

5. Diskussion

Eine Infektion mit dem parasitischen Protozoen *Eimeria* verursacht die Kokzidiose, welche besonders in der Geflügelindustrie zu großen wirtschaftlichen Verlusten führt (Williams 1998). Die Immunantwort der Wirte führt nach Primärinfektion zum Aufbau einer stabilen Immunität vor Folgeinfektionen. Dabei sind besonders zelluläre Abwehrmechanismen von Bedeutung, welche in Hühnern sowie in Nagern schon vielfach untersucht wurden (Lillehoj 1998). Trotzdem sind im Hinblick auf die Funktionsweise der Immunzellen, besonders im Aufbau einer stabilen Immunität vor Folgeinfektion, noch viele Fragen offen. Dafür ist weiteres Verständnis der Interaktion zwischen Parasit und Immunsystem notwendig, um neue Wege der Entwicklung von Kontrollstrategien einschlagen zu können. Aufgrund der besseren immunologischen und genetischen Charakterisierung wurden Experimente zur Untersuchung der immunologischen Mechanismen in dem Modellorganismus Maus durchgeführt. Dabei werden durch Habitatsspezifitäten des Parasiten in Maus und Huhn Vergleiche in der Immunantwort gezogen. Der in dieser Arbeit verwendete Parasit *E. falciformis* infiziert das Caecum und obere Colon von Mäusen, ähnlich wie der hochpathogene Erreger *E. tenella* des Huhnes (Haberkorn 1970).

Ziel dieser Arbeit war es, die spezifische Immunantwort *E. falciformis*-infizierter Mäuse zu untersuchen sowie reaktive T-Lymphozyten zu identifizieren und im Transferexperiment deren mögliche Schutzwirkung bei Belastungsinfektion zu untersuchen. Eine Separierung von T-Zell-Subklassen und deren Einsatz im Transferexperiment gaben Aufschluss über die schützende T-Zell-Population. Um mehr über die Aktivierung und protektive Wirkung der Effektorzellen zu erfahren, wurde die Funktion des kostimulatorischen Rezeptors CTLA-4 auf der Oberfläche von T-Zellen in der Ausbildung einer Immunantwort bei *E. falciformis*-Infektion untersucht. Histopathologische Untersuchungen sowie die Bestimmung von lokalen und systemischen Konzentrationen an IFN- γ , TNF- α und IL-6 sollten das Krankheitsbild der Kokzidiose näher charakterisieren und weitere Erkenntnisse über die Beteiligung dieser Immunmodulatoren an der Ausbildung einer Immunantwort gegen Eimerien liefern.

5.1. Intestinale zelluläre Immunantwort *E. falciformis*-infizierter Mäuse

Die zelluläre Immunantwort ist für die Beendigung einer Infektion mit Eimerien verantwortlich. Dies konnte in verschiedenen Infektionsstudien mit Hühnern sowie mit Nagern

belegt werden (Rose et al. 1988b; Lillehoj & Lillehoj 2000). Hierbei kommt dem Darm-assoziierten Immunsystem eine große Bedeutung zu. Eine *in vitro*-Kultivierung von MLNC und Milzzellen infizierter sowie naiver Mäuse zeigte unterschiedliche proliferative Eigenschaften der Zellen, abhängig vom Entnahmetag nach der Infektion (Rose et al. 1988a). In diesem Experiment konnte ein Zusammenhang zwischen stärkster Proliferation *in vitro* und der höchsten Schutzrate bei Transfer in naive Tiere und nachfolgender Belastungsinfektion festgestellt werden.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sollte im Rahmen der Arbeit die Reaktivität von MLNC sowie Milzzellen *E. falciformis*-infizierter Mäuse untersucht werden. Um den Zeitpunkt einer möglichen verstärkten Proliferation besser bestimmen zu können, wurden die Zellen infizierter Spender am vierten, achten und 12. Tag nach Infektion unter Zugabe von SpAg im Lymphozyten-Transformationstest stimuliert. Dabei zeigten die MLNC an allen drei Entnahmetagen eine starke parasitenspezifische Proliferation bei Zugabe von 10^5 Sporoziten pro Napf der Kulturplatte, wohingegen die Milzzellen keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation aufwiesen. Diese Ergebnisse bestätigten Daten von *in vitro*-Experimenten mit dem verwandten Dünndarmparasiten *E. vermiformis*. Auch hier zeigten MLNC infizierter Rezipienten eine starke proliferative Antwort nach Stimulation mit Parasiten-Antigen (Rose et al. 1996). Weitere Studien mit isolierten MLNC und Stimulation mit parasitärem Antigen zeigten Hinweise auf die zeitliche Entwicklung einer starken zellulären Reaktion nach Infektion (Wakelin et al. 1993; Rose et al. 1997). Hierbei konnte an den Tagen fünf bis sieben nach Infektion die stärkste proliferative Antwort der Zellen beobachtet werden. Im Lymphozyten-Transformationstest dieser Arbeit bei Stimulation mit *E. falciformis*-SpAg zeigten die MLNC, entnommen am Tag vier p.i., eine Tendenz zu verstärkter Proliferation, der Vergleich der Proliferationsraten der verschiedenen Untersuchungstage war aber nicht statistisch signifikant. Die parasitenspezifische Reaktivität der MLNC weist aber auf eine mögliche Beteiligung der Zellen an der Entwicklung einer Immunantwort gegen Eimerien hin.

5.2. **Protektive Wirkung transferierter mesenterialer Lymphknotenzellen bei *E. falciformis*-Infektion**

Die Übertragung von Immunität gegen Eimerien durch Transfer von Lymphozyten ist möglich. Daten aus der Literatur belegen eine partielle Schutzwirkung gegen den Parasiten bei Transfer von T-Zellen aus MLN, Milz und Blut infizierter oder immuner Tiere auf naive Rezipienten

(Rose & Hesketh 1982, 1988a; Wakelin & Rose 1990). Dabei übertrugen MLNC den höchsten Grad an Immunität. Aufgrund der räumlich Nähe dieses Lymphorgans zum Ort der Infektion ist anzunehmen, dass die Präsentation des Antigens vorrangig dort stattfindet und somit eine schnelle Abwehrreaktion eingeleitet werden kann (Ovington et al. 1995; Spahn & Kucharzik 2004).

Erste Versuche der Immunitätsübertragung durch Zell-Transfer wurden für Ratten, infiziert mit *E. nieschulzi*, und für Hühner, infiziert mit *Eimeria maxima* beschrieben (Rommel & Heydorn 1971; Liburd et al. 1973; Rose & Hesketh 1982). Dabei waren sehr große Mengen an Zellen notwendig, um einen substantiellen Grad an Schutz übertragen zu können. Die weitere Erforschung der Effektorzellen bei dieser Infektion führte dann zur Verwendung von MLNC, welche protektiver waren als z.B. Milzzellen und deren Zahl bei Transfer drastisch reduziert werden konnte.

Das Behandlungsschema für den Zell-Transfer in dieser Arbeit wurde an Experimente mit dem verwandten Parasiten *E. vermiformis* adaptiert (Rose et al. 1988a), wobei das Zeitintervall zwischen Bestrahlung der Rezipienten und dem Zell-Transfer von drei auf einen Tag verkürzt werden konnte (Dr. U. Steinhoff, MPI Berlin, persönliche Mitteilung). Des Weiteren wurde eine Erhöhung der von Rose et al. verwendeten Bestrahlungsdosis von 200 rad auf 400 rad vorgenommen. Eine sublethale Bestrahlung vor dem T-Zell-Transfer führte nachweislich zu geringeren Ausscheidungen an Oozysten, was auch in der vorliegenden Arbeit festgestellt werden konnte. Hierbei wurden bei einer Bestrahlungsdosis von 400 rad verglichen mit einer 200 rad-bestrahlten und einer nicht bestrahlten Gruppe die größte Reduktion in der Oozystenausscheidung bei Transfer aktivierter T-Zellen beobachtet. Eine γ -Bestrahlung tötet lymphoide Zellen schon bei Dosen, welche für andere Gewebe des Körpers nicht schädlich sind. B-Zellen zeigten bei einer Bestrahlungsdosis von 50 rad eine um 50%-reduzierte Aktivität *in vitro*, wohingegen bei T-Zellen 200 rad angewendet werden mussten (Janeway 1975). Die in dieser Arbeit verwendete Bestrahlungsdosis von 400 rad führte somit vermutlich zu einer Abtötung bzw. weitgehenden Aktivitätseinschränkung von nahezu allen T- und B-Lymphozyten im Körper der Rezipienten. Die intravenös transferierten Zellen finden über den Homing-Rezeptor $\alpha 4\beta 7$ -integrin ihren Weg aus der Blutbahn in den Darm (Hamann et al. 1994) und können sich dort besser etablieren, ohne mit den schon vorhandenen Lymphozyten konkurrieren zu müssen. T-Zellen Virus-infizierter Mäuse zeigten bei Transfer in naive Rezipienten eine signifikant verstärkte Migration in Lymphknoten, Milz und Colon verglichen mit transferierten B-Zellen (Finke & Acha-Orbea 2001). Diese Verteilung der funktionell kompetenten T-Zellen in die peripheren lymphatischen Organe ist wichtig für die Auslösung

der adaptiven Immunantwort bei Folgeinfektionen. Transferierte Zellen konnten einen Tag nach Injektion in Milz-, MLN- und intestinalen IEL-Populationen wiedergefunden werden (Smith & Hayday 2000a). Deshalb konnte 24 Stunden nach Transfer die Infektion mit *E. falciformis* vorgenommen werden. Die Infektionsdosis von 100 Oozysten wurde gewählt, da sich Unterschiede der induzierten Immunität durch die Anzahl der ausgeschiedenen Oozysten besser beurteilen lassen. Eine erhöhte Infektionsdosis würde einen schützenden Effekt transferierter Zellen womöglich durch massive Ausscheidungen maskieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich die antiparasitären Eigenschaften transferierter MLNC infizierter Tiere. Eine Reduktion der Oozystenausscheidung um 65% mit MLNC von Tag vier p.i. bzw. um 74% mit MLNC vom zehnten Tag p.i. ist dafür ein deutlicher Beweis. Ein Zusammenhang zwischen stärkster Proliferation *in vitro* und größter Schutzwirkung bei Transfer *in vivo* wie von Rose et al. (1988a) beschrieben, konnte dagegen nicht festgestellt werden. Dazu ist aber zu bemerken, dass in den Untersuchungen von Rose et al. die spontane Proliferation der Zellen naiver und infizierter Spender gemessen wurde und nicht, wie in den Experimenten dieser Arbeit, unter Zugabe parasitären Antigens. Somit sind die gleichbleibend erhöhten Proliferationsraten der MLNC im Lymphozyten-Transformationstest dieser Arbeit vermutlich auf die starke antigenetische Stimulation durch SpAg zurückzuführen.

Weitergehend konnte für den Dünndarmparasiten *E. vermiformis* eine vollständige Schutzwirkung vor Sekundärinfektion bei Übertragung von $3,5 \times 10^8$ MLNC infizierter Spender pro Maus erzielt werden (Rose et al. 1988a). In der vorliegenden Arbeit wurden regulär 5×10^7 MLNC pro Tier transferiert, womit, wie oben erwähnt, eine 74%ige Reduktion der Oozysten in den Faeces erreicht wurde. Es ist anzunehmen, dass höhere Zahlen an MLNC auch zu erhöhten Schutzraten geführt hätten. Eine signifikante Reduktion der Ausscheidungszahlen an Oozysten konnte jedoch schon durch den Transfer von 5×10^7 MLNC erreicht werden. Des Weiteren gibt es Unterschiede in der Immunogenität der einzelnen murinen *Eimeria*-Arten. So sind BALB/c-Mäuse, infiziert mit *E. vermiformis*, vollständig vor einer Belastungsinfektion geschützt, wohingegen für *E. falciformis* erst bei Drittinfektion keine Oozystenausscheidungen mehr festgestellt werden konnten (Schito et al. 1996; Steinfelder 2002). Diese Unterschiede können von verschiedenen Faktoren abhängen, wie z.B. der Lokalisation des Parasiten im Darm (Shi et al. 2000). Eimerien des Dickdarmes, wie *E. falciformis*, *Eimeria separata*, *Eimeria ferrisi* und *E. tenella* induzieren eine relativ schwache Immunität im Vergleich zu Eimerienarten des Dünndarmes. Der Grund dafür ist nach Meinung der Forscher das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (GALT), welches im Dünndarm besser entwickelt ist als im Dickdarm (Beagley et al. 1995; Schito et al. 1996).

Demnach ist anzunehmen, dass diese Eigenschaft der Induktion einer Immunantwort des Parasiten auch eine Rolle in der Immunitätsübertragung aktivierter MLNC spielt. Somit könnte vermutet werden, dass für einen vollständigen Schutz bei Sekundärinfektion mit *E. falciformis* MLNC von Mäusen nach Drittinfektion verwendet werden müssten.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass intravenös transferierte aktivierte MLNC bei Infektion mit *E. falciformis* zu einer signifikant verminderten Oozystenausscheidung führten und somit an der Limitierung einer Sekundärinfektion maßgeblich beteiligt sind.

5.3. Analyse der Schutzwirkung transferierter T-Zell-Subklassen bei *E. falciformis*-Infektion

Eine Infektion mit intrazellulären Pathogenen wird vorrangig von einer starken Th1-Antwort begleitet. So zeigten Untersuchungen mit Leishmanien, Toxoplasmen und Cryptosporidien die Beteiligung von CD4⁺-T-Zellen in der Abwehr der Erreger (Denkers & Gazzinelli 1998; Riggs 2002; Scott et al. 2004). Auch im Falle der Eimerien konnte in vielfachen Untersuchungen mit murinen sowie aviären Arten eine limitierende Wirkung von CD4⁺-T-Zellen in der Primärinfektion bestätigt werden (Rose et al. 1988b; Trout & Lillehoj 1996). Die Kontrolle einer Sekundärinfektion ist noch nicht vollständig geklärt. Daten aus der Literatur weisen auf die Beteiligung von CD8⁺-T-Zellen in der Resistenzentwicklung bei intrazellulären parasitären, bakteriellen sowie viralen Infektionen hin (Morrot & Zavala 2004; Brzoza et al. 2004; Shoukry et al. 2004). Infektionsexperimente nach *in vivo*-Depletion von T-Zell-Subklassen sprachen den CD8⁺-T-Lymphozyten eine Beteiligung an der Termination einer Sekundärinfektion mit Eimerien zu (Rose et al. 1992a; Trout & Lillehoj 1996). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für den parasitischen Protozoen *Trypanosoma cruzi* erhalten, wobei der Transfer einer Lymphozytensuspension nach Depletion der CD8⁺-T-Zellen keine protektiven Effekte mehr zeigte (Paiva et al. 1999). Bei adoptivem Transfer von CD8⁺-T-Zellen konnte auch für die parasitären Infektionskrankheiten Malaria und Toxoplasmose eine starke protektive Wirkung dieser Zell-Population festgestellt werden (Rodrigues et al. 1991; Buzoni-Gatel et al. 1997).

Zur Untersuchung einer schützenden Immunantwort bei Belastungsinfektion mit *E. falciformis* wurden CD8⁺-T-Lymphozyten infizierter Spender separiert und naiven Tieren intravenös injiziert. Die Menge der transferierten T-Zellen entsprach ihrem prozentualen Anteil im gesamten Lymphknoten (ca. 20%) bezogen auf die vorher übertragene Gesamtzellzahl von 5 x

10^7 MLNC pro Maus. Nach Infektion mit 100 Oozysten pro Maus wurden die Ausscheidungen in den Faeces der Tiere als Parameter für die schützende Wirkung der transferierten Zellen bestimmt. Hierbei konnte eine signifikant reduzierte Oozystenausscheidung in der Gruppe der aktivierten $CD8^+$ -T-Zell-Empfänger, verglichen mit Kontrollgruppen, beobachtet werden.

Die protektive Wirkung von $CD8^+$ -T-Zellen wurde in Experimenten mit Hühnern und Nagern bestätigt. Dabei führte eine Depletion von Zellen, welche das CD8-Antigen oder den $TCR\alpha\beta^+$ exprimierten, bei Sekundärinfektion mit *E. tenella* und *Eimeria acervulina* zu einer substantiell erhöhten Oozystenproduktion und zum vollständigen Verlust der Resistenz vor Reinfektion (Trout & Lillehoj 1996). Dies konnte ebenfalls in Untersuchungen mit dem murinen Parasiten *E. vermiformis* festgestellt werden (Rose et al. 1992a; Roberts et al. 1996; Smith & Hayday 2000a). Weitere Untersuchungen sprachen den $CD8^+$ -T-Zellen in der Abwehr einer Eimerien-Infektion eine duale Rolle zu. Zum einen wurde auf eine Beteiligung von $CD8^+$ -T-Zellen am Transport von Sporozoiten durch das Epithel hingewiesen (Trout & Lillehoj 1995; Beattie et al. 2001). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten die Mehrzahl der Sporozoiten in $CD8^+$ -T-Zellen und Makrophagen (Trout & Lillehoj 1993, 1995). Die Depletion dieser Zellen führte zu einer signifikant verminderten Oozystenausscheidung während der Primärinfektion mit *E. tenella* und *E. acervulina* (Trout & Lillehoj 1996). Hierbei kann vermutet werden, dass der fehlende Transport der Sporozoiten im Darm durch die $CD8^+$ -T-Lymphozyten in der Folge auch zu verminderter Oozystenentwicklung führte. Dagegen sprachen Vervelde et al. (1995) den $CD8^+$ -T-Zellen nur eine untergeordnete Funktion als Transportmittel für Sporozoiten zu, da in Experimenten nur eine kleine Anzahl an Sporozoiten in diesen Zellen gefunden werden konnte. In diesen Untersuchungen wurde eher vermutet, dass Sporozoiten mit Hilfe ihres Apikalkomplexes selbständig bis zum Kryptenepithel vordringen können. Die Transportfunktion der Zellen ist für die Sekundärinfektion aber von untergeordneter Bedeutung, da der Sporozoitentransfer zu den Epithelzellen der Krypten inhibiert ist (Rose et al. 1984; Trout & Lillehoj 1995). Hierbei konnte eine Akkumulation der Sporozoiten in den $CD8^+$ -T-Lymphozyten nach Sekundärinfektion beobachtet werden. Dies lässt vermuten, dass die Parasiten unfähig waren, die Zellen zu verlassen oder dass die T-Zellen den Austritt verhinderten, wodurch eine Weiterentwicklung in den Epithelzellen der Krypten verhindert wurde (Trout & Lillehoj 1995).

Zum anderen konnte 48 Stunden nach Sekundärinfektion ein signifikanter Anstieg der $CD8^+$ -T-Zellzahl im Darm beobachtet werden, besonders in Kontakt mit Parasiten-enthaltenden Epithelzellen (Lillehoj & Trout 1996). Dies deutet an, dass infizierte Epithelzellen Ziele für die zytotoxische Wirkung dieser Zell-Population sind.

Der genaue Mechanismus dieser Schutz-vermittelnden Zell-Population ist noch weitgehend ungeklärt. Wahrscheinlich wirken Zytotoxizität und Zytokine der CD8⁺-T-Zellen zusammen an der Verhinderung der Parasitenvermehrung bzw. deren Abtötung mit. So wurden intrazellulär geschädigte Parasiten in intakten Wirtszellen gefunden (Rose & Hesketh 1987). Hier könnte vermutet werden, dass über den direkten Kontakt der Effektorzellen zum infizierten Epithel Veränderungen im intrazellulären Milieu der Epithelzellen induziert werden und so die Eimerieninfektion limitiert wird. Die genauen Mechanismen dieser intrazellulären Schädigung sind nicht geklärt und bedürfen der weiteren Überprüfung, beispielsweise durch Untersuchungen der zytolytischen Aktivität der Zellen. So zeigten *in vitro*- sowie *in vivo*-Experimente mit defizienten Mäusen eine perforin-, granzym B- und Fas-abhängige Zytolyse von infizierten Zielzellen (Lowin et al. 1994; Kägi et al. 1994). Die zytolytischen Aktivität von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) bei Infektion mit dem intrazellulären Protozoen *Toxoplasma gondii* führte zwar zur Zerstörung der Epithelzellen des Darmes, der Parasit blieb davon aber unberührt. Interessanterweise wurden in 8% der Effektorzellen Tachyzoiten von *T. gondii* gefunden, was zu der Vermutung führt, dass der Parasit nach Zerstörung der Epithelzellen zytotoxische Effektorzellen infiziert und sich darin vermehrt (Yamashita et al. 1998). Eine andere Möglichkeit der Parasiteneliminierung ist, dass die Apoptose durch CD8⁺-T-Lymphozyten zu einer Phagozytose der zerstörten Zellen durch Makrophagen führt und zu enzymatischer Verdauung des Parasiten in Phagolysosomen (Savill 1996). Es könnte aber auch vermutet werden, dass nach Zerstörung der Epithelzellen und Freiwerden des Parasiten in das Lumen des Darmes andere Effektormoleküle oder -zellen, wie z.B. Antikörper, Komplement, Makrophagen, NK-Zellen oder Leukozyten, für die Eliminierung des Parasiten verantwortlich sind (siehe histologische Fotos S. 55). Die Ergebnisse der Experimente dieser Arbeit zeigen aber eindeutig, dass die Zell-Population der CD8⁺-T-Zellen für eine Resistenz vor Reinfektion mit *E. falciformis* mitverantwortlich ist.

Neben den aktivierten CD8⁺-T-Zellen wurden als Kontrolle CD8⁻-Zellen infizierter Spender transferiert. Die Empfänger der aktivierten CD8⁻-Zellsuspension, bestehend aus CD4⁺-T-Zellen, B-Zellen, DC, NK-Zellen und Makrophagen, zeigten starke pathologische Symptome, worauf alle Rezipienten der Empfängergruppe im Verlauf der Infektion verstarben. Diese starke Pathologie der Erkrankung wurde ebenfalls in einem Wiederholungsexperiment beobachtet. Der äußere Habitus der Tiere war durch gesträubtes Fell, aufgekrümmten Rücken, glanzlose Augen sowie verschmutzten Schwanz und Anus gekennzeichnet. Dehydratation, Bewegungsunlust, stark vermindertes Reinigungsverhalten bis hin zu Apathie, Zittern und Festliegen waren Symptome für eine unkontrollierte Infektion mit *E. falciformis*. Da erkrankte

Tiere aufgrund von gestörtem Allgemeinbefinden weniger Futter aufnehmen und es durch Zerstörung des Epithels zu verminderter Resorption aufgenommener Nahrung kommt, ist die Gewichtsveränderung der Rezipienten nach Infektion ein deutlicher Parameter für eine Schutzwirkung transferierter Zellen vor dem Parasiten. In diesem Experiment konnten aber keine eindeutigen Rückschlüsse der starken Gewichtsreduktion als pathologisches Symptom auf die transferierte Zell-Population gezogen werden, da die Ausgangsgewichte der Tiere sehr differierten. Es war aber offensichtlich, dass die transferierte Zellsuspension für die starken pathologischen Veränderungen verantwortlich ist. Die Analyse der prozentualen Anteile der verschiedenen Zell-Populationen in der CD8⁻-Zellsuspension mittels FACS zeigte, dass CD4⁺-T-Lymphozyten den größten Anteil in dieser Fraktion darstellten. Die inflammatorischen Eigenschaften dieser Zell-Population wurden vielfach beschrieben (De Winter et al. 1999; Westendorf et al. 2005). So führte ein Transfer von TCRαβ⁺CD4⁺-T-Zellen in *scid* (*severe combined immunodeficient*)-Mäuse zu einer Infiltration der Lamina propria und des Epithels des Darmes und induzierte eine lethal entzündliche Darmerkrankung, wohingegen eine unfraktionierte Zellsuspension der Milz keine Erkrankung auslöste (Claesson et al. 1996). In Untersuchungen der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE) bei Mäusen konnte eine regulatorische CD8⁺-T-Zell-Population identifiziert werden, welche durch Aktivierung in der Primärinfektion die Bildung Antigen-spezifischer CD4⁺-T-Zellen während der Sekundärinfektion kontrolliert (Jiang & Chess 2004). Dabei reagiert das MHC Klasse 1b-Molekül Qa-1, welches von aktivierten CD4⁺-T-Zellen in der Primärinfektion exprimiert wird, mit dem TCRαβ auf regulatorischen CD8⁺-T-Zellen, die wiederum potentiell pathogene CD4⁺-T-Lymphozyten mit diesem Peptidkomplex in der Sekundärinfektion supprimieren. Diese Suppression ist mit einer spezifischen Antigen-Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen verbunden, der genaue Mechanismus ist bisher noch nicht hinreichend geklärt. Es könnte aber vermutet werden, dass die Aktivierung der regulatorischen CD8⁺-T-Zellen zu einer Differenzierung in zytolytische T-Zellen führt, welche die Zielzellen lysieren oder durch Bildung von Lymphokinen die Wirkung der Zielzellen regulieren (Jiang & Chess 2004). Evident ist aber, dass Qa-1-defiziente Mäuse eine überschießende sekundäre CD4⁺-T-Zell-Antwort nach viraler Infektion entwickeln (Sarantopoulos et al. 2004). In Analogie dazu werden in der Primärinfektion mit Eimerien ebenfalls Antigen-spezifische CD4⁺-T-Zellen gebildet, welche zur Bildung regulatorischer CD8⁺-T-Lymphozyten führen könnten. Durch die Separation der gesamten CD8⁺-T-Zell-Population im Transferexperiment mit *E. falciformis* in dieser Arbeit fehlte somit vermutlich diese regulatorische Komponente, weshalb eine überschießende Immunantwort der Grund für den Tod der Versuchstiere gewesen sein könnte.

Aufgrund des Verdachtes der pathologischen Wirkung aktivierter CD4⁺-T-Lymphozyten wurde in einem Folgeexperiment die Funktion separierter aktivierter CD4⁺-T-Zellen bei Transfer in naive Mäuse und nachfolgender Belastungsinfektion untersucht. Die Menge an transferierten Zellen entsprach ihrem prozentualen Anteil im gesamten Lymphknoten (ca. 50%) bezogen auf die in den ersten Transferexperimenten verabreichte Gesamtzellzahl von 5×10^7 MLNC pro Maus. Die Ergebnisse zeigten zwar keinen protektiven Effekt, aber auch keine verstärkten klinischen Symptome der Rezipienten. Dagegen waren in den histologischen Untersuchungen des Dünn- und Dickdarmes dieser Versuchsgruppe die stärksten pathologischen Veränderungen ersichtlich, was zu der Schlussfolgerung führt, dass CD4⁺-T-Zellen eine pathologische Wirkung auf das Darmepithel bei Eimerieninfektion haben, die starke klinische Symptomatik aber vermutlich auf dem Zusammenspiel dieser Zellen mit anderen Zell-Populationen, wie B-Zellen, DC, NK-Zellen oder Makrophagen und deren gebildeten Zytokinen, beruht.

Die FACS-Analysen zeigten, dass der prozentuale Anteil der aktivierten CD4⁺-T-Zellen in den MLN nach Infektion mit *E. falciformis* im Vergleich zu naiven CD4⁺-T-Zellen abnahm. Dies konnte auch in Experimenten mit *E. vermiformis* gezeigt werden (Wakelin et al. 1993).

Der prozentuale Anteil der protektiven aktivierten CD8⁺-T-Zellen unterschied sich in beiden Experimenten nicht von dem der naiven CD8⁺-T-Lymphozyten. Infektionsexperimente mit den verwandten Parasiten *E. vermiformis* und *E. papillata* zeigten dagegen nach Primärinfektion eine starke Zunahme der CD8⁺-T-Zellzahl bis zum Höhepunkt der Oozystenausscheidung (Tag neun bzw. Tag fünf p.i.), wonach ein Abfall der Zellzahl zu verzeichnen war (Wakelin et al. 1993; Schito et al. 1998). Da die Zellen in den Experimenten dieser Arbeit erst an Tag zehn p.i. entnommen wurden, könnten die vergleichbaren Zellzahlen der naiven und aktivierten CD8⁺-T-Zellen auf den späten Zeitpunkt der Entnahme nach *E. falciformis*-Infektion zurückzuführen sein. Dies könnte in weiteren Experimenten durch Untersuchung der Zellzusammensetzung der MLNC an verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mittels FACS-Analyse überprüft werden.

Der B-Zell-Anteil nahm in zwei Experimenten von 25-34% in naiven Tieren auf 42-48% nach Infektion zu. Die humorale Immunantwort bei Eimerien-Infektion wurde in verschiedenen Experimenten als unbedeutend beschrieben. So zeigten Untersuchungen mit chemisch und hormonal burssektomierten Hühnern, dass eine Resistenz gegen Reinfektion trotz Inhibition einer Antikörperbildung aufgebaut werden konnte (Giambrone et al. 1981). Dagegen zeigten *in vivo*-Untersuchungen der Antikörperproduktion in Colon und MLN von Mäusen nach *E.*

falciformis-Infektion einen deutlichen Anstieg der Antikörperkonzentration ab Tag sieben p.i. mit der stärksten Konzentrationsmessung an Tag elf p.i. (Nash & Speer 1988). Desweiteren wurde eine spezifische Antikörperbildung gegen Antigene von *E. falciformis* beschrieben, welche bei der *in vitro*-Phagozytose von Sporozoiten durch Makrophagen und auch der Lyse durch Neutrophile beteiligt waren (Bekthi & Péry 1989; Bekthi et al. 1992; Kazanji et al. 1994). Trotzdem korrelierte auch in Mäusen eine verstärkte Bildung von Antikörpern nicht mit einer Immunität gegen Eimerien (Rose et al. 1988a).

Dendritische Zellen (DC) können als antigenpräsentierende Zellen (APC) durch Aufnahme von Antigenen im Darm und Präsentation im Lymphknoten die adaptive Immunantwort aktivieren und die Bildung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten einleiten (Macpherson et al. 2004). Der Einfluss dieser Zell-Population auf die Immunitätsausbildung bei Eimerien-Infektion ist noch ungeklärt. Die FACS-Analyse der MLNC in dieser Arbeit zeigte eine, bezogen auf die Zellzahl pro Maus, ähnlich große Population an DC in den MLN infizierter und naiver Tiere. DC vollziehen nach Antigenkontakt durch die Expression von MHC Klasse-II-Molekülen, CD80 und CD86 eine funktionelle Reifung, die für die T-Zell-Aktivierung bedeutend ist (Iwasaki & Kelsall 1999). Vorrangig wird im mukosalen Immunsystem eine Th2-gerichtete Proliferation angeregt, welche aber im Verlauf der Infektion zur Entwicklung einer starken Th1-Immunantwort führt (Stumbles et al. 1998; Biedermann 2001). Dass diese Zell-Population eine Rolle in der Resistenzentwicklung parasitärer Infektionen spielt, zeigen Daten aus der Literatur. DC haben eine besondere Bedeutung in der Abwehr des parasitischen Protozoen *Leishmania major* im Krankheitsbild der murinen Hautleishmaniose, wobei durch Transfer vorinkubierter epidermaler Langerhans-Zellen ein Schutz vor einer Folgeinfektion induziert wurde (Flohé et al. 1998). Weiterhin führte eine *ex vivo*-Behandlung von DC mit *T. gondii*-Antigen bei Transfer zu einer spezifischen Proliferation der MLNC und zeigte eine starke Resistenzentwicklung gegen den Parasiten (Dimier-Poisson et al. 2003). Die Funktion dieser Zell-Population bei Eimerieninfektion könnte durch *in vitro*-Experimente isolierter Zellen mit parasitärem Antigen und darauffolgender Inkubation mit MLNC überprüft werden. Eine anschließende FACS-Analyse könnte dann Aufschluss über proliferierte Zell-Populationen der MLN und damit Hinweise auf die Bedeutung der DC bringen.

Der Einfluss Natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) auf eine Infektion mit Eimerien wurde ebenfalls untersucht. Experimente mit *E. papillata* wiesen auf die Beendigung einer Primärinfektion durch diese Zell-Population hin (Schito & Barta 1997). Hierbei zeigten NK-Zell-defiziente Mäuse bei Infektion mit diesem Parasiten eine signifikant erhöhte Oozystenausscheidung, verglichen mit Kontroll-Mäusen. Infektionsstudien mit anderen

murinen *Eimeria*-Arten zeigten dagegen keinen protektiven Effekt dieser Zell-Population in der Primärinfektion (Rose et al. 1988b, 1990, 1995; Schito et al. 1996). Ein Anstieg der NK-Zell-Aktivität war dennoch in Zellsuspensionen von Milz und MLN bei *E. vermiformis*-Infektion zu verzeichnen, wobei die Depletion dieser Zell-Population keinen Einfluss auf die Oozystenausscheidung hatte (Smith et al. 1994). Die Ergebnisse der FACS-Analyse in dieser Arbeit zeigten, dass der Anteil der NK-Zellen in den MLN *E. falciformis*-infizierter und naiver BALB/c-Mäuse nicht differierte. Diese Resultate lassen eine eher untergeordnete Rolle in der Abwehr von *E. falciformis* vermuten. Die Zytotoxizität dieser Zellen scheint dabei von untergeordneter Bedeutung zu sein, wie Infektionsstudien von *beige* (*bg*) Mäusen mit *T. gondii* (Johnson & Sayles 1995) und *L. major* (Scharton & Scott 1993) zeigten. Dabei zerstört die Punktmutation im *bg*-Gen selektiv die lytischen Funktionen der NK-Zellen, wohingegen die Zytokinsekretion der Zell-Population nicht beeinträchtigt wird (Roder & Duwe 1979). Die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen, angeregt durch das von APC gebildete proinflammatorische IL-12, hat eine große Bedeutung in der Aktivierung Parasiten-spezifischer CD8⁺-T-Zellen (Combe et al. 2005). Somit könnte vermutet werden, dass NK-Zellen bei Eimerieninfektion durch Produktion von IFN- γ an der Entwicklung einer frühen Th1-Immunantwort beteiligt sind und die Abwehr unterstützen. Im Falle des Transfers der CD8⁻-Zellsuspension im Rahmen dieser Arbeit trug die Zytokinsekretion dieser Zell-Population vermutlich aber zu einer Verstärkung der Immunpathologie bei.

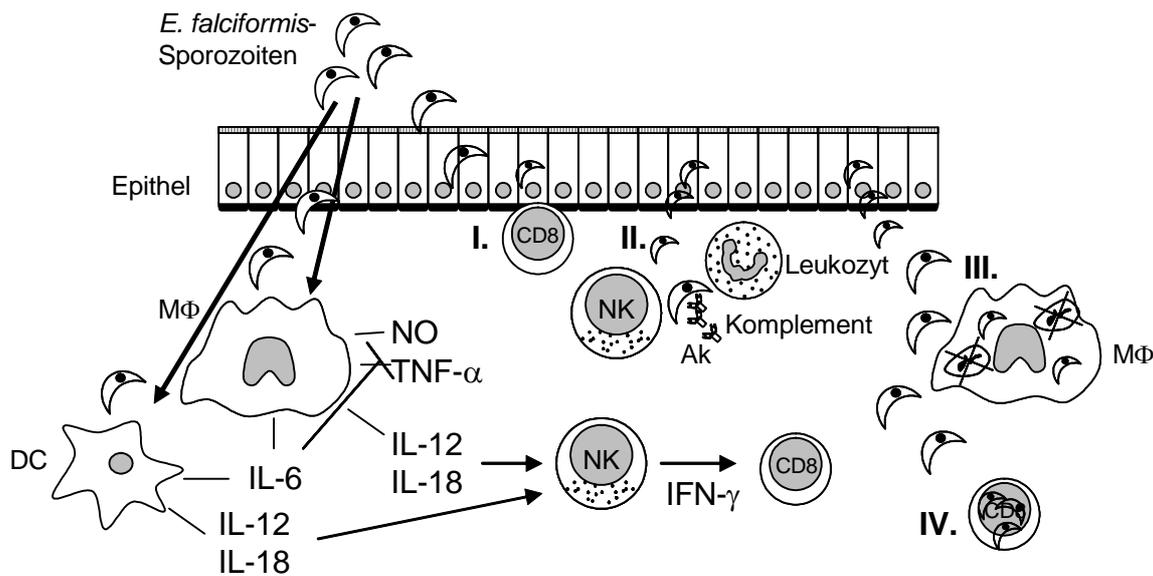


Abb. 26: Hypothesen der Schutzmechanismen bei Sekundärinfektion mit *Eimeria falciformis*.

I. CD8⁺-T-Zelle in direktem Kontakt mit infizierter Epithelzellen -> intrazelluläre Schädigung des Parasiten; Zytotoxizität.

II. Aus zerstörten Epithelzellen freigewordene Sporozoiten werden durch Antikörper und Komplement opsoniert und nachfolgend durch Natürliche Killerzellen (NK) und Leukozyten eliminiert.

III. Apoptose von infizierten Epithelzellen durch zytotoxische CD8⁺-T-Zellen führt zur Phagozytose durch Makrophagen und enzymatischer Verdauung des Parasiten in Phagolysosomen.

IV. Akkumulation von Sporozoiten in CD8⁺-T-Lymphozyten.

MΦ Makrophagen; DC Dendritische Zellen; NK Natürliche Killerzellen; Ak Antikörper

Zusammenfassend konnte anhand der Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit eine protektive Immunantwort, vermittelt durch CD8⁺-MLNC, in der Sekundärinfektion mit *E. falciformis* festgestellt werden. Initial ist eine Beteiligung von Zellkompartimenten der angeborenen Immunantwort, wie DC und NK-Zellen, an der Aktivierung der adaptiven Immunantwort gegen den Parasiten denkbar. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit sind vermutlich die zytotoxischen Eigenschaften der CD8⁺-T-Lymphozyten in Zusammenhang mit der Zytokinwirkung für die Abwehr einer Eimerieninfektion verantwortlich. Die genauen Mechanismen des Zusammenspiels der einzelnen Zell-Populationen in der Entwicklung einer protektiven Immunantwort gegen *E. falciformis* sind noch weitgehend ungeklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen. So könnten zur Charakterisierung der spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort Untersuchungen der zytolytischen Aktivität der Zellen durchgeführt werden. Für

einen noch umfassenderen Einblick in das intestinale Immunsystem sollte im Weiteren die Funktion der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) bei Eimerieninfektion untersucht werden, denn vielen der IEL im Colon, welche den $\text{TCR}\alpha\beta^+\text{CD8}^+$ -Rezeptor (Boll et al. 1995) exprimieren, wird eine protektive Funktion in der Abwehr intrazellulärer Pathogene zugesprochen. $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -T-Zell-defiziente Mäuse entwickelten Defekte in der protektiven Immunantwort und waren nicht vor einer Reinfektion mit *E. vermiformis* geschützt (Roberts et al. 1996). Auch Infektionsexperimente mit *E. acervulina* im Huhn zeigten ein Ansteigen von $\alpha\beta^+\text{CD8}^+$ -IEL im Darm nach Belastungsinfektion (Lillehoj & Bacon 1991). Demnach sind $\text{TCR}\alpha\beta^+$ -IEL Effektorzellen der protektiven Immunantwort und bilden eine erste Barriere vor intestinaler Infektion mit Eimerien. Des Weiteren könnte die Bedeutung der DC und NK-Zellen in der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort durch Depletion dieser Zellpopulationen und nachfolgender *E. falciformis*-Infektion untersucht werden.

5.4. Histopathologische Veränderungen und Zytokinproduktion nach *E. falciformis*-Infektion

Aufgrund der hohen Mortalitätsrate nach Transfer CD8^+ -T-Zell-depletierter MLNC in naive Tiere und nachfolgender Belastungsinfektion wurden der Dünn- und Dickdarm dieser Rezipienten histologisch untersucht. Dabei zeigten sich pathologische Veränderungen wie Zottenabrasion, Zellabschilferung, Blutansammlungen im Lumen sowie Exsudationen, welche vermutlich auf immunpathologische Mechanismen zurückzuführen waren. Aufgrund des Verdachtes der pathologischen Wirkung der CD4^+ -T-Zell-Fraktion wurde diese nach Separation in naive Tiere transferiert und durch eine Belastungsinfektion deren Wirkung untersucht. In diesem Experiment wurden pro Versuchstiergruppe drei Tiere an Tag neun p.i. getötet und der Dünn- und Dickdarm sowie die Milz der Rezipienten für die histologische Beurteilung und Zytokinbestimmung entnommen. Dieser Zeitpunkt für die Entnahme der Proben für die histologischen Untersuchungen wurde gewählt, da sich bis zu diesem Tag die stärksten klinischen Symptome entwickelten, als auch die größte Gewichtsreduktion der Rezipienten. Die höchsten Ausscheidungsraten an Oozysten traten regulär an Tag sieben oder acht p.i. auf. Infektionsstudien mit *E. vermiformis* zeigten die schwersten histopathologischen Veränderungen zwischen Tag acht und zehn, ebenfalls zum Zeitpunkt der Reifung sexueller Stadien und den höchsten Ausscheidungsraten an Oozysten (Blagburn & Todd 1984). Als auffälligste histopathologische Veränderungen im Epithel des Darmes der im Rahmen dieser

Arbeit untersuchten Mäuse traten Exsudationen, Zottenabrasion im Dünndarm, Blut in den Lumina, Desquamation der Epithelzellen sowie eine verstärkte kapilläre Blutfülle in der Lamina propria auf. Dabei zeigten sich die schwersten pathologischen Veränderungen im Dünn- und Dickdarm der Empfänger aktivierter CD4⁺-T-Zellen. Diese Veränderungen wurden vermutlich neben der mechanischen Zerstörung des Epithels durch die transferierten Zell- Populationen induziert, wobei besonders Zytokine eine große Rolle spielen.

Als Schlüsselzytokin der Th1-Immunantwort für die Beendigung einer Primärinfektion mit Eimerien wurde IFN- γ identifiziert (Rose et al. 1989; Wakelin et al. 1993; Yun et al. 2000). Eine Behandlung von BALB/c-Mäusen mit anti-IFN- γ -Antikörpern führte zu signifikant erhöhter Oozystenausscheidung und verlängerter Patenz. Dagegen hatte die Neutralisation des Zytokins in der Primärinfektion keine Auswirkungen auf die Ausbildung einer stabilen Immunität in der Sekundärinfektion mit *E. vermiformis* (Rose et al. 1989). Dies konnte in Infektionsexperimenten mit IFN- γ -knock-out-Mäusen für *E. falciformis* bestätigt werden (Steinfelder 2002). Der protektive Einfluss des Zytokins zeigte sich ebenfalls in Primärinfektionen mit den parasitischen Protozoen *T. gondii* (Liesenfeld et al. 1996) und *Cryptosporidium parvum* (Chen et al. 1993). Im Falle von *T. gondii* konnte aber auch eine Verstärkung der Pathologie festgestellt werden. Demnach kommt diesem Zytokin eine duale Funktion zu: die Beteiligung an der Parasiteneliminierung und die entzündungsfördernden Eigenschaften.

Die in dieser Arbeit gemessenen IFN- γ -Werte zeigten eine erhöhte Produktion des Zytokins in den Caeca der Rezipienten aktivierter CD8⁺-, CD4⁺-T-Zellen sowie der PBS-Kontrollgruppe. Bei Vergleich der produzierten Konzentrationen an IFN- γ aller Versuchsgruppen in diesem Darmabschnitt konnten aber keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Demnach kann IFN- γ in der Sekundärinfektion keine protektive Funktion zugesprochen werden, da die Empfänger aktivierter CD4⁺-T-Zellen und die PBS-Kontrollgruppe keine reduzierten Oozystenausscheidungen aufwiesen. Die erhöhten Werte könnten aber für eine immunregulatorische Funktion des Zytokins durch Aktivierung von Effektorzellen sprechen. Die Produktion von IFN- γ in der Th1-Immunantwort wird den CD4⁺- sowie den CD8⁺-T-Zellen zugesprochen. Die hauptsächliche Bildung des Zytokins ist maßgeblich vom Ort der Infektion abhängig. So sind CD4⁺-T-Zellen die Hauptproduzenten von IFN- γ in den drainierenden Lymphknoten der kutanen Hautleishmaniose (Heinzel et al. 1991), wohingegen in einer *T. gondii*-Infektion CD8 α -IEL die Produktion übernehmen (Lee & Shin 2002). Die IFN- γ Produktion während der Primärinfektion mit Eimerien wird von TCR $\alpha\beta$ ⁺-T-Zellen,

welchen das Antigen über das MHC-II-Molekül präsentiert wird, übernommen (Smith & Hayday 1998). Da der MHC-II-Peptidkomplex vom Korezeptor CD4 auf T-Zellen erkannt wird, sind CD4⁺αβ⁺-T-Zellen somit die Effektoren der immunvermittelten Resistenz in einer Primärinfektion. Die Produktion des Zytokins in der Sekundärinfektion ist noch unerforscht, da IFN-γ eine nur unbedeutende Rolle in der Abwehr der Belastungsinfektion spielt, wie Depletionsexperimente zeigten (Rose et al. 1989). Die in der vorliegenden Arbeit erhöhten Zytokinwerte im Caecum aller drei Versuchstiergruppen können nicht hauptsächlich den transferierten Zellen zugesprochen werden, da in der PBS-Kontrollgruppe ebenfalls erhöhte Werte gemessen wurden, diese Tiere aber keine Zellen erhielten. Demnach sind andere Zell- Populationen wie z.B. NK-Zellen, DC und Makrophagen, Effektoren der angeborenen Immunantwort, an der Produktion beteiligt, welche durch die sublethale Bestrahlung nicht abgetötet wurden. Obwohl die Depletion von NK-Zellen keinen Einfluss auf die Resistenz von Mäusen vor Sekundärinfektionen mit *E. vermiformis* hat, ist die Aktivität dieser Zell- Population nach Infektion dennoch erhöht (Smith et al. 1994). Resistente BALB/c-Mäuse zeigten die stärkste NK-Zell-Aktivität in den MLN an Tag sieben p.i. Ebenfalls erhöhte NK-Zell-Aktivität konnte in Milz und IEL von Hühnern ab Tag sieben nach *E. acervulina*- Infektion sowie nach Sekundärinfektion mit diesem Parasiten gemessen werden (Lillehoj 1989). Dieser Zeitpunkt erhöhter Aktivität der NK-Zellen könnte auch auf das Transferexperiment dieser Arbeit zutreffen, da hier die Zytokinwerte im Darm von Tag neun p.i. gemessen wurden. Auch in anderen protozoischen Infektionskrankheiten spielt die Bildung von IFN-γ durch NK-Zellen eine bedeutende Rolle (Korbel et al. 2004). So führte die Depletion dieser Zell-Population bei Infektion mit Leishmanien und Trypanosomen zu einer erhöhten Parasitämie, einem schweren Infektionsverlauf mit Todesfällen sowie verminderten IFN-γ-Werten (Rottenberg et al. 1988; Scharton & Scott 1993; Laskay et al. 1993; Laurenti et al. 1999). Deshalb ist eine verstärkte Zytokinproduktion durch NK-Zellen auch im Experiment dieser Arbeit vorstellbar, welche womöglich zu den pathologischen Veränderungen beigetragen hat.

Weitere Zell-Populationen der angeborenen Immunabwehr, wie DC und Makrophagen, tragen ebenfalls zur IFN-γ-Produktion bei. Untersuchungen mit APC-depletierten Mäusen und Infektion mit den intrazellulären Pathogenen *Listeria monocytogenes* und *T. gondii* zeigten eine erhöhte Mortalitätsrate der Rezipienten und eine stark verminderte IFN-γ-Produktion (Suzue et al. 2003). Eine *in vitro*-Stimulation von APC der Milz mit *L. monocytogenes*- Antigen führte zu stark erhöhten IFN-γ-Werten (Ohteki et al. 1999). Die Bildung des Zytokins konnte durch die Applikation von anti-IL-12-Antikörpern vollständig aufgehoben werden.

Dieses Zytokin spielt in der Aktivierung von NK-Zellen, DC und Makrophagen, wie auch IL-18, eine bedeutende Rolle. Die Produktion dieser Zytokine durch DC oder Makrophagen nach Antigenkontakt führte zu weiterer Aktivierung dieser Zell-Populationen und NK-Zellen und verstärkte die Bildung von IFN- γ (Tripp et al. 1993; Munder et al. 1998; Fukao et al. 2000). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die erhöhten Werte an IFN- γ in den Caeca der aktivierten CD8⁺- und CD4⁺-T-Zell-Rezipienten sowie der PBS-Kontrollgruppe in dieser Arbeit womöglich auf die Produktion der DC, NK-Zellen und Makrophagen zurückzuführen sind.

Da die Beurteilung der histologischen Präparate der Versuchsgruppen gravierende Unterschiede in den pathologischen Veränderungen zeigte, muss angenommen werden, dass IFN- γ hier eher eine immunregulatorische als protektive Funktion hatte. Aufgrund der verstärkten pathologischen Veränderungen besonders im Dünndarm der CD4⁺-T-Zell-Empfänger könnte auch eine Beteiligung der transferierten Zellen an der verstärkten Pathologie vermutet werden. So zeigten Transferexperimente mit radioaktiv markierten T-Zellen eine starke Migration der Zellen in den Dünndarm, wobei eine hohe Zellaktivität gemessen werden konnte (Kumar et al. 1985). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Effektor-Gedächtniszellen vornehmlich im nicht-lymphatischen Gewebe zirkulieren oder persistieren, unabhängig vom Antigen und dem Infektionsweg (Masopust et al. 2001). Dabei ist der Homing-Rezeptor $\alpha 4\beta 7$, welcher besonders stark von Gedächtniszellen exprimiert wird und für das Einwandern der Zellen in die Peyerschen Platten verantwortlich ist, von großer Bedeutung (Farstad et al. 1997; Williams & Butcher 1997). *In vivo*-Studien mit naiven CD4⁺-T-Zellen, welchen ein Antigen präsentiert wurde, differenzierten sich zu Gedächtniszellen, zeigten eine verstärkte Produktion von IFN- γ und migrierten zum Infektionsort (Reinhardt et al. 2001). Aufgrund der hohen prozentualen Anzahl der transferierten CD4⁺-T-Zellen aus den mesenterialen Lymphknoten infizierter Tiere und der vermutlich starken Expression des Homing-Rezeptors $\alpha 4\beta 7$ könnte somit eine verstärkte Migration der aktivierten CD4⁺-T-Zellen in dieses Darmkompartiment vermutet werden, wodurch eine Verstärkung der Zytokinproduktion und somit der pathologischen Veränderungen angenommen werden kann.

Ein weiteres Zytokin, welches eine bedeutende Rolle besonders in der Entwicklung pathologischer Symptome spielt und deshalb im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist TNF- α . Dieses Zytokin wird vorrangig von aktivierten Makrophagen aber auch, neben Endothelzellen und Fibroblasten, von T- und B-Zellen gebildet.

Die TNF- α -Konzentrationen der Organextrakte von Duodenum und Caecum des Transferexperimentes dieser Arbeit waren im Vergleich zu den Gehalten in den Milzen der Rezipienten erhöht. Obwohl keine signifikanten Konzentrationsunterschiede festgestellt werden konnten, zeigte die Empfängergruppe der aktivierten CD4⁺-T-Zellen eine Tendenz zu verstärkter Zytokinproduktion im Caecum. Die einmalige Durchführung des Experimentes mit anschließender Zytokinbestimmung unter Verwendung von Organextrakten lässt keine eindeutigen Schlussfolgerungen über die TNF- α -produzierenden Zell-Populationen und die Wirkung des Zytokins zu. Es kann aber einen Hinweis darauf geben, dass Zellen der angeborenen Immunantwort, wie Makrophagen oder DC, für die Produktion des Zytokins verantwortlich sein könnten.

Daten aus der Literatur belegen, dass die Bindung von TNF- α an Zielzellen protektive aber auch pathologische Folgen in parasitären Infektionen haben kann. So konnte eine Beteiligung des Zytokins an der Entwicklung intestinaler pathologischer Veränderungen und früher Mortalität empfänglicher Mäuse bei *T. gondii*-Infektion festgestellt werden. Eine Behandlung mit anti-TNF- α -Antikörpern verhinderte die Entwicklung von Nekrosen im Dünndarm dieser Mäuse (Liesenfeld et al. 1999). Eine Neutralisation des Zytokins *in vivo* führte dagegen bei chronischer toxoplasmatischer Enzephalitis durch Reaktivierung von latenter Infektion zu gesteigerter Lethalität (Gazzinelli et al. 1993). Die Funktion des Zytokins bei Infektion mit Eimerien ist noch weitgehend unklar. *In vitro*-Untersuchungen der Stimulation dendritischer Zellen mit löslichem *E. tenella*-Oozysten-Extrakt zeigten eine starke TNF- α -Produktion (Rosenberg et al. 2005). Byrnes et al. (1993) untersuchten die TNF- α -Produktion isolierter Makrophagen von infizierten Hühnern. Dabei konnte ein biphasisches Muster der gesteigerten Produktion des Zytokins assoziiert mit der Pathogenese der Erkrankung und der Entwicklung einer protektiven Immunität beobachtet werden. Ferner könnte die synergistische Wirkung von TNF- α und IFN- γ für die pathologischen Veränderungen in Dünn- und Dickdarm verantwortlich sein, vor allem durch die Induktion der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthese (Drapier et al. 1988). NO ist als starker immunologischer Mediator bei vielen parasitären Infektionen involviert und erfordert eine strenge Regulation, um ungewollten pathologischen Effekten entgegenzuwirken (Brunet 2001). Durch die Wirkung von NO wird die Permeabilität der Darmmukosa erhöht, Bakterien können einwandern und Enterozyten durch längere NO-Exposition zerstört werden (Xu et al. 2002). Neben der Zerstörung des Dickdarmepithels durch die parasitären Vermehrungsphasen könnte dieser Mediator an den starken Entzündungszeichen im Caecum und Colon sowie Dünndarm der Zell-Empfänger in dieser Arbeit beteiligt gewesen sein. Im Gegensatz dazu wurden TNF- α und NO aber hauptsächlich

protektive Effekte bei Infektionen mit Protozoen zugesprochen (Johnson 1992; Leitch & He 1999; Lacroix et al. 2001). Aufgrund der großen Unterschiede in der Ausprägung histopathologischer Veränderungen, aber der nicht signifikanten Konzentrationsunterschiede von TNF- α in den Organen, kann diesem Zytokin keine eindeutige Beteiligung an der starken Pathologie zugesprochen werden. Zur genauen Analyse der möglichen pathologischen oder protektiven Wirkung von TNF- α in der Sekundärinfektion mit *E. falciformis* sollten die Zytokinkonzentrationen im Darm an verschiedenen Tagen der Patenz untersucht bzw. durch *in vivo*-Depletion die Funktion des Zytokins überprüft werden.

Die Untersuchung der Gehalte an Interleukin-6 (IL-6) in den Organextrakten der Empfänger aktivierter CD8⁺/CD4⁺-T-Zellen sowie der PBS-Kontrolle zeigten nur im Caecum, verglichen mit den Zytokinkonzentrationen in Duodenum und Milz, erhöhte Werte. Die Unterschiede der Konzentrationen in den Caeca der untersuchten Gruppen waren aber nicht signifikant. IL-6 wird von einer Vielzahl von Zelltypen gebildet wie Makrophagen, dendritische Zellen, T- und B-Lymphozyten sowie Epithelzellen. Das Zytokin wird initial bei Infektion produziert und hat über die Induktion der Akute-Phase-Reaktion (APR) und darauffolgender Fieberentwicklung sowie der Aktivierung der T- und B-Zell-Differenzierung eine starke immunstimulatorische Wirkung (Van Snick 1990; Thomson 1994).

Im Experiment dieser Arbeit konnte eine verstärkte Produktion von IL-6 im Caecum der aktivierten CD8⁺-T-Zell-Empfänger beobachtet werden, was die Vermutung zulässt, dass dieses Zytokin womöglich an der Induktion einer schützenden Immunantwort gegen *E. falciformis* beteiligt ist, da die Empfänger dieser Zellen eine starke Reduktion in den Oozystenausscheidungen aufwiesen. Diese Vermutung wurde durch *in vitro*-Stimulation isolierter MLNC mit IL-6 gestützt, da hierbei eine verstärkte Differenzierung zytolytischer T-Zell-Vorläufer festgestellt werden konnte, wodurch auf eine Beteiligung des Zytokins an der polyklonalen T-Zell-Aktivierung geschlossen werden kann (Uyttenhove et al. 1988; Renauld et al. 1989).

IL-6 ist ein multifunktionelles Zytokin der Immunantwort und bei vielen intestinalen Infektionen viraler, bakterieller und parasitärer Herkunft beteiligt (Kopf et al. 1994; Gao & Pereira 2002; Cho & Chae 2003). Die Bedeutung von IL-6 bei Infektion mit Eimerien ist noch weitgehend unklar. Eine Infektion von genetisch resistenten BALB/c-Mäusen mit dem verwandten Parasiten *E. vermiformis* führte zu signifikanter Produktion von IL-6, wohingegen keine Zytokinproduktion bei empfänglichen C57BL/6-Mäusen gemessen werden konnte (Lynagh et al. 2000). Dies deutet eine genetische Disposition für die verstärkte Produktion von

IL-6 in Zusammenhang mit der Ausbildung einer schützenden Immunantwort an. Defiziente Mäuse zeigten bei *E. vermiformis*-Infektion eine signifikant erhöhte Oozystenausscheidung in der Primärinfektion, wohingegen kein Einfluss des Zytokins auf die Ausbildung einer stabilen Immunität bei Sekundärinfektion festgestellt werden konnte (Smith & Hayday 2000b). Die Funktion des Zytokins in der Sekundärinfektion mit *E. falciformis* ist dagegen ungeklärt.

Im Experiment dieser Arbeit könnte der Transfer aktivierter CD8⁺-T-Zellen zu der erhöhten IL-6-Produktion im Caecum der Rezipienten beigetragen haben. Da die aktivierten Zellen bei Antigenkontakt vermutlich mit einer starken Ausschüttung inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und TNF- α reagierten, konnten diese Mediatoren wiederum eine verstärkte IL-6-Produktion induzieren, wie *in vitro*-Experimente zeigten (Van Damme et al. 1987; Shalaby et al. 1989). Diese Hypothese könnte ebenfalls die geringeren IL-6-Konzentrationen in der CD4⁺-T-Zell-Empfänger- sowie der PBS-Kontrollgruppe erklären. Der PBS-Kontrollgruppe fehlte zudem durch die vorausgegangene Bestrahlung von 400 rad auf das Antigen reagierende Lymphozyten im Darm, wodurch IL-6 hier vermutlich hauptsächlich von Makrophagen und Epithelzellen produziert wurde.

Neuere Untersuchungen der Wirkung des Zytokins zeigten, dass IL-6 im weiteren Verlauf der Infektion aber dazu beiträgt, in einem IL-4-abhängigen Prozess eine Th2-Immunantwort zu fördern und gleichzeitig die Th1-Immunantwort zu hemmen (Diehl & Rincón 2002). Demnach könnte IL-6 im späteren Verlauf der Infektion mit Eimerien eine regulatorische Funktion übernehmen und pathologischen Effekten von Th1-Zytokinen entgegenwirken, was mit den geringeren pathologischen Veränderungen im Darm der CD8⁺-T-Zell-Rezipienten korrelieren würde. Eine Überprüfung dieser Hypothese könnte durch Untersuchung der Zytokinwerte im Darm an verschiedenen Tagen nach Infektion durchgeführt werden, um damit den Einfluss von IL-6 auf die Ausbildung einer schützenden Immunantwort gegen Eimerien bzw. dessen mögliche regulatorische Funktion zu untersuchen.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die Pathologie der Eimerien-Infektion auf einem Zusammenspiel der Invasion des Parasiten in die Epithelzellen des Darmes und seiner Vermehrungsphasen und der Wirkung der von Effektorzellen gebildeten Zytokine beruht. Die Ergebnisse des letzten Transferexperimentes in dieser Arbeit können aber keine eindeutigen Hinweise auf die pathologischen bzw. auch möglichen protektiven Wirkungen der hier untersuchten Zytokine geben. Für genauere Analysen der Zytokin-produzierenden Zell- Populationen könnten im Weiteren Infektionsexperimente mit defizienten Mäusen durchgeführt werden. Außerdem sollten weitere, in die Immunantwort involvierte Zytokine

wie IL-1, IL-12, IL-18 untersucht und deren Einfluss bei Infektion mit *E. falciformis* überprüft werden.

5.5. Einfluss von CTLA-4 in der Primär- und Sekundärinfektion mit *E. falciformis*

Zur Aktivierung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten bedarf es neben der Antigenpräsentation durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) auf den APC und dem T-Zell-Rezeptor mit den Korezeptoren CD4 oder CD8 noch weiterer kostimulatorischer Signale, um eine Proliferation der Zellen zu induzieren. Dieses zweite Signal für die T-Zell-Aktivierung wird durch die Bindung von B7-Molekülen (CD80/CD86) auf der Oberfläche der APC mit CD28 auf der Oberfläche der T-Zellen geliefert. Ein zweiter Rezeptor für die B7-Liganden ist CTLA-4 (CD152), welcher nach der T-Zell-Aktivierung durch die CD28-B7-Ligation auf der T-Zell-Oberfläche exprimiert wird (Greenfield et al. 1998). Neuere Studien zeigten, dass dieser Rezeptor durch Inhibition der T-Zell-Proliferation die Immunantwort supprimiert (Krummel et al. 1996). Dafür wird die Bildung des Wachstumsfaktors IL-2 gehemmt, der Zellzyklus durch Blockierung der benötigten G1-Kinasen unterbrochen und durch die Ausschüttung des Zytokins TGF- β die T-Zell-Proliferation begrenzt (Chen et al. 1998; Brunner et al. 1999; Greenwald et al. 2002).

Um die Funktion des CTLA-4-Rezeptors in der Ausbildung einer Immunantwort bei *E. falciformis*-Infektion zu untersuchen, wurden im Rahmen dieser Arbeit weibliche BALB/c-Mäuse mit Antikörpern gegen diesen Rezeptor behandelt und nachfolgend mit 100 Oozysten von *E. falciformis* infiziert. Dabei sollte die Wirkung der Antikörper-vermittelten Blockierung des Rezeptors bei Induktion einer Primärantwort gegen den Parasiten sowie der Ausbildung von Gedächtniszellen untersucht werden. Der Vergleich der Ausscheidungsraten der CTLA-4- sowie der Kontroll-Antikörper-Empfänger in der Primärinfektion zeigte in zwei Experimenten keine Beeinflussung der Immunantwort durch die verabreichten Antikörper. Die im Verhältnis zur Infektionskontrolle verminderten Oozystenausscheidungen der Antikörper-Empfängergruppen lassen sich vermutlich durch eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch die Injektion der Antikörper erklären. So könnte vermutet werden, dass die mehrfach verabreichten anti-CTLA-4- sowie Kontroll-Antikörper durch APC zur Aktivierung naiver T-Zellen und somit zu schnellerer Reaktion des Immunsystems auf die parasitäre Infektion führten. Die Ausscheidungsraten an Oozysten während der Sekundärinfektion waren in beiden Experimenten unterschiedlich. Im ersten Experiment

konnte eine signifikante Reduktion der Oozysten im Kot der Kontroll-Antikörper-Empfänger im Vergleich zu der anti-CTLA-4-Antikörper-behandelten Gruppe festgestellt werden. Dies könnte auf eine verminderte Gedächtniszellbildung durch die Antikörperbehandlung in der Primärinfektion hindeuten. Jedoch waren diese signifikanten Unterschiede in den Ausscheidungen der Versuchstiergruppen im zweiten Experiment nicht mehr zu verzeichnen. Demnach kann nicht eindeutig von einer Beeinflussung der Immunitätsausbildung bei *E. falciformis*-Infektion durch die Blockierung des CTLA-4-Rezeptors auf den T-Zellen ausgegangen werden.

Die Expression des CTLA-4-Rezeptors erfolgt sowohl auf CD4⁺- als auch auf CD8⁺-T-Zellen (Linsley et al. 1992) 48 Stunden nach der T-Zell-Aktivierung (Walunas et al. 1994). Nach weiteren 24 Stunden ist der Ausgangszustand der Zelle ohne CTLA-4-Rezeptoren auf der Oberfläche wieder eingetreten (Krummel & Allison 1995). Somit könnte vermutet werden, dass durch die Antikörperbehandlung an Tag -1 und am Tag der Infektion keine CTLA-4-Rezeptoren blockiert werden konnten, sondern vermutlich, wie schon erwähnt, über APC eine unspezifische Immunantwort induziert wurde. Die weiteren Antikörperbehandlungen führten sodann womöglich nicht zu einer vollständigen Abdeckung der Rezeptoren und da der CTLA-4-Rezeptor eine 10-20fach höhere Affinität zu B7-Molekülen aufweist als CD28 (Linsley et al. 1994), wurde somit eine überschießende Immunantwort in der Primärinfektion verhindert. Es wird angenommen, dass die Ligation des Rezeptors eine Immunantwort durch Apoptose der Lymphozyten stoppt und damit eine überschießende Reaktion des Immunsystems auf das Antigen verhindert (Tivol et al. 1995; Gribben et al. 1995). Die immunregulatorische Funktion des Rezeptors wurde eingehend in Untersuchungen mit CTLA-4-defizienten Mäusen belegt. Diese Tiere entwickelten, ohne regulatorische Wirkung des Rezeptors, lymphoproliferative Krankheiten mit lymphozytärer Infiltration in viele Organe und Gewebeerstörung, welche nach drei bis vier Lebenswochen zum Tode führten (Waterhouse et al. 1995; Tivol et al. 1995). Die Blockade des CTLA-4-Rezeptors durch anti-CTLA-4-Antikörper führte bei Infektion mit den parasitischen Protozoen *Leishmania donovani* und *T. cruzi* zu erhöhter Resistenz in der Primärinfektion (Murphy et al. 1998; Martins et al. 2004), was für die Infektion mit *E. falciformis* aufgrund der vergleichbaren Ausscheidungsraten der Antikörper-Empfängergruppen nicht bestätigt werden konnte. Die Rolle des Rezeptors in der späten T-Zell-Differenzierung, d.h. bei der Bildung und Reaktivierung von Gedächtnis-T-Lymphozyten, ist noch weitgehend unerforscht. Die *in vitro*-Stimulation von T-Lymphozyten *T. cruzi*-infizierter Mäuse zeigte keine Unterschiede in der Proliferation sowie der Zytokinproduktion bei Zugabe von anti-CTLA-4-Antikörpern (Graefe et al. 2004), weshalb eine normale

Entwicklung der Effektorzellen mit anschließender Bildung von Gedächtniszellen vermutet werden könnte. Die vergleichbar starke Reduktion in den Oozystenausscheidungen der mit anti-CTLA-4- sowie Kontroll-Antikörpern behandelten Mäuse in der Sekundärinfektion mit *E. falciformis* bestätigen diese Annahme. Somit scheint der CTLA-4-Rezeptor in der Ausbildung von Gedächtniszellen vermutlich keine bedeutende Rolle zu spielen. Dagegen wiesen Infektionsexperimente mit CD28-defizienten Mäusen und *T. gondii* darauf hin, dass dieser Korezeptor für die Entwicklung oder Erhaltung der Gedächtnis-T-Zell-Antwort erforderlich ist (Villegas et al. 1999). Dabei hat vermutlich die Stimulation der IL-2-Produktion oder auch die verstärkte Expression von anti-apoptotisch wirksamen Membranproteinen der Mitochondrien durch den CD28-Rezeptor eine Bedeutung für die Proliferation bzw. Erhaltung langlebiger Gedächtniszellen (Boise et al. 1995). Für eine genauere Analyse der Funktion des CTLA-4-Rezeptors in der Ausbildung von Gedächtniszellen bei protozoischer Infektion bedarf es dagegen noch weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Blockierung des Korezeptors CTLA-4 auf T-Zellen mittels intravenös verabreichter Antikörper zu keiner Beeinflussung der Immunantwort in der Primärinfektion mit *E. falciformis* führte. Aufgrund des moderaten Infektionsverlaufes und der vergleichbaren Oozystenausscheidungen der mit anti-CTLA-4-Antikörpern sowie mit Kontroll-Antikörpern behandelten Mäuse lässt sich eine überschießende Proliferation von T-Lymphozyten ausschließen. Die divergierenden Ausscheidungszahlen der Antikörper-Empfängergruppen während der Sekundärinfektion lassen ebenfalls keine eindeutige Aussage über den Einfluss des CTLA-4-Rezeptors auf die Gedächtniszellbildung zu. Möglicherweise könnten in weiteren Experimenten mit verbesserter Behandlungsstrategie im Zeitraum der Expression des CTLA-4-Rezeptors und paralleler Untersuchung des Einflusses des CD28-Rezeptors bedeutende Hinweise auf die Funktion dieser kostimulatorischen Rezeptoren bei der Abwehr einer *E. falciformis*-Infektion gefunden werden.

5.6. Ausblick

Der Transfer von MLNC infizierter Mäuse in naive Rezipienten führte zu einer signifikanten Reduktion in der Oozystenproduktion nach Belastungsinfektion mit *E. falciformis*. Durch Separierung von T-Zell-Populationen konnten CD8⁺-T-Lymphozyten als Schutz-vermittelnde Zell-Population identifiziert werden. Die genauen Mechanismen der Ausbildung einer schützenden Immunantwort sind aber noch ungeklärt. Deshalb sollte die protektive Wirkung

dieser Zell-Population in weiteren Studien näher untersucht werden. Beispielsweise könnte eine *in vitro*-Stimulation separierter CD8⁺-T-Zellen mit parasitischem Antigen und nachfolgendem Transfer in naive Empfängertiere Aufschluss über die Spezifität und Schutzwirkung der stimulierten Zellen bringen. Ferner könnte die Fraktionierung des *E. falciformis*-SpAg mittels FPLC-Anlage (*fast performance liquid chromatography*) zu parasitenspezifischen T-Zellklonen führen, welche sich bei Transfer als protektiv herausstellen könnten. Auf diesem Wege könnten Antigene des Parasiten identifiziert werden, welche die Entwicklung einer schützenden Immunantwort induzieren und für die Vakzineherstellung gegen diesen intestinalen Parasiten von großer Bedeutung sind.

Die aufgrund der starken Immunpathologie bei Transfer der CD8⁺-T-Zell-depletierten Zellsuspension untersuchten Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-6 führten zu keinen eindeutigen Schlussfolgerungen auf die Funktion dieser Zytokine bei *E. falciformis*-Infektion. Deshalb sollte der Einfluss dieser Immunmodulatoren in der Ausbildung einer schützenden Immunantwort bzw. Immunpathologie in weiteren Experimenten näher überprüft werden. In diese Untersuchungen sollten auch weitere, für die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen wichtige Zytokine wie IL-1, IL-2 und IL-12 mit eingeschlossen werden. In diesem Zusammenhang sollten die Zytokin-produzierenden Zell-Populationen identifiziert werden, um einen umfassenden Einblick in die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort gegen Eimerien zu bekommen.

Aufgrund der Komplexität der Immunantwort gegen den intestinalen Parasiten *Eimeria* ist die Entwicklung einer Vakzine sehr erschwert. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über die Mechanismen der Immunitätsausbildung müssen zukünftig in weiteren Experimenten auf das Huhn übertragen werden, um zur Vakzineentwicklung gegen die wirtschaftlich bedeutenden hochpathogenen *Eimeria*-Arten des Huhnes beitragen zu können. Sodann könnten Bekämpfungsstrategien entwickelt werden, welche auf einer zellulär vermittelten Immunität basieren.