

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Identifizierung von Effektorzellen der Immunantwort bei *E. falciformis*-Infektion**

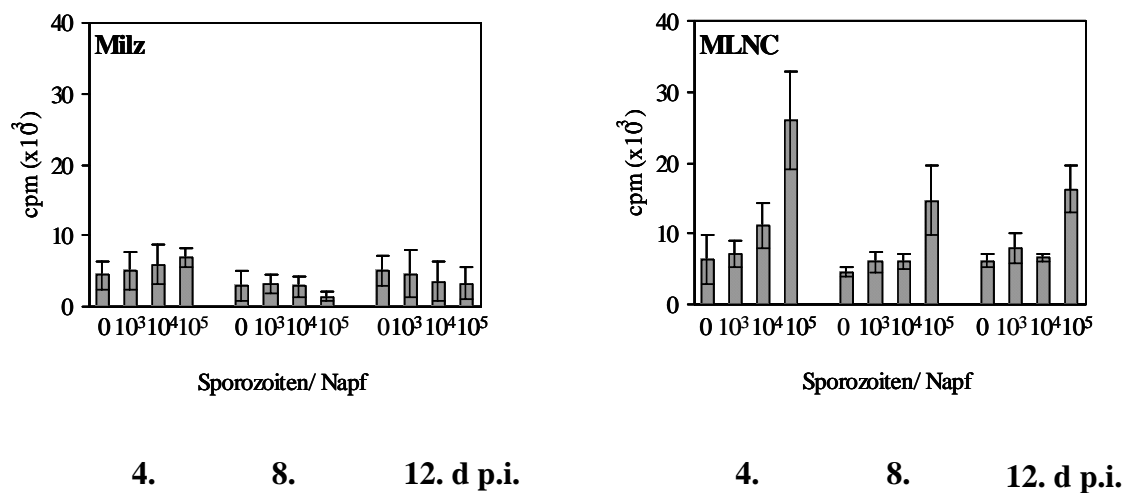
Eine Infektion mit Eimerien führt zur Ausbildung einer stabilen Immunität vor Nachfolgeinfektionen. Daten aus der Literatur belegen, dass vor allem die zelluläre Immunantwort für die Kontrolle von Eimerien-Infektionen verantwortlich ist (Wakelin & Rose 1990; Lillehoj & Trout 1994). Um die Abwehrmechanismen bei Infektion mit diesen obligat intrazellulär lebenden Parasiten näher zu charakterisieren, wurde die lokale Immunantwort des Darmes und der beteiligten Gewebe bei *E. falciformis*-Infektion untersucht.

Um die zelluläre Immunantwort *E. falciformis*-infizierter Mäuse zu untersuchen, wurden Zellen der mesenterialen Lymphknoten (MLN) sowie der Milz aus infizierten und nicht-infizierten (naiven) Tieren isoliert und unter Stimulation mit *E. falciformis*-Sporozoiten-Gesamtantigen (SpAg) im Lymphozyten-Transformationstest eingesetzt. Hierbei wurden dem lokalen Immunsystem, dargestellt durch die mesenterialen Lymphknotenzellen (MLNC), isolierte Milzzellen als Vergleichsorgan der systemischen Immunantwort im Experiment gegenübergestellt.

#### **4.1.1. Untersuchung der zellulären darmassoziierten Immunantwort von *E. falciformis*-infizierten Mäusen**

Um die parasitenspezifische T-Zell-Reaktivität der Lymphozyten *E. falciformis*-infizierter Mäuse zu untersuchen, wurden 8-12 Wochen alte, weibliche BALB/c-Mäuse mit 1000 Oozysten pro Tier infiziert. Um zu untersuchen, an welchem Tag nach der Infektion die stärkste Proliferation der T-Zellen auftrat, wurden Gruppen infizierter Tiere am vierten, achten und zwölften Tag post infectionem (p.i.) getötet, Milzen und MLN entnommen und deren Zellen als Einzelzellsuspension im Lymphozyten-Transformationstest eingesetzt. Die Kontrolle der allgemeinen Reaktivität der T-Zell-Populationen wurde durch Stimulation der Zellen mit dem T-Zell-spezifischen Mitogen Concanavalin A (Con A) überprüft. Dabei zeigten beide Zell-Populationen bei Zugabe von 5 µg/ml eine im Vergleich zur Mediumkontrolle

signifikant erhöhte Proliferationsrate ( $p=0,029$ ). Daraus konnte eine starke proliferative Aktivität der Zellen abgeleitet werden (Daten nicht gezeigt). Um nun eine spezifische Reaktivität der isolierten Zellen aus Milz und MLN nachzuweisen, wurde eine Stimulation mit *E. falciformis*-SpAg durchgeführt (Abb. 4).



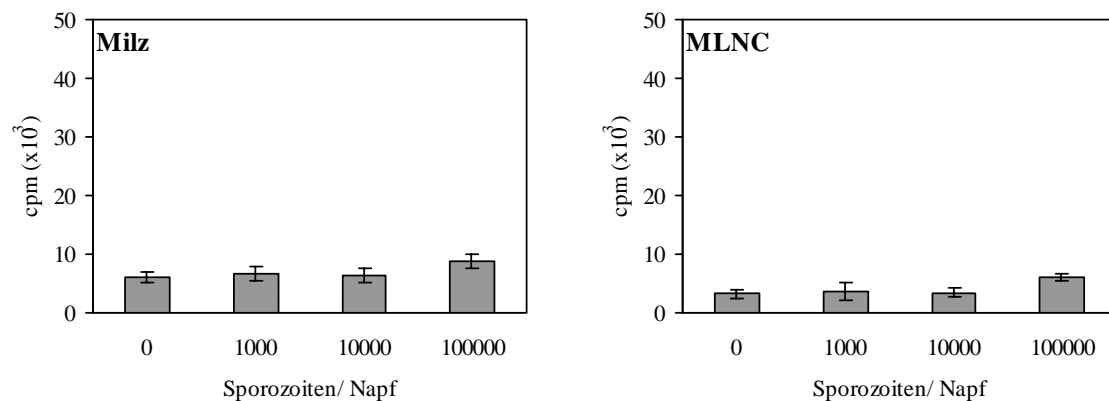
**Abb. 4: Proliferationsraten von Milzzellen und mesenterialen Lymphknotenzellen infizierter BALB/c-Mäuse unter Zugabe verschiedener Antigenmengen.**

Die Einzelzellen jedes Tieres pro Gruppe ( $n=4$ ) wurden am Tag 4, 8 und 12 p.i. isoliert und unter Stimulation mit *Eimeria falciformis*-SpAg im Lymphozyten-Transformationstest eingesetzt. Pro Napf der Flachbodenmikrotiterplatte wurden  $3 \times 10^5$  Zellen pro Tier kultiviert. Jede Probe wurde in Dreifachbestimmung untersucht.

Die Stimulation mit unterschiedlichen Antigenmengen führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der Proliferation der Milzzellen. Demnach zeigte diese Zell-Population keine spezifische Reaktivität auf *E. falciformis*-Antigen. Dagegen zeigten die MLNC bei Stimulation mit  $10^5$  Sporozoiten pro Napf der Kulturplatte im Vergleich zur Mediumkontrolle an Tag vier nach Infektion eine signifikant erhöhte Proliferation ( $p=0,014$ ), ebenso an Tag acht ( $p=0,018$ ) und Tag zwölf ( $p=0,001$ ). Bei Vergleich der stärksten Proliferationsraten der Zellen nach Zugabe von  $10^5$  Sporozoiten konnten keine signifikanten Unterschiede der untersuchten Tage nach Infektion festgestellt werden.

Die erhöhten Proliferationsraten der MLNC bei Zugabe von  $10^5$  Sporozoiten pro Napf der Kulturplatte wurden in einem Wiederholungsexperiment bestätigt. Auch in dieser Untersuchung konnte ein signifikanter Unterschied bei Vergleich der stärksten Proliferationsraten mit den Mediumkontrollen für Tag vier p.i. ( $p=0,029$ ) sowie Tag acht ( $p=0,029$ ) und Tag zwölf p.i. ( $p=0,047$ ) gemessen werden. Diese Untersuchungen zeigen deutlich die spezifische lokale Reaktivität von Lymphozyten der MLN auf die Stimulation mit *E. falciformis*-SpAg. Daraus könnte vermutet werden, dass MLNC Effektoren der lokalen darmassoziierten Immunantwort sind und somit an der Abwehr von Eimerien-Infektionen beteiligt sein können.

Um die proliferative Antwort naiver MLNC und Milzzellen zu untersuchen, wurden den isolierten Einzelzellsuspensionen neben einer Mediumkontrolle  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  Sporozoiten pro Napf der Mikrotiterplatte zugegeben. Der Vergleich der Proliferationsraten der beiden Zell-Populationen zeigte keine Unterschiede in der proliferativen Reaktivität der Zellen (Abb. 5).

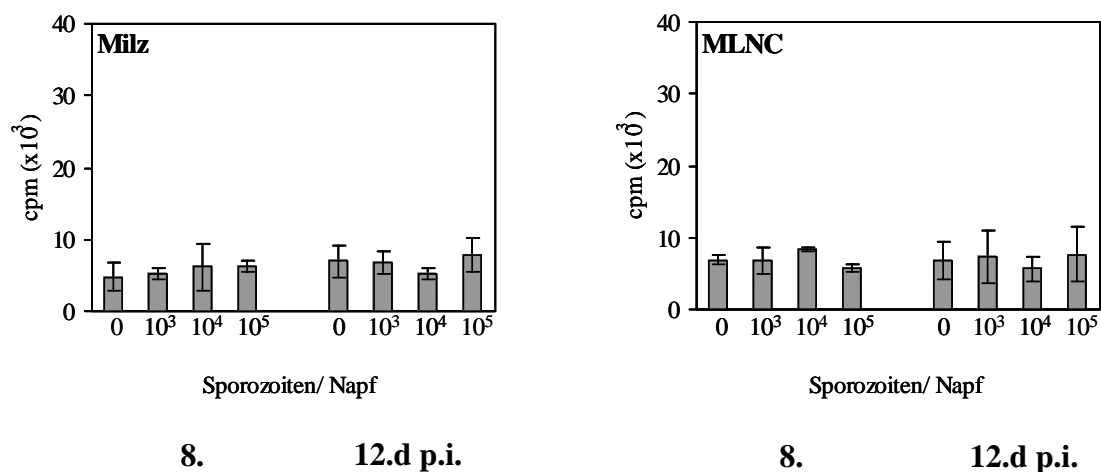


**Abb. 5: Vergleich der Proliferationsraten naiver Milzzellen und mesenterialer Lymphknotenzellen nach Stimulation mit *Eimeria falciformis*-Antigen.**

Pro Napf der Flachbodenplatte wurden  $3 \times 10^5$  Zellen kultiviert. Die Daten zeigen Mittelwerte der Zellproliferation aus Dreifachbestimmungen einzeln untersuchter Tiere ( $n=5$ ), Standardabweichungen sind angegeben.

Da keine spezifische Reaktion der T-Zell-Populationen naiver Spendertiere gegen *E. falciformis*-SpAg bestimmbar war und eine spezifische Proliferation der MLNC erst nach Infektion der Rezipienten zu beobachten ist, lässt sich vermuten, dass T-Lymphozyten der MLN an der Ausbildung einer adaptiven Immunantwort gegen *E. falciformis* beteiligt sind.

Um die spezifische Reaktivität der MLNC infizierter Mäuse auf *E. falciformis*-SpAg zu bekräftigen, wurden isolierte Einzelzellen infizierter BALB/c-Mäuse mit *Eimeria tenella*-SpAg des Huhnes im Lymphozyten-Transformationstest stimuliert. Dabei zeigten die Proliferationsraten der murinen T-Lymphozyten bei Stimulation mit unterschiedlichen Mengen an *E. tenella*-Antigen keine signifikanten Unterschiede, was auf das Vorhandensein artspezifischer Antigene hinweist (Abb. 6).

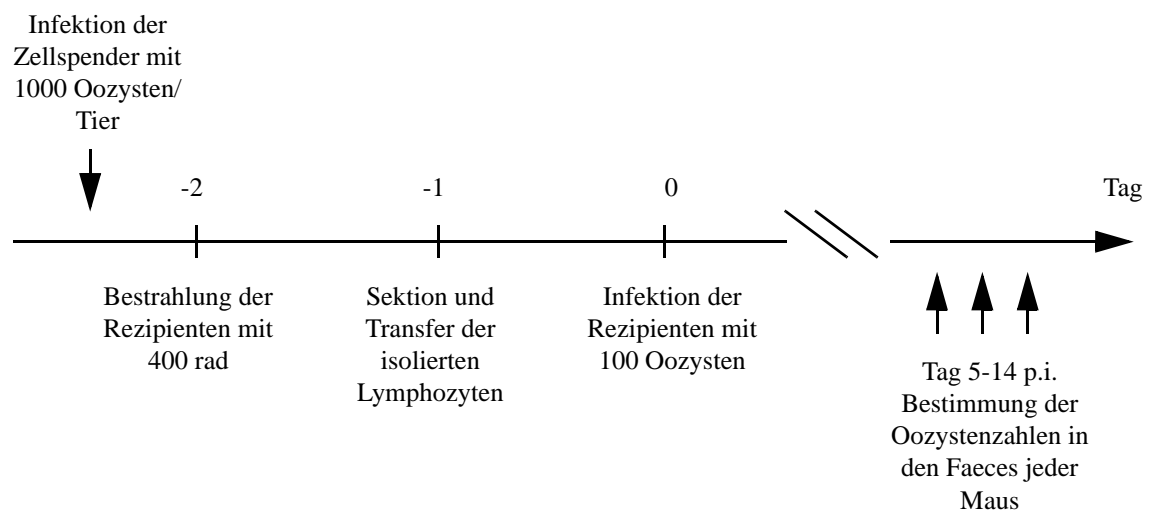


**Abb. 6: Vergleich der Proliferationsraten von Milzzellen und mesenterialen Lymphknotenzellen infizierter Mäuse nach Stimulation mit *Eimeria tenella*-Antigen.**

Die Zellen wurden an Tag 8 und 12 p.i. isoliert und neben einer Mediumkontrolle mit  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  *E. tenella*-Sporozoiten stimuliert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte der Proliferation aus Dreifachbestimmungen individuell untersuchter Tiere ( $n=4$ /Gruppe). Standardabweichungen sind angegeben.

#### 4.2. Identifizierung schützender Effektorzellen bei *E. falciformis*-Infektion

Wie die Ergebnisse der Lymphozyten-Transformationstests zeigten, reagierten MLNC infizierter Mäuse spezifisch auf eine Stimulation mit *E. falciformis*-SpAg. Um die Funktion dieser möglichen Effektorzellen *in vivo* zu untersuchen, wurden MLNC infizierter sowie nicht infizierter BALB/c-Mäuse isoliert und intravenös in naive Rezipienten injiziert. Zuvor wurden diese Empfängertiere mit einer sublethalen Bestrahlungsdosis von 400 rad (4 Gy) bestrahlt. Am Tag nach dem Transfer erhielten die Rezipienten eine Infektion mit 100 Oozysten von *E. falciformis* (Abb. 7).

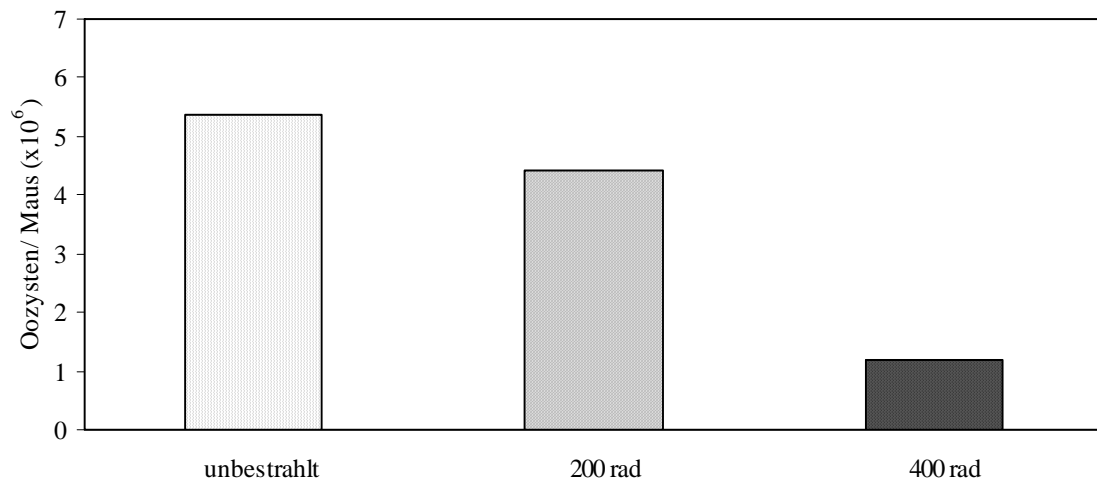


**Abb. 7: Zeitlicher Ablauf eines Transferexperimentes.**

8-10 Wochen alte Spendertiere wurden mit 1000 Oozysten von *Eimeria falciformis* infiziert. Einen Tag nach Bestrahlung der Rezipienten wurden die mesenterialen Lymphknotenzellen der Donoren isoliert und  $5 \times 10^7$  Zellen pro Empfänger intravenös injiziert. Am Tag 0 erfolgte die Belastungsinfektion mit 100 Oozysten pro Maus. Von Tag fünf bis 14 p.i. wurden die Oozystenzahlen in den Faeces jedes Tieres bestimmt. Dieses Verfahren wurde auch bei Transfer naiver mesenterialer Lymphknotenzellen angewendet.

#### **4.2.1. Untersuchung des Einflusses sublethaler Bestrahlung auf die Etablierung und Schutzwirkung transferierter MLNC**

Eine sublethale Bestrahlung führt zur Abtötung lymphoider Zellen im Körper von Versuchstieren, wodurch die Untersuchung der Funktion transferierter Lymphozyten vereinfacht wird. Um den Einfluss der sublethalen Bestrahlung der Rezipienten vor dem T-Zell-Transfer auf die Etablierung der MLNC im Darm zu untersuchen, wurde eine Gruppe naiver BALB/c-Mäuse mit 400 rad, eine Gruppe mit 200 rad und eine Gruppe von Rezipienten nicht bestrahlt. Einen Tag danach erfolgte der Transfer von MLNC, isoliert von infizierten Spendern an Tag 10 p.i. Dieser Tag nach Infektion für die Isolierung der Zellen wurde gewählt, da die Proliferationsraten der Zellen verschiedener Tage p.i. im Lymphozyten-Transformationstest keine signifikanten Unterschiede aufwiesen und Daten aus der Literatur zeigten, dass Zellen dieses Tages p.i. protektive Eigenschaften besaßen (Rose et al. 1988a). Die Tiere erhielten entweder  $5 \times 10^7$  MLNC intravenös oder  $1 \times 10^8$  MLNC intraperitoneal. Nach der Infektion mit 100 Oozysten pro Tier wurde der Kot der in Zweiergruppen gehaltenen Rezipienten täglich gesammelt und die Oozystenzahlen bestimmt. Der Vergleich der Gesamtoozystenausscheidungen pro Maus in jeder Gruppe zeigte deutlich eine stark verminderte Ausscheidung in der Gruppe, welche mit 400 rad bestrahlt wurde (Abb. 8).



**Abb. 8: Einfluss unterschiedlicher Bestrahlungsdosen vor adoptivem Transfer aktivierter mesenterialer Lymphknotenzellen und *Eimeria falciformis*-Infektion.**

Gesamtoozystenausscheidungen von unbestrahlten ( $n=4$ ) sowie mit 200 rad ( $n=4$ ) und 400 rad ( $n=3$ ) bestrahlten, weiblichen BALB/c-Mäusen nach *E. falciformis*-Infektion. Den Tieren wurden entweder  $5 \times 10^7$  MLNC intravenös oder  $1 \times 10^8$  MLNC intraperitoneal transferiert (isoliert an Tag 10 p.i.) und nachfolgend mit 100 Oozysten infiziert. Die Ausscheidungsraten der in 2er Gruppen gehaltenen Tiere wurden täglich bestimmt.

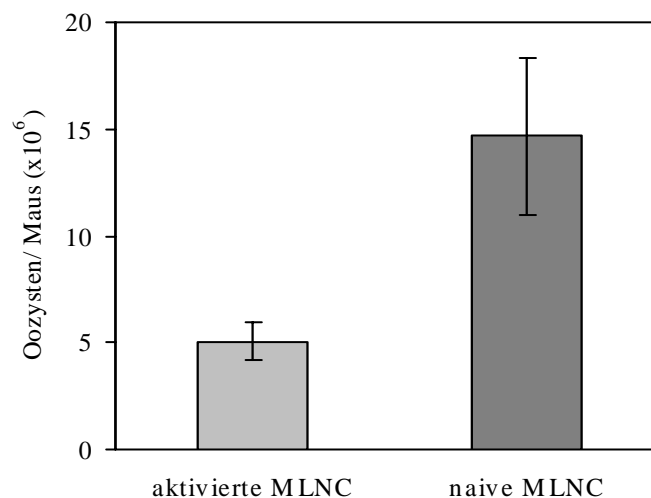
Die starke Reduktion der Oozystenausscheidungen in der mit 400 rad bestrahlten Gruppe zeigte, dass sich die transferierten Zellen bei dieser Bestrahlungsdosis am besten im Darm etablieren und die Parasitenreplikation verhindern konnten. Die Tiere dieser Gruppe zeigten im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen mit geringerer Bestrahlungsdosis bzw. ohne Bestrahlung keine verstärkten klinischen Symptome. Daraufhin wurde die Bestrahlungsdosis von 400 rad in weiteren Transferexperimenten verwendet.

#### **4.2.2. Untersuchung der Schutzwirkung transferierter MLNC, isoliert an Tag vier und zehn p.i.**

Wie im ersten Transferexperiment gezeigt, führte der Transfer von MLNC *E. falciformis*-infizierter BALB/c-Mäuse (im weiteren Text als aktivierte MLNC bezeichnet) zu einer stark

verminderten Ausscheidung von Oozysten. Nun sollte die Wirkung aktivierter MLNC im Vergleich zu naiven Zellen *in vivo* untersucht werden. Da die Proliferationsraten der Zellen im Lymphozyten-Transformationstest keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, wurde die Effektorwirkung von MLNC, entnommen an Tag vier sowie an Tag zehn nach Infektion, untersucht. Hierbei sollte überprüft werden, ob und wann sich im Verlauf einer Infektion mit Eimerien protektive Zell-Populationen entwickeln, welche bei Belastungsinfektion zu einer schützenden Immunantwort beitragen.

Abbildung 9 zeigt die Gesamtoozystenausscheidungen der Rezipienten aktivierter sowie naiver MLNC, isoliert an Tag vier p.i. Jedem Tier wurden einen Tag nach sublethaler Bestrahlung mit 400 rad  $5 \times 10^7$  Zellen intravenös injiziert. Einen Tag später wurden die Mäuse mit 100 Oozysten infiziert. Von Tag fünf bis 14 p.i. wurden täglich die Oozystenzahlen im Kot jedes Tieres bestimmt. Hierbei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Oozysten in den Faeces um ca. 65% in der Gruppe, welche MLNC infizierter Spender erhielt.

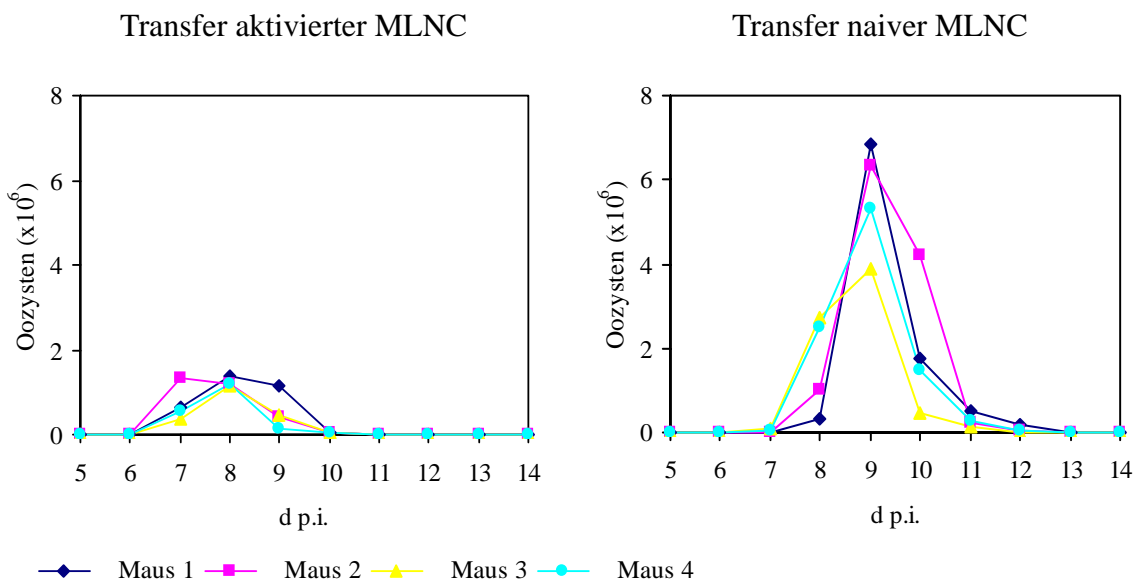


**Abb. 9:** Gesamtoozystenausscheidungen von BALB/c-Mäusen nach Transfer aktivierter mesenterialer Lymphknotenzellen (d 4 p.i.) sowie naiver MLNC und Infektion mit *Eimeria falciformis*.

Dargestellt sind die Gesamtoozystenausscheidungen weiblicher BALB/c-Mäuse nach intravenösem Transfer aktivierter MLNC, isoliert an Tag vier p.i. (n=4) sowie naiver MLNC (n=3) als Kontrolle und nachfolgender Belastungsinfektion mit 100 Oozysten pro Maus. Standardabweichungen sind angegeben. Die Ausscheidungsraten der Rezipienten aktivierter MLNC waren gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert ( $p=0,004$ ).



Hinweise aus der Literatur zeigten, dass sich die Differenzierung von Gedächtniszellen für die effektive Abwehr einer Infektion langsam bzw. erst spät in der Patenz einstellt (Kaech et al. 2002; Martin & Tarleton 2004). Deshalb sollten nun MLNC, isoliert zu einem späteren Zeitpunkt im Infektionsverlauf, auf ihre Wirkung bei Transfer in naive Tiere untersucht werden. Bezogen auf die nicht signifikanten Unterschiede der Proliferation von MLNC im Lymphozyten-Transformationstest und der gleichmäßig hohen Proliferationsraten der MLNC zwischen den Tagen acht und zwölf p.i. wurden für ein weiteres Transferexperiment nun Zellen von Tag zehn p.i. verwendet. Hierbei konnte eine starke Reduktion der Oozysten in den Faeces in der Gruppe festgestellt werden, welche MLNC infizierter Spender erhielt. Abbildung 10 zeigt den Infektionsverlauf mit täglich bestimmter Oozystenausscheidung jedes Tieres in der Patenz.

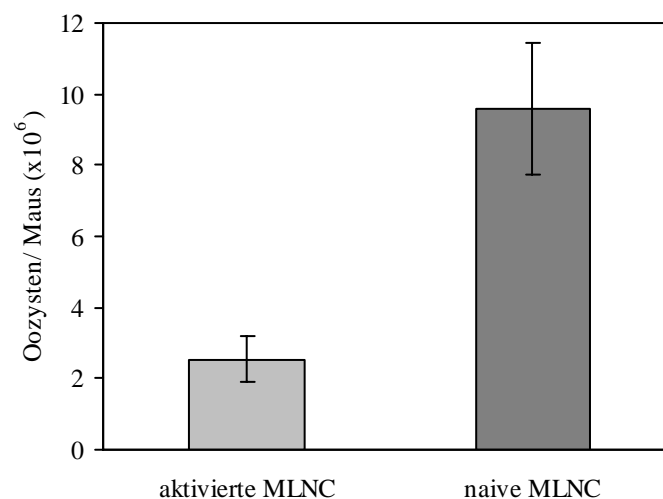


**Abb. 10: Infektionsverlauf weiblicher BALB/c-Mäuse nach Transfer aktivierter mesenterialer Lymphknotenzellen (d 10 p.i.) bzw. naiver MLNC und *Eimeria falciformis*-Infektion.**

Jedem Tier wurden  $5 \times 10^7$  MLNC intravenös injiziert (d -1) und nachfolgend mit 100 Oozysten infiziert (d 0). Die Bestimmung der Oozystenanzahlen in den Faeces jeder Maus erfolgte von Tag fünf bis 14 p.i.

Bei Vergleich der Infektionsverläufe beider Gruppen ist offensichtlich, dass die Empfänger aktivierter Zellen signifikant weniger Oozysten in der Patenz ausschieden als die

Kontrollgruppe, denen naive Zellen transferiert wurden. Der Tag der höchsten Oozystenausscheidungen in der Gruppe der Rezipienten aktivierter MLNC war Tag acht p.i., wohingegen bei der Empfängergruppe naiver MLNC erst an Tag neun p.i. die höchsten Ausscheidungszahlen an Oozysten im Kot bestimmbar waren. Diese Verschiebung der höchsten Ausscheidungsdaten zeigt, dass die Parasitenreplikation in der Empfängergruppe aktivierter MLNC schon während der Schizogoniestadien verhindert wurde, was einer starken Vermehrung der sich im Verlauf der Infektion entwickelnden Oozysten entgegenwirkte. Der signifikante Unterschied in der Oozystenausscheidung zeigte sich ebenfalls in der Gesamtoozystenproduktion der Tiere jeder Gruppe (Abb. 11).



**Abb. 11: Gesamtoozystenausscheidung weiblicher BALB/c-Mäuse nach Transfer aktivierter respektive naiver mesenterialer Lymphknotenzellen.**

Die Daten zeigen Mittelwerte der Gesamtoozystenausscheidungen separat untersuchter Tiere (n=4/Gruppe), Standardabweichungen sind angegeben. Die Ausscheidungsraten an Oozysten differierten signifikant ( $p \leq 0,001$ ).

Die Reduktion der Oozysten im Kot der Empfänger aktivierter MLNC, verglichen mit den Ausscheidungen der Rezipienten naiver MLNC, betrug 74%. Ein weiteres Transferexperiment mit MLNC vom zehnten Tag p.i. führte ebenfalls zu einer starken Reduktion der Oozystenausscheidungen von 74% in der Empfängergruppe aktivierter MLNC. Tabelle 2 zeigt

eine Übersicht der durchgeführten Transferexperimente mit erhaltenen Reduktionen in den Oozystenausscheidungen.

**Tab. 2: Übersicht der Gesamtoozystenausscheidungen nach Transfer aktivierter mesenterialer Lymphknotenzellen sowie naiver MLNC und nachfolgender Infektion mit *Eimeria falciformis*.**

Die Tabelle zeigt Mittelwerte der Gesamtoozystenausscheidungen der Rezipienten aktivierter MLNC, entnommen an Tag 4 bzw. 10 p.i., und naiver MLNC nach *E. falciformis*-Infektion. Angabe der Reduktion an Oozysten im Kot in Prozent.

Experiment	Oozystenausscheidungen		Reduktion (%)
	Empfänger aktivierter MLNC	Empfänger naiver MLNC	
<b>I</b> (MLNC von d 4 p.i.)	$5,1 \times 10^6 \pm 9,1 \times 10^5$	$14,7 \times 10^6 \pm 3,7 \times 10^6$	65
<b>II</b> (MLNC von d 10 p.i.)	$2,5 \times 10^6 \pm 6,4 \times 10^5$	$9,6 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$	74
<b>III</b> (MLNC von d 10 p.i.)	$1,6 \times 10^6 \pm 5,3 \times 10^5$	$6,2 \times 10^6 \pm 7,1 \times 10^4$	74

Somit konnte im *E. falciformis*-System nachgewiesen werden, dass durch Transfer aktivierter MLNC eine Schutzwirkung bei Belastungsinfektion übertragbar ist. Dabei zeigte ein Transfer von MLNC, isoliert an Tag vier p.i., eine protektive Wirkung durch Reduktion der Oozystenausscheidungen der Rezipienten um ca. 65%. Weitere zwei Transferexperimente mit MLNC, entnommen an Tag zehn p.i., führten zu einer Reduktion der Oozysten in den Faeces von 74%. Aufgrund der Verstärkung der erzielten Schutzrate bei Transfer aktivierter MLNC vom zehnten Tag p.i. könnte vermutet werden, dass eine größere Anzahl an MLNC nach längerem Antigenkontakt bei Transfer in naive Mäuse und nachfolgender Infektion mit *E. falciformis* protektiv wirksam sind.

### **4.3. Transferexperimente mit separierten T-Zell-Subklassen und Überprüfung der Schutzwirkung bei Infektion mit *E. falciformis***

Wie in dieser Arbeit schon gezeigt wurde, können mesenteriale Lymphknotenzellen infizierter Spender bei Transfer in naive Rezipienten und nachfolgender Belastungsinfektion einen Immunschutz vermitteln.

Nun sollte die Frage geklärt werden, welche Zell-Population der MLNC für diesen Immunschutz verantwortlich ist. Deshalb wurden aus den MLNC infizierter sowie naiver Spender CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten separiert, um deren Wirkung nach Transfer in naive Empfängertiere und Infektion mit *E. falciformis* zu untersuchen. In einem weiteren Transferexperiment wurde neben den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten die Wirkung separierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bei Infektion mit diesem Parasiten überprüft.

#### **4.3.1. Analyse der Zellzusammensetzung der MLN mittels FACS**

Aufbauend auf die vorangegangenen Experimente wurden MLNC vom zehnten Tag p.i. verwendet, welche mittels eines magnetischen Zellsortierungssystems (MACS) in eine CD8<sup>+</sup>- und eine CD8<sup>-</sup>-Fraktion separiert wurden. Aus dieser CD8<sup>-</sup>-Fraktion wurde in einem weiteren Experiment die CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population isoliert. Um die Reinheit der separierten T-Zell-Populationen und die prozentualen Anteile aller Zell-Populationen überprüfen zu können, wurden Proben jeder Zell-Fraktion durch eine FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorter*) untersucht.

##### **4.3.1.1. FACS-Analyse isolierter aktivierter sowie naiver MLNC**

Um die Anteile der Zell-Populationen im gesamten Lymphknoten zu bestimmen, wurde zuerst die gesamte Einzelzellsuspension der MLN im FACS analysiert. Dazu wurden Aliquots mit Antikörpern, gekoppelt an Fluoreszenzmoleküle, gegen Oberflächenantigene der CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, B- und dendritischen Zellen versetzt. Tabelle 3 zeigt die prozentualen Anteile der untersuchten Zell-Populationen von zwei Experimenten im FACS. Dabei zeigten sich keine Unterschiede in den Anteilen der CD8<sup>+</sup>-T-Zell- sowie der dendritischen Zell-Fraktion in naiven und infizierten Tieren. Der Anteil an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen naiver Tiere betrug 57 bzw. 60%,

welcher nach Infektion auf ca. 44% abfiel. Der B-Zell-Anteil naiver Tiere reichte von 25 bzw. 34% und zeigte einen deutlichen Anstieg nach Infektion auf 42 bzw. 48%.

**Tab. 3: FACS-Analyse der Gesamtzellsuspension aktivierter und naiver MLNC.**

Bestimmung der prozentualen Anteile verschiedener Zell-Populationen unter Zugabe von CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, dendritische- und B-Zell-Oberflächenmarkern in zwei Experimenten, wobei Pools von Zellen von 16 infizierten bzw. 31 naiven Spendertieren untersucht wurden. Pro Färbungsansatz wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen eingesetzt.

<i>Exp. I</i>	<b>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>dendritische Zellen</b>	<b>B-Zellen</b>
aktiviert	6,6%	43,6%	0,6%	48%
naiv	5%	60%	0,5%	34%

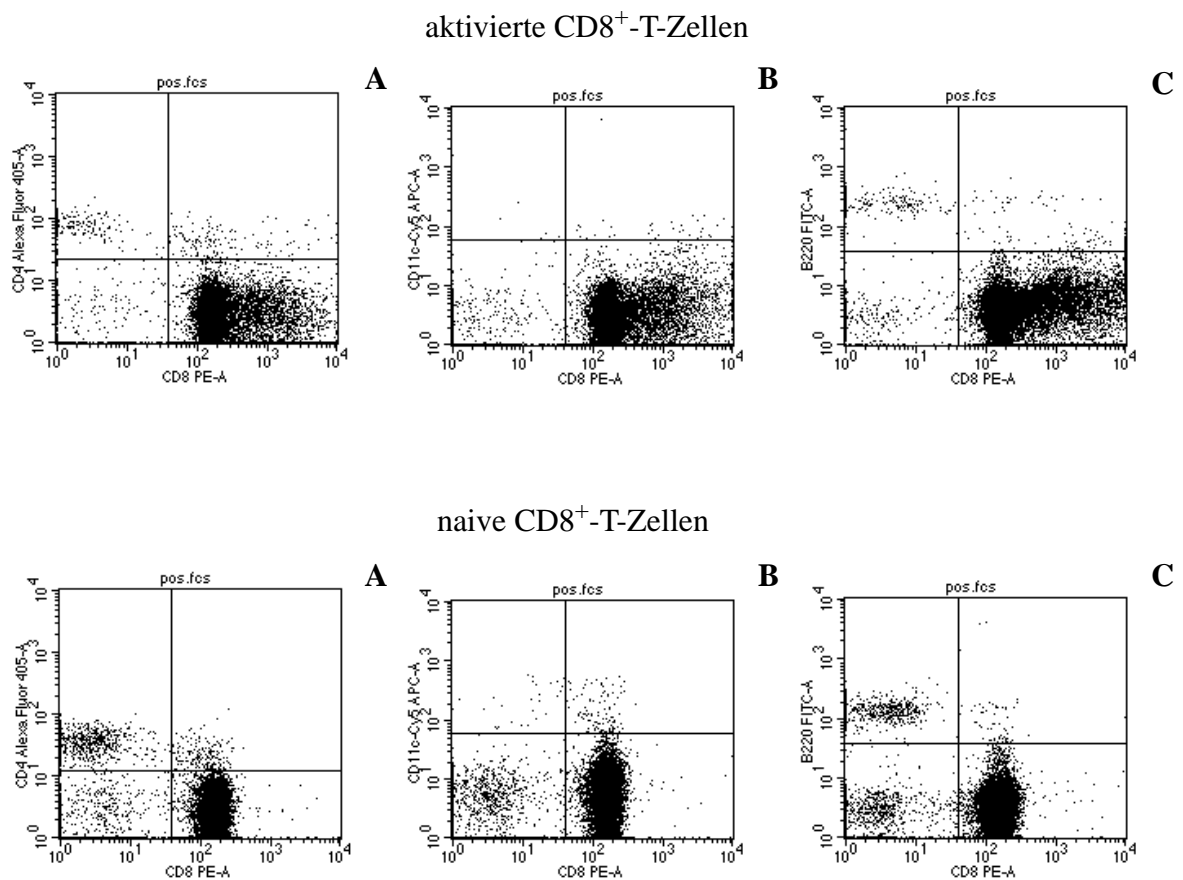
<i>Exp. II</i>	<b>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>dendritische Zellen</b>	<b>B-Zellen</b>
aktiviert	12%	43,5%	0,2%	42%
naiv	13%	57%	0,6%	25%

Im zweiten Experiment wurde neben CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, B- und dendritischen Zellen auch der Anteil an natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) in den mesenterialen Lymphknoten bestimmt. Dabei enthielt die Gesamtzellsuspension der aktivierten Zellen 0,5% und die der naiven Zellen 0,7% NK-Zellen.

Die prozentualen Anteile der Zell-Populationen zeigten keine Veränderung der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-, dendritischen Zell- sowie NK-Zell-Population nach Infektion. Dagegen war ein Anstieg in der B-Zell-Population nach Infektion und ein Abfall der Zellzahl in der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population in beiden Experimenten zu verzeichnen.

### 4.3.1.2. Untersuchung der Homogenität separierter Zell-Populationen mittels FACS

Nach der positiven Selektion der CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten mit Hilfe von Miltenyi MACS MicroBeads wurden nun die positive sowie die negative Fraktion der Zellsuspensionen im FACS untersucht. Abbildung 12 und 13 zeigen beispielhaft Ergebnisse der FACS-Analysen in graphischer Darstellung.



**Abb. 12: FACS-Dot-Plots der separierten aktivierten und naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population.**

Dargestellt ist die mittels magnetisch wirkender CD8a-MicroBeads positiv selektionierte CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population im unteren rechten Quadranten jedes Plots gegen eine weitere Zell-Population der mesenterialen Lymphknoten im oberen linken Quadranten.

Gegenfärbung: **A** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, **B** dendritische Zellen, **C** B-Zellen

Abbildung 12 zeigt die Zusammensetzung der positiv selektionierten aktivierten und naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellsuspensionen. Im rechten unteren Quadranten der Dot-Plots sind jeweils die

Anteile der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dargestellt. Jeder Dot (Punkt) bedeutet dabei ein gemessenes Ereignis bzw. Zelle. Im Vergleich zu den CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten sind jeweils im linken oberen Quadranten der Plots die Anteile der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, dendritischen Zellen und B-Zellen dargestellt. Der linke untere Quadrant zeigt doppelt negative Zellen, also Zellen, die nicht von CD8-PE-Antikörpern und dem jeweiligen anderen Zell-Oberflächenantikörper des einzelnen Plots markiert sind. Der rechte obere Quadrant zeigt dagegen doppelt positive Zellen, welche Antigene von zwei Zelltypen exprimieren und von beiden verwendeten Antikörpern markiert wurden. In Tabelle 4 wurden die prozentualen Anteile der in der separierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellsuspension vorhandenen Zell-Populationen dargestellt.

**Tab. 4: Untersuchung der Reinheit separierter CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Populationen aktivierter und naiver mesenterialer Lymphknotenzellen.**

Dargestellt sind die in der FACS-Analyse bestimmten prozentualen Anteile der aufgelisteten Zell-Populationen in der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Fraktion.

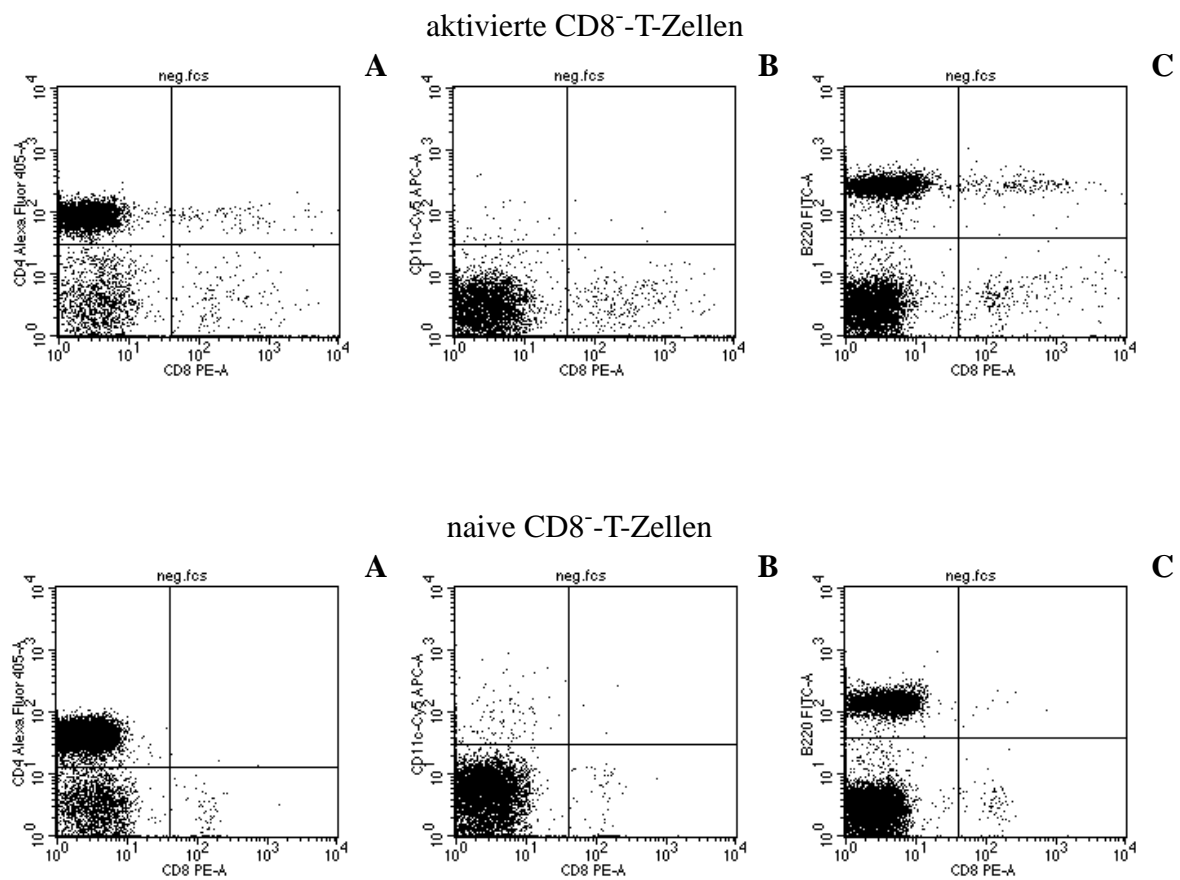
<i>Exp. I</i>	<b>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>dendritische Zellen</b>	<b>B-Zellen</b>
aktiviert	98%	0,4%	0,05%	0,63%
naiv	99%	0,3%	0,02%	0,24%

<i>Exp. II</i>	<b>CD8<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	<b>dendritische Zellen</b>	<b>B-Zellen</b>
aktiviert	96%	1,2%	0,03%	1,6%
naiv	90%	4,7%	0,15%	3,9%

Aufgrund der relativ hohen Anteile an CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie B-Zellen in der naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population im zweiten Experiment wurde eine weitere positive Selektion durchgeführt. Nach diesem zweiten Separationsschritt betrug die Reinheit der naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellsuspension 98%. Allgemein wurden Zellsuspensionen mit einer Reinheit von 96-99% für den Transfer verwendet.

Als Kontroll-Population sollte in diesen Experimenten die CD8<sup>+</sup>-T-Zellsuspension in naive Empfängertiere transferiert werden. Um die Zell-Zusammensetzung zu untersuchen, wurde diese Zellsuspension im FACS analysiert. Wiederum wurden Aliquots der Zellsuspension mit Antikörpern gegen spezielle Oberflächenantigene der CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-, B- und dendritischen Zellen inkubiert und ausgewertet. Die x-Achse der Plots zeigt den Anteil an aktivierten und naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Vergleich zu den auf der y-Achse dargestellten Zell-Populationen (Abb. 13).



**Abb. 13: FACS-Dot-Plots der im Durchfluss enthaltenen aktivierten und naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen.**

Dargestellt sind die nach magnetischer Separierung im Durchfluss verbliebenen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im unteren rechten Quadranten gegen eine unmarkierte Zell-Population aus der Gesamtzellsuspension der mesenterialen Lymphknoten im linken oberen Quadranten.

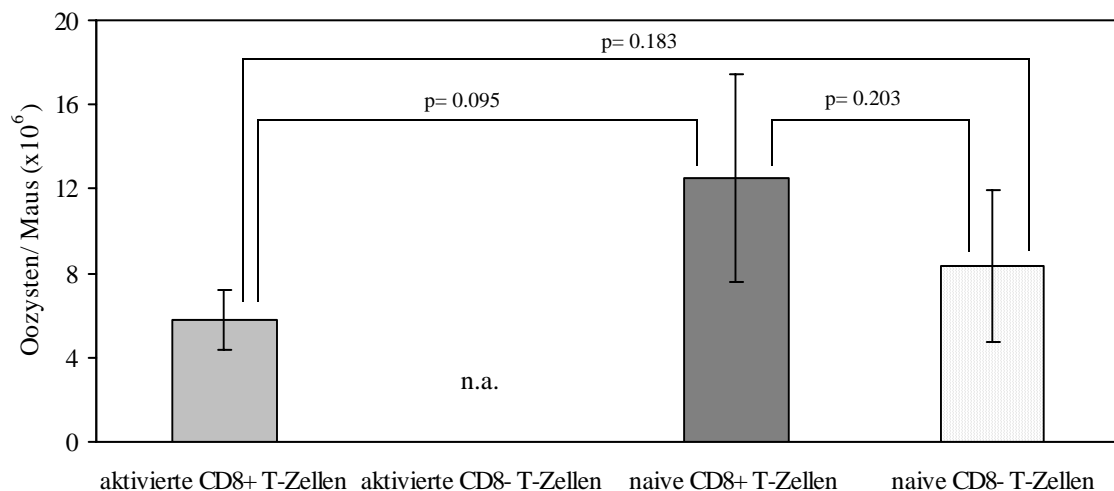
Gegenfärbung: **A** CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, **B** dendritische Zellen, **C** B-Zellen



Den prozentual größten Anteil dieser CD8<sup>-</sup>-T-Zellsuspension stellte die CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population dar. Dabei reichten die Zell-Gehalte von 57% in naiven bis ca. 50% in infizierten Tieren (Ergebnisse aus zwei Experimenten). Der B-Zell-Anteil machte in naiven Tieren ca. 31% und in infizierten Tieren ca. 39% aus. Die Anteile der dendritischen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen lagen zwischen 0,4 und 2,7% und stellten damit die kleinsten Zell-Populationen dieser CD8<sup>-</sup>-T-Zellsuspension dar.

#### 4.3.2. Transferexperiment mit aktivierten und naiven CD8<sup>+</sup>-/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen

Nachfolgend wurden diese separierten aktivierten sowie naiven CD8<sup>+</sup>-/CD8<sup>-</sup>-T-Zell-Populationen naiven Rezipienten intravenös injiziert und durch eine Belastungsinfektion mit 100 Oozysten von *E. falciformis* deren Schutzwirkung überprüft (Abb. 14).

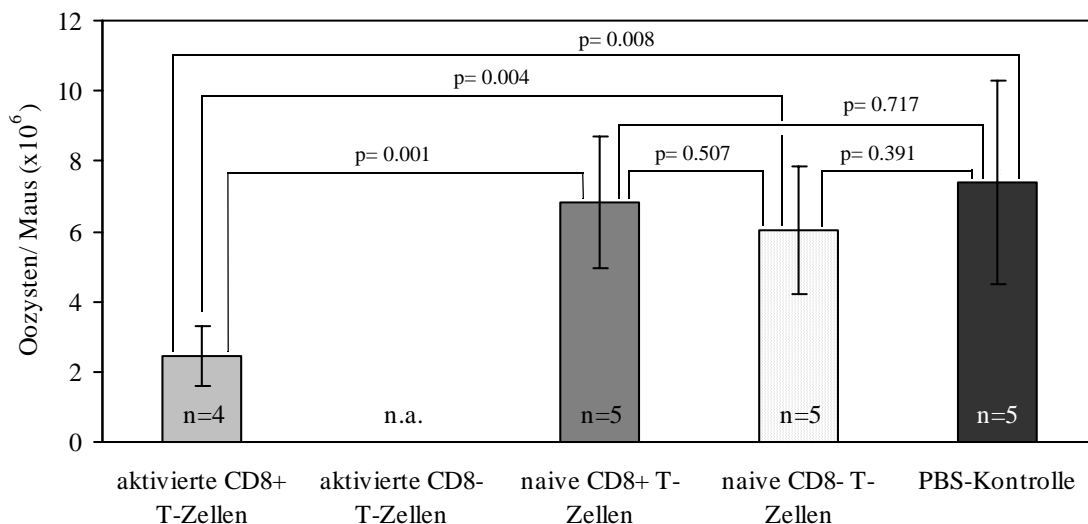


**Abb. 14: Oozystenausscheidungen von BALB/c-Mäusen nach Transfer separierter CD8<sup>+</sup>- sowie CD8<sup>-</sup>-T-Zellen und nachfolgender Infektion mit *Eimeria falciformis*.**

Gesamtoozystenausscheidungen weiblicher BALB/c-Mäuse (n=5/Gruppe) nach Übertragung aktivierter sowie naiver CD8<sup>+</sup>-/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte individuell untersuchter Tiere jeder Gruppe, Standardabweichungen sind angegeben.

n.a. = nicht auswertbar (100% Mortalität der Empfänger aktivierter CD8<sup>-</sup>-T-Zellen)

Die Rezipienten aktivierter  $CD8^+$ -T-Zellen zeigten bei Vergleich mit der Empfängergruppe der naiven  $CD8^+$ -T-Zellen eine starke Reduktion in den Oozystenausscheidungen. Die Unterschiede in den Ausscheidungsraten waren jedoch statistisch nicht signifikant. In der Gruppe der Empfänger aktivierter  $CD8^-$ -T-Lymphozyten verstarben alle Mäuse im Verlauf der Infektion. Die Tiere zeigten starke pathologische Symptome wie Diarrhoe, Dehydratation, Bewegungsunlust und Apathie. Bei makroskopischer Beurteilung des Darmes nach Sektion der Rezipienten waren besonders im Dünndarm starke Entzündungszeichen zu erkennen. Aufgrund dieser hohen Mortalitätsrate der Empfängergruppe aktivierter  $CD8^-$ -T-Zellen wurde das Experiment unter Zufügung einer PBS-Kontrollgruppe wiederholt (Abb. 15).



**Abb. 15: Oozystenausscheidungen von BALB/c-Mäusen nach Transfer separierter  $CD8^+$ -/ $CD8^-$ -T-Zellen bzw. PBS als Kontrolle und Infektion mit *Eimeria falciformis*.**

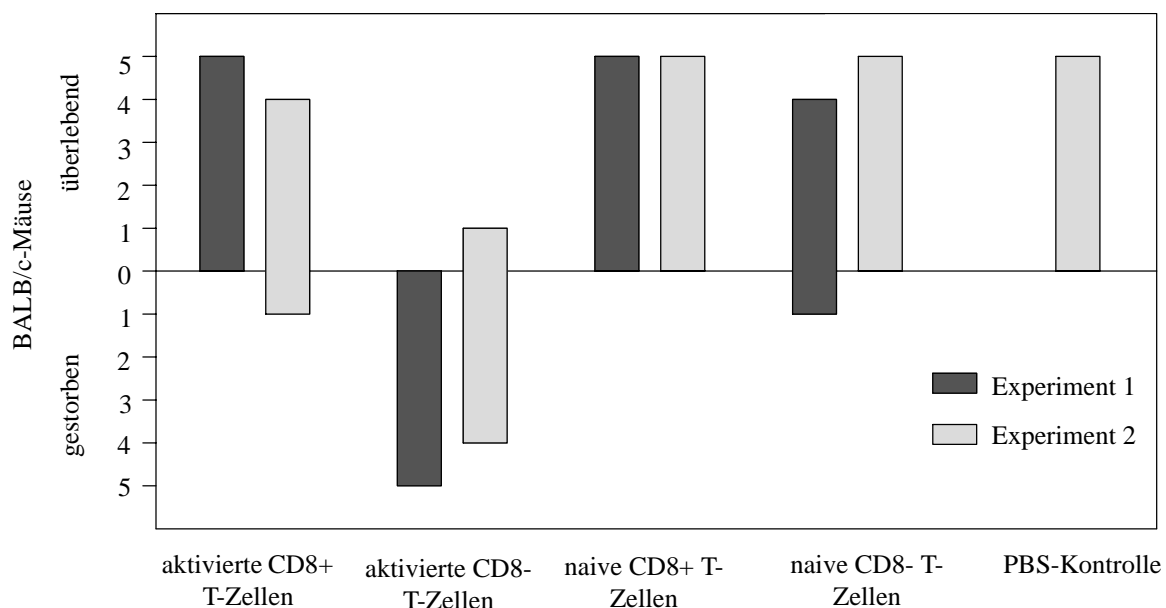
Gesamtoozystenausscheidung weiblicher BALB/c-Mäuse bei Übertragung aktivierter  $CD8^+$ -/ $CD8^-$ -T-Zellen, naiver  $CD8^+$ -/ $CD8^-$ -T-Zellen und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) als Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte der Gesamtoozystenausscheidungen einzeln untersuchter Tiere, die Standardabweichungen sind angegeben.

$p < 0,05$  = statistisch signifikante Differenz in den Ausscheidungen

n.a. = nicht auswertbar (80% Mortalität der Empfänger aktivierter  $CD8^-$ -T-Zellen)

In diesem Experiment bestätigte sich die Verminderung in den Oozystenausscheidungen in der Empfängergruppe der aktivierten  $CD8^+$ -T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) der Oozystenreduktion in den Faeces festgestellt werden. In der Gruppe der CD8<sup>-</sup>-T-Zell-Empfänger starben vier der fünf Rezipienten, weshalb sich die erhöhte Mortalitätsrate dieser Empfängergruppe des ersten Experimentes wiederholte (Abb. 16). Diese erhöhte Mortalität könnte auf immunpathologische Mechanismen zurückzuführen sein, welche in einem weiteren Experiment näher charakterisiert werden sollten.



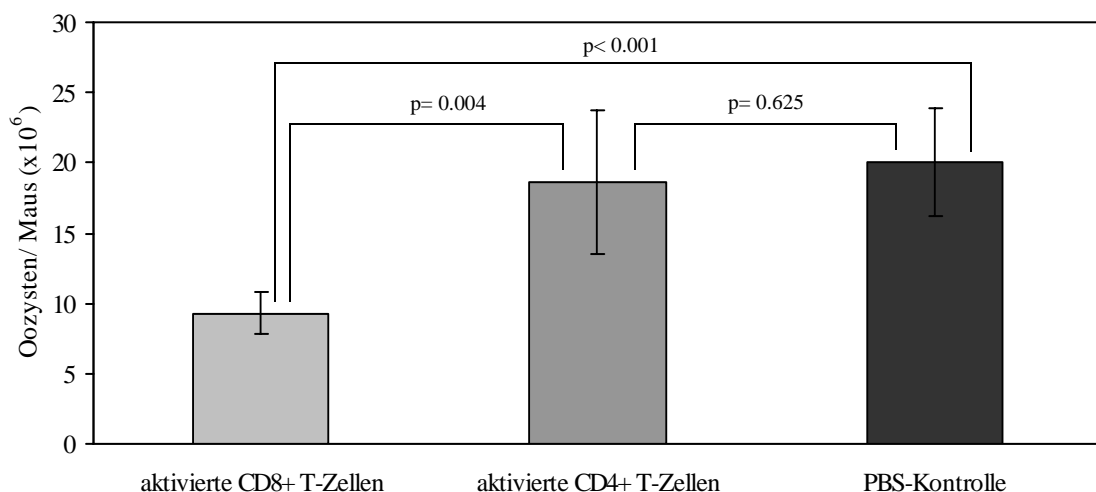
**Abb. 16: Schutz- und Mortalitätsraten von BALB/c-Mäusen nach Transfer separierter CD8<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen bzw. PBS und Infektion mit *Eimeria falciiformis*.**

Dargestellt sind die Anzahlen überlebender und gestorbener BALB/c-Mäuse nach Übertragung aktivierter CD8<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen, naiver CD8<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen und phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) als Kontrolle in zwei Experimenten.

#### 4.3.2.1. Transferexperiment mit separierten aktivierten CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen

Neben der Verminderung der Oozystenanzahl bei Transfer von aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigte sich für die Empfängergruppe aktivierter CD8<sup>-</sup>-T-Zellen eine hohe Mortalitätsrate. Der größte Anteil der CD8<sup>-</sup>-T-Zell-Fraktion besteht aus CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Da CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entzündungsfördernde Eigenschaften haben, sollte nun neben den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Separation dieser Zell-Population, Transfer in naive Rezipienten und nachfolgender

Belastungsinfektion mit *E. falciformis* deren Wirkung untersucht werden. Nach den Separationsschritten mit Hilfe von MicroBeads wurden die Zell-Populationen im FACS auf ihre Reinheit untersucht. Nach der positiven Selektion betrug die Reinheit der aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Fraktion 98% und die der naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen 99%. Aus dem Durchfluss der unmarkierten Zellen wurden sodann die CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten selektioniert. Dabei betrug die Reinheit der aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen 97% und die der naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Fraktion 98%. Diese fraktionierten Zell-Populationen wurden in naive BALB/c-Mäuse transferiert und anschließend erfolgte eine orale Infektion mit 100 Oozysten von *E. falciformis*. Die Oozystenzahlen in den Faeces der individuell gehaltenen Rezipienten wurden von Tag sechs bis 14 p.i. bestimmt. Bei Vergleich der Gesamtoozystenausscheidungen der Mäuse jeder Gruppe zeigten die Empfänger aktivierter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) in den Ausscheidungen (Abb. 17).



**Abb. 17: Gesamtoozystenausscheidung von BALB/c-Mäusen nach Transfer separierter CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.**

Gesamtoozystenausscheidungen weiblicher BALB/c-Mäuse (n=5/Gruppe) bei Übertragung aktivierter CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und PBS als Kontrolle und nachfolgender Infektion mit 100 Oozysten von *E. falciformis*. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ausscheidungen pro Maus und Gruppe. Standardabweichungen sind angegeben.

$p < 0,05$  = statistisch signifikante Differenz in den Ausscheidungen

Diese Transferexperimente zeigten deutlich die protektiven Eigenschaften aktivierter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei Transfer in naive Mäuse und nachfolgender Belastungsinfektion. Eine erhöhte Mortalität, wie bei Transfer aktivierter CD8<sup>-</sup>-T-Zellen, konnte nach Separation und Transfer aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nicht beobachtet werden. Demzufolge ist anzunehmen, dass die erhöhte Sterberate der Versuchstiere in den ersten Experimenten nicht allein den CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten zuzuschreiben ist, sondern eine Beteiligung anderer Zell-Populationen der MLNC an der Verstärkung der pathologischen Symptome wahrscheinlich ist.

Die Gewichtsreduktion ist neben den Oozystenausscheidungen eine weitere wichtige Größe zur Beurteilung des Infektionsverlaufes und einer möglichen schützenden Wirkung transferierter Zellen. Deshalb wurden die Rezipienten, neben der Beurteilung des klinischen Bildes, täglich gewogen. Tabelle 5 zeigt die Gewichtsabnahmen der Empfänger aktivierter CD8<sup>+</sup>-/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie der PBS-Kontrollgruppe des letzten Transferexperimentes. Der Vergleich zwischen dem Tag der Infektion und Tag neun p.i. wurde gewählt, da bis zu diesem Tag die stärksten Gewichtsabnahmen der Tiere zu verzeichnen waren.

**Tab. 5: Gewichtsabnahmen der Rezipienten nach Transfer separierter CD8<sup>+</sup>-/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Infektion mit *Eimeria falciformis*.**

Dargestellt sind die Gewichtsabnahmen der Empfänger (n=5) separierter aktivierter CD8<sup>+</sup>-/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie der PBS-Kontrolle zwischen dem Tag der Infektion und Tag 9 p.i.

Empfängergruppe	Tag 0 p.i.	Tag 9 p.i.	Gewichtsverlust (%)
aktivierte CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen	19,96 ± 1,14	16,09 ± 1,14	19,4
aktivierte CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen	19,14 ± 1,02	15,85 ± 1,47	17,2
PBS-Kontrolle	20,77 ± 1,26	17,70 ± 2,1	15,0

Die Gewichtsverluste der Tiere waren bei Vergleich aller Versuchstiergruppen gleichmäßig. Die Rezipienten aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wiesen im Vergleich zu den aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Empfängern auch keine verstärkten klinischen Symptome auf. Daraus ist zu schließen, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen allein nicht für die hohe Mortalitätsrate in den vorherigen Experimenten verantwortlich sein können.

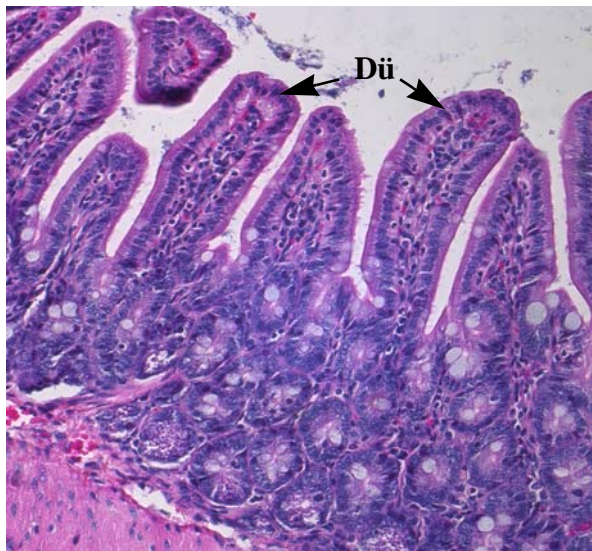
Um den Grund für die starken pathologische Veränderungen bei Transfer aktivierter CD8<sup>-</sup>-T-Zellen festzustellen, wurden histologische Präparate von Dünndarm und Dickdarm der aufgrund des klinischen Bildes getöteten Tiere angefertigt und beurteilt. Beispiele für pathologische Veränderungen im Darm werden im Verlauf der weiteren Experimente bildlich dargestellt. Die histologischen Schnitte zeigten starke Entzündungserscheinungen wie Ödembildung, Zottenabrasion und Austreten von Gewebeflüssigkeit und Blut in das Lumen des Darmes. Dies weist auf eine immunpathologische Wirkung der transferierten Zellen hin, die möglicherweise durch eine Zytokinausschüttung ausgelöst wurde. Zytokine spielen in der Abwehr intrazellulärer Pathogene durch protektive aber auch entzündungsfördernde Eigenschaften eine große Rolle. Besonders dem proinflammatorischen Th1-Zytokin IFN- $\gamma$  kommt in der Kontrolle einer Primärinfektion mit Eimerien eine große Bedeutung zu (Rose et al. 1989; Steinfeld 2002). Dieses Zytokin trägt aber auch zur Entwicklung pathologischer Veränderungen im Darm bei (Liesenfeld et al. 1996). Weitere proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- $\alpha$ , IL-12 und IL-6, können ebenfalls an der Abwehr intrazellulärer Pathogene aber auch an der Verstärkung entzündungsbedingter Veränderungen beteiligt sein (Byrnes et al. 1993; Biron & Gazzinelli 1995; Lynagh et al. 2000).

Für genauere Untersuchungen der möglichen pathologischen Wirkungen der CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Population wurden Proben für histologische Untersuchungen entnommen.

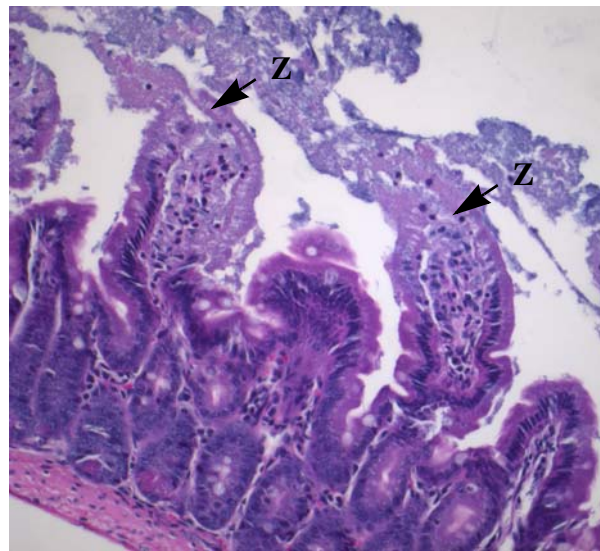
### 4.3.3. Histologische Untersuchung von Dünn- und Dickdarm nach Transfer separierter T-Zellen

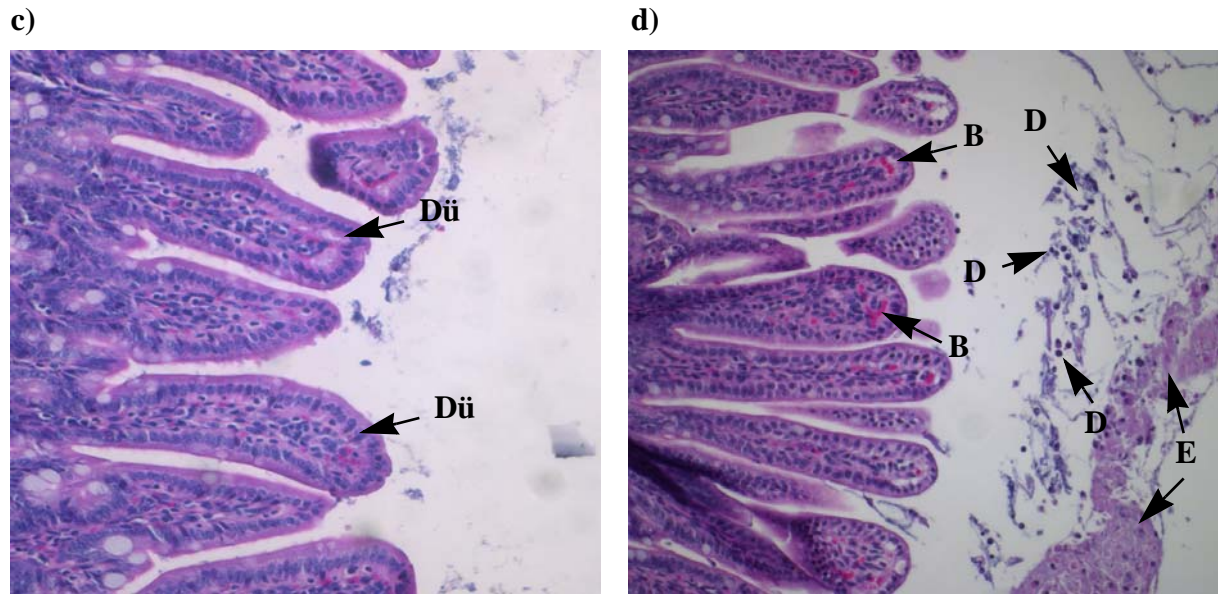
Aufgrund erhöhter Mortalität bei Transfer aktivierter CD8<sup>-</sup>-T-Zellsuspensionen in zwei Experimenten und des Verdachts der pathologischen Wirkung von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten wurden in diesem Experiment drei von acht Rezipienten jeder Gruppe an Tag neun p.i. getötet und der gesamte Dünn- sowie Dickdarm für die histologischen Untersuchungen entnommen. Nach Herstellung histologischer Präparate und Anfärbung mit Hämatoxylin und Eosin erfolgte die Auswertung der pathologischen Veränderungen. Abbildung 18 zeigt beispielhaft im Vergleich zu gesundem Gewebe naiver Mäuse entzündungsbedingte Veränderungen im Dünndarmepithel nach *E. falciformis*-Infektion. Neben Abrasion der Zotten und stark blutgefüllten Kapillaren der Lamina propria sind Exsudationen und abgeschilferte Epithelzellen im Lumen des Darmes zu finden.

a)



b)





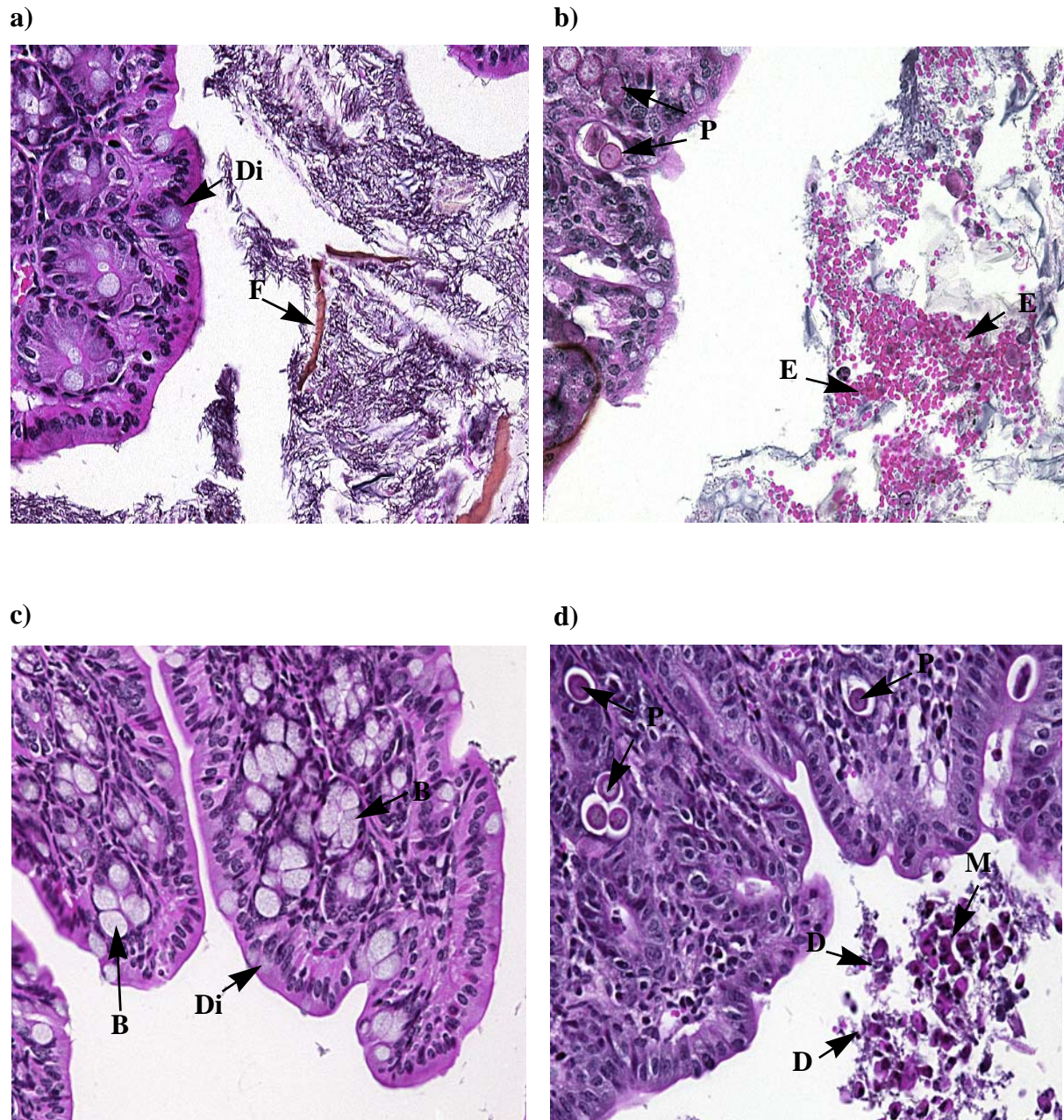
**Abb. 18: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Dünndarmepithels naiver Mäuse sowie *Eimeria falciiformis*-infizierter Mäuse nach adoptivem T-Zell-Transfer.**

Dargestellt sind histologische Schnitte des Dünndarmepithels naiver (a,c) sowie *E. falciiformis*-infizierter Mäuse (b,d) mit histopathologischen Veränderungen. HE-Färbung. Vergrößerung (a,b,c,d) 400x.

**B** starke Blutfülle der Kapillaren; **D** Desquamation von Epithelzellen; **Dü** Dünndarmzotten naiver Mäuse; **E** Exsudation; **Z** Zottenabrasion

Nachfolgend wurden im Vergleich zu gesunden Geweben naiver Tiere entzündungsbedingte Veränderungen des Caecum- und Colonepithels nach adoptivem T-Zell-Transfer und Infektion mit *E. falciiformis* beurteilt. Desquamation der Epithelzellen, stark blutgefüllte Kapillaren und massive Blutansammlungen im Lumen des Darmes waren dabei die hervortretendsten histopathologischen Veränderungen (Abb. 19).





**Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen des Dickdarmepithels naiver Mäuse sowie *Eimeria falciformis*-infizierter Mäuse nach adoptivem T-Zell-Transfer.**

Dargestellt sind histologische Präparate des Dickdarmepithels naiver (a,c) sowie *E. falciformis*-infizierter BALB/c-Mäuse (b,d) mit histopathologischen Veränderungen. HE-Färbung. Vergrößerung (a,b,c,d) 400x.

**E** Erythrozyten im Lumen; **B** Becherzellen; **D** Desquamation von Epithelzellen; **Di** Dickdarmepithel naiver Mäuse; **F** Futterbestandteile; **M** Makrophagen; **P** Parasitenstadien in parasitophoren Vakuolen

Die beobachteten Veränderungen im Darmepithel der untersuchten Mäuse sind in Tabelle 6 quantitativ zusammengefasst.

**Tab. 6: Histopathologische Veränderungen in Dün- und Dickdarm nach Zelltransfer und darauffolgender Infektion mit *Eimeria falciformis*.**

Dargestellt ist der Grad histopathologischer Veränderungen im Dün- und Dickdarm der Rezipienten aktivierter CD8<sup>+</sup>-/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie der PBS-Kontrollgruppe nach *E. falciformis*-Infektion (n=3/Gruppe).

(-) nicht vorkommend, (+) schwach, (++) mittelmäßig, (+++) stark

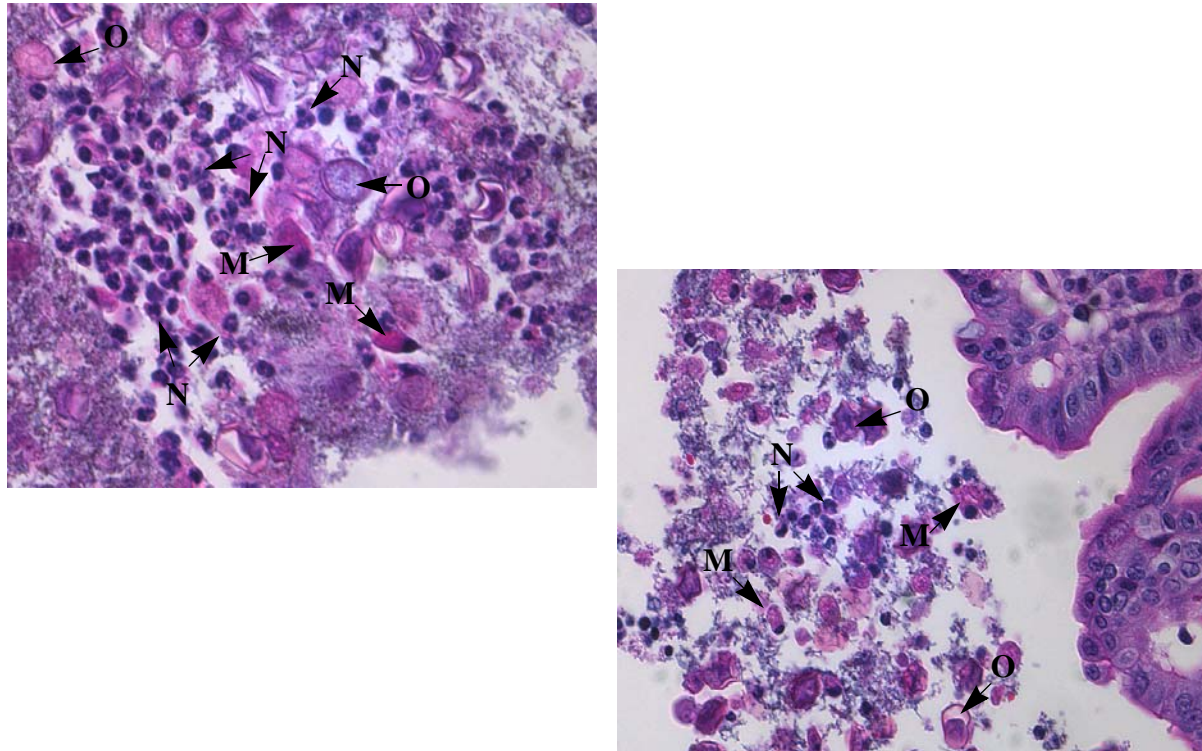
	aktivierte CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen		aktivierte CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen		PBS-Kontrolle	
	Dünndarm	Dickdarm	Dünndarm	Dickdarm	Dünndarm	Dickdarm
Exsudation	+	+++	+++	+++	+	+
Zottenabrasion	-	-	+++	-	(+)	-
Blut im Lumen	-	+++	-	+++	-	+
Desquamation	+	+	++	+++	-	+
kapilläre Blutfülle	-	-	+++	+++	++	-

Der Vergleich des Schweregrades der entzündungsbedingten Veränderungen zeigte eine starke Pathologie im Darm der Rezipienten von aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gegenüber den anderen beiden Gruppen. Besonders im Dünndarm traten starke Anzeichen der Entzündung auf. Aufgrund der Habitatsspezifität des Parasiten im Caecum und Colon könnten diese Veränderungen im Dünndarm durch gebildete Entzündungsmediatoren der transferierten Zellpopulationen, wie z.B. Zytokine, verursacht worden sein.

Die schädigende Wirkung der Parasitenreplikation im Caecum und Colon führte zu starkem Blutaustritt in das Lumen des Dickdarmes, Zellzerstörung mit Abschilferung und Exsudation.

Die aufgrund der Entzündung des Darmes stark erhöhte Gefäßpermeabilität bedingte das Einwandern von Leukozyten und Makrophagen in das Epithel (Stünzi & Weiss 1990) sowie in das Lumen des Darmes. Mikroskopisch deutlich zu erkennen, ordneten sie sich dort um frei

gewordene Oozysten an (Abb. 20). Bei Vergleich mit histologischen Präparaten naiver Tiere konnten neben Futterbestandteilen keine Entzündungszellen im Darmlumen beobachtet werden.



**Abb. 20:** Lichtmikroskopische Aufnahmen des Dickdarminhaltes *Eimeria falciformis*-infizierter Mäuse.

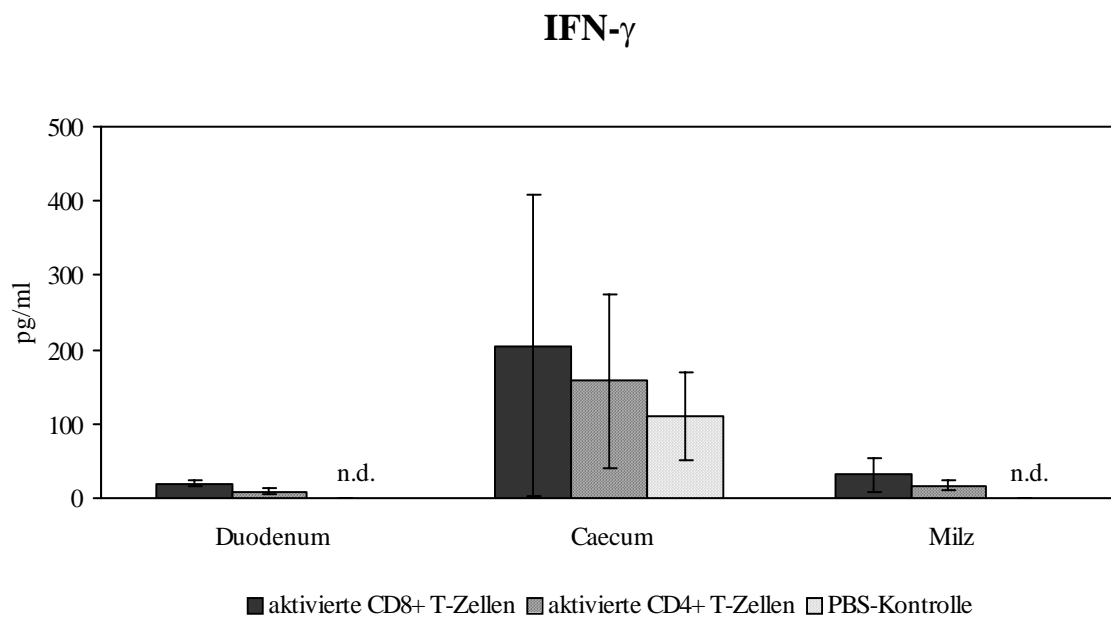
Abgebildet sind frei gewordene Oozysten im Lumen des Dickdarmes *E. falciformis*-infizierter Mäuse. Die Oozysten sind von neutrophilen Granulozyten sowie freien Gewebsmakrophagen umgeben. Vergrößerung 400x.

O freie Oozysten; N neutrophile Granulozyten; M Makrophagen

#### 4.3.4. Bestimmung der lokalen und systemischen Konzentrationen an IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ und IL-6 *E. falciformis*-infizierter Mäuse nach T-Zell-Transfer

Zur Untersuchung der Beteiligung dieser Entzündungsmediatoren an den pathologischen Veränderungen im Darmepithel *E. falciformis*-infizierter Mäuse und deren systemischer Wirkung wurden in orientierenden Experimenten die lokal und systemisch gebildeten Konzentrationen von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie IL-6 ermittelt. Dazu wurden von drei Mäusen pro Versuchsgruppe ca. ein Zentimeter lange Abschnitte von Duodenum und Caecum entnommen

und Extrakte angefertigt. Zur Bestimmung der systemischen Zytokin-Konzentrationen wurden Extrakte der Milzen dieser Tiere untersucht. Die Bestimmung erfolgte im ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) durch Zugabe spezifischer Antikörper. Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurde nachfolgend ein Proteinbestimmungstest der Organextrakte durchgeführt. Alle ermittelten Werte wurden dann an dem geringsten Proteingehalt des jeweiligen Organs abgeglichen. Die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen der untersuchten Organproben sind in Abbildung 21 dargestellt.



**Abb. 21: IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Darm und Milz *Eimeria falciformis*-infizierter Mäuse nach T-Zell-Transfer.**

Abgebildet sind die lokalen und systemischen IFN- $\gamma$ -Gehalte der Empfänger aktivierter CD8<sup>+</sup>-/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie der PBS-Kontrollgruppe (n=3/Gruppe) an Tag 9 p.i. Die Graphen zeigen Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen der individuell untersuchten Proben  $\pm$  Standardabweichungen.

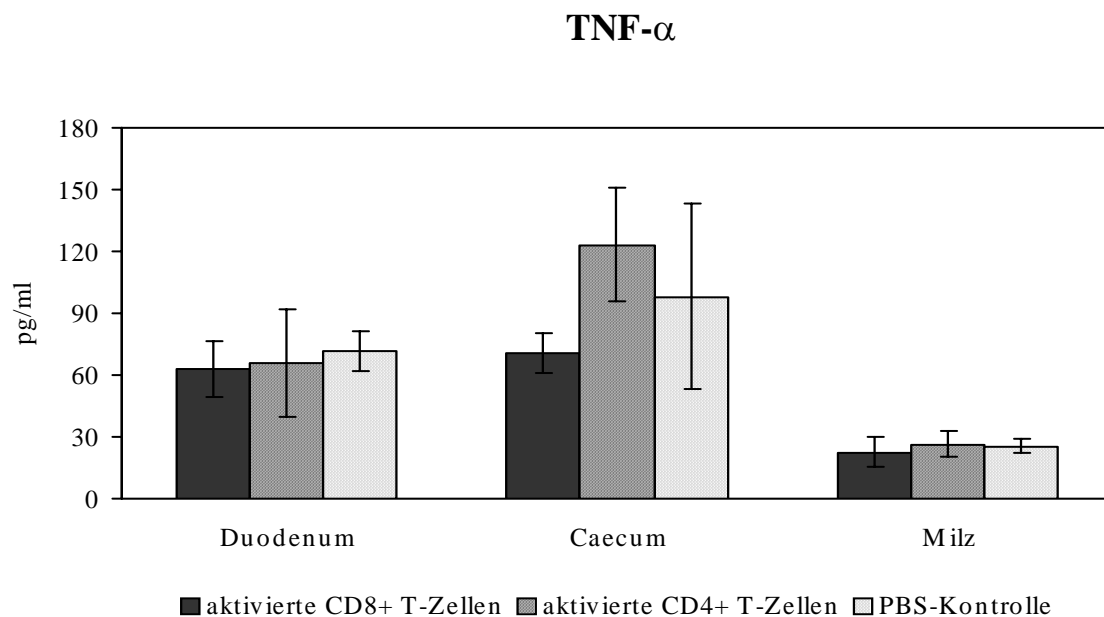
n.d. (nicht detektierbar)

Der Vergleich der Konzentrationen an IFN- $\gamma$  im Dünn- und Dickdarm zeigte eine erhöhte Produktion dieses Zytokins im Caecum in allen drei Versuchsgruppen. Die Unterschiede der IFN- $\gamma$ -Konzentration im Caecum zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen waren nicht statistisch signifikant. Die Daten der systemischen IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in den Milzen der Rezipienten aktivierter T-Zellen und der PBS-Kontrollgruppe zeigten im Vergleich zu den

Konzentrationen im Caecum keine erhöhten Zytokinwerte. Die IFN- $\gamma$ -Gehalte in Duodenum und Milz der PBS-Kontrollgruppe lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Die erhöhten lokalen Zytokinwerte im Caecum deuten an, dass IFN- $\gamma$  bei der Entwicklung einer Immunantwort gegen den Parasiten beteiligt sein könnte. Die Empfängergruppe der aktivierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigte dabei tendenziell eine verstärkte Produktion des Zytokins. Da aber keine signifikanten Unterschiede der IFN- $\gamma$ -Konzentrationen im Caecum aller Versuchsgruppen festgestellt werden konnten, kann hierbei nicht eindeutig ein Zusammenhang zwischen Zytokinproduktion und Schutzwirkung gesehen werden. Die erhöhten IFN- $\gamma$ -Gehalte im Caecum könnten deshalb eher auf eine immunstimulatorische Funktion durch Aktivierung von Effektorzellen und Zytokinproduktion hinweisen.

Als weiteres proinflammatorisches Zytokin wurde TNF- $\alpha$  untersucht. Abbildung 22 zeigt die lokal und systemisch produzierten Konzentrationen dieses Zytokins in den untersuchten Mäusen.



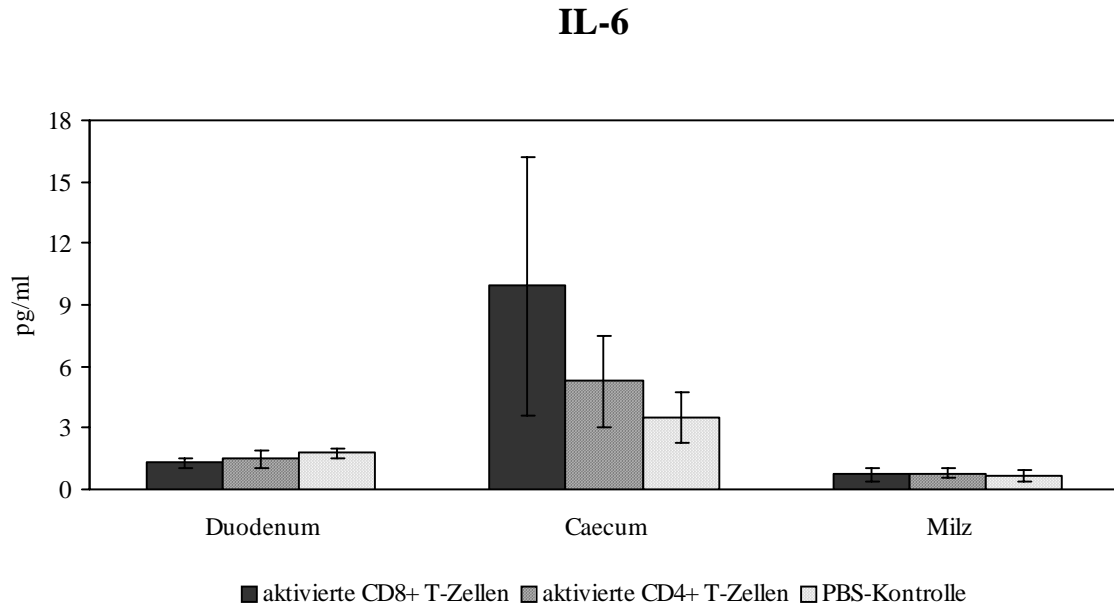
**Abb. 22: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in Darm und Milz *Eimeria falciformis*-infizierter Mäuse nach T-Zell-Transfer.**

Dargestellt sind die lokal und systemisch produzierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen aktivierter CD8<sup>+</sup>-/CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Empfänger sowie der PBS-Kontrollgruppe (n=3/Gruppe) an Tag 9 p.i. Die Graphen repräsentieren Mittelwerte der einzeln untersuchten Rezipienten, Standardabweichungen sind angegeben.

Die Proben aus Dünndarm und Dickdarm zeigten im Vergleich zu den Extrakten der Milzen eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration. Die Unterschiede der Gehalte an TNF- $\alpha$  im Duodenum sowie im Caecum zwischen den Rezipienten der aktivierten CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten und der PBS-Kontrollgruppe waren nicht statistisch signifikant. Die Zytokinkonzentrationen in den Milzen der Versuchstiergruppen zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Eine Tendenz zu verstärkter Zytokinproduktion konnte im Caecum der Empfängergruppe aktivierter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen festgestellt werden, was mit den schweren pathologischen Veränderungen in diesem Darmabschnitt in Verbindung gebracht werden könnte. Dagegen zeigten sich keine Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen des Duodenums, obgleich starke Schwankungen in der Ausprägung histopathologischer Veränderungen zwischen den Versuchstiergruppen beobachtet wurden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TNF- $\alpha$  nicht allein für die Pathologie der Erkrankung verantwortlich war, sondern womöglich durch Stimulation von Mediatoren der adaptiven Immunantwort zur Entwicklung der pathologischen Veränderungen beitrug. Wie auch bei IFN- $\gamma$  gezeigt, ist die systemische Produktion des Zytokins von untergeordneter Bedeutung.

Des Weiteren wurden die lokalen und systemischen Konzentrationen des Zytokins IL-6 gemessen (Abb. 23).



**Abb. 23: IL-6-Konzentrationen in Darm und Milz *Eimeria falciformis*-infizierter Mäuse nach T-Zell-Transfer.**

Die Graphen zeigen die lokal und systemisch gebildeten Konzentrationen an IL-6 der Empfänger aktivierter CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie der PBS-Kontrolle (n=3/Gruppe) an Tag 9 p.i. Dargestellt sind Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen jedes Tieres ± Standardabweichungen.

Die gemessenen Konzentrationen an IL-6 waren im Caecum, verglichen mit den Werten in Duodenum und Milz, erhöht. Bei Vergleich der Gehalte an IL-6 im Caecum zwischen den T-Zell-Empfängern und der PBS-Kontrollgruppe konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Jedoch zeigten die Rezipienten aktivierter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine erhöhte Tendenz für die Produktion von IL-6, was die Vermutung zulässt, dass dieses Zytokin an der Entwicklung einer Immunantwort beteiligt ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Produktion der hier untersuchten Zytokine keine eindeutigen Schlussfolgerungen auf deren Beteiligung an der Entwicklung pathologischer Veränderungen im Darm nach Belastungsinfektion mit *E. falciformis* zulässt. Jedoch die in allen Untersuchungen zum Teil stark erhöhten Gehalte der Zytokine im Caecum könnten ein

Hinweis dafür sein, dass diese Immunmodulatoren an der Entwicklung bzw. Regulation der Immunantwort gegen Eimerien beteiligt sind.

Abschließend sind die Oozystenausscheidungen, histopathologischen Veränderungen und Zytokinkonzentrationen der CD8<sup>+</sup>-, CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Empfänger sowie der PBS-Kontrollgruppe quantitativ in einer Übersichtstabelle zusammengefasst (Tab. 7).

**Tab. 7: Übersicht der Oozystenausscheidungen, histopathologischen Veränderungen und Zytokingehalte *Eimeria falciformis*-infizierter Mäuse nach T-Zell-Transfer.**

In dieser Tabelle sind die Oozystenausscheidungen, histopathologischen Veränderungen und Zytokinkonzentrationen der CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Empfänger sowie der PBS-Kontrollgruppe nach Infektion mit *E. falciformis* quantitativ dargestellt.

(-) nicht detektierbar, (+) wenig, (++) mittelmäßig, (+++) stark

	Oozystenausscheidung	histopathologische Veränderungen		Zytokine		
		<i>Duodenum</i>	<i>Caecum</i>	<i>Duodenum</i>	<i>Caecum</i>	<i>Milz</i>
<b>Empfänger CD8<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	+	+	++	+	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> +++ <b>TNF-<math>\alpha</math></b> ++ <b>IL-6</b> +++	+
<b>Empfänger CD4<sup>+</sup>-T-Zellen</b>	+++	+++	+++	+	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> ++ <b>TNF-<math>\alpha</math></b> +++ <b>IL-6</b> ++	+
<b>PBS-Kontrolle</b>	+++	+	+	-	<b>IFN-<math>\gamma</math></b> ++ <b>TNF-<math>\alpha</math></b> ++ <b>IL-6</b> ++	-

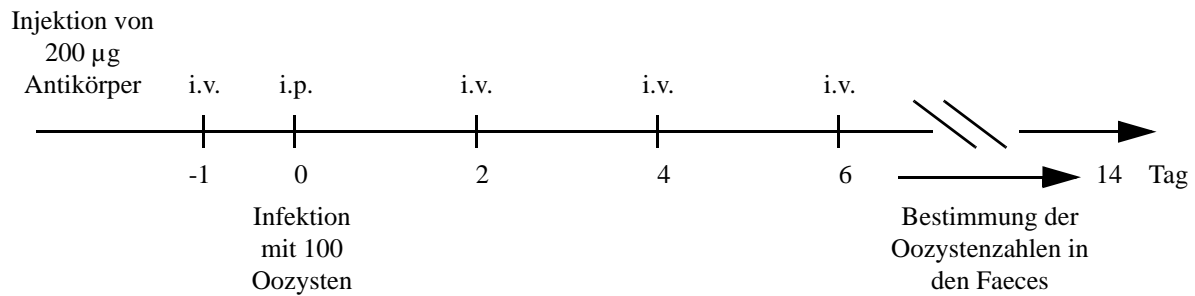


#### **4.4. Funktionsüberprüfung des T-Zell-Oberflächenrezeptors CTLA-4**

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, sind T-Zellen für die Limitierung einer Infektion mit *E. falciformis* essentiell. Um mehr über die Aktivierung und protektive Wirkung dieser Effektorzellen zu erfahren, wurde in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin die Funktion des kostimulatorischen Rezeptors CTLA-4 auf der Oberfläche von T-Zellen in der Ausbildung einer Immunantwort bei einer *E. falciformis*-Infektion untersucht. Da dieser Rezeptor einen Einfluss auf die proliferative Antwort von T-Lymphozyten hat (Krummel et al. 1996), sollte durch Antikörper-vermittelte Blockierung des Rezeptors die Funktion bei Induktion einer Immunantwort und bei der Ausbildung von Gedächtniszellen in einer Primärinfektion untersucht werden. Sodann wurde die Immunitätslage nach Primärinfektion in einer Sekundärinfektion mit *E. falciformis* überprüft.

##### **4.4.1. Untersuchung des Einflusses von CTLA-4 in der Primär- und Sekundärinfektion mit *E. falciformis***

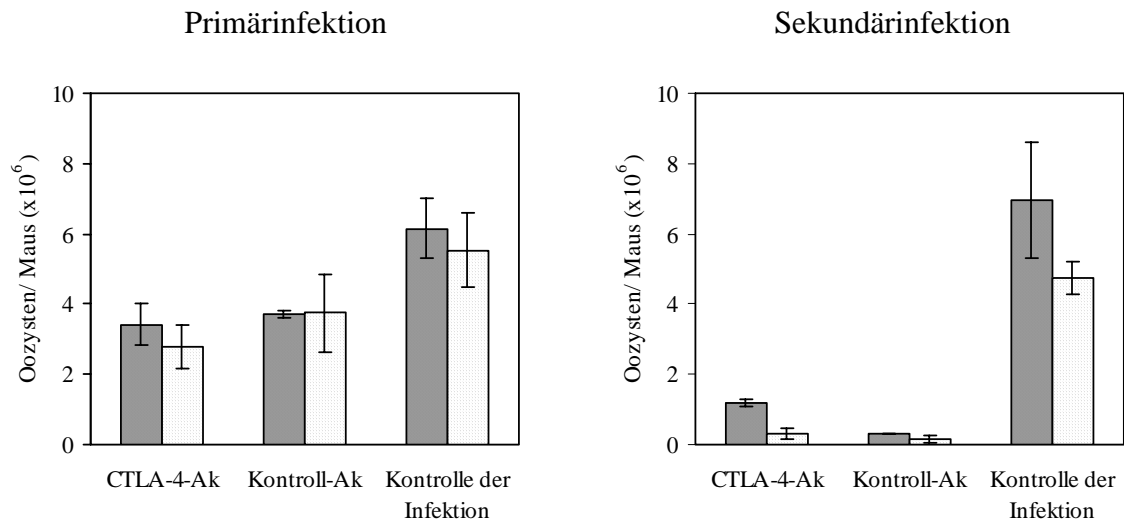
In diesem Experiment wurden weiblichen BALB/c-Mäusen an fünf Tagen je 200 µg eines Antikörpers gegen CTLA-4 verabreicht. Daneben gab es eine Kontrollgruppe, der die gleiche Menge eines Kontroll-Antikörpers (syrischer Hamster  $\gamma$ -Globulin) verabreicht wurde sowie eine Kontrollgruppe, welche nur mit dem Parasiten infiziert wurde. Die Antikörperinjektion erfolgte bis auf Tag 0 intravenös. Am Tag der Infektion wurde der Antikörper intraperitoneal injiziert. Alle Rezipienten erhielten am Tag 0 eine orale Infektion bestehend aus 100 Oozysten von *E. falciformis* (Abb. 24). Dieses Experiment wurde unter identischen Versuchsbedingungen wiederholt.



**Abb. 24: Zeitlicher Ablauf der Antikörperbehandlung und Infektion.**

Behandlungsschema weiblicher BALB/c-Mäuse mit Anti-CTLA-4-Antikörpern bzw. Kontroll-Antikörpern (syrischer Hamster  $\gamma$ -Globulin) und Infektion mit 100 Oozysten von *Eimeria falciformis*. Von Tag sechs bis 14 p.i. wurden die Oozystenzahlen in den Faeces bestimmt.

Fünf Wochen nach dem Infektionstag in der Primärinfektion erfolgte eine Belastungsinfektion der Antikörper-Empfänger mit 100 Oozysten pro Maus. Um den Infektionsverlauf besser verfolgen zu können, wurden parallel naive BALB/c-Mäuse als Kontrolle ebenfalls mit 100 Oozysten infiziert. Abbildung 25 zeigt die Ausscheidungsraten der Antikörper-Empfänger sowie der Kontrollgruppen in beiden Experimenten. Der Vergleich der Ausscheidungen beider Experimente während der Primärinfektion zeigte keine Beeinflussung der Immunantwort durch die verabreichten Antikörper. Die geringeren Ausscheidungsraten der Antikörper-Empfängergruppen gegenüber der Infektionskontrolle lassen sich möglicherweise durch eine unspezifische Aktivierung des Immunsystems durch die Antikörperinjektion erklären. Die Ergebnisse während der Sekundärinfektion sind nicht eindeutig. Bei Vergleich der Ausscheidungen der CTLA-4- und der Kontroll-Antikörper-Empfänger waren im ersten Experiment signifikante Unterschiede vorhanden ( $p=0,01$ ), welche im Wiederholungsexperiment nicht mehr beobachtet werden konnten. Der Vergleich der Ausscheidungsraten der Antikörper-Empfänger mit der Infektionskontrolle im Wiederholungsexperiment zeigte eine Oozystenreduktion von 94-97%. Diese Immunitätsrate geht konform mit Ergebnissen von Infektionsexperimenten mit unbehandelten Mäusen nach Sekundärinfektion. Deshalb ist aufgrund der Ergebnisse des zweiten Experimentes vermutlich nicht von einer Beeinflussung der Immunitätsausbildung bei Infektion mit *E. falciformis* durch Blockierung der CTLA-4-Rezeptoren auf den T-Lymphozyten auszugehen.



**Abb. 25: Oozystenausscheidungen nach Antikörperbehandlung in der Primär- und Sekundärinfektion mit *Eimeria falciformis*.**

Gesamtoozystenausscheidungen weiblicher BALB/c-Mäuse nach intravenöser Injektion von anti-CTLA-4-Ak bzw. Kontroll-Ak und Inokulation von 100 Oozysten von *E. falciformis* während der Primär- und Sekundärinfektion. Die Daten sind Mittelwerte, Standardabweichungen sind angegeben. Dunkle Balken repräsentieren das erste Experiment, helle Balken den Wiederholungsversuch. Gruppengröße = 6, paarweise Haltung.