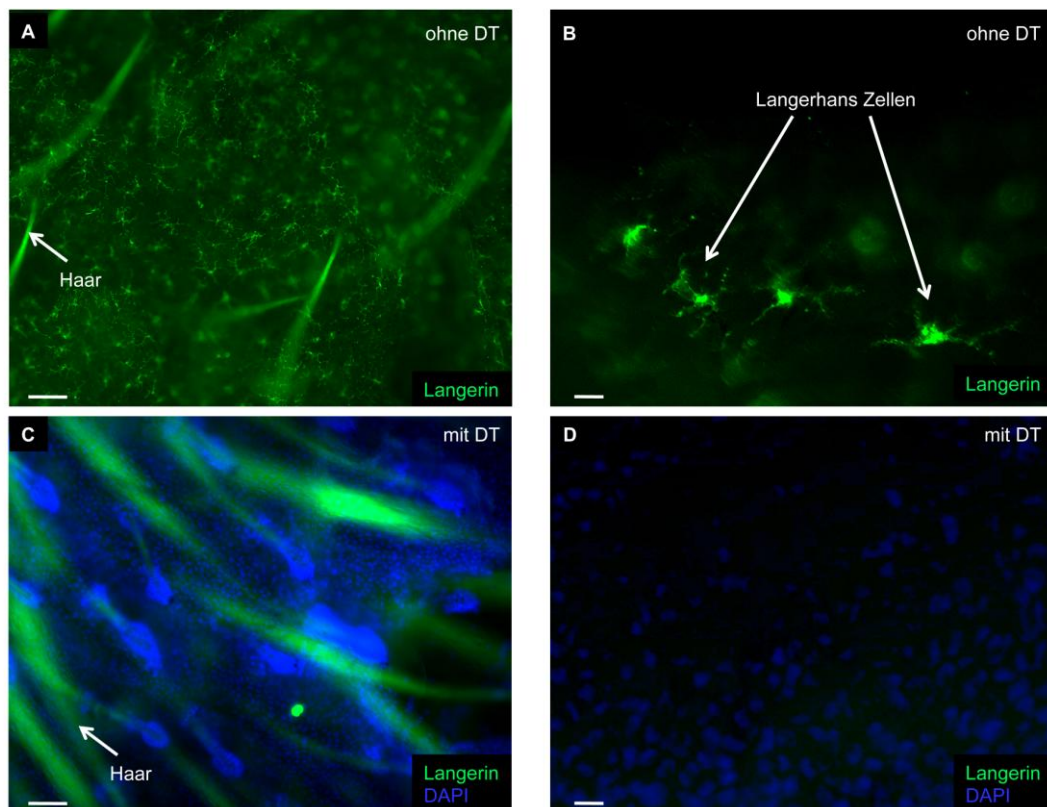


Abb. 3.2: DT-induzierte Depletion von Langerin⁺ Zellen in Lang-DTR-EGFP Mäusen

In Abbildung 3.2 wird die erfolgreiche Depletion von Langerhans Zellen (grün) in der Epidermis durch intraperitoneale (i. p.) Gabe von 1 µg DT dargestellt. Abbildung A und B zeigt eine Epidermis eines unbehandelten Tieres, C & D von einem Tier, dem 1 µg DT i. p. injiziert wurden. (A) Hier erkennt man das dichte Netzwerk von Langerhans Zellen. (B) In dieser Vergrößerung kann man die charakteristische dendritische Morphologie von Langerhans Zellen erkennen. In Abbildung C und D ist zur besseren Orientierung auch die DAPI-Färbung gezeigt. (C) Man sieht, dass durch die Gabe von DT sämtliche Langerin⁺ Zellen depletiert wurden. (D) Auch in dieser Vergrößerung sind keine Langerin⁺ Zellen zu sehen. In Abbildung A und C sind unspezifisch gefärbte Haare zu erkennen (siehe Pfeile). (Maßstab: A und C: 100 µm, B und D: 10 µm).

3.2 *In situ* Nachweis proliferierender Zellen und deren Charakterisierung

3.2.1 Detektion von proliferierten Zellen *in situ*

Besonders für immunologische Fragestellungen ist es wichtig, nicht nur zu wissen, welche Zellen proliferieren, was durchflusszytometrisch möglich ist, sondern auch die Lokalisation dieser proliferierten Zellen zu kennen. Um dies beantworten zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Technik etabliert, die es erlauben sollte, proliferierte Zellen mittels Immunfluoreszenz nachzuweisen. Dafür sollte in einem ersten Schritt untersucht werden, ob proliferierte Zellen nicht nur mit einem Chromogenfarbstoff detektierbar sind, sondern ob sich durch eine Fluoreszenzfärbung ein ähnliches Ergebnis erzielen lässt.

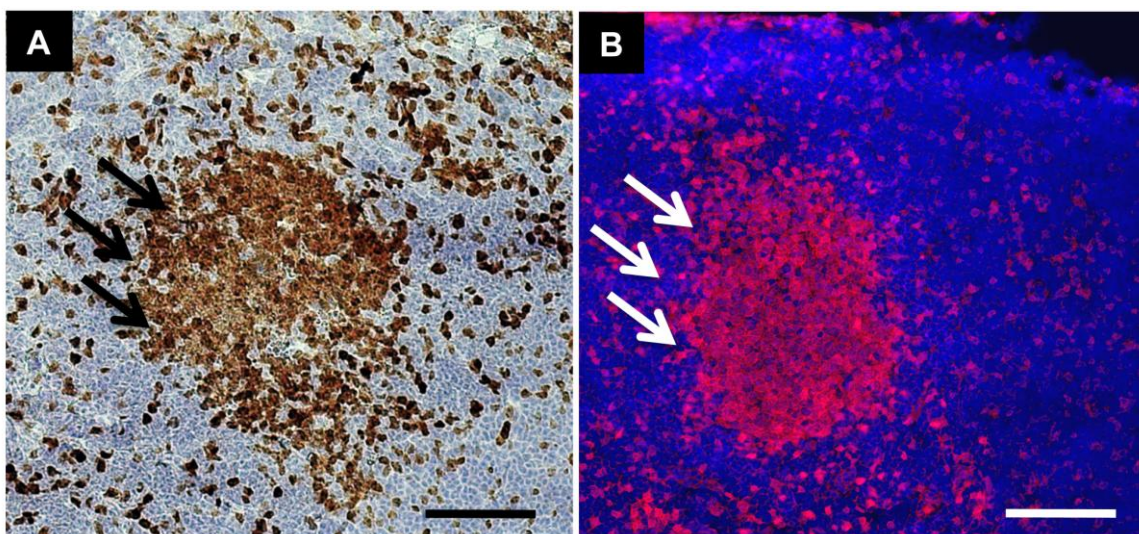


Abbildung 3.3: Etablierung der Detektion von proliferierten Zellen *in situ*

Haut-drainierende Lymphknoten von C57BL/6 Mäusen wurden 6 Tage nach Infektion mit Leishmanien auf die Proliferation von Zellen mit Kryostatschnitten untersucht. 3 Tage vor Beendigung des Versuchs bekamen die Tiere über das Trinkwasser 0,8 mg/ml Bromdeoxyuridin (BrdU). (A) Das von proliferierenden Zellen eingebaute BrdU wurde mit einem biotinylierten Antikörper gegen BrdU detektiert. Durch Kopplung des Streptavidin-Meerrettichperoxidase Komplexes an den biotinylierten Antikörper kann eine Umsetzung des Substrates 3,3' Diaminobenzidin (DAB) erfolgen. Die BrdU⁺ Zellen sind braun-rot gekennzeichnet. Die schwarzen Pfeile zeigen die dichte Anhäufung dieser Zellen. Als Gegenfärbung wurde Hämatoxylin verwendet. (B) Fluorochrombasierte Darstellung von BrdU⁺ Zellen. Hier wurde anstelle des Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugates (A) ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiertes Streptavidin verwendet. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI. Auch hier zeigen die Pfeile die dichte Struktur dieser Zellen an. Die Daten sind repräsentativ für vier Experimente. (Maßstabsbalken: 100 µm).

Um diese Frage zu klären, erhielten die Tiere für einen Zeitraum von drei Tagen vor dem Ende des Versuchs mit dem Trinkwasser 0,8 mg/ml des Thymidinanalogon Bromdexyuridin (BrdU). Die Lymphknoten wurden wie unter 2.2.1.9 in den Material und Methoden beschrieben präpariert. Von den poplietalen Lymphknoten dieser 6 Tage infizierten C57BL/6 Mäuse wurden Kryostatschnitte angefertigt. Prolifериerte Zellen können auf diesen Schnitten, wie in Abbildung 3.3 gezeigt und vom Hersteller angegeben (BD Pharmingen, Katalognummer 550803) mit einem Chromogenfarbstoff dargestellt werden. 8 µm dicke Kryostatschnitte wurden laut Herstellerprotokoll mit einem biotinylierten anti-BrdU Antikörper und anschließend mit einer an Streptavidin gebundenen Meerrettichperoxidase inkubiert. Durch Zugabe von 3,3' Diaminobenzidin (DAB) wird dieses von der Peroxidase in einen braunrötlichen Farbstoff umgesetzt (Abb. 3.3A). Alternativ sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt werden, das es erlaubt, wie in Abbildung 3.3B gezeigt, proliferierende Zellen mit fluoreszenten Antikörpern zu detektieren. Dafür wurde der Kryostatschnitt eines Lymphknotens ebenfalls mit biotinylierten anti-BrdU Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde der Schnitt mit fluoreszenten Streptavidin-AlexaFluor 546 inkubiert. Auch bei dieser Immunfluoreszenzfärbung sind die dicht angeordneten proliferierten Zellen erkennbar. Abbildung 3.3 zeigt, dass proliferierte Zellen vergleichbar mit beiden Protokollen dargestellt werden können.

Die hier gezeigte fluoreszenzbasierte Methode erlaubt es nun, den Phänotyp der BrdU⁺ Zellen näher zu charakterisieren (84). Jedoch musste vorher noch geklärt werden, ob eine fluoreszenzbasierte Oberflächenfärbung zusammen auf einem Kryostatschnitt mit einer für die BrdU-Färbung notwendigen DNS-Denaturierung möglich ist. Diese Problematik und deren Lösung werden im folgenden Abschnitt behandelt.

3.2.2 Charakterisierung proliferierter Zellen *in situ*

Wie bereits erwähnt, würde eine simultane Detektion von in die DNS eingebautem BrdU zusammen mit zellspezifischen Oberflächenmolekülen die Phänotypisierung einer BrdU⁺ und somit proliferierten Zelle *in situ* erlauben. Dafür wurde innerhalb dieser Arbeit der „*BrdU in situ Detection Kit*“ von BD Pharmingen modifiziert (84). Bei

diesem Protokoll werden zur Denaturierung der DNS die Kryostatschnitte 10 Minuten bei 89 °C in einem Citrat-haltigen Puffer inkubiert (siehe 2.2.1.9 in Material und Methoden). Eine derartige Behandlung hat zur Folge, dass Antikörper ihre entsprechenden Epitope nicht mehr detektieren können, wie in Abbildung 3.4 gezeigt. Die Färbebilder von Kontrollschnitten (ohne Hitzebehandlung) zeigen eine distinkte Färbung von CD4⁺ T-Zellen im Paracortex, wohingegen eine Inkubation mit einem anti-CD4 Antikörper nach dem Hitzeschritt ein für T-Zellen untypisches Färbemuster ergibt. So kommt es zum teilweisen Verlust des Nachweises CD4⁺ Zellen (siehe Abb. 3.4E). Zudem werden Strukturen (siehe Pfeile Abb. 3.4B) als falsch positiv dargestellt, was mit der Änderung der Tertiärstruktur der Oberflächenmoleküle zu tun haben könnte. Eine Oberflächenfärbung nach der Denaturierung zeigte sich zielführend, wie in Abbildung 3.4F zu sehen ist.

Nachdem die Abfolge der Färbeschritte geklärt war, stellte sich die Frage, welche Fluorochrome einen derartigen Schritt überstehen. Fluorochrome wie AlexaFluor488, Phycoerythrin (PE) und Allophycocyanin (APC) führen zu unspezifischen Färbungen wie in Abbildung 3.4C stellvertretend für AlexaFluor488 gezeigt. Dagegen können mit FITC, AlexaFluor647 oder Cy5 konjugierte Antikörper für eine derartige Methode verwendet werden, da sie zu vergleichbaren Färbemustern führten wie eine Kontrollfärbung ohne Hitzeschritt (siehe Abb. 3.4F eine Färbung stellvertretend mit Cy5 konjugiertem anti-CD4 Antikörper).

Dadurch ist es nun möglich, BrdU⁺ Zellen fluorochrom-basiert darzustellen und sie phänotypisch zu charakterisieren, wenn vor der DNS-Denaturierung eine Oberflächenfärbung erfolgt. Durch die Etablierung dieses Protokolls, war es möglich, im Verlauf dieser Arbeit während einer Infektion mit *L. major* bestimmte Kompartimente im Lymphknoten auf die darin proliferierenden Zelltypen hin zu untersuchen.

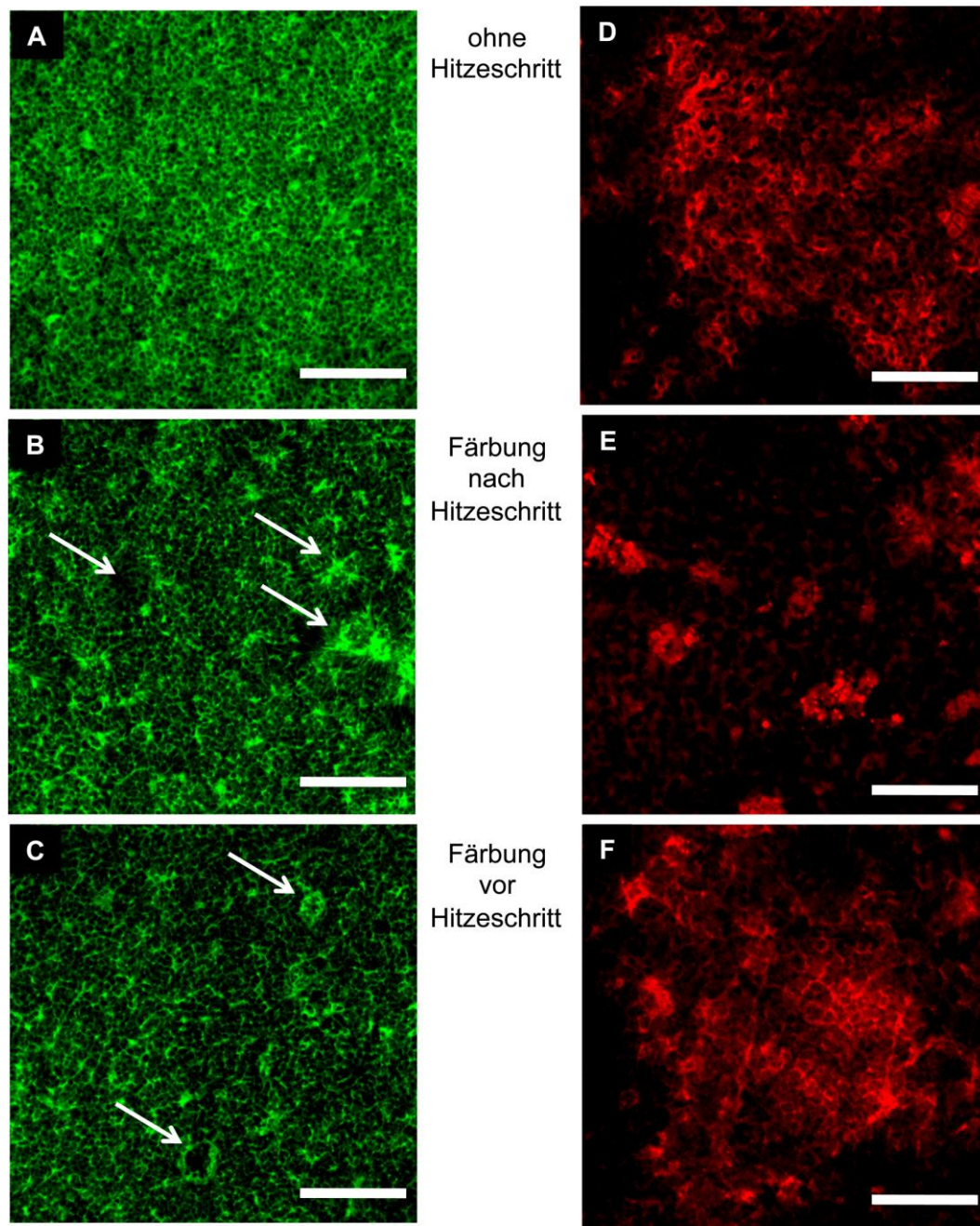


Abbildung 3.4: Etablierung einer Doppelfärbung von BrdU⁺ Zellen

Kryostatschnitte eines poplitealen Lymphknotens wurden mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern bei verschiedenen Ansätzen inkubiert. (A) Eine Kontrollfärbung mit AlexaFluor 488 konjugiertem anti-CD4 Antikörper ist hier gezeigt. Eine Inkubation bei 89 °C zur DNS-Denaturierung wurde nicht durchgeführt. (B) Eine Oberflächenfärbung nach dem 89 °C Hitzeschritt zeigt unspezifische Färbungen, siehe Pfeile. (C) Auch eine Färbung vor dem Hitzeschritt führt zu einer unspezifischen Färbung, wie durch Pfeile angedeutet ist. (D) Kontrollfärbung mit einem Cy5-konjugiertem anti-CD4 Antikörper ohne Hitzeschritt von 89 °C. (E) Eine Färbung nach dem Hitzeschritt zeigt, dass im Vergleich zu (D) weniger Zellen gefärbt sind. (F) Bei einer Färbung vor dem Hitzeschritt von 89 °C zeigt sich eine vergleichbare Färbung wie bei der Kontrollfärbung (D). Diese Abbildung ist exemplarisch für 3 Experimente. (Maßstabsbalken A-C: 100 µm, D-F: 50 µm).

3.3 Struktur eines naiven Lymphknotens

Ziel dieser Arbeit war unter anderem die Architektur eines Lymphknotens während einer Immunantwort gegen *L. major* in Abwesenheit von Langerin⁺ dendritischen Zellen zu untersuchen. 2004 wurde eine distinkte Struktur innerhalb eines Lymphknotens von Katakai *et al.* beschrieben, der sog. „cortical ridge“ (CR). Dieser zeichnet sich dadurch aus, dass die retikuläre Struktur innerhalb des CR sehr dicht und gefäßreich ist.

Aufgrund der zentralen Rolle dieser möglichen immunologischen Plattform (siehe Einleitung 1.5) wurde in Pilotexperimenten zunächst versucht, das charakteristische retikuläre Netzwerk in naiven Lang-DTR-EGFP Mäusen nachzuweisen. Unter Verwendung des Antikörperklons ER-TR7, der Oberflächenstrukturen von retikulären Fibroblasten erkennt, zeigte sich in der Tat, dass in naiven Lang-DTR-EGFP Mäusen ein CR wie von Katakai *et al.* beschrieben vorhanden ist. In der Vergrößerung in Abbildung 3.5A sieht man viele Gefäße innerhalb des CR. Der CR bildet die Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel. Dabei verläuft er um den B-Zell-Follikel halbmondförmig hin zum subkapsulären Sinus. Abbildung 3.5B, C und D zeigen, dass innerhalb des CR sowohl wenige B-Zellen, CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen vorkamen. Allerdings ist in Abbildung 3.5D zu sehen, dass CD8⁺ T-Zellen nicht bis zum subkapsulären Sinus hin im CR vorhanden waren.

In Abbildung 3.5C ist zusätzlich erkennbar, dass innerhalb der B-Zell-Follikel auch CD4⁺ T-Zellen vorhanden sind, wohingegen CD8⁺ T-Zellen nicht darin lokalisiert sind (Abb. 3.5D).

Wie Abbildung 3.5 zeigt, war in naiven Lang-DTR-EGFP Mäusen ein CR vorhanden, der die Grenzregion zwischen T-Zell-Bereich und B-Zell-Follikel bildet und dass innerhalb dieses Bereiches B-Zellen und T-Zellen lokalisiert waren. Ob es zu strukturellen Veränderungen während einer Infektion mit *L. major* Parasiten kommt, sollte im Folgenden untersucht werden.

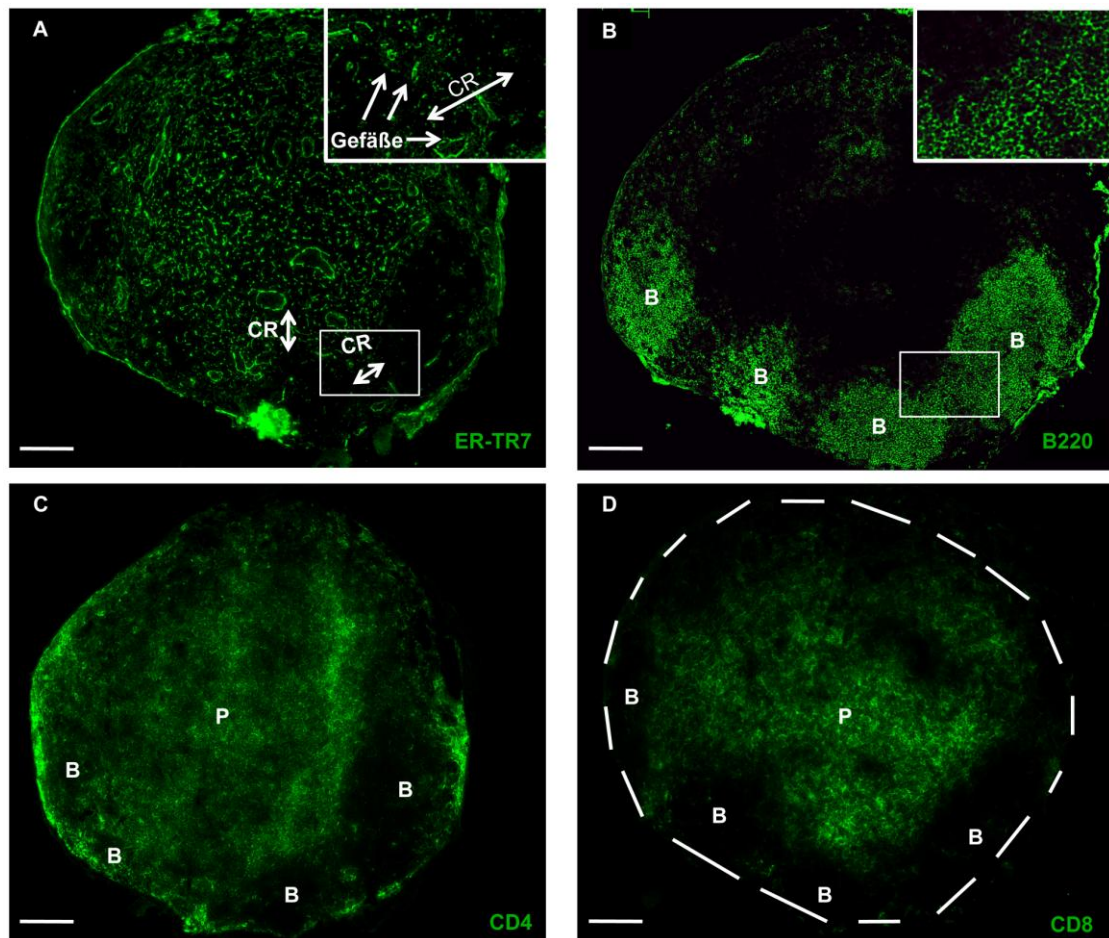


Abbildung 3.5: Struktur eines naiven Lymphknotens

In Abbildung 3.5 sind Kryostatschnitte eines Lymphknotens einer naiven Lang-DTR-EGFP Maus gezeigt. (A) Hier wurden retikuläre Strukturen (ER-TR7; grün) dargestellt. Neben Gefäßen sind dichte Strukturen an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel (Doppelpfeile) zu erkennen, die nach Katakai *et al.* „cortical ridge“ (CR) genannt werden. Rechts oben im Bild ist ein gefäßreicher CR vergrößert dargestellt, in der Übersichtsaufnahme kennzeichnet das Viereck die vergrößerte Region. (B) B-Zellen werden durch anti-B220 (grün) dargestellt. Deutlich sind die vier B-Zell-Follikel (mit B gekennzeichnet) zu erkennen. Wieder wird ein CR vergrößert im rechten oberen Rand des Bildes gezeigt. (C) $CD4^+$ T-Zellen (grün) sind im ganzen Paracortex verteilt und vereinzelt in B-Zellfollikeln. (D) $CD8^+$ T-Zellen sind kompakter im Paracortex lokalisiert und nicht in den B-Zell-Follikeln vorhanden. (B = B-Zell-Follikel; P = Paracortex). Abbildung ist repräsentativ für 3 Experimente. (Maßstabsbalken: 100 μm).

3.4 Der „cortical ridge“ während einer Infektion mit Leishmanien

3.4.1 Die retikuläre Struktur im Lymphknoten am Tag 3 nach Infektion

Nachdem die dichte retikuläre Struktur des naiven Lymphknotens in Abbildung 3.5 gezeigt werden konnte, galt es nun den CR im infizierten Lymphknoten nachzuweisen. Von Lymphknoten aus 3 Tage infizierten Lang-DTR-EGFP Tieren

wurden Kryostatschnitte angefertigt und retikuläre Fibroblasten mit ER-TR7 (grün) dargestellt.

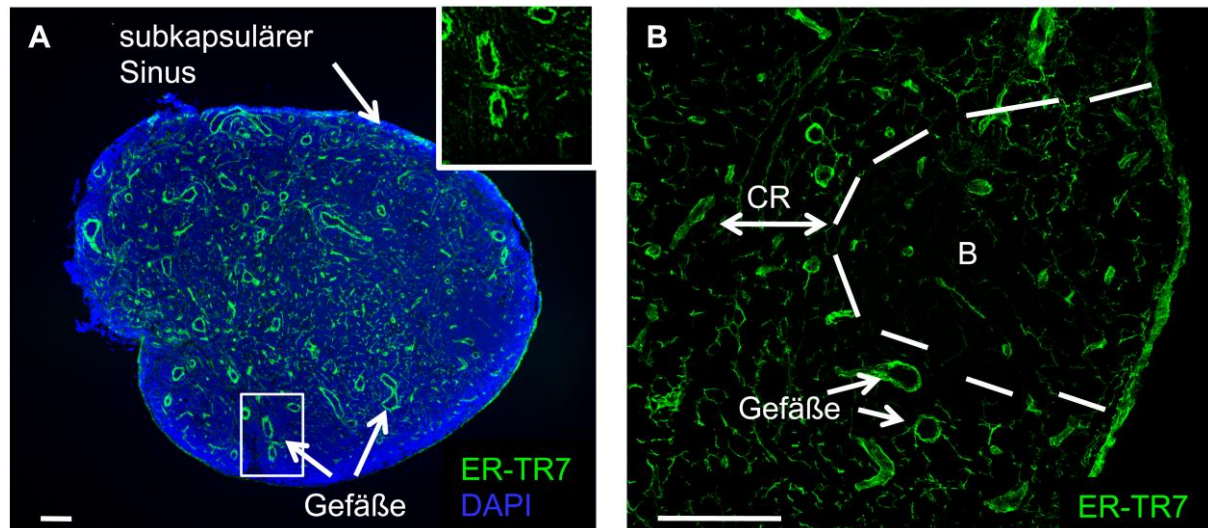


Abbildung 3.6: Der „cortical ridge“ am Tag 3 nach einer Infektion

Abbildung 3.6. zeigt Kryostatschnitte eines poplitealen Lymphknoten drei Tage nach einer Infektion mit Leishmanien. (A) Die retikuläre Fibroblasten wurde mit dem Antikörper ER-TR7 dargestellt (grün), um das dichte Netzwerk und den CR im Lymphknoten zu zeigen. Die Zellkerne sind mit DAPI gegengefärbt. Die Vergrößerung rechts oben im Bild zeigt den gefäßreichen CR, der Ausschnitt ist in der Übersichtsaufnahme durch das weiße Viereck gekennzeichnet. (B) Hier ist der gefäßreiche CR detaillierter gezeigt. (B = B-Zell-Follikel). Abbildung ist repräsentativ für 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. (Maßstabsbalken: A: 100 μ m. B: 50 μ m).

Wie Abbildung 3.6A zeigt, weist auch 3 Tage nach einer Infektion der Lymphknoten dichte retikuläre Strukturen auf. Deutlich sind in der Vergrößerung, rechts oben in Abbildung A, die vielen Gefäße im CR erkennbar.

In Abbildung 3.6B ist eine vergrößerte Aufnahme eines CR aus Abbildung 3.A gezeigt. Dabei ist die gefäßreiche retikuläre Struktur, der CR, deutlich dargestellt. Auch erkennt man, wie der CR den B-Zell-Follikel halbmondförmig zum Paracortex hin gewandt vom T-Zellbereich abgrenzt und dabei bis zum subkapsulären Sinus reicht.

Während einer Immunantwort, 3 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien, sind im Lymphknoten weiterhin CR an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel nachweisbar. Nachdem in Abbildung 3.5 im naiven Lymphknoten sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch CD8⁺ T-Zellen im CR lokalisiert waren, sollte die Existenz beider T-Zellsubpopulationen im CR während einer Infektion untersucht werden.

3.4.2 Charakterisierung der Zellen im CR am Tag 3 nach Infektion

Da die Verteilung von CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen im CR nicht bekannt ist, wurde die Anordnung der beiden T-Zellsubpopulationen während einer Infektion innerhalb des CR charakterisiert.

Dazu wurden Lang-DTR-EGFP Mäuse 3 Tage mit Leishmanien infiziert und anschließend Kryostatschnitte der Lymphknoten angefertigt. Diese Schnitte wurden auf die Verteilung von CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen im gesamten Lymphknoten und im speziellen im CR hin analysiert.

Dabei zeigte sich, dass CD4⁺ T-Zellen im gesamten Lymphknoten lokalisiert sind (Abb. 3.7A). Im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen waren CD8⁺ T-Zellen im tiefen Paracortex zentriert. Ein direkter Vergleich beider T-Zellsubpopulationen in Abbildung 3.7C stellt die unterschiedlich dichte Verteilung im gesamten Lymphknoten aber auch im CR dar. Eine detailliertere Darstellung des dichten retikulären Netzwerkes im Grenzbereich zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel bestätigt den Befund der Übersichtsaufnahmen, dass massiv CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.7D) im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.7E) im CR 3 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien vorhanden waren (Abb. 3.7F). Im B-Zell-Follikel finden sich ebenfalls CD4⁺ T-Zellen aber keine CD8⁺ T-Zellen. Dies deutet auf eine besondere Bedeutung dieser T-Zellen hin.

Am Tag 3 sind CD4⁺ T-Zellen die dominante T-Zellsubpopulation im Vergleich zu CD8⁺ T-Zellen. Für eine erfolgreiche Immunantwort gegen *L. major* Parasiten ist es wichtig, dass T-Zellen von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen aus Haut aktiviert werden woraufhin diese T-Zellen klonal proliferieren.

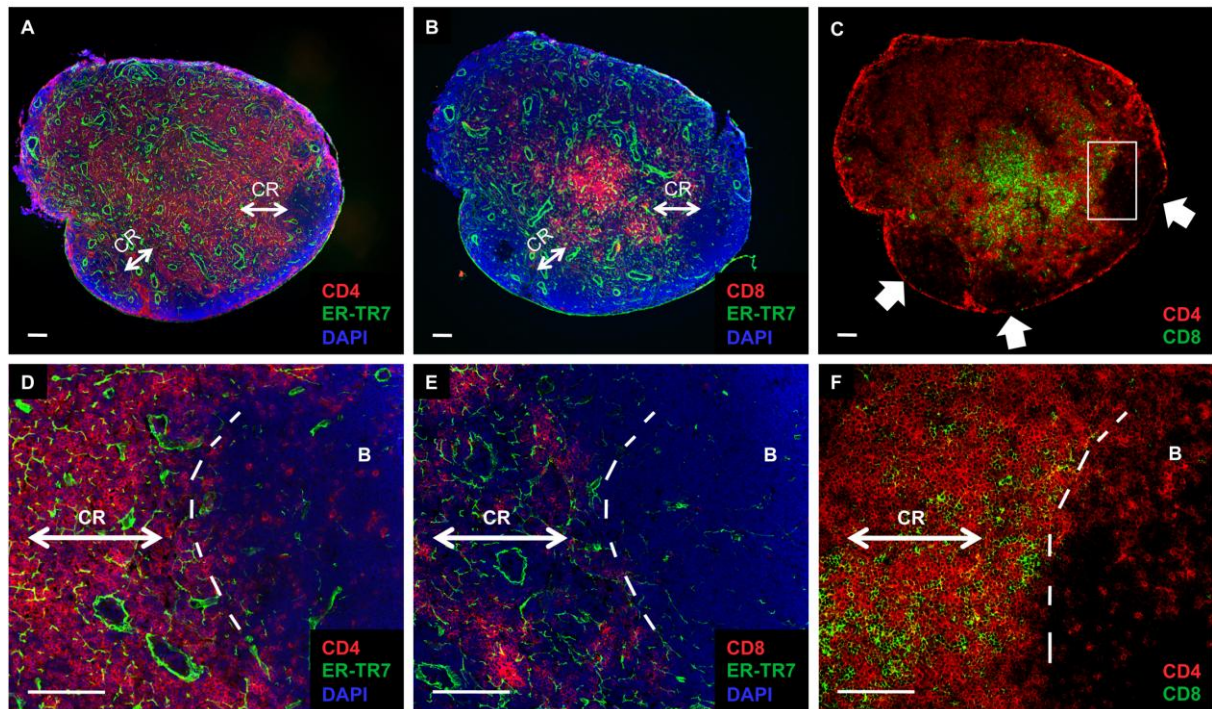


Abbildung 3.7: Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im poplitealen Lymphknoten, insbesondere im CR, 3 Tage nach Infektion

Abbildung 3.7 zeigt die Verteilung von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in einem Lymphknoten einer drei Tage infizierten Lang-DTR-EGFP Maus. (A) $CD4^+$ T-Zellen sind im Paracortex lokalisiert, jedoch auch im CR (angedeutet durch Doppelpfeile) und im B-Zell-Follikel vorhanden. (B) $CD8^+$ T-Zellen sind im Paracortex und im CR (angedeutet durch Doppelpfeile) vorhanden, nicht im B-Zell-Follikel. (C) $CD4^+$ T-Zellen (rot) im direkten Vergleich zu $CD8^+$ T-Zellen (grün). Die Blockpfeile deuten die B-Zell-Follikel an. Das Viereck zeigt den Bereich, der in D-F detaillierter dargestellt ist. (D) Darstellung des retikulären Netzwerkes (ER-TR7, grün) zusammen mit $CD4^+$ T-Zellen ($CD4$, rot). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel. Der B-Zell-Follikel ist mit einem B gekennzeichnet. (E) Die Verteilung von $CD8^+$ T-Zellen (rot) im retikulären Netzwerk (ER-TR7, grün). Die gestrichelte Linie zeigt die Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel, der mit einem B gekennzeichnet ist. (F) Direkter Vergleich zwischen $CD8^+$ T-Zellen (grün) zu $CD4^+$ T-Zellen (rot) im CR. Im Vergleich zu den $CD4^+$ T-Zellen sind keine $CD8^+$ T-Zellen im B-Zell-Follikel nachweisbar. Die Bilder sind repräsentativ für 4 Experimente. (Maßstabsbalken: 100 μ m).

Wie bereits erwähnt können T-Zellen nach ihrer Aktivierung durch antigenpräsentierende Zellen klonal expandieren. Im Kontext mit Abbildung 3.7, die zeigt, dass $CD4^+$ T-Zellen die dominante T-Zellsubpopulation im CR am Tag 3 nach einer Infektion sind, sollte nun untersucht werden, ob diese $CD4^+$ T-Zellen im CR proliferieren. Dazu wurden Lymphknoten von Lang-DTR-EGFP Mäusen entnommen, die 3 Tage subkutan mit Leishmanien infiziert worden waren und serielle Kryostatschnitte angefertigt. So sollte in diesen Lymphknoten der Phänotyp der proliferierten Zellen im CR bestimmt werden.

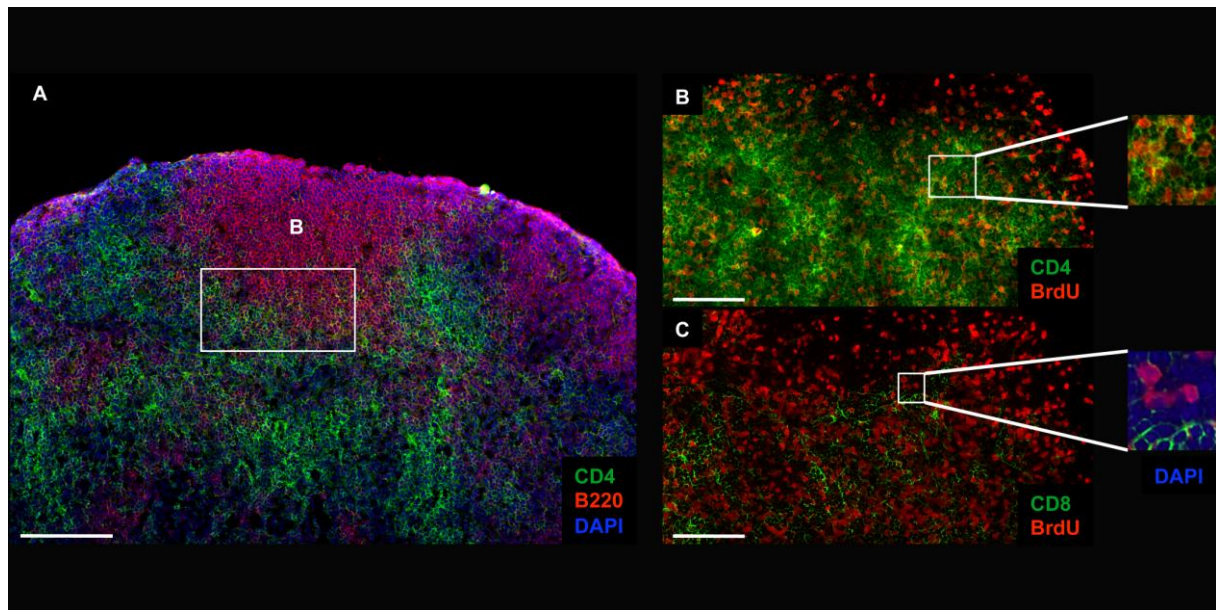


Abbildung 3.8: CD4⁺ T-Zellen proliferieren im CR am Tag 3 nach einer Infektion

Charakterisierung der T-Zellproliferation im poplitealen Lymphknoten 3 Tage nach einer Infektion. Kryostatschnitte wurden mit diversen Antikörpern zur Phänotypisierung der proliferierenden Zellen inkubiert. 0,8 mg/ml BrdU wurde 3 Tage lang über das Trinkwasser verabreicht. (A) CD4⁺ T-Zellen (grün) sind im CR ebenso vorhanden wie B-Zellen (rot). Der B-Zell-Follikel ist mit einem „B“ gekennzeichnet. Das Viereck zeigt den Ausschnitt, der in (B) und (C) dargestellt ist. (B) Alle CD4⁺ T-Zellen (grün) im CR sind BrdU⁺ und haben proliferiert wie der Ausschnitt zeigt. (C) Im CR sind nur sehr wenige CD8⁺ T-Zellen nachweisbar die negativ für BrdU (rot) sind (siehe Ausschnitt). Die Bilder sind repräsentativ für 4 Experimente. (Maßstabsbalken: 100 µm).

Dabei zeigt Abbildung 3.8A die Grenzregion zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel. Eine Charakterisierung der BrdU⁺ Zellen im CR zeigte, dass alle CD4⁺ T-Zellen in diesem Bereich BrdU⁺ waren und somit proliferiert haben (Abb. 3.7B). Dies wird besonders in dem vergrößerten Ausschnitt von Abbildung 3.8B deutlich. Dagegen zeigt der vergrößerte Ausschnitt in Abbildung 3.8C, dass die BrdU⁺ Zellen negativ für CD8 waren. Auch in der Übersichtsaufnahme ist gut zu erkennen, dass die wenigen im CR vorhandenen CD8⁺ T-Zellen innerhalb der ersten 3 Tage nach einer Leishmanien-Infektion nicht proliferiert haben.

Dieser Befund verdeutlicht die von Katakai *et al.* publizierte Ansicht, dass der CR eine wichtige immunologische Plattform während einer Immunantwort darstellt. Des Weiteren scheint es, dass im CR speziell CD4⁺ T-Zellen aktiviert werden. Die Entwicklung dieser immunologischen Plattform, wandern CD8⁺ T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt der Immunantwort in den CR, bleibt der CR unverändert im weiteren Verlauf bestehen, ist demnach von großem Interesse.

3.5 Die Entwicklung im Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion

3.5.1 Die Struktur des Lymphknotens am Tag 6 nach einer Infektion

Nachdem bisher gezeigt werden konnte, dass $CD4^+$ T-Zellen die dominante T-Zellsubpopulation im CR nach einer Infektion mit Leishmanien sind, war es nun von großem Interesse, wie die Entwicklung des CR im Laufe einer Immunantwort ist. Dabei sollte zunächst untersucht werden, wie sich der Lymphknoten als Ganzes am Tag 6 nach einer Infektion darstellt. Dazu wurden wiederum serielle Kryostatschnitte von Lymphknoten entsprechender Tiere angefertigt.

Wie Abbildung 3.9A zeigt vergrößerte sich der Lymphknoten zwischen Tag 3 und 6. Dabei war das dichte retikuläre Netzwerk weiterhin vorhanden, was bedeutet, dass der CR auch am Tag 6 nach einer Infektion besteht. Eine Färbung der B-Zellen in Abbildung 3.9B zeigt, dass die B-Zell-Follikel stark expandiert hatten. Sie wurden aber weiterhin halbmondförmig wie bereits in naiven Tieren (Abb. 3.5) und am Tag 3 nach einer Infektion (Abb. 3.7) vom CR umrandet. $CD4^+$ T-Zellen waren auch weiterhin über den ganzen Lymphknoten verteilt und wie durch die Pfeile in Abbildung 3.9C hervorgehoben immer noch im B-Zell-Follikel vorhanden. Die $CD8^+$ T-Zellen verteilten sich jedoch im Vergleich zum Tag 3 nach einer Infektion (Abb. 3.7) mehr im Lymphknoten, aber es konnten weiterhin keine $CD8^+$ T-Zellen im B-Zell-Follikel nachgewiesen werden (Abb. 3.9D).

Auch am Tag 6 nach einer Infektion bestand der CR im vergrößerten Lymphknoten. Die dabei in Abbildung 3.9 untersuchten Zellpopulationen, wie $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen zeigten auch keine besonders auffälligen Veränderungen in der Übersicht zum Tag 3 (Abb. 3.7) nach einer Infektion. Doch wie eine Darstellung der B-Zellen zeigt, waren die B-Zell-Follikel vergrößert (Abb. 3.9B). Diese Vergrößerung konnte entweder durch neu in den Lymphknoten eingewanderte B-Zellen bedingt gewesen sein, oder dass B-Zellen ebenfalls massiv begonnen hatten zu proliferieren. Im Folgenden sollte untersucht werden wie sich die zelluläre Zusammensetzung am Tag 6 nach Infektion im CR darstellt.

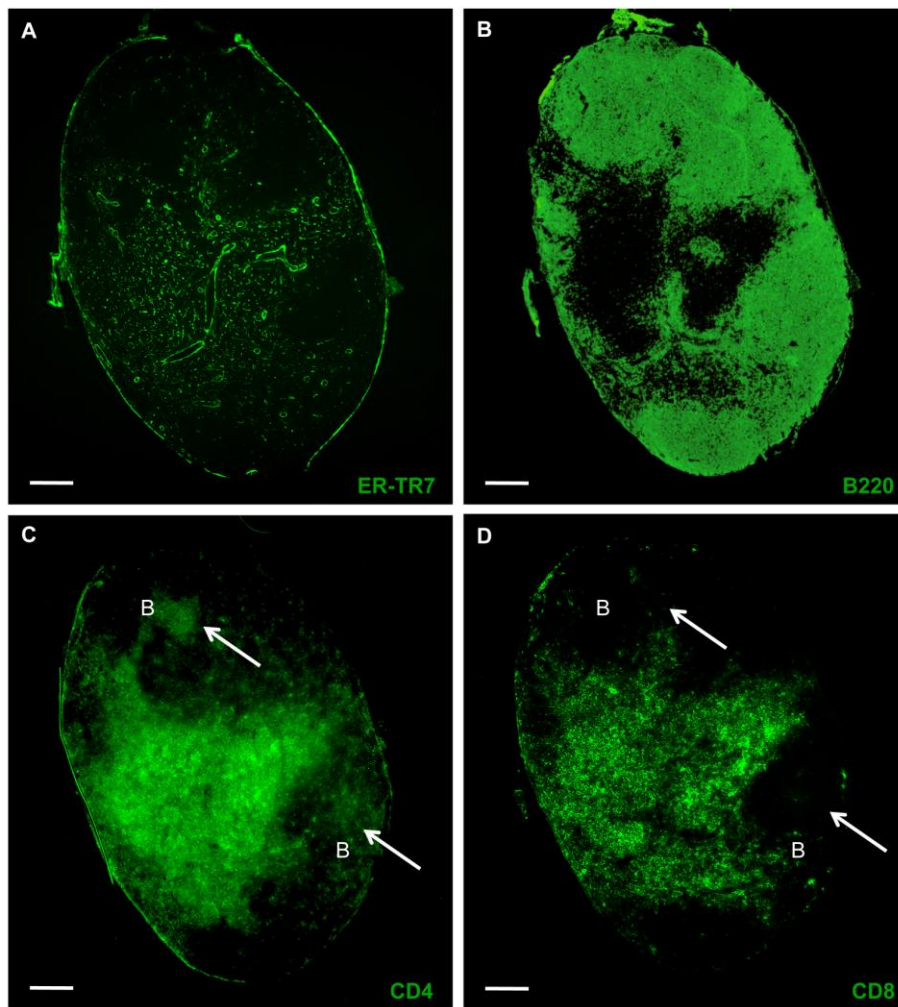


Abbildung 3.9: Struktur eines poplitealen Lymphknotens 6 Tage nach Infektion

In Abbildung 3.9 sind Kryostatenschnitte eines poplitealen Lymphknotens 6 Tage nach einer Infektion mit *L. major* Parasiten gezeigt. (A) ER-TR7 Färbung (grün) mit der dichten retikulären Struktur. (B) Die B-Zell-Follikel (grün und mit B gekennzeichnet) 6 Tage nach der Infektion. (C) CD4⁺ T-Zellen (grün) sind über den Lymphknoten verteilt, aber auch im B-Zell-Follikel (mit B gekennzeichnet) vorhanden, siehe Pfeile. (D) CD8⁺ T-Zellen (grün) sind über den ganzen Lymphknoten verteilt, aber nicht im B-Zell-Follikel vorhanden, wie mit den Pfeilen hervorgehoben. Die Bilder sind repräsentativ für 4 Experimente. (Maßstab: 200 µm)

3.5.2 Die zelluläre Zusammensetzung des CR am Tag 6 nach einer Infektion

Nachdem in Abbildung 3.9 gezeigt wurde, dass der CR auch am Tag 6 nach einer Infektion nachweisbar ist, sich allerdings bis auf die vergrößerten B-Zell-Follikel keine offensichtlichen Veränderungen im Vergleich zu Tag 3 zeigten, soll nun die zelluläre Zusammensetzung des CR am Tag 6 nach einer Infektion mit Leishmanien detaillierter, v. a. auf die proliferierenden Zellen innerhalb des CR hin, untersucht werden.

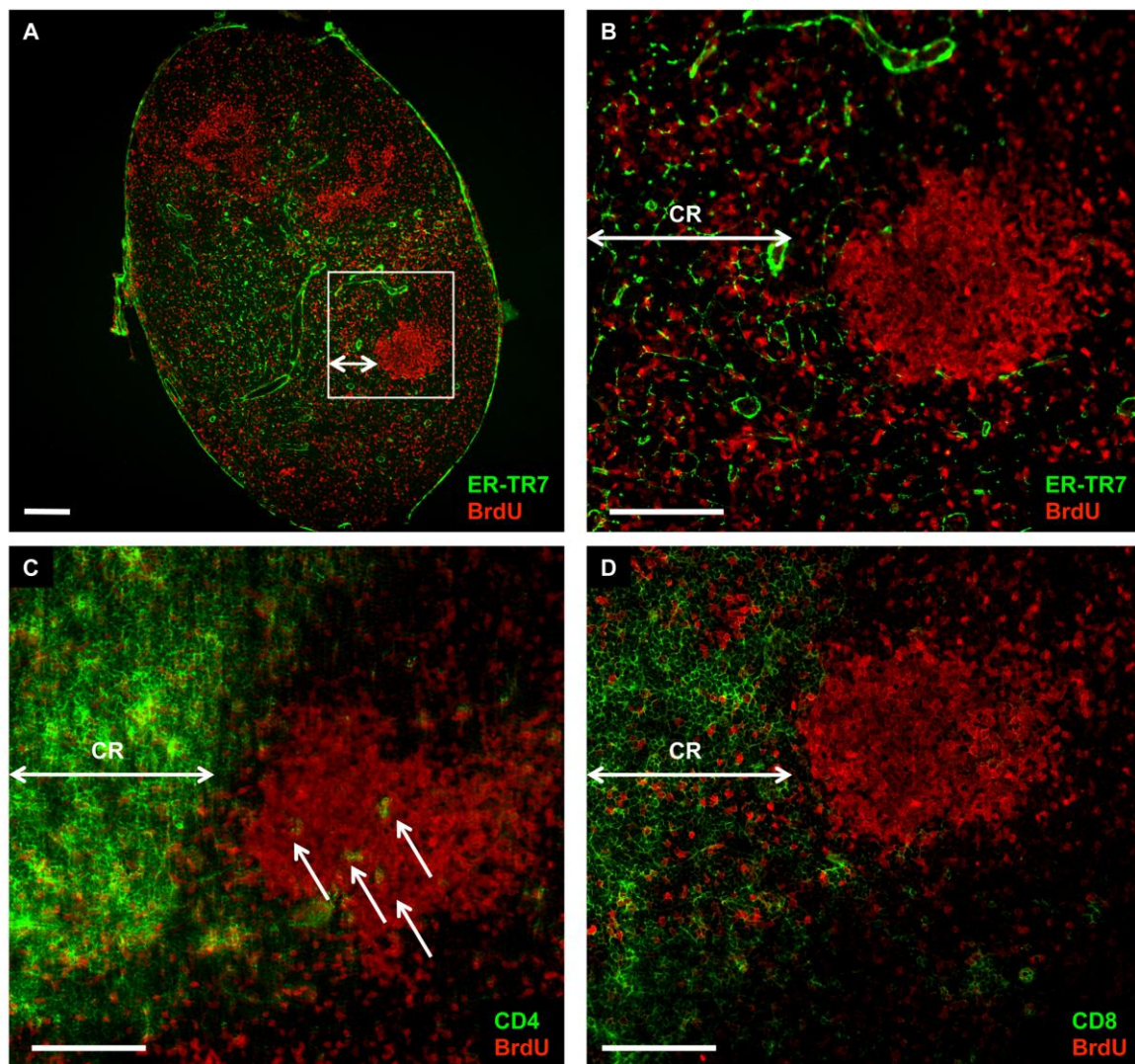


Abbildung 3.10: Darstellung des CR im poplitealen Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion

Abbildung 3.10 zeigt den CR am Tag 6 nach einer Infektion mit Leishmanien. (A) Übersichtsaufnahme eines Lymphknoten 6 Tage nach einer Infektion. Man sieht am CR (ER-TR7, grün, dargestellt durch den Doppelpfeil) dichte Ansammlungen von proliferierten Zellen (BrdU⁺, rot) (weißes Viereck). (B) Detailaufnahme, angedeutet in Abbildung A durch das weiße Viereck. Man kann die retikuläre Struktur des CR und Gefäße (ER-TR7, grün) erkennen. Zudem sind proliferierte Zellen (BrdU⁺, rot) vereinzelt und im dichten Zellverband dargestellt. (C) Im CR (angedeutet durch den Doppelpfeil) sind auch am Tag 6 nach einer Infektion sehr viele CD4⁺ T-Zellen (grün) vorhanden. Auch innerhalb des B-Zell-Follikels sind einige CD4⁺ T-Zellen erkennbar (siehe Pfeile). (D) CD8⁺ T-Zellen (grün) sind auch am Tag 6 nach einer Infektion weitaus weniger als CD4⁺ T-Zellen im Bereich des CR (hervorgehoben mit dem Doppelpfeil) vorhanden. Auch innerhalb der angehäuften proliferierten Zellen sind keine CD8⁺ T-Zellen erkennbar. Die Bilder sind repräsentativ für 4 Experimente. (Maßstabsbalken A: 200 µm, B-D: 100 µm).

Dazu wurden wieder von entsprechenden Lang-DTR-EGFP Tieren die Lymphknoten entnommen und von diesen Kryostatschnitte angefertigt. Um die proliferierenden Zellen nachweisen zu können, wurde für die letzten 3 Tage des Versuchs den Tieren 0,8 mg/ml BrdU in das Trinkwasser gegeben.

Färbt man BrdU⁺ Zellen zusammen mit dem Antikörper ER-TR7, so zeigte sich, dass sehr dichte Ansammlungen BrdU⁺ Zellen am CR nachweisbar waren. Diese Zellverbände waren vom T-Zellbereich abgewandt im B-Zell-Follikel (Abb. 3.10A). Obwohl unter diesen BrdU⁺ Zellen auch CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten, waren nicht alle BrdU⁺ Zellen CD4⁺ T-Zellen. Dass es sich bei dieser Population auch nicht um CD8⁺ T-Zellen handelte zeigt Abbildung 3.10D, denn innerhalb dieser BrdU⁺ Zellen sowie im restlichen B-Zell-Follikel zeigten sich keine CD8⁺ T-Zellen lokalisiert. Auch im Bereich des CR, der die Aggregate an BrdU⁺ Zellen hin zum Paracortex teilweise umrandet, waren proliferierte Zellen zu erkennen. Bei einem Vergleich der CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.10C) und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.10D) stellte sich heraus, dass CD4⁺ T-Zellen weiterhin die dominante T-Zellsubpopulation im CR waren. Auch ergab die Phänotypisierung der proliferierten Zellen, dass sich in diesem Areal hauptsächlich BrdU⁺ CD4⁺ T-Zellen befanden. BrdU⁺ CD8⁺ T-Zellen konnten dagegen im CR nur vereinzelt nachgewiesen werden, die Mehrzahl der CD8⁺ Zellen zeigte sich BrdU⁻.

Bei der Untersuchung der Proliferation in Lymphknoten eines 6 Tage infizierten Tieres zeigte sich, dass nach wie vor CD4⁺ T-Zellen die dominante T-Zellsubpopulation im CR darstellten. Besonders auffällig waren jedoch die dichten Zellverbände BrdU⁺ CD4⁻ CD8⁻ Zellen im B-Zell-Follikel, die vom CR halbmondförmig umrandet wurden. Unter diesen im B-Zell-Follikel dicht gepackten BrdU⁺ Zellen fanden sich zwar auch vereinzelt CD4⁺ T-Zellen, im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen, jedoch sind T-Zellen nicht die Zellpopulation, die derartig proliferiert hatte. Aufgrund der Lage und anhand von seriellen Schnitten konnte davon ausgegangen werden, dass es sich um B-Zellen handelt.

Die dichten Zellverbände sollten nachfolgend genauer charakterisiert werden.

3.5.3 Charakterisierung BrdU⁺ Zellaggregate

Da sich die dichten Aggregate an BrdU⁺ Zellen in Abbildung 3.10 im B-Zell-Follikel befanden, stellte sich die Frage, ob es sich dabei um Keimzentrumsreaktionen handelt. Keimzentren können unter anderem mit „*peanut agglutinin*“ (PNA) dargestellt werden. PNA ist ein ca. 110 kD großes Protein, das aus 4 Untereinheiten besteht und an Galaktose bindet. Da B-Zellen wie T-Zellen nach Aktivierung durch

entsprechendes Antigen proliferieren, sollte dies in Abbildung 3.11 auch untersucht werden. Dafür wurden Kryostatschnitte eines Lymphknotens angefertigt. Die Lymphknoten dafür stammten aus Lang-DTR-EGFP Tieren, denen die Lymphknoten 6 Tage nach einer Infektion entnommen worden waren. Diese Tiere erhielten um die Proliferation darstellen zu können 0,8 mg/ml BrdU im Trinkwasser über einen Zeitraum von 3 Tagen vor der Organentnahme.

Es zeigte sich, dass in diesen Lymphknoten mit PNA Keimzentren dargestellt werden konnten. Der in Abbildung 3.11A dargestellte Lymphknoten weist 3 Keimzentren auf. Diese Keimzentren stimmten mit den Ansammlungen BrdU⁺ Zellen überein (vgl. Abb. 3.10A und 3.11A). Da diese Keimzentren eng am CR anlagen, in welchem CD4⁺ T-Zellen die dominante T-Zellsubpopulation im Vergleich mit CD8⁺ T-Zellen darstellten (siehe Abb. 3.10) wurden die Keimzentren detaillierter untersucht. In Folge dessen konnten CD4⁺ T-Zellen innerhalb der Keimzentren nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.11B und C). Des Weiteren waren auch außerhalb der Keimzentren CD4⁺ T-Zellen eng an diesen lokalisiert. Wie Abbildung 3.11C zeigt, kamen CD4⁺ T-Zellen nicht nur im Keimzentrum bzw. in der PNA⁺ dunklen Zone des Keimzentrums vor, sondern auch in der hellen Zone. Wie bereits erwähnt, proliferieren antigenspezifische B-Zellen nach ihrer Aktivierung. Dabei war Leishmanien-Antigen besonders am Übergang vom T-Zellbereich zum B-Zell-Follikel detektierbar, aber auch im Keimzentrum. Da es sich bei Abbildung 3.11B und C und serielle Schnitte handelt, ist davon aus zu gehen, dass die Aggregate BrdU⁺ Zellen in den B-Zell-Follikeln Keimzentren repräsentieren.

Die bereits in Abbildung 3.10 gezeigten dichten Ansammlungen BrdU⁺ Zellen waren auch PNA⁺, was darauf hindeutete, dass es sich um Keimzentren handelt. Des Weiteren konnten diese Areale mit einem anti-GL7 Antikörper, einem Protein, das an aktivierte B-Zellen in Keimzentren bindet, dargestellt werden (Abbildungen nicht gezeigt). Auch in naiven Tieren können vereinzelt Ansammlungen von BrdU⁺ Zellen nachgewiesen werden, im Gegensatz zu der Parasiten-induzierten Immunantwort waren diese Zellaggregate aber negativ PNA. Dies zeigte, dass innerhalb von drei Tagen B-Zellen auch spontan proliferieren (Daten nicht gezeigt).

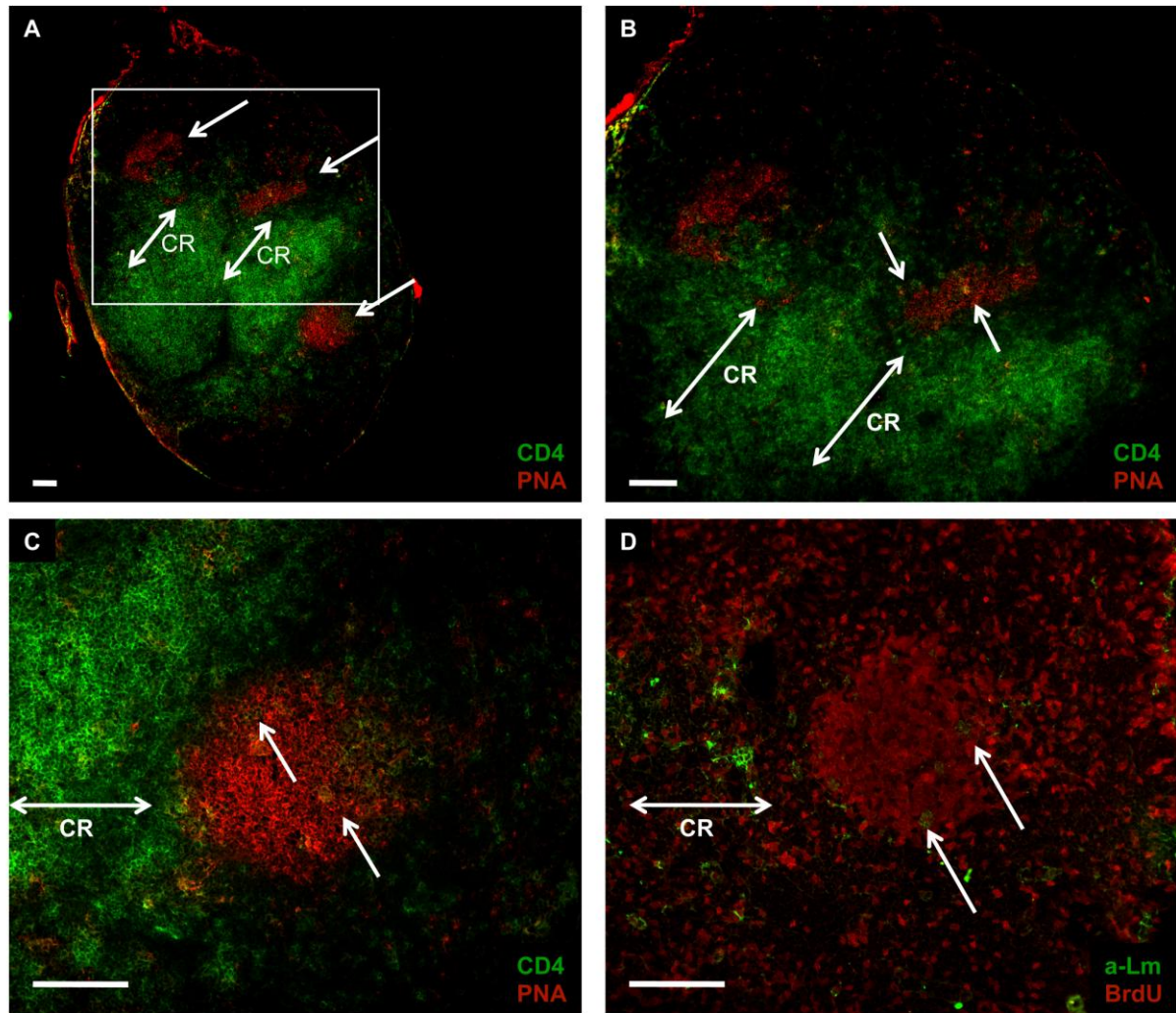


Abbildung 3.11: *In situ* Charakterisierung des poplitealen Lymphknotens am Tag 6 nach einer Infektion mit *L. major*

In Abbildung 3.11 sind serielle Kryostatschnitte eines Lymphknotens am Tag 6 nach einer Infektion dargestellt. (A) $CD4^+$ T-Zellen (grün) und „*peanut agglutinin*“ (PNA; rot) kennzeichnen den T-Zell-Bereich bzw. Keimzentren. Der CR ist durch die Doppelpfeile angedeutet. Die Pfeile kennzeichnen die 3 Keimzentren. (B) Innerhalb der Keimzentren (PNA⁺, rot) sind wie durch Pfeile angedeutet $CD4^+$ T-Zellen (grün) nachweisbar, der CR ist mit Hilfe von Doppelpfeilen angedeutet. (C) Das PNA⁺ Keimzentrum (rot) ist an der dem Paracortex zugewandten Seite von $CD4^+$ T-Zellen umgeben. (D) Sowohl im CR (siehe Pfeile) als auch im Keimzentrum kann Leishmanien-Antigen (a-Lm, grün) detektiert werden, wiederum deutet der Doppelpfeil den CR an. Die Bilder sind repräsentativ für 3 Experimente. (Maßstabsbalken: 100 μ m).

Da diese Keimzentren eng am CR anliegen, unterstreicht dies die Bedeutung des CR als immunologische Plattform, in welcher der Grundstein für eine T-Zellvermittelte B-Zellantwort gelegt wird. Daher war die Kenntnis über die Entwicklung des CR im Verlauf einer Immunantwort wichtig.

3.6 Der CR am Tag 10 nach einer Infektion mit Leishmanien

Da sowohl am Tag 3 als auch am Tag 6 nach einer Infektion $CD4^+$ T-Zellen die dominante T-Zellsubpopulation im CR darstellen, sollte dies auch für einen späteren Zeitpunkt während der Immunantwort untersucht werden. Dafür wurden Lang-DTR-EGFP Mäuse 10 Tage mit Leishmanien infiziert und von den entnommenen Lymphknoten Kryostatschnitte angefertigt. Da wiederum die Proliferation der Lymphozyten in diesen Lymphknoten untersucht werden soll, erhielten die Tiere BrdU mit dem Trinkwasser für einen Zeitraum von 3 Tagen vor Beendigung des Experiments.

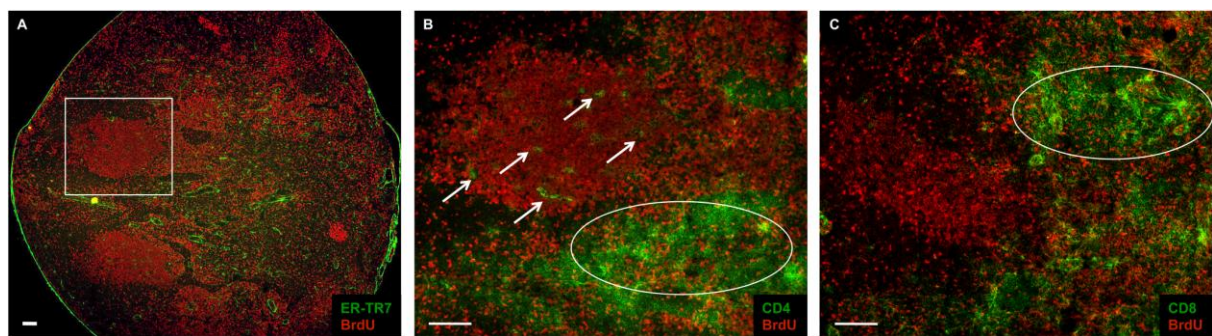


Abbildung 3.12: Charakterisierung der Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen am Tag 10 nach einer Infektion mit *L. major* Parasiten im poplitealen Lymphknoten

Abbildung 3.12 zeigt die Verteilung proliferierender $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen im poplitealen Lymphknoten am Tag 10 nach einer Infektion mit *L. major* Parasiten. (A) Hier ist eine Übersichtsaufnahme eines Lymphknotens gezeigt. Man sieht die großen Keimzentren (rot), die nicht mehr am CR (ER-TR7, grün) anliegen. Das Viereck zeigt das Keimzentrum, das nachfolgend detaillierter gezeigt ist. (B) Es sind nach wie vor $CD4^+$ T-Zellen (grün) im Keimzentrum zu erkennen (siehe Pfeile), im CR sind weiterhin $CD4^+$ T-Zellen vorhanden. (C) $CD8^+$ T-Zellen (grün) sind nicht im B-Zell-Follikel vorhanden. Im CR sind die $CD8^+$ T-Zellen räumlich distinkt von den $CD4^+$ T-Zellen lokalisiert, wie die Ovale anzeigen. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 Experimente. (Maßstabsbalken: 100 μm).

Ein Großteil der Zellen im Lymphknoten am Tag 10 nach Infektion war BrdU⁺, was auf eine intensive Proliferation bzw. einen reaktiven Lymphknoten schließen lässt. Auffallend ist, dass neben einer diffusen Anordnung im Paracortex die BrdU⁺ Zellen im B-Zell-Follikel stark aggregierten. Dabei zeichneten sich die Keimzentren noch distinkt ab, wobei sie nicht mehr nahe am CR anliegen, sondern sich weiter in den B-Zell-Follikel verlagert hatten (Abb. 3.12A). Allerdings kann nicht unterschieden werden, ob weitere B-Zellen zwischen das Keimzentrum und den CR gewandert

waren, oder ob der CR seine Lage veränderte. Innerhalb dieser Keimzentren waren auch am Tag 10 nach einer Infektion $CD4^+$ T-Zellen nachweisbar, wohingegen $CD8^+$ T-Zellen weiterhin nicht in den Keimzentren detektiert werden konnten. Im CR zeigte sich allerdings, dass $CD4^+$ T-Zellen unterschiedlich zu den $CD8^+$ T-Zellen lokalisiert sind, so befanden sich ausgehend vom Keimzentrum die $CD4^+$ T-Zellen auf der einen Seite im CR, die $CD8^+$ T-Zellen auf der gegenüberliegenden Seite (Abb. 3.12B und C). Dabei herrschte am Tag 10 nach einer Infektion mit Leishmanien ein mengenmäßiges Gleichgewicht zwischen $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen.

Für die ersten 10 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien konnte nachgewiesen werden, dass ein CR, die dichte retikuläre Struktur an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel, in den Haut-drainierenden Lymphknoten vorhanden ist. Des Weiteren stellen $CD4^+$ T-Zellen bis Tag 6 die dominante T-Zellsubpopulation im CR dar. Keimzentren, die wichtig für die Entstehung von Gedächtnis-B-Zellen und langlebigen Plasmazellen sind, konnten am Tag 6 am CR detektiert werden. Daher scheint es sinnvoll, in Bezug auf eine T-Zellabhängige B-Zellantwort diesen Zeitpunkt für weitere Untersuchungen zu wählen.

3.7 Der Vergleich von Lymphknoten aus Tieren mit DT-Behandlung und DT unbehandelten Tieren

Es ist bekannt, dass während einer Leishmanien-Infektion dendritische Zellen aus der Haut, wie i) Langerhans Zellen, ii) Langerin⁺ dermale dendritische Zellen (dDCs) und iii) Langerin⁻ dermale dendritische Zellen, in den Haut-drainierenden Lymphknoten wandern können (5). Dazu passend konnte Leishmanien-Antigen am Tag 6 (vgl. Abb. 3.11) nach einer Infektion sowohl im CR als auch in den Keimzentren nachgewiesen werden. Die intraperitoneale Gabe von 1 µg DT einer Lang-DTR-EGFP Maus erlaubt es, Langerhans Zellen und Langerin⁺ dermale dendritische Zellen zu depletieren, wie in Material und Methoden unter 2.2.2.1 beschrieben. Des Weiteren weisen beide Langerin⁺ Populationen distinkte Repopulationskinetiken auf, wodurch es möglich ist, durch die entsprechende Gabe von DT eine Situation zu schaffen, in der eine Maus keine Langerhans Zellen aufweist, bzw. eine Maus ohne beide Langerin⁺ Zelltypen (25-27). Injiziert man Lang-

DTR-EGFP Tieren 7 Tage vor der Infektion DT (1x DT), so sind am Tag 6 wie in Abbildung 3.1 bestätigt alle Langerhans Zellen depletiert. Bei einer zusätzlichen Injektion 5 Stunden vor der Infektion (2x DT) erreicht man, dass am Tag 6 nach Infektion, nur noch Langerin⁺ Zellen in der Haut vorhanden sind. In Abbildung 3.13 sind beide Injektionsansätze zusammen mit einem Ansatz ohne Injektion von DT dargestellt.

Kryostatschnitte von oben genannten Tieren wurden auf die räumliche Verteilung der BrdU⁺ Zellen und proliferierenden Zellen im Lymphknoten hin untersucht. Wie in Abbildung 3.11 im Vergleich zu Abbildung 3.12 dargestellt, stimmte ein PNA-Nachweis mit den Aggregaten BrdU⁺ Zellen überein, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei diesen Ansammlungen BrdU⁺ Zellen um Keimzentren handelt. Dabei zeigte sich, dass im Lymphknoten eines Tieres ohne DT-Behandlung mehr B-Zell-Follikel nachweisbar waren als bei den beiden anderen Tiergruppen. Dabei zeigt Abbildung 3.13A, dass ohne DT-Behandlung in jedem B-Zell-Follikel eine Keimzentrumsreaktion vorhanden war (Abb. 3.13A, B, E, F, I, J). Auch war der Lymphknoten des nicht DT-behandelten Tieres größer als bei Tieren ohne Langerhans Zellen bzw. ohne Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs (Abb. 3.13A, E, I), was mit Vermessungen gleich nach der Entnahme der Organe übereinstimmt (Daten nicht gezeigt). Der Vergleich der CR aller Tiere zeigt keine Unterschiede bzgl. der Verteilung von CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.13C, G, K) als auch bei der räumlichen Anordnung von CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.13D, H, L). CD4⁺ T-Zellen konnten in den Keimzentren von Tieren ohne DT-Behandlung ebenso erkannt werden wie auch bei Tieren ohne Langerhans Zellen bzw. ohne Langerhans Zellen und Langerin⁺ Zellen. Auch waren im Vergleich aller 3 Ansätze keine CD8⁺ T-Zellen in den Keimzentren nachzuweisen (Abb. 3.13D, H, L). Jedoch zeigte sich ein Unterschied zwischen den Tieren hinsichtlich der Größe der Keimzentren. Im Lymphknoten eines Tieres ohne DT-Behandlung waren die BrdU⁺ Zellaggregate am größten, wie Vergleiche zeigen (Abb. 3.13 C, D, G, H, K, L).

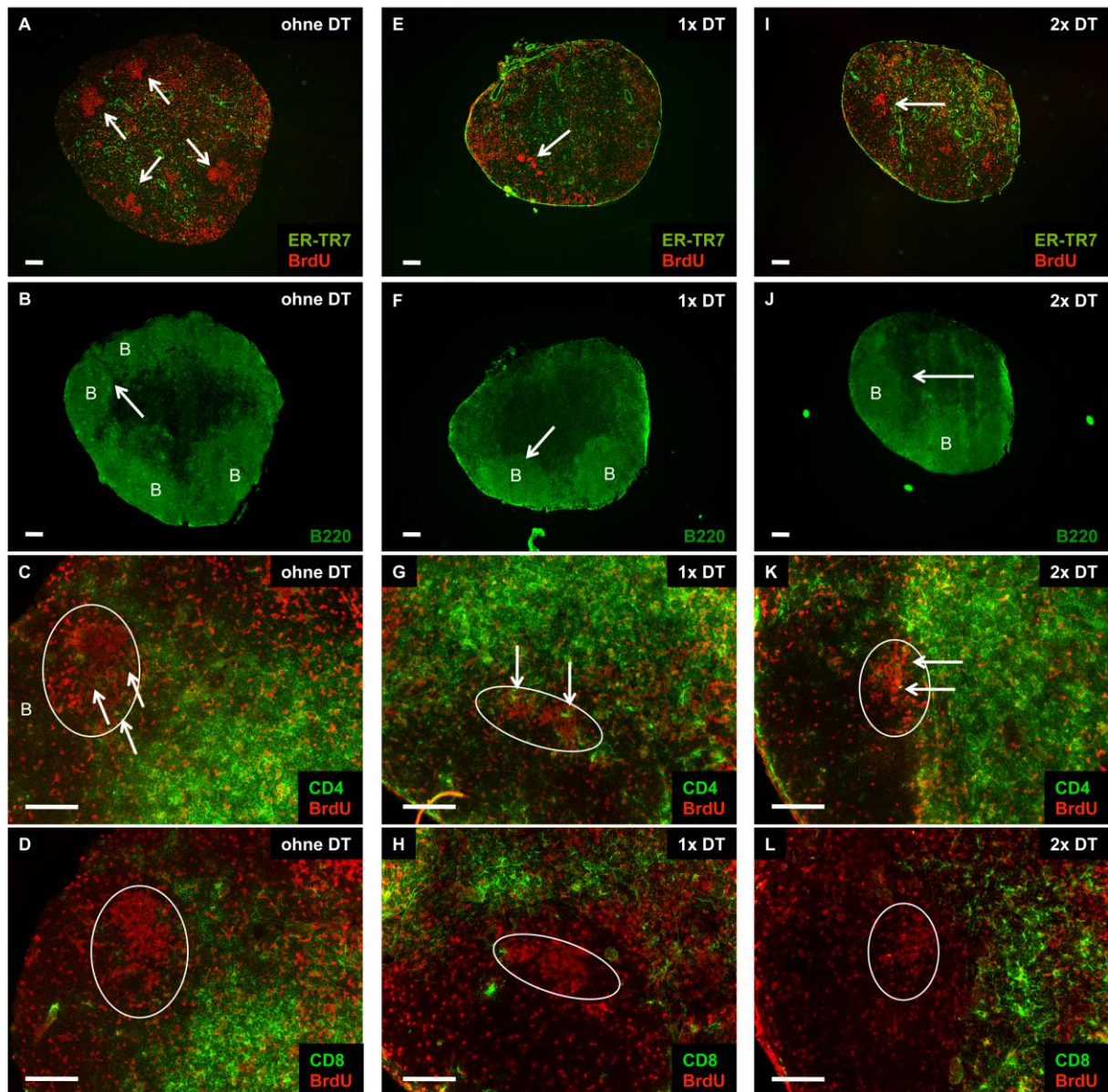


Abbildung 3.13: Die Bedeutung von Langerin⁺ dendritischer Zellen für die Proliferation in poplitealen Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion mit Leishmanien

Abbildung 3.13 zeigt Kryostatschnitte der Lymphknoten von Tieren 6 Tage nach einer Infektion. A-D: Lymphknoten eines Tieres ohne DT-Behandlung, d. h. alle Langerin⁺ Zellen waren in der Haut vorhanden. (A) Deutlich heben sich die Areale BrdU⁺ Zellen (rot) im Lymphknoten ab (geknennzeichnet mit Pfeilen). Gezeigt ist auch die retikuläre Struktur des Lymphknotens (ER-TR7, grün). (B) B220⁺ B-Zell-Follikel (grün) sind dargestellt. (C) CD4⁺ T-Zellen (grün) sind im CR und innerhalb der BrdU⁺ Zellaggregate (geknennzeichnet durch das Oval) vorhanden, wie mit Pfeilen angedeutet. (D) Im CR sind CD8⁺ T-Zellen (grün) vorhanden, in den Ansammlungen BrdU⁺ Zellen (umrandet mit einem Oval) sind keine CD8⁺ T-Zellen erkennbar, wie mit Pfeilen hervorgehoben. E-H: Lymphknoten eines Tieres, bei dem die Langerhans Zellen durch DT-Gabe depletiert waren (1x DT). (E) Die Übersichtsaufnahme zeigt im Vergleich zu (A) ein kleineres Areal proliferierter Zellen (BrdU⁺, rot) wobei auch der Lymphknoten kleiner ist als ohne DT-Gabe. (F) In diesem Lymphknoten sind nur zwei B-Zell-Follikel (B220⁺, grün) vorhanden. (G) Auch ohne Langerhans Zellen sind CD4⁺ T-Zellen (grün) innerhalb der BrdU⁺ Zellaggregate detektierbar. Das Oval zeigt an, dass dieses Zellaggregat ohne Langerhans Zellen kleiner als mit diesen Zellen ist. (H) Ohne Langerhans Zellen sind keine CD8⁺ T-Zellen (grün) in den Ansammlungen BrdU⁺ (rot) Zellen und weniger im CR als CD4⁺ T-Zellen. I-L: Lymphknoten eines Tieres, bei dem alle Langerin⁺ Zellen in der Haut durch DT-Gabe depletiert wurden (2x DT). (I) Ohne Langerin⁺ T-Zellen ist ein Areal BrdU⁺ Zellen (rot) erkennbar. (J): Dieser Lymphknoten weist auch zwei B-Zell-Follikel (B220⁺, grün) auf. (K) CD4⁺ T-Zellen (grün) sind in den Ansammlungen BrdU⁺ Zellen

(rot) und auch im CR lokalisiert. Das Oval zeigt das Zellaggregat BrdU⁺ Zellen. (L) In den Aggregaten BrdU⁺ Zellen (rot, angedeutet mit dem Oval) sind keine CD8⁺ T-Zellen (grün) sowie nur wenige im CR nachzuweisen. Pfeile in (B), (F) und (J) verweisen auf die im Detail gezeigten Follikel in (C), (D), (G), (H), (K) und (L). Die Bilder sind repräsentativ für 3 Experimente. (Maßstabsbalken: 100 µm)

Eine Depletion führte zu keinen Unterschied in der Lokalisation von sowohl CD4⁺ T-Zellen als auch von CD8⁺ T-Zellen im CR. In den Lymphknoten aller Tiere waren CD4⁺ T-Zellen im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen nachweisbar. Aber die Depletion von Langerhans Zellen sowie die von Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs führte zu einer verminderten Größe der Keimzentren. Ob sich die Keimzentren zwischen Tieren ohne DT-Behandlung und mit DT-Behandlung nur hinsichtlich ihrer Größe unterscheiden, sollte nachfolgend untersucht werden.

3.8 Die Keimzentrumsreaktion nach einer Infektion

3.8.1 Der Einfluß von Langerin⁺ Zellen auf die Keimzentrumsreaktion am Tag 6 nach Infektion

Keimzentren zeichnen sich dadurch aus, dass in ihnen B-Zellen proliferieren und es zur Affinitätsreifung dieser Antikörper kommt. Dabei tragen gegen Ende dieser Reifung B-Zellen membranständiges IgG (64). Follikuläre T_H-Zellen sind wichtig für diese Reifung der B-Zellen. Diese T_{FH}-Zellen sind u. a. definiert durch ihre Lokalisation im B-Zell-Follikel und die Expression des Transkriptionsfaktors BCL-6 (59). Die Depletion von Langerhans Zellen wie auch die von Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs führte zu einer verringerten Größe der Keimzentren (Abb. 3.13).

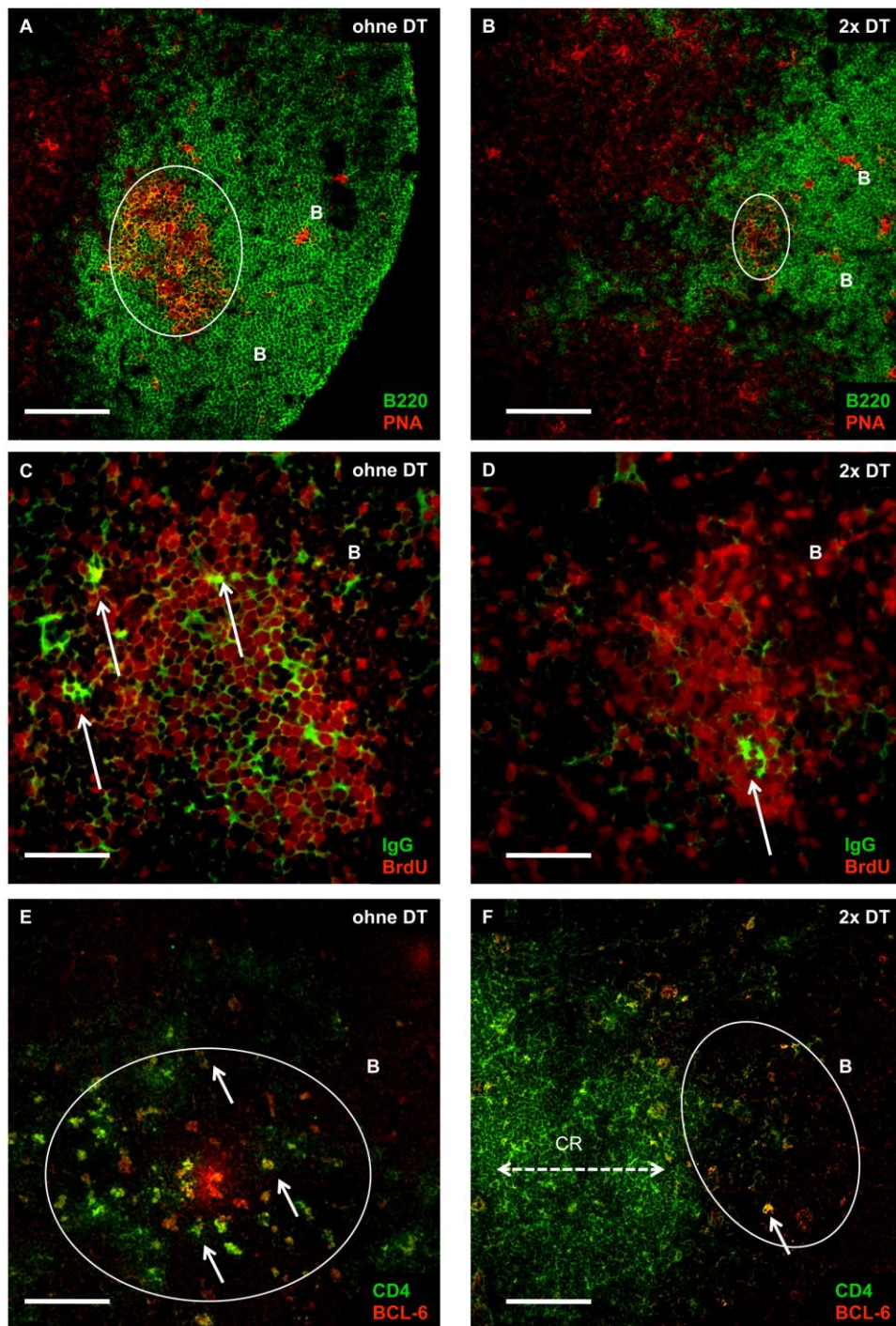


Abbildung 3.14: *In situ* Charakterisierung von Keimzentren in poplitealen Lymphknoten 6 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien

6 Tage infizierten Lang-DTR-EGFP Tieren wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen. Aus diesen Lymphknoten wurden Kryostatschnitte angefertigt, um die Keimzentren näher charakterisieren zu können. A, C, E: Lang-DTR-EGFP Mäuse ohne DT-Behandlung; B, D, F: Lang-DTR-EGFP Mäuse ohne Langerin⁺ Zellen in der Haut (2x DT). (A) Im B-Zell-Follikel (grün) ist ein Keimzentrum (PNA⁺, rot) (durch das Oval umrandet) nachweisbar. (B) Dargestellt ist ein Keimzentrum (PNA⁺, rot) im B-Zell-Follikel (B220⁺, grün). (C) Im Keimzentrum sind IgG-positive (grün) Zellen detektierbar, wie durch die Pfeile angedeutet. (D) Nach Depletion waren weniger IgG-positive (grün) Zellen im Keimzentrum vorhanden, wie die Pfeile zeigen. (E) Im B-Zell-Follikel (B) sind BCL-6⁺ CD4⁺ T-Zellen (gelb/orange, Pfeile) im Keimzentrum (angedeutet durch das Oval) zu erkennen (F) Im Keimzentrum (angedeutet durch das Oval) sind BCL-6⁺ CD4⁺ T-Zellen (gelb/orange, Pfeil) ebenfalls nachweisbar. In dieser Abbildung ist ein Teil des CR (gestrichelter Doppelpfeil) erkennbar. Die Abbildung ist repräsentativ für 2 Experimente. (Maßstabsbalken: A&B: 100 µm, C-F: 50 µm).

Um Keimzentren genauer *in situ* charakterisieren zu können, wurden Kryostatschnitte von drainierenden Lymphknoten angefertigt. Diese Lymphknoten stammten von Lang-DTR-EGFP Mäusen am Tag 6 nach einer Infektion.

Im Vergleich zwischen einer Lang-DTR-EGFP Maus ohne DT-Behandlung mit einem Tier, dessen Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs depletiert wurden, zeigte sich ein kleineres Keimzentrum bei letzterem Tier. Innerhalb dieser Keimzentren konnten IgG⁺ Zellen nachgewiesen werden. Dabei führte die Depletion von Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs zu weniger IgG⁺ Zellen innerhalb der Keimzentren (Abb. 3.14D). Wie die Abbildungen 3.14E und F zeigen, ist diese verringerte Keimzentrumsreaktion womöglich darauf zurück zu führen, dass weniger follikuläre T_H-Zellen (CD4⁺ BCL-6⁺) im Keimzentrum vorhanden waren. Denn nach Depletion Langerin⁺ Zellen konnte nur eine reduzierte Anzahl an T_{FH}-Zellen im Keimzentrum nachgewiesen werden (59). Neben diesen CD4⁺ BCL-6⁺ T_H-Zellen waren auch BCL-6⁺ B-Zellen im Keimzentrum vorhanden (Abb. 3.14E). Bei diesen könnte es sich um proliferierende B-Zellen in der dunklen Zone des Keimzentrums (Zentroblasten) handeln.

Abbildung 3.14 zeigt, dass die verkleinerten Keimzentren, die bereits in Abbildung 3.13 nachgewiesen wurden, auf das Fehlen von follikulären T_H-Zellen zurück zu führen sein könnten. Des Weiteren waren deutlich weniger IgG⁺ Zellen bei Fehlen von Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs zu erkennen. Im Folgenden sollten die Keimzentren zusammen mit der Expression von membranständigem IgG bei Tieren 10 Tage nach der Infektion untersucht werden.

3.8.2 Das Keimzentrum nach Depletion von Langerin⁺ Zellen am Tag 10 nach einer Infektion

Wie bereits in Abbildung 3.13 gezeigt, ist die Größe von Keimzentren reduziert, wenn in den Lang-DTR-EGFP Tieren Langerhans Zellen oder Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs depletiert wurden (Abb. 3.15A und B). Auch konnte bereits dargestellt werden, dass am Tag 10 nach einer Infektion mit *L. major* Parasiten die Keimzentren nicht mehr unmittelbar am CR lokalisiert waren (vgl. Abb. 3.12A). Daher sollte ein Vergleich zwischen Tiere ohne DT-Behandlung und Tiere mit depletierten

Langerin⁺ Zellen durchgeführt werden. Von besonderem Interesse war dabei, wie sich Keimzentren darstellen, wenn ein Tier 10 Tage infiziert war.

Um am Tag 10 nach einer Infektion eine Depletion von Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs zu erreichen, bekamen die Tiere 7 Tage, 5 Stunden vor und 7 Tage nach der Infektion 1 µg DT injiziert. Von den entnommen Lymphknoten wurden serielle Schnitte angefertigt und diese auf die Proliferation und im speziellen die Keimzentrumsreaktionen hin untersucht.

Wie in den Abbildungen 3.15A und B gezeigt, war auch am Tag 10 nach einer Infektion mit Leishmanien die Größe des Keimzentrums reduziert. Wie bereits am Tag 6 (vgl. Abb. 3.15) stellte sich die Größe des Keimzentrums bei mit DT behandelten Tieren verringert dar, wie in Abbildung 3.16A und B gezeigt. Leishmanien-Antigen konnte bei beiden Ansätzen nicht mehr im Keimzentrum detektiert werden allerdings fand man es weiterhin im CR, wie die Abbildungen 3.15C und D zeigen. In Abbildung 3.15E sieht man, dass IgG⁺ Zellen in der hellen Zone des Keimzentrums, der dem subkapsulären Sinus zugewandten, vorhanden waren. Weiterhin konnte ein dichtes Aggregat an IgG⁺ Zellen bei DT unbehandelten Tieren in dem Areal zwischen Keimzentrum und T-Zellbereich deutlich dargestellt werden (Abb. 3.15E). Dabei zeigte sich im Vergleich der beiden Tiergruppen, dass eine Depletion zum Verlust von diesen IgG⁺ Zellen außerhalb des Keimzentrums führt (Abb. 3.15F). In der hellen Zone des Keimzentrums konnten auch bei Tieren ohne Langerin⁺ Zellen viele IgG⁺ Zellen nachgewiesen werden. Bei den IgG⁺ Zellen in Abbildung 3.15E könnte es sich um extrafollikuläre Plasmablasten, die niedrig affine Antikörper sezernieren, handeln.

Daher war es wichtig, die Tiere auf die verschiedenen Leishmanien-spezifischen Antikörper hin zu untersuchen.

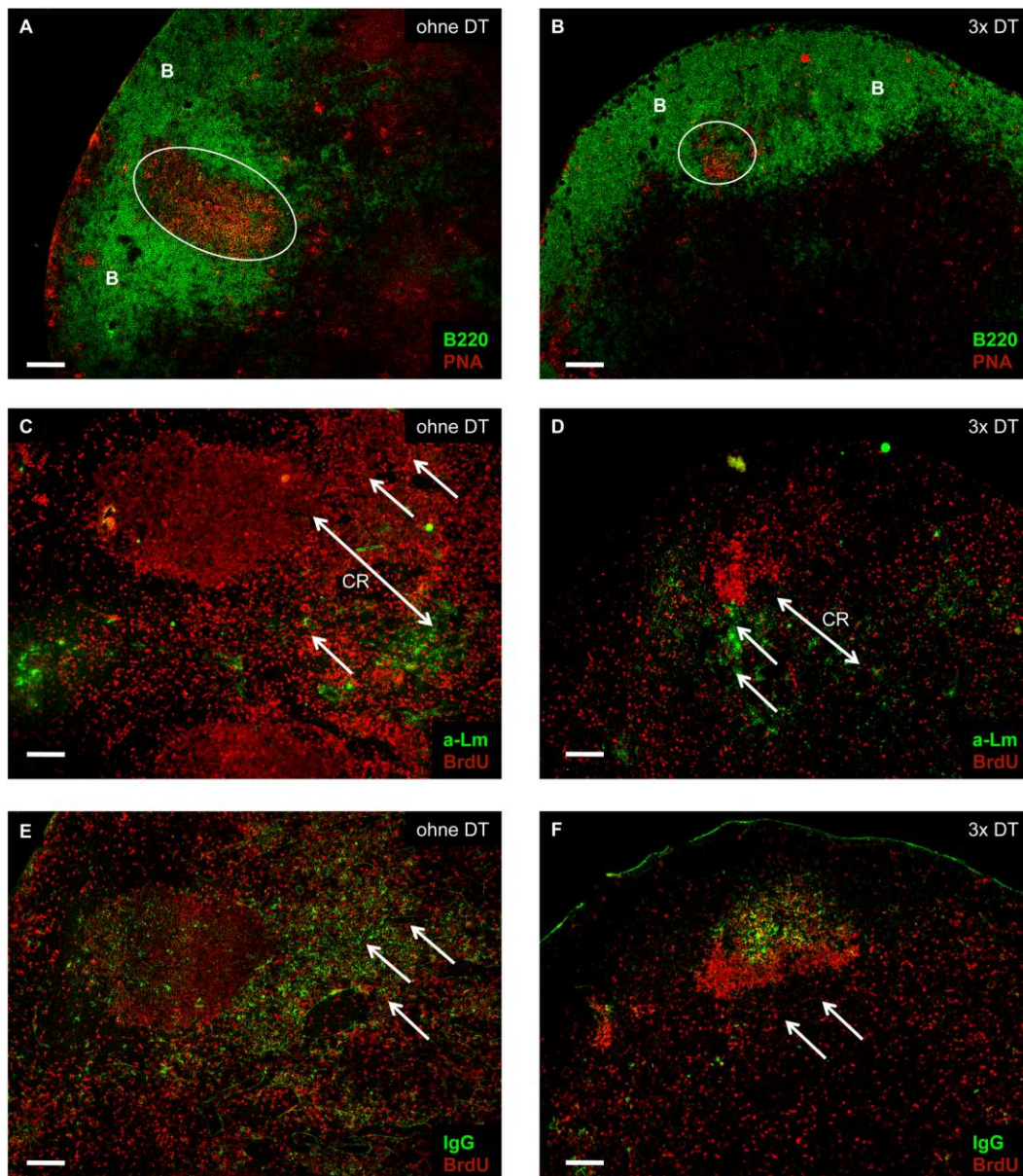


Abbildung 3.15: Charakterisierung von Keimzentren in poplitealen Lymphknoten am Tag 10 nach einer Leishmanien-Infektion von Lang-DTR-EGFP Tieren in Abhängigkeit von Langerin⁺ Zellen

Serielle Kryostatschnitte von Lymphknoten aus Tieren am Tag 10 nach Infektion wurden angefertigt. Dabei ist ein Vergleich von Tieren ohne DT-Behandlung (ohne DT) mit Tieren ohne Langerin⁺ Zellen (3x DT) dargestellt. (A) Deutlich zu erkennen sind die großen Keimzentren (PNA⁺, rot), angedeutet durch das Oval) in den B-Zell-Follikeln (B220⁺, grün), gekennzeichnet mit „B“. (B) Dargestellt ist ein Keimzentrum (PNA⁺, rot, angedeutet durch das Oval) im B-Zell-Follikel (B220⁺, grün). (C) Leishmanien-Antigen (a-Lm, grün) ist im CR (angedeutet durch den Doppelpfeil) detektierbar (hervorgehoben mit den Pfeilen), im Keimzentrum aber nicht. (F) Leishmanien-Antigen ist nur im CR (angedeutet durch den Doppelpfeil) nachweisbar, wie mit den Pfeilen hervorgehoben wurde. (G) IgG⁺ Zellen (grün) sind sowohl in der hellen Zone des Keimzentrums (BrdU⁺, rot) zu detektieren als auch außerhalb des Keimzentrums vorhanden, wie mit Pfeilen angedeutet. (H) Auch bei einer Maus, die mit DT behandelt wurde, sind IgG⁺ Zellen (grün) in der hellen Zone des Keimzentrums erkennbar. Wie die Pfeile aber zeigen, sind keine IgG⁺ Zellen außerhalb nachweisbar. Die Abbildung ist repräsentativ für 2 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente. (Maßstabsbalken: A-D: 100 µm; E-H: 50 µm).

3.9 Leishmanien-spezifische Immunglobuline

Da sowohl die Keimzentren durch die Depletion Langerin⁺ Zellen verkleinert sind (Abb. 3.13, 3.14 und 3.15) als auch weniger IgG⁺ Zellen innerhalb dieser Keimzentren nachweisbar sind, sollte untersucht werden, ob sich die reduzierte B-Zell-Antwort in der Maus in der Quantität von Immunglobulin im Serum widerspiegelt.

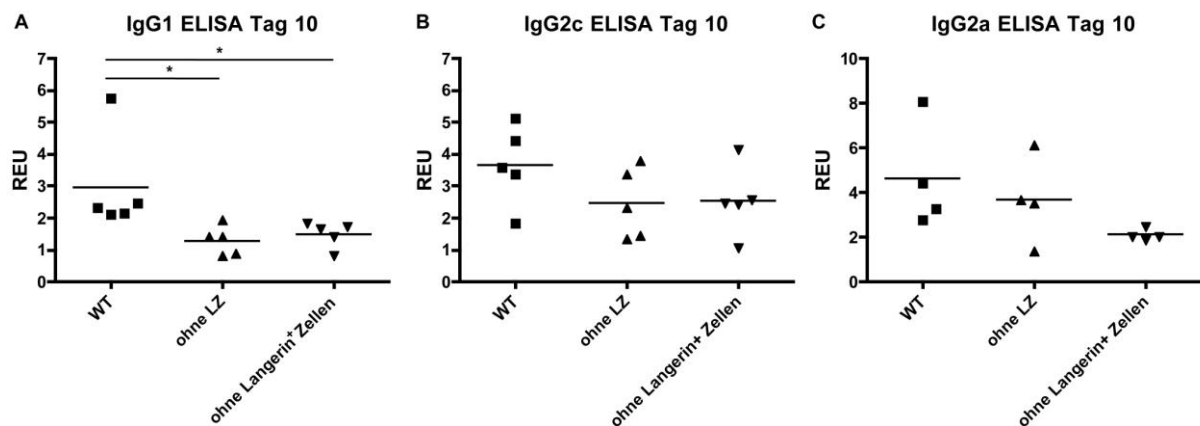


Abbildung 3.16: Charakterisierung Leishmanien-spezifischer IgG-Subtypen am Tag 10 einer Infektion

Aus dem Blut von infizierten Lang-DTR-EGFP Mäusen wurde Serum hergestellt und dieses auf Leishmanien-spezifische Antikörper mittels ELISA untersucht. Ein Vergleich von Lang-DTR-EGFP Mäusen ohne DT-Behandlung, Lang-DTR-EGFP Mäusen ohne Langerhans Zellen (LZ) und Lang-DTR-EGFP Mäusen ohne Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs (ohne Langerin⁺ Zellen) ist dabei in Abbildung 3.16 dargestellt. Der Quotient aus der OD der einzelnen Seren von infizierten Tieren mit der OD von nicht infizierten Tieren ergibt die hier gezeigten relativen ELISA-Einheiten (REU). (A) Die Depletion von Langerin⁺ Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion Leishmanien-spezifischer IgG1 Antikörper. (B) Für IgG2c zeigte sich keine signifikante Reduktion durch Depletion. (C) Auch Leishmanien-spezifisches IgG2a wurde durch Depletion nicht signifikant weniger produziert. Jeder Punkt repräsentiert ein Tier, dargestellt ist der Mittelwert. Da Tiere von 2 verschiedenen Experimenten untersucht wurden, wurde der one-way Anova verwendet, $p < 0,05$.

Pilotexperimente zeigten, dass ab Tag 6 nach Infektion Leishmanien-spezifische IgGs nachweisbar waren. Aufgrund dieser frühen Induktion wurde der Tag 10 als repräsentativer Tag für die IgG-Bestimmung herangezogen. Hierfür wurde Lang-DTR-EGFP Tieren, die 10 Tage in beide Hinterpfoten infiziert waren, retrobulbär Blut entnommen, daraus Serum hergestellt und dieses im ELISA untersucht. Um Langerhans Zellen zu depletieren, bekamen die entsprechenden Lang-DTR-EGFP Tiere DT injiziert, in diesem Experiment 7 Tage vor der Infektion 1 μ g DT sowie 7 Tage nach der Infektion. Tiere, bei denen Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs

depletiert werden sollten, bekamen 7 Tage und 5 Stunden vor der Infektion und 7 Tage nach der Infektion DT. Es wurde ein Quotient aus der jeweiligen OD der Seren von den infizierten Tieren und der Seren von naiven Tieren gebildet. Dies ergab wie in 2.2.1.8 in Material und Methoden beschrieben die relativen ELISA-Einheiten (REU) (89).

Es zeigte sich, dass eine DT-Behandlung zu einer signifikant reduzierten Produktion von Leishmanien-spezifischem IgG1-Immunglobulin führte (Abb. 3.16). Dazu wurden nicht DT-behandelte Tiere mit Tieren ohne Langerhans Zellen bzw. Tieren ohne Langerin⁺ Zellen verglichen. Für Leishmanien-spezifisches IgG2c konnte allerdings am Tag 10 nach einer Infektion keine Reduktion nachgewiesen werden (Abb. 3.16B). Deutlich war auch erkennbar, dass die Produktion von Leishmanien-spezifischen IgG2a verringert war, wenn bei Lang-DTR-EGFP Mäusen Langerin⁺ Zellen depletiert worden waren.

Die Feststellung, dass es durch die Depletion von Langerin⁺ Zellen zu einer verminderten Produktion von Leishmanien-spezifischen IgG1 kommt unterstreicht den Befund, dass in Tieren ohne Langerin⁺ Zellen weniger IgG⁺ Zellen nachgewiesen werden können. Denn kleinere Keimzentren führen eventuell zu einer geringeren Anzahl antikörpersezernierenden Plasmazellen, die aus IgG⁺ Zentrozyten der hellen Zone des Keimzentrums hervorgehen, und dies wiederum führt zumindest für Leishmanien-spezifisches IgG1 zu geringeren Mengen im Blut. Ob dies auf einer verminderten Affinitätsreifung beruht, sollte nachfolgend geklärt werden.

3.10 Genexpressionsanalysen

3.10.1 Genexpressionsanalyse von AID im ganzen Lymphknoten

Da am Tag 10 nach einer Infektion mit Leishmanien weniger Leishmanien-spezifisches IgG1 von Tieren ohne Langerin⁺ Zellen produziert wurde, sollte untersucht werden, ob dies an einer verminderten somatischen Hypermutation bzw. Isotypwechsel liegen kann. Dazu wurden Tiere subkutan mit Leishmanien in die Hinterpfote infiziert und am Tag 6 nach der Infektion die Lymphknoten entnommen. Aus den kompletten Lymphknoten wurde RNA isoliert und diese in cDNA

umgeschrieben. Das Enzym „*activation-induced cytidine deaminase*“ (AID) wird von B-Zellen im Keimzentrum exprimiert und ist essentiell für deren Isotypwechsel und die somatische Hypermutation hin zu Gedächtnis-B-Zellen und antikörpersezernierenden Plasmazellen (57). Daher wurde die cDNA auf die Expression von AID hin untersucht. Relativiert wurde die AID-Expression zum Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) entsprechend der delta ct Methode wie unter Punkt 2.2.3.6 in den Material und Methoden beschrieben.

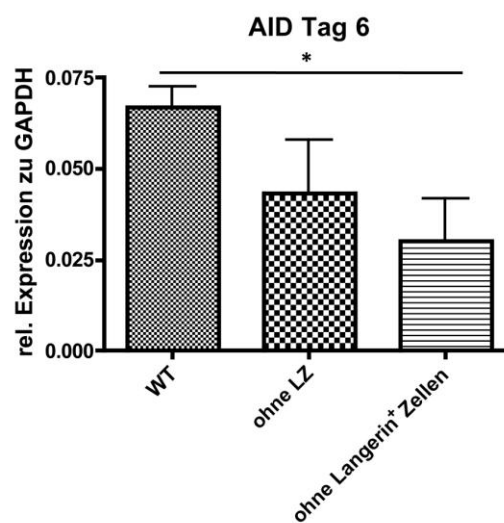


Abbildung 3.17: qPCR-Analyse der relativen Expression von AID-mRNA im poplitealen Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion mit Leishmanien

Aus den Zellen eines Lymphknotens von infizierten Lang-DTR-EGFP Mäusen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese auf die Expression von „*activation-induced cytidine deaminase*“ (AID) mittels qPCR hin untersucht. Dabei wurden Tiere ohne DT-Behandlung (WT), Tiere ohne Langerhans Zellen (LZ) und Tiere sowohl Langerin⁺ Zellen verglichen. (A) Die relative Expression von AID-mRNA am Tag 6 nach Infektion in Bezug zum Referenzgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Der Vergleich von Lang-DTR-EGFP Tieren (WT) zu Lang-DTR-EGFP Tieren ohne Langerin⁺ Zellen zeigt eine signifikante Reduktion der relativen Expression von AID-mRNA am Tag 6 nach Infektion. (n=3 Tiere). Angezeigt ist der Mittelwert mit den Standardabweichungen. Statistik: t-Test; $p < 0,05$.

Die Analyse der relativen Expression von AID zum Referenzgen zeigte, dass bei infizierten Tieren die Depletion aller Langerin⁺ Zellen zu einer signifikant reduzierten Expression der mRNA dieses Enzyms führte. Auch der Vergleich von Tieren ohne DT-Behandlung und Tieren, denen Langerhans Zellen fehlen, deutet auf eine reduzierte Expression von AID am Tag 6 nach Infektion hin (Abb. 3.17).

Abbildung 3.17 zeigt deutlich, dass bei Tieren ohne Langerhans Zellen bzw. Langerin⁺ Zellen die mRNA des Enzyms AID am Tag 6 nach einer Infektion vermindert exprimiert war. Da dieses Enzym sehr wichtig für den Isotypwechsel und die somatische Hypermutation ist, deutet es auf eine gestörte Entwicklung von antikörpersezernierender Plasmazellen hin. Da B-Zellen, die ein Keimzentrum bilden und in diesem Kompartiment proliferieren sowie eine Affinitätsreifung durchführen, Konjugate mit CD4⁺ T-Zellen bilden (57), sollten diese Konjugate näher untersucht werden.

3.10.2 Genexpressionsanalysen in B-Zellen

In Abbildung 3.17 konnte gezeigt werden, dass die Genexpression des Enzyms AID im gesamten Lymphknoten reduziert ist, wenn Langerin⁺ Zellen in den Tieren depletiert waren. Aktivierte B-Zellen bilden mit T_{FH}-Zellen stabile Konjugate während einer Infektion. Dies ermöglicht es diese Konjugate von nicht aktivierten B-Zellen durchflusszytometrisch zu separieren. Anschließend trennt man mit EDTA die Konjugate zu Einzelzellen auf und separiert sie nochmals (57). Lang-DTR-EGFP Mäuse wurden mit Leishmanien infiziert und am Tag 6 bzw. Tag 10 nach der Infektion die poplitealen Lymphknoten entnommen. Um die nötige Zellzahl zu erlangen, ist aus 4 Lymphknoten eine Einzelzellsuspension angefertigt worden. Diese Einzelzellen wurden auf CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen gefärbt und dann durchflusszytometrisch separiert. Aus den B-Zellen, die ein Konjugat gebildet hatten als auch aus nicht konjugierten B-Zellen wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Anschließend analysierte man die Genexpression von AID und BCL-6, einem für die Proliferation der B-Zellen im Keimzentrum wichtigem Transkriptionsfaktor, mit qPCR.

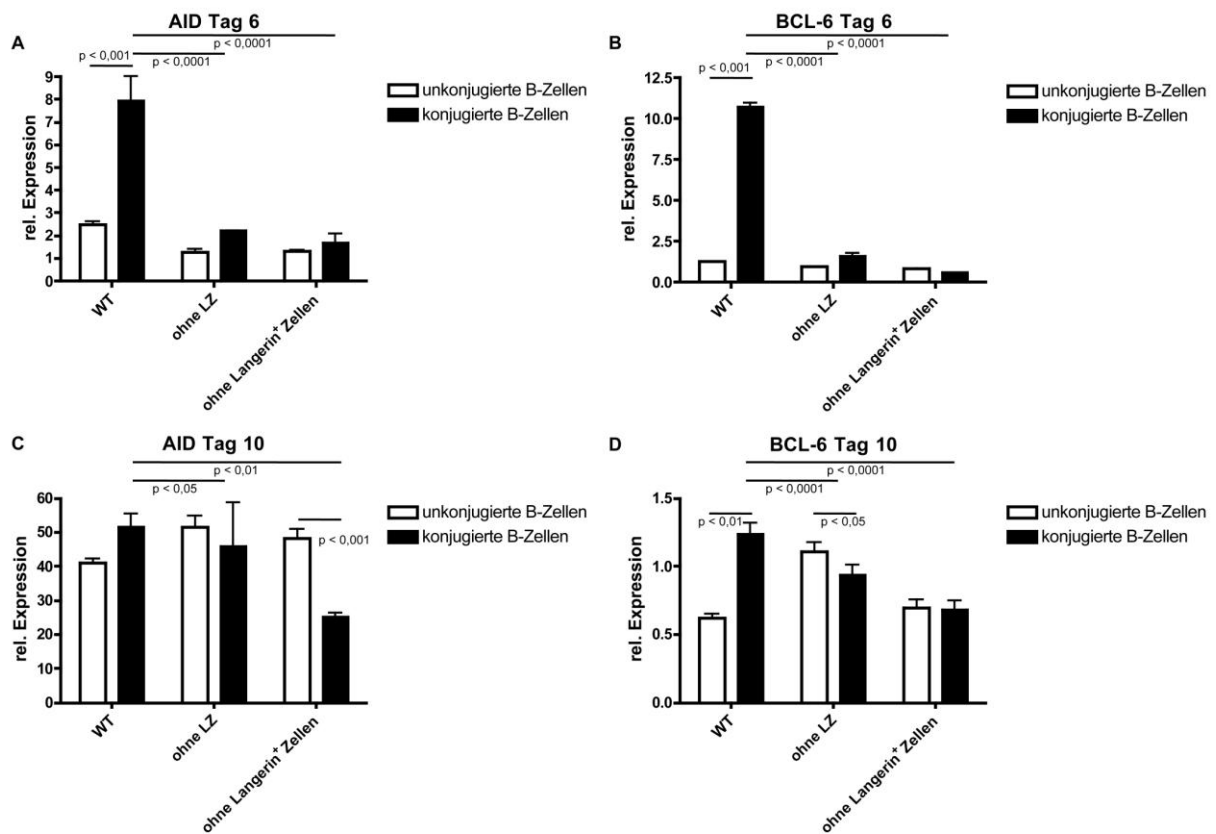


Abbildung 3.18: Expressionsanalysen von mRNA aus B-Zellen, die ein Konjugat mit CD4⁺ T-Zellen gebildet hatten

B-Zellen aus Lymphknoten von infizierten Lang-DTR-EGFP Tieren, mit oder ohne DT-Behandlung, wurden sortiert. Die B-Zellen sind durchflusszytometrisch in Zellen, die mit CD4⁺ T-Zellen konjugierte unkonjugierte separiert worden. Aus den sortierten Zellen wurde RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Daran anschließend durchgeführte Expressionsanalysen mit qPCR sind in Abbildung 3.18 dargestellt. Die Ergebnisse wurden auf die Expression der entsprechenden Gene in naiven B-Zellen relativiert. (A) Ergebnis einer qPCR für die Expression von AID-mRNA in B-Zellen aus Tieren, die 6 Tage infiziert waren. (B) Expressionsanalyse für BCL-6-mRNA in B-Zellen aus 6 Tage infizierten Tieren. (C) Relative Genexpression von AID in B-Zellen aus 10 Tage infizierten Tieren. (D) Relative BCL-6-mRNA Expression in B-Zellen aus Lymphknoten von Tieren, die 10 Tage infiziert waren. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von technischen Replikaten und repräsentieren eines von 3 unabhängigen Experimenten. Statistik: 2-way-Anova

Die Genexpression von AID war am Tag 6 nach einer Infektion in mit CD4⁺ T-Zellen konjugierten B-Zellen im Vergleich zu nicht konjugierten B-Zellen verstärkt (Abb. 3.18A). Der Vergleich der einzelnen Tiergruppen miteinander zeigt, dass nur in Tieren ohne DT-Behandlung AID-mRNA so stark exprimiert war (Abb. 3.18A). Bei Tieren mit DT-Behandlung zeigt sich kein Unterschied bzgl. der Expression von AID-mRNA zwischen konjugierten und nicht konjugierten B-Zellen. Am Tag 10 nach einer Infektion deuteten Genexpressionsanalysen darauf hin, dass bei mit DT unbehandelten, infizierten Tieren in den konjugierten B-Zellen weiterhin vermehrt AID

exprimiert wurde als in unkonjugierten B-Zellen. Bei Tieren ohne Langerin⁺ Zellen war dieser Befund umgekehrt, in den unkonjugierten B-Zellen war mehr AID-mRNA vorhanden. Der Vergleich zwischen den Tiergruppen, im Besonderen zwischen den zuvor mit CD4⁺ T-Zellen konjugierten B-Zellen, zeigte, dass mehr AID-mRNA bei infizierten Tieren exprimiert worden war wenn die Tiere kein DT injiziert bekommen hatten (Abb. 3.18C). Bei der Analyse der Expression von BCL-6-mRNA am Tag 6 nach Infektion zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die Expression von AID am Tag 6 (Abb. 3.18A und B). In B-Zellen von Tieren ohne DT-Behandlung war eine erhöhte Expression von BCL-6 in konjugierten B-Zellen gegenüber unkonjugierten nachzuweisen (Abb. 3.18B). Dieser Befund war in den beiden anderen Tiergruppen nicht vorhanden. Es zeigte sich jedoch, dass BCL-6-mRNA am stärksten in den konjugierten B-Zellen der Tiere exprimiert war, die nicht mit DT behandelt waren. Der Vergleich zwischen zuvor konjugierten und nicht konjugierten B-Zellen am Tag 10 ergab, dass bei DT-unbehandelten, infizierten Tieren die Expression von BCL-6-mRNA erhöht war (Abb. 3.18D). Bei Tieren ohne Langerhans Zellen zeigte sich dagegen, dass die Genexpression in konjugierten B-Zellen vermindert war gegenüber unkonjugierten. In Tieren ohne Langerin⁺ Zellen konnte sogar kein Unterschied in der Expression nachgewiesen werden. Ein Vergleich zwischen den 3 Tiergruppen untereinander bzgl. der konjugierten B-Zellen ergab, dass in Tieren ohne DT-Behandlung mehr BCL-6-mRNA exprimiert war (Abb. 3.18D).

Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, war am Tag 6 und 10 die Genexpression von AID und BCL-6 bei Tieren ohne DT-Behandlung in konjugierten B-Zellen erhöht. Der Vergleich zwischen den einzelnen Tiergruppen ergab, dass in konjugierten B-Zellen von mit DT unbehandelten, infizierten Tieren immer mehr mRNA der beiden untersuchten Gene exprimiert war als in den Tiergruppen mit DT-Behandlung.

Nachdem die B-Zellen auf Expressionsunterschiede zwischen konjugierten und nicht konjugierten Zellen untersucht wurden, sollten nachfolgend auch CD4⁺ T-Zellen auf eventuell vorhandene Unterschiede hin analysiert werden. Besonders interessant dabei war, ob CD4⁺ T-Zellen, die ein Konjugat mit B-Zellen gebildet hatten, BCL-6 exprimierten, bzw. ob eine veränderte Expression von BCL-6 nachweisbar war bei Depletionsexperimenten.

3.10.3 Genexpressionsanalysen in CD4⁺ T-Zellen

Da die Abbildungen 3.17 und 3.18 darauf hinweisen, dass die Affinitätsreifung von B-Zellen im Keimzentrum bei Tieren ohne Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs gestört ist, sollten mögliche Ursachen untersucht werden. Damit B-Zellen eine Affinitätsreifung durchführen können, benötigen sie Zytokine, z. B. IL-4, von T_{FH}-Zellen. Diese T_{FH}-Zellen bilden mit den entsprechenden, proliferierenden B-Zellen stabile Konjugate (57). Die Konjugate, die sowohl positiv für T-Zellmarker wie CD4 als auch für B-Zellmarker wie CD19 sind, können laut Reinhardt *et al.* mittels Durchflusszytometrie von anderen im Lymphknoten vorhandenen Zellen separiert und anschließend mit EDTA getrennt werden. Um die nötige Zellzahl zu erreichen wurden im Rahmen dieser Arbeit die Lymphozyten von 4 infizierten Lymphknoten jeweils vereinigt. Nach dem ersten Sortierschritt wurde aus den T-Zellen und B-Zellen, die keine Konjugate gebildet hatten, RNA isoliert. Die Konjugate wurden wie unter 2.2.1.7 in den Material und Methoden beschrieben aufgelöst und im Durchflusszytometer in die beiden distinkten Zellpopulationen separiert. Aus diesen Zellen wurde ebenfalls die RNA isoliert. Mit der aus der RNA umgeschriebenen cDNA erfolgten Expressionsanalysen verschiedener Gene durch qPCR. Da BCL-6 nur in T_{FH}-Zellen exprimiert werden sollte, erlaubt die Genexpressionsanalyse für BCL-6 und BLIMP-1 eine Unterscheidung zwischen CD4⁺ T_{FH}-Zellen und anderen CD4⁺ T-Zellsubpopulationen. Außerdem sollte der Vergleich zwischen Tieren ohne DT-Behandlung und Tieren, denen entweder Langerhans Zellen bzw. Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs fehlten, zeigen, ob die verminderte Keimzentrumsreaktion auf eine unvollständige Induktion der T_{FH}-Zellen zurück zu führen ist.

In Abbildung 3.19 sind repräsentative Ergebnisse von Genexpressionsanalysen von CD4⁺ T-Zellen bzgl. der beiden Transkriptionsfaktoren BCL-6 und BLIMP-1 dargestellt. Dabei konnte für die Genexpression von BCL-6 nachgewiesen werden, dass diese bei allen 3 Tiergruppen in den zuvor mit B-Zellen konjugierten CD4⁺ T-Zellen vermehrt exprimiert war. Dies konnte sowohl für Tag 6 als auch Tag 10 nach Infektion nachgewiesen werden. Ein Vergleich der konjugierten CD4⁺ T-Zellen aus den 3 Tiergruppen untereinander zeigt, dass sowohl am Tag 6 als auch 10, BCL-6-mRNA in Tieren ohne Langerhans Zellen am stärksten exprimiert war (Abb. 3.19A und C).

Analysen der Expression von BLIMP-1-mRNA weisen dagegen darauf hin, dass für dieses Gen keine Expressionsunterschiede sowohl am Tag 6 als auch 10 vorhanden waren. Weder ein Vergleich der konjugierten mit nicht konjugierten CD4⁺ T-Zellen innerhalb der 3 Tiergruppen noch ein Vergleich zwischen den Gruppen zeigt deutliche Unterschiede (Abb. 3.19B und C).

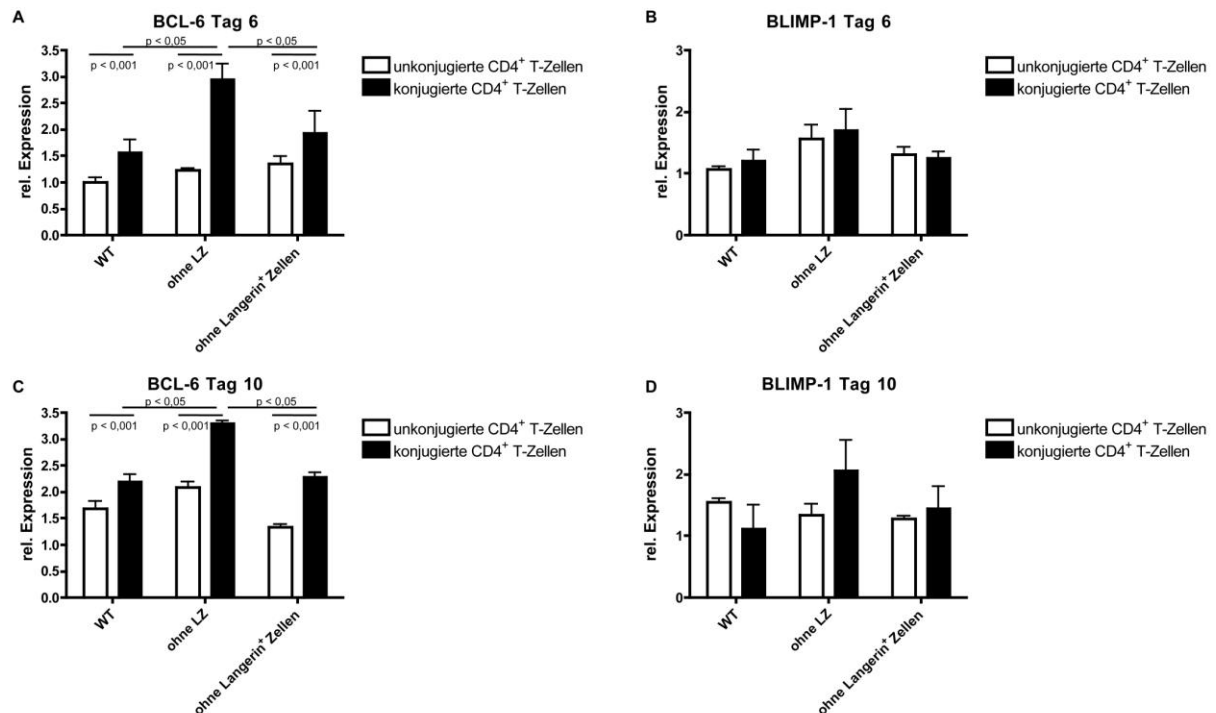


Abbildung 3.19: Expressionsanalysen von mRNA aus CD4⁺ T-Zellen, die ein Konjugat mit B-Zellen gebildet hatten

Lymphozyten wurden in CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen und doppelpositiven Zellen mit einem Durchflusszytometer sortiert. Die aufgelösten Konjugate wurden ebenfalls in CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen separiert. Aus den CD4⁺ T-Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und auf die Expression verschiedener Gene mit qPCR analysiert. Die Ergebnisse sind auf die Expression des jeweiligen Gens in CD4⁺ T-Zellen aus naiven Tieren relativiert worden (delta delta ct Methode). Verglichen wurden die Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten von Lang-DTR-EGFP Tieren, ohne DT-Behandlung (WT) und bei denen Langerhans Zellen (ohne LZ) bzw. alle Langerin⁺ Zellen depletiert waren. (A) Expressionsanalyse des Transkriptionsfaktors BCL-6 am Tag 6 nach Infektion. (B) Untersuchung der Genexpression von BLIMP-1 in CD4⁺ T-Zellen 6 Tage nach Infektion. (C) Expressionsanalyse von BCL-6-mRNA in CD4⁺ T-Zellen aus den verschiedenen behandelten Tieren am Tag 10. (D) Analyse der BLIMP-1 Expression am Tag 10 nach Infektion in CD4⁺ T-Zellen. Angegeben sind die Mittelwerte der technischen Triplikate und die jeweilige Standardabweichung. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Experimente.

Wie in Abbildung 3.19 dargestellt, waren BCL-6 jeweils in zuvor mit B-Zellen konjugierten CD4⁺ T-Zellen stärker exprimiert als in unkonjugierten T-Zellen. Weiterhin zeigte sich, dass ein Vergleich der konjugierten CD4⁺ T-Zellen zwischen

den einzelnen Tiergruppen ergibt, dass BCL-6-mRNA am höchsten in Tieren ohne Langerhans Zellen exprimiert war (Abb. 3.19A und C). Deswegen sollte im Folgenden die Qualität der gebildeten T_{FH}-Zellen genauer analysiert werden.

3.10.4 Analyse der Expression von IL-4-mRNA in CD4⁺ T-Zellen

Reinhardt *et al.* konnten zeigen, dass alle IL-4 produzierenden CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten nach einer Leishmanien-Infektion T_{FH}-Zellen sind. Da, wie in Abbildung 3.19 dargestellt, Genexpressionsunterschiede zwischen CD4⁺ T-Zellen, die ein Konjugat mit B-Zellen gebildet hatten, und nicht konjugierten T-Zellen nachgewiesen werden konnten, sollte die Expression von IL-4-mRNA in CD4⁺ T-Zellen untersucht werden.

CD4⁺ T-Zellen wurden aus Lymphknoten von 6 bzw. 10 Tage infizierten Tieren isoliert. Nach 2 durchflusszytometrischen Schritten hatte man CD4⁺ T-Zellen, die mit B-Zellen und welche, die nicht mit B-Zellen konjugiert waren. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit qPCR die Genexpression von IL-4 untersucht.

Eine Analyse der CD4⁺ T-Zellen aus Lymphknoten von Tieren ohne DT-Behandlung zeigt, dass zuvor mit B-Zellen konjugierte T-Zellen stärker IL-4-mRNA exprimierten als unkonjugierte T-Zellen. Dieser Befund war bei Tieren mit DT-Behandlung nicht vorhanden, dort deuteten die Genexpressionsanalysen sogar darauf hin, dass in den konjugierten CD4⁺ T-Zellen weniger IL-4 vorhanden war als in den unkonjugierten CD4⁺ T-Zellen. Des Weiteren zeigt ein Vergleich der konjugierten CD4⁺ T-Zellen zwischen den Tiergruppen, dass IL-4-mRNA nur bei mit DT unbehandelten, infizierten Tieren erhöht exprimiert worden war (Abb. 3.20A).

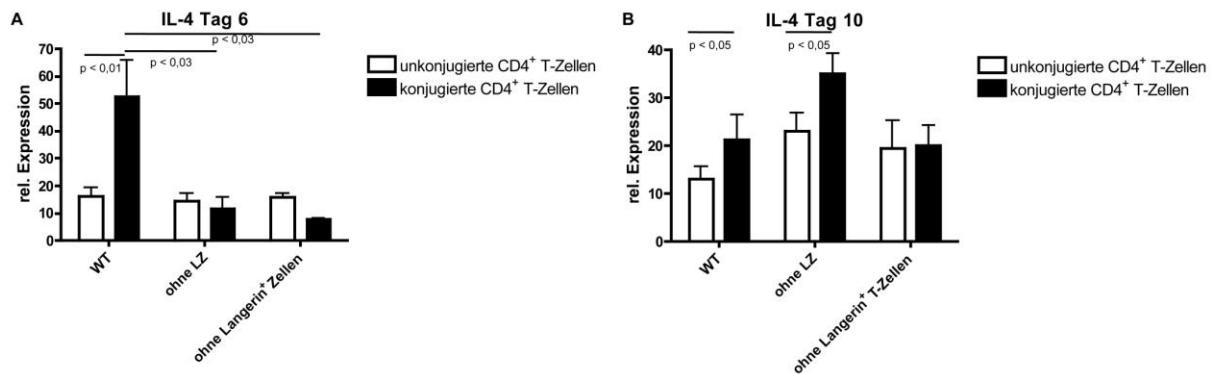


Abbildung 3.20: Genexpressionsanalysen von IL-4 in CD4⁺ T-Zellen aus den poplitealen Lymphknoten am Tag 6 und 10 nach Infektion

Aus allen Lymphozyten wurden wie bei Abbildung 3.18 beschrieben CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen separiert und die vorhandenen Konjugate aus T-Zellen und B-Zellen aufgetrennt und in einem weiteren durchflusszytometrischen Schritt aufgeteilt. Aus den CD4⁺ T-Zellen wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer qPCR die Genexpression von IL-4 analysiert. Die Expression von Zellen aus infizierten Tieren wurde zu der in CD4⁺ T-Zellen aus nicht infizierten Tieren relativiert. Dabei wurden Lymphknoten von Lang-DTR-EGFP Mäusen verwendet, die entweder kein DT injiziert bekamen, bzw. von welchen, bei denen Langerhans Zellen bzw. Langerin⁺ Zellen depletiert waren. (A) Genexpression von IL-4 in CD4⁺ T-Zellen am Tag 6 nach einer Infektion. (B) Analyse der IL-4-mRNA 10 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien. Dargestellt sind die Mittelwerte der technischen Triplikate und die entsprechenden Standardabweichungen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 3 voneinander unabhängig durchgeführte Experimente.

Die Analyse von Lymphozyten aus Tieren, die 10 Tage infiziert waren zeigt, dass IL-4-mRNA in CD4⁺ T-Zellen verstärkt exprimiert wurde, wenn die Tiere entweder kein DT injiziert worden war bzw. wenn den Tieren nur Langerhans Zellen fehlten (Abb. 3.20B). Bei Tieren ohne Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs ergab eine quantitative Analyse der IL-4-mRNA dagegen, dass die Expression zwischen unkonjugierten CD4⁺ T-Zellen und konjugierten gleich war.

Mittels Durchflusszytometrie sollten im Folgenden die CD4⁺ T-Zellen weiter untersucht werden, im speziellen die Anzahl an CD4⁺ T-Zellen in gesamten poplitealen Lymphknoten.

3.11 Die Anzahl CD4⁺ T-Zellen in infizierten Lymphknoten in Abhängigkeit von Langerin⁺ Zellen

Nachdem in Abbildung 3.10 gezeigt werden konnte, dass CD4⁺ T-Zellen im CR die dominante T-Zellpopulation darstellen, wurde deren Anzahl in Abhängigkeit von Langerin⁺ Zellen bestimmt.

Dafür wurden Lang-DTR-EGFP Mäuse subkutan mit Leishmanien infiziert. Um Proliferationsanalysen durchführen zu können, bekamen die Tiere für die letzten 3 Tage bis zur Organentnahme 0,8 mg/ml BrdU über das Trinkwasser. Am Tag 6 bzw. 10 wurden die Haut-drainierenden Lymphknoten entnommen. Aus den Lymphknoten angefertigte Einzelzellsuspensionen, wie in 2.2.1.7 in den Material und Methoden beschrieben, wurden gegen entsprechende Zellmarker bzw. BrdU gefärbt. Um bei der Analyse die während des Färbeprozesses verlorenen Zellen zurück rechnen zu können, sind jeder Färbung eine definierte Anzahl Latexkugeln zugefügt worden. Damit kann man die Anzahl der Zellen einer Population im gesamten Lymphknoten berechnen (siehe 2.2.1.7 in Material und Methoden).

In Abbildung 3.21A ist stellvertretend die Auswertestrategie einer durchflusszytometrischen Analyse dargestellt. Dabei wurden anhand der Zellgröße und der Granularität die Zellen bestimmt. Daneben erlaubte die geringere Größe der Latexkugeln von Zellen abzugrenzen. Die Zellen konnten anschließend anhand verschiedener Marker weiter unterschieden werden. Wie die Punktauftragung rechts in Abbildung 3.21.A zeigt, wurden hier CD4⁺ T-Zellen auf der x-Achse aufgetragen, BrdU⁺ Zellen auf der y-Achse. Innerhalb dieser Auftragung konnten somit die CD4⁺ Zellen bestimmt werden. Die Anzahl der CD4⁺ T-Zellen am Tag 6 nach einer Infektion mit Leishmanien im gesamten Lymphknoten änderte sich nicht, wenn Langerhans Zellen bzw. Langerin⁺ Zellen zuvor durch die Gabe von 1 µg DT depletiert worden waren (Abb. 3.21B). Dies zeigte sich auch für BrdU⁺ CD4⁺ T-Zellen (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zu einem mit DT unbehandeltem Tier, zeigte sich, dass die CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten wie erwartet im Infektionsverlauf zugenommen hatten (Abb. 3.21B). Am Tag 10 nach einer Infektion kann ebenfalls

kein Unterschied in der Anzahl $CD4^+$ T-Zellen in gesamten Lymphknoten nachgewiesen werden. Dies gilt für den Vergleich aller 3 Tiergruppen zueinander.

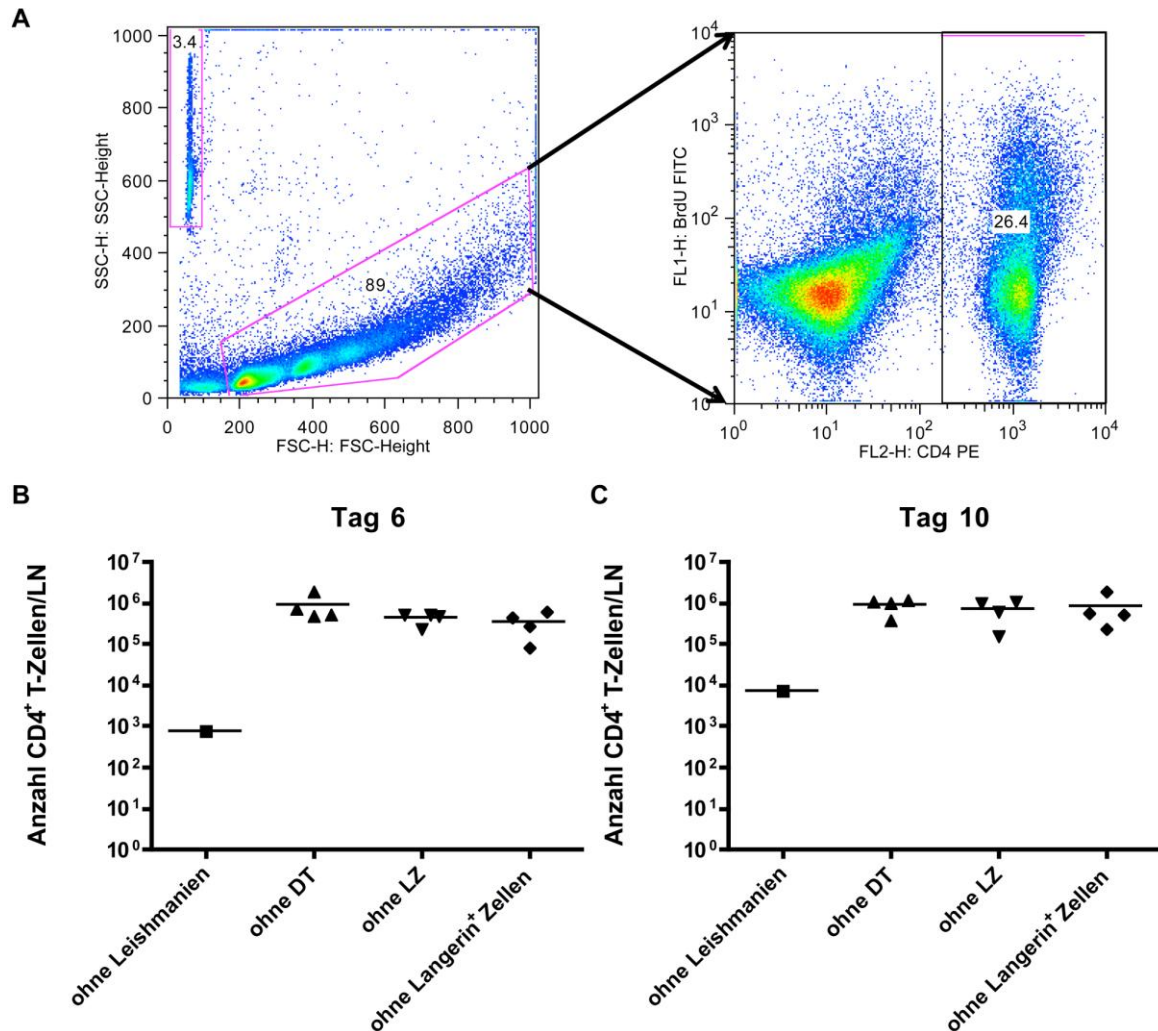


Abbildung 3.21: Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl von $CD4^+$ T-Zellen in poplitealen Lymphknoten am Tag 6 und 10 nach einer Infektion

Lang-DTR-EGFP Mäuse wurden für 6 bzw. 10 Tage subkutan mit Leishmanien infiziert. Abbildung 3.21 zeigt den Vergleich von Tieren ohne DT-Behandlung, ohne Langerhans Zellen und ohne Langerin⁺ Zellen. Als Kontrolle dienten Lang-DTR-EGFP Tiere, die weder infiziert noch mit DT behandelt waren. Aus den entnommenen Lymphknoten wurden Einzelzellsuspensionen angefertigt und mit anti- $CD4$ Antikörper gefärbt, sowie gegen BrdU, um proliferierte Zellen detektieren zu können. (A) Zuerst wurden anhand der Größe und ihrer Granularität Zellen sowie die Latexkugeln definiert. Anschließend konnten innerhalb der Zellen die $CD4^+$ T-Zellen bestimmt werden, indem man $CD4^+$ T-Zellen gegenüber BrdU⁺ Zellen darstellte. Alle Zellen im rechten Viereck sind $CD4^+$ T-Zellen. (B) Das Diagramm zeigt die Anzahl der $CD4^+$ Zellen, ggf. auch Lymphozyten, im gesamten Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion. (C) Dargestellt ist die Anzahl $CD4^+$ Lymphozyten in gesamten Lymphknoten am Tag 10. Jeder Punkt repräsentiert in (B) und (C) ein Tier. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 5 von einander unabhängig durchgeführte Experimente.

Abbildung 3.21 zeigt, dass die Behandlung mit DT bei Lang-DTR-EGFP Tieren zu keiner Veränderung der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen führte. Wie in Abbildung 3.14 histologisch dargestellt, war die Größe von Keimzentren reduziert, wenn Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs während einer Infektion fehlten. Daher sollte die Proliferation der B-Zellen im Lymphknoten durchflusszytometrisch analysiert werden.

3.12 Die B-Zellproliferation in Haut-drainierenden Lymphknoten nach einer Infektion mit *L. major* Parasiten

Da die Abbildungen 3.14 und 3.15 zeigen, dass nach einer selektiven Depletion von Langerhans Zellen bzw. aller Langerin⁺ Zellen die Größe der Keimzentren reduziert war, sollte untersucht werden, ob sich die Anzahl proliferierender B-Zellen im kompletten Lymphknoten nach einer Depletion verändert. Dafür wurden Lang-DTR-EGFP Mäuse mit und ohne DT-Behandlung für 6 und 10 Tage mit Leishmanien infiziert. Um proliferierte Zellen nachweisen zu können, bekamen die Tiere über den Zeitraum von 3 Tagen vor Ende des Versuchs 0,8 mg/ml BrdU über das Trinkwasser. Aus den entnommenen poplitealen Lymphknoten sind Einzelzellsuspensionen angefertigt und im Durchflusszytometer analysiert worden. Den Tieren wurde 7 Tage vor der Infektion 1 µg DT i. p. injiziert. Sollten nur Langerhans Zellen depletiert werden, wurde entsprechenden Tieren 7 Tage nach der Infektion nochmals DT injiziert. Zur Depletion von Langerhans Zellen und Langerin⁺ Zellen bekamen die Tiere 7 Tage und 5 Stunden vor der Infektion eine Injektion von DT und entsprechend 7 Tage später nochmals.

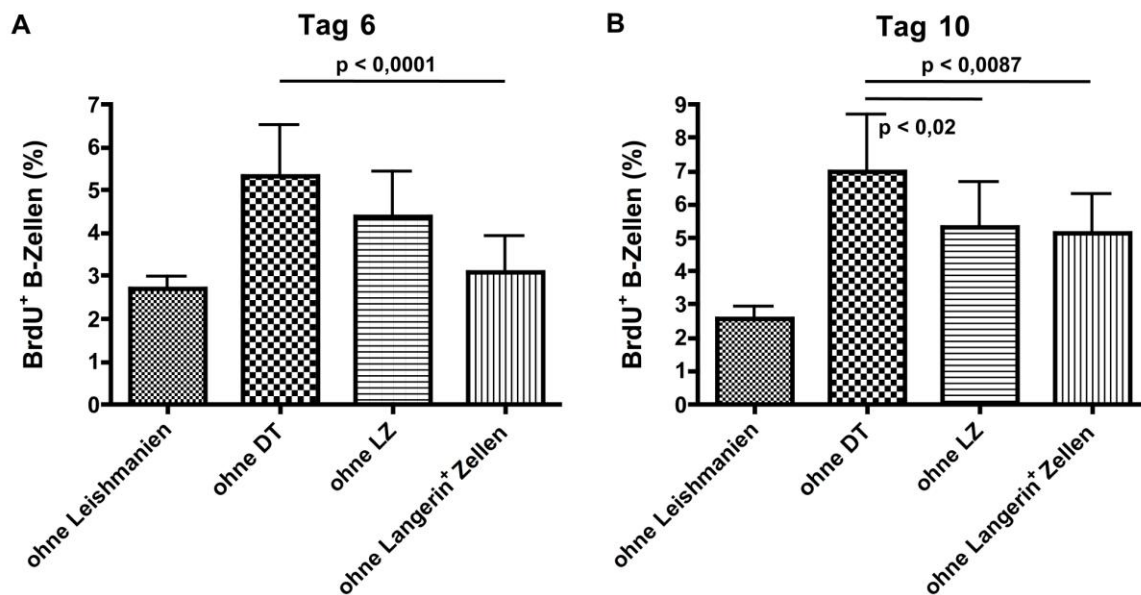


Abbildung 3.22: Durchflusszytometrische Analyse der prozentualen Anzahl BrdU⁺ B-Zellen in poplitealen Lymphknoten 6 und 10 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien

Lang-DTR-EGFP Mäuse, ohne DT-Behandlung (ohne DT), ohne Langerhans Zellen (ohne LZ) und ohne Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs (ohne Langerin⁺ Zellen), wurden 6 bzw. 10 Tage nach Infektion die poplitealen Lymphknoten entnommen. Über einen Zeitraum von 3 Tagen vor der Organentnahme bekamen die Tiere BrdU mit dem Trinkwasser. Aus diesen Lymphknoten wurden Einzelzellsuspensionen angefertigt und diese mit anti-B220 Antikörper (B-Zellen) und anti-BrdU Antikörper gefärbt. (A) Das Diagramm zeigt die prozentuale Anzahl BrdU⁺ B-Zellen in Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion bzw. in nicht infizierten Tieren (ohne Leishmanien). (B) Dargestellt sind die BrdU⁺ B-Zellen in Haut-drainierenden Lymphknoten am Tag 10 nach einer Infektion in nicht infizierten Tieren sowie in Tieren ohne DT-Behandlung und in DT behandelten Tieren. In (A) sind bei „ohne Leishmanien“ der Mittelwert und die Standardabweichung von 5 Tieren, bei den infizierten Tieren sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 10 Tieren gezeigt. In (B) sind die Mittelwerte und Standardabweichung von 4 Tieren bei nicht infizierten Tieren dargestellt, bei den infizierten sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichung von 11 Tieren dargestellt. Statistik: t-Test.

Es zeigte sich, dass BrdU⁺ B-Zellen am Tag 6 nach einer Infektion signifikant reduziert waren, wenn alle Langerin⁺ Zellen depletiert worden waren. Abbildung 3.22A deutet sogar darauf hin, dass am Tag 6 nach Infektion die prozentuale Anzahl der proliferierten B-Zellen zwischen Tieren ohne Langerin⁺ Zellen und naiven Tieren gleich war. Am Tag 10 zeigt der Vergleich zwischen den Tiergruppen, dass eine DT-Behandlung zu einer reduzierten B-Zellproliferation führt. Die B-Zellproliferation war sowohl bei i) Tieren ohne Langerhans Zellen als auch ii) ohne Langerin⁺ Zellen signifikant reduziert (Abb. 3.22B).

Die Depletion von Langerin⁺ Zellen führte sowohl am Tag 6 als auch am Tag 10 nach einer Infektion zu einer reduzierten B-Zellproliferation. Da es innerhalb von Keimzentren zu einer massiven Proliferation von B-Zellen kommt, die Größe dieser Keimzentren allerdings verringert war, wenn Langerin⁺ Zellen fehlten (vgl. Abbildungen 3.14 und 3.15), deuten auch die in Abbildung 3.22 dargestellten Ergebnisse darauf hin, dass die B-Zellantwort durch das Fehlen Langerin⁺ Zellen reduziert ist. Wie Abbildung 3.16 zeigt, konnte eine verminderte Menge an IgG1-Immunglobulin nach Depletion von Langerin⁺ Zellen nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Befunde sollte nachfolgend analysiert werden, ob die verminderte Anzahl an proliferierten B-Zellen zu weniger IgG1-Immunglobulin führte, oder ob eine Veränderung der Qualität nachzuweisen sei.

3.13 Analyse der Qualität Leishmanien-spezifischer IgG1-Immunglobuline

Am Tag 10 nach einer Infektion kommt es zu einer signifikant reduzierten Produktion von Leishmanien-spezifischen IgG1 Antikörpern, wenn Langerin⁺ Zellen depletiert waren. Daher sollten neben der Quantität auch die Qualität der Antikörper bzgl. ihrer Avidität untersucht werden. Die Avidität ist die Summe aller Affinitäten, d. h. Bindungsstärken, eines monoklonalen Antikörpers.

Dafür wurden Lang-DTR-EGFP Mäuse mit Leishmanien infiziert. Tiere ohne DT-Behandlung wurden mit Tieren verglichen, die 7 Tage und 5 Stunden vor der Injektion der Leishmanien 1 µg DT i. p. injiziert bekommen hatten. Um eine Repopulation von Langerin⁺ Zellen zu verhindern, bekamen die Tiere alle weiteren 7 Tage DT injiziert. Da allerdings Langerin⁺ dDCs bereits 4 Tage nach DT-Gabe teilweise wieder vorhanden sind (26), kann bei diesem Experiment nur von einer vollständigen Depletion der Langerhans Zellen ausgegangen werden. Aufgrund ihrer Repopulation nach DT-Gabe waren Langerin⁺ dDCs teilweise wieder vorhanden. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde den Tieren vor der zervikalen Dislokation retrobulbär unter Anästhesie Blut entnommen. Das aus diesem Blut hergestellte Serum wurde für den Aviditäts-ELISA verwendet. Die Auswertung dieses ELISA erfolgte wie unter 2.2.1.8 in den Material und Methoden beschrieben (90).

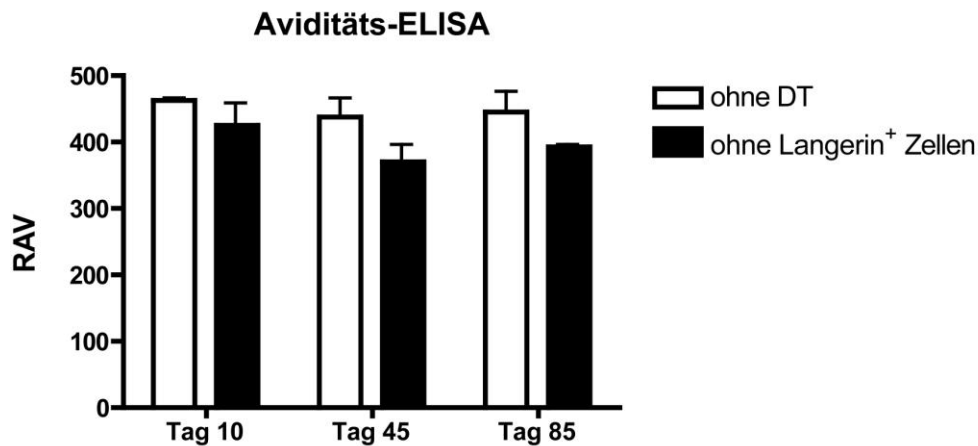


Abbildung 3.23: Bestimmung der Avidität von Leishmanien-spezifischen IgG1 im Serum von infizierten Lang-DTR-EGFP Mäusen

Mit Leishmanien infizierten Lang-DTR-EGFP Mäusen wurde retrobulbär Blut entnommen und in dem daraus hergestellten Seren mittels ELISA die Avidität der Leishmanien-spezifischen IgG1-Antikörper bestimmt. In Abbildung ist der Vergleich von mit DT behandelten und unbehandelten Tieren gezeigt. Wie unter 2.2.1.8 in den Material und Methoden beschrieben wurde der RAV (*relative affinity value*) gebildet. Es wurden Seren in der sehr frühen Phase der Infektion sowie Seren in der abklingenden Phase an Tag 45 und 85 untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte und die entsprechenden Standardabweichungen der technischen Replikate. Die Daten sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

Es zeigte sich, dass sich die Seren von Tieren ohne DT-Behandlung mit denen von Tieren ohne Langerin⁺ Zellen im Laufe einer Immunantwort gegen *L. major* Parasiten nicht nur in der Menge von produzierten IgG1-Immunglobulin unterschieden (vgl. Abb 3.16), sondern dass Tiere ohne Langerhans Zellen auch IgG1 Antikörper mit einer geringeren Avidität produzierten (Abb. 3.23). Am Tag 10 deutet Abbildung 3.23 darauf hin, dass geringe Unterschiede bzgl. der Avidität zwischen Tieren mit und welchen ohne Langerhans Zellen vorhanden waren. 45 Tage nach einer Infektion zeigt sich, dass die RAV-Werte vergleichbar mit denen an Tag 10 waren, was dafür spricht, dass sich Antikörper, die in den ersten 10 Tagen nach einer Infektion gebildet worden sind sich in der Avidität nicht von Antikörpern zu späteren Zeitpunkten unterscheiden. Dies gilt aufgrund der ähnlichen RAV-Werte auch für noch spätere Zeitpunkte, wie am Tag 85 nach Infektion. Auch wird am Tag 45 der Unterschied zwischen Tieren ohne Langerhans Zellen und mit DT unbehandelten, infizierten Tieren deutlicher bzgl. der Avidität. 85 Tage nach einer Infektion, ein Zeitpunkt, an dem die Fussdicke bei infizierten Tieren bereits abschwilt, was auf eine abklingende

Immunantwort und damit einhergehend erfolgreiche Bekämpfung des Erregers hindeutet, zeigt sich ein tendenziell größerer Unterschied in der Avidität der IgG1-Immunglobuline zwischen Tieren ohne DT-Behandlung und Tieren ohne Langerin⁺ Zellen.

Abbildung 3.23 zeigt, dass die während einer Leishmaniose produzierten IgG1-Immunglobuline eine geringere Avidität besaßen, wenn Langerhans Zellen über den Verlauf des Experiments depletiert wurden. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die in der frühen Phase der Infektion produzierten Antikörper keinen qualitativen Unterschied zu denen in der späten Phase aufweisen. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass ein Fehlen Langerin⁺ Zellen zu einer verminderten B-Zellproliferation (Abb. 3.22) führt. Einhergehend mit diesem Befund sind die Keimzentren bei. Dies bedeutet, dass nicht nur die Quantität sondern auch die Qualität (Abb. 3.23) der Immunglobuline betroffen ist.

4. Diskussion

Für eine erfolgreiche Immunantwort und der damit verbundenen Eliminierung des obligat intrazellulären Parasiten *L. major* ist eine T_H1 -Antwort unerlässlich. Diese Immunantwort wird nach momentanen Wissensstand in den Lymphknoten induziert, die die infizierte Haut drainieren (24). Um die Parasiten erfolgreich eliminieren zu können bedarf es einer T_H1 -Antwort, jedoch zeigen Infektionen von B-Zelldefizienten Tieren, dass ein Fehlen einer humoralen Immunantwort zu verstärkten Symptomen, wie vergrößerte Hautläsionen, führt (86, 87).

Die murine Haut, der Ort der Injektion im experimentellen Modell der Leishmaniose, verfügt über ein dichtes immunologisches Netzwerk, das verschiedene DC-Subtypen enthält. Nämlich den Langerhans Zellen in der Epidermis der Haut. Des Weiteren sind in der Dermis $Langerin^+$ und $Langerin^-$ DCs vorhanden. Bezüglich dieser verschiedenen Subtypen weiß man bisher, dass $Langerin^+$ dDCs wichtig für die Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen sind und $Langerin^-$ dDCs für die Induktion von $CD4^+$ T-Zellen (5). Für die Induktion einer humoralen Immunantwort während einer Infektion sind ebenfalls DCs wichtig, wobei der Phänotyp dieser DC-Population bisher nicht geklärt wurde (57). In den Lymphknoten wurde im Grenzbereich zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel ein gefäßreiches dichtes Netzwerk retikulärer Fibroblasten beschrieben, von dem man annimmt, dass innerhalb dieser Zone eine adaptive Immunantwort induziert wird (33).

In dieser Arbeit wurde der CR als potentielle immunologische Plattform für die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort mit Hilfe des Lang-DTR-EGFP-Mausmodells untersucht. Des Weiteren wurde mit Hilfe des erwähnten Mausmodells untersucht, welcher 3 erwähnten Subtypen an kutanen dendritischen Zellen für die Induktion einer T_{FH} -Zell-vermittelten Immunantwort notwendig ist.

4.1 DT-induzierte Zelldepletion in Lang-DTR-EGFP Mäusen

Zunächst sollen die Stärken und Schwächen des in der Arbeit verwendeten Tiermodells kurz angeführt werden.

In Lang-DTR-EGFP Mäusen erfolgt die Expression des hochaffinen, humanen DT-Rezeptors unter der Kontrolle des Promotors des C-Typ-Lektins Langerin. Die Untereinheit B von DT bindet an den Rezeptor, wodurch die Untereinheit A in das Zytoplasma aufgenommen wird. Dort blockiert die Untereinheit A die Proteinbiosynthese und löst innerhalb kurzer Zeit den Zelltod durch Apoptose aus (32, 96). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Lang-DTR-EGFP Mäusen führt die Injektion von DT innerhalb von 24-48 Stunden aller Langerin⁺ Zellen in der Haut, zu einer 97%-igen Depletion der aus der Haut in den drainierenden Lymphknoten gewanderten DCs und zu einer 70%-igen Depletion der aus dem Blut stammenden Langerin⁺ CD8⁺ CD4⁻ DCs in Haut-drainierenden Lymphknoten (32).

Bereits vier Tage nach einer DT-Injektion sind wieder Langerin⁺ dDCs in der Dermis detektierbar. Weitere 3 Tage später können sie auch wieder in den Haut-drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden. Bis zum Tag 14 nach einer Injektion wird die Population sukzessive aufgefüllt (27). Bzgl. der aus dem Blut stammenden Langerin⁺ DCs gibt es bisher keine genauen Untersuchungen. Langerhans Zellen sind nicht vor Tag 14 nach einer DT-Behandlung wieder in der Epidermis und in den Haut-drainierenden Lymphknoten nachzuweisen und es dauert etwa 6 Wochen bis die Population wieder vollständig aufgefüllt ist (32, 36). Die Injektion von DT führt zu einer transienten Depletion Langerin⁺ dDCs (32).

Um eine erfolgreiche Depletion durch DT-Injektionen nachzuweisen, eignen sich Biopsien der Epidermis des Ohres. Diese Biopsien kann man mit einem anti-Langerin Antikörper färben und damit eine erfolgreiche Depletion überprüfen. Bei jedem Experiment im Rahmen dieser Arbeit wurden Biopsien der Versuchstiere entnommen und analysiert. Dabei zeigte sich, dass in dem mit DT-behandelten Tieren niemals Langerin⁺ Zellen in der Epidermis nachzuweisen waren (Abb. 3.2). Als Kontrolle dienten immer Tiere, die kein DT erhalten hatten.

Gerade für Langzeitexperimente, bei denen Langerin⁺ dDCs depletiert werden sollten, wäre eine Gabe von DT an jeden dritten Tag sinnvoll. Allerdings zeigten Pilotexperimente bei C57BL/6 als auch bei BALB/c Tieren, dass eine DT-Injektion an jeden dritten Tag zu einem massiven Gewichtsverlust führt (Daten nicht gezeigt). Daher wurde im Rahmen von Langzeitexperimenten den Tieren nur wöchentlich DT injiziert. Dies führt zu einer kompletten Depletion der Langerhans Zellen in der Epidermis, sowie der Langerin⁺ dDCs. Letztere sind aber bereits ca. 4 Tage nach der DT-Gabe wieder in der Dermis vorhanden, weswegen hier von transienter Depletion ausgegangen werden muss (27).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Genotyp der verwendeten Tiere regelmäßig überprüft (siehe Abb. 3.1). Tiere, die kein eindeutiges Ergebnis ergaben wurden weder in Versuchen noch für die Zucht weiter verwendet.

4.2 Charakterisierung proliferierender Zellen *in situ*

Im Rahmen dieser Arbeit sollten proliferierende Lymphozyten charakterisiert werden. Bzgl. der Proliferation ist die klonale Expansion antigenspezifischer T-Zellen nach Aktivierung durch APCs, im Besonderen dendritischen Zellen, von Bedeutung. Gerade für immunologische Fragestellungen ist es hierfür wichtig, den Phänotyp dieser T-Zellen zu charakterisieren. Eine Methode um proliferierte Zellen darstellen zu können ist, den Einbau des Thymidinanalogons BrdU in die DNS nachzuweisen. Dafür erhalten Tiere BrdU über das Trinkwasser, welches dann von proliferierenden Zellen in die DNS eingebaut wird. Um das eingebaute BrdU allerdings detektieren zu können, bedarf es einer Denaturierung der DNS. Hierfür gängige Methoden in der Immunhistologie wie die Behandlung mit HCl, enzymatischer Verdau oder Ethanolfixierung führen jedoch dazu, dass Epitope nicht mehr durch entsprechende Antikörper erkannt werden können, was wiederum eine Phänotypisierung dieser Zellen in fluoreszenz-immunhistologischen Schnitten nicht erlaubt (84, 97). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt um den Phänotyp BrdU⁺ Zellen basierend auf fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf Kryostatschnitten charakterisieren zu können (Abb. 3.3 und 3.4). Dadurch konnten im Folgenden die proliferierten Zellen auf Kryostatschnitten von Lymphknoten charakterisiert und ihre Lokalisation bestimmt werden. Im Besonderen konnten proliferierte Zellen innerhalb

retikulärer Strukturen lokalisiert und anhand von seriellen Kryostatschnitten der Phänotyp bestimmt werden. Dadurch war es u. a. möglich zu zeigen, dass alle CD4⁺ T-Zellen am Tag 3 nach einer Infektion mit Leishmanien an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel proliferiert hatten (Abb. 3.8). Darüber hinaus konnten entstehende Keimzentren mit Hilfe dieser Methode dargestellt und deren zelluläre Zusammensetzung charakterisiert werden (Abb. 3.14 und 3.15). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode erlaubt es, die Vorgänge in lymphatischen Organen während einer Infektion genauer zu studieren. Aber nicht nur lymphatische Organe können auf proliferierende Zellen und ihren Phänotyp hin besser untersucht werden. Mit dieser Methode können alle Organe, die kryokonserviert werden können, bzgl. proliferierender Zellen besser charakterisiert werden. Damit können nicht nur immunologische Fragestellungen beantwortet werden, sondern diese Methode bietet generell die Möglichkeit, neu entstehende Zellen und ihre Lokalisation sowie ihren Phänotyp zu charakterisieren. Dies ist z. B. in der Stammzellbiologie sehr wichtig (98).

4.3 Die Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel

Die für eine erfolgreiche Immunantwort gegen Leishmanien wichtigen CD4⁺ T_H1-Zellen werden in den nächstgelegenen sekundären lymphatischen Organen, den Lymphknoten, aktiviert (24, 99). Lymphknoten können grob in einen T-Zellbereich (Paracortex) und B-Zell-Follikel aufgeteilt werden. Der T-Zellbereich besteht aus 95% T-Zellen, die restlichen 5% sind residente DCs und Stroma-Zellen (85). Wichtig für die Migration der T-Zellen im Paracortex sind die retikulären Fibroblasten, entlang welcher sie sich innerhalb dieses Areals bewegen (85). Bzgl. anatomischer Aspekte zeigt sich der T-Zell-Bereich des Lymphknotens sehr heterogen und lässt sich nicht in qualitativ distinkten Areale aufteilen (85). An der Grenze zwischen T-Zell-Bereich und B-Zell-Follikel scheint jedoch ein gefäßreiches Areal mit einer dichten Anordnung retikulärer Fibroblasten vorhanden zu sein (85). In 2004 beschrieben Katakai *et al.* diese dichte Anordnung retikulärer Fibroblasten innerhalb der Grenzregion die sie „cortical ridge“ (CR) nannten, sowie die Anordnung der T- und B-Zellen innerhalb dieses Areals (33). Die Autoren postulierten basierend auf ihren Daten die Theorie, dass der CR eine immunologische Plattform darstellt, innerhalb derer es zur

Interaktion von DCs aus der Periphäre mit T- und B-Zellen kommt (33). Veröffentlichte Daten zeigen zusätzlich, dass T-Zellen zwischen Paracortex und CR eine intensive Migration aufweisen (100).

Wie Abbildung 3.5 zeigt, konnte der CR auch in Lang-DTR-EGFP Mäusen nachgewiesen werden. So umrandet der CR die B-Zell-Follikel halbmondförmig hin zum subkapsulären Sinus (Abb. 3.5A). Da T-Zellen nach einer antigenspezifischen Aktivierung durch APCs zur Zellteilung aktiviert werden (31, 84, 101) deutet der Nachweis von Leishmanien-Antigen und die massive T-Zellproliferation am Tag 3 und 6 nach einer Infektion auf eine antigenabhängige bzw. klonale Expansion der T-Zellen im CR hin (Abb. 3.8, 3.10 und 3.11). Wie bereits erwähnt, wandern DCs aus peripheren Geweben in den CR ein (33). Des Weiteren zeigten Untersuchungen mit Lang-EGFP Tieren, die unter der Kontrolle des Langerin-Promotors EGFP exprimieren, dass aus der Haut eingewanderte dermale DCs im Bereich des CR nachgewiesen werden konnten (32). Die antigenspezifische Proliferation im CR bestätigt zum ersten Mal die Theorie des CR als immunologische Plattform, in der T-Zellen von DCs aus der Periphäre aktiviert werden.

Im Verlauf einer Infektion konnte nachgewiesen werden, dass bis Tag 6 CD4⁺ T-Zellen die dominante T-Zellsubpopulation im CR darstellen, aber am Tag 10 auch CD8⁺ T-Zellen vermehrt im CR vorhanden waren (Abb. 3.12). Es ist diesbezüglich bekannt, dass CD8⁺ T-Zellen zu Arealen migrieren, in denen Zell-Zell-Kontakte zwischen DCs und CD4⁺ T-Zellen stattfinden (102). In bisherigen Studien wurden T-Zellen nur als CD3⁺ Population untersucht, aber nicht zwischen CD4⁺ T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen unterschieden (33, 100). So stellen diese Ergebnisse den CR nicht nur als eine immunologische Plattform dar, sie weisen auch nach, dass im CR zuerst eine Interaktion von CD4⁺ T-Zellen mit DCs stattfindet und im Verlauf einer Infektion CD8⁺ T-Zellen in den CR nachfolgen.

Auch am Tag 10 nach einer Leishmanien-Infektion konnte der CR dargestellt werden (3.12A). Diesbezüglich ist bekannt, dass während einer Infektion der Lymphknoten aufgrund proliferierender Lymphozyten anschwillt und das Netzwerk retikulärer Fibroblasten sich ebenfalls ausdehnt (85). Dies deutet darauf hin, dass der CR im Laufe einer Infektion seine Bedeutung für die Immunantwort beibehält.

Die Verwendung des Lang-DTR-EGFP Mausmodells bietet die Möglichkeit, die Bedeutung der verschiedenen DC-Subtypen für die Induktion der T-Zellproliferation im CR zu untersuchen (5). Bei Analysen der Lokalisation der verschiedenen in der Haut vorkommenden DC-Subtypen zeigte sich, dass dermale DCs im äußeren Paracortex vorkommen, Langerhans Zellen verteilten sich dagegen ungleichmäßig im Paracortex (32). Bei der Studie von Kissenpfennig *et al.* wurde allerdings nicht zwischen Langerin⁺ dDCs und Langerin⁻ dDCs unterschieden. Bisherige Untersuchungen konnten zeigen, dass in der frühen Phase einer Immunantwort gegen Leishmanien CD8⁺ T-Zellen von Langerin⁺ dDCs aktiviert werden (5). Bei Depletionsexperimenten stellte sich heraus, dass bzgl. der Lokalisation von CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen im CR keine Veränderungen vorhanden waren (Abb. 3.13). So hat weder ein Fehlen von Langerhans Zellen noch aller Langerin⁺ Zellen einen Einfluss auf die Verteilung von eben genannten T-Zellen. Da als einziger DC-Subtyp die Langerin⁻ dDCs durch die DT-Gabe nicht depletiert wurden, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sie für die antigenspezifische Induktion der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen im CR verantwortlich sind. Dies deckt sich mit den erwähnten Ergebnissen von Kissenpfennig *et al.*, die dermale DCs im äußeren Paracortex nachweisen konnten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der CR eine immunologische Plattform während einer Leishmanien-Infektion darstellt. Innerhalb dieser Plattform findet die antigenspezifische Induktion von CD4⁺ T-Zellen statt. Des Weiteren deuten die Ergebnisse darauf hin, dass für diese Induktion Langerin⁻ dDCs vom Ort der Infektion verantwortlich sind.

4.4 Die Aktivierung von T_{FH}-Zellen während einer Immunantwort gegen *Leishmania major*

Bisherige Daten führten zu dem Schluss, dass Langerin⁻ dDCs für die antigenspezifische Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sind. Als Ort der Induktion von CD4⁺ T-Zellen favorisierte man die Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel, dem CR (5), da in diesem Areal DCs in den T-Zellbereich einwandern (33). Während einer Infektion mit *L. major* Parasiten zeigte sich, dass innerhalb des

CR $CD4^+$ T-Zellen bis ca. Tag 10 nach Infektion die dominante T-Zellpopulation darstellen (Abb. 3.7, 3.10 und 3.12). Dies deutet darauf hin, dass Langerin⁻ dDCs im CR eine T_H1 -Antwort induzieren. Des Weiteren konnte innerhalb des CR Leishmanien-Antigen nachgewiesen werden (Abb. 3.11). Zusammen mit dem Befund, dass am Tag 3 (Abb. 3.8) und Tag 6 (Abb. 3.10) nach einer Infektion eine massive Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen im CR stattfindet, deutet dies darauf hin, dass die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen tatsächlich im CR induziert wird. Somit konnte erstmalig bewiesen werden, dass die Hypothese von Katakai *et al.*, der CR sei eine immunologische Plattform, richtig ist. Auch ist bekannt, dass Langerin⁺ dDCs verantwortlich für die Aktivierung $CD8^+$ T-Zellen sind, während es Hinweise gab, dass Langerin⁻ dDCs verantwortlich für die Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen sind. Dies bestätigt sich durch Abbildung 3.13, in der nachgewiesen werden konnte, dass kein Unterschied bzgl. der $CD4^+$ T-Zellen im CR bestand, wenn Langerhans Zellen oder Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs in den infizierten Lang-DTR-EGFP Mäusen depletiert worden waren. Auch führte die Depletion von Langerhans Zellen oder Langerin⁺ Zellen zu keinem Unterschied der Anzahl proliferierter $CD4^+$ T-Zellen im gesamten Lymphknoten (Abb. 3.21). Es konnte aber nachgewiesen werden, dass die Anzahl proliferierender $CD8^+$ T-Zellen reduziert ist, wenn Langerin⁺ Zellen depletiert worden waren (Daten nicht gezeigt). Diese Daten sprechen dafür, dass $CD4^+$ T-Zellen und $CD8^+$ T-Zellen von unterschiedlichen DC-Subtypen induziert werden. Des Weiteren zeigen die Daten, dass beide T-Zellsubpopulationen in verschiedenen Arealen des Lymphknotens induziert werden.

Unter den $CD4^+$ T-Zellen gibt es verschiedene Subpopulationen, wie T_H1 -Zellen, T_H2 -Zellen oder T_H17 -Zellen (11). 2009 konnte gezeigt werden, dass T_{FH} -Zellen, eine weitere Subpopulation $CD4^+$ T-Zellen, wichtig für die Antikörperproduktion in mit Leishmanien infizierten Tieren sind (57). Diese $CD4^+$ T_{FH} -Zellen sind unter anderem dadurch definiert, dass sie durch die Expression des Chemokinrezeptors CXCR5 in der Lage sind, CXCL13, das von FDCs im B-Zell-Follikel freigesetzt wird, zu binden und so in den B-Zell-Follikel des Lymphknoten wandern können (11, 103). Auch in dieser Arbeit konnten im B-Zell-Follikel $CD4^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. So waren bereits in Lymphknoten von naiven Tieren $CD4^+$ T-Zellen im B-Zell-Follikel vorhanden (Abb. 3.5). Es ist diesbezüglich bekannt, dass $CD4^+$ T-Zellen in den B-Zell-Follikel wandern können, unabhängig davon, ob es zuvor zu einer Interaktion zwischen diesen $CD4^+$ T-Zellen und B-Zellen an der Grenze zwischen T-Zellbereich

und B-Zell-Follikel gekommen ist (54). Im Verlauf einer Infektion mit Leishmanien waren am Tag 3, 6 und 10 $CD4^+$ T-Zellen im B-Zell-Follikel erkennbar (Abb. 3.6, 3.10 und 3.12). Dass sich diese T-Zellen innerhalb der Keimzentren befanden, deutet darauf hin, dass diese $CD4^+$ T-Zellen T_{FH} -Zellen waren. Somit konnten bereits innerhalb der ersten 10 Tage T_{FH} -Zellen in Keimzentren nachgewiesen werden.

Ein weiteres Merkmal von T_{FH} -Zellen ist die Expression des Transkriptionsfaktors BCL-6 (8, 54, 57, 72, 104). Wie in Abbildung 3.14 dargestellt, können innerhalb von Keimzentren $BCL-6^+ CD4^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Kryostatschnitte von Lymphknoten zeigen, dass das Fehlen von Langerin⁺ Zellen in Keimzentren zu einer reduzierten Anzahl an $BCL-6^+ CD4^+ T_{FH}$ -Zellen führt (Abb. 3.14E und F). Dies liefert einen ersten Hinweis, dass T_{FH} -Zellen von Langerin⁺ Zellen induziert werden.

Eine Eigenschaft von T_{FH} -Zellen im B-Zell-Follikel ist die Ausbildung stabiler Konjugate mit B-Zellen (54, 57, 104). Diese Eigenschaft kann man sich zu nutze machen, in dem diese Konjugate durchflusszytometrisch von anderen Lymphozyten und v. a. von nicht konjugierten $CD4^+$ T-Zellen und B-Zellen separiert werden (57). Deswegen wurde aus separierten Zellen mRNA isoliert und die Genexpression von BCL-6 analysiert. Die Genexpressionsanalysen zeigen, dass BCL-6 in zuvor mit B-Zellen konjugierten $CD4^+$ T-Zellen höher exprimiert war als in nicht konjugierten. BCL-6 ist dabei nicht nur ein Marker von T_{FH} -Zellen wie lange angenommen wurde, sondern auch wichtig für die Entwicklung von T_{FH} -Zellen (72, 74). Dies spricht dafür, dass es sich bei den konjugierten $CD4^+$ T-Zellen tatsächlich um T_{FH} -Zellen handelt. BCL-6 ist zwar wichtig für die Entstehung von T_{FH} -Zellen, aber wichtig für ihre Funktion sind andere Faktoren (72). Zu diesen Faktoren gehört die Ausschüttung von IL-4 und IFN- γ durch T_{FH} -Zellen (57).

Allerdings war die Expression von BCL-6-mRNA in konjugierten $CD4^+$ T-Zellen am höchsten bei Tieren ohne Langerhans Zellen. Da bei B-Zellen aus infizierten Kontrolltieren die Genexpression von BCL-6 an Tag 6 einen großen Unterschied zeigte, könnten es sein, dass T_{FH} -Zellen in diesen Tieren bereits induziert und entwickelt waren. Dafür sprechen auch die histologischen Färbungen am Tag 6 nach Infektion (Abb. 3.14). In Tieren, denen aber Langerhans Zellen fehlten, könnte die Induktion verzögert stattgefunden haben, da zu wenige Langerin⁺ dDCs vorhanden waren, um eine genügend große Anzahl an T_{FH} -Zellen zu induzieren. In Tieren ohne Langerin⁺ Zellen findet die Induktion teilweise auch statt, da die konjugierten $CD4^+$ T-

Zellen eine erhöhte Expression gegenüber unkonjugierten zeigten. Diese Induktion von BCL-6 könnte aber auf eine B-Zell-induzierte Aktivierung zurück zu führen sein. Dass es sich um keine zusätzliche Aktivierung bei Tieren ohne Langerhans Zellen handelt kann dadurch ausgeschlossen werden, dass es nur einer bestimmten Anzahl an T_{FH}-Zellen für eine erfolgreiche Keimzentrumsreaktion bedarf (54). Dass in Tieren ohne Langerhans Zellen die Keimzentrumsreaktion nicht verzögert sondern wirklich reduziert ist zeigt die verringerte B-Zellproliferation am Tag 10. Auch die verringerte Avidität der IgG1-Immunglobuline (Abb. 3.23) stützt nicht die Vermutung, dass bei Tieren ohne Langerhans Zellen die Keimzentrumsreaktion nur verzögert sei.

Allerdings muss erwähnt werden, dass die Genexpression von BCL-6 sehr kritisch gesehen werden muss, da BCL-6 posttranskriptional durch viele Mechanismen wie z. B. Phosphorylierung kontrolliert wird (51). Allerdings sind Expressionsanalysen von BCL-6-mRNA zur Zeit die einzige Möglichkeit neben histologischen Färbungen um Zellen auf diesen Transkriptionsfaktor hin zu untersuchen.

Alle BCL-6⁻ CD4⁺ T-Zellen sind laut Literatur BLIMP-1⁺, da sich beide Transkriptionsfaktoren gegenseitig supprimieren (72). Nachdem sich BCL-6 und BLIMP-1 gegenseitig regulieren und BCL-6 spezifisch für T_{FH}-Zellen ist (51), sollten unkonjugierte CD4⁺ T-Zellen eine vermehrte Expression von BLIMP-1 aufweisen. Allerdings zeigen *in vitro* Experimente, dass BLIMP-1 erst sehr spät in der Entwicklung von CD4⁺ Effektor-T-Zellen exprimiert wird. Dann wenn die T-Zelle die Proliferation abgeschlossen hat und beginnt, ihren Sekretionsapparat auszubilden (51). Deswegen könnten die Analysen am Tag 6 und 10 (Abb. 3.19) verfrüht gewesen sein. Bei den Genexpressionsanalysen am Tag 6 und 10 für BLIMP-1-mRNA zeigten sich keine Unterschiede in der Expression, sowohl im Vergleich zwischen konjugierten und nicht konjugierten CD4⁺ T-Zellen als auch zwischen den verschiedenen Versuchstiergruppen mit und ohne Depletion (Abb. 3.19B und D). Dass die Einteilung von CD4⁺ T-Zellen in T_{FH}-Zellen nicht nur mittels Transkriptionsfaktoren erfolgen kann, zeigt auch, dass T-bet, der für T_H1-Zellen spezifische Transkriptionsfaktor, auch in T_{FH}-Zellen nachgewiesen werden konnte (72). Bei den Genexpressionsanalysen im Rahmen dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass GATA3-mRNA sowohl in konjugierten als auch nicht konjugierten CD4⁺ T-Zellen aller Tiergruppen detektiert werden konnte. Allerdings war dabei die

Genexpression von GATA3 in den nicht konjugierten CD4⁺ T-Zellen wesentlich erhöht. (Daten nicht gezeigt).

Während einer Infektion mit Leishmanien postulierten Reinhardt *et al.*, dass nur T_{FH}-Zellen im Lymphknoten nach einer Infektion mit Leishmanien IL-4 sezernieren. Ebenso konnten die Autoren ausschließen, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten T_{FH}-Zellen T_H2-Zellen sind, da die IL-4 sezernierenden Zellen positiv für ICOS waren, dieses aber wiederum für die Funktion von T_H2-Zellen entbehrlich ist (57). IL-4 ist neben IFN- γ oder IL-21 wichtig für B-Zellen während einer Keimzentrumsreaktion. IFN- γ ist dabei wichtig für den Isotypwechsel, IL-21 reguliert neben dem Isotypwechsel auch die Proliferation von B-Zellen (53). IL-4 dagegen wirkt u. a. als Wachstumsfaktor für B-Zellen (12, 57, 59).

Für IL-4 ist bekannt, dass es B-Zellen zu einem Isotypwechsel hin zu IgG1 führt (105, 106). So konnte nachgewiesen werden, dass IL-4⁺ T_{FH}-Zellen zu einer verstärkten Expression von AID in B-Zellen führt (57). Am Tag 6 nach einer Infektion zeigte sich, dass IL-4-mRNA bei Tieren ohne DT-Behandlung in konjugierten CD4⁺ T-Zellen stärker exprimiert war als bei unkonjugierten CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.20). Des Weiteren wird IL-4-mRNA nur Tieren ohne DT-Behandlung verstärkt exprimiert. Am Tag 10 ist die Expression von IL-4-mRNA bei Tieren ohne Langerhans Zellen in den konjugierten CD4⁺ T-Zellen am stärksten (Abb. 3.20B). Dieser Befund könnte darauf beruhen, dass am Tag 6 BCL-6-mRNA in diesen Tieren am stärksten exprimiert war (Abb. 3.19A), also hier erst die Induktion der T_{FH}-Zellen stattgefunden hat.

4.5 Die B-Zell-Antwort während einer Infektion mit Leishmanien

Wie bereits beschrieben, ist IL-4 für die Produktion von IgG1 durch B-Zellen wichtig (105, 106). Dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Tieren ohne DT-Behandlung in den konjugierten CD4⁺ T-Zellen vermehrt IL-4-mRNA exprimiert wurde (Abb. 3.20). Entsprechend zeigte sich bei der Analyse von produzierten IgG1, dass die Menge an Leishmanien-spezifischen IgG1 reduziert ist, wenn Langerin⁺ Zellen fehlen. Eine andere Arbeitsgruppe konnte bei DNS-Immunisierungen mit einer *gene gun* zeigen, dass das Fehlen von Langerin⁺ dDCs zu einer reduzierten IgG1-Produktion führt (107). In immunfluoreszenz-basierten

Färbungen von Kryostatschnitten konnte auch nachgewiesen werden, dass innerhalb von Keimzentren weniger IgG⁺ Zellen waren, wenn Langerin⁺ Zellen fehlten (Abb. 3.14). Diese IgG⁺ BrdU⁺ Zellen könnten am Tag 10 nach Infektion Zentrozyten darstellen, die ihre somatische Hypermutation abgeschlossen haben, wieder Immunglobulin auf ihrer Oberfläche tragen und hin zu FDCs wandern, um bei entsprechender Affinität zum Antigen auf den FDCs von T_{FH}-Zellen ein Überlebenssignal, CD40L, IL-21 oder IL-4, zu erhalten (12, 108).

Nach ihrer Aktivierung präsentieren B-Zellen über den MHC-Klasse-II Komplex Antigen, um CD4⁺ T-Zellen zu rekrutieren, die den B-Zellen bei der Proliferation Hilfe durch Zytokine geben (64). Eines dieser Zytokine ist das bereits erwähnte IL-4 (64). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass am Tag 6 nach einer Infektion weniger B-Zellen proliferieren, wenn Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs fehlen (Abb. 3.22A). Am Tag 10 nach Infektion war dies auch in Tieren ohne Langerhans Zellen der Fall (Abb. 3.22B). Aus naiven B-Zellen entstehen nach Aktivierung entweder kurzlebige Plasmablasten, die an der Grenze des B-Zell-Follikels hin zum T-Zellbereich lokalisiert sind, oder Keimzentrums-B-Zellen (64). Kurzlebige Plasmablasten sind nach ihrer Aktivierung extrafollikulär lokalisiert und sezernieren IgM- und IgG-Antikörper mit einer geringen Affinität (64). In Abbildung 3.15 ist dargestellt, dass IgG⁺ Zellen am CR am Tag 10 nach Infektion fehlten, wenn in den Tieren Langerin⁺ Zellen depletiert waren. Dies zeigt, dass die Depletion von Langerin⁺ Zellen zu einer verminderten B-Zellproliferation führt. Diese Depletion hat auch zur Folge, dass extrafollikuläre Plasmablasten fehlen sowie die Keimzentrumsreaktion reduziert ist. Diese Ergebnisse sind ein starkes Indiz dafür, dass die Depletion von Langerin⁺ Zellen in einer verminderten B-Zell-Antwort resultiert, was auf eine reduzierte Funktionalität der T_{FH}-Zellen zurück geführt werden kann.

Während einer Keimzentrumsreaktion findet in der dunklen Zone des Keimzentrums eine massive Proliferation von B-Zellen statt (8, 12, 57). Wie in Abbildung 3.10 dargestellt, waren am Tag 6 nach einer Infektion dichte BrdU⁺ Zellaggregate anliegend am CR im B-Zell-Follikel vorhanden. Diese Zellaggregate waren sowohl PNA⁺ (Abb. 3.11C und D) als auch positiv für GL-7, einen Marker für aktivierte B-Zellen (Daten nicht gezeigt). Sowohl PNA als auch GL-7 kennzeichnen Keimzentren was darauf schließen lässt, dass diese dichten Ansammlungen proliferierter Zellen

Keimzentrumsreaktionen repräsentieren. Weiterhin konnte am Tag 6 und 10 nach Infektion nachgewiesen werden, dass die Keimzentren in Tieren, denen Langerin⁺ Zellen fehlten, eine reduzierte Größe aufwiesen (Abb. 3.14 und 3.15). Das Fehlen von Langerin⁺ Zellen führt zu verminderten Keimzentrumsreaktionen. Dies unterstreicht, dass Langerin⁺ Zellen wichtig für die Induktion funktioneller T_{FH}-Zellen sind.

Aus Keimzentrumsreaktionen resultieren neben Gedächtnis-B-Zellen langlebige Plasmazellen, die hochaffine antigenspezifische Antikörper sezernieren (68). Für IgG1-Immunglobuline konnte gezeigt werden, dass durch das Fehlen von Langerhans Zellen im Laufe einer Immunantwort gegen Leishmanien deren Avidität reduziert war (Abb. 3.23). Diese Daten zeigen, dass die Depletion von Langerin⁺ Zellen zu verminderten Keimzentrumsreaktionen führt, dies wiederum eine reduzierte Quantität und Qualität der IgG1-Immunglobuline zur Folge hat. So weisen auch diese Daten darauf hin, dass Langerin⁺ Zellen funktionelle T_{FH}-Zellen induzieren und deren Fehlen die eben beschriebenen Folgen auf die humorale Immunantwort haben.

Der bereits erwähnte Transkriptionsfaktor BCL-6 ist auch für Keimzentrums-B-Zellen, im Besonderen für deren Proliferation wichtig (68). So inhibiert BCL-6 Proteine wie Cyclin D2, die ihrerseits den Zellzyklus unterdrücken (51). Auch inhibiert BCL-6 Mechanismen zur Reparatur von Mutationen des DNS-Codes, was konträr zur somatischen Hypermutation wäre (51, 68). Innerhalb des Keimzentrums befinden sich die proliferierenden B-Zellen in der dunklen Zone, die dem CR zugewandt ist. Sie führen in dieser dunklen Zone einen Isotypwechsel durch und daran anschließend eine somatische Hypermutation, um einen möglichst affinen Antikörper sezernieren zu können (12, 57). Genexpressionsanalysen zeigten, dass BCL-6-mRNA während einer Infektion verstärkt in B-Zellen exprimiert wird, wenn die B-Zellen zuvor ein Konjugat mit CD4⁺ T-Zellen gebildet hatten. Dies gilt aber nur für Tiere ohne eine DT-Behandlung (Abb. 3.18B). Diese verstärkte Expression von BCL-6-mRNA und damit erhöhte Proliferation könnte der Grund dafür sein, dass Keimzentren in Tieren ohne DT-Behandlung größer waren als bei behandelten Tieren (Abb. 3.13). Auch für die Genexpression von BCL-6 zeigt sich, dass eine Depletion von Langerin⁺ Zellen zu einer Reduktion führt. Eine fehlende Induktion funktioneller T_{FH}-Zellen führt zu einer verminderten Proliferation von B-Zellen im

Keimzentrum und dies letztendlich zu einer geringeren Quantität und Qualität gebildeter Immunglobuline.

Um hochaffine Immunglobuline produzieren zu können, müssen B-Zellen einen Isotypwechsel und daran anschließend die somatische Hypermutation durchführen. Dafür benötigen B-Zellen das Enzym AID (70). Dieses Enzym wird überwiegend in Keimzentrums-B-Zellen exprimiert. Reinhardt *et al.* konnten bei semiquantitativen PCRs diesbezüglich zeigen, dass B-Zellen, die mit IL-4⁺ T_{FH}-Zellen ein Konjugate gebildet hatten, vermehrt AID-mRNA exprimieren (57). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte mit quantitativen Genexpressionsanalysen gezeigt werden, dass AID-mRNA in zuvor konjugierten B-Zellen nach einer Infektion vermehrt exprimiert ist (Abb. 3.18A). Bei den konjugierten B-Zellen am Tag 10 nach einer Infektion war die Expression von AID-mRNA am stärksten in mit DT unbehandelten, infizierten Tieren (Abb. 3.18C). Die verminderte Quantität und Qualität ist also darauf zurück zu führen, dass infolge funktionell unzureichender T_{FH}-Zellen, induziert durch das Fehlen von Langerin⁺ Zellen, weniger AID-mRNA exprimiert wurde und dadurch der Isotypwechsel und die somatische Hypermutation reduziert waren.

Es zeigte sich allerdings auch in den nicht konjugierten B-Zellen eine verstärkte Expression von AID-mRNA (Abb. 3.18C). Eine klare Trennung zwischen konjugierten B-Zellen und unkonjugierten B-Zellen wird im Verlauf einer Infektion immer schwieriger, da nicht mehr alle aktiven B-Zellen im Keimzentrum ein Konjugat mit T_{FH}-Zellen bilden (57, 59). Im Durchflusszytometer erhält man keine Information über die Lokalisation der Zellen. Daher nimmt man an, dass es sich bei der Mehrheit der konjugierten CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen um T_{FH}-Zellen und Keimzentrums-B-Zellen handelt. Allerdings wird dabei eine T_{FH}-Zelle bzw. Keimzentrums-B-Zelle fälschlicherweise eben nicht als solche erkannt, wenn sie nicht zum Zeitpunkt der Analyse ein Konjugat gebildet hatte. Dadurch kann es sein, dass die Genexpression von AID auch in nicht konjugierten B-Zellen erhöht scheint,

4.6 Die Achse dendritische Zelle – T_{FH}-Zellen – B-Zellen während einer Immunantwort gegen Leishmanien

Die Aktivierung von T_{FH}-Zellen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt sehr kontrovers diskutiert worden. Es stellte sich die Frage, ob die Entwicklung einer naiven CD4⁺ T-Zelle hin zu einer T_{FH}-Zelle durch B-Zellen oder durch dendritische Zellen induziert wird. Neuere Arbeiten zeigen aber, dass die Induktion von T_{FH}-Zellen durch B-Zellen deswegen bedingt ist, da B-Zellen bei einer OVA-Immunisierung, das Modell vieler bisherigen Studien, nach kurzer Zeit die einzige Quelle von präsentiertem Antigen waren (54). Das bedeutet, dass am Ort der Injektion kein OVA mehr vorhanden ist, daher keine neuen DCs in den Lymphknoten wandern und Antigen präsentieren. Dazu passend konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen in den B-Zell-Follikel wandern können, unabhängig davon, ob es zuvor zu einer Interaktion an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel von diesen CD4⁺ T-Zellen und B-Zellen gekommen ist (54). Andere Studien zeigten dagegen, dass in B-Zelldefizienten Mäusen keine T_{FH}-Zellen gebildet werden, da keine Induktion der T_{FH}-Zellen durch B-Zellen stattfinden kann (59, 73). Das Fehlen von T_{FH}-Zellen bei OVA-Immunisierungen resultiert in einer verminderten Keimzentrumsreaktion und damit einhergehend in einer verminderten bzw. fehlenden humoralen Immunantwort (8, 54, 57, 72).

Das Fehlen von Langerhans Zellen und Langerin⁺ Zellen führte dazu, dass weniger T_{FH}-Zellen innerhalb von Keimzentren nachzuweisen waren (Abb. 3.14 E und F). Des Weiteren war die Größe von Keimzentren reduziert, wenn Langerhans Zellen oder Langerhans Zellen und Langerin⁺ dDCs fehlten (Abb. 3.13). Generell waren in Tieren ohne Langerhans Zellen bzw. ohne Langerin⁺ Zellen die BrdU⁺ B-Zellen vermindert (Abb. 3.22). Die erwähnten Ergebnisse zeigen, dass zwar T_{FH}-Zellen bei Tieren ohne Langerin⁺ Zellen induziert werden, diese T_{FH}-Zellen allerdings eine reduzierte Funktionalität aufweisen, die in einer verminderten Größe von Keimzentren resultiert.

In mit IL-4-produzierenden T_{FH}-Zellen konjugierten B-Zellen konnte eine vermehrte Expression von AID-mRNA gezeigt werden (57). Dieser Befund konnte im Rahmen dieser Arbeit in infizierten Tieren ohne DT-Behandlung ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 3.17 und 3.18). Die verminderte Expression von AID-mRNA führt zu einer verminderten Affinitätsreifung und somit wohl auch dazu, dass weniger

Leishmanien-spezifische IgG1-Immunglobuline in mit DT behandelten Tieren produziert wurden (Abb. 3.16). Diese IgG1-Immunglobuline zeigten bei Fehlen von Langerhans Zellen auch eine verringerte Avidität (Abb. 3.23). Allerdings muss die Existenz von Keimzentren auch in DT behandelten Tieren sowie die Tatsache, dass Leishmanien-spezifische Immunglobuline gebildet wurden, darauf zurück geführt werden, dass T_{FH} -Zellen in diesen Tieren vorhanden waren. Dafür spricht auch, dass in mit B-Zellen konjugierten $CD4^+$ T-Zellen die Expression von BCL-6 nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.19). Am Tag 10 nach einer Infektion zeigte sich auch eine Expression von AID-mRNA in DT-behandelten Tieren (Abb. 3.18). Langerin⁻ dDCs können als die für die Induktion von T_{FH} -Zellen verantwortliche Subpopulation durch die Depletionsversuche ausgeschlossen werden, denn dabei hätte sich keiner der untersuchten Parameter wie z. B. Größe des Keimzentrums, Quantität und Qualität von IgG1-Immunglobulinen, verändern dürfen. Tiere ohne Langerhans Zellen zeigen zwar auch reduzierte Keimzentren oder eine verminderte Avidität von IgG1-Immunglobulinen, doch könnte dies darauf zurück geführt werden, dass durch die Injektion von DT auch Langerin⁺ dDCs depletiert wurden (5, 26). Da die Expression von AID-mRNA im gesamten Lymphknoten bereits am Tag 6 reduziert war ebenso wie die Anzahl proliferierter B-Zellen wenn Langerin⁺ dDCs depletiert waren, deutet dies daraufhin, dass es vornehmlich diese Langerin⁺ dDCs sind, die eine Entwicklung von naiven $CD4^+$ T-Zellen hin zur T_{FH} -Zelle induzieren. Auch die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen von IL-4 und BCL-6 in $CD4^+$ T-Zellen deuten, wie bereits erwähnt, darauf hin (Abb. 3.19 und 3.20).

Dass sich keine Unterschied zwischen den verschiedenen Tiergruppen bei Depletionsexperimenten hinsichtlich der Proliferation von $CD4^+$ Zellen im Lymphknoten ergibt (Abb. 3.21), könnte der Tatsache geschuldet sein, dass nach einer Infektion $CD4^+$ T_H1 -Zellen im poplitealen Lymphknoten hauptsächlich induziert werden (31) und T_{FH} -Zellen nur einen mengenmäßig sehr kleinen Anteil an der Gesamtpopulation der $CD4^+$ T-Zellen darstellen (57).

Die Ergebnisse zeigen, dass zwar T_{FH} -Zellen generiert werden, ihre Funktionalität jedoch reduziert ist, wenn Langerin⁺ dDCs fehlen. Dies wird dadurch bestätigt, dass sich die Anzahl der Konjugate aus $CD4^+$ T-Zellen und B-Zellen nicht verändert, wenn Langerin⁺ dDCs zuvor depletiert wurden. Eine zeitlich verspätete Induktion der T_{FH} -Zellen kann ausgeschlossen werden, da selbst zu späten Zeitpunkten die

Leishmanien-spezifischen IgG1-Antikörper eine verminderte Avidität aufweisen, wenn Langerhans Zellen fehlen und Langerin⁺ dDCs transient depletiert waren. Daher lässt sich abschließend feststellen, dass Langerin⁺ dDCs funktionell vollwertige T_{FH}-Zellen induzieren.

5. Zusammenfassung

Der obligat intrazelluläre Parasit *Leishmania (L.) major* verursacht im Menschen die kutane Form der Leishmaniose. Die Parasiten werden hierbei durch den Stich einer Sandmücke in die Haut des Wirtes übertragen und infizieren dort Zellen des mononukleären Systems. Im experimentellen Mausmodell der Leishmaniose ist eine erfolgreiche Immunantwort gegen den Erreger mit einer T_H1 -Immunantwort verbunden. Dabei regen $IFN-\gamma$ -produzierende $CD4^+$ T_H1 -Zellen infizierte Makrophagen zur Bildung von antimikrobiellem Stickstoffmonoxid an. Dies führt zur Eliminierung der intrazellulären Parasiten. Laut Lehrbuchmeinung nehmen dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) Leishmanien am Infektionsort auf und prozessieren die Antigene. Daran anschließend wandern diese Antigen-beladenen DCs zum drainierenden Lymphknoten und präsentieren dort u. a. den T-Zellen Leishmanien-Antigen. Dabei kommt es zur Aktivierung *L. major*-spezifischer T-Zellen. Eine Hypothese besagt, dass es an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel im Lymphknoten eine immunologische Plattform gibt, innerhalb welcher die Interaktion zwischen DCs, T-Zellen und B-Zellen stattfindet. Ein Nachweis für die tatsächliche Existenz einer solchen Plattform während einer Infektion konnte allerdings bisher nicht erbracht werden.

Die Haut von Mäusen enthält nach heutigem Kenntnisstand 3 verschiedene DC-Subtypen. Langerhans Zellen (*Langerhans cells*, LCs), die positiv für das C-Typ-Lektin Langerin (CD207) sind, befinden sich ausschließlich in der Epidermis. In der Dermis gibt es 2 weitere DC-Subtypen, die Langerin⁺ und die Langerin⁻ DCs. Bisher ist bekannt, dass Langerin⁺ dermale DCs bei der Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen in der frühen Phase der Infektion wichtig sind, Langerin⁻ dDCs für $CD4^+$ T-Zellen. In der vorliegenden Arbeit sollte zum einen untersucht werden, ob der „*cortical ridge*“ (CR) während einer Infektion eine immunologische Plattform darstellt. Zum anderen waren Untersuchungen, inwiefern die verschiedenen DC-Subtypen der Haut die B-Zellantwort während einer Leishmaniose beeinflussen, Gegenstand dieser Arbeit.

Es konnte gezeigt werden, dass während einer Infektion mit Leishmanien die B-Zellproliferation verringert war, wenn Langerin⁺ Zellen in der Haut fehlten. Darüber

hinaus war die Keimzentrumsreaktion im Lymphknoten reduziert. Dies spiegelte sich nicht nur in der Größe der Keimzentren wider, sondern konnte auch durch Genexpressionsanalysen bestätigt werden, die zeigten, dass durch das Fehlen Langerin⁺ Zellen für eine erfolgreiche Keimzentrumsreaktion wichtige Faktoren reduziert exprimiert waren. Eine humorale Immunantwort beruht auf der Produktion hochaffiner Antikörper. Diesbezüglich konnte nachgewiesen werden, dass sowohl die Quantität und als auch die Qualität Leishmanien-spezifischer IgG1-Immunglobuline nach einer Depletion Langerin⁺ Zellen vermindert war. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass eine effektive Keimzentrumsreaktion der Hilfe spezifischer CD4⁺ T-Zellen bedarf, den follikulären T-Helfer-Zellen (T_{FH}-Zellen). Trotz Depletion Langerin⁺ Zellen wurden T_{FH}-Zellen induziert, dennoch konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass ihre Funktion bei fehlenden Langerin⁺ dDCs gestört war. Dabei erfolgt die Induktion von CD4⁺ T-Zellen in der frühen Phase einer Infektion mit *L. major* Parasiten im CR. , Zusammen mit dem Befund, dass Keimzentrumsreaktionen am CR induziert werden, bestätigt dieser Nachweis zum ersten Mal die Hypothese, dass der CR im Lymphknoten eine immunologische Plattform darstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen somit erstmalig, dass die antigenspezifische Induktion von CD4⁺ T-Zellen innerhalb einer immunologischen Plattform an der Grenze zwischen T-Zellbereich und B-Zell-Follikel erfolgt. Auch konnte zum ersten Mal der Nachweis erbracht werden, dass Langerin⁺ dDCs nicht nur für die Induktion von CD8⁺ T-Zellen in der frühen Phase einer Infektion wichtig sind, sondern dass dieser Zelltyp im experimentellen Modell der Leishmaniose für die Generierung funktioneller T_{FH}-Zellen verantwortlich ist.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Antigenpräsentationswege in DCs.....	7
Abb. 1.2	Die verschiedenen CD4 ⁺ T-Helfer-Zellen.....	15
Abb. 1.3	Die Keimzentrumsreaktion.....	22
Abb. 1.4	Der Lebenszyklus von Leishmanien.....	27
Abb. 2.1	Färbeschema für Oberflächenfärbungen und BrdU- <i>in-situ</i> Färbungen.....	54
Abb. 3.1	Genotypisierung von Lang-DTR-EGFP Mäusen.....	65
Abb. 3.2	DT-induzierte Depletion von Langerin ⁺ Zellen in Lang-DTR-EGFP Mäusen.....	67
Abb. 3.3	Etablierung der Detektion von proliferierten Zellen <i>in situ</i>	68
Abb. 3.4	Etablierung einer Doppelfärbung von BrdU ⁺ Zellen.....	71
Abb. 3.5	Struktur eines naiven Lymphknotens.....	73
Abb. 3.6	Der „ <i>cortical ridge</i> “ am Tag 3 nach einer Infektion.....	74
Abb. 3.7	Verteilung von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im poplitealen Lymphknoten, insbesondere im CR, 3 Tage nach Infektion.....	76
Abb. 3.8	CD4 ⁺ T-Zellen proliferieren im CR am Tag 3 nach einer Infektion.....	77
Abb. 3.9	Struktur eines poplitealen Lymphknotens 6 Tage nach Infektion.....	79
Abb. 3.10	Darstellung des CR im poplitealen Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion.....	80
Abb. 3.11	<i>In situ</i> Charakterisierung des poplitealen Lymphknotens am Tag 6 nach einer Infektion mit <i>L. major</i>	83
Abb. 3.12	Charakterisierung der Proliferation von CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen am Tag 10 nach einer Infektion mit <i>L. major</i> Parasiten im poplitealen Lymphknoten.....	84
Abb. 3.13	Die Bedeutung von Langerin ⁺ dendritischer Zellen für die Proliferation in poplitealen Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion mit Leishmanien.....	87
Abb. 3.14	<i>In situ</i> Charakterisierung von Keimzentren in poplitealen Lymphknoten 6 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien.....	89

Abb. 3.15	Charakterisierung von Keimzentren in poplitealen Lymphknoten am Tag 10 nach einer Leishmanien-Infektion von Lang-DTR-EGFP Tieren in Abhängigkeit von Langerin ⁺ Zellen.....	92
Abb. 3.16	Charakterisierung Leishmanien-spezifischer IgG-Subtypen am Tag 10 einer Infektion.....	93
Abb. 3.17	qPCR-Analyse der relativen Expression von AID-mRNA im poplitealen Lymphknoten am Tag 6 nach einer Infektion mit Leishmanien.....	95
Abb. 3.18	Expressionsanalysen von mRNA aus B-Zellen, die ein Konjugat mit CD4 ⁺ T-Zellen gebildet hatten.....	97
Abb. 3.19	Expressionsanalysen von mRNA aus CD4 ⁺ T-Zellen, die ein Konjugat mit B-Zellen gebildet hatten.....	100
Abb. 3.20	Genexpressionsanalysen von IL-4 in CD4 ⁺ T-Zellen aus den poplitealen Lymphknoten am Tag 6 und 10 nach Infektion.....	102
Abb. 3.21	Durchflusszytometrische Analyse der Anzahl von CD4 ⁺ T-Zellen in poplitealen Lymphknoten am Tag 6 und 10 nach einer Infektion....	104
Abb. 3.22	Durchflusszytometrische Analyse der prozentualen Anzahl BrdU ⁺ B-Zellen in poplitealen Lymphknoten 6 und 10 Tage nach einer Infektion mit Leishmanien.....	106
Abb. 3.23	Bestimmung der Avidität von Leishmanien-spezifischen IgG1 im Serum von infizierten Lang-DTR-EGFP Mäusen.....	108

7. Literaturverzeichnis

1. K. Murphy, P. Travers, M. Walport, and M. Ehrenstein. 2008. Janeway's immunobiology. *citeulike.org*
2. LeBien, T. 2008. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*
3. Lemischka, I., and D. Raulet. 1986. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell*
4. Bedoui, S., and T. Gebhardt. 2010. Interaction between dendritic cells and T cells during peripheral virus infections: a role for antigen presentation beyond lymphoid organs? *Current opinion in immunology*
5. Brewig, N., A. Kissenpfennig, B. Malissen, A. Veit, T. Bickert, B. Fleischer, S. Mostbock, and U. Ritter. 2009. Priming of CD8+ and CD4+ T cells in experimental leishmaniasis is initiated by different dendritic cell subtypes. *The Journal of Immunology*
6. Liu, Y. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell*
7. Linderman, J.J., T. Riggs, M. Pande, M. Miller, S. Marino, and D.E. Kirschner. 2010. Characterizing the Dynamics of CD4+ T Cell Priming within a Lymph Node. *The Journal of Immunology*
8. Fazilleau, N., L. Mark, L. McHeyzer-Williams, and M. McHeyzer-Williams. 2009. Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity*
9. Belz, G.T., and A. Kallies. 2010. Effector and memory CD8+ T cell differentiation: toward a molecular understanding of fate determination. *Current opinion in immunology*
10. Lees, J.R., and D.L. Farber. 2010. Generation, persistence and plasticity of CD4 T-cell memories. *Immunology*
11. Deenick, E.K., C.S. Ma, R. Brink, and S.G. Tangye. 2010. Regulation of T follicular helper cell formation and function by antigen presenting cells. *Current opinion in immunology*
12. Gatto, D., and R. Brink. 2010. The germinal center reaction. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*
13. Steinman, R.M., and Z.A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of Experimental Medicine*
14. Liu, K., and M.C. Nussenzweig. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunological Reviews*
15. Banchereau, J., F. Briere, and C. Caux. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2000.
16. Lauvau, G. 2004. Mini- review: Presentation of pathogen- derived antigens in vivo. *European journal of immunology*
17. Lin, M., Y. Zhan, and J. Villadangos. 2008. The cell biology of cross-presentation and the role of dendritic cell subsets. *Immunology and Cell Biology*
18. Villadangos, J., and P. Schnorrer. 2007. Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nature Reviews Immunology*
19. Vyas, J., A. Van der Veen, and H. Ploegh. 2008. The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Reviews Immunology*
20. Ackerman, A., and A. Giodini. 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity*

21. Rodriguez, A., A. Regnault, and M. Kleijmeer. 1999. Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nature Cell Biology*
22. Diebold, S. 2009. Activation of dendritic cells by toll-like receptors and C-type lectins. *Dendritic Cells*
23. Villadangos, J. 2005. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Seminars in immunology*
24. Ritter, U. 2010. Presentation of Skin-Derived Leishmania Antigen by Dendritic Cell Subtypes *Book chapter, Protozoa, Immune Response to Parasitic Infections Vol-I. October 2010. Bentham-Press*
25. Bursch, L., L. Wang, B. Igyarto, A. Kissenpfennig, B. Malissen, D. Kaplan, and K. Hogquist. 2007. Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*
26. Ginhoux, F., M. Collin, M. Bogunovic, M. Abel, M. Leboeuf, J. Helft, J. Ochando, A. Kissenpfennig, B. Malissen, and M. Grisotto. 2007. Blood-derived dermal langerin+ dendritic cells survey the skin in the steady state. *Journal of Experimental Medicine*
27. Poulin, L.F., S. Henri, B. de Bovis, E. Devilard, A. Kissenpfennig, and B. Malissen. 2007. The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *The Journal of Experimental Medicine*
28. Merad, M., F. Ginhoux, and M. Collin. 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*
29. Alvarez, D., and E. Vollmann. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*
30. Valladeau, J., V. Clair-Moninot, C. Dezutter-Dambuyant, J. Pin, A. Kissenpfennig, M. Mattei, S. Ait-Yahia, E. Bates, B. Malissen, and F. Koch. 2002. Identification of mouse langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *The Journal of Immunology*
31. Ritter, U., A. Meissner, C. Scheidig, and H. Körner. 2004. CD8(alpha)-and Langerin-negative dendritic cells, but not Langerhans cells, act as principal antigen-presenting cells in leishmaniasis. *European journal of immunology*
32. Kissenpfennig, A., S. Henri, B. Dubois, C. Laplace-Builhé, P. Perrin, N. Romani, C. Tripp, P. Douillard, L. Leserman, and D. Kaiserlian. 2005. Dynamics and Function of Langerhans Cells In Vivo:: Dermal Dendritic Cells Colonize Lymph Node Areas Distinct from Slower Migrating Langerhans Cells. *Immunity*
33. Katakai, T., T. Hara, J. Lee, H. Gonda, M. Sugai, and A. Shimizu. 2004. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *International Immunology* 16:1133.
34. Saito, M., T. Iwawaki, C. Taya, and H. Yonekawa. 2001. Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nature Biotechnology*
35. Kaplan, D., M. Jenison, S. Saeland, W. Shlomchik, and M. Shlomchik. 2005. Epidermal langerhans cell-deficient mice develop enhanced contact hypersensitivity. *Immunity*
36. Kaplan, D.H., A. Kissenpfennig, and B.E. Clausen. 2008. Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models. *European journal of immunology*
37. Bennett, C., and M. Noordegraaf. 2007. Langerhans cells are required for efficient presentation of topically applied hapten to T cells. *Journal of Immunology*
38. Lenardo, M. 2003. Molecular regulation of T lymphocyte homeostasis in the healthy and diseased immune system. *Immunologic research*

39. Takahama, Y., T. Nitta, A. Mat Ripen, S. Nitta, S. Murata, and K. Tanaka. 2010. Role of thymic cortex-specific self-peptides in positive selection of T cells. *Seminars in immunology*
40. Zlotoff, D., and B. Schwarz. 2008. The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man. *Semin Immunopathol*
41. Friedl, P., A.T. den Boer, and M. Gunzer. 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nature Reviews Immunology*
42. Rudd, C., and A. Taylor. 2009. CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunological Reviews*
43. Arens, R., and S.P. Schoenberger. 2010. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunological Reviews*
44. Kronenberg, K., S. Brosch, F. Butsch, Y. Tada, N. Shibagaki, M.C. Udey, and E. von Stebut. 2010. Vaccination with TAT-Antigen Fusion Protein Induces Protective, CD8(+) T Cell-Mediated Immunity Against Leishmania Major. *J Investig Dermatol*
45. Biedermann, T., M. Röcken, and J. Carballido. 2004. TH1 and TH2 Lymphocyte Development and Regulation of TH Cell-Mediated Immune Responses of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*
46. Malissen, B. 2009. Revisiting the follicular helper T cell paradigm. *Nature Immunology*
47. Jordan, K.A., and C.A. Hunter. 2010. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol*
48. Pötl, J., C. Botteron, E. Tausch, X. Pedré, A.M. Mueller, D.N. Männel, and A. Lechner. 2008. Tracing functional antigen-specific CCR6 Th17 cells after vaccination. *PLoS ONE*
49. King, C., S. Tangye, and C. Mackay. 2008. T follicular helper (TFH) cells in normal and dysregulated immune responses. *Annual Reviews*
50. Laurent, C., N. Fazilleau, and P. Brousset. 2010. A novel subset of T-helper cells: follicular T-helper cells and their markers. *Haematologica*
51. Crotty, S., R. Johnston, and S. Schoenberger. 2010. Effectors and memories: Bcl-6 and Blimp-1 in T and B lymphocyte differentiation. *Nature Immunology*
52. Linterman, M., and C. Vinuesa. 2010. Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function. *Semin Immunopathol*
53. Nurieva, R.I., Y. Chung, D. Hwang, X.O. Yang, H.S. Kang, L. Ma, Y.-h. Wang, S.S. Watowich, A.M. Jetten, Q. Tian, and C. Dong. 2008. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity*
54. Deenick, E.K., A. Chan, C.S. Ma, D. Gatto, P.L. Schwartzberg, R. Brink, and S.G. Tangye. 2010. Follicular Helper T Cell Differentiation Requires Continuous Antigen Presentation that Is Independent of Unique B Cell Signaling. *Immunity*
55. Akiba, H., K. Takeda, Y. Kojima, Y. Usui, N. Harada, T. Yamazaki, J. Ma, K. Tezuka, H. Yagita, and K. Okumura. 2005. The role of ICOS in the CXCR5+ follicular B helper T cell maintenance in vivo. *J Immunol*
56. Bossaller, L., J. Burger, R. Draeger, B. Grimbacher, R. Knoth, A. Plebani, A. Durandy, U. Baumann, M. Schlesier, A.A. Welcher, H.H. Peter, and K. Warnatz. 2006. ICOS deficiency is associated with a severe reduction of CXCR5+CD4 germinal center Th cells. *J Immunol*
57. Reinhardt, R.L., H.-E. Liang, and R.M. Locksley. 2009. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nature Immunology*
58. Yusuf, I., R. Kageyama, L. Monticelli, R.J. Johnston, D. Ditoro, K. Hansen, B. Barnett, and S. Crotty. 2010. Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4

- Production Is Dependent on Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor (CD150). *The Journal of Immunology*
59. Linterman, M.A., and C.G. Vinuesa. 2010. Signals that influence T follicular helper cell differentiation and function. *Semin Immunopathol*
 60. Simpson, N., P. Gatenby, and A. Wilson. 2010. Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *ARTHRITIS & RHEUMATISM*
 61. Cobaleda, C., A. Schebesta, A. Delogu, and M. Busslinger. 2007. Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nature Immunology*
 62. Shapiro-Shelef, M., and K. Calame. 2005. Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology*
 63. Allman, D., and S. Pillai. 2008. Peripheral B cell subsets. *Current opinion in immunology*
 64. Batista, F., and N. Harwood. 2009. The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nature Reviews Immunology*
 65. Carrasco, Y.R., and F.D. Batista. 2006. B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. *Current opinion in immunology*
 66. Harwood, N.E., and F.D. Batista. 2010. Early events in B cell activation. *Annual Review of Immunology*
 67. Depoil, D., S. Fleire, B.L. Treanor, M. Weber, N.E. Harwood, K.L. Marchbank, V.L.J. Tybulewicz, and F.D. Batista. 2008. CD19 is essential for B cell activation by promoting B cell receptor-antigen microcluster formation in response to membrane-bound ligand. *Nature Immunology*
 68. Oracki, S.A., J.A. Walker, M.L. Hibbs, L.M. Corcoran, and D.M. Tarlinton. 2010. Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews*
 69. Pelletier, N., L.J. McHeyzer-Williams, K.A. Wong, E. Urich, N. Fazilleau, and M.G. McHeyzer-Williams. 2010. Plasma cells negatively regulate the follicular helper T cell program. *Nature Immunology*
 70. Maul, R., and P. Gearhart. 2010. AID and Somatic Hypermutation. *Advances in Immunology*
 71. Nutt, S.L., K.A. Fairfax, and A. Kallies. 2007. BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nature Reviews Immunology*
 72. Johnston, R.J., A.C. Poholek, D. Ditoro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A.L. Dent, J. Craft, and S. Crotty. 2009. Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science*
 73. Johnston, R.J., A.C. Poholek, D. DiToro, I. Yusuf, D. Eto, B. Barnett, A.L. Dent, J. Craft, and S. Crotty. 2009. Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. *Science*
 74. Nurieva, R.I., Y. Chung, G.J. Martinez, X.O. Yang, S. Tanaka, T.D. Matskevitch, Y.-h. Wang, and C. Dong. 2009. Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. *Science* 325:1001-1005.
 75. Kato, H., E.A. Gomez, A.G. Cáceres, H. Uezato, T. Mimori, and Y. Hashiguchi. 2010. Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis. *Int J Environ Res Public Health*
 76. Von Stebut, E. 2007. Cutaneous Leishmania infection: progress in pathogenesis research and experimental therapy. *Experimental dermatology*
 77. Lipoldová, M. 2006. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*
 78. von Stebut, E. 2007. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*

79. Caucig, P., D. Teschner, and S. Dinges. 2010. Dual Role of Interleukin-1 α in Delayed-Type Hypersensitivity and Airway Hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol* 2010
80. Kobayashi, K., and K. Kaneda. 2001. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE* 53:241–245 (2001)
81. Mendes, E. 1979. Transfer of delayed hypersensitivity to leishmanin (Montenegro reaction). *Cellular immunology*
82. Belkaid, Y., S. Mendez, and R. Lira. 2000. A natural model of Leishmania major infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *Journal of Immunology*
83. Ritter, U., J. Mattner, J.S. Rocha, C. Bogdan, and H. Körner. 2004. The control of Leishmania (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. *Microbes Infect*
84. Florian, C., T. Barth, A.K. Wege, D.N. Männel, and U. Ritter. 2010. An advanced approach for the characterization of dendritic cell-induced T cell proliferation in situ. *Immunobiology*
85. Lämmermann, T., and M. Sixt. 2008. The microanatomy of T-cell responses. *Immunological Reviews*
86. Gibson-Corley, K.N., P.M. Boggiatto, R.M. Mukbel, C.A. Petersen, and D.E. Jones. 2010. A deficiency in the B cell response of C57BL/6 mice correlates with loss of macrophage-mediated killing of Leishmania amazonensis. *Int J Parasitol*
87. Woelbing, F., S. Kostka, K. Moelle, Y. Belkaid, C. Sunderkoetter, S. Verbeek, A. Waisman, A. Nigg, J. Knop, and M. Udey. 2006. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fc γ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. *The Journal of Experimental Medicine*
88. Solbach, W., K. Forberg, and M. Röllinghoff. 1986. Effect of T-lymphocyte suppression on the parasite burden in Leishmania major-infected, genetically susceptible BALB/c mice. *Infect Immun* 54:909-912.
89. Weiss, R., S. Scheiblhofer, J. Thalhamer, T. Bickert, U. Richardt, B. Fleischer, and U. Ritter. 2007. Epidermal inoculation of Leishmania-antigen by gold bombardment results in a chronic form of leishmaniasis. *Vaccine*
90. Deisenhammer, F., G. Keir, B. Pfausler, and E.J. Thompson. 1996. Affinity of anti-GM1 antibodies in Guillain-Barré syndrome patients. *J Neuroimmunol*
91. Bustin, S. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of molecular endocrinology*
92. Kubista, M., J. Andrade, and M. Bengtsson. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*
93. Nolan, T., and R. Hands. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature protocols*
94. Zipper, H., H. Brunner, and J. Bernhagen. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic acids research*
95. Pfaffl, M. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*
96. Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G.-I. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, E.G. Pamer, D.R. Littman, and R.A. Lang. 2002. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity*
97. Rivera, F.J., M. Kandasamy, S. Couillard-Despres, M. Caioni, R. Sanchez, C. Huber, N. Weidner, U. Bogdahn, and L. Aigner. 2008. Oligodendrogenesis of adult neural

- progenitors: differential effects of ciliary neurotrophic factor and mesenchymal stem cell derived factors. *J Neurochem*
98. Florian, C., T. Langmann, B.H.F. Weber, and C. Morsczeck. 2008. Murine Müller cells are progenitor cells for neuronal cells and fibrous tissue cells. *Biochem Biophys Res Commun*
 99. Scharton-Kersten, T., and P. Scott. 1995. The role of the innate immune response in Th1 cell development following *Leishmania major* infection. *Journal of leukocyte biology*
 100. Bajénoff, M., J.G. Egen, L.Y. Koo, J.P. Laugier, F. Brau, N. Glaichenhaus, and R.N. Germain. 2006. Stromal cell networks regulate lymphocyte entry, migration, and territoriality in lymph nodes.
 101. Ritter, U., and A. Osterloh. 2007. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Medical microbiology and immunology*
 102. Castellino, F., A.Y. Huang, G. Altan-Bonnet, S. Stoll, C. Scheinecker, and R.N. Germain. 2006. Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature*
 103. Schaerli, P., K. Willmann, A.B. Lang, M. Lipp, P. Loetscher, and B. Moser. 2000. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *The Journal of Experimental Medicine*
 104. Haynes, N. 2008. Follicular associated T cells and their B-cell helper qualities. *Tissue Antigens*
 105. Finkelman, F.D., J. Holmes, I.M. Katona, J.F. Urban, M.P. Beckmann, L.S. Park, K.A. Schooley, R.L. Coffman, T.R. Mosmann, and W.E. Paul. 1990. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Annual Review of Immunology*
 106. Mosmann, T. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology*
 107. Stoecklinger, A., T.D. Eticha, M. Mesdaghi, A. Kissenpfennig, B. Malissen, J. Thalhamer, and P. Hammerl. 2010. Langerin⁺ Dermal Dendritic Cells Are Critical for CD8⁺ T Cell Activation and IgH {gamma}-1 Class Switching in Response to Gene Gun Vaccines. *The Journal of Immunology*
 108. Goodnow, C.C., C.G. Vinuesa, K.L. Randall, F. Mackay, and R. Brink. 2010. Control systems and decision making for antibody production. *Nature Immunology*

8. Anhang

Manuskript, das im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist:

Florian C., Barth T., Wege A.K., Männel D.N., Ritter U.

An advanced approach for the characterization of dendritic cell-induced T cell proliferation *in situ*.

(*Immunobiology*. 2010 Sep-Oct; 215(9-10):855-62. Epub Jun 9.)

Vorträge:

Florian C., Barth T, Botteron C, Männel DN, Ritter U (2010).

T cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs within distinct microcompartments

(14. Minisymposium Infektion und Immunabwehr)

Florian C., Barth T, Botteron C, Männel DN, Ritter U (2010).

The role of dendritic cell subtypes for the induction of distinct T-helper responses

(Regensburg International Graduate School of Life Sciences, Summer School „From molecule to disease“)

Posterpräsentation:

Florian C., Barth T., Botteron C., Männel DN, Ritter U (2010)

Priming of T cell subtypes occurs within distinct areas of skin-draining lymph nodes

40. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Leipzig

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die mir bei der Anfertigung dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Uwe Ritter, der mir dieses überaus interessante Thema mit den benötigten Mitteln zur Verfügung stellte. Lieber Uwe, Deine hilfreichen Anregungen, die stets konstruktiven Diskussionen und Dein beispielhafter Enthusiasmus waren für diese Arbeit von unschätzbarem Wert.

Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel möchte ich für Ihre konstruktive Diskussionsbereitschaft während meiner Seminare danken. Ebenso dem ganzen Institut für Immunologie.

Herrn Prof. Dr. Karl Kunzelmann möchte ich herzlich danken für die stets freundliche Kommunikation und die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der NWF III aus.

Bedanken möchte ich mich auch bei PD. Dr. Richard Weiss für die Übernahme des Mentorats von Seiten der Graduiertenschule aus.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Sven Mostböck bedanken, dass er mir so manche Methode beigebracht hat und für die Bereitstellung seines Wissens.

Ein Dank gilt auch Dr. Anja Lechner und Dr. Anja Wege für die Bereitstellung ihres Wissens. Des Weiteren gilt mein Dank den Operatoren des FACS-Aria Durchflusszytometers, Jaqueline Igl und Rüdiger Eder.

Ein großer Dank gilt auch Karin Holz, Dominic Schmidt und Catherine Botteron für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Bei Nicole Zimara und Max Schmid möchte ich mich bedanken für die tolle Atmosphäre im Labor während der letzten Wochen dieser Arbeit.

Luise Eder möchte ich danken für ihre gewissenhafte Arbeit, die mir viel Arbeit bezüglich Formalitäten erspart hat.

Ein großer Dank gilt meinen beiden Freunden und Kollegen, Thomas Barth und Wolfgang Ernst für die tolle Zusammenarbeit sowie die vielen Diskussionen und Anregungen bzgl. dieser Arbeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie bedanken. Meinem Bruder Stefan, der stets hinter mir gestanden hat. Meinen Eltern, die mich Zeit meines Lebens bestens unterstützen. Ohne sie wäre all das nie möglich gewesen.