

Charakterisierung der Rolle von CCR6 im Modell der Leishmaniose



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

vorgelegt von

Thomas Barth

aus

Nabburg

im Jahr 2011

Charakterisierung der Rolle von CCR6 im Modell der Leishmaniose



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

vorgelegt von

Thomas Barth

aus

Nabburg

im Jahr 2011

Diese Dissertation entstand im Zeitraum von Juli 2008 bis Februar 2011 unter der Anleitung von Frau Prof. Daniela N. Männel und Dr. Anja Lechner am Institut für Immunologie der Universität Regensburg.

Promotionsgesuch eingereicht am:25.02.2011.....

Fachmentorat:

Betreuer: Prof. Dr. Daniela N. Männel (Med. Fakultät)

1. Mentor: Prof. Dr. Markus Schnare (Institut für Immunologie, Marburg)

2. Mentor: Prof. Dr. Thomas Langmann (Med. Fakultät)

Prüfungsausschuss: Prof. Dr. Thomas Dresselhaus (Prüfungsvorsitz)

Prof. Dr. Daniela N. Männel (1. Prüfer)

Prof. Dr. Markus Schnare (2. Prüfer)

Prof. Dr. Thomas Langmann (3. Prüfer)

Prof. Dr. Reinhard Wirth (Ersatzprüfer)

Eidesstattliche Erklärung:

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter der Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Regensburg, den

Thomas Barth

Für meine Kinder Sofia, Elias und Vincent

**„Wissenschaft ist wie Sex.
Manchmal kommt etwas Sinnvolles dabei raus,
das ist aber nicht der Grund,
warum wir es tun.“**

Richard P. Feynman

(Nobelpreis für Physik, 1965)

1 Einleitung	16
1.1 Das Immunsystem	16
1.1.1 Die Zellen des angeborenen Immunsystems.....	16
1.1.2 Die Zellen des erworbenen Immunsystems.....	17
1.2 T Helper-Zell-Differenzierung	19
1.2.1 T Helper-Zell-Subpopulation.....	19
1.2.1.1 Entdeckung und Eigenschaften der T_H17 -Zellpopulationen.....	20
1.2.1.2 Die T_{reg} -Zellpopulation.....	23
1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren.....	25
1.3.1 Chemokine.....	25
1.3.1.1 Aufbau und Funktion von Chemokinen	25
1.3.1.2 Das Chemokin CCL20.....	26
1.3.2 Chemokinrezeptoren	27
1.3.2.1 Aufbau und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren.....	27
1.3.2.2 Der Chemokinrezeptor CCR6.....	28
1.4 Die Leishmaniose.....	30
1.4.1 Die Verbreitung der Leishmaniose.....	30
1.4.2 Der Parasit und seine Übertragung.....	31
1.4.3 Verschiedene Formen der Leishmaniose.....	32

1.4.4 Modell der Leishmaniose in der Maus.....	33
1.4.5 Leishmaniose und der CCR6	34
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	35
2 Material und Methoden.....	36
2.1 Material.....	36
2.1.1 Versuchstiere	36
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	37
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	38
2.1.3.1 Kulturmedium für primäre Lymphozyten aus Lymphknoten.....	38
2.1.3.2 Puffer für durchflusszytometrische Untersuchung.....	39
2.1.4 Kits	39
2.1.5 Enzyme.....	39
2.1.6 Antikörper/Konjugate.....	40
2.1.7 Oligonukleotide.....	43
2.1.8 Verbrauchsmaterialien und Geräte.....	44
2.2 Methoden	46
2.2.1 Infektion von Versuchstieren mit <i>L. major</i>	46
2.2.2 Kultivierung von Leishmanien	46
2.2.3 Herstellung von löslichem Leishmanien-Antigen.....	47

2.2.4	Isolation von primären Lymphknotenzellen.....	48
2.2.5	Präparation der Milz.....	48
2.2.6	Isolation der Leber.....	48
2.2.7	Isolation von Knochenmarkzellen.....	49
2.2.8	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	49
2.2.9	Durchflusszytometrie.....	50
2.2.10	Intrazelluläre Markierung mit Antikörpern	51
2.2.11	Intrazelluläre Markierung von Foxp3 mit einem Antikörper	51
2.2.12	Messung der Proliferationsrate mittels BrdU-Einbau.....	52
2.2.13	Apoptosemessung mit FLICA	52
2.2.14	CSFE-Markierung von Zellen.....	53
2.2.15	Polyklonale und antigenspezifische Stimulation.....	53
2.2.16	RNA-Präparation.....	54
2.2.17	Herstellung von cDNA.....	54
2.2.18	Isolierung genomicscher DNA.....	55
2.2.19	Qualitative PCR-Genotypisierung der CCR6 ^{-/-} -Mäuse.....	55
2.2.20	Quantitative PCR zur Bestimmung der Parasitenlast.....	57
2.2.21	Quantifizierung der Genexpression mittels PCR	59
2.2.22	Blutentnahme und Gewinnung von Serum.....	60

2.2.23	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA).....	60
2.2.24	Statistik.....	61
3	Ergebnisse.....	62
3.1	Verlauf der <i>L. major</i> Infektion in den WT- und CCR6 ^{-/-} -Mäusen.....	63
3.1.1	Schwellung der Mauspften nach Infektion.....	63
3.1.2	Zellzahl und Schwellung der Lymphknoten im Infektionsverlauf.....	64
3.1.3	Verteilung von Leukozyten-Subpopulationen in den Lymphknoten.	66
3.1.4	CCL20 Expression im ableitenden Lymphknoten.....	70
3.1.5	CD4 ⁺ CCR6 ⁺ -Zellen der WT-Mäuse im Verlauf der Infektion	71
3.2	Untersuchung der antiparasitären Antwort.....	74
3.2.1	Parasitenlast nach Infektion.....	74
3.2.2	Immunantwort der B-Zellen im Verlauf der Infektion.....	76
3.3	Die T _H 1-Immunantwort im Verlauf der Infektion im Lymphknoten.....	81
3.3.1	Expression von IL-12p35 und IL-12p40	81
3.3.2	T _H 1-Immunantwort.....	83
3.3.3	NK-Zellen im Verlauf der Infektion im Lymphknoten	85
3.3.3.1	IL-15-Expression	85
3.3.3.2	IL-17RA Expression auf NK-Zellen.....	86
3.3.4	Expression von IFN- γ nach Infektion	87

3.3.5 IFN- γ -Produktion nach polyklonaler Stimulation.....	88
3.4 T_H17 -Zellen im Verlauf der Infektion im Lymphknoten.....	90
3.4.1 IL-17-produzierende Zellen.....	90
3.4.2 Expression von IL-17, IL-21 und IL-22 im Verlauf der Infektion.....	92
3.4.3 IL-17-Produktion nach Stimulation.....	94
3.5 T_{reg} -Zellen im Verlauf der Infektion im Lymphknoten.....	95
3.5.1 Expression von IL-10 im Verlauf der Infektion.....	96
3.6 Proliferation und Apoptose.....	98
3.6.1 Proliferation von CD4 $^+$ und CD8 $^+$ Zellen	98
3.6.2 Proliferation nach SLA-Restimulation in vitro.....	100
3.6.3 CD4 $^+$ - und CD8 $^+$ -apoptotische Zellen in den Lymphknoten.....	102
4 Diskussion.....	104
4.1 Protektive Immunantwort in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen.....	105
4.1.1 Pfotenschwellung im Infektionsverlauf	105
4.1.2 Klassenwechsel der B-Zellen.....	106
4.1.3 CD4 $^+$ bzw. CD8 $^+$ T-Zellsubpopulation	107
4.2 Fehlregulation der Immunantwort in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen.....	110
4.2.1 Parasitenlast im Infektionsverlauf.....	110
4.2.2 T_H17 -Zellen im Verlauf der Infektion.....	110

4.2.3 T_{reg} -Zellen im Verlauf der Infektion.....	112
4.2.4 Untersuchung der NK-Zellpopulation.....	114
5 Zusammenfassung.....	115
6 Anhang.....	117
6.1 Abkürzungsverzeichniss.....	117
6.2 Veröffentlichungen.....	121
7 Literaturverzeichnis.....	123
8 Danksagung.....	129

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist im Laufe des Lebens einer Vielzahl von Krankheiten ausgesetzt. Unter anderem machen chemische und physikalische Einflüsse, aber vor allem auch eine Vielzahl von Mikroorganismen wie z. B. Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten krank. Die Untersuchung der Vorgänge, die im Kampf gegen diese Pathogene im Körper ablaufen, ist Gegenstand der immunologischen Forschung. Heute wissen wir, dass das menschliche Immunsystem aus zwei voneinander abgrenzbaren Teilen besteht: dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem. Diese beiden Teile funktionieren keineswegs unabhängig voneinander, sondern sie beeinflussen sich gegenseitig. Es entwickelte sich das Konzept der „Transitionalen Immunität“, das alle Prozesse umfasst, die zwischen der Wahrnehmung einer Infektion durch Zellen des angeborenen Immunsystems und der Aktivierung des erworbenen Immunsystems stattfinden (Pennington et al., 2005). Im Folgenden werden die wichtigsten Bestandteile und Funktionen der angeborenen und der erworbenen Immunität kurz vorgestellt.

1.1.1 Die Zellen des angeborenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, die es dem Organismus ermöglichen, schnell auf Pathogene zu reagieren. So bilden z.B. die Epithelien des Körpers eine physikalische Barriere gegen eindringende Krankheitserreger. Sollten Pathogene diesen

Schutz überwinden, können spezialisierte Zellen, die sogenannten Phagozyten, zu denen unter anderem Makrophagen und Neutrophile gehören, diese durch Phagozytose aufnehmen und zerstören. Neben der Bekämpfung ist die wichtigste Funktion dieser Zellen, die Information über die Infektion an das erworbene Immunsystem weiterzuleiten. Auch die zytotoxisch wirksamen natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sind wie Granulozyten direkte Effektorzellen. Eine weitere wichtige Funktion der Zellen des angeborenen Immunsystems ist die Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen, welche unter anderem die erworbene Immunantwort beeinflussen (Abbas et al., 2007).

1.1.2 Die Zellen des erworbenen Immunsystems

Im Verlauf der erworbenen Immunantwort kommt es zu einer antigenspezifischen Reaktion, die in einem lang anhaltenden Gedächtnis gegen das jeweilige Antigen mündet. Sie beruht auf der Wirkung von T- und B-Lymphozyten. Grundsätzlich gehören Immunreaktionen, die durch antigenspezifische zytotoxische T-Zellen und T_H -Zellen vermittelt werden, zur zellvermittelten Immunität, die einen der beiden Teile des erworbenen Immunsystems bilden. Der andere Teil ist die humorale Immunität, welche auf der Wirkung von Antikörpern beruht, die von B-Zellen produziert werden (Abbas et al., 2007). Zur Aktivierung einer antigenspezifischen Immunantwort kommt es in den lymphatischen Organen, wo sich ein Großteil der Lymphozyten befinden. In den lymphatischen Organen zeigen Zellen des angeborenen Immunsystems die Anwesenheit eines Pathogenes an, indem sie den T-Zellen bestimmte Antigene des Erregers präsentieren. Professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) sind dendritische Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Die Aktivierung von T-Zellen stellt einen sehr wichtigen Teil der

erworbenen Immunität dar, weil der Fortgang der weiteren Immunantwort durch die verschiedenen T_H -Zellsubpopulationen bestimmt wird. Auf die einzelnen T_H -Zellsubpopulationen und deren Funktion wird im nächsten Abschnitt eingegangen. Nach erfolgreicher Bekämpfung einer Infektion verhindern regulatorische Zellen ein „Überschießen“ der Immunantwort, indem sie hemmend auf die aktivierte Immunzellen wirken (Suri-Payer et al., 1998).

1.2 T Helper-Zell-Differenzierung

1.2.1 T Helper-Zell-Subpopulation

Die Einteilung der T-Helfer-Zellen begann in den späten 1980er Jahren durch Mosmann und Coffman (Mosmann et al., 1989). Im Gegensatz zu den zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen direkt eliminieren können, aktivieren die T_H -Zellen hauptsächlich weitere Leukozyten, wie Makrophagen und zytotoxische T-Zellen für die zelluläre Immunantwort. Des weiteren werden B-Zellen aktiviert, die für eine humorale Immunantwort nötig sind. Zur Aktivierung naiver T_H -Zellen bedarf es verschiedener Signale. Zuerst bindet der T-Zell-Rezeptor-Komplex an den Antigen/MHC-II-Komplex auf den APC. Weiter ist für die Aktivierung der T_H -Zellen, die Ligand-Bindung ko-stimulatorischer Rezeptoren, wie z.B. CD28 und Zytokinen wichtig.

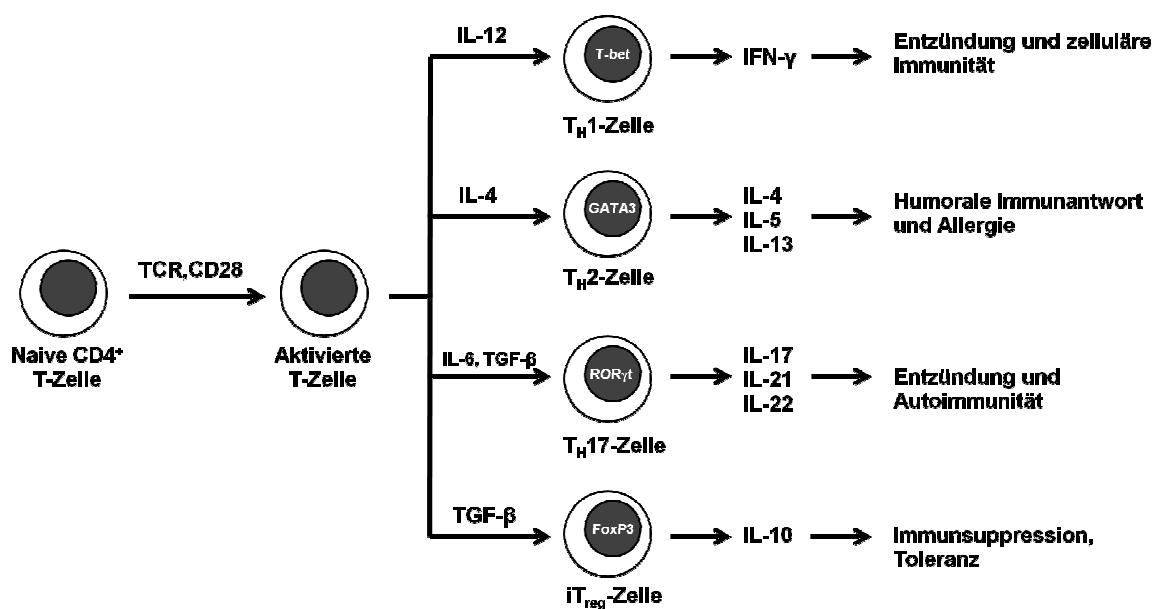


Abbildung 1.1: Übersicht über die T Helper-Zelldifferenzierung, modifiziert nach Awasthi et al., 2009.

Im weiteren Verlauf bestimmt das vorherrschende Zytokinmilieu die weitere Differenzierung der aktivierte T-Zellen. Durch das Zytokin IL-12 differenzieren aktivierte T_H -Zellen mithilfe des Transkriptionsfaktors T-bet zu T_H1 -Zellen. Durch die Produktion von IFN- γ fördern sie die Entzündung wie auch die zelluläre Immunantwort. Die zelluläre Immunantwort ist vor allem wichtig für die Bekämpfung intrazellulärer Erreger. Darunter fallen z.B. Viren, intrazelluläre Bakterien und Parasiten. Eine Entwicklung von T_H2 -Zellen wird durch das Zytokin IL-4 in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor GATA-3 ermöglicht. Diese T_H2 -Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 und aktivieren so B-Zellen. Diese humorale Immunantwort spielt bei der Bekämpfung extrazellulärer Organismen eine entscheidende Rolle. Ebenso kommt ihr eine große Bedeutung bei allergischen Reaktionen zu (Awasthi et al., 2009). Durch die Einteilung der T_H -Zellpopulationen konnte die Bekämpfung einer Vielzahl von Erregern erklärt werden (Abb. 1.1). Doch die Entstehung von Autoimmunkrankheiten oder die Bekämpfung einiger extrazellulärer Bakterien und Pilze forderte das Vorhandensein weiterer T_H -Zell-Subpopulationen.

1.2.1.1 Entdeckung und Eigenschaften der T_H17 -Zellpopulationen

Für selbstreaktive T_H1 -Zellen konnte in adaptiven Zelltransfer-Experimenten, im Fall des Myelin-Oligodendrozyten Glykoproteins, ein Transfer der Autoimmunität und somit ein Transfer der Krankheit in die Empfängermaus gezeigt werden (Das et al., 1997). Aber in verschiedenen Mäusen mit defizienter T_H1 -Immunantwort, kam es trotzdem zu einer Ausbildung der Experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) (McGeachy et al., 2008). Im Jahre 2000 konnte ein weiterer Bindungspartner für das Protein IL-12p40 neben dem IL-12p35 identifiziert werden, und zwar p19. IL-12p40 und

IL-12p35 bilden zusammen IL-12, das für die T_H1 -Antwort wichtig ist. Aus den Untereinheiten IL-12p40 und p19 entsteht IL-23 (Oppmann et al., 2000). Da der IL-12-Rezeptor auf naiven T_H -Zellen und der IL-23-Rezeptor auf Effektorgedächtniszellen und aktivierten Effektorzellen exprimiert wird, nahm man zuerst eine förderliche Wirkung von IL-12 und IL-23 zu verschiedenen Zeitpunkten an (Parham et al., 2002). In einem richtungsweisenden Experiment wurde aber gezeigt, dass IL-12p35 defiziente Mäuse eine EAE ausbilden können, Tiere mit IL-12p40- bzw. IL-23p19- Defizienz jedoch nicht. Später wurde klar, dass IL-23 die Produktion von IL-17 in aktivierten T_H -Zellen induzieren kann. Daher wurde IL-23 eine entscheidenden Rolle für die Differenzierung einer neuen T_H -Zell-Subpopulation zugewiesen (Cua et al. 2003; Awasthi et al., 2009; Langrish et al., 2005). IL-23 spielt eine Rolle bei dem Erhalt der neuen T_H -Zell-Subpopulation, die durch die IL-17 Produktion gekennzeichnet ist (Aggarwal et al., 2003). Der neue Typus von T_H -Zellen wurde nach dem proinflamatorischen Zytokin IL-17 - also T_{H17} -Zelle - benannt (Harrington et al., 2005). Die Differenzierung der T_{H17} -Zellen läuft nach Aktivierung unter Einfluss der Zytokine IL-6 und TGF- β ab (Abb. 1). Der spezifische Transkriptionsfaktor für die Differenzierung der T_{H17} -Zellen ist ROR γ t. Der Zustand der T_{H17} -Zellpopulation wurde unter Anderem im Immunisierungsmodell mit Ovalbumin (OVA) näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bereits in naiven Mäusen ein aktiverter Status der T_{H17} -Zellen besteht. Der Befund dieser $CD4^+CCR6^+IL-17^+$ -Zellpopulation wurde anhand der erhöhten Expression von CD69 und CD44 und der verminderten Expression von CD62L und CD45RB nachgewiesen. Der CC-Chemokinrezeptor (CCR) 6 wurde auf allen T_{H17} -Zellen detektiert (Pötzl et al., 2008).

T_{H17} -Zellen sind im Fokus der Forschung, weil sie bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine zentrale Rolle spielen. Ein Beweis dafür wurde

in der EAE gezeigt. Hier wurden IL-17 produzierende T_H -Gedächtniszellen in gesunde Mäuse transferiert. Der Transfer führte zur Auslösung der Autoimmunerkrankung in den Empfängertieren (Langrish et al., 2005). Die EAE bei Mäusen ist der beim Menschen auftretenden Multiplen Sklerose sehr ähnlich. Bei Patienten mit Multipler Sklerose wurde an den Entzündungsherden im Gehirn eine T-Zell-vermittelte IL-17-Produktion nachgewiesen (Tzartos et al., 2008). Auch in der rheumatoiden Arthritis korreliert das Auftreten von T_H17 -Zellen und IL-17 in den Gelenken mit dem Krankheitgeschehen. Dadurch wird durch Synovialzellen eine vermehrte Produktion von proinflamatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 oder TNF induziert. Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen wie chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis ulcerosa) oder der Psoriasis wurden vermehrt T_H17 -Zellen und IL-17 am Ort der Erkrankung nachgewiesen (Fujino et al., 2003; Zaba et al., 2007).

Obwohl T_H17 -Zellen bei Autoimmunkrankheiten entdeckt wurden, spielen sie auch eine wichtige Rolle bei der Wirtsabwehr von Infektionen. Für viele Infektionen wurde eine Induktion der IL-17-Produktion von T_H17 -Zellen nachgewiesen, z.B. bei der Infektion mit *Borrelia burgdorferi* und der daraus resultierenden Lyme-Borreliose oder der Infektion mit dem Gram-negativen Bakterium *Klebsiella pneumoniae* in der Lunge (Codolo et al., 2008, Aujla et al., 2008). Die biologische Aktivität von IL-17 in Infektionen ist charakterisiert durch die Induktion der Produktion von proinflamatorischen Mediatoren, wie IL-1, IL-6, TNF α , CXCL8, G-CSF und GM-CSF von epidermalen, endothelialen und anderen Stromazellen am Ort der Entzündung. Dies führt unter anderem auch zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen als erste Linie der Verteidigung des Immunsystems (Ouyang et al., 2008).

1.2.1.2 Die T_{reg} -Zellpopulation

Etwa zur gleichen Zeit etablierte sich eine weitere T-Zell-Subpopulation: die regulatorischen T-Zellen (Levings et al., 2005; Suri-Payer et al., 1998). Diese Zellen werden in Gegenwart von TGF- β generiert (Abb. 1) und können die Proliferation von Leukozyten durch Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, TGF- β) inhibieren. Das Zytokin IL-10 wirkt dabei vor allem auf T-Lymphozyten und Makrophagen. IL-10-defiziente Tiere leiden an chronischer Enterocolitis (Kühn et al., 1993). Also verhindert IL-10 ein Überschießen der Immunantwort. Weiter charakteristisch für T_{reg} -Zellen ist die Expression von CD25 an der Oberfläche und von Foxp3, einem intrazellulären Transkriptionsfaktor. CD25 ist die α -Kette des IL-2 Rezeptors, die erst nach Antigen-spezifischer Aktivierung auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wird, wohingegen die β - und γ -Untereinheit ständig vorhanden sind. Man unterscheidet natürliche T_{reg} -Zellen (nT_{reg}), die man von Geburt an trägt, von den induzierbaren T_{reg} -Zellen (iT_{reg}), die direkt infolge einer Entzündungsreaktion gebildet und wieder abgebaut werden (Faria et al., 2006; Wan et al., 2006). So schützen T_{reg} -Zellen z.B. vor Autoimmunität. Gezeigt wurde dies durch einen Transfer von CD4 $^{+}$ CD25 $^{-}$ -Zellen aus BALB/c-Mäusen in BALC/c athymic nude Mäuse, denen z.B. der Thymus fehlt. Diese Mäuse entwickeln nach dem Transfer spontan verschiedenste Autoimmunreaktionen, wie Gastritis, Arthritis oder Glomerulonephritis. Transferiert man aber in einem bestimmten Zeitfenster auch noch CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ -Zellen, so sind die BALB/c athymic nude Mäuse vor diesen Autoimmunkrankheiten geschützt (Sakaguchi et al., 1995). Ein Teil der regulatorischen T-Zellen exprimiert auch den Rezeptor CCR6 auf der Oberfläche. Bei Untersuchungen von Patientinnen mit Brustkrebs wurde eine Anreicherung von CD4 $^{+}$ CCR6 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ -Zellen im Tumorgewebe gezeigt. Weiter korreliert diese Anreicherung mit einer

verminderten CD8⁺IFN- γ ⁺-Zellpopulation. Somit sinkt fatalerweise mit der Anreicherung dieser CCR6⁺ T_{reg}-Zellen die Überlebenschance der Patienten (Xu et al., 2010). T_{reg} sind also nicht nur schützend, sondern in einigen Fällen führt die Anwesenheit dieser Zellen auch zu einer unerwünschten, manchmal fatalen Unterdrückung des Immunsystems.

1.3 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die im Blut zirkulierenden naiven T-Zellen wandern über das hohe Endothel der lymphatischen Gefäße in die Lymphknoten (Girard et al., 1995). Diese Migration geschieht über spezielle Oberflächenmoleküle, den Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren auf den Zellen. Einige der wichtigsten Moleküle für die Migration von naiven T-Lymphozyten in den Lymphknoten sind das Adhäsionsmolekül CD62L und der Chemokinrezeptor CCR7 (Forster et al., 1999; Warnock et al., 1998). Nach der Aktivierung und Proliferation verlassen diese Zellen den Lymphknoten durch die efferenten Lymphgefäß, zirkulieren im Blut und migrieren in die Peripherie. Die Migration von Leukozyten an den richtigen Ort ist unter Anderem von der Chemokin-Chemokinrezeptor Wechselwirkung abhängig. Die Selektivität der Migration wird durch die richtige Kombination von Adhäsionsmolekülen und Chemokinen gesteuert. So konnte gezeigt werden, dass z.B. CCR8 für die Migration von T_H2-Zellen spezifisch ist (Cosmi et al., 2001). Deswegen können Chemokinrezeptoren auch als Marker zur Klassifizierung verschiedener T_H-Zell-Subpopulationen verwendet werden. Dies ermöglicht den Einsatz von durchflusszytometrischen Methoden zur Identifizierung und Sortierung verschiedener T_H-Zellen. Damit wird eine bessere Untersuchung der Funktion dieser Zellen erlaubt.

1.3.1 Chemokine

1.3.1.1 Aufbau und Funktion von Chemokinen

Chemokine sind basische, chemotaktische Zytokine mit einem Molekulargewicht von 8-14 kDa. Sie sind für die Steuerung der Migration von

Leukozyten durch den Organismus verantwortlich. Weiter spielen sie bei der Differenzierung von hämatopoetischen Zellen, Organogenese und Angionese eine zentrale Rolle (Baggiolini, 1998; Rollins, 1997; Zou et al., 1998). Sie werden einerseits akut während der Immunantwort induziert von aktivierten Leukozyten und andererseits konstitutiv von Gewebszellen produziert. Dabei binden die Chemokine an Heparan-Sulfat Proteoglykanen auf Endothelzellen und vermitteln die Rezirkulation und Positionierung der Leukozyten. In der Maus wurden mehr als 30 Chemokine identifiziert (Zlotnik et al., 2000). Sie werden aufgrund ihrer N-terminalen, konservierten Cystein-Reste in vier Klassen unterteilt. Die zwei größten Klassen bilden die CC- und CXC-Chemokine. Bei den CC-Chemokinen befinden sich zwei Cysteine in direkter Nachbarschaft. CXC-Chemokine haben in ihrer Aminosäuresequenz eine, CX₃C-Chemokine drei beliebige Aminosäuren zwischen den beiden Cysteinen. Eine weitere Gruppe bilden die Chemokine, die nur einen N-terminalen Cystein-Rest besitzen, die CX-Chemokine. Die Chemokine wirken durch die Bindung an Chemokinrezeptoren (siehe 1.3.3). Dabei kann in den meisten Fällen ein Chemokin an verschiedene Rezeptoren bzw. ein Rezeptor verschiedene Chemokine binden (Baggiolini, 1998).

1.3.1.2 Das Chemokin CCL20

CCL20 besteht aus drei β -Faltblättern und einer α -Helix ein Motiv, das allen Chemokinen gemeinsam ist. Wie eingangs erwähnt (siehe 1.3.2.1), binden Chemokine meist an mehrere verschiedene Chemokinrezeptoren. Das Chemokin CCL20 bildet dabei eine Ausnahme, da es selektiv an den Chemokinrezeptor CCR6 bindet. Umgekehrt bindet CCR6 unter den Chemokinen ausschließlich CCL20 (Baba et al., 1997; Varona et al., 1998). Ein

weiterer Bindungspartner für CCR6 ist das β -Defensine 4 (Röhrl et al., 2010). Die Monospezifität von CCL20/CCR6 zwischen den Chemokinen und deren Rezeptoren wurde durch eine NMR-Studie aufgeklärt (Perez-Canadillas et al., 2001). Die Selektivität von CCL20 kann mit der starren Konformation des N-terminalen DCCL-Motivs und der Fuge zwischen dem N-terminalen loop und der β_2 - β_3 -Haarnadelschleife, die hier viel enger zusammenliegt als bei anderen Chemokinen, erklärt werden. CCL20 kann induziert oder konstitutiv gebildet werden und spielt bei der Rezirkulation von Leukozyten in sekundär lymphatische Organe und nichtlymphatische Gewebe eine wichtige Rolle. Besonders konnte CCL20 bei diversen Autoimmunerkrankungen in erhöhtem Maß nachgewiesen werden. So detektierte man in den Läsionen von Psoriasis-Patienten oder bei Patienten, die von der atopischen Dermatitis betroffen sind, einen erhöhten Plasmaspiegel an CCL20. Die erhöhte Menge an CCL20 korrelierte mit der Einwanderung von autoreaktiven T-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen in die Epidermis (Homey et al., 2000; Nakayama et al., 2001).

1.3.2 Chemokinrezeptoren

1.3.2.1 Aufbau und Signaltransduktion von Chemokinrezeptoren

Es wurden bislang 19 verschiedene Chemokinrezeptoren identifiziert. Diese lassen sich ebenso wie die Chemokine, in CC-, CXC-, CX₃C- und XC-Chemokinrezeptoren einteilen. Sie gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die strukturell zu den Sieben-Transmembran-Domänen-Rezeptoren zählen (Murphy et al., 2000). Nachdem die Chemokine an den passenden Rezeptor der Leukozyten binden, erfolgt die intrazelluläre Signaltransduktion durch GTP-bindende (G)-Proteine (Mackay, 2001). Dabei

spaltet das GTP die Untereinheiten des G-Protein-Komplexes in die α - und die $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Die so aktivierte G-Proteine leiten nun die exogenen Signale in das Zellinnere weiter bis es zur Bildung der sogenannten second messenger Moleküle, Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacetylglycerol (DAG), kommt. Durch IP₃ wird die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem Endoplasmatischen Reticulum (ER) veranlasst. DAG aktiviert die Proteinkinase C. Beide Moleküle bewirken die Expression von Proteinen, die für Überleben, Differenzierung, Proliferation oder Apoptose der Zelle verantwortlich sind (Curnock et al., 2002).

1.3.2.2 Der Chemokinrezeptor CCR6

Hauptsächlich exprimieren B-Zellen, unreife dendritische Zellen, sowie T-Zellen CCR6 auf ihrer Oberfläche (Dieu et al., 1998; Iwasaki et al., 2000; Nakayama et al., 2001). Für alle drei Zellpopulationen ist eine chemotaktische Wirkung von CCL20 beschrieben. Im Falle der B-Zellen wurde dies durch einen funktionales Adhäsions-Experiment gezeigt (Meissner et al., 2003). Auch konnte der Nachweis geliefert werden, dass CCR6 durch Bindung von CCL20 maßgeblich bei der Migration von dendritischen Zellen beteiligt ist. Denn bei CCR6^{-/-}-Mäusen wurde ein Defekt bei der Migration von dendritischen Zellen in die Darm-Mukosa sowie bei DTH Reaktionen festgestellt (Cook et al., 2000; Varona et al., 2001). Später wurde die Expression von CCR6 auch auf spezialisierten T-Zellen gefunden, die phänotypisch und funktionell der Klasse der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen zuzuordnen sind (Fitzhugh et al., 2000). CCL20 wirkt auf CCR6-positive T-Zellen ebenfalls chemotaktisch. Allerdings wurde die Expression von CCR6 nach Aktivierung dieser Zellen verschieden interpretiert. So konnte nachgewiesen werden, dass CCR6 nach Bindung von

CCL20 oder nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors bzw. nach Zugabe von IL-2 nicht vermehrt auf der Oberfläche der Zellen exprimiert wurde (Greaves et al., 1997; Liao et al., 1999). Ebert et al. zeigten, dass nach einer Aktivierung an der Oberfläche von T_H -Zellen CCR6 exprimiert wird (Ebert et al., 2002). Eine genauere Analyse der Effektorzellen ergab später, dass T_H17 - und T_{reg} -Zellen zu den CCR6⁺-Effektorzellen gehören. Die Rezeptor-Expression wird durch TGF-β induziert und ist vom Transkriptionsfaktor ROR γ t unabhängig. Ebenso induziert TGF-β die Expression von Foxp3, dem Transkriptionsfaktor für T_{reg} -Zellen (Kleinewietfeld et al., 2005). Vermittelt durch CCL20 können so diese CCR6⁺ T_H17 - bzw. T_{reg} -Zellen zum Ort der Entzündung migrieren. Im Modell der EAE von CCR6-defizienten Mäusen ist die Zellzahl der T_H17 - und T_{reg} -Zellen im Gehirn der Mäuse reduziert. Dies spricht für eine CCR6-abhängige Migration dieser Zelltypen zum Ort der Entzündung (Korn et al., 2007). Bei der Immunabwehr von Bakterien, wie in einem Mausmodell mit Mykobakterium bovis gezeigt, wirkt sich eine CCR6-Defizienz negativ auf die Bekämpfung der Bakterien aus. Eine Untersuchung der Lungenflüssigkeit zeigte in CCR6^{-/-}-Mäusen eine Reduktion der TCR- α/β^+ -T-Zellen und auch eine Reduktion von NKT-Zellen, die normalerweise eine frühe IFN- γ -Antwort gegen die Bakterien induzieren würden. Im weiteren Verlauf der Infektion wird dieser Effekt ausgeglichen und die Bakterien können erfolgreich bekämpft werden (Stolberg et al., 2011).

1.4 Die Leishmaniose

1.4.1 Die Verbreitung der Leishmaniose

In über 88 Ländern der Tropen und Subtropen sind die verschiedenen Formen der Leishmaniose verbreitet (Abb. 1.2). Die Parasiten kommen aber auch im Mittelmeerraum und in Mittelasien vor, während Australien frei von Leishmanien ist. Die WHO schätzt, dass weltweit etwa 350 Mio. Menschen bedroht sind und ca. 12 Mio. Menschen mit den Erregern infiziert sind. Jährlich kommen etwa 2 Mio. Neuerkrankungen dazu. Die Verbreitung der Leishmaniose ist streng an das Vorkommen ihrer Vektoren, der Schmetterlingsmücken und Sandfliegen, gebunden (www.WHO.int, 2010).

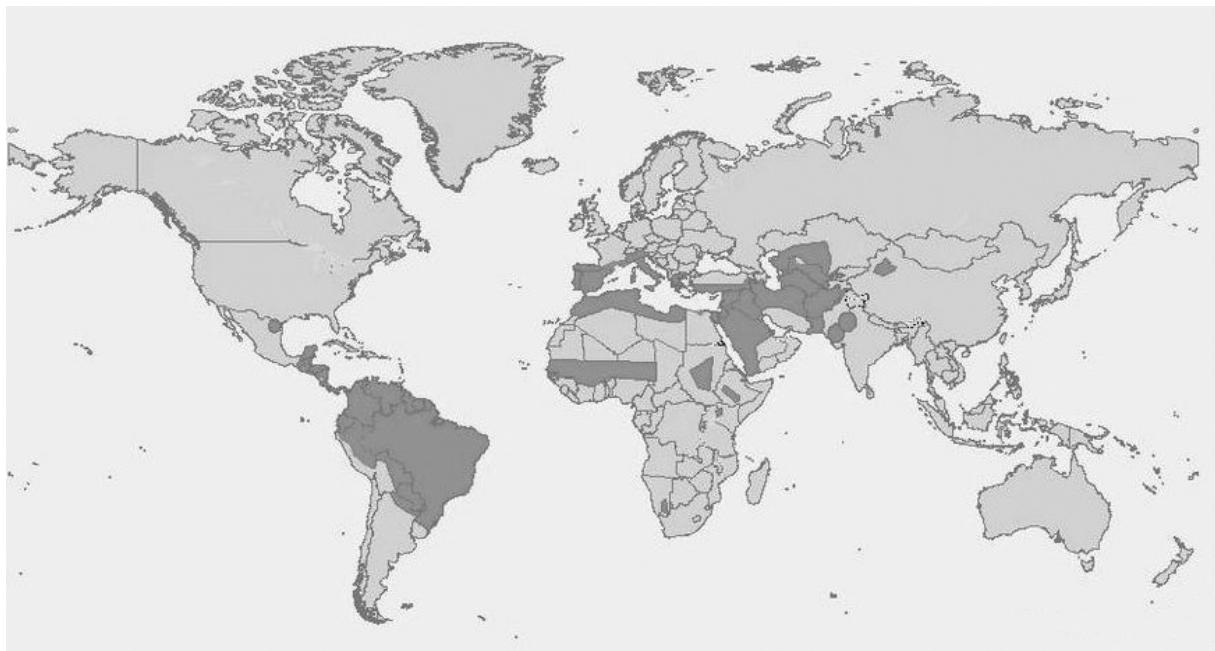


Abbildung 1.2: Die Verbreitungsgebiete der verschiedenen Formen der Leishmaniose (dunkelgrau) auf der Welt. modifiziert nach WHO, 2003. Die kutane Leishmaniose ist in Europa (Mittelmeerländer), in Afrika (Nordafrika, Sahel) und in Asien (Kleinasien, Mittlerer Osten, Südwestasien) weit verbreitet.

1.4.2 Der Parasit und seine Übertragung

Erreger der Leishmaniose sind parasitär lebende intrazelluläre Protozoen der Gattung *Leishmania*. Leishmanien sind teilweise begeißelte Einzeller, die durch die weiblichen Schmetterlings- oder Sandmücken (Familie Psychodidae) der Gattungen *Phlebotomus* (Asien und Afrika) sowie *Lutzomyia* (Mittel- und Südamerika) übertragen werden. Es gibt ca. 500 bekannte Arten von Phlebotomen, aber nur etwa 30 können Leishmanien übertragen. Neben dem Menschen gibt es in vielen Regionen der Erde auch ein Erregerreservoir unter Wild- und Haustieren. Dazu zählen wildlebende Nagetiere, bei der viszeralen Leishmaniose aber auch Karnivoren wie Hunde, die selbst schwer an Leishmaniose erkranken. Wird der Erreger vom Wirbeltier auf den Menschen, gelegentlich auch umgekehrt, übertragen, spricht man von einer Zoonose. Die Übertragung erfolgt durch den Stich einer infizierten Mücke bei der Blutmahlzeit. Die promastigoten Stadien werden von Phagozyten wie beispielsweise Makrophagen, dendritischen Zellen oder Langerhans-Zellen aufgenommen. Dort werden sie nur zum Teil zerstört und wandeln sich in die amastigote Form um. Diese vermehren sich in der parasitophoren Vakuole durch Zweiteilung, bis die Wirtszelle schließlich platzt. Die freigewordenen Amastigoten werden entweder erneut phagozytiert oder von einem geeigneten Vektor aufgenommen. Ebenso können infizierte zirkulierende Makrophagen vom Vektor aufgenommen werden. Im Darm der Mücke wandeln sie sich zu promastigoten, begeißelten Stadien um, die sich durch Zweiteilung stark vermehren. Dieser Prozess dauert etwa 4 bis 25 Tage. Schließlich sind Vorderdarm und Stechrüssel der Mücke mit Promastigoten gefüllt, die beim nächsten Blutmahl in einen neuen Wirt übertragen werden (Kayser et al., 2005) (siehe Abb. 1.3).

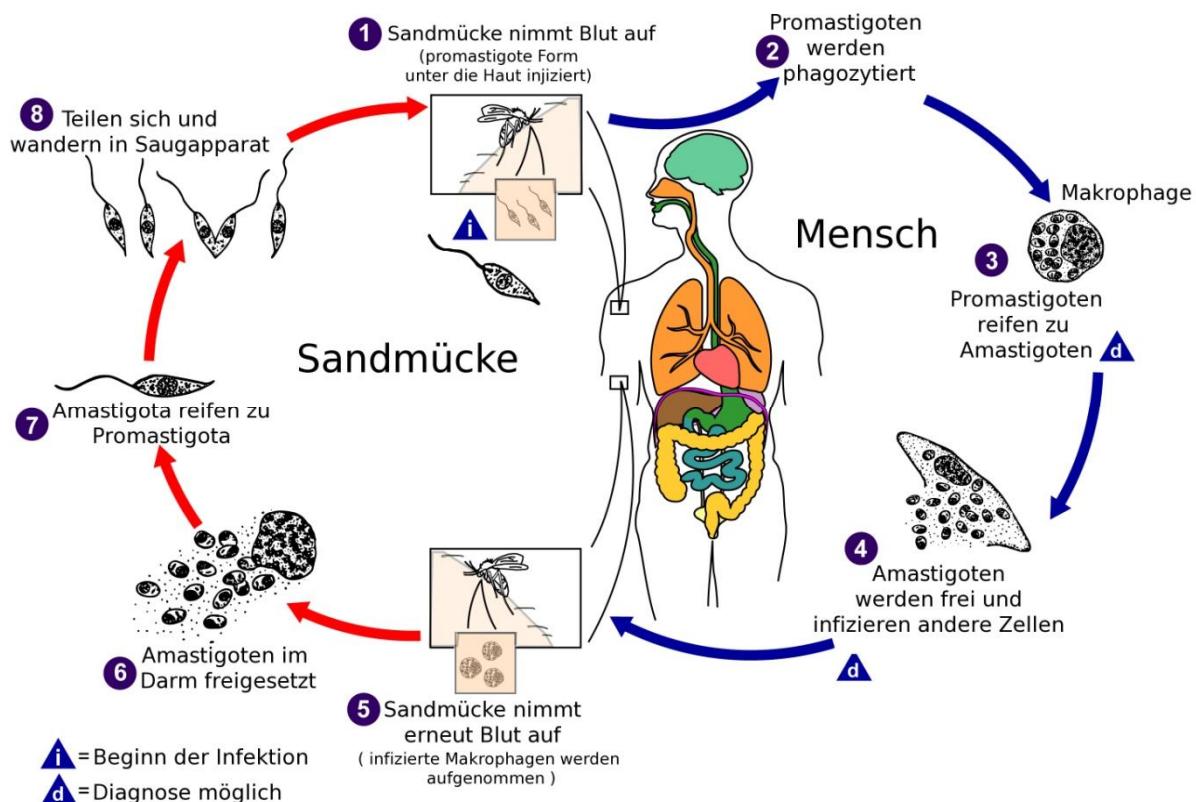


Abbildung 1.3: Übersicht über den Lebenszyklus von Leishmanien, modifiziert nach www.wikipedia.de, 2010.

1.4.3 Verschiedene Formen der Leishmaniose

Die verschiedenen Arten der Leishmanien können eine Vielzahl von klinischen Symptomen hervorrufen. Die viszerale Leishmaniose, auch Kala-Azar (schwarze Krankheit) genannt ist eine oft tödlich verlaufende Form der Leishmaniose. Pathologisch ist der Erreger in fast allen inneren Organen zu finden und verursacht eine Vielzahl von Funktionsstörungen des Körpers. Hervorgerufen wird sie z.B. durch *L. infantum* und *L. chagasi*.

Daneben gibt es die mukokutane Leishmaniose, bei der hauptsächlich die Schleimhäute der oberen Atemwege und die Nase betroffen sind. Kennzeichen sind Geschwür- und Ödembildung, sowie Gewebszerstörung. Am weitesten ist

allerdings die kutane Leishmaniose (Orientbeule) verbreitet. Die verschiedenen humanpathogenen Arten und Unterarten (über 10 beim Menschen) sind morphologisch nicht unterscheidbar. Zu diesen zählen unter anderem in der „alten Welt“ *Leishmania (L.) major*, *L. infantum*, *L. donovani* und *L. tropica*. In der „neuen Welt“ kommen vor allem die Arten *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. chagasi* und *L. brasiliensis* vor (Kayser et al., 2005).

1.4.4 Modell der Leishmaniose in der Maus

Am Modell der Leishmaniose in der Maus hat man viel über T-Zell-Antworten gelernt. Bei den resistenten Inzuchtstämmen C57BL/6 oder CBA bildet sich die Hautläsion nach 4 bis 5 Wochen zurück. Im Gegensatz dazu werden empfängliche Mausstämme wie z.B. BALB/c schwer krank und vermögen die Infektion nicht unter Kontrolle zu halten. Um eine Leishmanien-Infektion unter Kontrolle zu halten, müssen die befallenen Wirtszellen aktiviert werden: Für die Makrophagen-Aktivierung sind aktivierte T_H1 -Zellen entscheidend, die durch ein IFN- γ -Signal die NO-Synthetase der Makrophagen induzieren. Das produzierte NO ist für die intrazellulären Parasiten tödlich. Für die Entwicklung und Erhaltung einer T_H1 -Immunantwort ist das Zytokin IL-12, das überdies die Entwicklung einer T_H2 -Antwort inhibiert, unabdingbar. Es ist also eine überwiegende T_H1 -Immunantwort, welche resistente Mäuse, wie auch Menschen nach einer Leishmaniose-Infektion gesunden lässt. Die Interaktionen zwischen Parasit und Wirtszelle („cross talk“) sind äußerst komplex und werden erst in Ansätzen verstanden. Die aufgenommen Leishmanien verlieren ihre Geißel und aus der extrazellulären, promastigoten Form entsteht eine intrazelluläre, amastigote Form. Dieser Wechsel ist für das Überleben des Parasiten wichtig, da er den Wirt dazu bringt, antiparasitäre Mechanismen

einzustellen. So produziert die Wirtszelle anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β und somit wird die T_H1 -Antwort-induzierende IL-12-Produktion eingestellt. Die Empfänglichkeit der BALB/c-Mäuse ist durch eine überschießende T_H2 -Immunantwort bedingt, die kurz nach der Infektion einsetzt und durch IL-4 und IL-10 aufrechterhalten wird. Die durch eine T_H2 -Immunantwort stimulierten Antikörper spielen keine Rolle bei der Elimination des intrazellulären Parasiten und vermitteln keinen Schutz vor der Infektion (Ritter, U., 2010).

1.4.5 Leishmaniose und der CCR6

Über die Rolle des CCR6 während der Immunantwort in *L. major* infizierten C57BL/6 Mäusen, ist wenig bekannt. Der Rezeptor wird vor allem auf naiven B-Zellen, auf T-Zellsubpopulation, wie T_H17 - und T_{reg} -Zellen exprimiert. Die Aufgabe von CCR6 ist die Navigation der Zellen durch den Organismus zum Ort der Entzündung, wie oben mehrfach beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von CCR6 die NO-Produktion von C57BL/6 Makrophagen *in vitro* nicht beeinflusst und somit die NO-abhängige Bekämpfung der Parasiten nicht beeinträchtigt ist. Auch ist die Migration von CD4 $^+$ -Zellen zum Entzündungsherd in C57BL/6 CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen vermindert (Lechner et al., 2006). Das heißt, CCR6 ist mitverantwortlich für die Migration von CD4 $^+$ -Zellen zum Ort der Entzündung. Bei der mukosalen Form der Leishmaniose wurden im Menschen CD4 $^+$ - T_H17 -Zellen zusammen mit Neutrophilen am Ort der Infektion gezeigt (Boaventura et al., 2010). Wahrscheinlich ist in CCR6-defizienten C57BL/6-Mäusen die Migrationsfähigkeit der T_H17 -Zellen beeinträchtigt, so dass weniger T_H17 -Zellen zum Ort der Entzündung wandern.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Vor und während der Immunantwort vermitteln Chemokinrezeptoren, aktiviert durch ihre Liganden, die Migration von Zellen an den Ort ihrer Bestimmung. So wandern z.B. T_{H17} - und T_{reg} -Zellen mit Hilfe von CCR6 zum Ort der Entzündung (Korn et al., 2007). Es ist aber wenig darüber bekannt, welchen Einfluss der CCR6 auf andere Funktionen der Zellen, wie z.B. Proliferation, Apoptose usw. hat.

In dieser Arbeit sollten die Auswirkungen einer CCR6-Defizienz in resistenten C57BL/6 Mäusen auf die Immunantwort gegen eine *L. major*-Infektion behandelt werden. Da die Immunantwort gegen Leishmanien hauptsächlich von T-Zellen abhängt, könnte der Rezeptor eine wichtige Rolle für die Bekämpfung der Leishmaniose spielen. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, welchen Einfluss diese Defizienz auf die proinflamatorisch wirkenden T_{H17} -Zellen und die regulatorischen T_{reg} -Zellen im Verlauf der Infektion hat. So sollten unter anderem Parameter, wie Zytokinproduktion, Proliferation oder Apoptose untersucht werden. Weiter sollten die indirekten Auswirkungen der CCR6-Defizienz durch z.B. veränderte Zytokinproduktion auf andere Zellpopulationen, wie NK-Zellen oder $CD8^+$ zytotoxische Zellen untersucht werden, die durch ihre $IFN-\gamma$ -Produktion maßgeblich an der Parasitenbekämpfung teilhaben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Allen Versuchstieren standen Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Für die Versuche wurden Mäuse im Alter zwischen 6 und 16 Wochen verwendet. Alle Versuche wurden nach den FELASA-Richtlinien durchgeführt und waren von den lokalen Behörden genehmigt (AZ 54.2531.1-07/06).

C57BL/6: Die Mäuse wurden von den Firmen Charles River (Sulzfeld) und Janvier (Le Genest, Frankreich) bezogen und unter specific pathogen free (SPF) Bedingungen gehalten. Im Folgenden werden sie als WT-Mäuse bezeichnet.

CCR6^{-/-}: Diese Mäuse wurden von der Firma The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen und unter SPF-Bedingungen als Eigenzucht weiter geführt. Kennzeichnend für den auf C57BL/6-Hintergrund hergestellten Mausstamm ist, dass *E. coli lacZ* unter dem CCR6 Promotor, welches für β -Galactosidase kodiert, exprimiert wird. Des Weiteren werden sie als CCR6^{-/-}-Mäuse bezeichnet.

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

β-Mercaptoethanol	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach
Agarose	GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, München
Carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe
Caspase Inhibitor VI	Merck, Darmstadt
5xcDNA-Synthese Puffer	Promega, Mannheim
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, München
CpG ODN 1668	Eurofins MWG/Operon, Ebersberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
dNTP-Mix	Promega, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach
HANKS Puffer	PAA Laboratories, Pasching
HEPES	Sigma-Aldrich, München

Incomplete Freund's Adjuvans (IFA)	Sigma-Aldrich, München
Ovalbumin (OVA)	Sigma-Aldrich, München
Para-Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach
Percoll	Amersham, Uppsala, Schweden
Phosphat-gepufferte Salinelösung (PBS)	PAA Laboratories, Pasching
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching
Tissue-Tek	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Trypanblau	Sigma-Aldrich, München
Trypsin/EDTA	PAN, Biotech GmbH, Aidenbach

2.1.3 Puffer und Lösungen

2.1.3.1 Kulturmedium für primäre Lymphozyten aus Lymphknoten

RPMI 1640, 10 % (V/V) FCS, 50 µM β-Mercaptoethanol, 100 U/ml Penicillin, 100 U/ml Streptomycin

2.1.3.2 Puffer für durchflusszytometrische Untersuchung

PBS, 2 % FCS

2.1.4 Kits

Apoptose Detection Kit Caspasis 3 & 7	Immunochemistry Technologies LCC, Blomington, USA
BD OptEIA Substrat Kit	BD Biosciences, Heidelberg
BrdUFlow Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
DNA Purification Kit	Promega, Mannheim
ELISA: - mouse IFN- γ - mouse IL-17	R&D Systems, Minneapolis, USA
Nucleo Spin RNA II	Macherey-Nagel, Düren

2.1.5 Enzyme

Absolute SYBR Green Fluorescin	Thermo Scientific, Schwerte
Collagenase D	Roche, Mannheim

DNasel	Invitrogen, Karlsruhe
goTaq-Mastermix	Promega, Mannheim
iQ SYBR-Green Super Mix	BIO-RAD, München
M-MLV Punktmutation Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim

2.1.6 Antikörper/Konjugate

Verwendung	Spezifität	Konjugat	Klon	Hersteller
Durchflusszytometrie	B220	Biotin	RA3-6B2	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	B220	PE	RA3-6B2	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	B220	PerCP-Cy5.5	RA3-6B2	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	Maus anti-BrdU	FITC	B44	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CCR6	FITC	140706	R&D Systems
Durchflusszytometrie	CCR6	PE	140706	R&D Systems
Durchflusszytometrie	CCR6	-	140706	R&D Systems
Durchflusszytometrie	CD3ε	AF 488	145.2C11	eBioscience

Stimulation	CD3ε	-	145.2C11	Hybridom-Zell Überstand
Durchflusszytometrie	CD4	AF 647	YTS 191.1	AbD Serotec
Durchflusszytometrie	CD4	APC	RM4-5	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD4	eFlour450	RM4-5	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD4	PerCP	RM4-5	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD4	Pacific Blue	RM4-5	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD8a	AF 700	53-6.7	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD8a	APC	53-6.7	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD8a	PE	53-6.7	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD11b	APC	M1/70	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD11b	PE	M1/70	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD25	APC	PC61 5.3	eBioscience
Durchflusszytometrie	CD44	APC	IM7	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD44	Biotin	IM7	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD45.2	Biotin	104	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	CD62L	PE	HRL1	BD Biosciences

Durchflusszytometrie	Foxp3	FITC	FJK-16s	eBioscience
Durchflusszytometrie	Gr.1	FITC	RB6-8C5	BD Biosciences
ELISA	IgG1	HRP	6F7	Sigma
ELISA	IgG2a	HRP	M4434	Sigma
Durchflusszytometrie	IFN- γ	APC	XM61.2	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	IL-17A	AF 488	TC11-18H10	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	IL-17A	FITC	TC11-18H10	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	IL-17A	PE	TC11-18H10	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	IL-17R	APC	PAJ-17R	eBioscience
Durchflusszytometrie	NK1.1	Biotin	PK 136	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	NK1.1	PE	PK 136	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	NKp46	PE	29A1.4	BD Biosciences
Durchflusszytometrie	Ziege anti-Ratte	AF 488	A-11066	Invitrogen
Durchflusszytometrie	Ziege anti-Ratte	AF 647	A-21247	Invitrogen
Durchflusszytometrie	Strepavidin	Cy5	-	Dianova

Durchflusszytometrie	Strepavidin	Pacific Orange	-	Invitrogen
Durchflusszytometrie	TNF	APC	AP6-XT22	BD Biosciences

2.1.7 Oligonukleotide

β-Aktin forward	5'-AGAGGGAAATCGTGCCTCAC- 3'
β-Aktin reverse	5'-AGGCCGCTTATGTTGAAACC- 3'
CCL20 forward	5'-TGCTATCATCTTCACACGA- 3'
CCL20 reverse	5'-ATCTTCTTGACTCTTAGGCTG- 3'
CCR6 GS (E;T)	5'-AAAACCCAAGTGTGGTGGCATGAG- 3'
CCR6 GS (E1)	5'-CCCTAGAAGAGGTCAGAAACTTCAC- 3'
CCR6 NEO (T)	5'-GGGTGGGATTAGATAAATGCCTGCTCT- 3'
IFN-γ forward	5'-ACCTGGTAGAAGTGTGATGCCAGGCA- 3'
IFN-γ reverse	5'-CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA- 3'
IL-4 forward	5'-TGTCCCTTCCCTGCGGTA- 3'
IL-4 reverse	5'-ACTCGAGCAGACATCCCGAAG- 3'
IL-10 forward	5'-ACCTGGTAGAAGTGTGATGCCAGGCA- 3'
IL-10 reverse	5'-CTATGCAGTTGATGAAGATGTCAAA- 3'
IL-12a/p35 forward	5'-TGTCAATCACGCTACCTCCTC- 3'
IL-12a/p35 reverse	5'-TTTCTCTGGCCGTCTCAC- 3'
IL-12b/p40 forward	5'-TCAGGGACATCATCAAACCA- 3'
IL-12b/p40 reverse	5'-CTTCTGGTTACACCCCTCCT- 3'
IL-15 forward	5'-CCTTACCGCGCTGCAGGGACC- 3'
IL-15 reverse	5'-GCCAGAGGGCCATGTGTCAAGG- 3'

IL-17 forward	5'-GTTAAGCTTGCAGCAGCGATCAGCCC- 3'
IL-17 reverse	5'-CAACTCGAGTCGGCTGCCTGGCGGAC- 3'
IL-21 forward	5'-AGCAGAGATCCCGTGTACCGC- 3'
IL-21 reverse	5'-GCACCATTGGACACTTACGTGGG- 3'
IL-22 forward	5'-TGCAGGAGGTGGTGCCTTCCT- 3'
IL-22 reverse	5'-AGGTCCAGTTCCCCAATCGCCT- 3'
IL-23/p19 forward	5'-CAAGGACTCAAGGACAACAGC- 3'
IL-23/p19 reverse	5'-ATCCTCTGGCTGGAGGAGTT- 3'
ISS1 forward	5'-GCTCCAAAAGGGTATATTAATGCTGT- 3'
ISRV reverse	5'-TCCTTCATTCCCTAGAGGCCGTGAGT- 3'
Oligo-dT	5'-TTTTTTTTTTTTTTTT- 3'

2.1.8 Verbrauchsmaterialien und Geräte

ELISA Reader	MWG Biotech, Ebersberg
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss, Jena
Inkubatoren	Heraeus, Hanau
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg
Laminar Flow HB 2448-Sterilbank	Heraeus, Hanau

Lichtmikroskop	Carl Zeiss, Jena
iQ5 rt-PCR Optical System + Software V. 2.1	BIO-RAD, München
LSR-II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg
MACS Separation Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
Neubauer Zählkammer	Brand, Gießen
Pipetten, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Spritzen	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter, 0,45 µm	PALL, Ann Arbor, USA
UNITPS (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Abimed, Langenfeld
Waagen: Sartorius R16OP & L2200S	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen: Eppendorf 5810R & 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zellsiebe (40 µm)	BD Biosciences, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Infektion von Versuchstieren mit *L. major*

Promastigote Leishmanien in der stationären Wachstumsphase wurden aus den Blutagarplatten entnommen, in einer Petrischale gesammelt und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dreimaligem Waschen mit 50 ml steriles PBS mit anschließender Zentrifugation für 8 min bei 3220 g, 4°C und dem Lösen des Pellets, wurde ein Aliquot der Parasiten in einer 1:100 Verdünnung mit 2-prozentigen Paraformaldehyd-PBS-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Parasiten in einer Neubauer-Zählkammer (20 µm Tiefe, Kammerfaktor 5×10^4) ausgezählt. Zur Infektion der Mäuse wurden diese in einer Röhre fixiert und mit 3×10^6 *L. major*-Parasiten in einem Volumen von 30 µl subkutan in eine Hinterpfote oder in beide Hinterpfoten injiziert.

2.2.2 Kultivierung von *Leishmanien*

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 entstand ein sog. Schrägar, wobei die eine Hälfte des Bodens frei von Agar ist. Die Leishmanien wuchsen innerhalb von sieben Tagen im Agar-freien Bereich im 190 µl RPMI-Vollmedium zu einer konfluenten Schicht. Je nach Dichte der Leishmanien-Parasiten wurden sie aus vier bzw. acht Näpfen 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, um aus der Pfote Parasiten für eine neue Leishmanien-Kultur zu isolieren. Dies geschah, um die Virulenz der Leishmanien zu gewährleisten. Nach vier bis fünf Wochen konnten die Parasiten aus der Pfote isoliert werden. Dazu wurde die Pfote abgetrennt, das Fleisch vom Knochen entfernt, durch ein Zellsieb gedrückt und die Zellsuspension bei 200 g und 4°C für acht Minuten zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, in welchem sich die Parasiten befanden, in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 8 min bei 3220 g und 4°C wiederum zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 15 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert und zur Kultur auf eine Blutagarplatte ausgesäht.

2.2.3 Herstellung von löslichem *Leishmanien*-Antigen

Zur Herstellung von löslichem Leishmanien-Antigen (SLA) wurden promastigote L. major-Parasiten aus den Blutagarplatten entnommen, in einer Petrischale gepoolt und anschließend in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach dreimaligem Waschen mit 50 ml steriles PBS mit anschließender Zentrifugation für 8 min bei 3220 g und 4°C und dem Lösen des Pellets, wurde ein Aliquot der Parasiten in einer 1:100 Verdünnung mit 2-prozentigen p-Formaldehyd-PBS-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Parasiten in einer Neubauer-Zählkammer (20 μm Tiefe, Kammerfaktor 5×10^4) ausgezählt. Die Parasiten wurden mit PBS auf eine Konzentration von 1×10^9 Zellen/ml eingestellt. Diese Suspension wurde dann zwanzigmal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die SLA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4 Isolation von primären Lymphknotenzellen

Die Mäuse wurden mittel zervikaler Dislokation getötet, mit 70-prozentiger Ethanol-Lösung desinfiziert und geöffnet. Je nach Versuch wurden die poplitealen, inguinalen, axillären und brachialen Lymphknoten entfernt und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 1 ml PBS / 2 % FCS auf Eis gegeben. Durch ein Zellsieb (Maschenweite 40 µm) wurden die Lymphknotenzellen mit dem Stempel einer 2 ml Spritze in ein 50-ml-Röhrchen überführt. Das Zellsieb wurde mehrmals mit FACS-Puffer gespült, um möglichst viele Zellen in das Röhrchen zu überführen. Die Organhülle blieb zurück. Nach Zentrifugation bei 300 g für 5 min bei 4°C wurde das Zellpellet in einem Aliquot PBS / 2 % FCS aufgenommen. Die Gesamtzellzahl der Zellsuspension wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.5 Präparation der Milz

Die Mäuse wurden wie in 2.2.5 getötet und geöffnet. Die Milz wurde entfernt und gewogen. Dann wurde ein Stück der Milz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die restliche Milz nochmals gewogen. Die Differenz ergab das Gewicht des überführten Stückes. Zur Bestimmung der Parasitenlast wurde die DNA isoliert.

2.2.6 Isolation der Leber

Die Mäuse wurden wie in 2.2.5 getötet und geöffnet. Die Leber wurde entfernt und gewogen. Dann wurde ein Stück der Leber in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und die restliche Leber nochmals gewogen. Die

Differenz ergab das Gewicht des überführten Stückes. Zur Bestimmung der Parasitenlast wurde aus dem Stück Leber die DNA isoliert.

2.2.7 Isolation von Knochenmarkzellen

Die Mäuse wurden auch hier wie in 2.2.5 getötet und geöffnet. Die Oberschenkelknochen wurden mit einem Skalpell vom umgebenden Muskel befreit und durch Abtrennen der Sehnen an Knie und Becken präpariert. Der Knochen wurde dann für ca. 10 sec in 70-prozentigen Ethanol gelegt und anschließend in PBS gewaschen. Die beiden Enden wurden mit einer Schere geöffnet, dann wurde der Knochen mit eiskaltem PBS aus einer Spritze mit Kanüle mehrmals gespült. Die so erhaltenen Knochenmarkzellen wurden zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und in PBS / 2 % FCS aufgenommen und gezählt. Aus 5×10^5 Zellen wurde die DNA isoliert und die Parasitenlast bestimmt.

2.2.8 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl einer Suspension lässt sich mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmen. Dazu werden 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 Zellen blaugefärbt bleiben und somit im Mikroskop unterschieden werden können. Zur Zellzählung wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau versetzt. 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 Großquadranten mit dem Kammerfaktor 1×10^4 , der Verdünnung und dem Volumen der Zellsuspension ergab sich die Gesamtzahl aller lebenden Zellen in der Suspension.

2.2.9 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen von Zellen wurde das LSR-II-Durchflusszytometer von BD Biosciences benutzt. Die verwendete Analysesoftware war DIVA. Lebende und tote Zellen konnten durch zwei Parameter unterschieden werden, die sog. Forward Scatter und Side Scatter. Dabei wird die Größe und Granularität der Zelle bestimmt. Beide Parameter werden linear, alle Fluoreszenz-Parameter in logarithmischer Darstellung ausgewertet. Die fluoreszenzmarkierten Zellen wurden bei konstanter Fließgeschwindigkeit gemessen. Für die Markierung der verschiedenen Antigene an der Oberfläche der Zellen wurden monoklonale, fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet. Es wurden je $0,2-1 \times 10^6$ Zellen in 50 μl PBS, 2 % FCS gelöst und die Antikörper in der jeweiligen Verdünnung zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 4 °C wurde zum Ansatz 2 ml FACS-Puffer gegeben, zentrifugiert (5 min, 300 g, 4 °C) und das Pellet in 300 μl FACS-Puffer pro 1×10^6 Zellen gelöst. Für Färbungen von Zellen mit nicht-markierten Antikörpern wurde ein fluoreszenzmarkierter Sekundär-Antikörper gegen den Fc-Teil, das Epitop des Erst-Antikörpers benutzt. Danach wurden die noch freien F_{ab}-Teile des Sekundär-Antikörpers mit autologen Serum geblockt. Nachfolgende Antikörper konnten so nicht mehr durch den Sekundär-Antikörper gebunden werden und falsch-positive Signale wurden verhindert.

2.2.10 Intrazelluläre Markierung mit Antikörpern

Frisch isolierte Mauszellen wurden für 4 h mit PMA (80 ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) zusammen mit Brefeldin A (10 μ g/ml) bei 37 °C in Kulturmedium inkubiert. Dabei induziert PMA eine Aktivierung der Proteinkinase C und Ionomycin führt zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen. Beides führt zur Stimulation der Zelle und ahmt die T-Zell-Rezeptor-Aktivierung nach. Brefeldin A interferiert im retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum, wodurch es zu einer Akkumulation von Proteinen im Endoplasmatischen Retikulum kommt. Dann wurde eine Markierung der Antigene auf der Oberfläche der Zellen durchgeführt. Zur intrazellulären Färbung wurde das Cytofix/Cytoperm Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wird die Membran der Zellen durch eine saponinhaltige Lösung für die fluoreszenzmarkierten Antikörper, die gegen unterschiedliche Zytokine gerichtet sind, durchlässig gemacht. So kann der Anteil an Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden, der spezifische Zytokine produziert.

2.2.11 Intrazelluläre Markierung von Foxp3 mit einem Antikörper

Vor der intrazellulären Färbung von Foxp3, wurde zuerst eine Oberflächenfärbung der Zellen durchgeführt. Danach wurde mit dem Foxp3 Staining Set nach Angaben des Herstellers das im Kern lokalisierte Foxp3 markiert. Dabei wird durch mehrere Fixierung- und Permeabilisierungsschritte die Zellmembran und die Kernmembran der Zellen für den fluoreszenzmarkierten Antikörper, der gegen Foxp3 gerichtet ist, durchlässig gemacht. So kann mittels Durchflusszytometrie der Anteil an Zellen ermittelt werden, die spezifisch für Foxp3 sind.

2.2.12 Messung der Proliferationsrate mittels BrdU-Einbau

Proliferierende Zellen synthetisieren während der S-Phase des Zellzyklus neue DNA. Diese Zellen können markiert werden, indem man Nukleotide radioaktiv markiert oder Nukleotidanaloge verwendet werden, die anschließend mit einem Antikörper detektiert werden. Um Nukleotidanaloge mit einem Antikörper detektieren zu können, muss die DNA für diese zugänglich gemacht werden. Für BrdU-Färbungen im FACS erfolgte eine Behandlung mit DNase I, um den DNA-Doppelstrang aufzubrechen. So kann der Antikörper an das BrdU binden. Diese Markierung wurde mit dem BrdU Flow Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.13 Apoptosemessung mit FLICA

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, ist ein evolutionär konservierter Prozess. Eine zentrale Komponente dieses Prozesses ist eine Kaskade von proteolytischen Enzymen, genannt Caspase. Caspase können spezifische Sequenzen aus vier Aminosäuren erkennen, die letzte ist immer eine Asparaginsäure. Diese Aminosäure ist wichtig für die Spaltungsreaktion. Mit dem FLICA (*Fluorochrom Inhibitor of Caspases*) Apoptosis Detection Kit können aktive Caspase detektiert werden. Das enthaltene Reagenz FAM-DEVD-FMK besteht aus Carboxyfluoresin (FAM), einem Fluoreszenzfarbstoff, konjugiert mit der Aminosäuresequenz DEVD und einem Fluoromethyl Keton (FMK) als Inhibitor von Caspase. Die Markierung der primären Zellen wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.14 CSFE-Markierung von Zellen

Die Proliferation von Zellen *in vitro* und *in vivo* kann mit CFSE (Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester) nachgewiesen werden. Die Vorstufe CFDA-SE diffundiert in die Zelle und wird dort durch Esterasen aktiviert zum CFSE, das an Aminosäuren intrazellulärer Proteine bindet und so nicht mehr aus der Zelle austreten kann. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaft von CFSE kann die Proliferation von Zellen gemessen werden. Mit jeder Teilung halbiert sich die Intensität des Signals. Primäre Zellen aus den ableitenden Lymphknoten wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen pro 1 ml PBS resuspendiert und mit CFSE ($c = 1 \mu\text{M}$) versetzt. Nach 8 min Inkubation bei 37 °C wurde das 10-fache Volumen kaltes PBS / 2 % FCS zugegeben und die Zellen zentrifugiert (5 min, 4 °C, 300 g). Dieser Schritt wurde wiederholt und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert.

2.2.15 Polyklonale und antigenspezifische Stimulation

Isolierte, primäre Zellen aus den Lymphknoten wurden in einer Konzentration von $0,3 \times 10^6$ Zellen pro 200 µl Kulturmedium auf eine 96-Loch-Platte gebracht. Zur polyklonalen Stimulation wurden die Platten vorher mit anti-CD3 ($c = 5 \mu\text{g/ml}$) in einem Volumen von 50 µl Tris/HCl (50 mM; pH 8,8) beschichtet und bei 37 °C inkubiert. Nach 2 h wurden die Platten mit 250 µl Kulturmedium zweimal gewaschen. Bei der antigenspezifischen Stimulation wurde zu den Zellen SLA in einer Konzentration $1,5 \times 10^6$ Zelläquivalenten pro 200 µl Kulturmedium gegeben.

2.2.16 RNA-Präparation

Ganze Lymphknoten wurden wie bereits beschrieben durch ein Sieb gedrückt um Einzelzellen daraus 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 erhaltene RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser bei -20 °C aufbewahrt und ist so einige Wochen haltbar.

2.2.17 Herstellung von cDNA

Die gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben. Zur Synthese der cDNA wurde folgender Ansatz verwendet:

Ansatz 1, Template vorbehandeln	1-fach [µl]
Oligo-dT (50 µM)	1
RNA (200 ng/ml – 1 µg/ml)	5
Wasser	4
Gesamt	10

Mastermix	1-fach [µl]
5xcDNA-Synthese Puffer	4
Wasser	3,5
dNTP-Mix (10 mM)	2
M-MLV Punktmutation rt (200 U/µL)	0,5
Gesamt	10

Durchführung:

Ansatz 1 wurde zum Denaturieren 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. 10 µl Template wurden zu 10 µl Mastermix gegeben und für 5 min bei 37 °C inkubiert. Die reverse Transkription erfolgte bei 42 °C für eine Stunde. Danach wurde die Temperatur für 5 min auf 85°C erhöht, um die reverse Transkriptase zu denaturieren. Das Einsatz-Volumen für die anschließende PCR betrug 1-2 µl.

2.2.18 Isolierung genomicscher DNA

Die Isolation der genomicschen DNA für die Bestimmung der Parasitenlast und der Genotypisierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers (DNA Purification Kit).

2.2.19 Qualitative PCR-Genotypisierung der CCR6^{-/-}-Mäuse

Durch die Genotypisierung wurde gewährleistet, dass nur homozygote Mäuse für Versuche verwendet wurden. Dazu wurde von einem kleinen Stück Schwanz die DNA isoliert. Die Genotypisierung der CCR6^{-/-} Mäuse gestaltet sich wie folgt:

Mastermix:

Mastermix	1-fach [μ l]
goTaq-Mastermix	25
Wasser	22
Primer-Paar 1 (WT) bzw 2 (CCR6 ^{-/-})	1 + 1
DNA	1
Gesamt	50

PCR-Programm:

Denaturieren der DNA: 5 min, 94°C

35 x Denaturieren: 1 min, 94°C

Annealing: 30 sec, 61°C

Elongation: 1 min, 72°C (Taq: ca. 1000 bp/min)

Abschluß: 5 min, 72°C

Standby bei 20°C

Die Produkte der qualitativen PCR wurden auf ein 1-prozentiges Agarosegel aufgetragen und anschließend dokumentiert (Abb 2.1). WT-Mäuse haben zwei normale CCR6-Allele. Das Primer-Paar 1 GS(E,T) und GS(E1) bindet innerhalb der Sequenz des CCR6-Gens. Daher kann aus DNA-Proben dieser Mäuse nur das 228 bp lange WT-Fragment amplifiziert werden. CCR6^{-/-}-Mäuse haben zur funktionellen Deletion des CCR6 einen knock-in im Gen für CCR6 auf beiden Allelen, das Reportergen lacZ, dass für die β -Galaktosidase aus *E. coli*

kodiert. Für die Detektion dieser Mutation wird das Primer-Paar 2 verwendet, das zum einen an die WT-Sequenz (Primer GS(E,T)) des CCR6 und zum anderen an die Reportergen-Sequenz (Primer NEO(T)) bindet. Dieses PCR-Produkt hat eine Länge von 442 bp (<http://jaxmice.jax.org/strain/005793.html>)

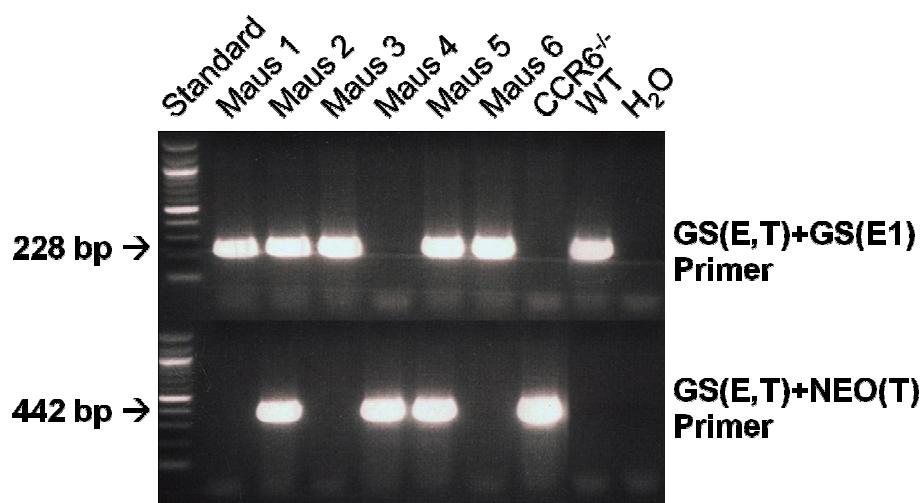


Abbildung 2.1: Die Abbildung zeigt zwei Agarosegele, wobei das obere Gel PCR-Produkte (228 bp) des GS(E,T) und GS(E1) Primer-Paares enthält und das untere Gel die PCR-Produkte (442 bp) des Primer-Paares GS(E,T) und NEO(T1). Maus 1, 3 und 6 sind WT-Mäuse, Maus 2 und 5 sind herterozygote Mäuse und Maus 4 ist eine CCR6^{-/-}-Maus. Als Kontrollen wurde bekannte DNA eingesetzt, CCR6^{-/-} entspricht der knock out-Kontrolle, WT der WT-Kontrolle und H₂O der Kontrolle ohne DNA. Es wurde der 1 kB-Standard verwendet. Gezeigt ist ein Foto eines Agarosegels einer repräsentativen Genotypisierung von 6 Mäusen.

2.2.20 Quantitative PCR zur Bestimmung der Parasitenlast

Das Prinzip der Quantifizierung der Parasitenlast ist die Verwendung eines bekannten Standards. Dazu wird Parasiten-DNA aus 10^6 Zellen zusammen mit Maus-DNA aus 10^5 Zellen isoliert und erhält somit die höchste Standardkonzentration. Aus dieser werden 1:10er-Verdünnungen erstellt und

dienen als weitere Standards, um eine Eichkurve zu erstellen. Man trägt dazu den Logarithmus der Parasiten-Konzentration (x-Achse) gegen den ct-Wert (y-Achse) auf und erhält eine sigmoide Kurve. Amplifiziert wurde die ribosomale 18S-Untereinheit des Parasiten und β -Aktin der Mäuse. Durch die so bestimmten ct-Werte wurde mit einem Vergleich der Eichkurven herausgefunden, wie viele Ausgangszellen zur Verfügung standen. Schließlich wurde das Verhältnis der Parasiten der Zellzahl im entsprechenden Gewebe gegenüber gestellt.

Mastermix:

Mastermix	1-fach [μ l]
iQ SYBR-Green Super Mix	12,5
Wasser	8,5
Primer-Paar 1 bzw 2	1 + 1
DNA	2
Gesamt	25

PCR-Programm:

Aktivieren der Polymerase: 3 min, 95°C

40 x Denaturieren: 20 sec, 95°C

Annealing: 30 sec, 58°C

Elongation: 30 sec, 72°C

Standby bei 20°C

2.2.21 Quantifizierung der Genexpression mittels PCR

Zur Quantifizierung der Expressionen von Zytokinen und Chemokinen wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

Mastermix	1-fach [μ l]
Absolute SYBR Green Fluorescin	12,5
Wasser	11,2
Primer forward (200 μ M)	0,15
Primer reverse (200 μ M)	0,15
cDNA	1
Gesamt	25

PCR-Programm:

Aktivieren der Polymerase: 15 min, 94°C

40 x Denaturieren: 30 sec, 94°C

Annealing: 30 sec, die Temperatur ist vom Primer-Paar abhängig

Elongation: 30 sec, 72°C (Taq: ca. 1000 bp/min)

Standby bei 20°C

Die relative Quantifizierung der Egnexpression erfolgte nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

2.2.22 Blutentnahme und Gewinnung von Serum

Für die Bestimmung von Immunglobulinen im Serum, wurde den Mäusen ca. 200 µl Blut aus der Schwanzvene entnommen. Das 1,5 ml Reaktionsgefäß mit dem Blut wurde für mindestens 30 min auf Eis gelagert, für weitere 30 min auf 37°C erwärmt und nochmals 30 min auf Eis gestellt. Nach vollständiger Gerinnung des Blutes wurde das Serum durch zweimaliges zentrifugieren (10 min, 20817 g, 4°C) gewonnen und bei -20°C gelagert.

2.2.23 Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)

Mit Hilfe eines ELISA können in einer Lösung enthaltene Proteine spezifisch und quantitativ nachgewiesen werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit diente dieser Test zur Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen und zum Nachweis von Immunglobulinen im Serum von Versuchstieren.

Die Bestimmung von löslichem IL-17 und IFN- γ erfolgte nach Angaben des Herstellers (R&D Duo ELISA Kit).

Die im Serum enthaltenen Immunglobuline IgG1 und IgG2a wurden mit einem Antikörper-HRP-Konjugat nachgewiesen. Zuerst wurden flexible Platten mit SLA beschichtet, pro Napf wurden 10^5 Zelllysateequivalente verwendet und in 100 µl 50 mM Tris/HCl-Lösung (pH 8,5) für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen (3-mal mit PBS / 0,05 % TWEEN 20) wurde für 2 Stunden bei 37°C mit einer PBS / 5 % BSA-Lösung geblockt und wieder gewaschen. Es wurde 50 µl verdünntes Serum aufgetragen und für 1 h bei 37°C inkubiert und gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Antikörper:

IgG1 HRP: 1/1000

IgG2a HRP: 1/1000

Die Ak wurde mit PBS / 2 % BSA verdünnt für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde gewaschen. Als Substrat wurde das OptEIA Substrat Kit verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.2.24 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.03. Zur Berechnung wurde entweder der ungepaarte t-Test, der One-way ANOVA oder der Two-way ANOVA verwendet. Werte von $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

3 Ergebnisse

In Bezug auf die Ausheilung der Leishmaniose bei infizierten WT-Mäusen ist eine T_H1 -Immunantwort maßgeblich. Neben dem T_H1 -Zytokin IFN- γ ist auch die Ausschüttung von IL-17, welches unter anderem von T_H17 -Zellen produziert wird, in vielen Krankheitsbildern an der frühen Induktion einer anti-pathogenen Immunantwort am Ort der Infektion beteiligt. IL-17 wird dabei für die Rekrutierung von Neutrophilen an den Ort der Entzündung benötigt, die ebenfalls die *L. major* Parasiten bekämpfen (Ouyang et al., 2008; Ritter et al., 2009). Nach der erfolgreichen Bekämpfung des Erregers wird die Immunbalance im Wirt unter Anderem durch T_{reg} -Zellen wieder hergestellt (Golovina et al., 2010).

Im Folgenden wurde im Mausmodell die Rolle von CCR6, einem Chemokinrezeptor, der sowohl auf regulatorischen T_{reg} -Zellen, wie auch auf inflammatorischen T_H17 -Zellen zu finden ist, für die frühe Immunantwort gegen *L. major*-Parasiten untersucht. Hierfür wurden zum einen CCR6⁺ C57BL/6 WT-Mäuse (im Folgenden WT-Mäuse genannt) und zum anderen CCR6-defiziente Mäuse (im Folgenden CCR6^{-/-}-Mäuse genannt) mit *L. major* infiziert und die T_H -Immunantwort in diesen Tieren genauer beleuchtet.

3.1 Verlauf der *L. major* Infektion in den WT- und CCR6^{-/-}-Mäusen

Mäusen

Zuerst wurde der Verlauf nach Infektion mit *L. major* anhand verschiedener klinischer Parameter verfolgt. Hierfür wurden die Pfortenschwellung, die Lymphknotengröße, die Zellzahlen, die Zellularität im ableitenden Lymphknoten und die CCL20-Expression, dem einzigen Chemokinliganden für CCR6, gemessen.

3.1.1 Schwellung der Mauspften nach Infektion

Zur Untersuchung der Pfortenschwellung von WT-Mäusen im Vergleich zu den CCR6^{-/-}-Mäusen wurden den Mäusen subkutan 3×10^6 *L. major*-Parasiten in die rechten hinteren Pfoten infiziert. Anschließend wurde die Pfortenschwellung über einen Zeitraum von 98 Tagen gemessen. Innerhalb von drei Wochen war ein starker Anstieg der Schwellung zu erkennen. Während nach der fünften Woche eine Abschwellung der Pfoten zu beobachten war. Bis zum endgültigen Abheilen der Schwellung dauerte es weitere 9 Wochen. Dabei war die Pfortenschwellung der CCR6^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen im Verlauf der Infektion signifikant erhöht, d.h. die Pfoten der CCR6^{-/-}-Mäuse waren stärker geschwollen (Abb. 3.1). Weiter wurde festgestellt, dass beide Mauslinien die Infektion gleich gut nach ca. 14 Wochen ausheilen konnten (Abb. 3.1).

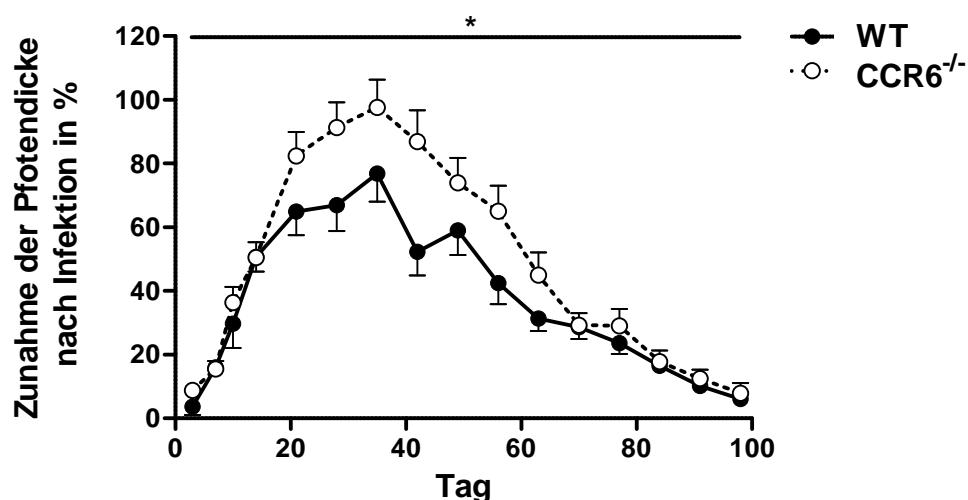


Abbildung 3.1: Zunahme der Pfotendicke nach Infektion: WT- (●) und CCR6^{-/-}-Mäuse (○) wurden mit 3×10^6 L. major Parasiten in die rechte Hinterpfote infiziert. Der Infektionsverlauf wurde am Tag 3, 7, 10, 14 und dann wöchentlich kontrolliert. Die Schwellung wurde als relative Zunahme gegenüber der kontralateralen nicht-infizierten Pfote dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte der Zunahme der Pfotendicke nach Infektion in % (\pm SEM). Es sind die Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils zehn Mäusen pro Gruppe dargestellt. (* $p < 0,05$, Two-way ANOVA).

3.1.2 Zellzahl und Schwellung der Lymphknoten im Infektionsverlauf

Nach dem Befund, dass die Pfoten der CCR6^{-/-}-Mäuse stärker geschwollen sind, sollte nun festgestellt werden, ob sich auch die ableitenden Lymphknoten nach Infektion in Bezug auf Zellzahl und Größe zwischen den Mauslinien unterscheiden. Es war eine stetige Zunahme der Zellzahlen zwischen Tag 0 und 98 in beiden Mausstämmen nach Infektion zu beobachten (Abb. 3.2 A). Die Zunahme der Zellzahl bestätigte die ablaufende Immunantwort in den infizierten Mausen.

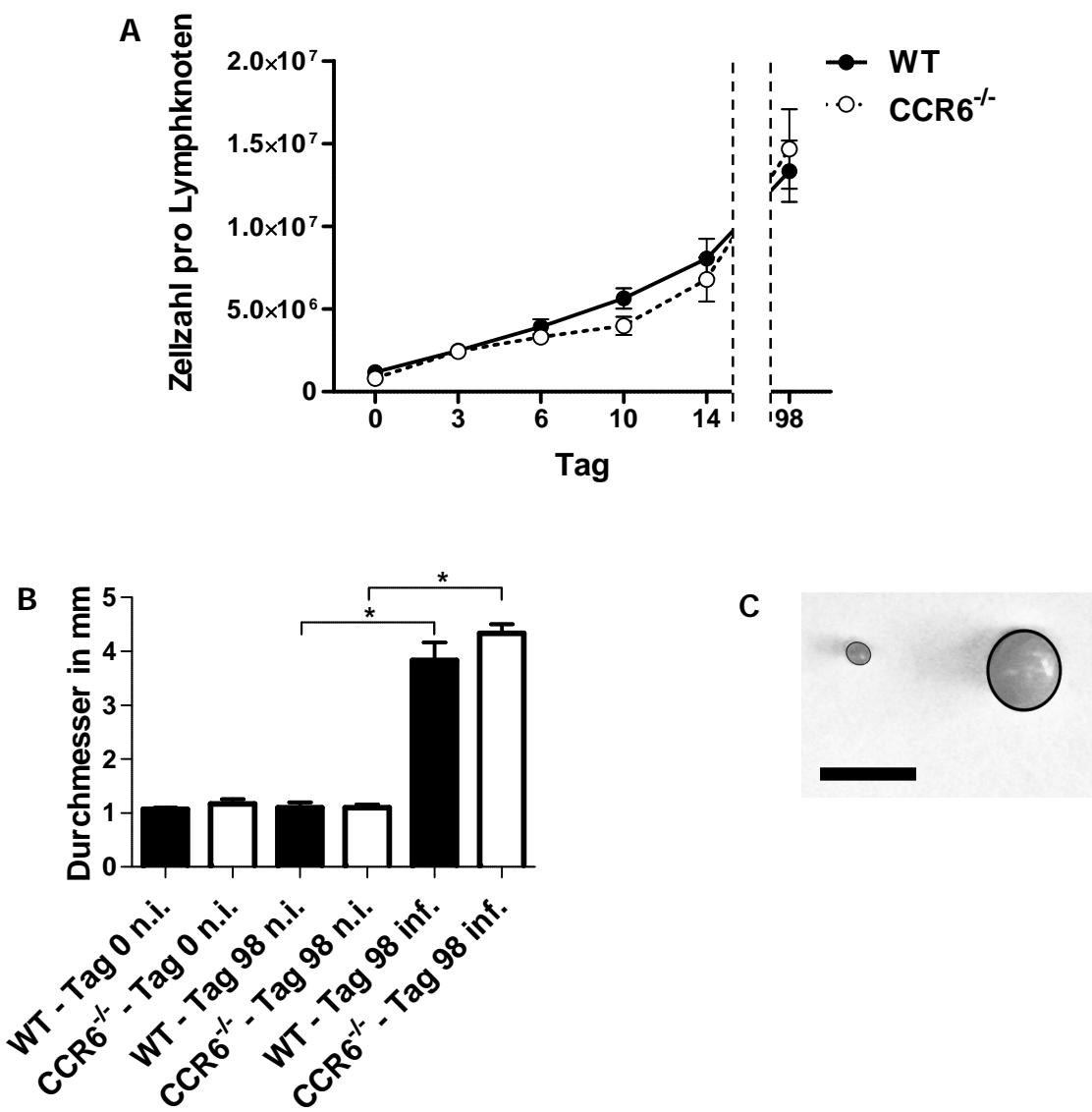


Abbildung 3.2: Zunahme der Zellzahlen im Lymphknoten zwischen Tag 0 und Tag 98 nach Infektion: WT- und $\text{CCR6}^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 3×10^6 *L. major*-Parasiten in eine (Tag 98) oder beide (Tag 3-14) Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 98 isoliert. Am Tag 0 und Tag 98 wurde mit einem Lineal der Durchmesser der Lymphknoten bestimmt und anschließend fotografiert. Nach der Verarbeitung zu einer Zellsuspension wurden die Zellen gezählt und der Wert durch zwei geteilt, wenn die Lymphknoten gepoolt wurden. A: Abgebildet ist der Mittelwerte der Zellzahl im Verlauf der Infektion. B: Gezeigt ist der Mittelwert der Durchmesser der ableitenden Lymphknoten der nicht-infizierten linken Pfoten am Tag 0 und Tag 98 (n.i.) und der infizierten rechten Pfoten am Tag 98 (inf.) der WT- bzw. $\text{CCR6}^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich. C: Gezeigt sind exemplarisch die ableitenden Lymphknoten einer WT-Maus, isoliert am Tag 98 nach Infektion. Links der ableitende Lymphknoten der nicht infizierten Pfote, rechts der ableitende Lymphknoten der infizierten Pfote (Balken: 5 mm). Die Abbildungen zeigen Daten eines Experimentes mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. (B: * $p < 0,05$, ungepaarter t-Test).

Des Weiteren mündet die Immunantwort von WT-Mäusen in einer klinischen Ausheilung. Das heißt, das infizierte Tier ist gesund, aber einige Parasiten persistieren noch in den Wirtszellen. Wie oben gezeigt wurde, ist die Pfotenschwellung nach mehr als 14 Wochen abgeklungen. Im Gegensatz dazu zeigten die ableitenden Lymphknoten in beiden Mauslinien keinen Rückgang der Schwellung am Tag 98 nach Infektion. Das könnte Zeichen der Persistenz der Erreger im Lymphknoten sein (Abb. 3.2 B und C).

3.1.3 Verteilung von Leukozyten-Subpopulationen in den Lymphknoten

Ab Tag 15 wurden Unterschiede in der Fußschwellung zwischen beiden Mauslinien festgestellt, resultieren wahrscheinlich aus einer Fehlregulation. In Lymphknoten sind überwiegend T- und B-Zellen vorhanden. Weiter findet man Makrophagen und DC, aber auch NK-Zellen und Granulozyten. Folgendes wurde untersucht, welchen Einfluss die Infektion mit *L. major* auf die prozentuale Verteilung der einzelnen Zellpopulationen an den Tagen 3, 6, 10 und 14 in den ableitenden Lymphknoten hat, insbesondere im Hinblick auf den Einfluss von CCR6 auf die Zellrekrutierung. Der Tag 0 dient als Kontrolle. Diese Mäuse wurden nicht infiziert. In Abbildung 3.3 wurde die prozentuale Verteilung der verschiedenen Leukozyten-Subpopulationen für die WT- (A) und für die CCR6^{-/-}-Mäuse (B) in den naiven Tieren dargestellt.

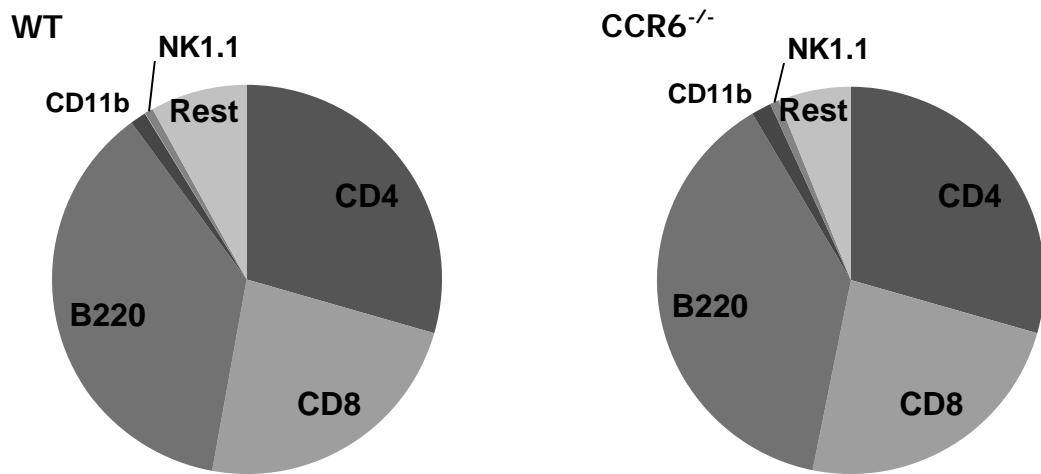


Abbildung 3.3 und Tabelle 3.1: Zellularität in den Lymphknoten naiver Tiere: Aus naiven WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäusen wurden die ableitenden Lymphknoten der hinteren Pfoten isoliert. Die Zellen wurden mit α CD4, α CD8, α B220, α CD11b und α NK1.1 fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert. In den Kreisdiagrammen sind die Mittelwerte der verschiedenen Zellpopulationen abgebildet, A entspricht den WT-Mäusen und B den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen. In der Tabelle sind die Mittelwerte (\pm SEM) der jeweiligen Zellpopulationen angegeben. Die Abbildung zeigt Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

Zellpopulation	WT	$CCR6^{-/-}$
CD4	$29,47 \pm 1,16$	$29,42 \pm 1,08$
CD8	$23,40 \pm 7,40$	$23,73 \pm 7,97$
B220	$37,00 \pm 10,47$	$38,37 \pm 11,76$
CD11b	$1,37 \pm 0,54$	$1,64 \pm 0,49$
NK1.1	$0,70 \pm 0,28$	$0,77 \pm 0,20$

Tabelle 3.1: Prozentuale Verteilung der Zellpopulationen im Lymphknoten

Die T-Zellpopulation wurde in die $CD4^+$ -T_H-Zellen und in die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen aufgetrennt. B-Zellen wurden durch B220-Ak und NK-Zellen mit NK1.1-Ak definiert. Weiter wurden durch CD11b-Ak myeloide Zellen untersucht (Abb. 3.3 und Tabelle 3.1). Es wurden keine Unterschiede in der Verteilung der Zellpopulationen zwischen naiven Tieren beider Mausstämme festgestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des

CCR6 keinen Einfluss auf die Verteilung der Leukozyten-Zellpopulation bei naiven $CCR6^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen hat.

Nun wurden die Subpopulationen im Verlauf der Infektion betrachtet. Bei der $CD4^+$ - T_H -Zellpopulation ist in Bezug auf den Kontrolltag 0 in den ersten 14 Tagen nach Infektion eine signifikante prozentuale Abnahme um ca. 60 % bei beiden Mauslinien messbar. Dabei waren keine Unterschiede zwischen den Zellpopulationen der WT- und den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen festzustellen (Abb. 3.4, A). Der prozentuale Anteil der zytotoxischen T-Zellen nahm im Verlauf der Infektion zwischen Tag 0 und Tag 14 um ca. 50 % bei den WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäusen ab. Auch hier konnte kein Unterschied zwischen beiden Mauslinien festgestellt werden (Abb. 3.4, B). Bei beiden Mauslinien war ein signifikanter Anstieg des Anteils der B-Zellpopulation um ca. 70 % im Verlauf der Infektion messbar. Auch hier gab es zwischen beiden Mauslinien keinen Unterschied (Abb. 3.4, C). Die CD11b exprimierenden myeloiden Zellen zeigten keine Veränderung im Anteil der Zellpopulation (Abb. 3.4, D). Natürliche Killerzellen und NK-T-Zellen wurden mit dem Marker NK1.1 markiert und untersucht (Abb. 3.4, E). Nach einem zunächst erwarteten anfänglichen Anstieg der Populationen an Tag 3 verkleinerte sich der Anteil der Population im WT-Mausstamm an den Tagen 6 und 10, bis er an Tag 14 wieder in etwa das Ausgangsniveau erreichte. Dies entspricht dem erwarteten Kurvenverlauf der NK1.1-Zellpopulation während einer Infektion mit *L. major*. Im Gegensatz dazu war der prozentuale Anteil der NK1.1 $^+$ -Zellen zwischen Tag 3 und Tag 10 in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen erhöht. Am Tag 14 lag der Anteil der NK1.1 positiven Population in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen auch fast wieder auf dem Ausgangsniveau. Insgesamt wurde im Verlauf der Infektion eine signifikant größere NK1.1 $^+$ Zellpopulation in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen beobachtet, verglichen zu den WT-Mäusen.

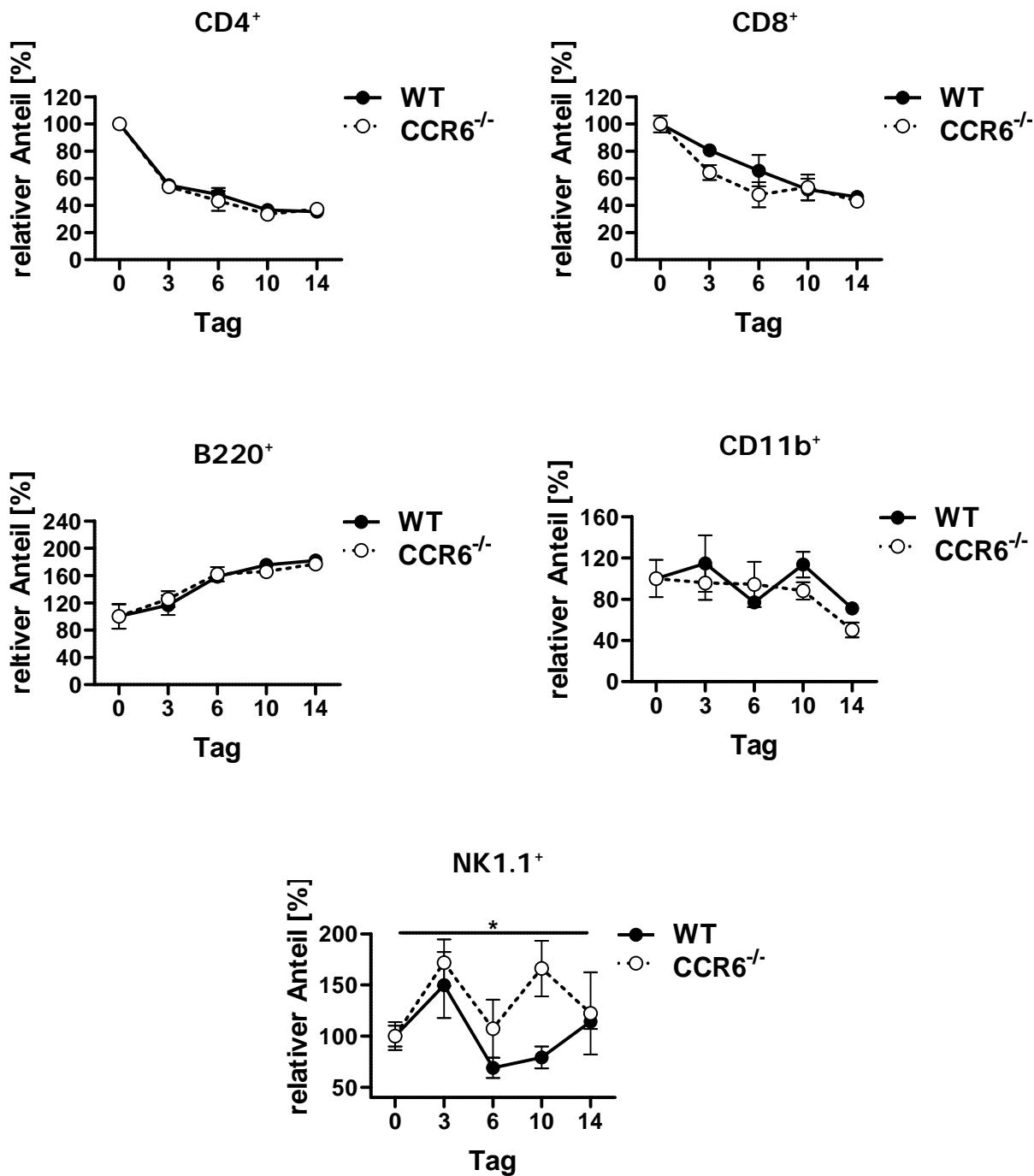


Abbildung 3.4: Veränderungen der Zellularität während der Infektion: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 entfernt und Einzelzellen isoliert. Die Zellen wurden gezählt und mit α CD4 (A), α CD8 (B), α B220 (C), α CD11b (D) und α NK1.1 (E) fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM) auf den Tag 0 (100 %) relativiert. Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. (* $p < 0,05$, Two-way ANOVA)

3.1.4 CCL20 Expression im ableitenden Lymphknoten

Der Ligand für CCR6 ist CCL20 wird hauptsächlich in der Peripherie von Epithelzellen und Endothelzellen exprimiert. Im Verlauf einer Infektion könnten auch T_{H17} -Zellen als Produzenten dienen, auf diese wirkt CCL20 in einem autokrienen Mechanismus. Im Weiteren wurde untersucht, wie sich die CCL20-Expression im Verlauf der *L. major*-Infektion verhält und welchen Einfluss die CCR6-Defizienz auf die Expression von CCL20 hat. In einem Vorversuch wurde die Expression von CCL20 auf die frühe Phase der Infektion eingegrenzt.

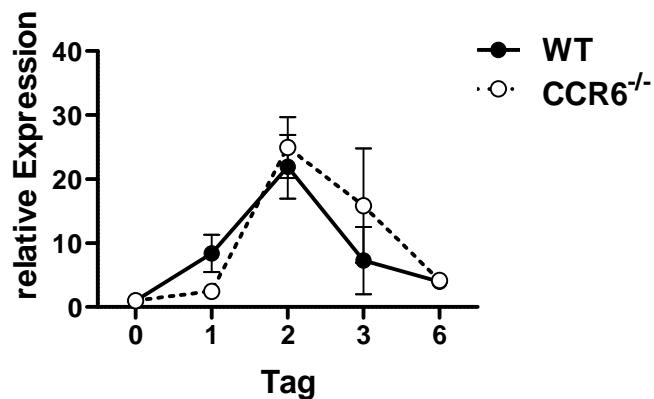


Abbildung 3.5: CCL20-Expression im ableitenden Lymphknoten: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 *L. major*-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Ein ableitender Lymphknoten wurde jeweils am Tag 0, 1, 2, 3 und 6 präpariert und daraus die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben zu cDNA wurde eine quantitative PCR-Analyse mit Primern für CCL20 durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte der relativen Expression (\pm SEM). Die Daten zeigen ein Experiment mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

Deswegen wurden die ableitenden Lymphknoten aus infizierten WT- bzw. CCR6^{-/-}-Mäusen präpariert, die enthaltene RNA isoliert und mittels einer rt-PCR die CCL20-Transkription quantifiziert. Abbildung 3.5 zeigt die ähnlichen Expressionsprofile der WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse im Verlauf der Infektion.

Es ist eine stark vermehrte CCL20-Expression bis Tag 2 nach Infektion bis auf das über 20-fache in beiden Mauslinien im Vergleich zur naiven Maus zu erkennen. Danach sinkt die Expressionsrate bis Tag 6 wieder ab. Verglichen mit den WT-Mäusen hat das Fehlen des CCR6-Rezeptors in den CCR6^{-/-}-Mäusen also keinen Einfluss auf die Expression von CCL20 im Verlauf der Infektion in den ableitenden Lymphknoten.

3.1.5 CD4⁺CCR6⁺-Zellen der WT-Mäuse im Verlauf der Infektion

Zunächst muss angemerkt werden, dass eine Betrachtung der CCR6⁺-Zellen nur in den WT-Mäusen möglich ist. Dazu wurden die Mäuse infiziert, die ableitenden Lymphknoten an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 präpariert und Zellsuspensionen hergestellt. Anschließend wurden die Zellen mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen CD4 und CCR6 markiert. Der Anteil der CD4⁺CCR6⁺ Subpopulation an der CD4⁺ Population beträgt in der naiven Maus ca. 1,5 %. In Zellzahlen ausgedrückt, entspricht das etwa 2500 Zellen pro Lymphknoten. Nach Infektion nimmt die Anzahl der CD4⁺CCR6⁺-Zellen signifikant zu (Abb. 3.6).

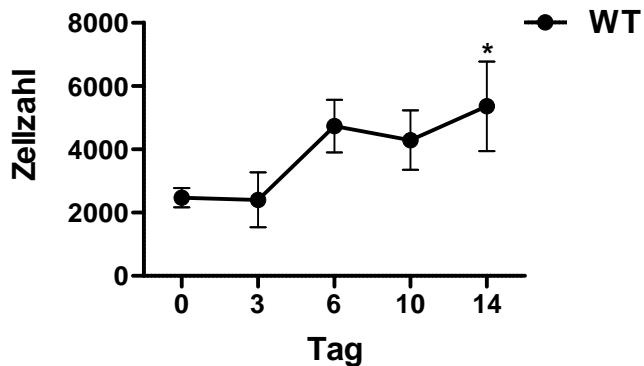


Abbildung 3.6: CD4⁺CCR6⁺-Zellen im Verlauf der Infektion: WT-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 isoliert und eine Zellsuspension angefertigt. Die Zellen wurden gezählt und mit α CD4 und α CCR6 fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte der Zellzahlen (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. ($*$ $p < 0,05$ im vgl. zu Tag 0, One-way ANOVA).

Im Weiteren sollte geklärt werden, ob die CCR6⁺-Zellen proliferierten oder einwanderten. Daher wurde die Proliferation von T-Zellen mittels BrdU-Einbau *in vivo* gemessen. In Abbildung 3.7 A ist der Anteil der CD4⁺CCR6⁺BrdU⁺ Zellsubpopulation dargestellt. In den naiven WT-Mäusen waren ca. 20 % der CD4⁺CCR6⁺ Population proliferierende Zellen. Im Verlauf der Infektion nahm der Anteil der proliferierenden Zellen bis Tag 14 auf ca. 10 % ab.

Nun wurde die CD4⁺CCR6⁺-Zellen auf ihr apoptotisches Verhalten im Verlauf der Infektion untersucht. Die Apoptoserate der CD4⁺CCR6⁺ Zellsubpopulation der naiven Mäuse lag bei ca. 45 % (Abb. 3.7 B). Im Verlauf der Infektion stieg die Apoptoserate der CD4⁺CCR6⁺-Zellen signifikant an. Die Sterblichkeitsrate der Zellen erhöhte sich von Tag 0 auf über 70 % am Tag 6 an und blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum auf hohem Niveau. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Anstieg an

CD4⁺CCR6⁺-Zellen während der *L. major* Infektion eher durch Rekrutierung bereits vorhandener Zellen zustande kommt, als durch Proliferation.

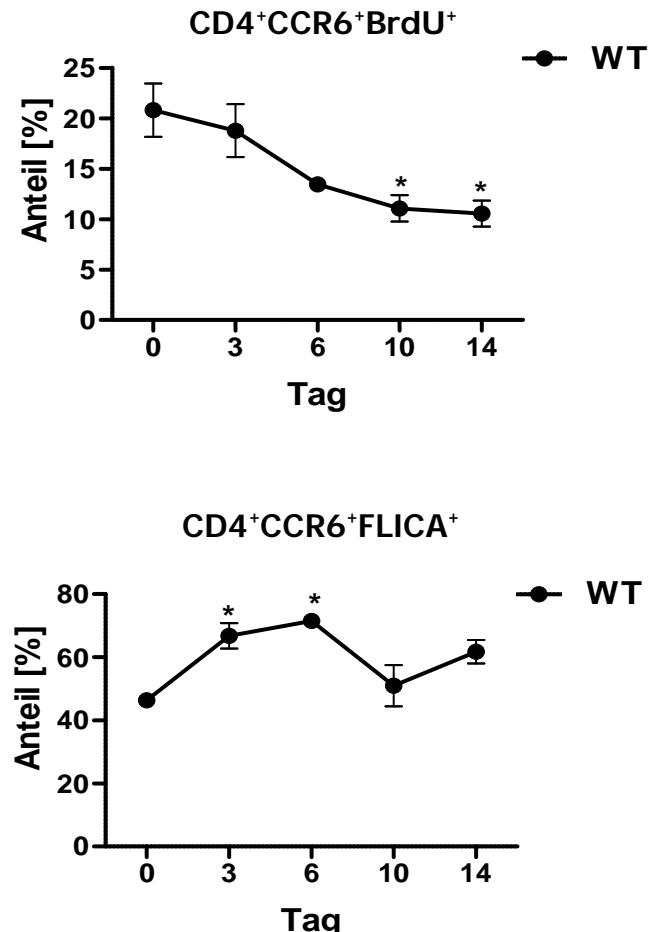


Abbildung 3.7: Anteil der proliferierenden und apoptotischen Zellen an der CD4⁺CCR6⁺-Zellpopulation: WT-Mäuse wurden mit 3×10^6 *L. major*-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 zu einer Zellsuspension verarbeitet. A: Den Tieren wurde jeweils drei Tage vor der Analyse BrdU über das Trinkwasser verabreicht. Die isolierten Zellen wurden mit α CD4, α CCR6 und α BrdU fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Unter B ist die CD4⁺CCR6⁺FLICA⁺ Zellsubpopulation dargestellt. Diese Zellen wurden vor der Markierung mit den Antikörpern gegen CD4 und CCR6 für 1 h mit FLICA inkubiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte der Prozentanteile der proliferierenden (A) bzw. der apoptotischen Zellen (B) (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. (* p < 0,05 im vgl. zu Tag 0, One-way ANOVA)

3.2 Untersuchung der antiparasitären Antwort

Die Ursache für die stärkere Pfotenschwellung in den CCR6^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen kann verschiedene Gründe haben. Denkbar wäre eine größere Parasitenlast in den Tieren durch eine unzureichende antiparasitäre Immunantwort, z.B. durch eine Verschiebung von einer T_H1-Antwort zu einer T_H2-Antwort durch die CCR6-Defizienz. Weiter wäre eine veränderte T_H17-Antwort möglich, die z.B. weniger Neutrophile in die Pfoten rekrutiert und so eine verschlechterte Bekämpfung der Parasiten verursacht. Es könnte aber auch sein, dass es durch das Fehlen der CCR6⁺ T_{reg}-Zellen in den CCR6^{-/-}-Mäusen zu einer überschießenden Immunreaktion kommt.

3.2.1 Parasitenlast nach Infektion

Wegen der oben genannten Hypothesen wurde zuerst die Parasitenlast in den ableitenden Lymphknoten, in der Milz, der Leber und im Knochenmark untersucht. Dazu wurden WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse subkutan mit je 3 x 10⁶ L. major-Parasiten in die Hinterpfote infiziert. Die Bestimmung an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 28 nach Infektion wurde mit Hilfe von quantitativer-PCR-Analysen durchgeführt (Abb. 3.8). In den ableitenden Lymphknoten war eine Zunahme der Parasitenlast in beiden Mausstämmen nach Infektion detektierbar (Abb. 3.8 A). Am Tag 3 und 6 nach Infektion war die Zunahme am größten und ging dann in ein Plateau an den Tagen Tag 10 und 28 über. Hier zeigten tendenziell mehr Parasiten in den Lymphknoten der WT-Mäuse im Vergleich zu den CCR6^{-/-}-Mäusen. In der Milz, die als sekundär lymphatisches Organ für Immunantworten gegen sich im Blutkreislauf befindliche Antigene wichtig ist, wurde die Parasitenlast unter Verwendung der

gleichen Methode ebenfalls bestimmt. Es konnten keine Parasiten in den Milzen der Mäuse beider Stämme detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

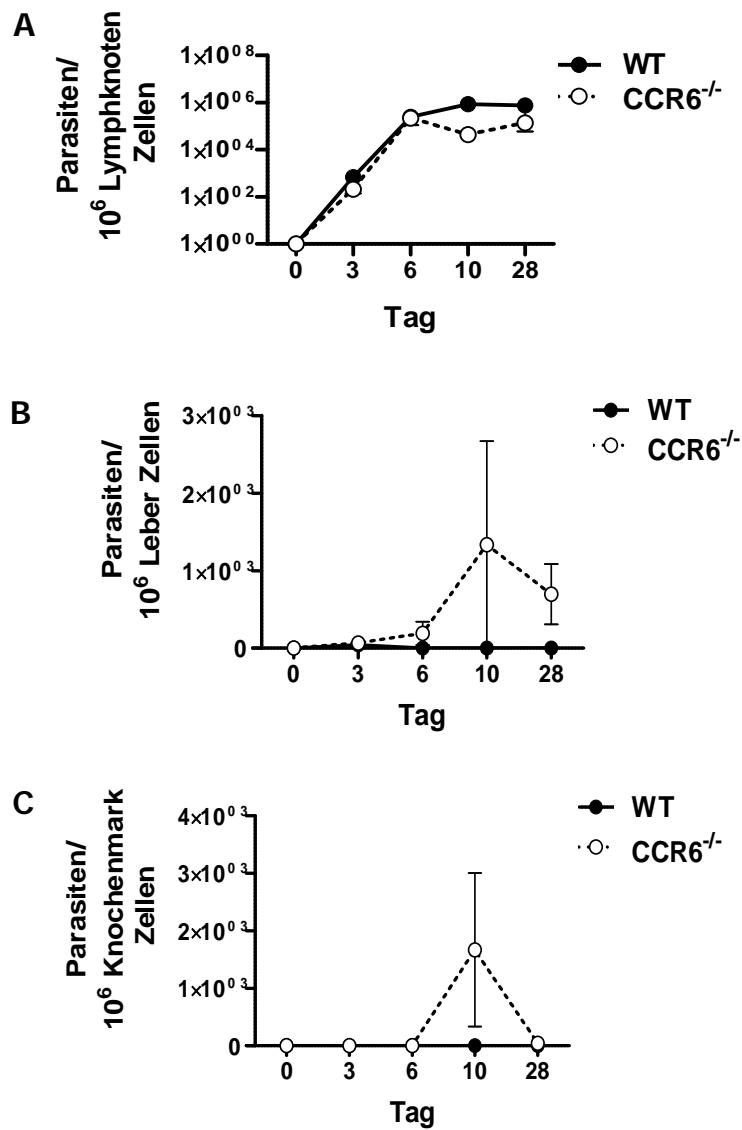


Abbildung 3.8: Parasitenlast in Lymphknoten, Leber und Knochenmark: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Der ableitende Lymphknoten bzw. das Knochenmark wurde jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 28 isoliert und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Es wurden 10^5 Lymphknotenzellen bzw. 10^6 Knochenmarkzellen lysiert und die DNA isoliert. Weiter wurde die DNA aus Gewebsstücken der Leber isoliert. In zwei separaten Reaktionen wurden die Kopienzahlen von Leishmania-18S rRNA und Maus-β-Aktin quantifiziert. Die Werte ergaben sich aus dem Vergleich mit der Parasiten-Standardkurve. A zeigt die Parasitenlast im Lymphknoten, B in der Leber und C im Knochenmark. Abgebildet sind die Mittelwerte der Zellzahlen (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten eines Experimentes mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

Die Leber ist im Zusammenhang mit einer Leishmanien-Infektion ein wichtiges Untersuchungsorgan, da der Parasit in Leberzellen überleben kann. Ebenso wurde das Knochenmark auf Parasiten untersucht, da dort Makrophagen aus dem Blut zirkulieren. In der Leber und im Knochenmark wurden auch Parasiten in beiden Mausstämmen an den Tagen 6, 10 und 28 nachgewiesen, wobei tendenziell mehr Parasiten in den CCR6^{-/-}-Mäusen detektiert wurden (Abb. 3.8 B und C).

3.2.2 Immunantwort der B-Zellen im Verlauf der Infektion

Hier sollen nun die Auswirkungen der CCR6-Defizienz auf die Immunantwort der B-Zellen untersucht werden. Wie schon unter 3.1.3 gezeigt, gab es keine Unterschiede im relativen Anteil der B-Zellpopulationen zwischen naiven und infizierten WT- bzw. CCR6^{-/-}-Mäusen. Nun wurde weiter untersucht, ob evtl. die CCR6-Defizienz einen Einfluss auf die Proliferationsrate bzw. die Apoptoserate der B-Zellen hat. Auch wurden die Antikörperkonzentrationen von IgG1 und IgG2a im Verlauf der Infektion untersucht, um den in den WT-Mäusen ablaufenden Klassenwechsel der Antikörper nach Infektion mit *L. major* mit der Antikörperproduktion in den CCR6^{-/-}-Mäusen vergleichen zu können.

Im Verlauf der Infektion in den ersten 14 Tagen konnte etwa eine Verdreifachung der Proliferationsrate auf 7,5 % für die B-Zellen im Vergleich zu den naiven Tieren gezeigt werden (Abb. 3.9 A). Hierbei war kein Unterschied zwischen den Mauslinien zu beobachten. Somit konnte gezeigt werden, dass im Verlauf der Infektion mit *L. major*, bezogen auf die Proliferationsrate im Vergleich zu den WT-Mäusen bei den CCR6^{-/-}-Mäusen kein Unterschied bestand.

Weiter wurde die Apoptoserate der B-Zellen untersucht. Die Apoptoserate der B-Zellen verändert sich im Verlauf der Infektion kaum und schwankte sowohl in den WT- als auch in den CCR6^{-/-}-Mäusen um ca. 1 % (Abb. 3.9 B).

Zusammengefasst lässt sich die Zunahme der B-Zellpopulation in beiden Mausstämmen ab Tag 3 nach Infektion (gezeigt unter 3.1.3 in der Abbildung 3.4 C) mit der nur gering gesteigerten Proliferationsrate, die erst ab dem Tag 14 zu beobachten ist (Abb. 3.9. A) nicht erklären. Zumal die Apoptoserate (Abb. 3.9. B) unverändert, wenn auch gering ist. Das heißt, die Zunahme der B-Zellpopulation muss durch eine massive Rekrutierung naiver B-Zellen in den ersten 10 Tagen nach Infektion vonstattengehen. Weiter scheint eine Abhängigkeit der Migration der B-Zellen in den Lymphknoten allein über CCR6 eher unwahrscheinlich, da zwischen den WT- und den CCR6^{-/-}-Mäusen kein Unterschied besteht (Abb. 3.4 C).

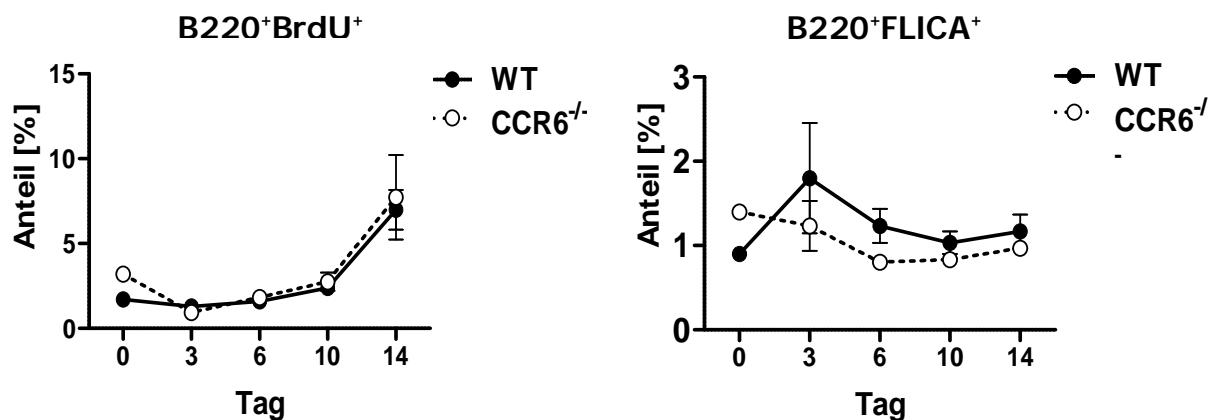


Abbildung 3.9: Proliferations- und Apoptoserate von B-Zellen im Infektionsverlauf: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die Tiere bekamen jeweils drei Tage vor der Analyse BrdU über das Trinkwasser verabreicht. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt und mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen B220 und BrdU markiert (A). Für B wurden die Zellen ebenfalls gegen B220 und mit FLICA markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Unter A) wurden die B220⁺ BrdU⁺, unter B) die B220⁺ FLICA⁺ Zellpopulation im Verlauf der Infektion aufgetragen. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

CD4⁺ T_H-Zellen unterstützen B-Zellen durch die Produktion von IL-4 zur Bildung von spezifischen Antikörpern und beim Klassenwechsel. Nun soll untersucht werden, ob die CCR6-Defizienz einen Einfluss auf die IL-4-Expression hat bzw. den Klassenwechsel beeinflusst. Dazu wurden die Lymphknoten von WT- und CCR6^{-/-}-Mäusen an verschiedenen Tagen nach Infektion präpariert, die RNA isoliert und die Expression von IL-4 durch eine rt-PCR quantifiziert. Im Verlauf der Infektion wird die IL-4-Expression in beiden Mausstämmen bis Tag 10 hochreguliert und dann wieder bis Tag 28 herab reguliert (Abb. 3.10). Dabei ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Mausstämmen. Die CCR6-Defizienz hat somit keinen Einfluss auf die IL-4-Expression im Vergleich zu den WT-Mäusen.

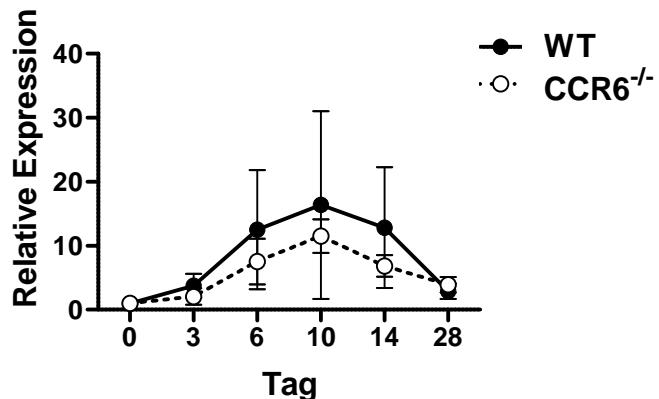


Abbildung 3.10: IL-4 Expression im Lymphknoten im Verlauf der Infektion: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Ein ableitender Lymphknoten wurde jeweils am Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 28 präpariert und daraus die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben zu cDNA wurde eine rt-PCR-Analyse mit Primern für IL-4 durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten aus einem Experiment mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

IL-4 ist in beiden Mausstämmen vorhanden, deshalb wurde angenommen, dass die beiden Stämme in der Lage sind Ak zu produzieren und den Klassenwechsel durchzuführen. Weiter wurden die Seren von naiven Tieren und infizierten Tieren (an den Tagen 0, 14, 28, 42 und 60) mittels ELISA auf spezifisch gegen L. major gerichtete IgG1 (T_H2 -Immunantwort) und IgG2a (T_H1 -Immunantwort) untersucht. Nach der Infektion kommt es in einer T_H1 -Zell-dominierten Immunantwort in beiden Mausstammen zu einer Antikörperproduktion (Abb. 3.11). Der Blutserumtiter von IgG1 steigt in beiden Mausstämmen in den ersten 14 Tagen an und geht dann zwischen Tag 14 und Tag 60 in ein Plateau auf relativ niedrigen Niveau über. Im Gegensatz zu IgG1 nimmt IgG2a im Verlauf der Infektion erst am Tag 28 bis Tag 42 zu und geht dann ebenfalls in ein Plateau bis Tag 60 über. An Tag 42 bzw. 60 sind in beiden Mausstämmen die Serumkonzentrationen von IgG2a gegenüber

IgG1 um ein Vielfaches erhöht. Dieser Klassenwechsel von IgM zu IgG2a ist ein deutlicher Befund für eine ablaufende $T_{H}1$ -Antwort in den WT- bzw. $CCR6^{-/-}$ -Mäusen.

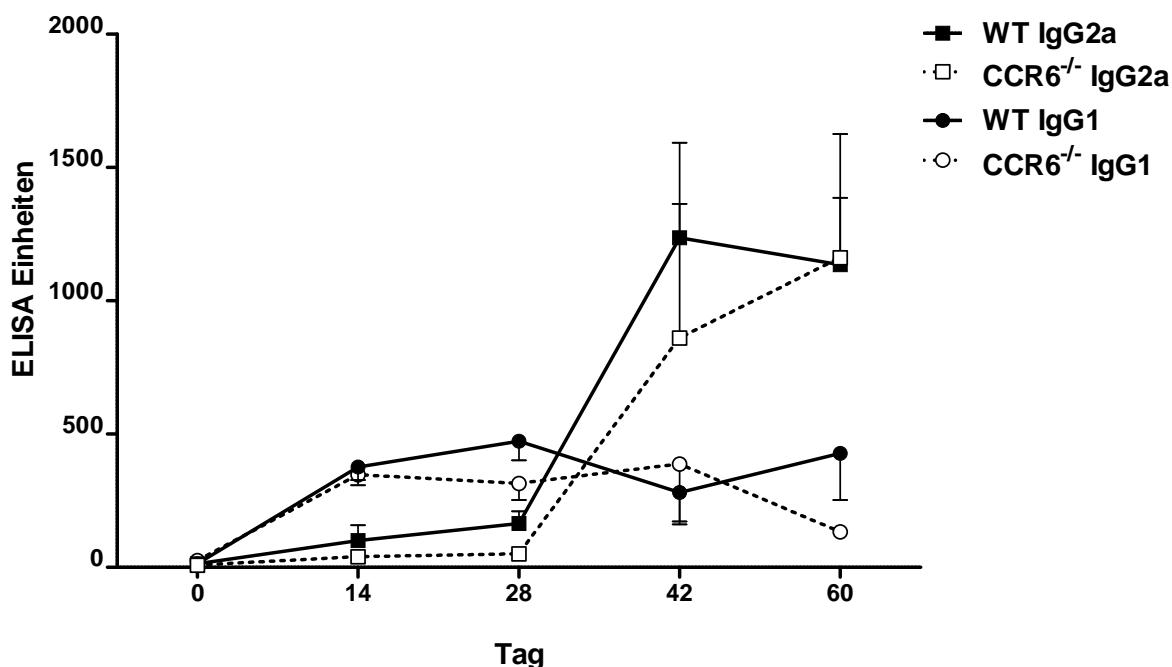


Abbildung 3.11: IgG1 und IgG2a Antikörperkonzentrationen im Serum: WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in die rechte Hinterpfoten infiziert. An den Tagen 0, 14, 28, 42 und 60 wurde den Tieren maximal 200 μ l Blut aus einer Schwanzvene entnommen und hieraus Serum hergestellt. Die Werte für IgG1 (● für WT- bzw. ○ für $CCR6^{-/-}$ -Mäuse) und IgG2a (■ für WT- bzw. □ für $CCR6^{-/-}$ -Mäuse) wurden als relative-ELISA-Einheiten dargestellt. Der ELISA wurde auf einen Standard normalisiert, der aus den Seren infizierter Tiere hergestellt wurde. Abgebildet sind die Mittelwerte der ELISA-Einheiten (\pm SEM). Die Abbildungen zeigen repräsentative Daten eines Experimentes von zwei mit jeweils fünf Mäusen pro Gruppe.

3.3 Die T_{H1} -Immunantwort im Verlauf der Infektion im Lymphknoten

Die Produktion von IFN- γ hat für die Bekämpfung der Leishmaniose in der C57BL/6-Maus eine zentrale Bedeutung. Durch dieses Zytokin werden vor allem Makrophagen aktiviert, welche dann die Parasiten bekämpfen. Da die IgG2a Antikörperproduktion ansteigt, deuten die Daten bisher darauf hin, dass die T_{H1} -Antwort intakt ist. Im Folgenden wird dargelegt, wie durch verschiedene Methoden untersucht wurde, ob es quantitative Unterschiede in der T_{H1} -Immunantwort zwischen den WT- bzw. $CCR6^{-/-}$ -Mäusen gibt. Dazu wurden die Expressionsmuster der zur T_{H1} -Antwort-führenden Zytokine und die Expression von IFN- γ näher untersucht. Weiter wurden die verschiedenen IFN- γ -produzierenden Zellpopulationen und die IFN- γ -Produktion von Lymphknotenzellen nach Restimulation analysiert.

3.3.1 Expression von IL-12p35 und IL-12p40

Naive T-Zellen differenzieren nach Rezeptor- und Ko-Stimulation mit Hilfe von IL-12 zu T_{H1} -Zellen. Wie in der Einleitung (1.2.1.1) beschrieben, bilden IL-12p40 und IL-12p35, welche unter Anderem von APC und Makrophagen ausgeschüttet werden, das heterodimerere Zytokin IL-12. Zur Untersuchung der Expression der Zytokin-Untereinheiten wurde die Expression von IL-12p35 und IL-12p40 im Verlauf der Infektion mittels quantitativer PCR-Analyse bestimmt. Die relative Expression der Untereinheit IL-12p35 ist im Verlauf der Infektion in den WT-Mäusen signifikant erhöht, wobei die beiden Kurven über den Beobachtungszeitraum ähnlich ansteigen (Abb. 3.12. A). Dabei vervielfacht sich die relative Expression von IL-12p35 in den WT-Mäusen etwa um den

Faktor 10 und in den CCR6^{-/-}-Mäusen nur etwa um den Faktor 5. Auch bei der relativen Expression von IL-12p40 unterscheiden sich die beiden Mauslinien signifikant im Verlauf der Infektion. Hier ist die Expression von IL-12p40 in den WT-Mäusen, vor allem an Tag 6 verglichen zu den CCR6^{-/-}-Mäusen stark erhöht (Abb. 3.12. B).

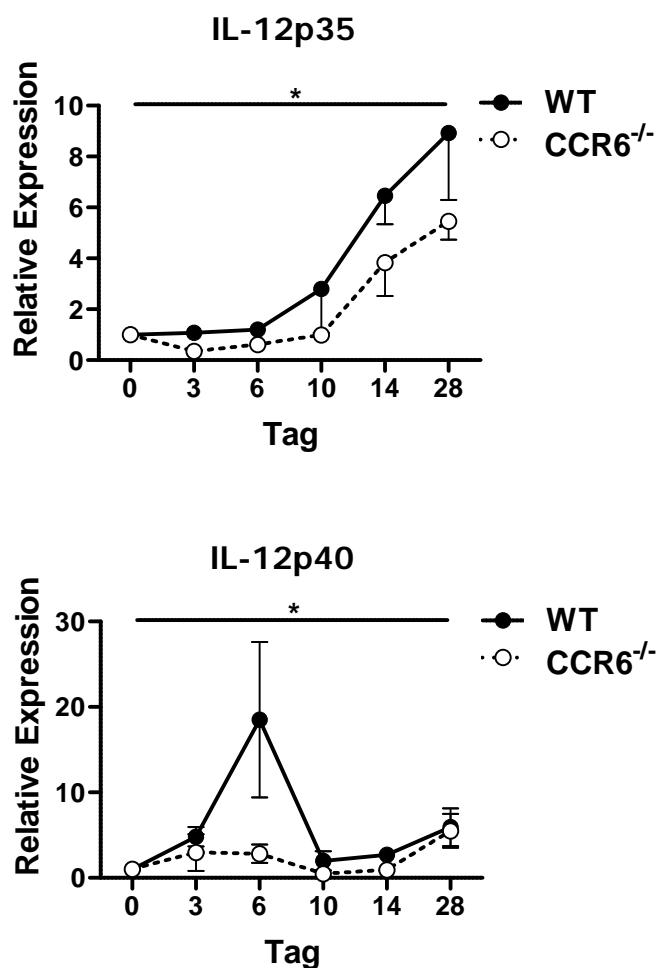


Abbildung 3.12: Expression von IL-12p35 und IL-12p40 im Lymphknoten: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Ein ableitender Lymphknoten wurde jeweils am Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 28 präpariert und daraus die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA wurde eine quantitative PCR-Analyse mit Primern für IL-12p35 (A) und IL-12p40 (B) durchgeführt. Aus einer Mischung von cDNA verschiedener Mäuse und Tage (nach Infektion) wurde eine Verdünnungsreihe erstellt, um die Effizienz der PCR zu prüfen. Die aufgetragenen Werte stellen die relative Expression jeweils zum Tag 0 dar. Die Abbildung zeigt Daten aus einem Experiment mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. (* p < 0,05, Two-way ANOVA)

3.3.2 T_H1-Immunantwort

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression sowohl von IL-12p35, als auch von IL-12p40 im Verlauf der Infektion in den WT-Mäusen signifikant erhöht sind, wurden nun die IFN- γ -produzierenden Zellen untersucht. Dazu wurden die ableitenden Lymphknoten nach Infektion an verschiedenen Tagen präpariert, eine Zellsuspension hergestellt und in vitro für 4 Stunden bei 37°C restimuliert. Die CD4 $^{+}$ -, CD8 $^{+}$ - und NK1.1 $^{+}$ -Zellen wurden hinsichtlich ihrer IFN- γ -Produktion durch intrazelluläre Zytokinbestimmung am LSR-II analysiert. Im Verlauf der Infektion nimmt die CD4 $^{+}$ IFN- γ $^{+}$ -Zellpopulation in beiden Mausstämmen von ca. 10³ Zellen pro ableitendem Lymphknoten, in den naiven Tieren auf über 10⁵ Zellen am Tag 28 (nach Infektion) signifikant zu (Abb. 3.13 A). Die Population der CD8 $^{+}$ IFN- γ $^{+}$ -Zellen war in den naiven Mäusen des WT- bzw. CCR6 $^{-/-}$ -Stämme etwa fünfmal größer als die der CD4 $^{+}$ IFN- γ $^{+}$ -Zellen. Auch hier war kein Unterschied im Verlauf der Infektion zwischen beiden Mausstämmen zu erkennen. Anders als bei den CD4 $^{+}$ IFN- γ $^{+}$ -Zellen nimmt die CD8 $^{+}$ IFN- γ $^{+}$ Population bis Tag 6 zu und sinkt ab (Abb. 3.13 B). Also wirkte sich die verringerten Mengen an IL-12p35 und IL-12p40 in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen nicht auf die IFN- γ -Produktion aus. Wie schon für die NK-Zellen selbst gezeigt (Abb. 3.4. E), unterscheidet sich der Verlauf der IFN- $^{+}$ NK-Zellen in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen. und ist während des gesamten Verlaufs der Infektion erhöht.

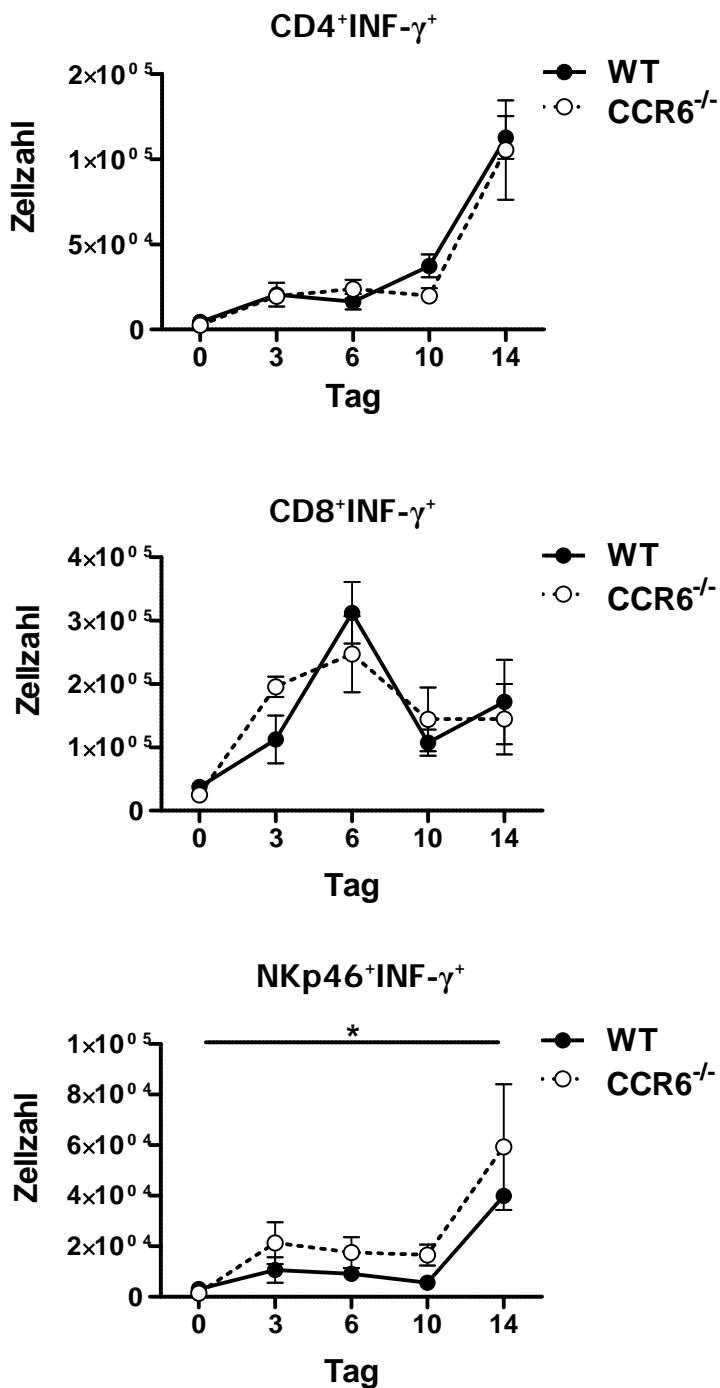


Abbildung 3.13: $IFN-\gamma^+$ - T_H - und NK-Zellen im Lymphknoten: WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt und mit Ionomycin, PMA und Brefeldin A für 4 Stunden bei $37^\circ C$ restimuliert. Anschließend wurde mit α CD4- (A), α CD8- (B) und NKp46- (C) fluorochrommarkierten Antikörper gefärbt. Dann wurden alle Zellen intrazellulär mit α IFN- γ markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte der Zellzahlen (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. ($*$ $p < 0,05$, Two-way ANOVA).

3.3.3 NK-Zellen im Verlauf der Infektion im Lymphknoten

Es wurde gezeigt, dass in den CCR6^{-/-}-Mäusen im Verlauf der Infektion (im Vergleich zu den WT-Mäusen) die NK-Zellpopulation insgesamt und auch die IFN- γ ⁺-NK-Zellpopulation größer war. IL-15 ist wichtig für die NK-Zellaktivierung. Deswegen wurde nun weiter untersucht, ob die IL-15-Expression in den CCR6^{-/-}-Mäusen fehlreguliert ist.

3.3.3.1 IL-15-Expression

Es sollte überprüft werden, ob die im Verlauf der Infektion signifikant größere NK-Zellpopulation (Abb. 3.4 E) und auch die vergrößerte IFN- γ -produzierende NK-Zellpopulation (Abb. 3.13 C) aus einer gesteigerten Expression von IL-15 im Lymphknoten der CCR6^{-/-}-Mäuse resultierte. Dazu wurden die Lymphknoten von WT- und CCR6^{-/-}-Mäusen an verschiedenen Tagen nach Infektion präpariert, RNA isoliert. Im Anschluss wurde in der quantitativen PCR die Expression von IL-15 bestimmt. Die Expression wird in beiden Mausstämmen vergleichbar reguliert. Im Verlauf der Infektion ergeben sich dabei nur geringe Unterschiede der Expression. Somit kann der Einfluss von IL-15 auf die Größe und Aktivierung der NK-Zellpopulation in den CCR6^{-/-}-Mäusen ausgeschlossen werden.

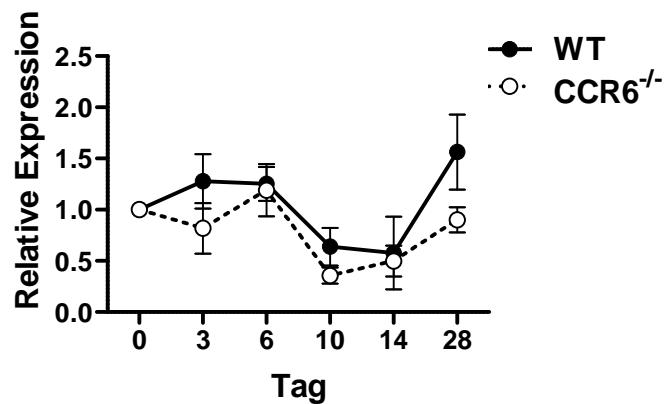


Abbildung 3.14: IL-15-Expression im Verlauf der Infektion: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Ein ableitender Lymphknoten wurde jeweils am Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 28 präpariert und daraus die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben zu cDNA wurde eine quantitative PCR-Analyse mit Primern für IL-15 durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden relativ zum Tag 0 berechnet und aufgetragen. Die Abbildung zeigt Daten aus einem Experiment mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

3.3.3.2 IL-17RA Expression auf NK-Zellen

Da IL-15 zur Regulation der NK-Zellpopulation nicht in Frage kam, wurde weiter untersucht, ob diese Population auf IL-17, den wichtigsten sekretorischen Zytokin von T_H17-Zellen, reagieren kann und evtl. die Abwesenheit von CCR6 zu der Erhöhung an NK-Zellen beiträgt. Für diese Analyse wurden WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse infiziert und an den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 untersucht. Nach der Herstellung einer Zellsuspension aus den ableitenden Lymphknoten wurden die Zellen mit α NKp46- und α IL-17RA-fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert und im LSR-II analysiert. In den ersten Tagen nach Infektion liegt in beiden Mausstämmen der Anteil der IL-17RA⁺-Zellen bei ca. 10-15 % der NK-Zellen (Abb. 3.15). Nach Tag 6 sinkt der Anteil in beiden Mausstämmen auf etwa 1 % ab. Das heißt, die NK-Zellen tragen den IL-17RA. Im Verlauf der Infektion wird der Rezeptor herab

reguliert, da ab Tag 10 nur noch ca. 1 % der Zellen den Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen. Das heißt, theoretisch wären an Tag 3 und 6 nach Infektion die NK-Zellen in der Lage auf IL-17 zu reagieren.

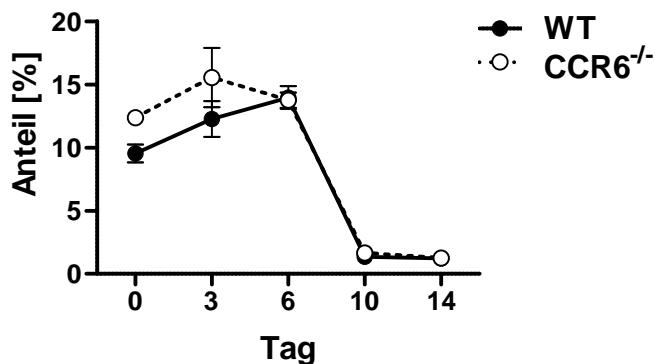


Abbildung 3.15: IL17RA-Expression auf den NK-Zellen beider Mausstämme: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt und mit α NKp46- und α IL-17RA-fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten eines Experiments mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

3.3.4 Expression von IFN- γ nach Infektion

Früh produziertes IFN- γ wird vor allem auch von NK-Zellen ausgeschüttet. Im Verlauf einer Infektion produzieren aber auch CD8⁺- und CD4⁺-Zellen große Mengen IFN- γ . Deswegen soll die Expression von IFN- γ im Verlauf der Infektion untersucht und mit den Daten der IFN- γ^+ -Zellpopulationen verglichen werden. Die ableitenden Lymphknoten aus Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 28 der infizierten WT- bzw. CCR6^{-/-}-Mäuse wurden präpariert und die enthaltene RNA isoliert. Nach dem Umschreiben wurde eine quantitative PCR mit spezifischen IFN- γ -Primern durchgeführt. Die Daten sind in Abbildung 3.16 gezeigt. In den ersten 10 Tagen ist in beiden Mausstämmen eine schwache Erhöhung der

Expression zu beobachten, erst an den Tagen 14 und 28 steigt die Expression um das Vier- bis Fünffache der Expression in naiven Mäuse an. Verglichen mit den IFN- γ^+ Zellpopulationen stimmt dieser Verlauf mit den IFN- γ^+ CD4 $^+$ -T_H-Zellen und den NK-Zellen überein.

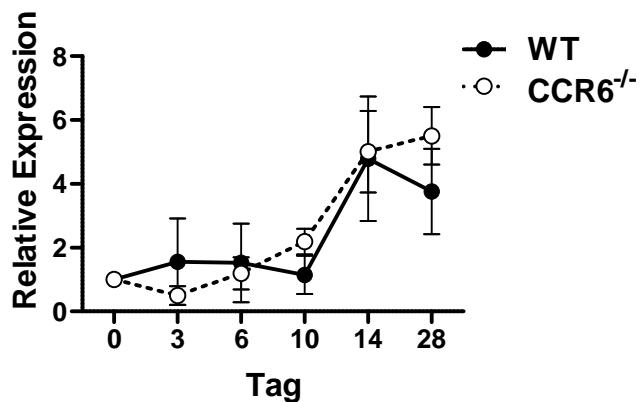


Abbildung 3.16: IFN- γ Expression im Lymphknoten: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Ein ableitender Lymphknoten wurde jeweils am Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 28 präpariert und daraus die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben zu cDNA wurde eine quantitative PCR-Analyse mit Primern für IFN- γ durchgeführt. Die aufgetragenen Werte stellen die relative Expression jeweils zum Tag 0 dar. Die Abbildung zeigt Daten aus einem Experiment mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

3.3.5 IFN- γ -Produktion nach polyklonalaler Stimulation

Nachdem hinsichtlich der NK-Zellzahl und der intrazellulären IFN- γ Produktion der NK-Zellen Unterschiede zwischen WT- und CCR6^{-/-}-Mäusen gezeigt wurden, soll nun die Produktion bzw. die Sezernierung von IFN- γ nach polyklonalaler Stimulation mit α CD3 untersucht werden. Dazu wurden Mäuse beider Stämme mit L. major-Parasiten infiziert, die Lymphknoten an verschiedenen Tagen präpariert, die Zellen isoliert und mit α CD3 für 3 Tag inkubiert. Danach wurde der Überstand der Kultur abgenommen und ein quantitativer ELISA für IFN- γ durchgeführt. Vor der Infektion ist festzustellen, dass die Zellen aus naiven

CCR6^{-/-}-Mäusen im Gegensatz zu den WT-Mäusen große Mengen an IFN- γ produzieren (Abb. 3.17). Dies lässt auf einen voraktivierten Status schließen, der durch die Stimulierung abgerufen wird. In der frühen Phase der Infektion am Tag 3 und 6 nehmen die IFN- γ Mengen auf WT-Niveau ab. Anschließend ist eine gesteigerte Ausschüttung von IFN- γ in den Kulturüberständen bei beiden Mausstämme zu beobachten.

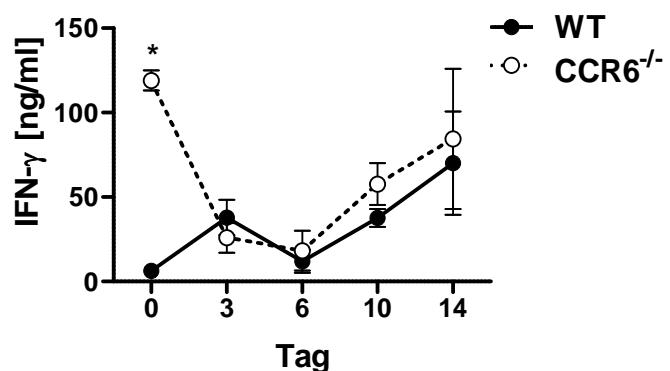


Abbildung 3.17: IFN- γ -Produktion nach Stimulation: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. An den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 wurden die ableitenden Lymphknoten Präpariert und daraus eine Zellsuspension hergestellt. Die primären Zellen wurden für 3 Tag polyklonal in Kulturmedium auf plattengebundenem α CD3 stimuliert. Die anschließenden ELISA wurden mit einem Standard durchgeführt und so die absoluten Mengen berechnet. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildungen zeigen repräsentative Daten zweier Experimente mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. (* $p < 0,05$, Two-way ANOVA).

3.4 T_H17 -Zellen im Verlauf der Infektion im Lymphknoten

Im vorherigen Abschnitt wurden die Auswirkungen der CCR6-Defizienz im Vergleich zu den WT-Mäusen im ableitenden Lymphknoten auf die für die Ausheilung wichtige T_H1 -Immunantwort im Verlauf der Infektion untersucht. Nun soll der Einfluss der CCR6-Defizienz auf weitere T_H -Subpopulationen untersucht werden. Im Speziellen wurden vor allem die CCR6-exprimierenden T_H17 -Zellen und T_{reg} -Zellen analysiert.

3.4.1 IL-17-produzierende Zellen

In der frühen Immunantwort spielt IL-17 als Entzündungsmediator eine wichtige Rolle. Im Weiteren werden T_H17 -Zellen durch die Expression von CD4 und IL-17 definiert. Andere CD4 $^-$ IL-17 $^+$ -Zellen sind z.B. $\gamma\delta$ T-Zellen. Es wurden WT- und CCR6 $^{/-}$ -Mäuse mit den *L. major*-Parasiten für verschiedene Tage zur Untersuchung infiziert. Aus den entnommenen Lymphknoten wurde eine Zellsuspension hergestellt, restimuliert und eine Oberflächen- bzw. intrazelluläre Markierung der Zellen mit den fluorochrom-konjugierten Ak gegen CD4 und IL-17 durchgeführt. Während die Zellzahl (131 \pm 10) der T_H17 -Zellen am Tag 0 in den CCR6 $^{/-}$ -Mäusen etwa um das Fünffache verringert ist, gleichen sich die Zellzahlen der T_H17 -Zellen der beiden Mausstämme am Tag 3 und 6 an (Abb. 3.18 A). Die Zellzahlen nehmen in den WT-Mäusen jedoch im Vergleich zu den CCR6 $^{/-}$ -Mäusen im Verlauf der Infektion an den Tag 10 und 14 signifikant zu. Betrachtet man die Zellzahlen der CD4-negativen IL-17-produzierenden Zellen im Verlauf der Infektion, so findet man zwar einen zeitabhängigen Anstieg während der Infektion, aber keinen Unterschied zwischen den beiden Mauslinien (Abb. 3.18 B).

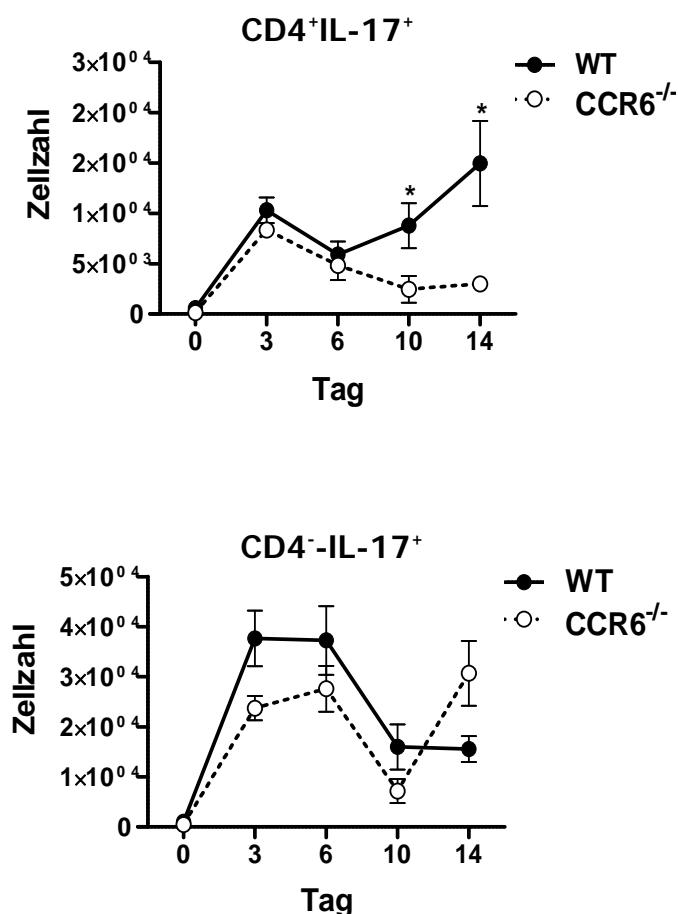


Abbildung 3.18: CD4⁺- und CD4⁻IL-17⁺-Zellen im Lymphknoten nach Restimulation:
 WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 präpariert und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt und mit Ionomycin, PMA und Brefeldin A für 4 Stunden bei 37°C restimuliert. Anschließend wurde mit α CD4 fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert. Danach wurden alle Zellen intrazellulär mit α IL-17 markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte der Zellzahl (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. (* $p < 0,05$, Two-way ANOVA)

3.4.2 Expression von IL-17, IL-21 und IL-22 im Verlauf der Infektion

Um weitere Informationen über die T_{H17} -Immunantwort in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen zu erhalten, wurde untersucht, ob das Fehlen des $CCR6$ Rezeptors einen Einfluss auf die Expression der T_{H17} -Zytokine IL-17, IL-21 und IL-22 hat. Dazu wurden die Lymphknoten von WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäusen an verschiedenen Tagen nach Infektion präpariert, die RNA isoliert und eine quantitative PCR-Analyse der Zytokin-Expressionen durchgeführt. Die Analyse der Expression von IL-17 ergab im Verlauf der Infektion weder einen Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen, noch war eine Regulierung zu beobachten (Abb. 3.19 A).

Bei der Expression von IL-21 konnte im Verlauf der Infektion eine tendenziell Erhöhung in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen werden. Die Expression in den WT-Mäusen blieb auf dem Niveau der nicht infizierten WT-Mäuse, während sie in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen zwischen Tag 3 und 10 etwa um das zweie- bis vierfache anstieg (Abb. 3.19 B).

Das letzte, auf die Expression hin untersuchte T_{H17} -Zytokin, war IL-22. Im Verlauf der Infektion bis Tag 28 blieb die Expression von IL-22 in den WT-Mäusen relativ gleich, bezogen auf die nicht-infizierten WT-Mäuse. Ebenso verhält es sich bis Tag 10 bei den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen. Im Verlauf der Infektion wurde schließlich stieg die Expression von IL-22 in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen ab Tag 14 um etwa das siebenfache (Abb. 3.19 C), während sie in den WT-Mäusen auf Basalniveau verbleibt.

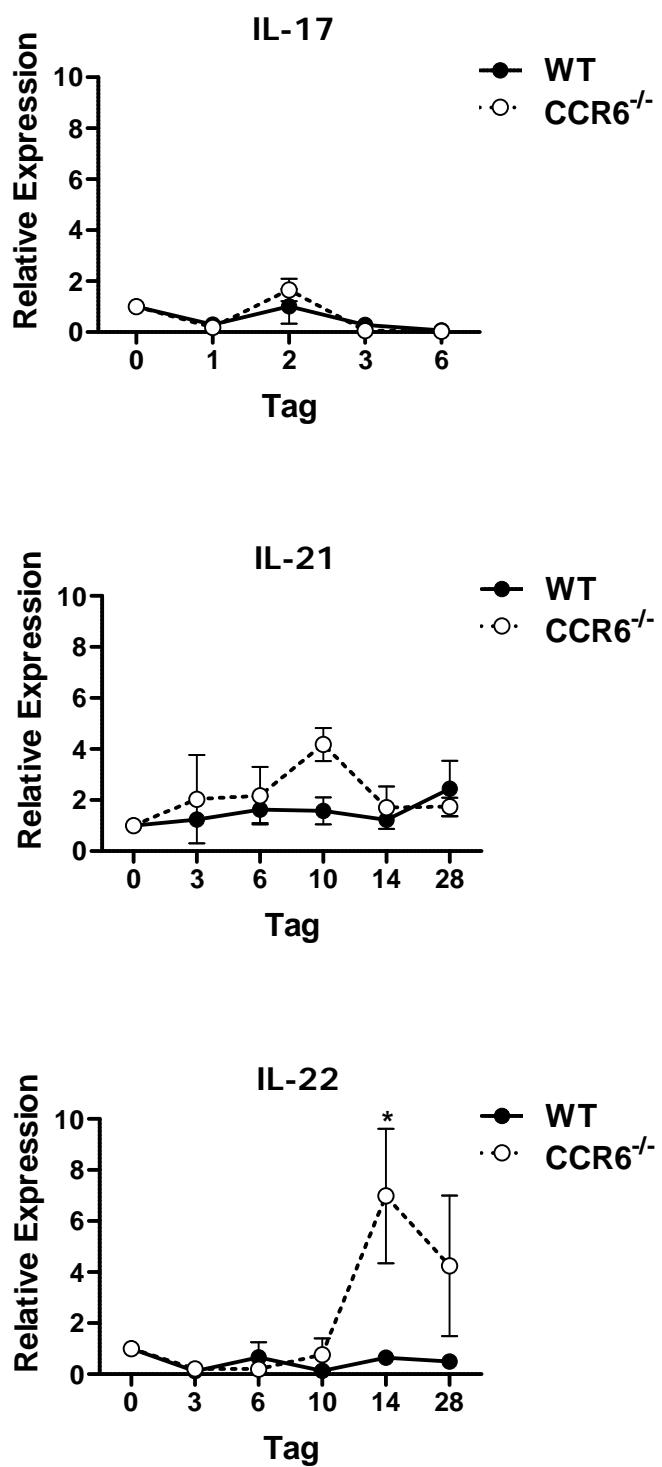


Abbildung 3.19: IL-17, IL-21 und IL-22 Expression: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Ein ableitender Lymphknoten wurde jeweils am Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 28 präpariert und daraus die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben zu cDNA wurde eine quantitative PCR-Analyse mit Primern für IL-17 (A), IL-21 (B) und IL-22 (C) durchgeführt. Die Abbildung zeigt Daten aus einem Experiment mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe. (*p < 0,05, Two-way ANOVA)

3.4.3 IL-17-Produktion nach Stimulation

Um die IL-17-Produktion nach polyklonaler Stimulation mit α CD3 untersuchen zu können wurden Mäuse beider Stämme, für die Untersuchung an verschiedenen Tagen, mit *L. major*-Parasiten infiziert. Die primären Zellen wurden für 3 Tage in vitro stimuliert. Danach wurde der Überstand der Kultur abgenommen und in einem ELISA quantitativ auf IL-17 hin untersucht. In den naiven $CCR6^{-/-}$ -Mäusen ist die IL-17-Ausschüttung der Lymphknotenzellen ca. dreimal so hoch wie in den WT-Mäusen (Abb. 3.20). Im Verlauf der Infektion an den Tagen 3 und 6 kommt es bei beiden Mausstämmen zu einer Reduktion der IL-17-Produktion. An Tag 10 wurde dann etwa dreimal mehr IL-17 von den WT-Mäusen in den Überstand abgegeben. Das korreliert auch mit dem Anstieg an $IL-17^+CD4^+$ -Zellen am Tag 10 im Lymphknoten.

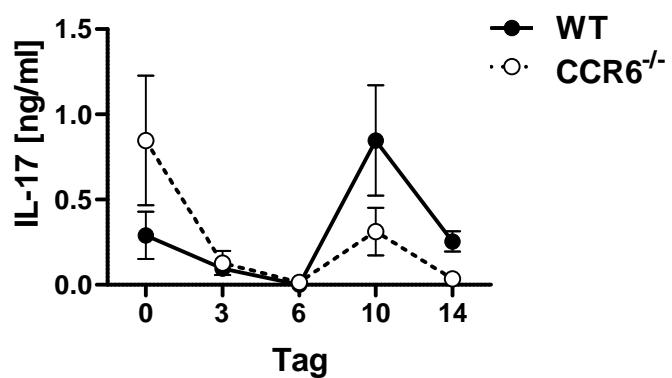


Abbildung 3.20: IL-17-Produktion nach polyklonaler Stimulation: WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 3×10^6 *L. major*-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. An den Tagen 0, 3, 6, 10 und 14 wurden die ableitenden Lymphknoten präpariert und eine Zellsuspension hergestellt. Die primären Zellen wurden für 3 Tage polyklonal in Kulturmedium mit plattengebundenem α CD3 stimuliert. Der ELISA wurde mit einem Standard durchgeführt und so die absoluten Mengen berechnet. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildung zeigt repräsentative Daten eines Experimentes von zwei mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

3.5 T_{reg} -Zellen im Verlauf der Infektion im Lymphknoten

T_{reg} -Zellen exprimieren den CCR6 Rezeptor auf ihrer Oberfläche. Eine CCR6-Defizienz könnte zu einer verminderten Gegenregulation im Verlauf der Immunantwort in den $CCR6^{-/-}$ -Tieren führen und so eine stärkere Pfortenschwellung mit verursachen. Deswegen sind die T_{reg} -Zellen Gegenstand der weiteren Untersuchung. Dazu wurden die beiden Mausstämme infiziert, die ableitenden Lymphknoten an verschiedenen Tagen isoliert und eine Zellsuspension aus Primärzellen hergestellt.

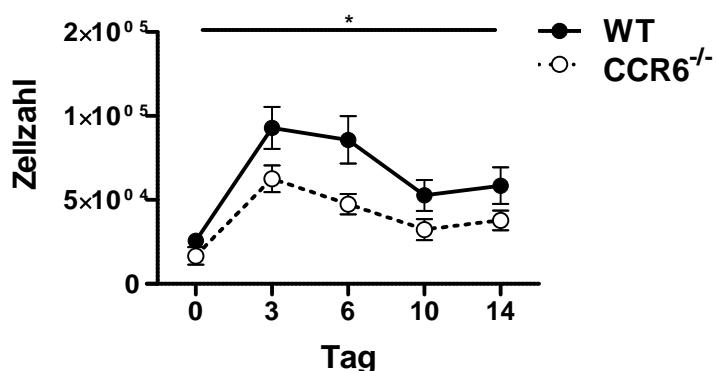


Abbildung 3.21: T_{reg} -Zellen im Verlauf der Infektion: WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt und mit α CD4, α CD25 und α CD62L markiert. Außerdem wurde der intrazelluläre Transkriptionsfaktor Foxp3 mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Abgebildet sind die Mittelwerte der Zellzahlen (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe ($*$ $p < 0,05$, Two-way ANOVA).

Die T_{reg} -Zellen wurden über die Marker CD4, CD25, CD62L und Foxp3 durch eine FACS-Analyse untersucht. Nach der Infektion nimmt die Zellzahl in beiden Mausstämmen bis Tag 3 um mehr als das sechsfache zu und von

Tag 6 bis Tag 14 nimmt sie dann wieder leicht ab (Abb. 3.21). Vergleicht man die Ergebnisse der WT-Mäuse mit den CCR6^{-/-}-Mäusen, so kann man eine signifikant größere Anzahl an T_{reg}-Zellen in WT-Mäusen im Verlauf der Infektion feststellen.

3.5.1 Expression von IL-10 im Verlauf der Infektion

Das Zytokin IL-10 wird hautsächlich von T_{reg}-Zellen exprimiert und ausgeschüttet. Seine Funktion ist die Gegenregulation einer andauernden Immunantwort. Die stärkere Pfotenschwellung bei den CCR6^{-/-}-Mäusen, könnte auf fehlendes IL-10 zurück geführt werden. Deswegen wurde die Expression von IL-10 in den ableitenden Lymphknoten untersucht. WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden für die Untersuchungstage 0, 3, 6, 10 und 14 infiziert. Nach der Lymphknotenpräparation wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Folgendes ergab sich nach einer quantitativen PCR mit spezifischen Primern für IL-10: Man kann im Vergleich von den WT-Mäusen zu den CCR6^{-/-}-Mäusen eine Tendenz der erhöhten IL-10 Expression im Verlauf der Infektion bis Tag 14 erkennen (Abb. 3.22). Etwa am Scheitelpunkt der Pfotenschwellung gleicht sich die Expression in beiden Mausstämmen an.

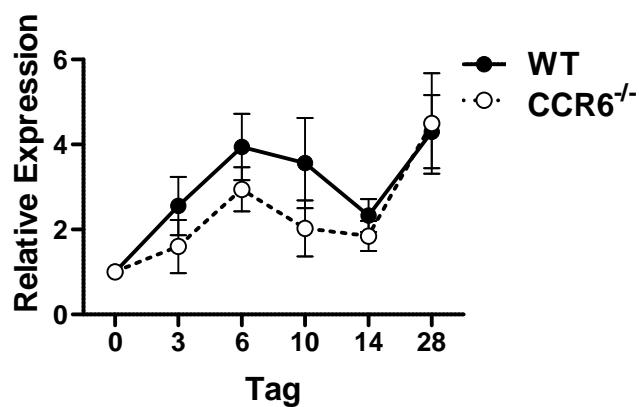


Abbildung 3.22: IL-10-Expression im Lymphknoten: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 L. major-Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Ein ableitender Lymphknoten wurde jeweils am Tag 0, 3, 6, 10, 14 und 28 präpariert und daraus die RNA isoliert. Nach dem Umschreiben in cDNA wurde eine quantitative PCR-Analyse mit Primern für IL-10 durchgeführt. Die Abbildung zeigt Daten aus einem Experiment mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe.

3.6 Proliferation und Apoptose

3.6.1 Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen

Nach der Antigenpräsentation in den ableitenden Lymphknoten kommt es zu einer Differenzierung von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen und Aktivierung von T-Zellen. Als Hauptmerkmal der Aktivierung kommt es im Verlauf einer Immunreaktion zunächst zu einer Expansion der aktivierte T-Zellen. Im Folgenden wurde bestimmt, ob sich die CCR6-Defizienz auf das Proliferationsverhalten in den CCR6^{-/-}-Mäusen auswirkt. Um die Proliferationsrate der T-Zellen zu untersuchen, wurde den Tieren jeweils drei Tage vor der Präparation der Lymphknoten über das Trinkwasser BrdU verabreicht. Jede sich teilende Zelle baut neben den normalen Nukleotiden auch mehrere Moleküle des Nukleotidanalogons BrdU ein. Nach Präparation der Lymphknoten und der antigenspezifischen Färbung von CD4, CD8, und BrdU mit fluorochrom-konjugierten Antikörpern, wurden die Zellen analysiert.

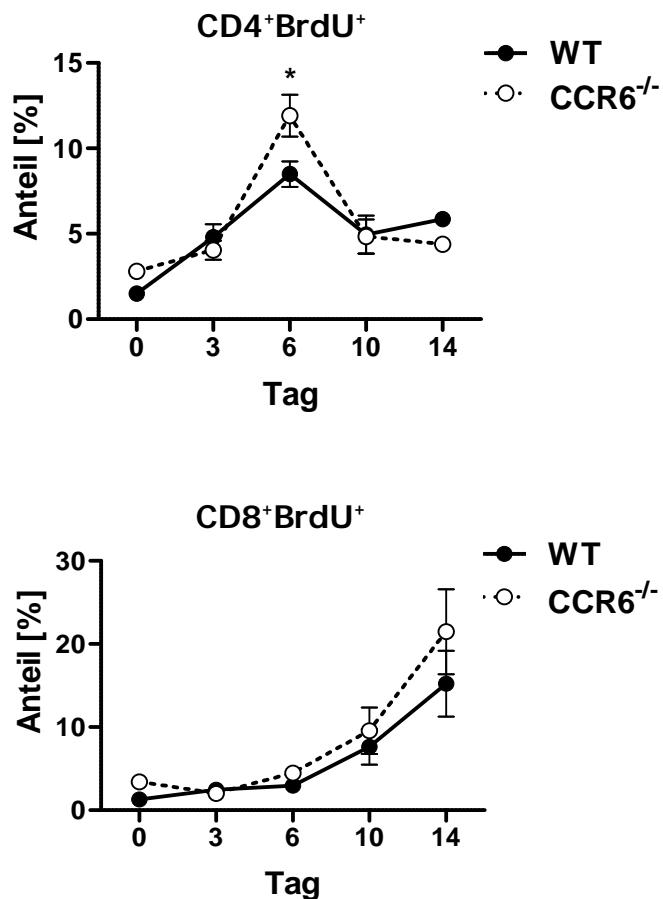


Abbildung 3.23: Proliferation von CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 *L. major* Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die Tiere bekamen jeweils drei Tage vor der Analyse BrdU über das Trinkwasser verabreicht. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt und mit α CD4, α CD8 und α BrdU fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Unter A ist die CD4⁺BrdU⁺- und unter B die CD8⁺BrdU⁺-Zellpopulation aufgetragen. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe (* p < 0,05, Two-way ANOVA).

In der Abbildung 3.23 A ist der Anteil der proliferierenden CD4⁺-Zellen aus der gesamten CD4⁺-Zellpopulation gezeigt. Im Verlauf der Infektion nimmt in beiden Mausstämmen der Anteil von etwa 2 % auf ca. 10 % um das ca. 5fache (bis Tag 6) nach Infektion zu. Am Tag 6 sind die proliferierenden

CD4⁺-Zellen in den CCR6^{-/-}-Mäusen signifikant erhöht. Nach Tag 6 nimmt der Anteil der proliferierenden Zellen am Tag 10 und Tag 14 bis auf ca. 5 % ab. Für die CD8⁺-Zellen zeigt sich während der Infektion eine veränderte Kinetik. Der Anteil der CD8⁺-proliferierenden Zellen in den WT- bzw. CCR6^{-/-}-Mäusen nimmt von ca. 2,5 % auf ca. 17,5 % zu (Abb. 3.23 B), wobei sich der Anteil der proliferierenden Zellen etwa versechsfachte. Zwischen den Mausstämmen ergab sich hier kein Unterschied.

3.6.2 Proliferation nach SLA-Restimulation *in vitro*

Nachdem in beiden Mausstämme eine Proliferation der CD4⁺ und CD8⁺ nach Infektion *in vivo* gezeigt wurde, soll nun die antigenspezifische Proliferationsfähigkeit *in vitro* zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Infektion untersucht werden. Dazu wurden die WT- bzw. CCR6^{-/-}-Mäuse mit *L. major* Parasiten infiziert, um die Zellen zu aktivieren. Nach der Isolation wurden die primären Lymphknotenzellen mit CSFE markiert und mit SLA *in vitro* für drei Tage restimuliert. Nach der Markierung wurde die antigenspezifische Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen im FACS analysiert. Im Verlauf der Infektion konnten an verschiedenen Tagen für die CD4⁺- bzw. CD8⁺-T-Zellen Unterschiede im Anteil der proliferierenden Zellen zwischen den WT- und CCR6^{-/-}-Mäusen festgestellt werden. Zunächst zeigte sich, dass etwa 10 % mehr CD4⁺-T-Zellen in den CCR6^{-/-}-Mäusen nach antigenspezifischer Restimulation am Tag 3 proliferierten (Abb. 3.24) Ebenfalls um ca. 10 % unterschied sich die Proliferationsrate der zytotoxischen T-Zellen an Tag 14 in den CCR6^{-/-}-Mäusen von den WT-Mäusen (Abb. 2.24 B). Auch hier zeigte sich eine verstärkte Proliferation von CD8⁺-Zellen in den CCR6^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen. Dieses mehr an Proliferation der einzelnen

Zelltypen in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen könnte ein Hinweis auf eine fehlende Regulation der T-Zellaktivität sein. Diese Hypothese wird durch die verringerte Anzahl der T_{reg} -Zellen in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen unterstützt. Global ist festzustellen, dass in beiden Mauslinien eine antigenspezifische Proliferation der Zellen stattfindet.

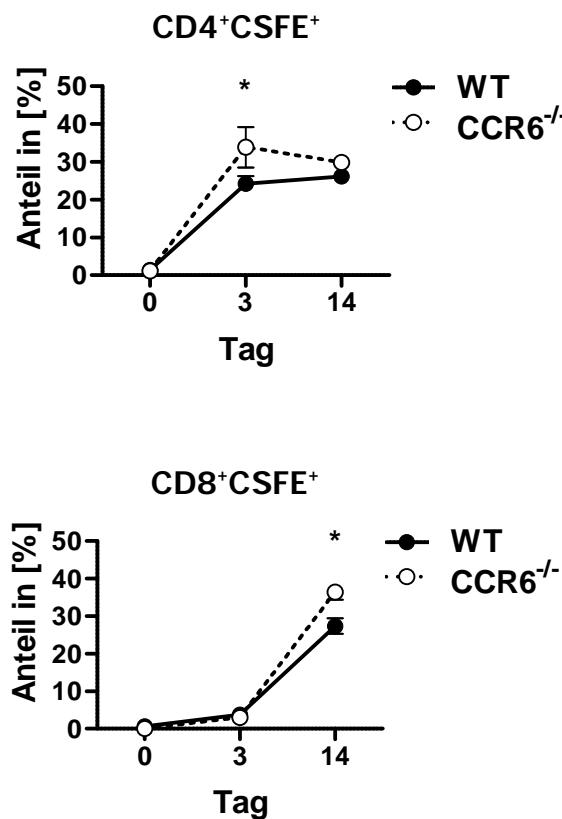


Abbildung 3.24: In vitro Proliferation nach SLA-Stimulation: WT- und $CCR6^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 3×10^6 *L. major* Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3 und 14 und zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt und mit CSFE markiert, drei Tage mit SLA in vitro restimuliert und anschließend mit α CD4 und α CD8 und α B220 fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Unter A sind die $CD4^+CSFE^+$ - und unter B die $CD8^+CSFE^+$ -Zellpopulation dargestellt. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten von einem Experimenten mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe (* $p < 0,05$, Two-way ANOVA).

3.6.3 CD4⁺- und CD8⁺-apoptotische Zellen in den Lymphknoten

Im Folgenden sollen die Auswirkungen des Fehlens des Rezeptors in den CCR6^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen in Bezug auf die Apoptoserate der T-Zellpopulationen im Verlauf der Infektion mit *L. major* untersucht werden. Die apoptotischen Zellen wurden anhand der Aktivität von Caspase 3 und 7 bestimmt. Die Mäuse wurden infiziert, die ableitenden Lymphknoten an verschiedenen Tagen präpariert und Zellsuspensionen hergestellt. Nach Inkubation mit FLICA-Reagenz erfolgte die Markierung von CD4 und CD8 und die anschließende Analyse der Zellen. In Abbildung 3.25 A ist die zwischen WT- und CCR6^{-/-}-Mäusen ähnlich verlaufende Kurve der Apoptoserate der CD4⁺-Zellpopulation gezeigt, die im Verlauf der Infektion von ca. 2,5 % auf 7,5 % ansteigt. Anders verhält es sich bei den CD8⁺FLICA⁺-Zellen (Abb. 3.25 B). Im Verlauf der Infektion ist die Apoptoserate in den WT-Mäusen signifikant größer als in den CCR6^{-/-}-Mäusen. Während die Apoptoserate der WT-Zellen von ca. 2 % bis auf ca. 6 % bis Tag 6 nach Infektion ansteigt und bis Tag 14 wieder auf etwa 5 % sinkt, zeigt sich bei den CCR6^{-/-}-Mäusen bis Tag 6 zwar ein ähnlicher Verlauf, aber an Tag 10 und 14 fällt die Apoptoserate bis auf unter ca. 2 %. Betrachtet man diesen Befund zusammen mit der Proliferationsrate der CD8⁺-Zellen aus 3.6.1, so ist vermuten, dass die CD8⁺-Zellpopulation in den CCR6^{-/-}-Mäusen größer ist. Dies unterstützt auch die Hypothese der Fehlregulation bzw. der T-Zellsuppression.

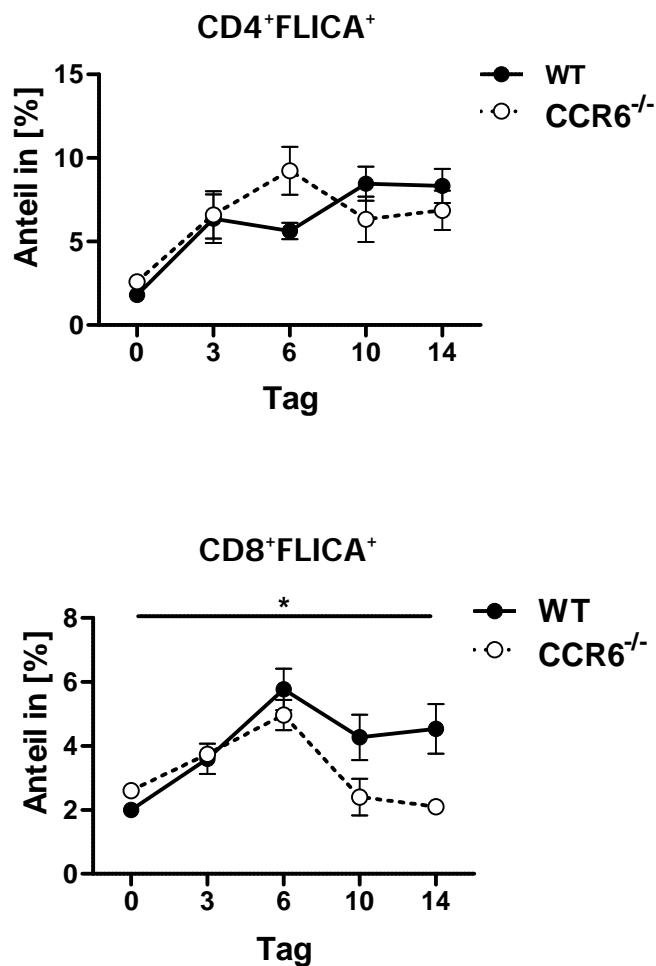


Abbildung 3.25: Apoptoserate von CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen: WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse wurden mit 3×10^6 *L. major* Parasiten in beide Hinterpfoten infiziert. Die ableitenden Lymphknoten wurden jeweils am Tag 0, 3, 6, 10 und 14 zu einer Zellsuspension verarbeitet. Die Zellen wurden gezählt, mit FLICA-Reagenz inkubiert und mit α CD4, α CD8 und α B220 fluorochrom-konjugierten Antikörpern markiert. Die Analyse wurde mit dem LSR-II durchgeführt. Unter A ist die CD4⁺FLICA⁺- und unter B die CD8⁺FLICA⁺-Zellpopulation aufgetragen. Abgebildet sind die Mittelwerte (\pm SEM). Die Abbildung zeigt Daten eines repräsentativen Experiments von zwei mit jeweils drei Mäusen pro Gruppe ($*$ $p < 0.05$, Two-way ANOVA).

4 Diskussion

Nach Schätzungen der WHO sind weltweit etwa 350 Mio. Menschen von der Leishmaniose bedroht. Jährlich kommen zu den im Moment ca. 12 Mio. infizierten Menschen etwa zwei Mio. Neuerkrankungen hinzu. Die klinischen Symptome einer Leishmanien-Infektion sind durch die verschiedenen Arten der Leishmania-Parasiten sehr unterschiedlich. Die am weitesten verbreitete Form ist die kutane Leishmaniose, auch Orientbeule genannt, von der meist unbedeckte Körperstellen betroffen sind.

In der Regel kann das Immunsystem eines gesunden Menschen, den Erreger innerhalb von zwei bis drei Wochen bekämpfen und es kommt zu einer klinischen Ausheilung der Leishmaniose. Aber z.B. eine HIV-Infektion oder eine andere Form der Immunsupprimierung kann zu einer Reaktivierung der latenten Infektion führen kann. Es bilden sich dann im Verlauf der Krankheit Geschwüre und Ödeme mit zu Teil erheblicher Gewebszerstörung am Ort der Infektion. Da es bisher keine wirksame Prophylaxe in Form eines Impfstoffes gibt, ist es wichtig die Abwehrmechanismen des Immunsystems genau zu studieren, um neue Heilungsstrategien gegen diese Krankheit zu entwickeln (Kayser et al., 2005).

4.1 Protektive Immunantwort in den CCR6^{-/-}-Mäusen

Leishmanien sind obligat intrazelluläre Erreger, die durch eine überwiegende T_H1-Immunantwort beim Mensch, wie auch bei der Maus bekämpft werden (Sacks et al., 2002). In den resistenten C57BL/6-Mäusen kommt es durch eine T_H1-Immunantwort-vermittelte IFN- γ -Produktion, zu einer Aktivierung von Makrophagen, die über NO-Synthese die intrazellulären Parasiten bekämpfen können (Ritter, 2010). In dieser Arbeit soll die Funktion von CCR6, einem Chemokin-Rezeptor, der für die Migration von T_H17- und T_{reg}-Zellen verantwortlich ist, für die T_H-Zellimmunantwort im Modell der Leishmaniose näher charakterisiert werden. Weiter sollen die Mechanismen, die früh in der Infektion zu einer Weichenstellung in Richtung verstärkte Immunantwort führen und die Zelltypen, die hierfür verantwortlich sind, in dieser Arbeit genauer analysiert werden.

4.1.1 Pfortenschwellung im Infektionsverlauf

Für die Untersuchung der Funktion des CCR6 wurden WT- und CCR6^{-/-}-Mäuse mit 3 x 10⁶ L. major Parasiten infiziert und anschließend die Pfortendicke gemessen.

Die Pfortendicke in beiden Mäusen nimmt in den ersten 21 Tagen stark zu. Die Pforten der CCR6^{-/-}-Mäuse schwollen im weiteren Verlauf stärker an. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass CCR6^{-/-}-Mäuse genauso wie die WT-Mäuse die Krankheit nach etwa 14 Wochen auszuheilen konnten. Das heißt beide Mausstämme können eine protektive Immunantwort ausbilden (Lechner et al., 2007). Der in dieser Arbeit vorgestellte Befund einer stärkeren

Schwellung der CCR6^{-/-}-Mäusepfoten spricht für eine verstärkte Entzündung in den Pfoten.

4.1.2 Klassenwechsel der B-Zellen

Die Immunantwort gegen *L. major* in C57BL/6 Mäusen ist vor allem durch das Effektor-Zytokin IFN- γ gekennzeichnet. So ist beschrieben, dass IFN- γ wichtig ist für den Klassenwechsel und die Produktion von Antikörpern des IgG2a-Typs, aber die Expression von z.B. IgG1 Antikörpern inhibiert. Somit zeigt die IgG2a-Produktion die Polarisierung der Immunantwort in Richtung T_H1 an (Snapper et al., 1987). In unserem Infektionsmodell konnte sowohl auf RNA- und Protein-Ebene in den WT- bzw. CCR6^{-/-}-Mäusen eine gesteigerte Produktion von IFN- γ ab Tag 10 festgestellt werden. Dies spricht dafür, dass auch in den CCR6^{-/-}-Mäusen eine T_H1-dominierte Immunantwort abläuft. Der Befund wird gestützt durch die Untersuchung der Serumspiegel von IgG1 und IgG2a. Es kommt, wie in den WT-Mäusen, in den CCR6^{-/-}-Mäusen zu einer gesteigerten Produktion von IgG2a. Im Vergleich dazu blieb die IgG1 Antikörperproduktion auf einem niedrigen Basalwert und mit den WT-Mäusen vergleichbar. Weiter sind die Parasiten in der Lage die IFN- γ -vermittelte Immunantwort durch Sekretion von suppressorischen Proteinen zu inhibieren und gleichzeitig die IL-4 Expression in C57BL/6-Mäusen anzukurbeln (Tabatabaei et al., 2011). In diesem Zusammenhang kam es in beiden Mausstämmen nach Infektion mit *L. major* trotz einer T_H1-dominierten Immunantwort zu einer Induktion der Expression von IL-4. Die IL-4-Produktion ist in den Lymphknoten zum Großteil auf die folikulären T_H-Zellen beschränkt (Reinhardt et al., 2009). Tendenziell wurde in den CCR6^{-/-}-Mäusen im Verlauf der Infektion die IL-4 Expression schwächer hochreguliert und auf der

anderen Seite mehr IFN- γ produziert. Das heißt, die sekretorischen suppressiven Proteine der Parasiten könnten in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen nur eine verminderte Wirkung haben. Wahrscheinlicher ist aber, dass in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen im frühen Stadium der Infektion zwischen Tag 0 und Tag 6 die vermehrte IFN- γ -Produktion durch NK-Zellen sich inhibitorisch auf die Expression von IL-4 auswirkt. Die inhibitorische Wirkung von IFN- γ auf die T_H2-Differenzierung wurde schon in den 80er Jahren gezeigt (Gajewski et al., 1988).

4.1.3 CD4 $^{+}$ bzw. CD8 $^{+}$ T-Zellsubpopulation

Schon seit den 90er Jahren ist bekannt, dass funktionelle CD4 $^{+}$ T_H-Zellen nötig sind, um eine kutane Leishmaniose ausheilen zu können (Erb et al., 1996). Für die Resistenz von C57BL/6 Mäusen für *L. major* ist das Zytokin IL-12 sehr wichtig und in der Erstinfektion für die Induktion der IFN- γ -Produktion von T-Effektor-Zellen verantwortlich (Park et al., 2002; Pakpour et al., 2008). In Protein Kinase C δ -(PKC δ)-defizienten C57BL/6-Mäusen, einem Enzym, dass wichtig in der Signalkaskade für die Induktion der IL-12 Expression ist, wird kaum IFN- γ gebildet und es kommt zu einer nicht-ausheilenden, chronischen Entzündung in diesen Mäusen (Guler et al., 2011).

In unserem Leishmanien-Modell wurde die Expression der beiden Untereinheiten von IL-12 durch eine quantitative PCR-Analyse untersucht. Es stellte sich heraus, dass sowohl die Expression der Untereinheit IL-12p35 als auch der Untereinheit IL-12p40 in den WT-Mäusen im Verlauf der Infektion im Vergleich zu den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen hochreguliert ist (3.3.1). Die deutliche Hochregulierung von IL-12p40 am Tag 6, aber auch im Verlauf der Infektion in den WT-Mäusen, korreliert in unserem Modell mit der zunehmenden Anzahl

von INF- γ CD4 $^{+}$ T_H-Zellen. Trotz der geringeren Hochregulierung von IL-12p40 und IL-12p35 in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen, reicht die Expression aus, um eine gleichwertige IFN- γ -Immunantwort von CD4 $^{+}$ -T-Zellen in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen zu induzieren. Ein weiterer Beleg für eine T_H1-dominante Immunantwort ist die Expression von IFN- γ selbst. Sie zeigt keine Unterschiede zwischen beiden Mausstämmen und auch die Kinetik der IFN- γ Expression war vergleichbar.

Das während der Infektion gebildete IL-12 wirkt sich positiv auf die Zellteilung und somit auf die Differenzierung von T_H-Zellen aus. Auf der anderen Seite wird die Apoptose von aktivierten T_H-Zellen inhibiert (Park et al., 2002). Im Verlauf der Infektion nimmt die CD4 $^{+}$ -Zellpopulation bezogen auf die Zellzahl in beiden Mausstämmen zu. Wie schon oben erwähnt, ist die Expression der IL-12-Untereinheiten in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erniedrigt. Die durch die Infektion induzierte Proliferation wurde mittels BrdU-Einbau verfolgt. Es konnte der typische Verlauf einer CD4 $^{+}$ T_H-Zellaktivierung bis Tag 6 (Reinhardt et al., 2001) durch die damit verbundene Proliferation nach Infektion beobachtet werden. Zwischen Tag 0 und 6 stieg die Proliferationsrate in den WT- und CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen an. Nach SLA-Stimulation *in vitro* zeigte sich an Tag 3 für die CD4 $^{+}$ -T_H-Zellen in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen eine gesteigerte Proliferationsrate. Dies bestätigt die funktionelle Aktivierung von T_H-Zellen. Bei der Apoptoserate konnte allerdings kein Unterschied in der CD4 $^{+}$ T_H-Zellpopulation im Verlauf der Infektion zwischen den Mausstämmen belegt werden.

Es wurden gezeigt, dass neben den CD4 $^{+}$ -IFN- γ -Produzenten auch CD8 $^{+}$ -T-Zellen bei der kutanen Leishmaniose im Menschen eine wichtige Rolle als IFN- γ -Produzenten spielen (Nateghi et al., 2010). Auch im Mausmodell von C57BL/6-Mäusen mit einer low dose Infektion von 100 Parasiten pro Ohr

wurde eine CD8⁺-zellabhängige protektive Immunantwort gezeigt. Denn CD8^{-/-}-Mäuse können die low dose Infektion nicht kontrollieren (Belkaid et al., 2002). Im Gegensatz zu den CD4⁺ IFN- γ -Produzenten, steigt die Anzahl der CD8⁺ IFN- γ -Produzenten bis Tag 6 in beiden Mausstämmen stark an und nimmt dann wieder ebenso stark ab. Dieser Befund ist ein Indiz, dass die CD8⁺ T-Zellen in der frühen Immunantwort gegen *L. major* ebenso wichtig sind. Im weiteren Verlauf der Infektion spielen die zytotoxischen T-Zellen für die Ausheilung der Leishmaniose keine Rolle (Erb et al., 1996).

Zusammengefasst kann man sagen, dass nach Infektion mit *L. major*-Parasiten die T_H1-Immunantwort sowohl in den WT-Mäusen als auch in den CCR6^{-/-}-Mäusen induziert wird und eine Ausheilung der Erkrankung ermöglicht. Denn auch die Makrophagen-Aktivierung ist in den CCR6^{-/-}-Mäusen vergleichbar mit den WT-Mäusen (Lechner et al., 2007). Diese sorgen letztlich für die Ausheilung.

4.2 Fehlregulation der Immunantwort in den CCR6^{-/-}-Mäusen

4.2.1 Parasitenlast im Infektionsverlauf

CXCR3 ist neben CCR6 ein wichtiger Rezeptor der die Migration von Effektorzellen an den Entzündungsort dirigiert (Groom et al., 2011). In Leishmanien-infizierten CXCR3^{-/-}-Mäusen wurde gezeigt, dass weniger CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen am Ort der Entzündung zu finden sind und zugleich die Parasitenlast im Vergleich zu den WT-Mäusen zunimmt (Rosas et al., 2005). In unserem Modell stieg die Parasitenlast in den Lymphknoten bis zum Tag 28 zwischen beiden Mausstämmen vergleichbar an. In der Leber und im Knochenmark wurden nur wenige Parasiten ab Tag 6 nachgewiesen. In der Milz wurden keine Parasiten detektiert. Dies weist darauf hin, dass in den CCR6^{-/-}-Mäusen keine Viszeralisierung stattfindet. Die vergleichbare Parasitenlast gibt somit keine Erklärung dafür, warum die Pfoten der CCR6^{-/-}-Mäuse stärker geschwollen sind.

4.2.2 T_H17-Zellen im Verlauf der Infektion

Im Menschen ist eine Immunantwort gegen *L. donovani* assoziiert mit einer Induktion der Expression von IL-17 und IL-22. Das meiste IL-17 und IL-22 wird von T_H17-Zellen produziert und es wird angenommen, dass diese Zytokine eine komplementäre Rolle zu den T_H1-Zytokinen einnehmen (Pitta et al., 2009). Auch nach der Infektion von WT- und CCR6^{-/-}-Mäusen mit *L. major*-Parasiten ist im Lymphknoten im Verlauf der Krankheit wurde eine Zunahme der Zellzahl von CD4⁺IL-17⁺-Zellen (T_H17-Zellen) zu beobachtet. Die Zellzahlen unterscheiden sich bis Tag 6 kaum zwischen beiden Mausstämmen. Danach können die WT-Mäuse das Niveau von ca. 10⁴ pro Lymphknoten

halten, während die T_{H17} -Zellpopulation in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen um 2/3 abnimmt. Das kann mehrere Ursachen haben. Es wurde schon gezeigt, dass in der Leishmaniose die Migration von $CD4^+$ -Zellen zum Entzündungsherd in $CCR6^{-/-}$ -Mäusen vermindert ist (Lechner et al., 2006). Somit kann nicht von einer Auswanderung der T_{H17} -Zellen, als Grund für eine Abnahme im Lymphknoten ausgegangen werden. Ohne $CCR6$ können diese Zellen nicht in den Lymphknoten migrieren oder dort gehalten werden. Wie gezeigt wurde, wird der Ligand von $CCR6$, $CCL20$ am Tag 2 in beiden Mausstämmen massiv hochreguliert. Somit konnte wir zeigen, dass $CCR6$ auch für die Migration von T-Zellen in den Lymphknoten wichtig ist.

Durch $IL-17$ kommt es zu einer Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen an den Ort der Entzündung. T_{H17} -Zellen stellen auch in diesem Zusammenhang einen Hauptproduzenten von $IL-17$ dar (Ouyang et al., 2008). Damit T_{H17} -Zellen diese Funktion erfüllen können, müssen sie ebenfalls an den Entzündungsort migrieren. Durch die fehlende Migration der T_{H17} -Zellen in die Pfoten der $CCR6^{-/-}$ -Mäuse im Verlauf der Infektion ist wahrscheinlich auch die Rekrutierung von Neutrophilen gestört. Neutrophile sind an der Bekämpfung der Leishmanien beteiligt, dienen aber auch als Wirtszelle für den Parasiten (Ritter et al., 2009).

Das Zytokin $IL-21$ ist involviert bei der T- und NK-Zellaktivierung und wird vor allem von $CD4^+$ -T-Zellen exprimiert (Leonard et al., 2005). In unserem Leishmaniose-Mausmodell ist $IL-21$ -Expression in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen tendenziell stärker hochreguliert als in den WT-Mäusen. Es konnte gezeigt werden, dass $IL-21$ synergistisch mit $IL-15$ zu einer verstärkten NK-Zell Aktivierung führt (Liu et al., 2009). Es ist daher wahrscheinlich, dass die stärkere Expression von $IL-21$ in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen mitverantwortlich für die vergrößerte NK-Zellpopulation im Verlauf der Infektion ist. An Tag 10 zeigte

sich die stärkste Korrelation. IL-21 kann auch die IFN- γ -Produktion in NK-Zellen induzieren (Ianello et al., 2010). Auch die Befunde in Bezug auf die IFN- γ -Produktion von NK-Zellen in den CCR6^{-/-}-Mäusen lassen sich durch die erhöhte IL-21 Expression erklären. Unter den NK-Zellen waren deutlich mehr IFN- γ^+ -NK-Zellen vorhanden. Eine mechanistische Erklärung, warum in den CCR6^{-/-}-Mäusen die IL-21-Expression tendenziell erhöht ist, kann an dieser Stelle nicht gegeben werden. Weiter darf nicht vergessen werden, dass die Effekte von IL-21 nicht sehr spezifisch sind und auch der Zustand der Zielzelle eine entscheidende Rolle spielt (Spolski et al., 2010).

4.2.3 T_{reg}-Zellen im Verlauf der Infektion

Die Aufgabe von T_{reg}-Zellen ist ein überschießen der Immunantwort zu verhindern (Sakaguchi et al., 1995). Dies geschieht im Verlauf der Infektion durch die Produktion von anti-inflamatorischen Zytokinen, wie IL-10. So verhindert IL-10 ein Überschießen der Immunantwort (Kühn et al., 1993). Auch T_{reg}-Zellen exprimieren CCR6 auf ihrer Oberfläche. In der EAE konnte eine Migration von T_{reg}-Zellen über CCR6 ins Gehirn gezeigt werden (Korn et al., 2007). Eine Migration von T_{reg}-Zellen mittels CCR6 zum Ort der Entzündung im Verlauf der Infektion mit *L. major* sollte somit in den CCR6-defizienten Mäusen ausgeschlossen sein. T_{reg}-Zellen migrieren nicht nur allein durch CCR6 zum Ort der Entzündung. Es wurde auch eine CCR5-abhängige Migration in die Dermis beschrieben. Die Infektion von CCR5^{-/-}-Mäusen zeigte im Vergleich zu den WT-Mäusen, dass am Ort der Entzündung mehr CD4⁺IFN- γ^+ -Zellen zu finden sind. Dieser Befund steht im Zusammenhang mit einer verminderten Anzahl von T_{reg}-Zellen am Entzündungsort, die normalerweise ein Langzeitüberleben des Parasiten sichern. Ohne diese CCR5⁺-T_{reg}-Zellen kann

eine stärkere IFN- γ -Immunantwort durch CD4 $^{+}$ -Zellen induziert werden. Dies hat in diesen Mäusen eine starke Resistenz gegen die *L. major* Parasiten zur Folge (Yurchenko et al., 2006). Aber die CCR6 gesteuerte Migration führt wahrscheinlich nicht nur zum Ort der Entzündung. Wie gezeigt werden konnte, wird die CCL20-Expression an den Tagen 2 bis 3 in den Lymphknoten stark hochreguliert. Im Vergleich zu den WT-Mäusen waren schon in den naiven CCR6-defizienten Mäusen weniger T_{reg}-Zellen im Lymphknoten vorhanden. Deswegen gehen wir von einer CCR6 gesteuerten Migration von T_{reg}-Zellen in den Lymphknoten aus. Die Reduktion der T_{reg}-Zellen in Lymphknoten legt eine frühe Fehlregulierung der Immunantwort nahe. In den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen ist im Vergleich zu den WT-Mäusen eine tendenziell geringere Parasitenlast in den Lymphknoten zu beobachten, was auf eine bessere Bekämpfung der Parasiten schließen lässt. Weiter wurde beschrieben, dass erst durch die Anwesenheit von T_{reg}-Zellen am Ort der Entzündung eine Persistenz der *L. major* Parasiten ermöglicht wird, da durch die Suppression von Effektorzellen, über IL-10 ab- und unabhängige Mechanismen, der Parasit überleben kann. (Belkaid et al., 2002). Die gesteigerte IFN- γ -Produktion im Lymphknoten könnte auf Grund des Mangels an T_{reg}-Zellen und der daraus resultierenden Fehlregulation der Entzündung herrühren. Dadurch kann in den CCR6 $^{-/-}$ -Mäusen, ähnlich wie in den CCR5 $^{-/-}$ -Mäusen (Belkaid et al., 2006) die verbesserte antiparasitäre Immunantwort erklärt werden verbunden mit einer stärkeren Schwellung der Pfoten.

Die Annahme der Fehlregulation der Immunreaktion unterstützt der Befund einer erhöhten Expression der Untereinheit IL-12p35 im Verlauf der Infektion in den WT-Mäusen. IL-35 wird aus den Untereinheiten IL-12p35 und dem Protein EBI-3 (Epstein-Bar-Virus induziertes Gen 3) gebildet (Hölscher, C.,

2004). Es hat immunsuppressorische Funktion, unter andrem in chronischen Entzündungsreaktion, aber auch bei Virus und Parasiten Infektionen und wird von T_{reg} -Zellen exprimiert (Collison et al., 2007). Die verminderte Expression in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen im Verlauf der Infektion, besonders ab Tag 10, könnte auf die verkleinerte Population der T_{reg} -Zellen zurück zuführen sein und eine stärkere Entzündung der Pfoten erklären.

4.2.4 Untersuchung der NK-Zellpopulation

Die Produktion von $IFN-\gamma$ in der frühen Phase der Infektion ist auf NK-Zellen zurückzuführen (Scharton-Kersten et al., 1995). Diese $IFN-\gamma^+$ -NK-Zellen sind in der Leishmaniose auch verantwortlich für die $CD4^+$ -T-Zelldifferenzierung (Scharton et al., 2010). Auch wir konnten durch den NK-Zellmarker NKp46 zeigen, dass in der frühen Phase der Infektion die NK-Zellen für die $IFN-\gamma$ -Produktion verantwortlich sind. Auch wenn sich die Proliferationsraten der $CD4^+$ -T-Zellen im Verlauf der Infektion zwischen den WT- und den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen ansonsten nur gering unterscheiden, so ist doch an Tag 6 eine vermehrte Proliferation in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen zu beobachten. Dies korreliert mit der Beobachtung, dass ab diesem Zeitpunkt auch die Anzahl der $IFN-\gamma^+$ -NK-Zellen in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen erhöht war. Es stellte sich die Frage, warum die NK-Zellpopulation in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen vergrößert ist. Wie schon oben erwähnt, wirkt IL-21 zusammen mit IL-15 synergistisch auf die Aktivierung der NK-Zellen und positiv auf deren $IFN-\gamma$ -Produktion aus. Weiter können NK-Zellen über IL-10 reguliert werden (Frimpong-Boateng et al., 2010). In unserem $CCR6^{-/-}$ -Mausmodell ist wahrscheinlich, dass durch eine verkleinerte T_{reg} -Population, die noch dazu keinen CCR6 haben, es zu einem relativen Mangel an IL-10 kommt und somit eine unzureichenden Supprimierung der NK-Zellen im Verlauf der Infektion in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen zustande kommt.

5 Zusammenfassung

Die Heilung der Leishmaniose ist von T_H -Zellen abhängig. Im Modell der Leishmaniose ist die T_H1 - und die T_H2 -Immunantwort gut verstanden. Der CCR6 wird von T_H17 - und T_{reg} -Zellen exprimiert. Die Rolle von T_H17 - und T_{reg} -Zellen im Krankheitsverlauf der Leishmaniose ist bis jetzt kaum untersucht worden.

In $CCR6^{-/-}$ -Mäusen lässt sich für die frühe Phase der Infektion sagen, dass das vermehrte gebildete $IFN-\gamma$ die Weichen für eine verstärkte Entzündungsreaktion stellen könnte. Es wird die Proliferation der $CD4^+$ -T-Zellen durch das vermehrte $IFN-\gamma$ in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen verstärkt. Auch passt in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen die verstärkte Expression von IL-21, welches mit IL-15 synergistisch wirkt, zu der erhöhten Anzahl von NK-Zellen und der erhöhten Anzahl von $IFN-\gamma^+$ -NK-Zellen. In diesem Zusammenhang ist auch die tendenziell geringere Parasitenlast in den Lymphknoten der $CCR6^{-/-}$ -Mäuse zu erwähnen, weil durch eine verstärkte Entzündungsreaktion auch die Parasiten besser bekämpft werden können.

Der primäre Effekt für die verstärkte Entzündungsreaktion in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen, ist aber sicherlich die geringere Anzahl der T_{reg} -Zellen im Lymphknoten im Verlauf der Infektion bei, weil ein Teil der immunsupprimierenden Zellen fehlt.

Daneben kommt es wahrscheinlich durch die geringere Anzahl der IL-17-produzierenden T_H17 -Zellen in den $CCR6^{-/-}$ -Mäusen zu einer geringeren Rekrutierung von Neutrophile, die neben den Makrophagen eine wichtige Rolle als Fresszellen bei der Bekämpfung der Parasiten haben.

Trotz dieser Fehlregulationen der Immunantwort können die CCR6^{-/-}-Mäuse die Infektion mit *L. major* ausheilen.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichniss

%	Prozent
°C	Grad Celsius
+/-	positiv/negativ
α	anti- oder alpha
μ	Mikro (10^{-6})
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APC	Allophycocyanin o. antigenpräsentierende Zelle
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
BrdU	Bromdesoxyuridin
bzw.	beziehungsweise
CCL	Chemokinrezeptor-Ligand
CCR	Chemokinrezeptor
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CSFE	5,6-Carboxyfluorescein-succinimidylester
Cy5	ein Cyanfarbstoff

DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol Dihydrochlorid
DC	dendritic cell, dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked-immunosorbant-assay
FACS	fluorescence-activated-cell-sorting, Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum, fötales Kalbserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC/SSC	forward/side scatter, Vor-/Seitwärtsstreulicht
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
HBSS	Hanks' buffered salt solution
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
IFN- γ	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
Kontr.	Kontrolle
L.	Leishmania

I	Liter
m	Milli (10^{-3})
M	molar (mol/l)
MHC-I/II	Haupthistokompatibilitätskomplex der Klasse-I/II
min.	Minute(n)
Mio.	Million
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
OD	Optische Dichte
p	Pico (10^{-12})
PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
qPCR	quantitative PCR
REU	relative ELISA-Einheiten
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rt	real time
RT	Raumtemperatur oder reverse Transkription
sec.	Sekunde(n)
SEM	standard error of the mean, Standardfehler

SLA	Lösliches L. major Antigen
sog.	so genannt
TAE	Tris-acetat EDTA
TGF- β	transforming growth factor- β
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TLR	Toll-like receptor
U	Unit
üN	über Nacht
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

6.2 Veröffentlichungen

Manuskripte, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind

Schmidt, D., Reber, S. O., Botteron, C., Barth, T., Peterlik, D., Uschold, N., Männel, D. N. & Lechner, A. (2010) Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav. Immun.* 24, 1097-1104.

Florian, C., Barth, T., Wege, A. K., Männel, D. N. & Ritter, U. (2010). An advanced approach for the characterization of dendritic cell-induced T cell proliferation *in situ*. *Immunobiology*. 215, 855-862.

Vorträge

Barth, T., Botteron, C., Florian, C., Ritter, U., Männel, D. N. & Lechner, A. (2010). Monitoring Th17 cells in C57BL/6 WT and CCR6^{-/-} mice during *L. major* infection. 14. Minisymposium Infektion und Immunabwehr, Rothenfels.

Posterpräsentation

Barth, T., Botteron, C., Hofstetter, A., Florian, C., Ritter, U., Männel, D. N. & Lechner, A. (2010). CCR6 deficiency leads to a stronger Th1 immune response in skin-draining lymph nodes after *L. major* infection. 40. Tagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, Leipzig.

Barth, T., Botteron, C., Hofstetter, A., Florian, C., Ritter, U., Männel, D. N. & Lechner, A. (2010). CCR6 deficiency leads to a stronger Th1 immune

response in skin-draining lymph nodes after *L. major* infection. 1. Summer school of the Regensburg International Graduate School of Life Sciences, „From molecule to disease“, Regen.

7 Literaturverzeichnis

- Abbas, K. A., Lichtman, A. H. & Pillai, S. (2007).** Cellular and molecular immunology, Saunders, 6th Edition.
- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J., Gurney, A. L. (2003).** Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.* 278, 1910-1914
- Aujla, S. J., Chan, Y. R., Zheng, M., Fei, M., Askew, D. J., Pociask, D. A., Reinhart, T. A., McAllister, F., Edeal, J., Gaus, K., Husain, S., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Pilewski, J. M., Myerburg, M. M., Mason, C. A., Iwakura, Y. & Kolls, J. K. (2008).** IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat. Med.* 14, 275-281.
- Aujla, S. J., Dubin, P. J. & Kolls, J. K. (2007).** Th17 cells and mucosal host defense. *Semin. Immunol.* 19, 377-382
- Awasthi, A. & Kuchroo, V. K. (2009).** Th17 cells: from precursors to players in inflammation and infection. *Int. Immunol.* 21, 489-498.
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M. C. & Sacks, D. (2002).** CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 168, 3992-4000.
- Boaventura, V. S., Santos, C. S., Cardoso, C. R., de Andrade, J., Dos Santos, W. L., Clarêncio, J., Silva, J. S., Borges, V. M., Barral-Netto, M., Brodskyn, C. I. & Barral, A. (2010)** Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. *Eur J Immunol.*, 40, 2830-2836.
- Codolo, G., Amedei, A., Steere, A. C., Papinutto, E., Cappon, A., Polenghi, A., Benagiano, M., Paccani, S. R., Sambri, V., Del Prete, G., Baldari, C. T., Zanotti, G., Montecucco, C., D'Elios, M. M. & de Bernard M. (2008).** *Borrelia burgdorferi NapA*-driven Th17 cell inflammation in lyme arthritis. *Arthritis Rheum.* 58, 3609-3617.
- Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. & Vignali, D. A. A. (2007).** The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature.* 450, 566-569.
- Cosmi, L., Annunziato, F., Maggi, E., Romagnani, S. & Manetti, R. (2001).** Chemoattractant receptors expressed on type 2 T cells and their role in disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 4, 273-279.

- Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A. & Sedgwick, J.D. (2003).** Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 421, 744-748.
- Das, M. P., Nicholson, L. B., Greer, J. M. & Kuchroo, V. K. (1997).** Autopathogenic T helper cell type 1 (Th1) and protective Th2 clones differ in their recognition of the autoantigenic peptide of myelin proteolipid protein. *J. Exp. Med.* 186, 867-876.
- Erb, K., Blank, C., Ritter, U., Bluethmann, H. & Moll, H. (1996).** Leishmania major infection in major histocompatibility complex class II-deficient mice: CD8+ T cells do not mediate a protective immune response. *Immunobiology*. 195, 243-260.
- Faria, A. M. and Weiner, H. L. (2006).** Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. 5, 179-190.
- Fitzhugh, D. J., Naik, S., Caughman, S. W. & Hwang, S. T. (2000).** Cutting edge: C-C chemokine receptor 6 is essential for arrest of a subset of memory T cells on activated dermal microvascular endothelial cells under physiologic flow conditions in vitro. *J. Immunol.* 165, 6677-6681.
- Frimpong-Boateng, K., van Rooijen, N. & Geiben-Lynn, R. (2010).** Regulatory T cells suppress natural killer cells during plasmid DNA vaccination in mice, blunting the CD8+ T cell immune response by the cytokine TGFbeta. *PLoS One*. 8:e12281.
- Fujino, S., Andoh, A., Bamba, S., Ogawa, A., Hata, K., Araki, Y., Bamba, T. & Fujiyama, Y. (2003).** Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*. 52, 65-70.
- Gajewski, T. F. & Fitch, F. W. (1988).** Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 140, 4245-4252.
- Girard, J. P. and Springer, T. A. (1995).** High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol. Today*. 16, 449-457.
- Golovina, T. N. & Vonderheide, R. H. (2010).** Regulatory T Cells. *Cancer J.* 16, 342-347.
- Groom, J. R. & Luster, A. D. (2011).** CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions. *Immunol. Cell Biol.* Epub ahead of print.
- Guler, R., Afshar, M., Arendse, B., Parihar, S. P., Revaz-Breton, M., Leitges, M., Schwegmann, A. & Brombacher, F. (2011).** PKCδ regulates IL-12p40/p70 production by macrophages and dendritic cells, driving a type 1

healer phenotype in cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* doi: 10.1002/eji.201040985.

Harrington, L. E., Hatton, R. D., Mangan, P. R., Turner, H., Murphy, T. L., Murphy, K. M. & Weaver, C. T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6, 1123-1132.

Hölscher, C. (2004). The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med. Microbiol. Immunol.* 1, 1-17.

Iannello, A., Boulassel, M. R., Samarani, S., Tremblay, C., Toma, E., Routy, J. P. & Ahmad, A. (2010). IL-21 enhances NK cell functions and survival in healthy and HIV-infected patients with minimal stimulation of viral replication. *J. Leukoc. Biol.* 5, 8578-8567.

Kayser, H. K., Böttger, E. C. & Zinkernagel R. M., (2005). Medizinische Mikrobiologie. Thieme. 10. Auflage, 569-575.

Kleinewiedfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Rotzschke, O. & Falk, K. (2005). CCR6 expression defines regulatory effector/memory-like T cells within the CD25⁺CD4⁺ T-cell subset. *Blood.* 105, 2877-2886.

Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T. R., Backstrom, B. T., Sobel, R. A., Wucherpfennig, K. W. & Strom, T. B. (2007) Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat. Med.* 13, 423-431.

Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Müller, W. (1993). Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 75, 263-274

Lechner, A., Ritter, U., Varona, R., Marquez, G., Bogdan, C. & Körner, H. (2007) Protektive immunity and delayed type hypersensitivity reaction are uncoupled in experimental Leishmania major infection of CCR6-negative mice. *Mic. Inf.* 9, 291-299.

Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A., & Cua, D. J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201, 233-240.

Lemischka, I. R., Raulet, D. H., & Mulligan, R. C. (1986). Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell.* 45, 917-927.

Leonard, W. J. & Spolski, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 688-698.

Levings, M. K. and Roncarolo, M. G. (2005). Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 293, 303-326.

- Liu, Z., Yang, L., Wang, X., Guo, C., Huang, Z., Kan, Q., Liu, Z. & Liu, Y. (2009).** IL-21 enhances NK cell activation and cytolytic activity and induces Th17 cell differentiation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 8, 1133-1144.
- McGeachy, M. J. & Cua, D. J. (2008).** Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity.* 28, 445-453.
- Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. (1989).** T_H1 and T_H2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7, 145-173.
- Nateghi Rostami, M., Keshavarz, H., Edalat, R., Sarrafnejad, A., Shahrestani, T., Mahboudi, F. & Khamesipour, A. (2010).** CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 10:e845.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F. & Kastelein, R. A. (2000).** Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 13, 715-725.
- Ouyang, W., Kolls, J. K. & Zheng, Y. (2008)** The biological functions of T helper effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 28, 454-467.
- Pakpour, N., Zaph, C. & Scott, P. (2008).** The central memory CD4+ T cell population generated during Leishmania major infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. *J Immunol.* 180, 8299-8305.
- Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A. M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D. M., Kastelein, R.A., de Waal Malefyt, R. & Moore, K.W. (2002).** A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* 168, 5699-5708.
- Park, A. Y., Hondowicz, B., Kopf, M. & Scott, P. (2002).** The role of IL-12 in maintaining resistance to Leishmania major. *J. Immunol.* 168, 5771-5777.
- Pennington, D. J., Vermijlen, D., Wise, E. L., Clarke, S. L., Tigelaar, R. E., & Hayday, A. C. (2005).** The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell-mediated responses. *Adv. Immunol.* 87, 27-59.
- Pitta, M. G., Romano, A., Cabantous, S., Henri, S., Hammad, A., Kouriba, B., Argiro, L., el Kheir, M., Bucheton, B., Mary, C., El-Safi, S. H. & Dessein, A. (2009)** IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani. *J. Clin. Invest.* 119, 2379-2387.

- Pötzl, J., Botteron, C., Tausch, E., Pedré, X., Mueller, A. M., Männel, D. N. & Lechner A. (2008).** Fracing Fuctional Antigen-Specific CCR6⁺ Th17 cells after Vaccination. PLoS one. 3, e2951.
- Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T. & Jenkins, M. K. (2001).** Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. Nature 410, 101-105.
- Ritter, U. (2010).** Presentation of skin-derived Leishmania antigen by dendritic cell subtypes. Protozoa, Immune Response to Parasitic Infections, Bentham-Press.
- Ritter, U., Frischknecht, F. & van Zandbergen, G. (2009)** Are Neutrophils important host cells for Leishmania parasites. Cell. 25, 505-510.
- Ritter, U., Lechner, A., Scharl, K., Kiafard, Z., Zwirner, J. & Körner, H. (2008).** TNF controls the infiltration of dendritic cells into the site of Leishmania major infection. Med. Microbiol Immunol. 197, 29-37.
- Röhrl, J., Yang, D., Oppenheim, J. J. & Hehlhans T. (2010).** Specific binding and chemotactic activity of mBD4 and its functional orthologue hBD2 to CCR6-expressing cells. J. Biol. Chem. 285, 7028-7034.
- Rosas, L. E., Barbi, J., Lu, B., Fujiwara, Y., Gerard, C., Sanders, V. M. & Satoskar A. R. (2005).** CXCR3-/- mice mount an efficient Th1 response but fail to control Leishmania major infection Eur. J. Immunol. 35, 515-523.
- Sacks, D. & Noben-Trauth N. (2002).** The immunology of susceptibility to Leishmania major in mice. Nat. Rev. Immunol. 11, 845-858.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995).** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. J. Immunol. 155, 1151-1164.
- Scharton, T. M. & Scott, P. (1993).** Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. J. Exp. Med. 178, 567-577.
- Scharton-Kersten, T. & Scott, P. (1995).** The role of the innate immune response in Th1 cell development following Leishmania major infection. J. Leukoc. Biol. 4, 515-522.
- Snapper, C. M. & Paul, W. E. (1987).** Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. Science. 236, 944-947.
- Spolski, R. & Leonard, W. J. (2010).** IL-21 is an immune activator that also mediates suppression via IL-10. Crit. Rev. Immunol. 6, 559-570.
- Stolberg, V. R., Chiu, B., Martin, B. E., Shah, S. A., Sandor, M. & Chensue, S. W. (2011).** Cysteine-Cysteinyl Chemokine Receptor 6 Mediates

- Invariant Natural Killer T Cell Airway Recruitment and Innate Stage Resistance during Mycobacterial Infection. *J. Innate Immun.* 3, 99-108
- Streck, H., Bogdan, C., Tingle, A. & Röllinghoff, M. (1987).** Murine cutaneous leishmaniasis: comparative study on the capacity of macrophages from "healer" and "non-healer" mouse strains to control *L. tropica* replication. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A.* 263, 594-604.
- Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M., & Shevach, E. M. (1998).** CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol.* 160, 1212-1218.
- Tabatabaei, P. A., Abolhassani, M., Mahdavi, M., Nahrevanian, H. & Azadmanesh, K. (2011).** Leishmania major: secreted antigens of *Leishmania* major promastigotes shift the immune response of the C57BL/6 mice toward Th2 in vitro. *Exp. Parasitol.* 127, 46-51.
- Tzartos, J. S., Friese, M. A., Craner, M. J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M. M. & Fugger, L. (2008).** Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am. J. Pathol.* 172, 146-155.
- Wan, Y. Y. & Flavell, R. A. (2006).** The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 212, 114-130.
- Wilhelm, P., Wiede, F., Meissner, A., Donhauser, N., Bogdan, C. & Körner, H. (2005).** TNF but not Fas ligand provides protective anti-*L. major* immunity in C57BL/6 mice. *Microbes. Infect.* 15, 1461-1468.
- Williams, I. R. (2004).** Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. *Immunol. Res.* 29, 283-292.
- Xu, L., Xu, W., Qiu, S. & Xiong, S. (2010).** Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer. *Clin. Immunol.* 135, 466-475.
- Yurchenko, E., Tritt, M., Hay, V., Shevach, E. M., Belkaid, Y. & Piccirillo, C. A. (2006).** CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4+ regulatory T cells to sites of *Leishmania* major infection favors pathogen persistence. *J. Exp. Med.* 203, 2451-2460.
- Zaba, L. C., Cardinale, I., Gilleaudeau, P., Sullivan-Whalen, M., Suárez-Fariñas, M., Fuentes-Duculan, J., Novitskaya, I., Khatcherian, A., Bluth, M. J., Lowes, M. A. & Krueger, J. G. (2007).** Amelioration of epidermal hyperplasia by TNF inhibition is associated with reduced Th17 responses. *J. Exp. Med.* 204, 3183-3194.

8 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Daniela N. Männel, Herrn Prof. Dr. Markus Schnare und Herrn Prof. Dr. Thomas Langmann für die Betreuung in Rahmen der Internationalen Regensburger Graduiertenschule für Lebenswissenschaften bedanken. Durch die Fragen und Anregungen hat diese Arbeit an Tiefe gewonnen.

Weiter Danke ich Dr. Anja Lechner für die Betreuung im Labor und die Kritik an meiner Arbeit. Ohne Ihre lehrenden und belehrenden Worte hätte nie entstehen können.

Luise Eder möchte ich für die Hilfe bei den vielen bürokratischen Kleinigkeiten danken.

Meinen (ehemaligen) Kollegen Anja W., Anne, Anne R., Barbara, Bernd, Doro, Ellen, Hannes, Johannes (Johann), Johannes, Judith, Karin, Katja, Mareile, Lisa, Louay, Max, Melanie, Nadine, Nicola, Nicole, Preetham, Sabine, Sophia, Sybille, Sven, Thomas, Uwe, Vroni, und Wolfgang möchte ich für die gute Zeit am Institut danken.

Einen lieben Dank an die Doktoranten Annette, Julia, Eva und Eugen, für die netten Unterhaltungen plus Laborspaß und das ich jetzt weiß, dass Mediziner doch nicht so doof sind ;-)

Dank gilt auch meinen Praktikanten Annika, Daniel, Dominic und Simon, dass ich an euch mein Geschick als Lehrender erproben dürfte.

Meinem lieben Laborkollegen, Prellbock und Freund Christian danke ich für die Gute Zeit im Labor, die Unterstützung mit Rat und Tat und für die offenen Gespräche.

Meinen Freunden Dani und Andi danke ich für die moralische Unterstützung und dass sie mich während der Zamschreiberei nicht vergessen haben. Vor allem aber danke ich Rudi und Nicole, die sich auch mal um meine Kinder gekümmert haben.

Meiner Partnerin Eva danke ich für die immer guten und aufbauenden Worte! Das sie immer an mich glaubte und mir tatkräftig zur Seite stand. Eva, ohne Dich wär ich nicht so weit gekommen, ich liebe Dich!