

**Aus dem Institut für Immunologie
der Medizinischen Hochschule Hannover**



**angefertigt im Rahmen des Programms
zur strukturierten Doktorandenausbildung**

StrucMed

**Die Funktion der Darm-drainierenden mesenterialen
Lymphknoten für die Immunität gegen den
Mauspeitschenwurm *Trichuris muris***

**Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Hochschule Hannover**

**vorgelegt von
Lena Maria Schaffartzik
2013**

Angenommen vom Senat der Medizinischen Hochschule Hannover am
26.04.2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Hochschule Hannover.

Präsident:	Prof. Dr. Dieter Bitter-Suermann
Betreuer:	Prof. Dr. Oliver Pabst
Referent:	Prof. Dr. med Franz Bange
Koreferent:	Prof. Dr. med. Georg Behrens

Tag der mündlichen Prüfung: 26.04.2013

Promotionsausschussmitglieder:

Prof. Dr. Michael Klintschar
Prof. Dr. Klaus Resch
Prof. Dr. Reinhard Schwinzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunkontrolle von <i>Trichuris muris</i>	4
1.1.1	Die Polarisierung der CD4 ⁺ T-Zell-Antwort entscheidet über die Kontrolle der <i>T. muris</i> Infektion	5
1.1.2	Effektormechanismen der Immunkontrolle von <i>T. muris</i>	8
1.2	Das Darmimmunsystem	11
1.2.1	Die Induktion von Immunantworten im Darm	11
1.3	Zielsetzung	14
2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Laborgeräte	16
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Gebrauchsfertige Reagenzien	17
2.1.5	Medien und Seren	18
2.1.6	Puffer und Lösungen	18
2.1.7	Antikörper und Konjugate	20
2.1.8	Mäuse	21
2.1.9	Parasiten und Antigene	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Organpräparation und Serumgewinnung	22
2.2.2	Histologie	22
2.2.3	Zellisolation	23
2.2.4	Durchflusszytometrie	24
2.2.5	Restimulation	24
2.2.6	Cytokin Assay	25
2.2.7	ELISA	25
2.2.8	Statistik	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Herstellung von infektiösen <i>Trichuris muris</i> Eiern und E/S-Antigen	27
3.2	MLN-defiziente C57BL/6-Mäuse können die <i>T. muris</i> Infektion nicht kontrollieren	28
3.3	Die Explantation der MLN beeinflusst nicht das Migrations- und Homing-Verhalten von T-Zellen in die Darmmukosa	30
3.3.1	Erhöhter Anteil CD3 ⁺ T-Zellen im Kolon <i>T. muris</i> infizierter MLN-defizienter Mäuse	34

3.3.2	CCR9-defiziente Mäuse zeigen keine erhöhte Wurmlast.....	36
3.4	Der Einfluss der MLN auf die Cytokinbalance der T-Zell Antwort während einer <i>T.muris</i> Infektion	37
3.5	MLN-explantierte Tiere weisen einen erhöhten IgG2a-Spiegel auf	41
3.6	Milz-explantierte Mäuse zeigen keine signifikant erhöhte Wurmlast.....	42
4	Diskussion	44
5	Zusammenfassung.....	52
6	Literaturverzeichnis	54
7	Abbildungsverzeichnis	59
8	Tabellenverzeichnis	60
9	Abkürzungsverzeichnis	61
10	Danksagung.....	63
11	Lebenslauf	64
12	Erklärung nach §2 Abs.2 Nrn.6 und 7.....	65

1 Einleitung

Mit weltweit fast 2 Milliarden Infektionen stellen durch intestinale Nematoden verursachte Erkrankungen ein erhebliches sozioökonomisches und medizinisches Problem dar. Nematodeninfektionen werden auch als Krankheiten der Armut bezeichnet und treten hauptsächlich in warmen tropischen oder subtropischen Gebieten mit niedrigem Hygienestandard auf (Abbildung 1). Viele Infektionsfälle verlaufen symptomfrei. Dennoch kann es in Einzelfällen zu schwerwiegenden Erkrankungen und bei mangelnder Behandlung zu einem chronischen Verlauf kommen. Insbesondere bei Kindern, die gleichzeitig die Bevölkerungsgruppe mit den höchsten Infektionszahlen darstellen, kann es zu blutiger Diarrhöe, Kolitis und einer damit verbundenen Anämie, zu einem rektalen Prolaps und zu einer verzögerten und eingeschränkten kognitiven Entwicklung kommen (1).

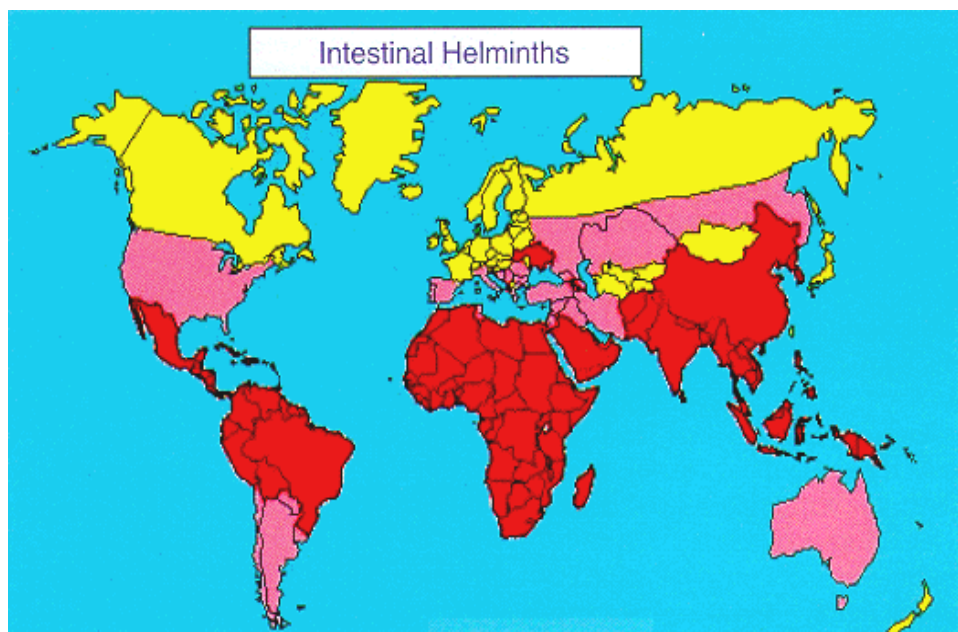


Abbildung 1: Geographische Verteilung der durch intestinale Nematoden verursachten Erkrankungen. In rot sind subtropische und tropische Gebiete mit niedrigem Hygienestandard, meist in Afrika, Südamerika oder Asien, hervorgehoben. In diesen Ländern kommt es begünstigt durch das warme und feuchte Klima, das die Entwicklung der Eier befördert, zu den meisten durch Nematoden verursachten Erkrankungen. In rosa sind die an die Problemländer angrenzenden Gebiete und in gelb hauptsächlich Industrienationen gezeigt, bei denen die Infektionszahlen deutlich geringer sind (2,3,6).

Die wichtigsten Erreger sind die Fadenwürmer *Trichuris trichiura*, der Spulwurm *Ascaris lumbricoides* und die Hakenwürmer *Necator americanus* und *Ancylostoma duodenalis* (4). Alleine durch *T.trichiura* werden weltweit 800 Millionen Infektionen verursacht (2,5). Die Übertragung der *T.trichiura* Infektionen erfolgt über den fäkal-oralen Weg ohne Zwischenwirte, indem die infektiösen Eier mit kontaminierten Nahrungsmitteln wie Reis, Bohnen, verschiedenen Getreidearten oder verunreinigten Trinkwasser aufgenommen werden. Aufgrund dieses typischen Übertragungsweges werden intestinale Nematoden auch als „soil transmitted helminths“ bezeichnet (5).

Nach Aufnahme der infektiösen Eier wandern diese durch den Magen weiter in den Dünndarm, in dem sie innerhalb von drei Monaten über das Larvenstadium zu adulten Würmern heranwachsen. Diese betten sich schließlich mit ihrem Kopf in das Epithel des Zäkums und des proximalen Kolons ein, wobei der Schwanz in das Darmlumen ragt und den Würmern so die Möglichkeit geboten wird sich mit benachbarten Würmern zu paaren. Die Würmer sind getrenntgeschlechtlich. Die Weibchen, die bis zu fünf Jahre überleben können, produzieren zwischen 2000 und 10000 Eier pro Tag, die mit dem Stuhl ausgeschieden werden und nach durchlaufener Embryonalzeit ihren infektiösen Status erlangen (Abbildung 2). Der Nachweis der mit dem Stuhl ausgeschiedenen Eier stellt in den meisten asymptomatischen Verläufen (Infektion mit weniger als 100 Eiern) das einzige diagnostische Kriterium dar (5,7,8).

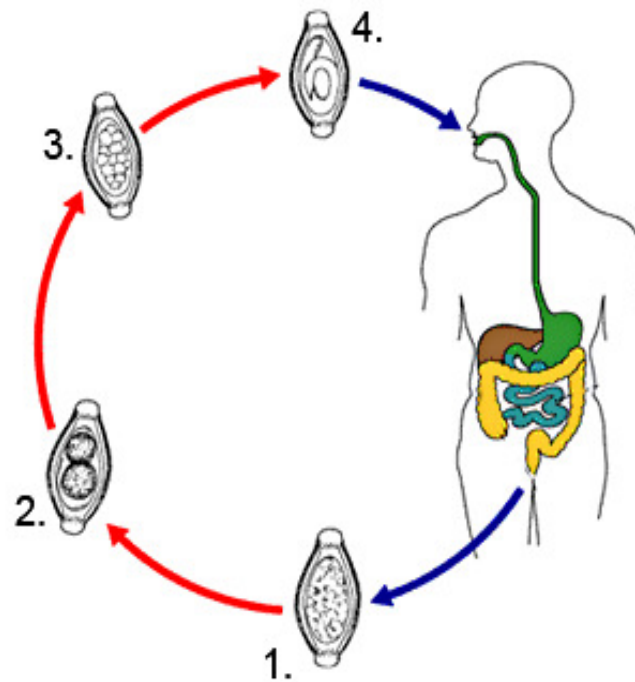


Abbildung 2: Der Infektionszyklus des *T. trichiura*. Abgebildet ist der Lebens- bzw. Infektionszyklus des *T. trichiura*. 1) Nicht infektiöse Eier werden mit dem Kot infizierter Patienten ausgeschieden. In asymptomatischen Fällen dient das Ausscheiden der Eier als einziges diagnostisches Kriterium. 2-4) Anschließend durchlaufen die Eier ihr Embryonalstadium bis sie ihren infektiösen Status erreicht haben (4). Durch kontaminierte Nahrungsmittel werden sie durch den Menschen aufgenommen, reifen heran und betten sich im Zäkum ein (9).

Die derzeitige Therapie der *T. trichiura* Infektion kann effektiv mit den Anthelminthika Mebendazol und Albendazol durchgeführt werden. In Einzeldosis verabreicht ist der Therapieerfolg jedoch nur gering (10,11). Eine mehrtägige Einnahme von Albendazol verbessert die Heilungsraten deutlich. Jedoch entsteht hierbei in den Entwicklungsländern der Konflikt, dass die Kosten für die Medikamente ansteigen, die Compliance der Bevölkerung abnimmt, sowie das Management für die Durchführung komplizierter wird. Somit bleibt eine effektive flächendeckende Behandlung in großen Teilen der betroffenen Gebiete aus (12). Die Folgen schwerer und chronischer Verläufe sind eine eingeschränkte kognitive Entwicklung bei Kindern und bei Erwachsenen durch den schlechten Gesundheitszustand die Arbeitsunfähigkeiten. Die WHO hatte sich durch Präventionsprogramme in Grundschulen das Ziel gesetzt, bei 75% der Schulkinder die Wurmlast effektiv und flächendeckend durch Medikamentenspenden bis 2010 zu reduzieren (2,6). Das langfristige Ziel in der

Forschung der *T.trichiura* Infektion bleibt weiterhin eine Immunisierungsstrategie zu entwickeln, da zunehmend befürchtet wird, dass sich durch die mehrfache und dauerhafte Gabe der Anthelminthika möglicherweise Resistenzen der Nematoden entwickeln können (10).

1.1 Immunkontrolle von *Trichuris muris*

Ein Infektionsmodell für die Erforschung von Wurmerkrankungen bieten Infektionen mit dem Maus-Pathogen *Trichuris muris*, welches nahezu den gleichen Lebenszyklus und Infektionsverlauf wie *T.trichiura* aufweist. Dieses Mausinfektionsmodell hat zu grundlegenden Erkenntnissen für das Verständnis der Infektion und der damit verbundenen Funktion des intestinalen Immunsystems geführt. Nach oraler Gabe infektiöser Eier kommt es in suszeptiblen Mausstämmen zur Entwicklung adulter Würmer im Zäkum und Kolon der infizierten Tiere. Die Anzahl der sich entwickelnden Würmer korreliert hierbei mit der Immunkontrolle durch den Wirt (13).

Athymische Mäuse waren nicht in der Lage die Infektion zu kontrollieren und es entwickelte sich ein chronischer Infektionsverlauf. Diesem Mausstamm fehlt der Thymus, sodass die Entwicklung von den Thymozyten, den Prä-T-Lymphozyten, zu T-Lymphozyten nicht stattfinden kann und diese Mäuse somit keine reifen T-Lymphozyten ausbilden. Der Transfer von Milzzellen bewirkte die vollständige Ausscheidung der Würmer, Zellen der mesenterialen Lymphknoten führten zu einer partiellen Resistenz (14). Ebenso sind SCID-Mäuse, die aufgrund einer Mutation der „Common gamma chain“ einen Funktionsverlust verschiedener Interleukin-Rezeptoren aufweisen und keine funktionsfähigen T- und B-Zellen bilden, nicht in der Lage die Würmer auszuschleiden (14,15). Auch in diesem Modell führte der Transfer von CD4⁺ T-Zellen aus infizierten Spendertieren in SCID Rezipienten zur Wiederherstellung der Infektionskontrolle (16).

Um spezifisch die Funktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen für die Infektionskontrolle zu untersuchen wurden depletierende Antikörper verwendet. Mäuse, die mit einem anti-CD4⁺-Antikörper behandelt wurden, konnten die Würmer anschließend nicht mehr ausscheiden und entwickelten einen chronischen Infektionsverlauf. Im Gegensatz dazu kam es bei den Tieren, denen ein anti-CD8⁺-Antikörper injiziert wurde, nicht zu einer Suppression der schützenden Immunantwort. Es konnte

außerdem kein Unterschied zwischen der Gabe von anti-CD4⁺-Antikörper und einer kombinierten Gabe von anti-CD4⁺- und anti-CD8⁺-Antikörper festgestellt werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die CD4⁺ T-Zellen die zentrale Rolle für die schützende Immunantwort spielen und dass CD4⁺ T-Zellen nicht nur notwendig, sondern auch ausreichend sind um die Immunkompetenz gegenüber *T.muris* zu entwickeln (14). Im Gegensatz zu CD4⁺ T-Zellen scheinen CD8⁺ T-Zellen keine entscheidende Funktion in der Immunkontrolle von *T.muris* zu spielen (14,15,16).

1.1.1 Die Polarisierung der CD4⁺ T-Zell-Antwort entscheidet über die Kontrolle der *T. muris* Infektion.

Infektionen in verschiedenen Mausstämmen zeigten deutlich divergente Infektionsverläufe. Viele übliche Laborstämme wie die C57BL/6 und BALB/c Mäuse sind in der Lage eine orale Infektion mit 200 infektiösen Eiern zu kontrollieren und scheiden die Würmer bis ca. 40 Tage nach Infektion vollständig aus (24). Im Gegensatz dazu entwickeln andere Mausstämme wie AKR eine chronische Infektion, die durch die persistierende Infektion adulter Würmer gekennzeichnet ist. Entscheidend für den Infektionsverlauf ist hierbei die Polarisierung der CD4⁺ T-Zell-Antwort. CD4⁺ T-Zellen werden in verschiedene Differenzierungslinien unterteilt: während anfänglich so genannte TH1 und TH2 CD4⁺ T-Zellen unterschieden wurden, berücksichtigen neuere Konzepte nun auch TH17, TH9, folliculäre TH (TFH), Treg und T-regulatorische T-Zellen Tr1 (Abbildung 3) (17,18).

Da für die Beschreibung der Immunantwort auf eine *T.muris* Infektion die Ausbildung von TH1/TH2 Antworten besonders wichtig ist, wird im Folgenden das vereinfachte TH1/TH2 Modell genauer dargestellt.

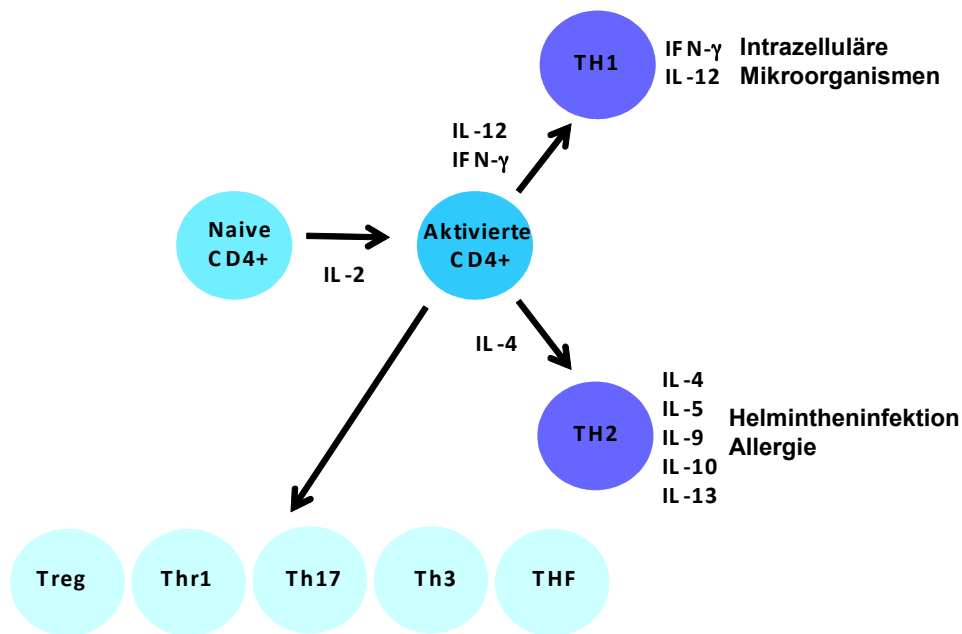


Abbildung 3: Differenzierung der CD4⁺ T-Zelle zu TH1- und TH2-Zellen. Die Abbildung zeigt die Differenzierungslinien einer naiven CD4⁺ T-Zelle. Antigenpräsentierende Zellen präsentieren der naiven T-Zelle über MHC-II das Antigen, durch zusätzliches IL-2 entwickelt sich die naive Zelle in eine aktivierte CD4⁺ T-Zelle. Die verschiedenen Cytokine bestimmen den letzten Entwicklungsschritt: Durch IL-12 und IFN- γ kommt es zur TH1-Differenzierung, das IL-4 führt hingegen zu einer TH2-Differenzierung. (Angelehnt an 18)

Die Differenzierung von TH1 T-Zellen kann *in vitro* durch Zugabe von Interleukin-12 (IL-12) bewirkt werden (Abbildung 4). TH1-Zellen sezernieren unter anderem Interferon gamma (IFN- γ) und spielen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung infizierter Makrophagen. Die TH1-Immunantwort umfasst die zellvermittelte Immunantwort und steht in Verbindung mit Erkrankungen durch intrazelluläre Mikroorganismen, wie Listerien oder Leishmanien. Der Krankheitsverlauf führt zur Aktivierung von Makrophagen oder Natürlichen Killerzellen (NK). Diese sezernieren IL-12 oder IFN- γ und das führt dazu, dass sich aktivierte CD4⁺ T-Zellen zu TH-1 Zellen differenzieren und anschließend selbst IFN- γ ausschütten. IFN- γ stimuliert die TH1-Proliferation und verhindert die Proliferation von TH2-Zellen. Es aktiviert Makrophagen um phagozytierte Mikroorganismen abzutöten und führt zu makrophagenreichen Entzündungen. Außerdem bewirkt es in Mäusen, dass es zu einem Immunglobulin-Wechsel zum Immunglobulin (Ig) G2a

durch die B-Zellen kommt. Das führt zur Aktivierung des Komplementsystems und zur Phagozytose opsonierter Mikroorganismen (19,20,21).

Die TH2-Zellen entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-4. Sie sind wesentlich an der Ausbildung der humoralen Immunantwort beteiligt. Zur TH2-Differenzierung kommt es durch Helmintheninfektionen und Allergien. Dabei wird unter anderem von Mastzellen und basophilen Granulozyten IL-4 produziert. Das führt dazu, dass sich aktivierte CD4⁺ T-Zellen zu TH2-Zellen differenzieren und die Cytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 sezernieren (20). IL-4 nimmt hierbei eine Schlüsselfunktion ein. Es stimuliert zusätzlich die Differenzierung zur TH2-Immunantwort und bewirkt außerdem den Isotypenwechsel zu IgE und in Mäusen zu IgG1. Gleichzeitig verhindert es den Wechsel zu IgG2a (21). IL-5 aktiviert die eosinophilen Granulozyten und stimuliert deren Wachstum und Differenzierung. IL-10 inhibiert die Expression von IL-12 durch Makrophagen und dendritischen Zellen und somit die Proliferation von TH1-Zellen. IL-13 stimuliert die Mukusproduktion von Becherzellen und beeinflusst die Epithelproliferation im Magen-Darm-Trakt während einer Helmintheninfektion (19).

Die Ausbildung einer TH1- oder TH2-Immunantwort während einer Infektion mit *T.muris* korreliert mit einem akuten oder chronischen Verlauf der Infektion (22,23). In den resistenten Mausstämmen C57BL/6 und BALB/c wird eine TH2-Immunantwort mit Bildung der Cytokinen IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 induziert. Die Infektion wird kontrolliert, die Larven entwickeln sich nicht zu adulten Würmern und die Mäuse haben bis Tag 35 p.i. ihre Larven ausgeschieden. In anfälligen Mausstämmen wie AKR kommt es zu einer TH1-Polarisierung mit den Cytokinen IFN- γ und IL-12. In der Folge sind diese Mäuse nicht in der Lage ihre Würmer auszuscheiden, stattdessen entwickeln sich die Larven zu adulten Würmern, die wiederum in der Lage sind nicht infektiöse Eier mit dem Kot abzugeben (24).

In verschiedenen Versuchen wurde die zentrale Rolle der TH1/TH2-Balance und der daran beteiligten Cytokine detailliert untersucht. So zeigten IL-4-defiziente Mäuse einen chronischen Infektionsverlauf und am Tag 35 p.i. adulte Würmer, deren Eier bereits mit dem Kot abgegeben wurden. Die infizierte Wildtyp-C57BL/6 Kontrollgruppe hingegen hatten zu diesem Zeitpunkt die Parasiten ausgeschieden. Dieser Verlauf korrelierte mit einer gestörten TH2-Differenzierung und verminderten IL-5, IL-9 und IL-13 Produktion. Stattdessen stieg bei diesen Tieren

der Level an IFN- γ deutlich an, was darauf hindeutet, dass diese Tiere durch das Fehlen von IL-4 verstärkt mit einer TH1-Immunantwort reagierten. Damit korrelierte auch der Anstieg von IgG2a, dessen Produktion durch das IFN- γ stimuliert wird (25). Interessanterweise ist der Infektionsverlauf im BALB/c-Stamm geschlechterabhängig: Weibliche IL-4-defiziente BALB/c-Mäuse reagieren resistent gegenüber der Infektion, wohingegen männliche IL-4-defiziente-Mäuse sich anfällig zeigten. Unterschiede zwischen den Geschlechtern in infizierten IL-4-defizienten-Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund waren nicht festzustellen: Beide Geschlechter zeigten einen chronischen Infektionsverlauf, bei dem an Tag 35 p.i. adulte Würmer im Darm nachgewiesen werden konnten (26).

Ebenso führte die Behandlung resistenter BALB/c Mäuse mit einem neutralisierenden IL-4-Antikörper zu einer Suppression der schützenden TH2-Immunantwort und zu einer verstärkten Differenzierung von TH1-Zellen. Das führte dazu, dass sich an Tag 36 p.i. adulte Würmer im Darm nachweisen ließen, wobei infizierte Wildtyp-Kontrollen bereits an Tag 21 p.i. den Großteil der Würmer ausgeschieden hatten (22). Umgekehrt führte eine Unterdrückung der TH1-Antwort in AKR-Mäusen durch einen neutralisierenden monoklonalen anti-IFN- γ -Antikörper zur Ausbildung einer TH2-Antwort und die Tiere waren schließlich in der Lage ihre Würmer bis Tag 35 p.i. auszuscheiden (22).

1.1.2 Effektormechanismen der Immunkontrolle von *T. muris*

Die zuvor beschriebenen Experimente belegen deutlich eine zentrale Funktion der durch IL-4 getriebenen TH2-Differenzierung. Ebenso deutliche Immundefekte in der *T. muris* Kontrolle zeigten auch IL-13-defiziente Mäuse (23). Die Produktion von IL-4 und IL-5 in IL-13-defizienten Tieren war vergleichbar mit der in infizierten Kontrollmäusen. Nach Deletion des IL-13 wurden daher wichtige TH2-Cytokine weiterhin ausgeschüttet und somit auch eine TH2-Immunantwort ausgebildet. Diese schien jedoch ineffektiv in ihrer Wurmausscheidung. In Übereinstimmung hiermit wurde in weiblichen resistenten IL-4-defizienten BALB/c Mäusen die Wurmausscheidung durch das Fusionsprotein IL-13R α 2Fc, welches das IL-13 neutralisiert, verhindert (26). Diese Versuche ließen vermuten, dass von TH2 T-Zellen produziertes IL-13 zentral an der Immunkontrolle von *T. muris* beteiligt ist.

IL-13 ist auf dem Chromosom 11 in nächster Nähe zu IL-4 lokalisiert. IL-4 und IL-13 unterscheiden sich wesentlich in ihrer Aminosäure-Sequenz, ähneln sich jedoch in ihrer Tertiärstruktur, was dazu führt, dass IL-13 die Alpha-Kette des IL-4-Rezeptors bindet (23). Aufgrund dessen teilen sie einige ihrer biologischen Funktionen. Dazu zählen die Hochregulation von Oberflächenmolekülen wie MHC-II auf Monozyten und Makrophagen und die Herunterregulierung von entzündungsfördernden Cytokinen. IL-13 zählt nicht wie IL-4 als T-Zell-Wachstumsfaktor, wird jedoch mit der T-Zell-Entwicklung in Verbindung gebracht. (27,28). In Hinsicht auf die Kontrolle von Wurminfektionen entfaltet IL-13 seine wichtigste Funktion über das Darmepithel: Es führt zu einer erhöhten Mucusproduktion durch Becherzellen, einer vermehrten Proliferation und Hyperplasie der Epithelzellen, was wiederum zu einer vermehrten Abschilferung des Epithels führt. Die Würmer verlieren somit ihren Halt im Epithel und können ausgeschieden werden (29).

Begleitend mit dem Austreten von TH2 T-Zellen kommt es während einer Helmintheninfektion zur Einwanderung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in die Darmmukosa. Eosinophile Granulozyten und Mastzellen können über Fc γ -Rezeptoren an die Parasiten binden, sobald diese an ihrer Oberfläche mit IgE besetzt sind. Diese Bindung führt dazu, dass der toxische Inhalt der Granula in den eosinophilen Granulozyten freigesetzt wird, sowie Mastzellen Prostaglandine und vasoaktive Amine wie Histamin, Serinproteasen und Proteoglykane ausschütten. Diese Stoffe wirken auf die Parasiten ein, was dazu führt, dass diese abgetötet werden. Man bezeichnet diese Abwehr als antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) (30). Für die Resistenz gegenüber der *T.muris* Infektion ist jedoch die Migration der Mastzellen und der eosinophilen Granulozyten in die Darmmukosa nicht entscheidend. So sind IL-5 defiziente Mäuse resistent, obwohl die eosinophilen Granulozyten nicht mehr aktiviert werden können. Auch wenn der Stammzellefaktor c-kit gehemmt wird und als Folge die Proliferation von Mastzellen ausbleibt, wird die schützende Immunantwort nicht beeinträchtigt. Außerdem sind Fc γ -Rezeptor-defiziente Mäuse weiterhin immun gegenüber der Infektion und scheiden die Würmer aus. Das zeigt, dass die ADCC keine entscheidende Rolle für die Kontrolle der *T.muris* Infektion übernimmt (31).

Wesentlich für die Immunkontrolle der *T. muris* Infektion ist daher die Ausbildung einer TH2 T-Zell-Antwort und damit verbunden die Produktion von IL-13. IL-13 entfaltet eine wichtige Funktion auf Epithelzellen (23,32). Im Gegensatz hierzu scheinen CD8⁺ T-Zellen, Antikörper, eosinophile Granulozyten und Mastzellen keine oder eine stark untergeordnete Funktion zu erfüllen (31).

Die Modulation der TH-Polarisierung in unterschiedlichen Mausstämmen, Gendefizienten Tieren oder durch therapeutische Intervention zeigte eine enge Korrelation chronischer Infektionsverläufe mit verminderten TH2-Antworten und im Gegensatz dazu verstärkte TH1-Antworten (Tabelle 1).

Stamm		Genotyp		Behandlung	
BALB/c	R			Anti-CD4+ mAK	A
				Anti-CD8+ mAK	R
		IL-4 KO ♂	A	TNF- α	R
		IL-4 KO ♀	R	Anti-IL-13 mAK	A
		IL-4 KO ♀	R	Anti-TNF- α mAK	A
C57BL/6	R			Low level Infektion	A
		IL-12 KO	R	Low level Infektion	R
		IFN- γ KO	R		
		IL-4 KO	A		
129Sv	R	IL-13 KO	A		
AKR	A				

Tabelle 1: Die Ausbildung einer TH2 T-Zell-Antwort korreliert mit effektiver Immunkontrolle. Die Tabelle listet die verschiedenen Inzuchtstämme (BALB/c, C57BL/6, 129Sv und AKR) und deren Resistenz beziehungsweise Anfälligkeit gegenüber der Infektion mit *T. muris* auf. Es wird zusätzlich dargestellt, wie sich durch Gendefizienz (IL-4, IL-12, IL-13, IFN- γ KO) sowie durch die Behandlung bestimmter Antikörper bzw. Gabe von Cytokinen die Infektionskontrolle in diesen Mausstämmen ändert. Low level infection = Infektion mit < 40 Eiern, R = resistent, A = anfällig, KO = Knock out, mAK = monoklonaler Antikörper

1.2 Das Darmimmunsystem

Wie zuvor dargestellt ist die Infektion mit *T. muris* auf das Zäkum und proximale Kolon begrenzt. Es liegt daher nahe anzunehmen, dass erstens das Immunsystem des Darms eine wichtige Funktion in der Auslösung und Modulation der Immunantwort gegen *T. muris* einnimmt und zweitens die Effektorzellen in den Darm dirigiert werden müssen.

Die prominentesten lymphatischen Strukturen des Dünndarms bilden die Peyer'schen Platten (PP). Im Kolon finden sich vergleichbare Strukturen (colonic patches) die allerdings weniger deutlich hervorstehen. Die PP und colonic patches beherbergen zahlreiche B-Zellen und dienen vornehmlich der Induktion von Antikörperantworten. Zusammenfassend werden die direkt in der Mukosa lokalisierten lymphatischen Strukturen als „gut associated lymphoid tissue“ (GALT) bezeichnet (33).

Die wesentlichen der Darm-drainierenden und zugleich größten Lymphknoten sind die mesenterialen Lymphknoten (MLN). Wie auch andere Lymphknoten lassen sich die MLN in zwei Regionen unterteilen, den Cortex und das Mark. Der Cortex lässt sich wiederum in den Paracortex, das T-Zell-Areal, und das B-Zell-Areal, welches aus B-Zell-Follikeln und Keimzentren besteht, unterteilt. Inwieweit das GALT und/oder die MLN an der Immunantwort gegen *T. muris* beteiligt sind, ist bislang unbekannt (33).

Neben den strukturierten lymphatischen Geweben des GALT und den MLN finden sich zahlreiche Immunzellen direkt im Gewebe. Diese können entweder direkt im Epithel („intra epithelial lymphocytes“ IEL) oder in der Lamina propria („Lamina propria lymphocytes“ LPL), dem sich unterhalb der Basallamina befindlichen Gewebe, lokalisiert sein (Abbildung 4) (33).

1.2.1 Die Induktion von Immunantworten im Darm

Antigene können in die PP über sogenannte M-Zellen im Epithel aufgenommen werden. Unterhalb des Epithels sind Antigen-präsentierende Zellen (APC) lokalisiert, die Antigene im Kontext von MHC-II-Molekülen naiven T-Zellen präsentieren können. Ein weiterer Weg zur Induktion einer Immunantwort führt über APC der Lamina propria. Diese Zellen können ebenfalls Antigen aufnehmen und über die afferenten Lymphgefäße in die MLN einwandern und sie dort den

naiven T-Zellen präsentieren. Hieraus ergibt sich, dass die PP und MLN wesentliche strukturelle Voraussetzungen für die Induktion von Immunantworten darstellen (Abbildung 4) (33,34).

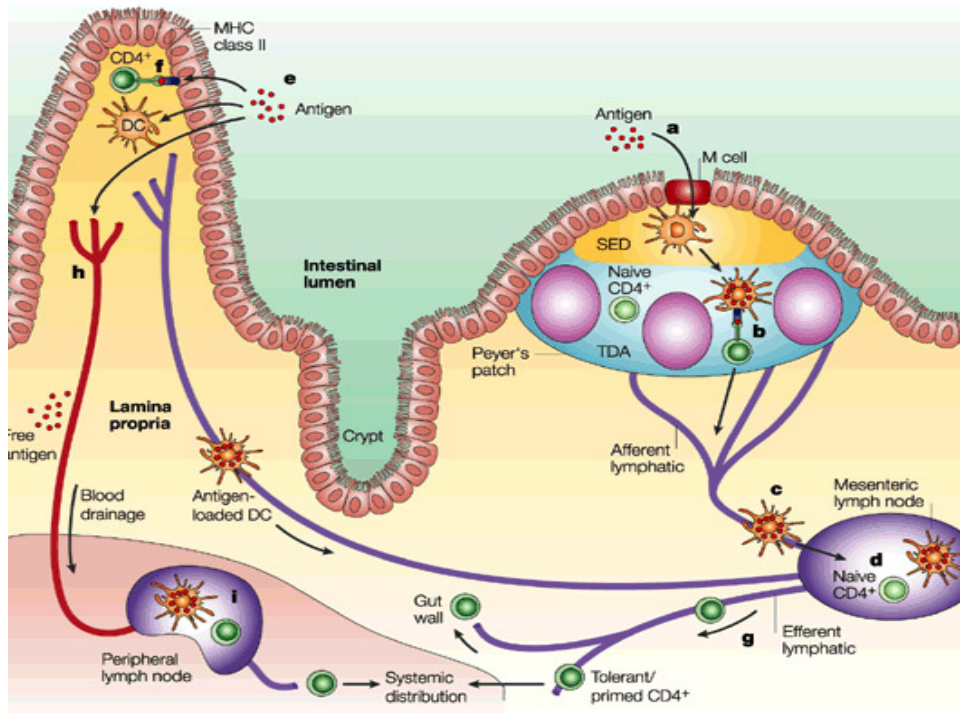


Abbildung 4: Aufbau des intestinalen Immunsystems. Antigen wird aus dem Darmlumen durch M-Zellen oder direkt über die Epithelzellen der Zotten aufgenommen und an darunter befindliche APC weitergegeben. Diese können über afferente Lymphgefäße in die mesenterialen Lymphknoten einwandern und naive $CD4^+$ T-Zellen aktivieren. Aktivierte T-Zellen exprimieren Adhäsionsfaktoren, die es ihnen erlauben in die Darmmukosa einzuwandern (33).

Vor der T-Zell-Aktivierung im MLN ist es den naiven T-Zellen nicht möglich in nicht-lymphoides Gewebe zu wandern. Dieser Prozess benötigt die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren, die erst nach Aktivierung exprimiert werden und so dazu beitragen die Lymphozyten gezielt in den Bereich der Inflammation zu dirigieren (35).

Generell kann die Einwanderung von Immunzellen in Gewebe durch ein Mehrstufenmodell beschrieben werden. Beispielhaft für die Migration naiver T-Zellen ist deren Einwanderung in die MLN oder PP in der Abbildung 5 im oberen Abschnitt dargestellt. Zuerst führt die Interaktion von L-Selektin (CD62L) mit peripheral-node-addressin (PNAd) der „high endothelial venule“ (HEV) zu einem

langsamen „Entlangrollen“ der Lymphozyten auf den HEV. In dessen Folge bewirken die auf den HEV gebundenen Chemokine über Chemokinrezeptoren eine Konformationsänderung von Integrinen. Im Fall naiver Lymphozyten können die Chemokine CCL21 und CCL19 über den Chemokinrezeptor eine hoch affine Konformation von β_2 -Integrinen induzieren. Es folgt die Bindung von aktivierten $\alpha_4\beta_7$ -Integrin an das MAdCAM-1 auf der Oberfläche der HEV und anschließend erfolgt über den transzellulären oder parazellulären Weg die Migration der naiven T-Zellen in die MLN oder PP (33,34).

Dieses Migrationsmuster naiver T-Zellen ändert sich grundlegend mit ihrer Aktivierung. Während der Aktivierung der T-Zellen in den MLN wird die Expression der Homing-Faktoren $\alpha_4\beta_7$ und CCR9 auf den $CD4^+$ T-Zellen hochreguliert und CCR7, sowie L-Selectin herunterreguliert. Das ermöglicht den Effektor-T-Zellen die Migration in die Lamina propria und in das Epithel des Darms (33). Der Ligand für CCR9 ist CCL25 und wird sowohl in der Maus als auch im Menschen von den Epithelzellen im Dünndarm exprimiert. Dabei sind die Hauptorte der Expression das Duodenum und das Jejunum. Der Darmlänge nach abnehmend zeigt das Ileum auf den Oberflächen seiner Epithelzellen schon ein deutlich geringeres Ausmaß von CCL25 und im Kolon wird es in gesunden Tieren kaum exprimiert (35, 45). Wird das CCR9 in Mäusen ausgeschaltet, so zeigt sich eine abgeschwächte Migration von $CD8^+$ T-Zellen und in geringerem Ausmaß von $CD4^+$ T-Zellen. Das zeigt, dass CCR9 eine wichtige Rolle für die Migration von Lymphozyten spielt, aber dieser Faktor nicht allein für die Migration in die Lamina propria verantwortlich ist, sondern, dass das Fehlen dieses Rezeptors durch andere Homingmoleküle kompensiert werden kann (36).

Neben CCR9 exprimieren Effektor-T-Zellen auch das Integrin $\alpha_4\beta_7$, dessen Ligand MAdCAM-1 von endothelialen Zellen postkapillärer Venolen im Dünndarm sowie im Kolon gebildet wird. In den Venolen der intestinalen Lamina propria bewirkt das Chemokin CCL25 und die Bindung an den Rezeptor CCR9 die Aktivierung von $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, das über den Liganden MAdCAM-1 eine Einwanderung in die Lamina propria ermöglicht (Abbildung 5) (34). Die Migration von Lymphozyten in das intestinale Immunsystem ist $\alpha_4\beta_7$ -abhängig und Mäuse, die ein Defizit in der β_7 -Integrin Untergruppe aufweisen, zeigen einen veränderten GALT-Aufbau. Dabei war es den Lymphozyten einerseits nicht möglich sich an

den HEVs der PP anzulagern, andererseits waren sie nicht in der Lage in die LP oder in das Epithel einzuwandern (37).

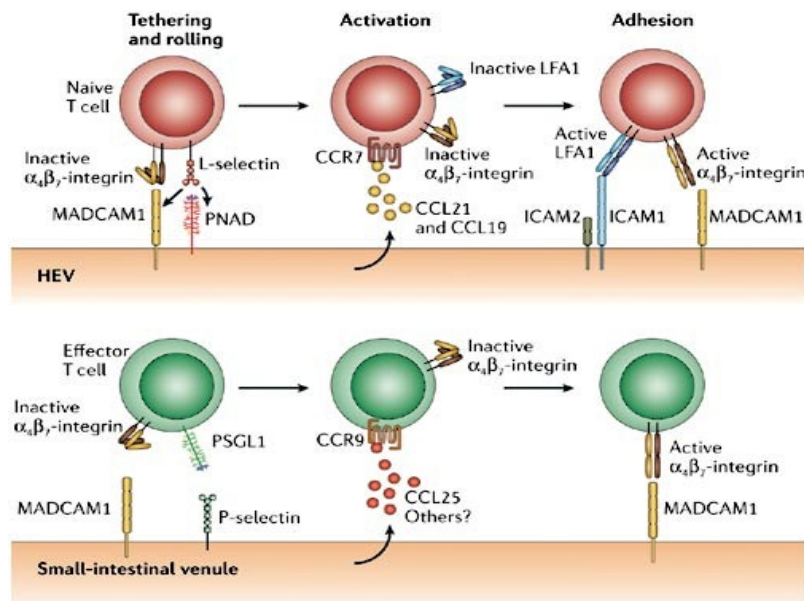


Abbildung 5: Migration naiver und aktivierter Lymphozyten. Im oberen Teil der Abbildung ist die Migration von naiven $CD4^+$ T-Zellen in die MLN oder PP dargestellt. Im ersten Schritt bindet das L-Selectin an das PNAD und bewirkt das Entlangrollen des Lymphozyten. Durch die Bindung von CCR7 mit CCL21 oder CCL19 wird das $\alpha_4\beta_7$ -Integrin aktiviert. $\alpha_4\beta_7$ -Integrin bindet an MADCAM-1, welches auf den HEVs von PP und der MLN exprimiert wird. Durch diese Bindung kommt es letztendlich zu einer Adhäsion zwischen der naiven T-Zellen und der Gefäßwand und es folgt anschließend die transendotheliale Migration (nicht dargestellt). Die Migration aktivierter T-Zellen in den Darm verläuft ähnlich. Durch Bindung von CCL25 an CCR9 kommt es zur Aktivierung des $\alpha_4\beta_7$ -Integrin, welches die Bindung an das von der Gefäßwand exprimierte MADCAM-1 ermöglicht (34).

1.3 Zielsetzung

Die MLN spielen sowohl eine wichtige Rolle für die Initiation von Immunantworten, als auch für die Ausprägung von Migrationsrouten. Ziel dieser Arbeit war es die Funktion der MLN für die Kontrolle einer *T. muris* Infektion zu beschreiben um auf lange Sicht betrachtet eine Immunisierungsstrategie ableiten zu können. Hierzu sollten die MLN operativ entfernt werden und der Infektionsverlauf, die Polarisierung der TH1/TH2 Antwort, die Cytokinbalance und das Homing von Immunzellen untersucht werden (Abbildung 6).

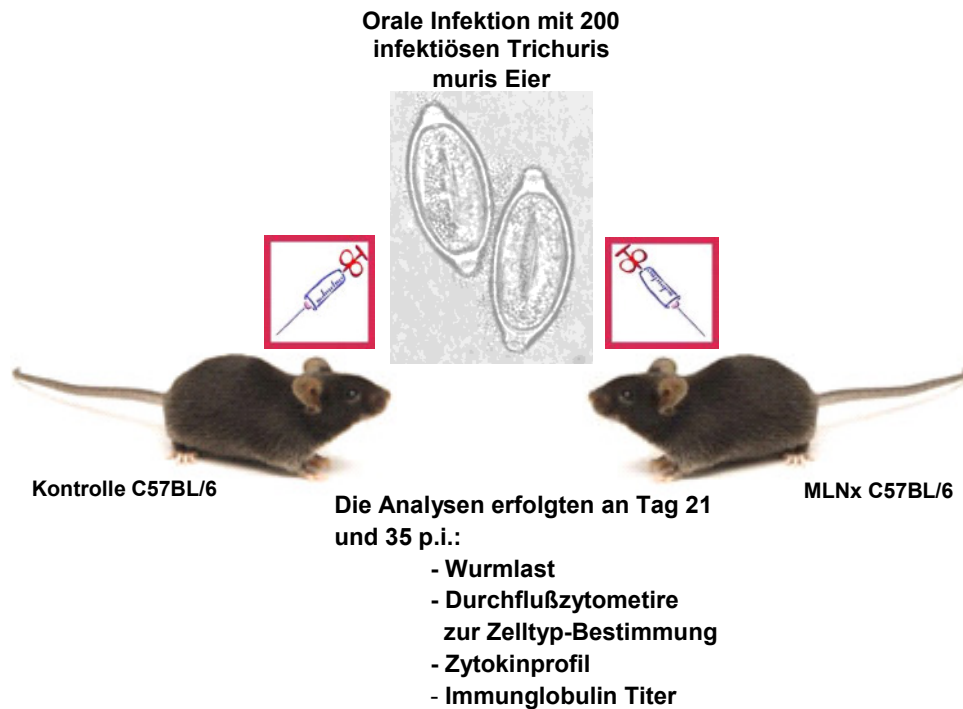


Abbildung 6 Versuchsaufbau. Sham-operierte (Kontrolle) und adentkomierte Mäuse (MLNx) wurden oral mit je 200 infektiösen *T.muris* Eiern infiziert. 21 und 35 Tage nach Infektion wurden Tiere geopfert und die Wurmlast im Zäkum und im proximalen Kolon bestimmt, die Zellzahlen der CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen sowie der eosinophilen Granulozyten in der LP gemessen, das Muster der produzierten Cytokine untersucht und spezifische Immunglobulin Level im Serum bestimmt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Beleuchtungseinheit für Binokular	Leica KL1500 LCD
Binokular	Leica MZ6
Brutschrank	Sanyo CO2 Incubator
Durchflusszytometer	BDLSRII Calibur
Entwässerungsmaschine	Leica
ELISA-Washer	BioTek
ELISA-Messgerät	BioTek
Kühlzentrifuge	Heraeus Multifuge 3 S-R
Luminex	Invitrogen
Mikroskop	Leica MZ6
Mikrotom	Leica RMZ165
Multikanal-Pipetten	Brand Transferpipette
NanaDrop	Peqlab Biotechnologie
OP- / Präparationsbesteck	Aesculap/Dumont
Plastik-Färberacks	Thermo Shandon
Plastik-Immunfärbekammern	Thermo Shandon
Scantainer	Scanbur A·S
Sicherheitswerkbank	HERA safe 356
Tischzentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415R
Vortex-Schüttler	Scientific Ind. Vortex-Genie2
Wasserbad	GFL 1002
Wärmebank Hotplate	Labortect
Zählkammer	Neubauer improved Marienfeld

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Amicon® Ultra 10K Filtrationsmembran	Milipore
Deckgläser (60 x 24 mm)	Menzel-Gläser

Einmal-Kanülen	Braun
Einwegspritzen	Braun
ELISA 96-Well-Platte	Greiner bio-one
FACS-Röhrchen	Greiner bio-one
Falcons 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one
Filterplatte für CytokinBead Assay(96-Well)	Invitrogen
Insulinspritzen	BD Microfine
Membransterilfilter (0,22 und 0,45 µm)	Roth
Plastik-Reaktionsgefäße (1,5 ml / 2 ml)	Eppendorf
PS-Mikroplatte 96 K V-Form	Greiner bio-one
Resorbierbarer PGA-Faden	Catgut
Zellkulturschalen (∅ 6 cm / 10 cm)	TPP
Zellkultur-Testplatten (6-well)	TPP
Zellkultur-Testplatten (96-well, V-Form)	TPP
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner bio-one

2.1.3 Chemikalien

β-Mercaptoethanol	Fluka
Diethylether	J.T.Baker
Dinatriumhydrogenphosphat	Fluka
EDTA (Dinatriumsalz)	Fluka
Ethanol	J.T.Baker
Entellan	J.T.Baker
Glycerin	Roth
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma
Paraffin	Sigma
Tween 20	Roth
Xylol	J.T.Baker

2.1.4 Gebrauchsfertige Reagenzien

FACS Clean	BD Biosciences
FACS Flow	BD Biosciences

FACS Rinse	BD Biosciences
Ketamin Gräub	A. Albrecht GmbH
L-Glutamin (200 mM)	Gibco (Invitrogen)
Penicillin-Streptomycin-Stammlösung	Gibco (Invitrogen)
Rompun 2%	Bayer
Vectabond Reagent	Vector Laboratories

Für den Cytokine Bead Assay wurden folgende gebrauchsfertige Reagenzien von der Firma Invitrogen verwendet:

Assay Diluent

Incubation Buffer

Wash Solution

Detection Antibody Diluent

10X SAV-RPE Concentrate

10X SAV-RPE Diluent

96-Well Filter Plate

Die individuellen Antikörper Bead Kit enthalten:

10X Bead Conjugated Capture Antibody Concentrate

10X Biotinylated Detection Antibody Concentrate

Multiplexed Standard (TH1/TH2-Standard und Inflammatory Standard für TNF-alpha)

2.1.5 Medien und Seren

Fetal Calf Serum (FCS)	PAA
Mausserum	Sigma
Percoll	Sigma
Rattenserum	Sigma
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	Gibco (Invitrogen)
Lympholyte-M	Cedarlane

2.1.6 Puffer und Lösungen

Complete Medium: 500ml Percoll+ L-Glutamine

- 25ml FCS (5%)
6ml PenStrep (1/100)
0,6ml beta-mercaptoethanol (1/1000)
- TMB-Entwicklerlösung: 1ml TMB 10xPuffer(10x Citrat-Puffer)
9ml destilliertes Wasser
1 TMB-Tablette
2 μ l H₂O₂
- PBS: NaH₂PO₄ 0,5m pH 4
Na₂HPO₄ 0,5m pH 9
insgesamt pH auf 7,5
→ autoklaviert
- PBS10 x: Natriumchlorid 80,0 g (\approx 1,40 M)
Dinatriumhydrogenphosphat 14,4 g (\approx 0,10 M)
Kaliumchlorid 2,0 g (\approx 0,03 M)
Kaliumdihydrogenphosphat 2,0 g (\approx 0,01 M)
bidest. H₂O ad 1000 ml
→ autoklaviert
- PBS / 3% FCS: PBS (1 x) 500 ml
Fetal Calf Serum (FCS) 15 ml
→ bei 4°C gelagert
- 40%iger Percoll-Lösung: 4 ml Percoll
0,4 ml 10x PBS
5,6 ml RPMI+4%FCS+PenStrep+ L-Glutamine
- 70%ige Percoll-Lösung: 7ml Percoll
0,7ml 10x PBS

2,3ml RPMI+4%FCS+PenStrep+ L-Glutamine

TBS (10 x): Tris 35,06 g (1,0 M)
Natriumchlorid 48,46 g (1,5 M)
→ in 200 ml bidest. H₂O lösen
→ auf pH7,5 eingestellt
bidest. H₂O ad 400 ml

TBST: TBS-Stammlösung (10 x) 100 ml
Tween 20 1 ml (0,1%)
bidest. H₂O ad 1000 ml

Verdaumedium: RPMI mit 10% FCS
2,4mg/10ml CollagenaseA
eine Spatelspitze DNase

2.1.7 Antikörper und Konjugate

Direkt-konjugierte monoklonale Antikörper gegen murine Antigene:

Anti-CD4-Cy5

Anti-CD8-APC-Cy7

Anti-CD62L-PO

Anti-CD45.2-PerCP-Cy5

Anti-SiglecF-PE

Unkonjugierte monoklonale Antikörper gegen murine Antigene:

Anti-CD3-AK

Anti-IgG1-bio

Anti-IgG2a-bio

Sekundär-AK:

donkey-anti-rabbit-Pox

Streptavidin-Pox

2.1.8 Mäuse

C57BL/6N	Charles River Laboratories
NOD.Cg- <i>Prkdc</i> ^{scid}	eigene Zucht
C57BL/6- <i>Ccr7</i> ^{tm1For}	eigene Zucht (38)
B6.Cg- <i>Ccr7</i> ^{tm1For} <i>Ccr9</i> ^{tm1.1Mal}	eigene Zucht (39)
C57BL/6- <i>Ccr9</i> ^{tm1.1Mal}	eigene Zucht (40)

Alle Mäuse wurden im zentralen Tierlabor der MHH unter sterilen Konditionen in ventilierten Käfigen im S₂-Bereich gehalten.

Die Infektion erfolgte ungefähr drei bis vier Wochen nach Explantation der MLN bzw. der Milz, im Alter von 9-11 Wochen.

2.1.9 Parasiten und Antigene

Die orale Infektion der Tiere mittels Gavagenadel erfolgte mit 200 infektiösen *T.muris* Eiern, die in 0,1 ml destilliertem Wasser verabreicht wurden. An Tag 21 und 35 p.i. wurden die Mäuse geopfert und analysiert.

NodScid-Mäuse dienten als Wirt um neue *T.muris* Eier und das Antigen Excretory/Secretory (E/S) zu produzieren. Die Infektion dauerte 40-42 Tage, in denen sich die Eier zu adulten Würmern entwickelt haben, die neue Eier produzierten und abgaben. Die Würmer wurden mit einer Pinzette aus dem Zäkum geschabt, mit 37°C warmen PBS + 5% PenStrep (Penicillin und Streptomycin) gewaschen und in 6 ml RPMI1640 mit jeweils 5% Penicillin und Streptomycin bei 37°C Grad Celsius für vier Stunden kultiviert. Danach wurden die Würmer in ein neues Well mit RPMI+PenStrep überführt und über Nacht weiter kultiviert.

Das Kulturmedium wurde gepoolt und für 10 min bei 2.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Wurmeier bildeten dabei ein Pellet, welches in ultra-reinem Wasser resuspendiert und für 40 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt wurde. In dieser Zeit durchliefen die Wurmeier ihre Embryonalphase und erreichten ihren infektiösen Status und wurden für weitere Verwendung bei 4°C Grad Celsius aufbewahrt. Der Überstand, der das E/S-Antigen enthielt, wurde von den zwei verschiedenen Abnahmezeitpunkten ebenfalls gepoolt und mit einem sterilen Filter (0.22 µm) gefiltert und mit Hilfe von Amicon® Ultra 10K (Milipore) konzentriert. Dafür wurden die Filter vorsichtig ausbalanciert

und bei 450 rpm bei Raumtemperatur für 30 min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt bis das Protein ausreichend konzentriert war. Gemessen wurde die Konzentration mittels NanoDrop. Anschließend wurde das Antigen in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°Grad eingefroren.

2.2 Methoden

2.2.1 Organpräparation und Serumgewinnung

Die Mäuse wurden durch Inhalation von CO₂ oder durch eine cervikale Dislokation getötet und mit Nadeln auf einem Styroporbrettchen fixiert. Das Fell wurde mit Ethanol (70%) benetzt und mit einer Schere vom Kopf bis zum Schwanz bauchseits geöffnet. Dabei wurde das Peritoneum mit einem Längsschnitt bis zum Brustkorb geöffnet. Mit zwei horizontalen Schnitten wurde der Bauchraum schließlich freigelegt. Die mesenterialen Lymphknoten wurden als erstes entnommen, anschließend wurde das Zäkum mit dem Kolon freigelegt und heraus präpariert. In einem letzten Schritt wurde die Milz entnommen.

Um Serum zu erhalten wurde der Maus Blut entnommen. Dieses erfolgte mittels 1 ml Spritzen entweder aus der Vena Cava inferior oder direkt aus dem Herzen. Es konnten durchschnittlich 200 µl gewonnen werden, die in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und anschließend bei 4° C für eine Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert wurden. Anschließend konnte das Serum abpipettiert und bei -20° C aufbewahrt werden.

2.2.2 Histologie

Das präparierte Kolon wurde mit PBS + 3% FCS gewaschen und auf dünne Glasröhrchen gezogen, für 4 Stunden bei -20° C in 3%-igem PFA fixiert und anschließend drei Mal alle 15 Minuten mit PBS + 3% FCS gewaschen. Anschließend teilte man es in 3 – 4 gleich große Abschnitte und dehydrierte diese in aufsteigender Alkoholreihe.

Dann wurden die Kolonabschnitte in Paraffin gegossen und mit Hilfe des Mikrotoms 7µm-Schnitte hergestellt und diese auf Vecta-Bond Objektträger aufgetragen.

Die Schnitte wurden für zwei Mal 5 min in Xylol deparaffiniert. Als nächstes erfolgte die Dehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe mit 70%- und 100%-igen Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in ein Bad mit 90 ml absoluten Methanol und 10 ml H₂O₂ gegeben, um die endogene Peroxidase-Aktivität zu blockieren. Danach wurde drei Mal 2 min mit PBS gespült, die Schnitte auf Objektträgern mit einem Liquid Blocker Stift umrundet und für 5 min auf einer ca 30° C warmen Wärmebank mit Trypsin behandelt und anschließend zwei Mal mit destilliertem Wasser und ein Mal mit TBST (TBS + 0,1% + Tween 20) gewaschen. Danach wurde 10 min mit TBST und 5%-igem Mausserum geblockt. Die Flüssigkeit wurde nach Ablauf der Zeit abpipettiert und der Anti-CD3-Antikörper in einer Verdünnung von 1:200 hinzugegeben, um für eine Stunde in einer feuchten Kammer zu inkubieren. Nach Ablauf der Stunde wurde einmal mit TBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper, dem donkey-anti-rabbit-Pox, in einer Verdünnung von 1:200 für 10 min gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurde 5 min mit Dap + 0,5 µl H₂O₂ und 20µl einer 1% Nickellösung entwickelt, die CD₃⁺ Zellen blau/schwarz anfärbten. Gestoppt wurde die Reaktion mit Leitungswasser und anschließend mit Nuclear fast Red (0,1%) gegengefärbt, um die Zellkerne der restlichen Zellen rot zu färben. Nach zweimaligem Spülen mit Leitungswasser und 30 s mit PBS wurden die Schnitte dehydriert, zwei Mal 10 s in 90% Ethanol, zwei Mal 10 s in 100% Ethanol und anschließend in Xylol. Eingedeckt wurden sie mit Etellan.

2.2.3 Zellisolation

Für die Zellisolation der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, sowie der eosinophilen Granulozyten der Lamina propria wurde das Kolon entnommen, mit PBS + 3% FCS in Petrischalen gewaschen und der Länge nach aufgeschnitten. Es wurde anschließend für 15 min in einem 37° C warmen Wasserbad in 15 ml HBSS mit 2 mM EDTA und 10% FCS inkubiert. Nach 15 min wurde 10 s kräftig geschüttelt, der Überstand verworfen und der Vorgang zwei Mal wiederholt. Nach einem weiteren Waschschrift in 10 ml PBS + 3% FCS wurde das Kolon in 10 ml Verdaumedium für eine Stunde im 37° C warmen Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Falcons kräftig geschüttelt, die Proben durch Gase gefiltert und anschließend für 8 min bei 4° C bei 1.200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in

4 ml 40%-iger Percoll-Lösung resuspendiert, als nächstes mit vorgelegten 4 ml 70%-igen Percoll überschichtet und für 20 min bei 2.000 rpm und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert.

Der Zwischenphasenring wurde nach Zentrifugation in ein neues Falcon überführt, auf 15 ml mit PBS + 3% FCS aufgefüllt und erneut bei 4° C 8 min mit 1.200 rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 150 µl Blocking-Puffer (FCS) überführt, mit Trypitan Blau (1:50) eingefärbt, in einer Zählkammer gezählt und auf Eis gestellt.

Neben der Isolation der LPL und eosinophilen Granulozyten wurden die MLN und die Milz der Tiere entnommen. Diese wurden mit einem Plastikstempel durch Gase zerrieben und in 500 µl PBS + 3% FCS in ein Eppendorfgefäß aufgenommen. Zur Entfernung der Erythrozyten aus dem Milzgewebe wurden diese Proben mit Lympholyte-M weiterbearbeitet. Die Proben wurden gezählt und danach auf Eis gestellt.

2.2.4 Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie wurden 50 µl der LPL Zellen, der Milz- und MLN-Zellen mit 50 µl eines Antikörper-Mix (Anti-CD4-Cy5, Anti-CD8-APCCy7, Anti-CD62L-PO, Anti-CD45.2-PerCP-Cy5, Anti-SiglecF-PE) für 30 min auf Eis gefärbt und über Nacht mit 100 µl 3% PFA fixiert. Die Proben wurden an einem FACS LSR gemessen und mit der Software FacsDiva und WinList bearbeitet.

2.2.5 Restimulation

Die verbliebenden Milz- und MLN-Zellen aus der Zellisolation wurden in eine 48-Well-Zellkulturplatte gegeben, pro well 200 µl mit 10^6 Zellen, und mit 5 µg E/S Protein restimuliert. Dafür wurden sie 48 Stunden im Wärmeschrank bei 37° C inkubiert und nach 24 Stunden unter dem Mikroskop auf ihre Vitalität kontrolliert.

Nach 48 Stunden wurden die Überstände in ein Eppendorfgefäß überführt, bei 12.000 rpm bei Raumtemperatur für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -4° C aufbewahrt.

2.2.6 Cytokin Assay

Die Cytokine im Überstand der restimulierten Zellen wurden mit einem Cytokine Bead Assay gemessen. Dazu diente ein allgemeines Puffer-Reagenz Kit und die Antikörper-Bead Kits mit den entsprechenden Standards für das jeweilige Cytokin der Firma Invitrogen.

Folgende Cytokine wurden gemessen: IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10, IL-13 und TNF- α .

Im ersten Schritt wurden die mitgelieferten Standardproben der jeweiligen Cytokine mit bekannten Konzentrationen konstituiert und eine Verdünnungsreihe von 1:3 hergestellt.

Im nächsten Schritt wurde die 96-Well-Platte mit PBS angefeuchtet und 12,5 μ l des Beadmix, zuvor 1:10 mit PBS verdünnt, in jedes Well pipettiert und 200 μ l PBS hinzugegeben. Nach 30 s wurde das PBS mit Hilfe einer Vakuumpumpe wieder abgesaugt und der Waschschrift wiederholt. Als nächstes wurde 25 μ l Incubation Puffer und 50 μ l der Standardreihe mit bekannter Verdünnung hinzugegeben. Zusätzlich wurde 50 μ l der zu messenden Proben, 1:2 mit dem Assay Diluent verdünnt, in die entsprechenden Wells gegeben und 2 h auf einem Schüttler mit 500-600 rpm bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Danach wurde zwei Mal mit 200 μ l PBS/well gewaschen und 50 μ l des Mix aus biotinylierten Detektor Antikörpern, zuvor 1:10 mit Biotin Diluent verdünnt, in jedes Well hinzugegeben und anschließend für 1 h auf dem Schüttler inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS und Absaugen wurde in jedes Well 50 μ l des Streptavidin-RPE hinzugegeben, welches vorher 1:10 mit dem Streptavidin-RPE-Diluent verdünnt wurde, und 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Nach drei weiteren Waschdurchgängen wurde 100 μ l PBS/well hinzugegeben und am Luminex die Cytokinkonzentrationen vermessen.

2.2.7 ELISA

Der ELISA diente zur Bestimmung der E/S-spezifischen IgG1 und IgG2a Konzentration im Serum der Mäuse. Die ELISA-96well-Platten wurden dazu mit 5 μ g E/S-Protein verdünnt in 50 μ l Carbonat-Puffer (pH-Wert 9,6) pro Well über Nacht bei 4° C gecoatet. Je Probe wurden vier Ansätze vorbereitet, sodass jeweils Doppelmessungen für IgG1 und IgG2a erfolgen konnten. Die Platten wurden am

nächsten Tag mit 50 µl Waschpuffer, PBS + 0.05% Tween, pro Well gewaschen und anschließend wurde 50 µl von dem Blockpuffer, PBS + 2%BSA, pro Well gegeben und eine Stunde bei 37° inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde 50 µl der Seren pro well, verdünnt in Waschpuffer, hinzugegeben. Die Anfangsverdünnung war 1:20 und es wurde eine Verdünnungsreihe von 1:3 durchgeführt. Anschließend wurde bei 37°C für anderthalb Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 50 µl pro well Anti-IgG1-bio und Anti-IgG2a-bio, verdünnt 1:500 mit PBS + 0,05% Tween, hinzugegeben.

Nach einer Stunde Inkubationszeit bei 37°C wurde drei Mal gewaschen und 50 µl pro Well des sekundären Antikörpers, Streptavidin-Pox, in einer Verdünnung von 1:1.000 hinzugegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Es folgten sechs Waschgänge, dann wurde 50 µl pro Well der Entwicklerlösung hinzugegeben und nach 10 min Entwicklungszeit wurden die Proben bei 450 nm gemessen.

2.2.8 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mit der Software GraphPad Prism. Signifikante Unterschiede wurden mit dem T-Test errechnet mit folgenden Signifikanzen: * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001

3 Ergebnisse

3.1 Herstellung von **infektiösen *Trichuris muris*** Eiern und E/S-Antigen

Um mit dem Infektionsmodell arbeiten zu können, wurden infektiöse *T.muris* Eier benötigt. Zusätzlich bilden die Würmer das E/S-Antigen, ein Proteingemisch, das zur Restimulation von T-Zellen sowie für die Messung von spezifischem IgG1 und IgG2a durch ELISA verwendet werden kann.

Zur Produktion infektiöser Eier wurden zehn NodSCID Mäuse oral mit 200 infektiösen Eiern infiziert. 40 Tage nach Infektion wurden die Tiere getötet und adulte Würmer aus dem Zäkum gewonnen (80-100 Würmer pro Maus). Diese wurden über Nacht kultiviert und am nachfolgenden Tag die Eier durch Zentrifugation konzentriert (ca. 60.000 insgesamt). Die gewonnenen Wurmeier wurden für 40 Tage bei Raumtemperatur im Dunkeln aufbewahrt. Innerhalb dieser Zeit durchliefen die unmittelbar nach der Ausscheidung noch nicht infektiösen Eier ihre Embryonalphase und erreichten ihren infektiösen Status. Nicht infektiöse Eier erkennt man an ihrem dunklen unstrukturierten Eiinhalt. Sobald die Eier ihren infektiösen Status erreicht haben, erkennt man mit Hilfe des Mikroskops die aufgerollten Larven in den Eiern, die deutlich heller sind als nicht infektiöse Eier (Abbildung 7). Die Larven schlüpfen aus ihren Hüllen, sobald die Umgebungstemperatur ansteigt, das heißt, wenn die Eier im Zäkum und proximalen Kolon angekommen sind und die Körpertemperatur der Maus vorliegt.

Zusätzlich wurde der Kulturüberstand über Zentricon-Röhrchen konzentriert und die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt. Aus 36 ml Kulturmedium ließen sich insgesamt 65 µg E/S Protein isolieren. Insgesamt wurde dieser Versuch zweimal durchgeführt um ausreichende Mengen an E/S Protein zu erhalten.

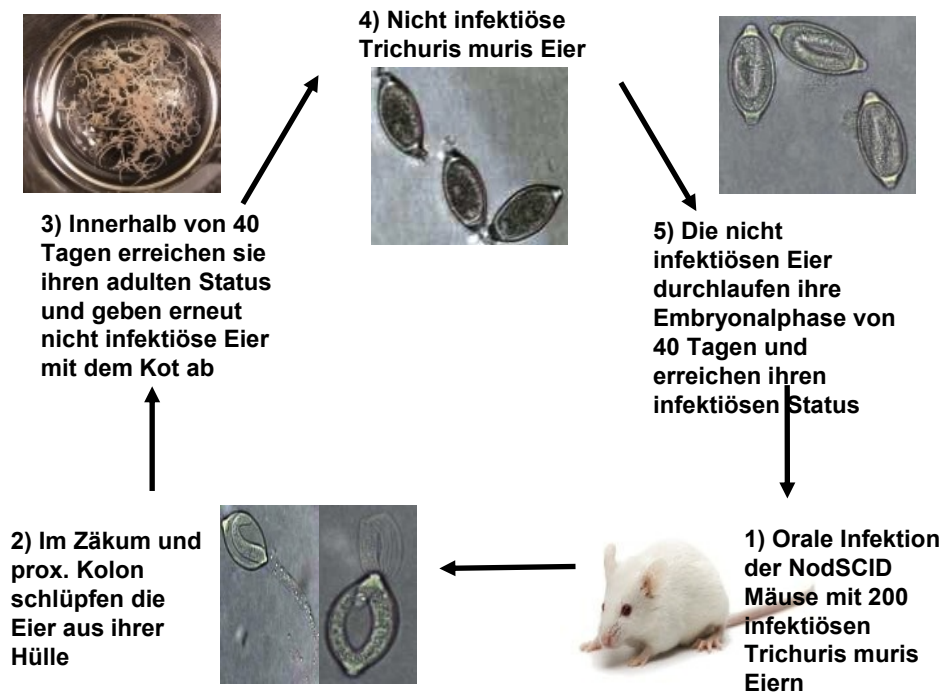


Abbildung 7: Infektionszyklus in NodSCID Mäusen zur Herstellung infektiöser *Trichuris muris* Eier. Elf NodSCID wurden mit jeweils 200 infektiösen Eiern oral infiziert (1). In den Mäusen entwickelten sich die Wurmlarven im Zäkum und Kolon innerhalb von 40 Tagen zu adulten Würmern, die sie aufgrund der fehlenden T- und B-Zellen nicht ausscheiden konnten (2). Die adulten Würmer waren wiederum in der Lage nicht infektiöse Eier abzugeben. Am Tag 40 wurden die Mäuse geopfert und die Würmer entnommen (3) um das E/S-Antigen und die nicht infektiösen Eier zu erhalten (4). Die Entwicklung der Eier habe ich mikroskopisch verfolgt. Phasenkontrastaufnahmen bilden beispielhaft 1) nicht infektiöse Eier, 2) infektiöse Eier und 3) schlüpfende Larven nach Erwärmung ab.

3.2 MLN-defiziente C57BL/6-Mäuse können die *T.muris* Infektion nicht kontrollieren

Um erste Hinweise über den Einfluss der mesenterialen Lymphknoten zu erhalten, galt es herauszufinden, ob die Explantation dieser Lymphknoten zu Unterschieden in der Kontrolle der Infektion und zu einer veränderten Wurmlast führt.

C57BL/6 Tiere wurden unter Narkose die mesenterialen Lymphknoten operativ entfernt. Die Kontrolltiere wurden einer Schein-Operation unterzogen. Das heißt, dass der Bauchraum eröffnet, der Darm isoliert und ohne weitere Manipulation in den Bauchraum rückverlagert wurde. Der Bauchraum wurde durch Naht und die

Haut durch Klammern verschlossen und die Tiere nach 3 Wochen in den Infektionsversuchen verwendet.

MLN-explantierte C57BL/6-Mäuse und Kontrolltiere (C57BL/6 Mäuse) wurden mit je 200 *T.muris* Eiern infiziert und an Tag 21 und 35 p.i. wurde die Wurmlast im Zäkum bestimmt. Zu beiden Zeitpunkten war die Wurmlast im Zäkum der explantierten Tiere signifikant höher als die der Kontrollgruppe (Abbildung 8). Die Kontrollgruppe wies an Tag 21 p.i. im Mittel 60 Würmer auf, wohingegen die mittlere Wurmlast der MLN-explantierten Gruppe bei 90 Würmern lag. Es wurden zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede in der Größe der Würmer festgestellt.

Im Verlauf der Infektion von Tag 21 bis Tag 35 p.i. nahm die Wurmlast in beiden Mausgruppen ab (Abbildung 8). Dabei hatten die Kontrollmäuse bis Tag 35 p.i. die Würmer nahezu vollständig ausgeschieden. Unter den verbliebenen Würmern konnten keine adulten Würmer aufgefunden werden. Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die verbliebenen Würmer bereits abgestorben waren. Diese Tiere gelten somit als resistent.

Die explantierte Gruppe zeigte an Tag 35 p.i. im Mittel ungefähr 50 Würmer, die sich vollständig entwickelt und teilweise eine Größe von bis zu einem Zentimeter erreicht hatten. Es konnte außerdem mithilfe des Binoklars beobachtet werden, dass diese Würmer bereits neue Eier ausschieden.

Die Befunde zeigten, dass die Explantation der MLN in resistenten C57BL/6-Mäusen dazu führte, dass diese nicht mehr in der Lage waren die Infektion zu kontrollieren und sich adulte Würmer entwickeln konnten.

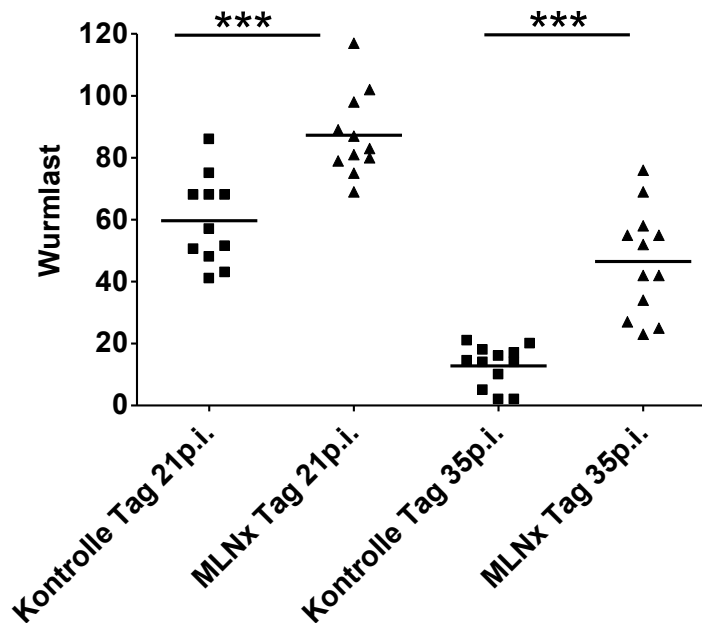


Abbildung 8: MLN-explantierte Mäuse zeigen im Vergleich zu sham-operierten Tieren eine erhöhte Wurmlast. Die MLN von C57BL/6-Mäusen wurden operativ entfernt (MLNx); 21 Tage später wurden die Mäuse und entsprechende Kontrolltiere mit je 200 infektiösen *T.muris* Eiern infiziert. An den Tagen 21 und 35 p.i. wurden die Tiere geopfert und die Wurmlast im Zäkum bestimmt. Die Ergebnisse setzen sich aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen zusammen, bei denen pro Zeitpunkt jeweils vier bzw. drei Mäuse pro Gruppe geopfert wurden. Die horizontalen Striche zeigen die durchschnittliche Wurmlast der einzelnen Gruppen an; die einzelnen Symbole repräsentieren die durch Mittelwert einer Doppelbestimmung pro Maus erhaltenen Werte. *** $P < 0,001$.

3.3 Die Explantation der MLN beeinflusst nicht das Migrations- und Homing-Verhalten von T-Zellen in die Darmmukosa

Immunreaktionen werden wesentlich durch Lymphknoten-spezifische Einflüsse geprägt. Weitere Versuche sollten daher genauer untersuchen, welche Eigenschaften der MLN für eine effektive Immunantwort gegen *T.muris* sind wichtig. Für die Entwicklung eines resistenten Infektionsverlaufs müssen naive $CD4^+$ T-Zellen aktiviert werden und zu TH2-Immunzellen differenzieren. Diese werden nach ihrer Aktivierung mit Homingmolekülen ausgestattet, so dass sie in das Epithel der Mukosa und in die Lamina propria des Zäkums und des Kolons einwandern können. Dort steuern sie durch lokale Cytokinausschüttung den

Mechanismus zur Wurmausscheidung. Es sollten daher erstens die Homingeigenschaften und zweitens die Cytokinbalance der Immunantwort in adenektomierten Tieren mit Kontrolltieren verglichen werden.

Um nun die Frage beantworten zu können, ob das Fehlen der mesenterialen Lymphknoten die Migration der T-Zellen sowie der eosinophilen Granulozyten in die Lamina propria beeinflusst, wurde die Zahl der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und die der eosinophilen Granulozyten in der Lamina propria des Kolons mittels Durchflusszytometrie analysiert. Da das Zäkum bereits zur Bestimmung der Wurmlast verwendet wurde, konnte es hier nicht berücksichtigt werden.

Für die Versuche wurden *T.muris* infizierte MLN-explantierte Tiere und infizierte C57BL/6 Kontrollmäuse an Tag 21 und Tag 35 p.i. sowie eine Gruppe nicht infizierter Kontrollmäuse analysiert (Abbildung 9). Die Immunzellen wurden durch enzymatischen Verdau und nachfolgende Aufreinigungsschritte aus der Lamina propria des Kolons isoliert, gezählt und mittels Durchflusszytometrie phänotypisiert. Aus der Lamina propria nicht infizierter Mäuse konnten ungefähr 10⁵ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen isoliert werden. Noch geringer war die Anzahl der eosinophilen Granulozyten (ca. 6000 Zellen).

Im Vergleich dazu sah man am Tag 21 p.i. sowohl bei den infizierten Kontrolltieren als auch bei den MLN-explantierten Mäusen einen starken Anstieg der CD4⁺ T-Zellen in die Lamina propria. Dieser führte zu einer Zunahme der isolierten CD4⁺ T-Zellen auf 4x10⁵ in den Kontrollen und 6x10⁶ in den adenektomierten Tieren. Damit zeigten an Tag 21 p.i. im Vergleich zu den infizierten Kontrollen die explantierten Tiere tendenziell eine höhere Anzahl an CD4⁺ T-Zellen. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Betrachtet man nun die Ergebnisse für Tag 35 p.i., so zeigt sich, dass zu diesem Zeitpunkt die explantierten Mäuse eine signifikant höhere Anzahl an CD4⁺ T-Zellen in der Lamina propria aufwiesen als infizierten Kontrollmäuse. Hierbei muss beachtet werden, dass sich die Zahlen der CD4⁺ T-Zellen in den infizierten Kontrollen sowie in den explantierten Mäusen zu Tag 21 p.i. leicht verringert hatten.

Ein etwas anderes Verhalten zeigten die CD8⁺ T-Zellen, deren Anzahl sich in der Lamina propria von Tag 21 bis zu Tag 35 p.i. sowohl in den infizierten Kontrollen als auch in den infizierten MLN-explantierten Mäusen sich stetig erhöhte. Es

konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden infizierten Gruppen festgestellt werden.

Die Zahl der eosinophilen Granulozyten hatte sich an Tag 21 p.i. in beiden infizierten Gruppen im Vergleich zu den nicht infizierten Mäusen erhöht. An Tag 35 p.i. wiesen beide infizierte Gruppen ungefähr die gleiche Anzahl an eingewanderten eosinophilen Granulozyten auf. Das lässt darauf schließen, dass diese Zellen ohne MLN in der Lage waren während der Infektion in das Epithel einzuwandern. Jedoch tragen die eosinophilen Granulozyten wie bereits in 1.1.2 beschrieben nicht für die Ausbildung einer Resistenz gegen eine *T.muris* Infektion bei.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sich das Migrationsverhalten der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Explantation der MLN nicht wesentlich verändert hatte. Die Effektor-T-Zellen waren in explantierten Tieren weiterhin in der Lage in die Lamina propria einzuwandern, was darauf schließen lässt, dass eine Immunantwort trotz Fehlen der mesenterialen Lymphknoten induziert werden konnte und die entsprechenden Effektor-CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen während ihrer Aktivierung mit den entsprechenden Homingfaktoren ausgestattet wurden, die ihnen die Migration in das Effektorareal ermöglichten.

Wie die Wurmlast in Abbildung 8 zeigt, waren die explantierten Tiere jedoch nicht in der Lage ihre Würmer effektiv auszuscheiden, sodass sich diese im Verlauf der Infektion zu adulten Wurmern entwickeln konnten. Die in die Lamina propria eingewanderten Effektorzellen waren somit nicht fähig eine effektive Ausscheidung der Würmer zu bewirken. Dies lässt vermuten, dass die Immunbalance ohne die MLN gestört sein musste und die Tiere keine schützende Immunantwort mehr ausbildeten.

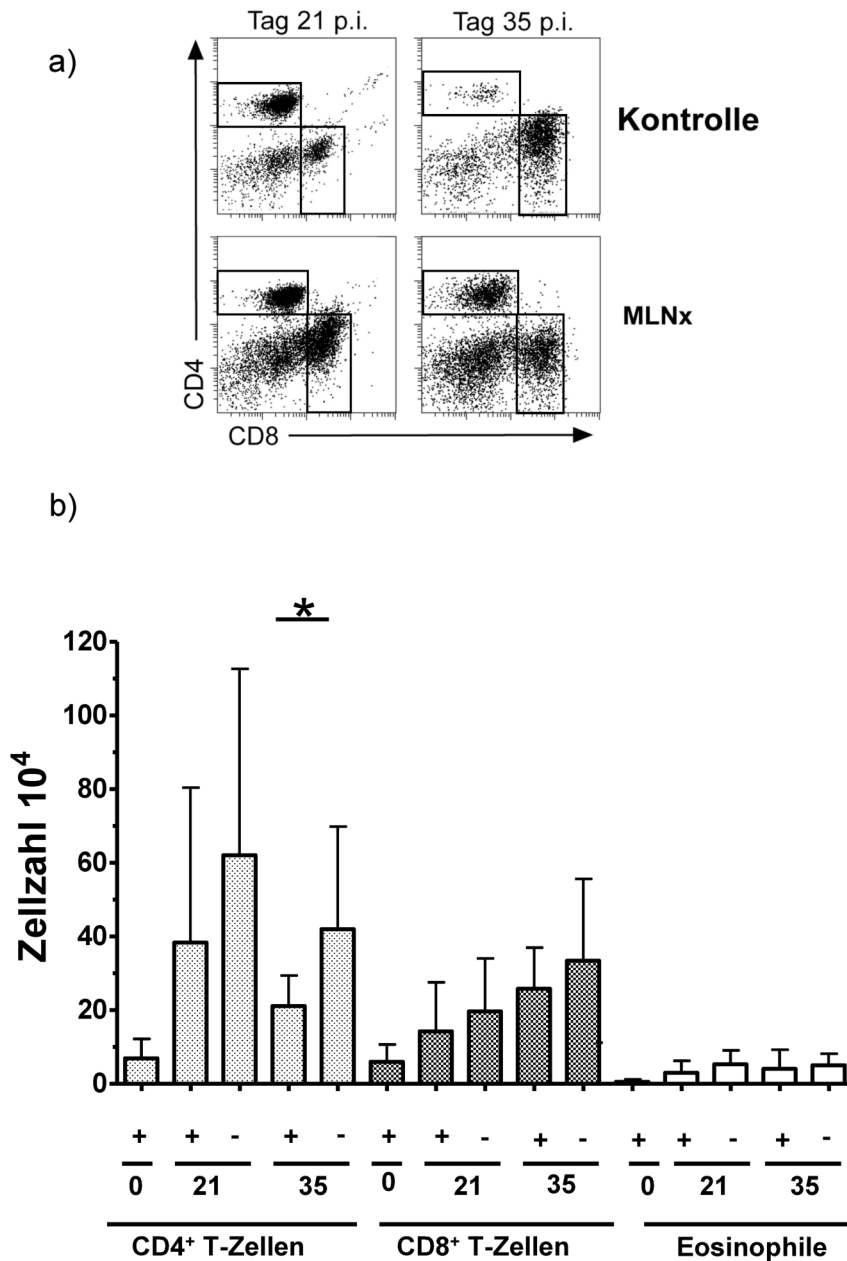


Abbildung 9: CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie eosinophile Granulozyten in der Lamina propria des Kolons am Tag 21 und 35 p.i. Die Mäuse wurden mit 200 *T.muris* Eiern infiziert und an Tag 21 oder 35 p.i. geopfert. Es wurden die LPL und eosinophilen Granulozyten des Kolons mittels Durchflusszytometrie bestimmt. a) zeigt repräsentativ den Facsplot für die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der infizierten Kontrollen und der MLN-explantierten Mäuse (MLNx) für Tag 21 und 35 p.i.. Die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen sind durch Gates markiert, dabei zeigt die Y-Achse das Signal für CD4, die X-Achse für CD8 (gefärbt mit Anti-CD4-Cy5 und Ani-CD8-APC-Cy7) In b) sind die dazugehörigen Zellzahlen der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und der eosinophilen Granulozyten aufgeführt + steht für nicht infizierte C57BL/6 Mäuse an Tag 0 sowie infizierte Kontrollen C57BL/6 an den jeweiligen Analysetage 21 und 35 p.i.. – steht für die MLN-explantierten Mäuse. Die Gruppe der nicht infizierten Mäuse umfassten jeweils acht Mäuse, deren Mittelwert aus den Zellzahlen jeweils einen Balken darstellen. Die Ergebnisse für Tag 21 p.i. ergaben sich aus zwei

getrennt voneinander durchgeführten Versuchen mit insgesamt fünf Mäusen für die MLNx (-) Gruppe und acht für die infizierten Kontrollmäuse (+). Die Ergebnisse für Tag 35 p.i. setzen sich auch aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuche zusammen. Ein Balken fasst die Ergebnisse von zehn infizierten Kontroll-Proben zusammen. Der Balken der MLNx setzt sich aus den Ergebnissen von acht Mäusen zusammen. Dargestellt werden der Mittelwert mit der Standardabweichung (SD). * $P < 0,05$

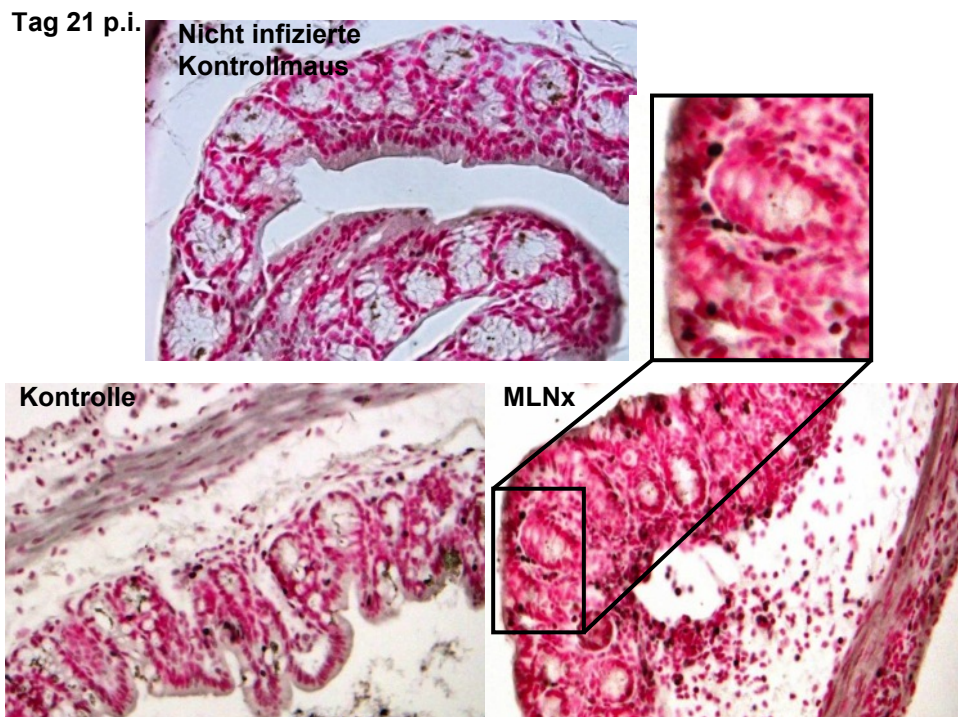
3.3.1 Erhöhter Anteil CD3⁺ T-Zellen im Kolon *T.muris* infizierter MLN-defizienter Mäuse

Die Isolation von Immunzellen aus der Lamina propria ist ein aufwendiges mehrstufiges Verfahren, das mit teilweise erheblichen Schwankungen der Zellzahl einhergeht. Um das Ergebnis der Durchflusszytometrie in der Lamina propria (Abbildung 9) histologisch zu bestätigen, wurden daher Paraffinschnitte vom Kolon hergestellt, auf denen die T-Zellen mit einem anti-CD3-Antikörper angefärbt wurden (Abbildung 10). CD3 ist ein auf T-Lymphozyten exprimierter Protein-Komplex, der zusammen mit dem T-Zell-Rezeptor für die T-Zellaktivierung wichtig ist und sowohl von CD8⁺ als auch von CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird (50).

In Übereinstimmung mit den Zellisolationen, zeigten auch die histologischen Analysen eine geringe Anzahl von T-Zellen in der Mukosa. Sowohl bei den infizierten Kontrollen als auch in der explantierten Mausgruppe konnten sowohl an Tag 21 als auch an Tag 35 p.i. deutlich mehr CD3⁺ T-Zellen angefärbt werden. Das zeigt, dass zu beiden Zeitpunkten im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollmäusen die T-Zellen in die Mukosa des Kolons einwanderten und bestätigt das Ergebnis der zunehmenden T-Zellzahlen an Tag 21 und 35 p.i. aus der Durchflusszytometrie (Abbildung 9).

Der signifikante Unterschied zwischen der Anzahl der CD4⁺ T-Zellen ließ sich hier schwer darstellen, zumal nur eine qualitative und keine quantitative Analyse durchgeführt und keine Unterscheidung zwischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vorgenommen wurde.

a)



b)

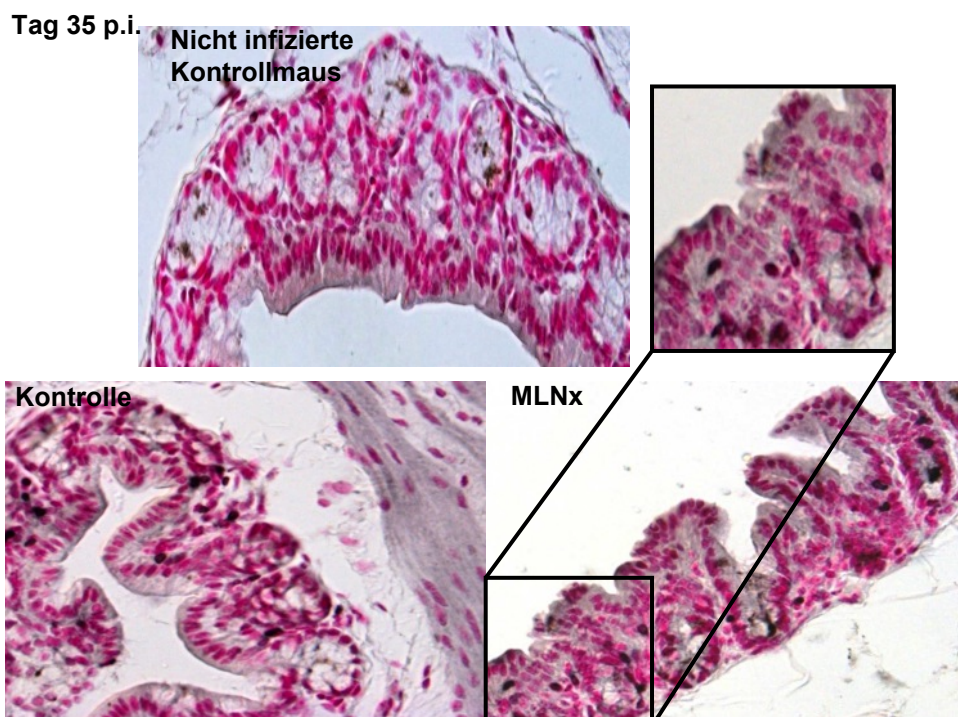


Abbildung 10: Vermehrte Anzahl an CD3⁺ T-Zellen in infizierten Mäusen an Tag 21 und 35p.i. Abgebildet ist die Kolonmukosa einer *T.muris* infizierten C57BL/6 Kontroll-Maus, einer MLNx-explantierten (MLNx) infizierten C57BL/6-Maus und einer nicht infizierten C57BL/6 Kontroll-Maus. Die Tiere wurden mit 200 *T.muris* Eiern infiziert und an Tag 21 p.i. (a) und an Tag 35 p.i. (b) geopfert. Dargestellt sind Querschnitte des Kolons mit einer Vergrößerung von 1:200. T-Zellen sind dunkel schwarz angefärbt (DAP+ 1% Nickellösung), alle weiteren Zellkerne hellrot (Nuclear fast red) gegengefärbt.

3.3.2 CCR9-defiziente Mäuse zeigen keine erhöhte Wurmlast

Die Homingfaktoren $\alpha_4\beta_7$ und CCR9 kontrollieren die Migration aktivierter Lymphozyten in den Dünndarm, wobei die Expression des Chemokinrezeptors CCR9 wesentlich durch die Umgebung des MLN geprägt wird (35). Für die Einwanderung ins Kolon spielen beide Faktoren allerdings eine untergeordnete Rolle. Das zeigt sich unter anderem daran, dass der Chemokinrezeptor CCR9 im Kolon nur auf einer geringen Anzahl von Lymphozyten exprimiert ist.

Um die Funktion von CCR9 in der *T. muris* Infektion zu untersuchen, wurden Kontrollen und CCR9-defiziente Tiere infiziert und an Tag 21 die Wurmlast bestimmt. Die CCR9-defizienten Mäuse wiesen im Vergleich zu Kontrollmäusen eine ähnliche Anzahl an Würmern auf und konnten demnach die Infektion auf gleiche Weise kontrollieren (Abbildung 11).

In einem nächsten Versuch sollte die Funktion des Chemokinrezeptors CCR9 im Kontext eines zusätzlichen Defekts des Chemokinrezeptors CCR7 untersucht werden. CCR7-defiziente Mäuse zeigen eine gestörte Architektur der sekundären lymphatischen Organe und eine verminderte Migration von T-Zellen und DC (39). In der Folge kam es zu einer verzögerten T-Zell-Aktivierung nach Antigenkontakt. Allerdings zeigte sich auch in den Doppelmutanten, den $CCR7^{-/-}/CCR9^{-/-}$ defizienten Mäusen, nur eine leicht erhöhte Wurmlast an Tag 21 p.i.. Einschränkend sollte aber erwähnt werden, dass die Ergebnisse dieser Gruppe stark streuten und nur drei Mäuse untersucht wurden. Des Weiteren zeigten CCR7 Einzelmutanten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine deutlich erhöhte Wurmlast.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Chemokinrezeptor CCR9 keine wichtige Funktion in der *T. muris* Infektion erfüllt, weder als Einzelmutation noch im Zusammenhang einer verminderten T-Zell-Aktivierung. Im Gegensatz dazu scheint der Verlust der CCR7 Funktion zu einer verminderten Kontrolle der Infektion zu führen.

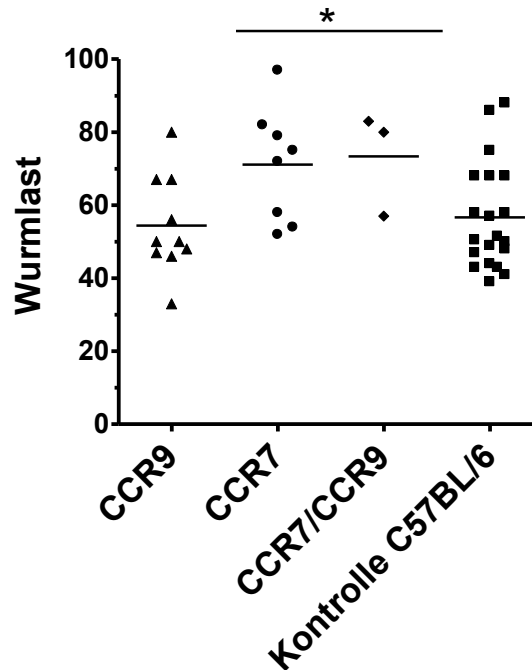


Abbildung 11: CCR7-defiziente Mäuse zeigen eine signifikant erhöhte Wurmlast im Vergleich zu Wildtypen. CCR7-, CCR9- und CCR7/CCR9-defiziente Mäuse, sowie infizierte Kontrollen wurden mit je 200 *T.muris* Eiern infiziert und an Tag 21 p.i. geopfert. Es wurde die Wurmlast im Zäkum bestimmt. Jedes Symbol stellt den Mittelwert aus der zweifachen Zählung der Wurmlast einer infizierten Maus dar. Die Ergebnisse basieren auf zwei voneinander getrennt durchgeführten Versuchen, wobei nur in einem der beiden Versuche CCR7^{-/-}/CCR9^{-/-} Mäuse analysiert wurden. Die horizontalen Striche zeigen den Mittelwert für die jeweilige Mausgruppe an. * P < 0,05.

3.4 Der Einfluss der MLN auf die Cytokinbalance der T-Zell Antwort während einer *T.muris* Infektion

Um die Polarisierung der T-Zell-Antwort und die Qualität der induzierten Cytokine zu untersuchen wurden Restimulierungsassays durchgeführt. Hierzu wurden Immunzellen aus den MLN und der Milz aus infizierten Kontrollmäusen und MLN-explantierten Mäusen mit dem E/S-Antigen am Tag 21 und 35 p.i. restimuliert und die Cytokine im Zellkulturüberstand analysiert. Milzzellen wurden verwendet um einen direkten Vergleich der Cytokinprofile explantierter (MLN-defizienter) Tiere mit den Kontrolltieren zu ermöglichen.

Es zeigte sich, dass ebenso wie die MLN-Zellen, auch Milzzellen nach Restimulation mit dem E/S-Antigen eine Cytokinantwort induzierten (Abbildung 12). Dies ließ sich bereits bei infizierten Wildtypmäusen nachweisen. Das lässt

darauf schließen, dass die Milz neben den MLN in gewisser Weise in die Immunantwort gegen *T.muris* eingebunden ist.

Betrachtet man die bei einer TH1-Antwort dominierenden Cytokine IFN- γ und IL-12, so zeigt sich, dass am Tag 21 p.i. die Produktion von IFN- γ in den restimulierten Milzzellen, sowohl der infizierten Kontrollen, als auch der MLN-explantierten Mäusen nahezu gleich ist. Das ändert sich im Verlauf der Infektion: an Tag 35 p.i. ließ sich ein signifikant erhöhtes Level von IFN- γ in den restimulierten Milzzellen der explantierten Mäuse im Vergleich zu den infizierten Kontrollmäusen messen. Der Cytokinspiegel von IFN- γ der restimulierten Milzzellen der infizierten Kontrollmäuse war zu diesem Zeitpunkt deutlich unter das Level von Tag 21 p.i. gefallen.

Für das IL-12 kann keine eindeutige Aussage getroffen werden, da es keine Unterschiede der beiden Versuchsgruppen im Cytokinprofil zu den unterschiedlichen Zeitpunkten gefunden wurden (nicht gezeigte Daten). Hier ließ sich jedoch feststellen, dass auch in den nicht stimulierten Negativkontrollen, das heißt bei nicht restimulierten MLN- bzw. Milzzellen, IL-12 gemessen werden konnte. Das war bei IFN- γ , IL-10, IL-13 und TNF- α nicht der Fall gewesen, bei diesen Cytokinprofilen waren die Werte der Negativkontrollen null gewesen und sind somit in den Diagrammen nicht abgebildet.

Die TH2-Cytokine tragen zu einer Resistenzentwicklung während einer *T.muris* Infektion bei. In diesem Versuch haben wir die Cytokine IL-13 und IL-10 sowie den Entzündungsparameter TNF- α untersucht. Für das IL-4 konnten keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden und die Daten sind nicht gezeigt.

Betrachtet man nun die Ergebnisse für IL-10 und IL-13, so lässt sich am Tag 21 p.i. feststellen, dass IL-13 und IL-10 sowohl durch die restimulierten MLN-Zellen, als auch durch die Milzzellen beider infizierter Gruppen produziert werden. Es konnte sogar ein signifikant erhöhter Spiegel dieser TH2-Cytokine der restimulierten Milzzellen der explantierten Tiere im Vergleich zu den restimulierten Milzzellen der infizierten Kontrollmäuse gezeigt werden.

Am Tag 35 p.i. zeigten die Cytokinwerte der restimulierten Milzzellen beider infizierter Gruppen den gleichen Verlauf. Die Cytokinspiegel des IL-13, IL-10 und des TNF- α sanken deutlich unter das Niveau von Tag 21 p.i.

Aus den hier beschriebenen Restimulationsversuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Die Milz beeinflusst bereits in infizierten Kontrollmäusen die Immunantwort. Das zeigt sich daran, dass es möglich war die Milzzellen mit dem E/S-Protein zu restimulieren und lässt darauf schließen, dass aktivierte T-Zellen in den Milzen Wurm-infizierter Mäuse vorliegen mussten, die auf die Restimulation mit einer Cytokinausschüttung antworteten. Nach der Explantation nahm der Einfluss der Milz zu, dies war an der steigenden Cytokinausschüttung zu erkennen. Es wurden am Tag 21 p.i. erhöhte Werte der TH2-Cytokine IL-13 und IL-10 gemessen, die jedoch vergleichbar zu den Wildtypen bis Tag 35 p.i. wieder absanken. Da die Würmer in MLN-explantierten Mäusen am Tag 21 p.i. jedoch nicht effizient ausgeschieden werden konnten, lässt vermuten, dass sich die Immunbalance auf die TH1-Seite verlagerte. Das wird dadurch bestätigt, dass der IFN- γ -Spiegel am Tag 35 p.i. in den explantierten Mäusen signifikant erhöht war, was zeigt, dass diese Tiere zu diesem Zeitpunkt eine TH1-Immunantwort aufwiesen. Diese führte dazu, dass sich die Würmer zu adulten Wurmern entwickeln und neue Eier ausscheiden konnten.

Die erhöhte IFN- γ - Konzentration in den Wildtyp-Mäusen an Tag 21 p.i. sowie die hohen TH2-Cytokinkonzentrationen der explantierten Mäuse lassen sich damit erklären, dass C57BL/6 Mäuse anfangs keine dominierende Immunantwort aufweisen, wie es bei den BALB/c-Mäusen der Fall ist. Sie zeigen stattdessen im Anfangsverlauf eine gemischte TH1/TH2-Immunantwort (44), die sich in den gemessenen Cytokinprofilen am Tag 21 p.i. widerspiegelt. Vermutlich kommt es erst zwischen Tag 21 und 35 p.i. in den Kontrollen zum Überwiegen der TH2-Immunantwort. Das führt dazu, dass sie ihre Würmer etwas später als BALB/c Mäuse ausscheiden.

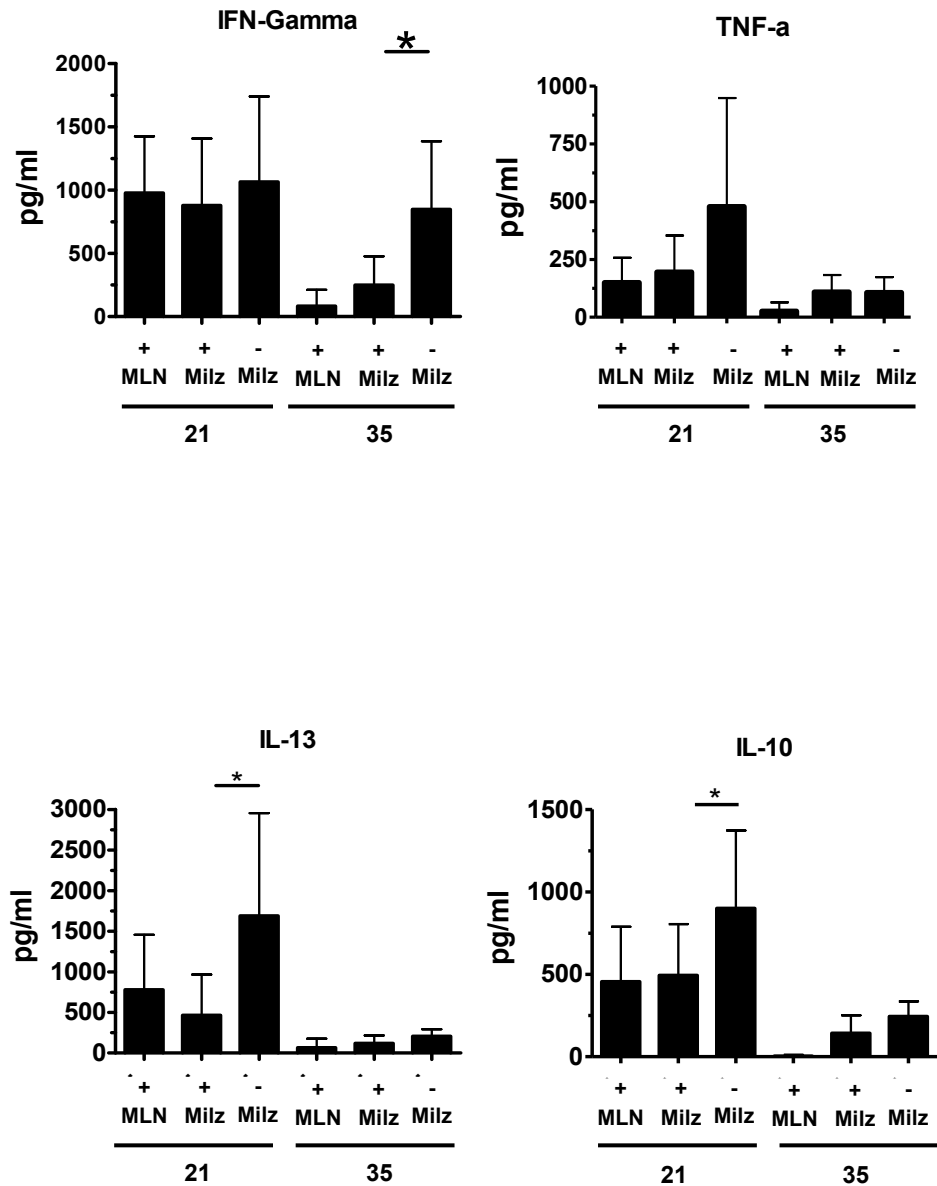


Abbildung 12: Die MLN-explantierten Mäuse zeigen am Tag 35p.i. ein erhöhtes IFN- γ . Die Mäuse wurden mit je 200 *T.muris* Eiern infiziert und die Milz- und MLN-Zellen mit dem *T.muris* Antigen E/S restimuliert. Nach 72 Stunden wurden die Zellkulturüberstände gewonnen und die Konzentration von IFN- γ , IL-10, IL-13 und TNF- α mithilfe des Cytokin-Bead-Assays gemessen. + steht für die infizierten Kontrollen, - für die MLN-explantierten Tiere. Die Balken stehen für die Ergebnisse von zehn Mäusen. Die Ergebnisse wurden aus zwei voneinander getrennten Versuchen ermittelt. Abgebildet sind die Werte mit den Mittelwerten und ihren SD. * P < 0,05

3.5 MLN-explantierte Tiere weisen einen erhöhten IgG2a-Spiegel auf

Die gemessenen Cytokinprofile lassen vermuten, dass es in den adenektomierten Tieren zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung eines TH1-Profiles kam. Um die Frage weiter zu verfolgen, ob die explantierten Mäuse eine verstärkte TH1-Immunantwort und damit verbunden ein erhöhtes IgG2a aufweisen, wurde aus dem Serum infizierter Kontrollen und MLN-explantierte Mäuse jeweils E/S-spezifisches IgG1 und -IgG2a mittels ELISA gemessen (Abbildung 13).

Am Tag 21 zeigten sich tendenziell niedrigere Konzentrationen E/S-spezifischen IgG1 in den adenektomierten Tieren. Diese Unterschiede erreichten jedoch keine Signifikanz. Am Tag 35 p.i. stieg die Konzentration an IgG1 in beiden Gruppen weiter an und erreichte ein vergleichbares Niveau. Das IgG1 ist an eine TH2-Immunantwort gekoppelt und spiegelt in den resistenten Kontrollen den Infektionsverlauf mit schützender TH2-Immunantwort wider. Interessant ist hierbei, dass auch die MLN-explantierten Mäuse an Tag 35 p.i. ein erhöhtes IgG1 aufwiesen. Im Cytokinprofil konnte jedoch gezeigt werden, dass zu diesem Zeitpunkt die TH1-Immunantwort überwiegen musste.

Betrachtet man die Konzentration von IgG2a, so fällt auf, dass an Tag 21 p.i. beide Gruppen die gleiche Konzentration aufwiesen, die wiederum sehr gering war. Das Diagramm vom Tag 35 p.i. zeigt den Anstieg der Konzentration des IgG2a sowohl bei den infizierten Kontrolltieren als auch bei den explantierten Mäusen, wobei ein signifikanter Unterschied in den Werten der explantierten Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe vorliegt. Somit lässt sich zeigen, dass die MLN-explantierten Mäuse am Tag 35 p.i. deutlich mehr E/S-spezifisches IgG2a produzierten. Das spiegelt wiederum das Ergebnis der überwiegenden TH1-Cytokine am Tag 35 p.i. in explantierten Mäusen wider und bestätigt zugleich die Vermutung, dass es in den Mäusen ohne MLN zu einer Verschiebung der Immunbalance kommt, bei der die TH1-Immunantwort überwiegt und eine chronische Infektion die Folge ist.

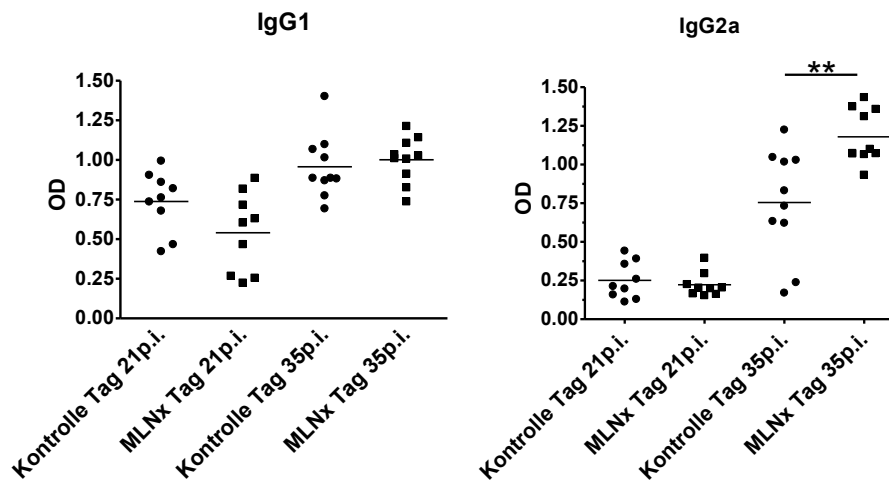


Abbildung 13: Die MLN-explantierten Mäuse weisen am Tag 35p.i. ein erhöhtes IgG2a auf. Die Mäuse wurden mit je 200 *T.muris* Eiern infiziert. An Tag 21 und 35p.i. wurden sie geopfert und das Serum entnommen. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen von E/S-spezifischen IgG1 und IgG2a ermittelt. Ein Symbol entspricht dem gemessenen Wert einer Maus, wobei sich die Ergebnisse aus zwei voneinander getrennt durchgeführten Versuchen zusammensetzen. Die horizontalen Striche markieren die Mittelwerte. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$

3.6 Milz-explantierte Mäuse zeigen keine signifikant erhöhte Wurmlast

Die vorherigen Versuche wiesen darauf hin, dass die Milz in gewisser Weise in die Induktion der Immunantwort einbezogen ist. Ob sie eine entscheidende Funktion für den Verlauf der Infektion hat, sollte mit diesem Versuch gezeigt werden, für den einer Gruppe von Mäusen wie bisher die MLN, einer weiteren die Milz und einer dritten sowohl die MLN als auch die Milz operativ entfernt wurden. Diese drei unterschiedlich behandelten Tiere und die Kontroll-C57BL/6 wurden nach dem Infektionsmodell infiziert und am Tag 21 p.i. analysiert, in dem ihre Wurmlast im Zäkum bestimmt wurde.

Das Ergebnis zeigt, dass die Milz-explantierten sowie die doppelt explantierten Mäuse eine deutlich höhere Wurmlast aufwiesen als die Wildtypen (Abbildung 14). Es zeigt jedoch keinen prägnanten Unterschied zwischen den MLN-explantierten und den Milz- bzw. der doppelt explantierten Gruppen. Es lässt sich zwar eine

Tendenz erkennen, bei der die Milz- und doppelt-explantierten Mäuse eine höhere Wurmlast aufwiesen als die MLN-explantierten Mäusen, jedoch ließ sich keine Signifikanz nachweisen. Somit konnte nicht eindeutig gezeigt werden, ob die Milz eine unerlässliche Funktion für die Infektionskontrolle einnimmt. In den vorhergegangenen Daten konnte gezeigt werden, dass die Milz zwar in der Lage ist eine Immunantwort zu induzieren, dabei jedoch eine TH1-Immunantwort überwiegt und sich als Folge eine chronische Infektion entwickelt.

Es sollte in der Analyse der Ergebnisse berücksichtigt werden, dass diese Mäuse mit einem neuen Wurmeier-Bestand infiziert wurden und die Ergebnisse nur eine Versuchsdurchführung ohne Wiederholungsversuch demonstrieren. Des Weiteren bestand die Gruppe der MLN-explantierten nur aus drei Tieren.

Im nächsten Schritt müsste geprüft werden, ob die Ergebnisse reproduzierbar sind.

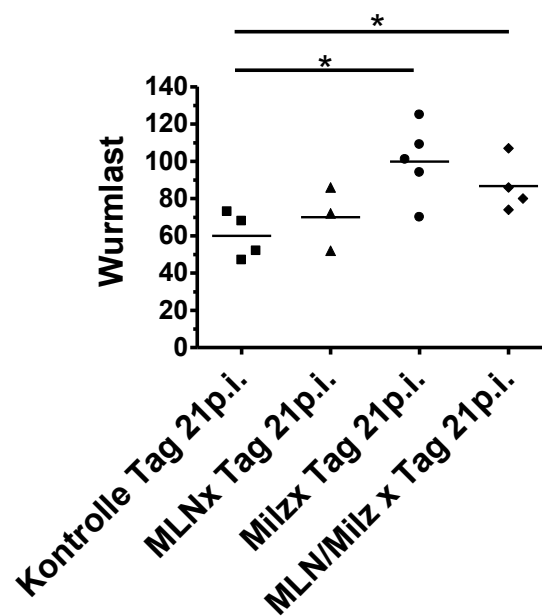


Abbildung 14: Milz und MLN/Milz-explantierte Tiere zeigen einen deutlichen Unterschied in der Wurmlast im Vergleich zu infizierten Kontrollen. Die Mäuse wurden mit je 200 *T.muris* Eiern infiziert und an Tag 21 p.i. geopfert und die Wurmlast im Zäkum bestimmt. Ein Symbol entspricht den Analysewerten einer Maus, wobei jede Maus doppelt gezählt und der Mittelwert gebildet wurde. Milzx steht für die Milz-explantierten Tiere, MLN/Milzx steht für die doppelt-explantierten Mäuse. Die horizontalen Striche zeigen den Mittelwert jeder Gruppe an. Die Ergebnisse stammen aus einem Experiment. * $P < 0,05$

4 Diskussion

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass die MLN eine wesentliche und unerlässliche Funktion für die Immunkontrolle während einer *T. muris* Infektion darstellen. Die erhöhte Wurmlast und die Ausbildung adulter Würmer an Tag 35 nach Infektion spricht dafür, dass resistente C57BL/6 nach MLN-Explantation eine chronischen Infektion entwickeln.

Die Infektion mit *T. muris* verläuft im Zäkum und proximalen Kolon, in dessen Epithel sich die Würmer einnisten und über vier Larvenstadien heranreifen. Wie bereits bekannt, ist die Resistenzentwicklung auf eine TH2-Immunantwort zurückzuführen, die mit der Ausschüttung der Cytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 und IL-13 verbunden ist, wobei IL-13 das wichtigste Cytokin darstellt. Es bewirkt durch die Becherzellhyperplasie und Epithelabschilferung, dass die Würmer ihren Halt im Epithel verlieren und somit ausgeschieden werden können (29). TH1-Cytokine führen hingegen zur Ausbildung eines chronischen Infektionsverlaufs, bei der die Mäuse nicht in der Lage sind die Würmer auszuschleiden und sich adulte Würmer ausbilden (42).

Für die Immunkontrolle der Infektion ist neben der Differenzierung zu einer TH2-Antwort auch die Migration von aktivierten CD4⁺ T-Zellen in das Effektorareal, die Lamina propria und das Epithel, des Zäkums und des proximalen Kolons unerlässlich. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie und der Immunhistochemie zeigten dabei interessanterweise, dass auch nach Explantation der MLN die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in die Darmmukosa des Kolon einwandern konnten und das Migrationsverhalten der T-Lymphozyten in diesen Darmabschnitten nicht beeinträchtigt war. Für die Migration der Effektorzellen in das Infektionsareal benötigt es spezielle Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren.

Für die Migration in die Lamina propria des Dünndarms exprimieren aktivierte CD4⁺ T-Zellen die Homingmoleküle CCR9 und $\alpha_4\beta_7$. Welche Rolle diese Oberflächenmoleküle für das Migrationsverhalten in das Zäkum und proximale Kolon spielen, wurde kontrovers diskutiert. β_7 -defiziente Mäuse generierten weiterhin eine schützende Immunantwort und es kam im Verlauf der *T.muris* Infektion weder zu Veränderungen der Lymphozytenmigration und deren

Cytokinprofile noch zu Einschränkungen der Migration von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen. In diesen Tieren konnte sowohl eine Epithelhyperproliferation als auch eine Becherzellhyperplasie im Intestinaltrakt nachgewiesen werden, was auf die effiziente Wirkung des IL-13 zurückzuführen war (32). Somit waren die β_7 -defiziente Tiere in der Lage die Würmer auf gleiche Weise auszuscheiden wie es bei resistenten Wildtypen der Fall war. (39)

Im Gegensatz dazu stehen die Versuche mit dem Fadenwurm *Trichinella spiralis*, dessen Infektion im Duodenum und Jejunum lokalisiert ist. Neben einer TH2-Immunantwort spielen auch Mastzellen und eosinophile Granulozyten für die Resistenz eine entscheidende Rolle. β_7 -defiziente Mäuse zeigten ein deutlich vermindertes Migrationsverhalten von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in das Duodenum und Jejunum. Als Folge davon kam es zu einem verspäteten Ausscheiden der Würmer. Eine Veränderung in der Immunantwort und im Serum IgG konnte dabei nicht festgestellt werden. Diese Versuche verdeutlichen die β_7 -abhängigen Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in den Dünndarm im Vergleich zum β_7 -unabhängigen Migrationsverhalten im Kolon. Es ist wahrscheinlich, dass die Bindung von $\alpha_4\beta_7/\alpha_e\beta_7$ an MAdCAM-1 nicht das einzige Signal für die Migration von Leukozyten in das Zäkum und Kolon darstellt und deren Fehlen zum Beispiel durch $\alpha_4\beta_1$ kompensiert werden kann (43, 44).

In resistenten C57BL/6 Mäusen, die mit *T. muris* infiziert wurden, wurde neben der Funktion des β_7 -Integrin das α_4 -Integrin und MadCAM-1 durch neutralisierende Antikörper blockiert. An Tag 35 p.i. hatten mit anti- β_7 und anti-MAdCAM-1 Antikörpern behandelte Tiere die Würmer vollständig ausgeschieden. Die Mäuse hingegen, die mit anti- α_4 -Antikörper behandelt wurden und bei denen folglich sowohl das $\alpha_4\beta_7$ als auch das $\alpha_4\beta_1$ blockiert wurde, zeigten eine deutlich erhöhte Wurmlast im Zäkum. Beide Gruppen zeigten interessanterweise keinen Unterschied in der CD4⁺ T-Zell-Infiltration in die Lamina propria des Zäkums, was darauf schließen lässt, dass weder das α_4 noch die Bindung von β_7 an MAdCAM-1 für die Migration der Effektorzellen eine entscheidende Rolle einnimmt (44).

Die erhöhte Wurmlast der mit anti- α_4 -Antikörpern behandelten Tieren lässt sich somit erklären, dass die Gabe von anti- α_4 -Antikörpern die Polarisation von CD4⁺ T-Zellen beeinträchtigte und das Gewicht zu einer TH1-Immunantwort verlagerte, was durch erhöhte IgG2a-Spiegel bestätigt wurde (44).

Unklar bleibt weiterhin, wie Lymphozyten in die LP wandern können, nachdem die Mäuse mit anti- α_4 behandelt wurden. Eine mögliche Integrin-Adressin-Kombination könnte das LFA-1 ($\alpha_L\beta_1$) mit seinem Liganden ICAM-1 darstellen, L-Selectin könnte ebenso für die Migration in diesen Darmabschnitt mitverantwortlich sein (44).

CCR9 stellt neben dem $\alpha_4\beta_1$ ein weiteres wichtiges Homingmolekül im Bereich des Dünndarms dar. Der Ligand des CCR9 ist das CCL25, welches in einem absteigenden Gradienten am stärksten im Duodenum exprimiert wird und vom Jejunum zum Kolon immer weiter abnimmt (35), sodass im Kolon die Expression von CCR9 und CCL25 in gesunden Wildtyp-Mäusen sehr gering ist. Es ließ sich aber beobachten, dass das Expressionslevel zunahm, nachdem in den Mäusen durch Dextran Sulfat sodium (DSS) eine Colitis hervorgerufen wurde. CCR9-defiziente sowie CCL25-defiziente Mäuse zeigten in den Versuchen eine verstärkte Colitis-Anfälligkeit mit erhöhtem Gewichtsverlust, verzögerter Regenerationsphase und erhöhter Mortalitätsrate im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Die Entzündungsreaktion umfasste in den defizienten Mausstämmen eine deutlich zunehmende granulozytäre und lymphoplasmazelluläre Infiltration. Das Profil der Immunantwort zeigte, dass CCR9-defiziente Mäuse die Cytokine IL-4 und IL-10 herunterregulierten und statt dessen eine TH1/TH17 Immunantwort überwiegte, die zu einer verstärkten Makrophagenmigration in das Kolon führte (45). In unseren Ergebnissen zur Wurmlast konnte gezeigt werden, dass CCR9-defiziente Mäuse in ihrer Infektionskontrolle nicht beeinträchtigt waren und sie an Tag 21 nach Infektion eine vergleichbare Wurmlast wie die Kontroll-C57BL/6 Mäuse aufwiesen. Das lässt darauf schließen, dass CCR9 für die Migration in das Kolon keine entscheidende Rolle übernimmt beziehungsweise es nach Explantation der MLN kompensiert werden kann, da in den Versuchen zur Durchflusszytometrie und Immunhistochemie zuvor die effektive Einwanderung der Effektorzellen in die Darmmukosa gezeigt werden konnte.

Für die Expression der Adhäsionsmoleküle und Integrine sowie der Chemokine sind der Ort der Lymphknoten und deren Milieu ausschlaggebend. So wandern Lymphozyten, welche aus dem mesenterialen Lymphknoten isoliert wurden, bevorzugt in die intestinale Mukosa ein, wohingegen Lymphozyten aus peripheren

Lymphknoten hauptsächlich in das Hautgewebe einwandern (46,47). Lymphozyten der peripheren Lymphknoten exprimieren auf ihrer Oberfläche E- und P-Selektin-Liganden und CCR4, wohingegen für die aktivierten Lymphozyten des Darms das $\alpha_4\beta_7$ und CCR9 unerlässlich sind um in die Darmmukosa einzuwandern. Ein wichtiger Einfluss auf die Ausbildung dieser verschiedenen Muster an Oberflächenmoleküle spielt die Retinsäure (48). In einem mehrschrittigen Prozess wird Retinol durch Alkoholdehydrogenasen (ADH) zu Retinal oxidiert, welches dann durch die Retinaldehydrogenase (RALDH) zu Retinsäure oxidiert wird. RALDH-Inhibitoren hemmen die Fähigkeit der dendritischen Zellen, die Expression von $\alpha_4\beta_7$ und CCR9 zu induzieren. So waren aktivierte T-Zellen bei Abwesenheit der Retinsäure nicht in der Lage effizient in die mesenterialen Lymphknoten und Peyerschen Platten sowie in die Dünndarmmukosa einzuwandern (48). Der wichtigste Isotyp ist das RALDH2, dessen mRNA hauptsächlich von dendritischen Zellen der mesenterialen Lymphknoten exprimiert wird. Es ist jedoch in dendritischen Zellen aus peripheren Lymphknoten kaum nachweisbar und fehlt vollständig in der Milz und den Peyerschen Platten. Neben den dendritischen Zellen spielen auch die Stromazellen für die Induktion der Homingmoleküle eine wichtige Rolle: Stromazellen der mesenterialen Lymphknoten exprimieren das RALDH2, wohingegen es in denen der peripheren Lymphknoten fehlt. Das führt dazu, dass es bei T-Zellen in transplantierten peripheren Lymphknoten nicht zur Induktion von $\alpha_4\beta_7$ und CCR9 kommt. Im Gegensatz dazu stehen die Stromazellen der mesenterialen Lymphknoten, die mit Hilfe von Retinsäure in der Lage sind, die Expression dieser Moleküle zu steuern und die dendritischen Zellen in ihrer Primingfunktion ergänzen (58).

Voraussetzung für die Ausbildung der Resistenz gegenüber *T. muris* ist einerseits die Migration der aktivierten Effektorzellen in das Zäkum und proximale Kolon sowie die Induktion einer TH2-Immunantwort (49).

Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, wie die Induktion der Immunantwort in diesem Darmabschnitt verläuft und wie das Antigen des *T. muris*, das E/S Protein, aus dem Lumen des proximalen Kolons und des Zäkums, aufgenommen wird und in welche lymphatischen Gewebe es transportiert wird. Anhand der erhöhten Wurmlast wird deutlich, dass die MLN für diesen Darmabschnitt eine

entscheidende Rolle spielen, jedoch ist die Migration der Effektorzellen nach Explantation auch weiterhin gegeben. Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Dünndarm Antigene einerseits über die sogenannten M-Zellen aufgenommen und an die darunter liegenden Peyerschen Platten weitergegeben werden. Andererseits werden sie über CX3CR1 exprimierende Dendritische Zellen in der Lamina propria über ihre entsprechenden transepithelialen Ausläufern aufgenommen (50,51). Es konnte in Versuchen gezeigt werden, dass in naiven, nicht infizierten Mäusen die Anzahl von dendritischen Zellen im Epithel des Dickdarms und des Zäkums sehr gering war und auch die Zahl an Zellen mit transepithelialen Ausläufern nicht nachzuweisen war (52). Es konnte zusätzlich beobachtet werden, dass es in resistenten Mausstämmen, wie BALB/c, bereits einen Tag nach Infektion mit *T. muris* zu einem deutlichen Anstieg an dendritischen Zellen im Epithel und der Lamina propria kam, wohingegen anfällige Mausstämme, wie AKR, erst 13 Tage nach Infektion mit einem Anstieg und Anreicherung von dendritischen Zellen im Epithel antworteten. Voraussetzung für die Induktion einer effektiven Immunantwort ist die Reifung der dendritischen Zellen, welches sich durch die Expression von CCR7 und MHC-II sowie der Herabregulation von der phagozytischen Funktion charakterisiert. Dieser Reifungsprozess ist vermutlich bei anfälligen Mausstämmen nicht vollständig, sodass die Induktion der effektiven Immunantwort bereits aufgrund der fehlenden Funktion der dendritischen Zellen ausbleibt (53). In welchem lymphatischen Gewebe die Induktion der Immunantwort anschließend stattfindet, bleibt weiterhin unklar. Anzunehmen ist, dass die reifen dendritischen Zellen in die MLN wandern und dort die Induktion einer TH2-Immunantwort auslösen. Neben den MLN muss jedoch noch ein weiteres lymphatisches Gewebe für die Induktion und die damit verbundene Migration der Effektorzellen verantwortlich sein. In unserem Versuch zeigten die CCR7-defizienten Mäuse eine deutlich höhere Wurmlast im Vergleich zu den Kontroll-C57BL/6 Tieren. Das zeigt, dass die Infektionskontrolle gestört war und bis Tag 21 nach Infektion keine effiziente Immunantwort ausgeführt werden konnte. Somit zeigt sich, dass CCR7 für die Migration der dendritischen Zellen des Zäkums und proximalen Kolons für das Einwandern in die mesenterialen Lymphknoten und die Immuninduktion unerlässlich ist.

Im weiteren Verlauf wurden Versuche zur Restimulation mit dem E/S Antigen durchgeführt um Cytokinprofile zu erstellen. Somit konnte Rückschluss auf die Immunbalance gezogen werden. Neben der Restimulation der MLN-Zellen konnten auch gewonnene Milzzellen mit dem E/S Antigen restimuliert werden und daraus Cytokinprofile erstellt werden. Es zeigte sich, dass die MLN-explantierten Tiere im Vergleich zu den infizierten Kontrolltieren an Tag 35 nach Infektion eine vermehrte TH1-Immunantwort ausbildeten und somit die Immunbalance verschoben wurde. Interessanterweise konnten beide Gruppen von Mäusen in vergleichbarer Weise sowohl die TH1 als auch die TH2 Cytokine an Tag 21 nach Infektion ausbilden. Das lässt sich damit erklären, dass eine effektive Immunantwort in C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu BALB/c Mäusen grundsätzlich etwas verspätet einsetzt. C57BL/6 Mäuse zeigen anfangs eine gemischte TH1/TH2-Immunantwort. Im Laufe der Infektion verschiebt sich die Immunantwort zu einer TH2-Differenzierung. Als Folge der verzögerten TH2-Differenzierung werden die *T.muris* Würmer verspätet ausgeschieden, wobei auch dieser Mausstamm bis Tag 35 p.i fast alle Würmer ausgeschieden hat. Jedoch sollte auch berücksichtigt werden, dass ungefähr eine von fünf Mäusen nicht in der Lage ist, ihre Würmer auszuscheiden und eine chronische Infektion entwickelt (44). Die TH2-Differenzierung an Tag 35 p.i. blieb in MLN-explantierten Tieren aus, sodass in diesen Tieren eine TH1-Immunantwort überwiegt und die Tiere einen chronischen Infektionsverlauf aufwiesen.

Unklar bleibt in diesem Zusammenhang, wie es zur Immuninduktion in der Milz kam, inwiefern dendritische Zellen, beladen mit dem E/S Antigen, in die Milz gelangten um dort anschließend eine systemische Reaktion hervorzurufen. Wie in den Diagrammen (Abbildung 12) dargestellt werden konnte, war es bereits bei den infizierten Kontrolltieren möglich die Milzzellen zu restimulieren. Anhand der erhöhten Cytokinpiegel durch die Milzzellen der explantierten Mäuse wird deutlich, dass die Rolle der Milz nach Explantation in gewisser Weise zunahm, es aber ohne MLN an unerlässlichen Signalen für die TH2-Proliferation mangelte. Bestätigt wurde das Überwiegen der TH1-Immunantwort an Tag 35 p.i. durch das erhöhte Serum-IgG2a der explantierten Mäuse an Tag 35p.i..

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die MLN für die Polarisierung der Immunantwort hinsichtlich einer schützenden TH2-Differenzierung zuständig sind

und es bei deren Abwesenheit zur Ausbildung einer TH1-Immunantwort kommt. In zuvor durchgeführten Versuchen zu Polarisierungseigenschaften von Lymphknoten konnte gezeigt werden, dass in den mesenterialen Lymphknoten von Lewis-Ratten durch höhere TGF- β und IL-4 Konzentrationen ein TH2/TH3-Cytokinmilieu vorliegt, wohingegen in peripheren Lymphknoten mit Überwiegen von IL-2 und IFN- γ eine TH1-Umgebung überwiegt (59). Nach Adenektomie kommt es zu einer Induktion einer Immunantwort, jedoch rief diese dann eine chronische Infektion hervor. Es zeigt sich aber, dass die naiven T-Zellen auch ohne MLN aktiviert wurden und in das Effektorareal einwandern konnten. Durch das Fehlen der MLN und deren überwiegende Polarisierung zur TH2-Immunantwort, kam es in den MLN-defizienten Tieren in unseren Versuchen zum Überwiegen einer TH1-Immunantwort und damit verbunden einem chronischen Infektionsverlauf, was darauf schließen lässt, dass das Immuninduktionsübernehmende Gewebe nach Explantation nicht in der Lage war, die Immunbalance zugunsten einer TH2-Antwort durchzuführen. Ob das überwiegend durch die lymphatische Funktion der Milz übernommen wird und das Antigen über den Blutkreislauf mithilfe dendritischer Zellen transportiert wird, bleibt unklar. Ob und wie weit die Colonic patches und die lymphatischen Follikel im Bereich des Zäkums und des Kolons in die Ausbildung der Immunantwort beteiligt sind, konnte bisher auch nicht gezeigt werden.

Neben dem Ziel langfristig eine Immunisierungsstrategie gegen die Infektionen mit *T.trichiura* zu erarbeiten, konnte auch im Bereich der Allergieerkrankungen und der autoimmunologisch bedingten Erkrankungen gezeigt werden, dass durch chronische, nicht akute Helmintheninfektionen immunregulatorische Prozesse aktiviert werden und diese einen Schutz gegen Allergien darstellen (54).

In weiteren Versuchen waren Mäuse, die mit Helminthen infiziert waren, vor der Ausbildung von immuninduzierten Krankheiten wie Colitis ulcerosa, Typ-1 Diabetes und Encephalitis geschützt. Auch klinische Studien zeigten, dass Helmintheninfektionen zu einer verringerten Entzündungsaktivität bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa führten. Das lässt einen Zusammenhang vermuten, dass Helmintheninfektionen die Immunantwort dahingehend verändern, dass neben allergischen Prozessen auch die dysregulierten Entzündungsreaktionen

von IBD und MS gemildert werden können (55) und die TH2-Immunantwort somit als Schutz dient.

Mit diesen Erkenntnissen wird versucht neue Therapiemethoden zu erforschen. Für die Behandlung der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung (IBD), die durch eine ausgeprägte TH1/TH17 Immunantwort charakterisiert ist, wird *Trichuris suis* herangezogen, ein Schweine-Peitschenwurm, der sich nicht im Menschen reproduziert und keine Krankheit hervorruft. *Trichuris suis* wird dem Patienten alle drei Wochen verabreicht und bis zu 70% der Patienten zeigen einen Rückgang der Entzündung. Nebeneffekte wurden bei der Behandlung nicht festgestellt (56). Auch hierbei bleibt weiterhin zu erforschen, welche genauen Regulationsmechanismen neben der Ausbildung der TH2-Immunantwort für die protektive Auswirkung der Helmintheninfektionen auf bestimmte allergische Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen verantwortlich sind, um möglichst bald den therapeutischen Nutzen effektiver einsetzen und ausweiten zu können (57). Voraussetzung für einen effektiven Nutzen muss eine systemische TH2-Immunantwort sein, um auch abseits des Intestinaltraktes auf die dysregulierten Erkrankungsprozesse wirken zu können. Das würde einerseits die Lymphknoten des Intestinaltrakts, als auch die Milz als Immuninduktionsort und Ausbildung einer systemischen Reaktion wieder näher in Betracht ziehen.

5 Zusammenfassung

Die Infektion mit *T.muris* verläuft im Zäkum und im proximalen Kolon, wobei die Resistenz gegen diesen Mauspeitschenwurm auf einer TH2-Polarisierung basiert. Nach Aktivierung der Effektorzellen wandern diese mit Hilfe von Homingmolekülen, die auf ihrer Oberfläche exprimiert werden, in die Lamina propria und in das Epithel um dort ihre Cytokine zu sezernieren. Zu den wichtigsten Cytokinen zählen das IL-4 und das IL-13. Der Mechanismus der Wurmausscheidung ist noch nicht vollständig erforscht. Es wird aber angenommen, dass es sich um eine lokale mechanische Reaktion handelt, bei der es zu einer Proliferation der Epithelzellen und zu einer Becherzellhyperplasie im Darmepithel kommt, wodurch die eingebetteten Würmer ihren Halt verlieren und ausgeschieden werden können (29).

Eosinophile Granulozyten und Mastzellen wandern während der Infektion in das Darmareal ein, ihnen konnte jedoch keine entscheidende Rolle für die Kontrolle der Infektion nachgewiesen werden, sodass es bei fehlender Leukozytenmigration auch zu einer schützenden Immunantwort kommt.

C57BL/6 Mäuse sind resistent gegenüber der *T.muris* Infektion. Im Vergleich zu BALB/c-Mäusen, bei denen bereits an Tag 21 p.i. der Großteil der Würmer ausgeschieden ist, setzt ihre Immunantwort verzögert ein, so dass die C57BL/6-Mäuse erst an Tag 35 p.i. den Großteil ihrer Würmer ausgeschieden haben.

Für die Experimente zur Funktion der Darm-drainierenden mesenterialen Lymphknoten während einer *T.muris* Infektion wurde einer Gruppe von C57BL/6 Mäusen die mesenterialen Lymphknoten operativ entfernt und in der Analyse mit resistenten C57BL/6 Kontrollmäusen verglichen. Als Grundlage für die Experimente diente das Infektionsmodell, bei dem die Mäuse oral mit 200 *T.muris* Eiern infiziert wurden und an Tag 21 und 35 p.i. die Analysen erfolgten.

In den Experimenten zeigte sich, dass die explantierten Mäuse zu beiden Zeitpunkten, Tag 21 und 35 p.i., im Vergleich zu den Wildtypen eine erhöhte Wurmlast aufwiesen. Außerdem hatten sich in den explantierten Mäusen die Würmer an Tag 35 p.i. bereits zu adulten Würmern entwickelt, die wiederum in der Lage waren neue Eier auszuscheiden.

Die Analysen der Lamina propria Lymphozyten sowie der eosinophilen

Granulozyten zeigten, dass die explantierten Mäuse in ihrer Migrationseigenschaft nicht beeinträchtigt waren und an Tag 21 p.i. keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Zellzahlen im Vergleich zu den infizierten Kontrollen aufwiesen. Am Tag 35 p.i. konnte sogar eine signifikant erhöhte Anzahl an CD4⁺ T-Lymphozyten festgestellt werden. Die eosinophilen Granulozyten waren auch ohne die mesenterialen Lymphknoten weiterhin in der Lage in die Lamina propria einzuwandern.

Bei den Ergebnissen zur Restimulation von Zellen der mesenterialen Lymphknoten und der Milz wurde deutlich, dass bereits die Milzzellen der Kontrollmäusen mit dem E/S-Antigen restimuliert werden konnten und die Milz somit in gewissem Maße an der Entwicklung der Immunität beteiligt sein musste. Die Cytokinprofile zeigten außerdem, dass die explantierten Mäuse durchaus in der Lage waren am Tag 21 p.i. die TH-2 Cytokine IL-13 und IL-10 zu bilden. Am Tag 35 p.i. dominierte in diesen Mäusen jedoch ein signifikant erhöhter IFN- γ -Spiegel. Die explantierten Mäuse zeigten zusätzlich an Tag 35 p.i. ein erhöhtes IgG2a, welches mit der Ausbildung einer TH1- Immunantwort korrelierte.

Anhand des erhöhten IFN- γ und IgG2a an Tag 35 p.i. ist anzunehmen, dass in diesen Tieren die TH1-Immunantwort überwiegt, so dass sich als Folge eine chronische Infektion entwickelte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die mesenterialen Lymphknoten für die Ausbildung einer schützenden TH2-Immunantwort verantwortlich sind und dass es beim Fehlen der MLN zu einer Immun-Dysbalance zugunsten einer TH1-Antwort kommt.

6 Literaturverzeichnis

1. Ugbomoiko US, Ofoezie IE, Multiple infection diagnosis of intestinal helminthiasis in the assessment of health and environmental effect of development projects in Nigeria. *J Helminthol.* 2007 Sep;81(3):227-31. Epub 2007 Jun 21.
2. WHO Preventive Chemotherapy in Human helminthiasis, coordinated use of anthelmintic Drugs in control interventions: A manual for health professional and programme managers, Geneva, Switzerland: WHO 2006
3. C.G. Meyer: Tropenmedizin: Infektionskrankheiten. 2. Auflage Landsberg 2007
4. Chan, M.S., The global burden of intestinal nematode infections--fifty years on. *Parasitol Today*, 1997. 13(11): p. 438-43.
5. Bethony J, Brooker S, Soil-transmitted helminth infections: ascariasis, trichuriasis, and hookworm. *Lancet.* 2006 May 6;367(9521):1521-32.
6. World Health Organization, WHO, Geneva, and A.M. D.W.T. Crompton, M.C. Nesheim, L. Savioli, Controlling disease due to helminth infections. 2003.
7. C.Mims; H.M. Dockrell; R.V.Goering; I.Roitt; D.Wakelin; M.Zuckerman *Medizinische Mikrobiologie - Infektiologie*, 2.Auflage, Urban & Fischer in Elsevier 2006
8. G.Darai, M.Handermann, H.G.Sonntag, C.Tidona, L.Zöller: *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe.* 3. Auflage, 2009 Springer Berlin Heidelberg.
9. Laboratory Identification of Parasites and Public Health Concern
www.dpd.cdc.gov
10. Keiser J., Utzinger J. Efficacy of current Drugs against soil-transmitted helminth infection, *Jama* 2008
11. Legesse M., Erko B, Medhin G. Efficacy of albendazole and mebendazole in treatment of ascaris and trichuris infection, *Ethiop Med J* 2002
12. Adams VJ., Lombard CJ., Dhansay MA., Markus MB., Fincham JE. Efficacy of albendazole against the whipworm trichuris trichiura: a randomised controlled trial, *Afr Med* 2004

13. Grencis, R.K., Cytokine regulation of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection - from host to parasite. *Vet Parasitol*, 2001. 100(1-2): p. 45-50.
14. Ito, Y., The absence of resistance in congenitally athymic nude mice toward infection with the intestinal nematode, *Trichuris muris*: resistance restored by lymphoid cell transfer. *Int J Parasitol*, 1991. 21(1): p. 65-9.
15. Else, K.J. and R.K. Grencis, Antibody-independent effector mechanisms in resistance to the intestinal nematode parasite *Trichuris muris*. *Infect Immun*, 1996. 64(8): p. 2950-4.
16. Koyama, K., H. Tamauchi, and Y. Ito, The role of CD4 and CD8+ T cells in protective immunity to the murine nematode parasite *Trichuris muris*. *Parasite Immunol*, 1995. 17(3): p. 161-5.
17. Wan YY. Multi-tasking of helper T cells. *Immunology* 2010 Jun;130(2):166-71.
18. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1557-69.
19. Abba, L., Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6.Auflage 2007.
20. Chaplin DD. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S3-23.
21. Boom WH, Liano D, Abbas AK. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. 1988 Apr 1;167(4):1350-63.
22. Else, K.J., et al., Cytokine-mediated regulation of chronic intestinal helminth infection. *J Exp Med*, 1994. 179(1): p. 347-51.
23. Grencis, R.K. and A.J. Bancroft, Interleukin-13: a key mediator in resistance to gastrointestinal-dwelling nematode parasites. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2004. 26(1): p. 51-60.
24. Grencis RK. Cytokine-mediated regulation of intestinal helminth infections: the *Trichuris muris* model. *Ann Trop Med Parasitol*. 1993 Dec;87(6):643-7.
25. Bancroft, A.J., et al., Interleukin-12 promotes a chronic intestinal nematode infection. *Eur J Immunol*, 1997. 27(4): p. 866-70.
26. Bancroft AJ, Artis D, Donaldson DD, Sypek JP, Grencis RK. Gastrointestinal nematode expulsion in IL-4 knockout mice is IL-13 dependent. *Eur J Immunol*. 2000 Jul;30(7):2083-91.

27. Minty, A., et al., Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, 1993. 362(6417): p. 248-50.
28. Zurawski, G. and J.E. de Vries, Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today*, 1994. 15(1): p. 19-26.
29. Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*. 2005 Jun 3;308(5727):1463-5.
30. Hahn, Schulz, Suerbaum, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6.Auflage Springer Berlin 2009
31. Betts, C.J. and K.J. Else, Mast cells, eosinophils and antibody-mediated cellular cytotoxicity are not critical in resistance to *Trichuris muris*. *Parasite Immunol*, 1999. 21(1): p. 45-52.
32. Cliffe LJ, Humphreys NE, Lane TE, Potten CS, Booth C, Grecis RK. Accelerated intestinal epithelial cell turnover: a new mechanism of parasite expulsion. *Science*. 2005 Jun 3;308(5727):1463-5.
33. Mowat, A.M., Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol*, 2003. 3(4): p. 331-41.
34. Agace, W.W., Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol*, 2006. 6(9): p. 682-92.
35. Agace, W.W., T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol*, 2008. 29(11): p. 514-22.
36. Stenstad, H., et al., Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4 T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood*, 2006. 107(9): p. 3447-54.
37. Wagner, N., et al., Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature*, 1996. 382(6589): p. 366-70.
38. Förster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Müller I, Wolf E, Lipp M. *Cell*. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. 1999 Oct 1;99(1):23-33.
39. Wurbel MA, Malissen M, Guy-Grand D, Meffre E, Nussenzweig MC, Richelme M, Carrier A, Malissen B. Mice lacking the CCR9 CC-chemokine receptor show a mild impairment of early T- and B-cell development and a

- reduction in T-cell receptor gammadelta(+) gut intraepithelial lymphocytes. *Blood*. 2001 Nov 1;98(9):2626-32.
40. Krueger A, Willenzon S, Lyszkiewicz M, Kremmer E, Förster R. CC chemokine receptor 7 and 9 double-deficient hematopoietic progenitors are severely impaired in seeding the adult thymus. *Blood*. 2010 Mar 11;115(10):1906-12. Epub 2009 Dec 29
 41. Abbas AK, Lichtman Cellular and Molecular Immunology, Editor: Saunders, (5th Ed.) Philadelphia, 2003.
 42. Cliffe LJ, Grencis RK. The *Trichuris muris* system: a paradigm of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection. *Adv Parasitol*. 2004;57:255-307.
 43. Artis, D., et al., Beta7 integrin-deficient mice: delayed leukocyte recruitment and attenuated protective immunity in the small intestine during enteric helminth infection. *Eur J Immunol*, 2000. 30(6): p. 1656-64.
 44. Bell, L.V. and K.J. Else, Mechanisms of leucocyte recruitment to the inflamed large intestine: redundancy in integrin and addressin usage. *Parasite Immunol*, 2008. 30(3): p. 163-70.
 45. Wurbel MA, McIntire MG, Dwyer P, Fiebiger E. CCL25/CCR9 interactions regulate large intestinal inflammation in a murine model of acute colitis. *PLoS One*. 2011 Jan 25;6(1):e16442.
 46. McDermott MR, Bienenstock J. Evidence for a common mucosal immunologic system. I. Migration of B immunoblasts into intestinal, respiratory, and genital tissues. *J Immunol*. 1979 May;122(5):1892-8.
 47. Cahill RN, Poskitt DC, Frost DC, Trnka Z. Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes. *J Exp Med*. 1977 Feb 1;145(2):420-8.
 48. Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY. Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*. 2004 Oct;21(4):527-38.
 49. Bell LV., Else KJ. Mechanisms of leucocyte recruitment to the inflamed large intestine: redundancy in integrin and addressin usage. *Parasite Immunol*. 2008 Mar;30(3):163-70.
 50. Milling SW, Cousins L, MacPherson GG. How do DCs interact with intestinal antigens? *Trends Immunol*. 2005 Jul;26(7):349-52. Review.

51. Uhlig HH, Powrie F. Dendritic cells and the intestinal bacterial flora: a role for localized mucosal immune responses. *J Clin Invest.* 2003 Sep;112(5):648-51.
52. Cruickshank SM, English NR, Felsburg PJ, Carding SR. Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice. *World J Gastroenterol.* 2005 Oct 28;11(40):6338-47.
53. Cruickshank SM, Deschoolmeester ML, Svensson M, Howell G, Bazakou A, Logunova L, Little MC, English N, Mack M, Grecis RK, Else KJ, Carding SR. Rapid dendritic cell mobilization to the large intestinal epithelium is associated with resistance to *Trichuris muris* infection. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):3055-62.
54. Smits HH., Everts B., Hartgers FC., Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections protect against allergic diseases by active regulatory processes. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2010 Jan;10(1):3-12.
55. Elliott DE., Weinstock JV. Helminthic therapy: using worms to treat immune-mediated disease. *Adv Exp Med Biol.* 2009;666:157-66.
56. Kerksiek K., Parasites and the hygiene hypothesis. *Infection Research,* 2008
57. Wang LJ., Cao Y., Shi HN. Helminth infections and intestinal inflammation. *World J Gastroenterol.* 2008 Sep 7;14(33):5125-32.
58. Hammerschmidt SI, Ahrendt M, Bode U, Wahl B, Kremmer E, Förster R, Pabst O. Stromal mesenteric lymph node cells are essential for the generation of gut-homing T cells in vivo. *J Exp Med.* 2008 Oct 27;205(11):2483-90. Epub 2008 Oct 13.
59. Bode U, Sparmann G, Westermann J. Gut-derived effector T cells circulating in the blood of the rat: preferential re-distribution by TGFbeta-1 and IL-4 maintained proliferation. *Eur J Immunol.* 2001 Jul;31(7):2116-25.).

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Geographische Verteilung der durch intestinale Nematoden verursachten Erkrankungen	1
Abbildung 2: Der Infektionszyklus des <i>T. trichiura</i>	3
Abbildung 3: Differenzierung der CD4 ⁺ T-Zelle zu TH1- und TH2-Zellen.....	6
Abbildung 4: Aufbau des intestinalen Immunsystems	12
Abbildung 5: Migration naiver und aktivierter Lymphozyten.....	14
Abbildung 6 Versuchsaufbau.....	15
Abbildung 7: Infektionszyklus in NodSCID Mäusen zur Herstellung infektiöser <i>Trichuris muris</i> Eier.....	28
Abbildung 8: MLN-explantierte Mäuse zeigen im Vergleich zu sham-operierten Tieren eine erhöhte Wurmlast	30
Abbildung 9: CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen sowie eosinophile Granulozyten in der Lamina propria des Kolons am Tag 21 und 35 p.i.....	33
Abbildung 10: Vermehrte Anzahl an CD3 ⁺ T-Zellen in infizierten Mäusen an Tag 21 und 35p.i.....	35
Abbildung 11: CCR7-defiziente Mäuse zeigen eine signifikant erhöhte Wurmlast im Vergleich zu Wildtypen	37
Abbildung 12: Die MLN-explantierten Mäuse zeigen am Tag 35p.i. ein erhöhtes IFN- γ	40
Abbildung 13: Die MLN-explantierten Mäuse weisen am Tag 35p.i. ein erhöhtes IgG2a auf.....	42
Abbildung 14: Milz und MLN/Milz-explantierte Tiere zeigen einen deutlichen Unterschied in der Wurmlast im Vergleich zu infizierten Kontrollen.....	43

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Ausbildung einer TH2 T-Zell Antwort korreliert mit effektiver Immunkontrolle.....	10
--	----

9 Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkoholdehydrogenase
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
CCL	CC-chemokine ligand
CCR	CC-chemokine receptor
Cy5	Cyanin 5
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	dendritische Zelle
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E/S	Excretory/Secretory
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fc	fragment crystallizable
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GALT	gut-associated lymphoid tissues
HEV	high endothelial venules
ICAM-1/-2	intercellular adhesion molecule 1 / 2
IL	Interleukin
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN γ	Interferon Gamma
Ig	Immunglobuline
KO	Knock out Mausstämme
LFA-1	leukocyte function-associated antigen type 1
LN	Lymphknoten (lymph node)
LP	Lamina propria
LPL	Lamina propria Lymphozyten
M	molar
MAdCAM-1	mucosal addressin-cell adhesion molecule 1
MLN	mesenteriale Lymphknoten
MHC	major histocompatibility complex
MS	Mausserum

NodScid	Non-Obese Diabetic Severe Combined Immuno- deficiency
PBS	phosphat buffered saline
PerCp	Peridin Chlorophyll
p.i.	post infectionem
PLN	periphere Lymphknoten
PFA	Paraformaldehyd
PNA _d	peripheral-node addressin
PP	Peyersche Platten
PP-DC	DC der Peyerschen Platten
Rag	Rekombinationsaktivierende Gene
Rpm	revolutions per minute
RS	Rattenserum
RT	Raumtemperatur
STH	soil transmitted helminths
TBS	tris buffered saline
TBST	TBS / Tween 20
TH1	T Helfer Zellen 1
TH2	T Helfer Zellen 2
Treg	regulatorische T Zellen
T.muris	Trichiuris muris
T.trichiura	Trichiuris trichiura
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
wt	Wildtyp

10 Danksagung

Ich möchte mich bei folgenden Personen für ihre Unterstützung während meiner StrucMed-Arbeit bedanken:

Bei meinem Betreuer, Prof. Dr. Oliver Pabst, der das Thema für das StrucMed-Programm vorgeschlagen hat und der mich mit seiner Unterstützung, seinen Denkanstößen, hilfreichen und konstruktiven Ideen in der StrucMed-Zeit sehr gut betreut hat.

Prof. Dr. Reinhold Förster, der das StrucMed-Programm ins Leben gerufen hat, und der mein Projekt in meiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat.

Meiner Arbeitsgruppe, die mir hilfreich bei allen Fragen zum wissenschaftlichen Arbeiten zur Seite stand, für die gute Arbeitsatmosphäre im Team, und Michaela Friedrichsen, die mir in der Durchführung meiner Experimente tatkräftig zur Seite stand.

12 Erklärung nach §2 Abs.2 Nrn.6 und 7

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Hochschule Hannover zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „Die Funktion der Darm-drainierenden mesenterialen Lymphknoten für die Immunität gegen den Mauspeitschenwurm *Trichuris muris*“ im Institut für Immunologie unter Betreuung von Prof. Dr. Oliver Pabst ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsverfahren ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegende Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Weiterhin versichere ich, dass ich den beantragten Titel noch nicht erworben habe.

Starnberg, 01.08.2013