

Aus dem Institut für Anatomie
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Westermann

**Das Zytokinmilieu in den Kompartimenten der
gesunden Rattenmilz:
Veränderungen während einer lokalen Immunantwort**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Maria Deierling
aus Hannover

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Westermann

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H. Hennig

Tag der mündlichen Prüfung: 04.09.2008

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.09.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät-

Meinem Großvater Friedrich Lubach gewidmet

*Die Umgebung, in der der Mensch (oder die Zelle) sich den
größten Teil des Tages aufhält, bestimmt seinen (ihren)
Charakter.*

Antiphon (480-411 v. Chr.), attischer Redner

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Versuchstiere	11
2.2	Induktion einer Immunantwort in der Milz	11
2.3	Entnahme und Färbung der Milzen	12
2.4	Mikrodissektion	14
2.5	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese	16
2.6	Quantitative real-time PCR	17
2.7	Auswertung der quantitativen PCR	22
2.8	Statistik	23
3	Ergebnisse	24
3.1	Quantitative Expression der untersuchten Zytokine	24
3.2	Das Zytokinmilieu der unstimulierten Milz	25
3.2.1	Dominanz der TH1-Zytokine in der PALS und der TH2-Zytokine im Follikel	25
3.2.2	Vergleichbares Zytokinmuster in Follikel, Marginalzone und roter Pulpa	29
3.2.3	Untersuchung ganzer Milzschnitte zeigt indifferentes Zytokinbild	32
3.3	Induktion einer Immunantwort in der Milz	34
3.3.1	Stimulation führt zu frühen Veränderungen der TH1-Zytokine in der PALS	37
3.3.2	Keine Expressionsänderungen bei den TH2-Zytokinen, IL15 und TGF β -1	37
3.3.3	Veränderung des Zytokinmusters der roten Pulpa	43
3.3.4	Lokalisation der Zytokinveränderungen innerhalb der PALS	
3.3.5	Keimzentrum und Corona unterscheiden sich in ihrem Zytokinmilieu	49
4	Diskussion	53
5	Zusammenfassung	66
6	Abkürzungsverzeichnis	68
7	Literaturverzeichnis	69

1 Einleitung

Durch überall in der Umwelt vorhandene Pathogene steht der Organismus unter der ständigen Bedrohung einer Schädigung im Sinne einer Erkrankung oder im schlimmsten Fall sogar des Todes. Dies zu verhindern ist die Aufgabe des Immunsystems, indem es auf verschiedene Arten eindringende Mikroorganismen für den Körper unschädlich macht. Grundsätzlich unterscheidet man dabei das angeborene (unspezifische) und das erworbene (spezifische) Immunsystem, beide Systeme bestehen jeweils aus Zellen und löslichen Komponenten [40].

Die erste Barriere, auf die Pathogene treffen, ist die Haut, durch die schon viele der Keime davon abgehalten werden in den Organismus einzudringen. Auch die Schleimhäute der Atemwege, des Urogenitaltraktes und des Magen-Darm-Traktes haben Abwehrmechanismen, wie z.B. das Lysozym im Speichel, das bakterizide Wirkungen zeigt. Gelingt es einem Keim doch die äußeren Schutzbarrieren zu durchbrechen und in den Körper einzudringen, stellt die angeborene Immunabwehr den ersten und raschesten Weg der Eliminierung dar. Durch Rezeptoren, die sich auf den Zellen des Immunsystems befinden, werden häufig vorkommende mikrobielle Oberflächenmoleküle erkannt und unschädlich gemacht. Eine wichtige Rolle kommt dabei den Toll-like-receptors (TLR) zu, deren Stimulierung zu einer Protein-Kaskade führt, an deren Ende die vermehrte Bildung von Stoffen steht, die den Körper in seiner Abwehr unterstützen, wie z.B. Zytokine [3,41,69]. Die beteiligten Zellen sind Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und natürliche Killerzellen, die löslichen Faktoren sind Zytokine, Akute-Phase-Proteine, Stoffe des Komplementsystems sowie verschiedene Enzyme. Durch die bei der angeborenen Immunantwort freigesetzten Botenstoffe werden andere Immunzellen, unter anderem auch solche des erworbenen Immunsystems, angelockt und aktiviert.

Viele der Eindringlinge werden auf diese Art und Weise getötet und abgebaut, doch im Rahmen der Evolution haben sich Keime gebildet, die die allgemeinen

Erkennungszeichen wie die oben erwähnten Oberflächenmoleküle, durch die sie durch das angeborene Immunsystem schnell als fremd erkannt und unschädlich gemacht werden können, nicht mehr tragen, indem sie z.B. Kapseln um sich herum gebildet haben oder als Virus in den körpereigenen Zellen leben und so der Elimination entgehen. In solchen Fällen beginnt nach 4-5 Tagen das erworbene Immunsystem wirksam zu werden, das aus den T- und B-Lymphozyten sowie den Antikörpern als löslichem Faktor besteht. Die Lymphozyten besitzen hochspezifische Rezeptoren, die für ein Antigen passend sind, und es existiert für nahezu jedes Fremdanigen ein Lymphozyt mit dem passenden Rezeptor. Bei Bindung an das entsprechende Antigen kommt es zur Teilung und Vermehrung des Lymphozyten, so dass viele spezifisch gegen dieses Antigen gerichtete Zellen entstehen.

Dabei gibt es verschiedene Abläufe einer Immunreaktion; einmal sind es vorwiegend B-Zellen, die proliferieren und Antikörper produzieren, ohne dass T-Zellen eine wichtige Rolle spielen. Ein Beispiel dafür ist die Infektion mit extrazellulären Bakterien, die von B-Lymphozyten als Antigen erkannt werden. Dabei wandeln sich die B-Zellen in Plasmazellen um und beginnen Antikörper zu produzieren, die ebenfalls genau gegen das Antigen gerichtet sind und sich sowohl im Blutplasma als auch in der interzellulären Flüssigkeit befinden. Sie binden an die Bakterien und führen dadurch entweder zu deren Neutralisation oder durch Aktivierung des Komplementsystems zur Lyse, oder aber sie werden als Immunkomplex von anderen Immunzellen erkannt und phagozytiert. Die Immunabwehr mit Hilfe von Antikörpern bezeichnet man auch als humorale Immunantwort.

Andererseits gibt es Antigene, die eine T-Zell-abhängige B-Zellantwort hervorrufen; das bedeutet, dass zur Stimulation der Antikörperproduktion T-Zellen notwendig sind und dass auch die T-Zellen selber direkt zur Eliminierung der Antigene beitragen. Die T-Lymphozyten lassen sich dabei in T-Helferzellen ($CD4^+$ -Zellen) und cytotoxische T-Zellen ($CD8^+$ -Zellen) unterteilen, die entweder andere Zellen aktivieren und Koordinationsaufgaben ($CD4^+$) wahrnehmen oder die eindringenden fremden oder infizierten Zellen durch Lyse abtöten können ($CD8^+$). Ein Teil der Lymphozyten wandelt sich außerdem in Gedächtniszellen

um und kann dann bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Antigen schneller und effektiver reagieren [41]. Diese zellulär vermittelte Immunreaktion tritt zum Beispiel bei Viren und anderen intrazellulären Erregern in Kraft. Über MHC I-Rezeptoren präsentieren die infizierten Zellen fremde Proteinstrukturen und können so von den T-Zellen erkannt und eliminiert werden. Es gibt aber auch partikuläre, extrazelluläre Antigene wie Schaferythrozyten (SRBC), die solch eine Immunantwort hervorrufen.

Durch die Untersuchungen von Mosmann und Sad 1986 [58] stellte sich heraus, dass es zwei Subpopulationen von T-Helferzellen gibt: die TH1- und die TH2-Zellen. Sie unterscheiden sich im Muster der von ihnen produzierten Zytokine und haben unterschiedliche funktionelle Aufgaben. Die TH1-Zellen produzieren $\text{IFN}\gamma$ und IL2 und führen so zur Aktivierung von Makrophagen, unterstützen die zelluläre Immunantwort und wirken somit bevorzugt auf intrazelluläre Erreger wie z.B. Viren. Die TH2-Zellen produzieren vor allem IL4 und IL5 sowie IL10 und fördern somit die humorale Immunantwort, die besonders bei bakteriellen, extrazellulären Infektionen eine große Rolle spielt. Die beiden Subpopulationen sind darüber hinaus in der Lage Funktionen der jeweiligen anderen Gruppe zu antagonisieren und zu beeinflussen [1,66,85].

In letzter Zeit ist eine weitere Gruppe von T-Zellen stärker in den Vordergrund gerückt, so genannte T-regulatorische Zellen (T_{reg}). Diese Zellen produzieren verstärkt TGF β und IL10, können sowohl TH1- als auch TH2-Immunreaktionen regulieren und nehmen auch suppressiven Einfluss auf Mastzellen, Basophile und Eosinophile. Dabei finden sich CD4 $^{+}$ - und auch CD8 $^{+}$ - T_{reg} -Zellen [36,76].

Es hat sich gezeigt, dass es bei bestimmten Infektionen des Körpers von elementarer Bedeutung sein kann, ob eine TH1- oder TH2- Antwort ausgelöst wird. Als Beispiel sei hier eine Infektion mit Leishmanien genannt, die bei einer TH1-dominierten Antwort zur Ausheilung kommt, bei einer IL4-gesteuerten TH2-Antwort hingegen zu einer schweren Erkrankung oder sogar zum Tod des Organismus führt [67,70].

Auch bei immunvermittelten Erkrankungen haben sich Zusammenhänge mit den verschiedenen Subpopulationen der T-Helferzellen offenbart, so sind

Autoimmunerkrankungen wie multiple Sklerose, Diabetes mellitus Typ1, rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn durch eine TH1-Aktivierung gekennzeichnet [34,74]. Eine verstärkte TH2-Antwort wird hingegen bei allergischen Reaktionen vom Soforttyp (Typ I) beobachtet und ist mit atopischen Störungen wie exogen-allergischem Asthma assoziiert [85]. Dabei wird auch den T_{reg} -Zellen eine wichtige Rolle eingeräumt, bei denen außerdem Zusammenhänge mit autoimmunologischen Erkrankungen, chronischen Erkrankungen und auch Tumorleiden nachgewiesen wurden [76].

Es ist somit von großem klinischem Interesse, die genauen Abläufe und die Initiierung von Immunreaktionen besser zu verstehen.

Dabei sind die initiiierenden Faktoren, die zur Auslösung einer TH1- oder TH2-Antwort führen, nur teilweise verstanden. Es spielen sowohl genetische Gründe als auch Umweltfaktoren eine Rolle. Die Menge und die Konstitution des Antigens kann darüber entscheiden, welche Richtung eingeschlagen wird, ebenso die Art der Antigenpräsentation und die Stärke der Kostimulation. Entscheidend ist letztlich, welches Zytokinmuster auf die naive T-Helferzelle einwirkt. IL12 und $IFN\gamma$ stellen dabei die Hauptinitiatoren einer TH1-Differenzierung dar, eine hohe IL4-Expression führt zu einer TH2-Antwort [21,52,59,66].

Der Kontakt mit Antigenen und die Proliferation der Lymphozyten findet in den sekundär lymphatischen Organen statt; darunter versteht man die Lymphknoten, die Milz und die lymphatischen Gewebe der Schleimhäute wie z.B. die Tonsillen des Rachens und die Peyerschen-Plaques im Darm. In den sekundär lymphatischen Organen werden die Antigene von speziellen Zellen präsentiert und die Lymphozyten, die immer wieder durch diese Organe hindurch wandern, haben so die Möglichkeit „ihr“ Antigen zu treffen.

Die Milz spielt im Immunsystem eine besondere Rolle, da sie nicht wie die anderen sekundären lymphatischen Organe die Lymphabflusswege drainiert, sondern das Blut. Man findet in der Milz eine deutliche Strukturierung in verschiedene Kompartimente, in denen unterschiedliche Zellen vorkommen, und die unterschiedliche Funktionen erfüllen; diese Kompartimente lassen sich

bei der Ratte besonders deutlich erkennen. Die Milz setzt sich aus der roten und der weißen Pulpa zusammen. Dabei dient die rote Pulpa vor allem dazu, alte Erythrozyten, die in ihren retikulären Fasern hängen bleiben, auszusortieren und abzubauen, während in der weißen Pulpa die Reaktionen der Immunantwort stattfinden [14,43,56]. Die weiße Pulpa lässt sich weiter untergliedern in Marginalzone, PALS (periarteriöläre Lymphozytenscheide) und Follikel. Die Marginalzone umgibt die anderen beiden Kompartimente und trennt sie damit von der roten Pulpa. Sie stellt die Haupteintrittspforte der Lymphozyten und auch der Antigene dar. Die hier vorhandenen Zellen sind vor allem B-Zellen und Makrophagen, außerdem kommen noch natürliche Killerzellen und einige T-Lymphozyten vor, die von hier aus in die PALS einwandern. Die PALS ist das Gebiet in der Milz, das am stärksten von T-Lymphozyten dominiert wird; hier kommt es durch den Kontakt mit dendritischen Zellen (DCs), die Antigene präsentieren und T-Zellen aktivieren können, zur Proliferation der T-Lymphozyten. Am äußeren Rand der PALS finden sich einige B-Zellen, die auf ihrem Weg durch die Milz dort hindurch wandern. Bei einer Immunreaktion werden sie an dieser Stelle durch T-Helferzellen unterstützt und aktiviert, sie beginnen Antikörper zu produzieren und entweder die Milz direkt durch die rote Pulpa hindurch zu verlassen oder aber in einen Follikel einzuwandern und Keimzentren zu bilden [87]. Im Follikel befinden sich außer den vorherrschenden B-Zellen noch follikuläre-interdigitierende-Zellen (FDCs), die Antigene in Form von Immunkomplexen präsentieren, sowie einige T-Helferzellen.

In der vorliegenden Arbeit haben wir für die Auslösung einer Immunantwort Schaferythrozyten gewählt, die den Ratten in hoher Konzentration in die Schwanzvenen injiziert wurden. Schaferythrozyten haben den Vorteil, dass sie mit großer Sicherheit eine Immunantwort auslösen und dass diese lokal auf die Milz beschränkt bleibt, da die anderen lymphatischen Organe wie Lymphknoten, Tonsillen und Peyerschen-Plaques ihr Antigen vor allem über die Lymphgefäße erhalten, die Milz hingegen das Blut drainiert [41]. Daneben gibt es auch eine natürliche zeitliche Begrenzung, da es, anders als bei einer Infektion mit lebenden Organismen, nicht zur weiteren Proliferation kommt.

Dadurch kann man den Umfang dieser Immunreaktion in etwa einschätzen und sie stellt somit ein gutes Modell dar.

Den konkreten Ablauf einer Immunreaktion mit SRBCs, die eine T-Zell-abhängige B-Zellantwort auslösen, stellt man sich so vor, dass die Antigene die Milz über den Blutstrom erreichen, in der Marginalzone ankommen, dort von Makrophagen aufgenommen und prozessiert werden; anschließend werden sie entweder auf B-Zellen übertragen oder die Makrophagen wandern selbst in die PALS, um dort das Antigen auf die DCs zu transferieren. Die DCs präsentieren das Antigen dann den T-Zellen, woraufhin die für dieses Antigen spezifischen T-Zellen zu proliferieren beginnen. Bei ihrem Weg durch die PALS treffen sie die B-Zellen, die das Antigen in der Marginalzone gebunden hatten und jetzt ebenfalls in die PALS einwandern. So kommt es zwischen den antigenspezifischen T- und B-Zellen zum Kontakt und die T-Zellen stimulieren die B-Zellen zur Differenzierung in Antikörper-produzierende Zellen, die zum Teil die Milz über die rote Pulpa verlassen oder aber in die Follikel wandern, wo sie Keimzentren bilden [81].

Die Milz stellt somit ein sehr wichtiges Organ für die Immunabwehr dar, was man auch daran erkennen kann, dass sie das Organ mit der höchsten Migrationsrate von Lymphozyten in Bezug auf die Durchblutung ist und damit die Wahrscheinlichkeit eines Kontaktes von Antigen und spezifischem Immunsystem sehr hoch ist [87]. Beobachtungen haben dementsprechend auch gezeigt, dass Menschen, denen die Milz entfernt wurde, unter einem besonderen Risiko stehen an bakteriellen Infektionen zu versterben [11].

Erst das Zusammenspiel des angeborenen und erworbenen Immunsystems und seiner Zellen und löslichen Faktoren führt zu einem adäquaten Schutz des Organismus vor Pathogenen aus der Umwelt. Hierbei übernehmen die Zytokine die Aufgabe der Koordinatoren. Sie steuern die Kommunikation zwischen den Immunzellen, beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von Leukozyten und können Immunantworten sowohl verstärken als auch beenden. Zytokine werden von vielen verschiedenen Zellen, in erster Linie jedoch von Immunzellen gebildet. Die Zytokine sind eine sehr heterogene Gruppe von löslichen Faktoren, zu ihnen gehören Interleukine, Interferone,

koloniestimulierende Faktoren, Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Transforming-Growth-Faktoren (TGF). Gemeinsamkeiten, die all diese Stoffe verbinden, sind ihre Wirksamkeit über Rezeptoren auf der Oberfläche ihrer Zielzellen und ihre Ausschüttung in sehr geringen Mengen, aber mit einer sehr hohen biologischen Aktivität und Wirksamkeit. Zytokine scheinen vor allem lokal zu wirken, was auch sinnvoll erscheint, da ansonsten wegen ihrer hohen Wirksamkeit Immunzellen im gesamten Körper beeinflusst würden [7,47]. Dabei wirken sie einmal auf die sezernierende Zelle selbst zurück (autokrin), aber auch auf benachbarte Zellen (parakrin). Zytokine sind pleiotrope Stoffe, das bedeutet, dass sie an verschiedenen Zielzellen auch verschiedene biologische Effekte hervorrufen können. Auf der anderen Seite können aufgrund gleicher Rezeptoruntereinheiten verschiedene Zytokine gleiche Wirkungen hervorrufen.

Aufgrund ihrer geringen Konzentration und der daraus folgenden schwierigen Nachweisbarkeit sind die Zytokine erst in den letzten 30 Jahren Gegenstand intensiver Forschung geworden. Rückblickend kann man sagen, dass schon im 19. Jahrhundert Beobachtungen zu Zytokinen gemacht sowie Effekte beschrieben wurden, die sich auf Zytokine zurückführen ließen, allerdings war es damals noch nicht möglich diese in kleinsten Konzentrationen auftretenden Stoffe nachzuweisen. Durch die Gentechnologie gelang es schließlich, größere Mengen einzelner Zytokine herzustellen und sie damit als Medikamente in die klinische Medizin einzubringen [47,80]. Als Beispiel seien hier genannt die α -Interferone in der Therapie von Viruserkrankungen und Ciclosporin, das die Bildung von IL2 hemmt und als Immunsuppressivum in der Verhinderung von Transplantatabstoßungen eingesetzt wird.

Der Nachweis von Zytokinen kann auf Protein- oder auf mRNA-Ebene erfolgen. Der Proteinnachweis kann z.B. durch Immunoassays geschehen, dabei werden die Zytokine durch spezifische Antikörper markiert und auf verschiedene Arten nachgewiesen; dafür kommt häufig ein sandwich-ELISA oder eine FACS-Analyse zur Anwendung.

Da die Gen-Expression von Zytokinen im Wesentlichen mit der Menge an sezerniertem Zytokin übereinstimmt, ist es möglich, die mRNA zu bestimmen.

Dabei werden verschiedene Techniken wie In-situ-Hybridisierung, Northern Blot, Microarrays, aber vor allem PCR-Techniken benutzt. Der große Vorteil der PCR ist, dass sie eine Vervielfältigung der sehr gering exprimierten Zytokin-mRNA ermöglicht [20].

Bisher war es nur möglich, Zytokine in ganzen Organen nachzuweisen, doch durch den technischen Fortschritt und die Entwicklung der Mikrodissektion besteht jetzt auch die Möglichkeit, lokale Informationen über Teilbereiche wie z.B. die verschiedenen Kompartimente der Milz zu gewinnen [19,22]. Besonders bei der Milz stellte es sich immer als ein Problem dar, dass man das gesamte Organ untersucht hat, da beinahe 75% des Gewebes der roten Pulpa zuzuordnen sind und es somit kaum möglich ist, von Werten der gesamten Milz auf die weiße Pulpa zurückzuschließen. So ist über das Zytokinmilieu der einzelnen Kompartimente der Milz bisher wenig bekannt, obwohl die Milz eine solch zentrale Rolle im Immunsystem einnimmt und sich schon bei der Untersuchung von mesenterialen und peripheren Lymphknoten gezeigt hat, dass das vorliegende Zytokinmuster entscheidenden Einfluss auf die Wiederkehr und Proliferationsfähigkeit von T-Effektorzellen nimmt [10].

Das Prinzip der von uns benutzten Laser-Mikrodissektion beruht darauf, dass man ausgewählte Bereiche von Gewebeschnitten markiert und vom Laser herausschießen lässt. Das so gewonnene Gewebe wird gereinigt, die mRNA in cDNA umgeschrieben und schließlich eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Das Ergebnis ermöglicht Aussagen über das Vorhandensein und die Menge von mRNA bestimmter Zytokine im markierten Bereich [13]. Dabei werden die Zellen in ihrer ursprünglichen Umgebung in den Kompartimenten untersucht werden, sie haben also keinen Kontakt zu Zellen aus anderen Kompartimenten, der nicht dem natürlichen Kontakt entspricht.

Wir haben die Mikrodissektion mit einer real-time PCR kombiniert, einer weiteren neuen Methode, die es erlaubt, kleinste Mengen von mRNA oder DNA quantitativ nachzuweisen, indem die gewünschten Genomabschnitte vervielfältigt werden und gleichzeitig die Produktmenge über Fluoreszenzfarbstoffe gemessen wird. In unserem Fall haben wir mRNA

nachgewiesen, da diese anders als die DNA, die die Erbinformation der gesamten Zelle umfasst, die tatsächlich benötigten Informationen für die aktuell geforderte Proteinsynthese enthält. Die gewonnene mRNA wird im ersten Schritt in cDNA umgeschrieben, weil die bei der PCR benutzte Polymerase nur DNA und keine RNA vervielfältigen kann. Da aber die mRNA als Matrize genutzt wurde, enthält auch die cDNA dann nur die für die Proteinsynthese relevanten Informationen.

Auf der einen Seite steht also die Milz, von der man weiß, dass sie eine große Rolle im Immunsystem spielt, verschiedene Kompartimente besitzt, die man histologisch unterscheiden kann und von denen bekannt ist, dass sie verschiedene Aufgaben im Immunsystem übernehmen. Auf der anderen Seite gibt es die Zytokine, deren große Bedeutung in der Beeinflussung des Immunsystems immer deutlicher wird und von deren genaueren Erforschung man sich Hoffnungen auf zukünftige Therapiemöglichkeiten macht.

Die Verbindung dieser beiden Gedanken führt zu den Fragen, ob nicht in den Kompartimenten der Milz ein unterschiedliches Zytokinmilieu vorherrscht, wie sich dieses Zytokinmilieu während einer Immunantwort verhält und ob es Unterschiede zwischen den Kompartimenten gibt. Unsere Hypothese dabei ist, dass ein unterschiedliches Milieu der Kompartimente existiert und dass dieses Milieu zu den verschiedenen Funktionen der Kompartimente beiträgt.

Wir haben dieses Zytokinmilieu in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion in Kombination mit der PCR untersucht und es anschließend in Korrelation mit Proliferation und Migrationsvorgängen von Lymphozyten gebracht. Untersucht haben wir die Milz der Ratte mit den Kompartimenten PALS, Marginalzone, Follikel und rote Pulpa. Dabei haben wir uns besonders für die beiden grundlegenden Richtungen von Immunantworten, TH1 oder TH2 interessiert und die Zytokine so ausgewählt, dass sie als Repräsentanten für diese Richtungen stehen, nämlich für die TH1-dominierte Antwort IL12p40, IL2 und IFN γ und für die TH2-dominierte Antwort IL4 und IL10. Zusätzlich haben wir noch die Expression von IL15 und TGF β -1 untersucht, die von vielen verschiedenen Zellen exprimiert werden und ebenfalls als T-Zell-regulierende

Faktoren bekannt sind. Dabei haben wir uns als erstes für das Milieu der ruhenden, unstimulierten Milz interessiert und haben dann Veränderungen beobachtet, die im Verlauf einer Immunreaktion auftreten.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden die Milzen von Lewis-Ratten verwandt, die aus dem Institut für Versuchstierkunde der Medizinischen Hochschule Hannover stammen und bei -80° Celsius eingefroren worden waren.

Die Ratten waren männlich, hatten ein Alter von 10 bis 12 Wochen, ein Körpergewicht von 272 ± 53 g und wurden während des Beobachtungszeitraumes unter so genannten special pathogen-free (SPF-) Bedingungen bei einer Umgebungstemperatur von 24°C gehalten.

Eine Genehmigung zur Durchführung von Tierversuchen lag vor (AZ 604-425022-94/716).

2.2 Induktion einer Immunantwort in der Milz

Für die Induktion einer lokalen Immunantwort in der Milz wurden Schaferythrozyten verwendet, die sich dafür als große, partikuläre Antigene bewährt haben. Sie gelangen nach intravenöser Injektion in die Schwanzvene über die Marginalzone in die Milz und rufen dort eine T-Zell-abhängige B-Zell-Immunantwort hervor, in deren Verlauf Antikörper gebildet werden [81].

Um sicherzustellen, dass eine Immunantwort ausgelöst wird, muss eine ausreichend große Menge Antigen appliziert werden, in diesem Fall wurden ca. 1×10^{10} Schaferythrozyten in die Schwanzvene injiziert. Zur Herstellung wurden 10 ml einer Alsever-Lösung von Schaferythrozyten (CL14AA, Biozol, Eching) mit 30 ml NaCl-Lösung für 10 min bei 400g in einer Zentrifuge gewaschen und der Überstand abgesaugt. Nach Anlegen einer Verdünnungsreihe (90 μl NaCl + 10 μl Blut, verdünnt bis 1:10.000) wurde von einem definierten Volumen die Zellzahl in einer Zählkammer bestimmt und so die erforderliche Anzahl Schaferythrozyten bestimmt, die dann mit NaCl auf 2 ml aufgefüllt und injiziert wurde. Die Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Kochsalzlösung. Für die

Versuchsreihe wurden zu verschiedenen Zeitpunkten 3 Ratten mit jeweils einem Kontrolltier untersucht. Die Werte der Kontrolltiere wurden später zusammen als Ergebnisse der unstimulierten Milz und als Nullwert der stimulierten Milz benutzt.

2.3 Entnahme und Färbung der Milzen

Die Tiere wurden nach den Zeitpunkten 1, 3, 6, 8 und 10 Tage nach Injektion der Schaferythrozyten getötet und die Milzen unmittelbar entnommen, in kleine Gewebeblöcke geschnitten, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt.

Zur weiteren Verarbeitung wurden mit dem Kryostat 10 µm dicke Gefrierschnitte der Milzen angefertigt und direkt auf mit Polyethylenaphtalat (PEN) membranbeschichtete Objektträger (PALM Microlaser Technologies AG, Bernried) aufgebracht. Nach Lufttrocknung wurde eine Färbung mit Toluidin-Blau durchgeführt; bei dieser Färbung werden alle Zellkerne blau dargestellt und aufgrund der verschiedenen Zelldichten kann man die einzelnen Kompartimente unterscheiden. Der Ablauf der Färbung sah so aus, dass die Gewebeschnitte zu Beginn für 30 sec mit 75% Ethanol fixiert und anschließend ca. 30 sec mit DEPC-Wasser gespült wurden. Danach fand für 10 min die eigentliche Färbung mit 1:10 verdünnter Toluidin-Blaulösung statt. Es folgte eine zweimalige Spülung mit DEPC-Wasser und eine wiederholte zweimalige Fixierung mit 100% Ethanol für jeweils 30sec. Abschließend wurden die Präparate luftgetrocknet und bis zur endgültigen Bearbeitung mit der Mikrodissektion wieder bei –80°C gelagert.

Für die Darstellung der Proliferation nach Stimulation wurden die Milzschnitte immunhistologisch gefärbt. Dabei beruhte das Prinzip auf dem APAAP-Verfahren (Alkalische-Phosphatase-Anti-Alkalische-Phosphatase), einer Form der Sichtbarmachung von spezifisch gebundenen monoklonalen Antikörpern. In unserem Fall wurden so His14-Antikörper gegen B-Zellen blau und Mib5-Antikörper gegen proliferierende Zellen rot angefärbt. Damit der Alkalische-

Phosphatase-Komplex, der aus dem Enzym Alkalische Phosphatase und einem Antikörper gegen Alkalische Phosphatase zusammengesetzt ist, in einer Substrat-Enzym-Reaktion letztendlich zu einer Anfärbung führen kann, ist ein Brückenantikörper als Bindeglied zwischen dem primären Antikörper (in unserem Fall His14 bzw. Mib5) und dem Alkalische-Phosphatase-Komplex notwendig. Somit werden um ein einzelnes spezifisches Antigen anzufärben insgesamt drei verschiedene Antikörper gebraucht. Die einzelnen Färbeschritte liefen wie folgt ab:

Zu Beginn wurden die Schnitte für jeweils 10 min erst mit Aceton, dann mit Chloroform fixiert und anschließend mit TBS-Tween (Tris-buffered-saline mit 0,05% Tween-20) gründlich gespült. Danach wurde das Gewebe bei 4° C in 4% PFA (Paraformaldehyd) für 45 min fixiert und wiederum mit TBS-Tween gespült. Anschließend wurde der erste Antikörper, nämlich His14 in einer Verdünnung von 1:50 zur B-Zellfärbung hinzugefügt und zusammen mit Rattenserum/NaCl für 1h inkubiert. Als Kontrolle wurde bei allen Färbungen ein Negativansatz mitgefärbt, der keinen spezifischen Antikörper enthielt, ansonsten aber identisch behandelt wurde. Bevor der nächste Antikörper, diesmal der Brückenantikörper RAM (1:50 verdünnt) mit 30 ml Rattenserum für 30min zugesetzt wurde, wurde gründlich mit TBS-Tween gespült. Anschließend folgte mit der Zugabe von APAAP in einer 1:50 Verdünnung der dritte Antikörper, mit dem zweimal, das erste Mal für 30 min, das zweite Mal für 15 min mit jeweils anschließendem Spülen mit TBS-Tween, inkubiert wurde. Das Hinzufügen des chromogenen Substrates sorgte dann für die farbige Darstellung der B-Zellen, an die der spezifische Antikörper gebunden hatte. Dazu wurden 4 mg Fast Blue nach dem Auftauen mit 4 ml APAAP-Substrat für 10 min vorinkubiert, filtriert und anschließend für 25 min bei Raumtemperatur auf die Präparate gegeben. Danach wurde wieder mit TBS-Tween gespült und die Schnitte für 30 min in 70% Ethanol fixiert.

Die B-Zellfärbung war damit beendet und es folgte die Darstellung der proliferierenden Zellen. Der spezifische Antikörper Mib5 richtet sich gegen das Ki67-Antigen, ein Kernprotein, das ausschließlich in proliferierenden Zellen vorhanden ist.

Um es dem Antikörper möglich zu machen, in die Zellen einzudringen, mussten die Präparate in EDTA-Puffer gestellt und für 1 h 15 min in einem Dampftopf denaturiert werden, anschliessend wurden sie mit TBS-Tween gespült und im Eisbad bei 4°C über 10 min abgekühlt. Danach wurde über Nacht der Antikörper Mib5 in einer 1:50 Verdünnung zusammen mit PBS + 1% BSA (bovine-serum-albumine) + 0,1% NaN₃ hinzugefügt und am nächsten Morgen gründlich mit TBS-Tween gespült. Die Zugabe der beiden anderen Antikörper folgte analog dem oben beschriebenen Vorgehen bei der His-Antikörper-Färbung. Anstelle des vorher benutzten blauen Farbstoffs wurden jetzt 2 mg Fast Red verwendet, die mit 3 ml APAAP-Substrat vorinkubiert wurden, bevor sie auf die Präparate gegeben wurden und dort zu einer roten Färbung der proliferierenden Zellen führten. Danach wurde nochmals mit TBS-Tween gespült und die Färbung mit Hämalaun komplettiert. Hämalaun ist eine Zellkerfärbung, durch die alle Zellen sichtbar gemacht werden und die es in Kombination mit der B-Zellfärbung leicht macht, die Kompartimente zu unterscheiden. Abschließend wurden die Präparate noch für 5 min mit PBS bei pH 7,4 behandelt und danach mit Aquatex eingedeckt.

2.4 Mikrodissektion

Mit Hilfe der Mikrodissektion (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG; Abbildung 1) wurden jeweils 2 - 2,5 Millionen μm^2 der verschiedenen Kompartimente bzw. Subkompartimente aus den Kryostatschnitten der Milz mit dem Laser ausgeschnitten. Dabei wurde zuerst unterschieden in rote Pulpa, Marginalzone, PALS und Follikel, dann wurden als Subkompartimente für alle Zeitpunkte innere und äußere PALS und ausschließlich an Tag 10 Keimzentrum und Corona des Follikels gesondert ausgeschnitten. Durch die Toluidin-Blau-Färbung kann man die verschiedenen Kompartimente gut unterscheiden und beim Herausschneiden wurde darauf geachtet nicht zu nah an die Ränder und damit Übergangszonen der Kompartimente zu kommen (Ausnahme war die äußere PALS, s. unten). Bei der Unterteilung in äußere und innere PALS wurden die Grenzen so festgelegt, dass der Bereich um die Zentralarterie, die

dabei eingeschlossen wurde, als innere PALS galt. Als sogenannte äußere PALS hingegen zählte der zur Marginalzone angrenzende Bezirk, wobei der Rand der Marginalzone eingeschlossen wurde. Diese Grenze haben wir so festgelegt, weil uns gerade der Übergangsbereich interessant erschien, da dort die Antigene, nachdem sie in der Marginalzone angekommen sind, in die PALS hineintransportiert werden. Zusätzlich haben wir die PALS nochmals in drei Bereiche gegliedert und zwar in die ausschließlich die Gefäße umfassende sowie die die Gefäße umgebende innere PALS und in die äußere PALS ohne Einbeziehung des Marginalzonenübergangs.

Die herausgeschnittenen Flächen wurden in einem mit Mineralöl benetzten Cap aufgefangen und in 300 µl einer 1:100 Mischung aus β -Mercaptoethanol und RLT-Puffer (Rneasy Mini Kit; Qiagen GmbH) gegeben. Durch 2-maliges abwechselndes Vortexen für 20 sec und Abzentrifugieren für jeweils 1 min mit 500 rpm wurde das Gewebe aufgeschlossen und denaturiert, um anschließend bei -20°C eingefroren zu werden.

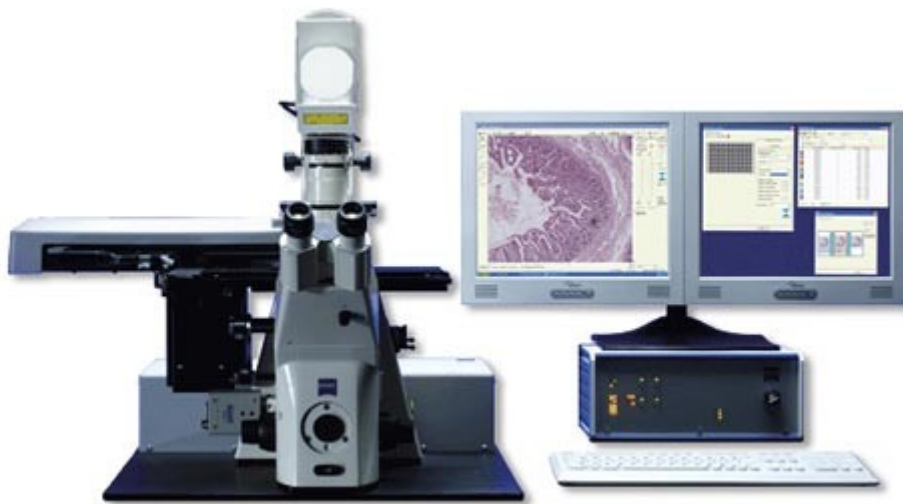


Abbildung 1: Mikroskop, Laser und Computer von der Firma P.A.L.M. wie in dieser Arbeit benutzt.

Abbildung von der Homepage: <http://www.palm-mikrolaser.com>

2.5 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Für die Weiterverarbeitung wurden die eingefrorenen Gewebelösungen aufgetaut, 1 min gevortext und mit 14500 rpm abzentrifugiert. Um die RNA aus den Proben zu gewinnen, wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH) gearbeitet.

Mit Hilfe einer Kanüle wurde die aus 300 µl bestehende Lösung in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und dort durch zehnmaliges Resuspendieren homogenisiert. Anschließend wurden 300 µl einer 70%-igen Ethanollösung dazugegeben, durch zehnmaliges Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt und auf die RNeasy Mini-Säule gegeben. Dort hat die RNA an die Matrix der Säule gebunden, während die unerwünschten Substanzen durchgelaufen sind. Nach Abzentrifugieren für 15 sec bei 10000 rpm wurde das Eluat verworfen. In mehreren Waschschritten wurden entsprechend dem Qiagen-Protokoll die nichtgebundenen Zellbestandteile wie Proteine, Kohlenhydrate, Fette und Nukleinsäuren mit RW1-Puffer bzw. RPE-Puffer aus der Säule entfernt. Mit 30 µl RNase-freiem Wasser (Qiagen GmbH) wurde anschließend die RNA aus der Säule durch einminütiges Abzentrifugieren bei 10000 rpm eluiert, nochmals auf die Säule pipettiert und zentrifugiert, um so die Ausbeute zu erhöhen. Um das Gesamtvolumen zu reduzieren wurden mit einer Kanüle fünf Löcher in den Deckel des Eppendorfgefäßes gestochen und die Proben 13 min bei 60°C in der Speedvac verdampft. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und es konnte mit der cDNA-Synthese begonnen werden.

Dafür wurden die RNA-Proben mit einer 10 µl Pipette genau ausgemessen und mit DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser, Rnase-frei) auf 12 µl aufgefüllt. Zur Entfernung genomischer DNA wurde DNase1 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) hinzugefügt und alles für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die DNase zu stoppen und die RNA-Stränge zu denaturieren, wurden 1,5 µl einer 20 mM EDTA-Lösung hinzugefügt und wieder, diesmal bei 70°C, inkubiert. Anschließend wurden, um das Zurückbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern, die Ansätze auf Eis gestellt. Die Proben wurden mit 1× Reverse Transkriptase-Puffer, 0,1 M DTT (Dithiotreitol), 10 µM

dNTP-Mix (je 10 μM dATP, dGTP, dCTP und dTTP bei neutralem pH) und 200 ng Random Primer Hexamers pro Ansatz versetzt. Zur Kontrolle der RNA-Umschreibung wurden die Ansätze in jeweils eine Positiv- und Negativ-Probe aufgeteilt. Zu den Positivproben wurden 0,5 μl der Reversen Transkriptase II (RT II; SuperScript™ II RNase H Reverse Transcriptase, 200 U/ μl , Invitrogen), zu den Negativproben DEPC-Wasser pipettiert. Die folgenden Inkubationszeiten dienten einerseits der Anlagerung der Random Primer an die RNA (10 min, 20°C), andererseits der Umschreibung der RNA in cDNA durch die RT II (50 min, 42°C). Die abschließende Inkubation für 15 min bei 70°C inaktivierte die RT II und stoppte die Reaktion. Schließlich wurden die Proben abzentrifugiert und bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren.

2.6 Quantitative real-time PCR

Die quantitative Bestimmung des Zytokin-mRNA-Musters der einzelnen Zytokine über die Zeit erfolgte mittels der real-time PCR. Die PCR dient dazu ausgewählte DNA-Abschnitte zu amplifizieren, indem nach Auftrennung des DNA-Doppelstrangs Primer für bestimmte DNA-Sequenzen angelagert werden, anschließend die Taq-Polymerase von dort aus die Kette verlängert und wieder einen komplementären Strang bildet, so werden genau die Abschnitte zwischen den Primern vervielfältigt (Tabelle 1). Nach Abschluss eines Zyklus wiederholt sich der Ablauf für insgesamt 50-mal (Abbildung 2). Das Besondere an der verwendeten real-time PCR ist, dass sie es möglich macht, die Anzahl der Amplifikate zu messen und so Rückschlüsse auf die ursprüngliche mRNA-Menge zu ziehen. Grundlage der real-time PCR ist dabei die Zugabe von Fluoreszenzsonden, deren Emission bei Bindung an einzelsträngige DNA durch einen Quencher gehemmt wird. Wird jedoch doppelsträngige DNA synthetisiert und der Fluoreszenzmarker durch die Polymerase vom Quencher abgespalten, wird Strahlung emittiert, die dann gemessen werden kann (Abbildung 3). Um zu verhindern, dass genomische DNA und nicht die gewünschte cDNA einen Beitrag zum Fluoreszenzsignal leistet, wird die Sonde überlappend an zwei Exons angelagert, so dass sie an die DNA, die dazwischen noch Introns besitzt,

nicht passt. Da die cDNA aus der mRNA hergestellt wurde, besitzt sie diese Introns nicht (Tabelle 1). Das Fluoreszenzsignal korreliert also mit der Menge an synthetisierter DNA und es ergeben sich exponentiell wachsende Kurven, die in einem Plateau enden. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Fluoreszin (fam) mit einem Emissionsmaximum bei 550 nm benutzt. Das Maß für die Expressionsstärke ist der Ct-Wert, der die PCR-Zyklusnummer bezeichnet, bei der das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal einen selbstgewählten Schwellenwert (threshold) überschreitet. Der Schwellenwert sollte im exponentiell ansteigenden Teil der Kurve liegen. Ein niedriger Ct-Wert bedeutet damit, dass früh ein hohes Fluoreszenzsignal vorhanden war und verweist auf eine hohe Expressionsstärke des zu analysierenden Gens. Ein hoher Ct-Wert entspricht einer späten Fluoreszenzdetektion und einer schwachen Genexpression.

Um einen internen Standard zu haben, zu dem man die Werte in Relation setzen kann, wurde das Housekeeping Gen MLN51 in jedem Lauf mitbestimmt. Für dieses Housekeeping Gen konnte gezeigt werden, dass die Expression in einem Gewebe unabhängig von Zelltyp und Aktivierungsstadium stabil bleibt und es sich somit eignet, die sich verändernden Expressionen anderer Zytokine daran zu messen [44].

Es wurde die mRNA-Expression der folgenden sieben Zytokine analysiert: IL2, IFN γ , IL4, IL10, IL12p40, IL15 und TGF β -1.

Das Reaktionsvolumen der PCR betrug 25 μ l mit 1 \times Mastermix (TaqMan Universal PCR Master Mix, Applied Biosystems GmbH), amplifiziert wurde mit dem ABI PRISM $^{\circledR}$ 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems GmbH). Zu Beginn der PCR findet eine 6 minütige Inkubation bei 95 $^{\circ}$ C statt, danach folgen 50 PCR Zyklen mit 95 $^{\circ}$ C (30 sec) zum Denaturieren der doppelsträngigen DNA und 60 $^{\circ}$ C (1 min) zur Primeranlagerung und Kettenverlängerung durch die Taq-Polymerase. Von jeder Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt, bei der sich nur geringfügige Schwankungen im Bereich von maximal 10% zeigten.

Tab. 1: Primer und Sonden der quantitativen PCR *

Primer/ Sonde	Nukleotid-Sequenz	Exon	Basenpaare des Amplifikats
Tgfβ 1 for	5'CTACATTTGGAGCCTGGACAC	e6	
Tgfβ1 rev	5'GCACGATCATGTTGGACAACCTG	e7	
Tgfβ1Sonde	5'CAAGGTCCTTGCCCTCTACAACCAAC	e6/e7	173
IL-2 for	5'AGCAGCTGTTGCTGGAC	e1	
IL-2 rev	5'GAGCATCATGGGGAGTTTCAG	e2	
IL2 Sonde	5'CAGGTGCTCCTGAGAGGGATCGATAATTAC	e1/e2	77
IL4 for e3	5'ATGTACCTCCGTGCTTGAAG	e3	
IL4 rev e4	5'TGAGCGTGGACTCATTAC	e4	
IL4 Sonde	5'CTTCTCAGTGAGTTCAGACCGCTGACAC	e3/4	117
IFNg for	5'TCATCGAATCGCACCTGATC	e3	
IFNg rev	5'CAGCTTTGTGCTGGATCTG	e4	
IFNg Sonde	5'CACCTCGAACTTGGCGATGCTCATG	e3/e4	114
IL10 for	5'GAGAAGCTGAAGACCCTCTG	e3	
IL10 rev	5'CATTCTTCACCTGCTCCACTG	e4	
IL10 Sonde	5'CAGCTGCGACGCTGTCATCGATTTCTC	e3/e4	94
IL15 for	5'CTACCTTGCAAACAGCAC	e7	
IL15 rev	5'GTGAAGTTTCTCTCCTCCAG	e9	
IL15 Sonde	5'CCTTGACAGCCAGACTCTATTACATTC	e8/e9	90
IL12p40	5'CCTACTTCTCCCTCAAGTTC	e6	
IL12p40	5'GCAGAGGTCTTCTCTACGAG	e7	
IL12p40 Sonde	5'CACCTTTCTGGTTACACTCCTCCTCTGTC	e6/e7	112
MLN51for	5'AGGACAGCCTTCATTCTG	e7	
MLN51rev	5'GCTTAGCTCGACCACTCTG	e9	
MLN51 Sonde	5'CACGGGAACTTCGAGGTATGCCTAACCAC	e7/e8	128

*Die Primer binden an verschiedene Exons (e), die jeweilige Sonde dann überlappend zwischen diesen forward- (for) und reverse- (rev) Primern. Angegeben ist zusätzlich noch die Anzahl der Basenpaare des resultierenden Amplifikats.

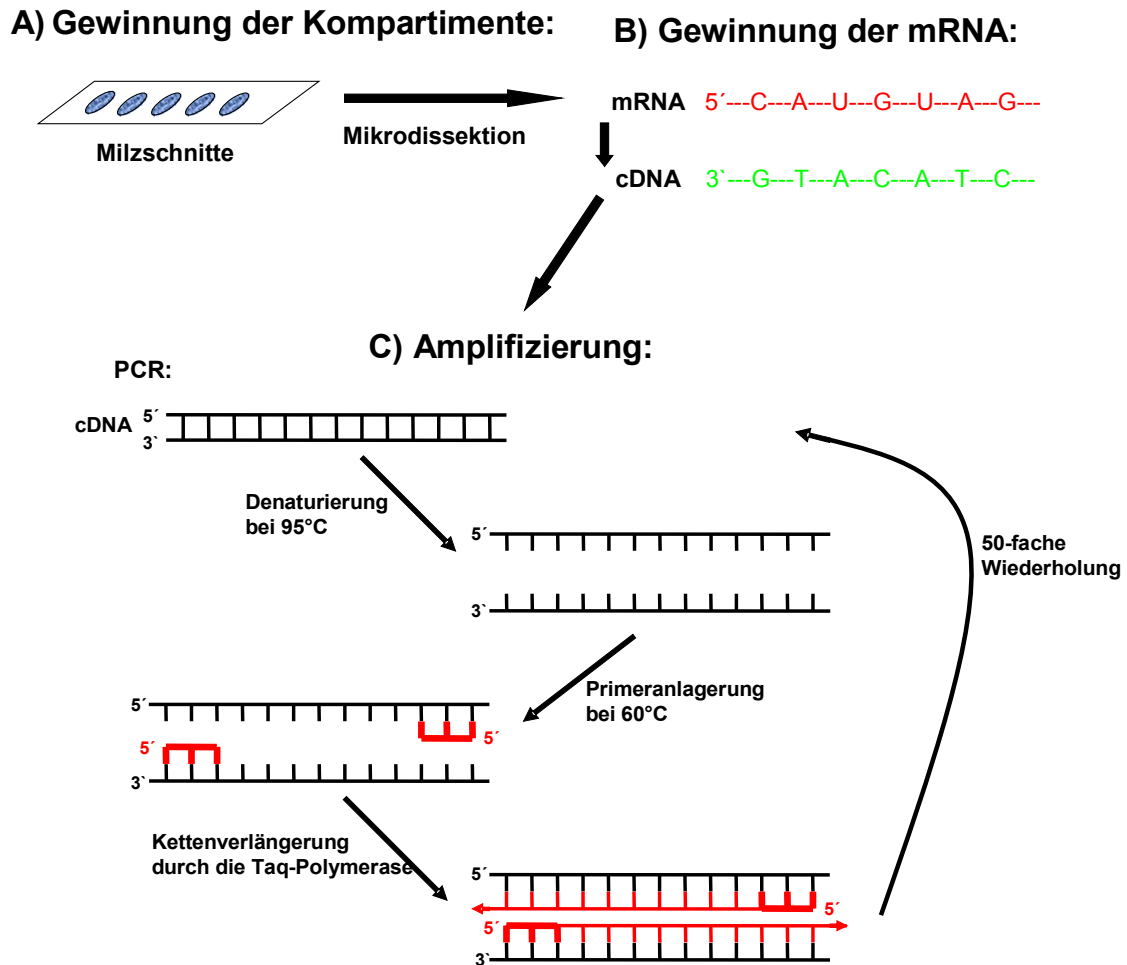


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs

A) Mit Hilfe der Mikrodissektion werden aus den Milzschnitten die verschiedenen Kompartimente ausgeschnitten.

B) Durch verschiedene Arbeitsschritte wird die mRNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben, um sie so für die Taq-Polymerase der PCR kompatibel zu machen.

C) Anschließend werden die durch bestimmte Primer definierten cDNA-Abschnitte durch die PCR amplifiziert. Dafür wird zu Beginn der Doppelstrang durch Denaturierung aufgetrennt, danach werden die Primer dazugefügt und angelagert. Schließlich findet die Kettenverlängerung durch die Taq-Polymerase statt, danach beginnt ein neuer PCR-Zyklus, insgesamt finden 50 Zyklen statt. Zur Vereinfachung ist eine normale PCR dargestellt. In der Arbeit wurde eine real-time PCR durchgeführt, dabei wird die Anzahl der Vervielfältigungen durch Fluoreszenz messbar gemacht (Abbildung 3).

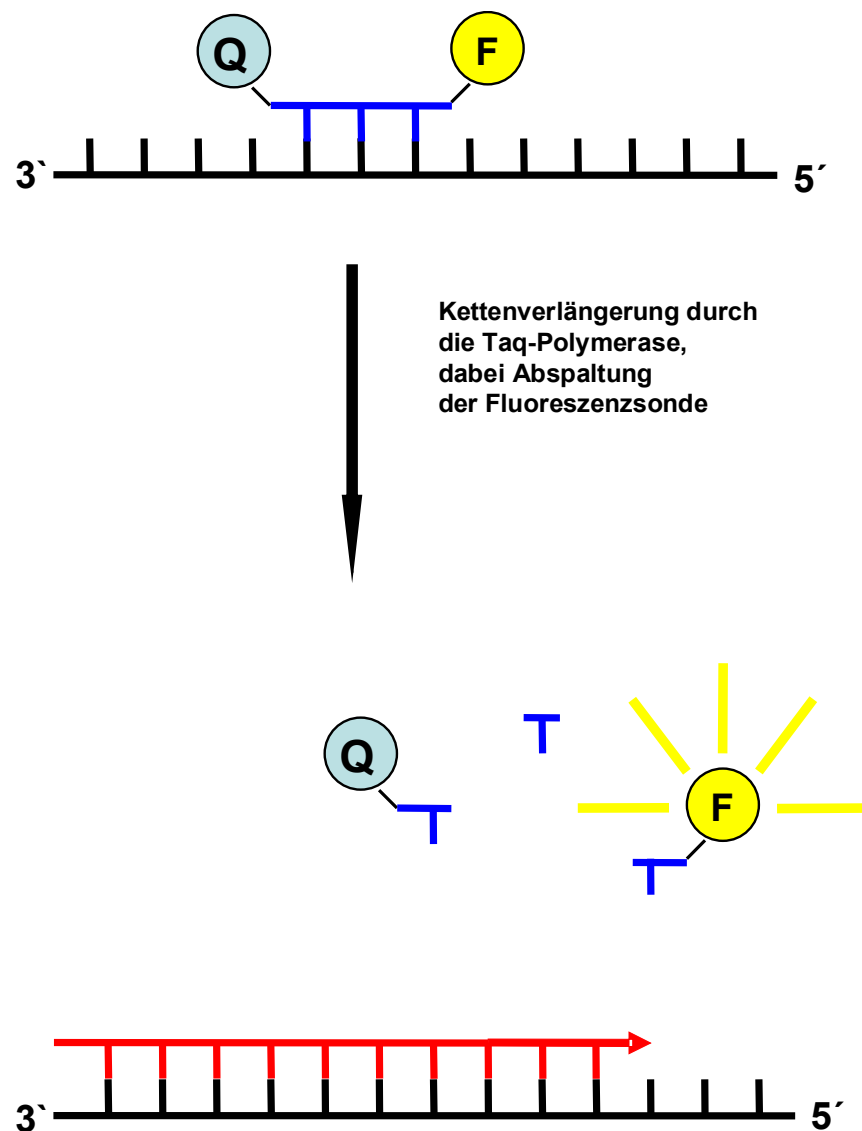


Abbildung 3: Darstellung des Prinzips der real-time-PCR

Die real-time-PCR ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Zytokine, indem nach jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen wird, die sich proportional zur DNA-Menge verhält. Dabei beruht das Prinzip darauf, dass eine Sonde, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladen ist, an DNA-Abschnitte gelagert wird, die vervielfältigt werden. Neben dem Fluoreszenzfarbstoff ist noch ein Quencher an die Sonde gebunden, der aufgrund der unmittelbaren Nähe die Emission des Fluoreszenzfarbstoffs hemmt. Bei der Amplifikation dieses DNA-Abschnitts wird die Sonde abgespalten und aufgetrennt, dadurch fällt die Hemmung durch den Quencher weg und der Fluoreszenzfarbstoff kann gemessen werden. (Q= Quencher, F= Fluoreszenzfarbstoff)

2.7 Auswertung der quantitativen PCR

Die Schwellenwerte, bei denen der jeweilige Ct-Wert abgelesen wurde, wurden mit Hilfe der Software des ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems GmbH) für alle Zytokine auf 0,15 festgelegt. Eine Ausnahme wurde bei IL2 gemacht, da dieses Zytokin in sehr geringen Mengen exprimiert wurde; hier wurde der Schwellenwert auf 0,10 festgesetzt. Die so gewonnenen Ct-Werte wurden mit Microsoft Excel 2000® ausgewertet.

Um die Ct-Werte umzurechnen in die Anzahl der vor der PCR vorhandenen Kopien braucht man die Ausgangs-Formel für die exponentielle Amplifikation der PCR, die folgendermaßen lautet: $X_n = X_0 \times (1+E_x)^n$

Dabei bedeutet: X_n : Zahl der Kopien beim n-ten PCR-Zyklus

X_0 : Zahl der initial vorhandenen Kopien

E_x : Effizienz der Amplifikation

n : Anzahl der Zyklen

Die Effizienz (E_x) sagt etwas über die Vollständigkeit der Amplifikation und die Güte der Primer aus, so bedeutet eine Effizienz von 1, dass 100% der gewünschten cDNA amplifiziert werden. Für diese Arbeit wurden die Primer in dieser Hinsicht geprüft und es kann eine Effizienz von 1 angenommen werden. Um die Werte beurteilbar und auch zwischen verschiedenen Zytokinen vergleichbar zu machen, müssen sie in Relation zu dem immer mitlaufenden Housekeeping-Gen gesetzt werden. Durch Umformen der Gleichung und Einsetzen der Effizienz gelangt man schließlich zu der Formel ($2^{\Delta Ct(\text{Zytokin}/\text{Housekeeping-Gen})}$), dabei steht ΔCt für die Differenz zwischen den Mittelwerten des Doppelansatzes des Housekeeping-Gens und des Zytokins. Das Ergebnis, das man auf diese Art berechnet, stellt dann die Kopien der jeweiligen Zytokin-mRNA pro Kopien des Housekeeping-Gens dar.

Bei der PCR kann es durch Hintergrundschwankungen zu Unterschieden bis zu 1 Ct kommen, deshalb haben wir bis zu zweifache Änderungen der Zytokinexpression nicht als relevanten Unterschied gewertet. Erst bei größeren

Unterschieden als zweifach haben wir die Daten als biologisch relevant verwertet.

Für Daten, die unterhalb der Nachweisgrenze der Methode lagen, haben wir den als von uns geringsten gemessenen Wert 0,0001 eingesetzt.

2.8 Statistik

Die Ergebnisse wurden mit SPSS 10.0 für Windows ausgewertet. Für die Daten der unstimulierten Milz wurden Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt sowie Signifikanzen für Paardifferenzen mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Dabei galt es als signifikant, wenn der p-Wert unter 0,05 lag. Aufgrund der geringen Fallzahl von n=3 Tieren bei den Ergebnissen der stimulierten Milz wurden die Tiere hier einzeln aufgetragen.

Die gezeigten Graphiken wurden mit SigmaPlot® 2001 für Windows erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative Expression der untersuchten Zytokine

Um ein umfassendes Bild über das Zytokinmilieu der Milz in der Ratte zu gewinnen, wollten wir zunächst eine grundsätzliche Vorstellung über das Vorkommen und die Expressionsstärke der verschiedenen Zytokine bekommen. Dafür haben wir ganze Schnitte unstimulierter Tiere untersucht und dort die jeweilige Expression bestimmt (Abbildung 4).

Als erstes Ergebnis konnten wir dabei *in vivo* feststellen, dass alle Zytokine messbar sind, damit also schon in der unstimulierten Milz und nicht erst nach Stimulation exprimiert werden und das Zytokinmilieu mitbestimmen. Es fiel auf, dass sich die Expressionsstärke erheblich unterschied, so dass die Werte gemeinsam nur in einer logarithmischen Skala aufgetragen werden konnten. So stellt IL4 das am geringsten exprimierte Zytokin dar und wird damit über 900-fach niedriger exprimiert als TGF β -1. IL2 und IFN γ werden im Vergleich zu IL4 10-20fach stärker exprimiert, IL10 und IL12 35-60fach. IL15 und TGF β -1 kommen am reichhaltigsten vor.

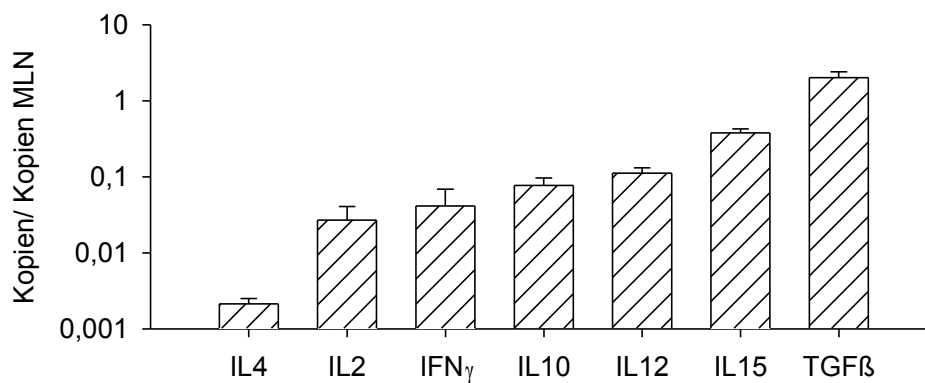


Abbildung 4: Die untersuchten Zytokine werden permanent exprimiert und zeigen große quantitative Unterschiede

Dargestellt sind alle untersuchten Zytokine von ganzen Milzschnitten als Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Tiere waren nicht stimuliert. Zu beachten ist die logarithmische Skala (n=5; MLN ist der Name des Housekeeping-Gens, dessen Expression immer gleich bleibend ist und das sich deshalb als Bezugsgröße eignet).

3.2 Das Zytokinmilieu der unstimulierten Milz

Bevor man sich mit der Immunantwort beschäftigt, die Veränderungen in der Milz hervorruft, muss das Grundmilieu in den verschiedenen Kompartimenten untersucht werden. Wir haben deshalb die Kompartimente PALS, Follikel, Marginalzone und rote Pulpa unterschieden und sie besonders im Hinblick auf die Einordnung in das TH1-/ TH2-Milieu untersucht. Die von uns ausgewählten Zytokine lassen sich dem TH1- bzw. TH2-Milieu zuordnen, dabei zählen IL12, IL2 und IFN γ zu den TH1-Zytokinen, IL4 und IL10 zu den TH2-Zytokinen; IL15 und TGF β -1 haben unter anderem bei der Homöostase der Immunzellen verschiedene Funktionen.

3.2.1 Dominanz der TH1-Zytokine in der PALS und der TH2-Zytokine im Follikel

Mit der Untersuchung der Milz und ihrer verschiedenen Kompartimente wollten wir herausfinden, ob und wie sich das Zytokinmilieu in den verschiedenen Regionen unterscheidet. Dabei entspricht die PALS der Zone, wo sich überwiegend T-Zellen aufhalten, der Follikel hingegen ist ein B-zellreiches Gebiet. Nach bisherigen Experimenten gilt für die TH1- und TH2-Zytokine, dass sie von aktivierten CD4⁺-T-Zellen produziert werden. Unsere Ergebnisse haben im Vergleich zwischen PALS und Follikel bei den beiden TH1-Zytokinen IL12 und IL2 eine Dominanz in der PALS gezeigt, für IFN γ fand sich kein Unterschied. Somit kann man sagen, dass in der PALS ein TH1-Milieu vorliegt (Abbildung 5).

Die TH2-Zytokine hingegen verhielten sich genau umgekehrt; sowohl für IL4 als auch für IL10 fanden sich signifikant höhere Expressionen im Follikel als in der PALS. Damit liegt im Follikel ein TH2-Milieu vor (Abbildung 6).

Zusätzlich war IL15 in der PALS deutlich höher messbar als im Follikel, TGF β -1 zeigte keinen Unterschied (Abbildung 7).

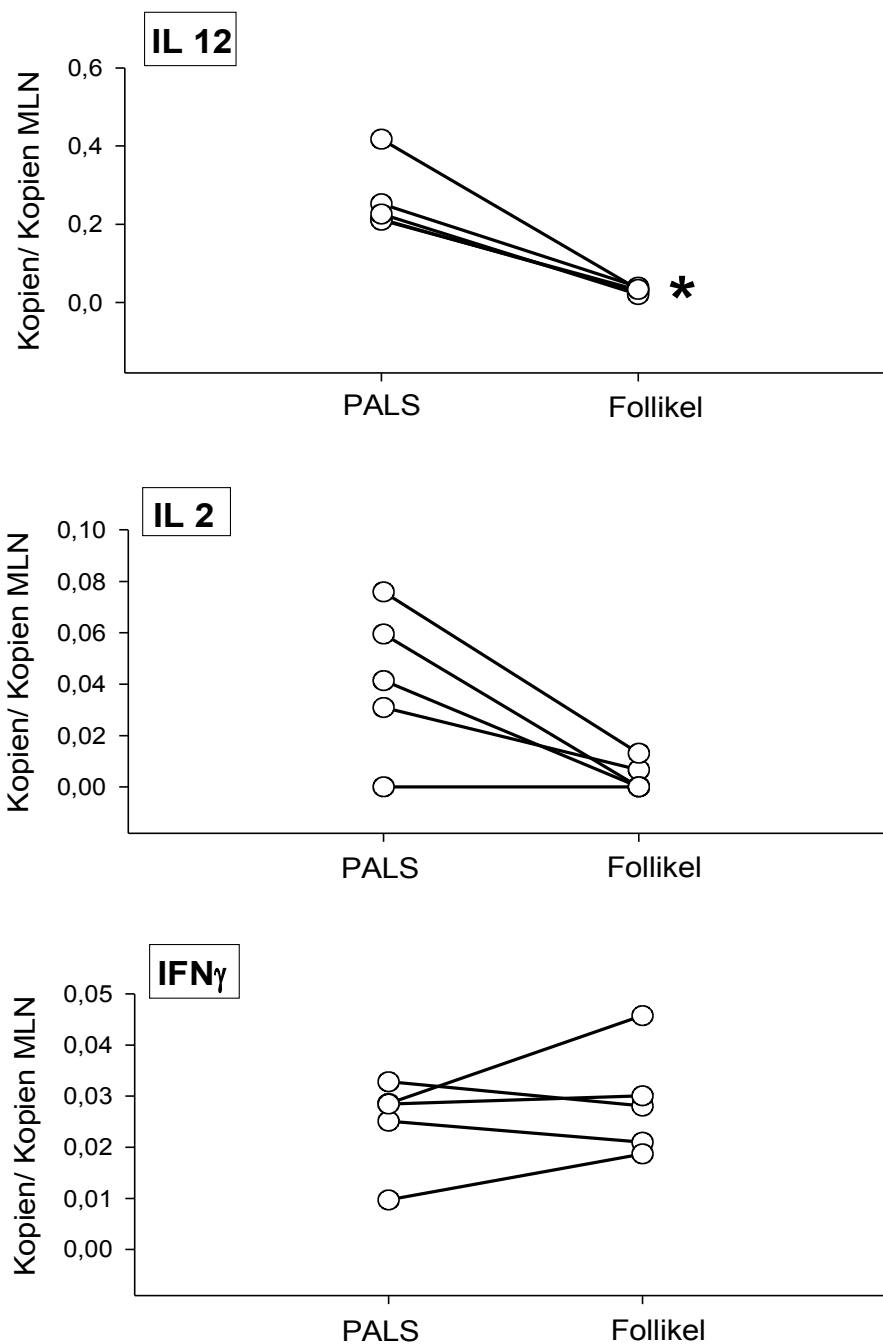


Abbildung 5: TH1-Milieu in der unstimulierten PALS

Aus Kryostatschnitten einer unstimulierten Milz wurden mit der Mikrodisektion PALS und Follikel isoliert und die Zytokine der TH1-Gruppe untersucht. Die Werte aus jeweils derselben Milz sind verbunden. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung (n=5).

* : signifikante Abweichung mit $p < 0,05$

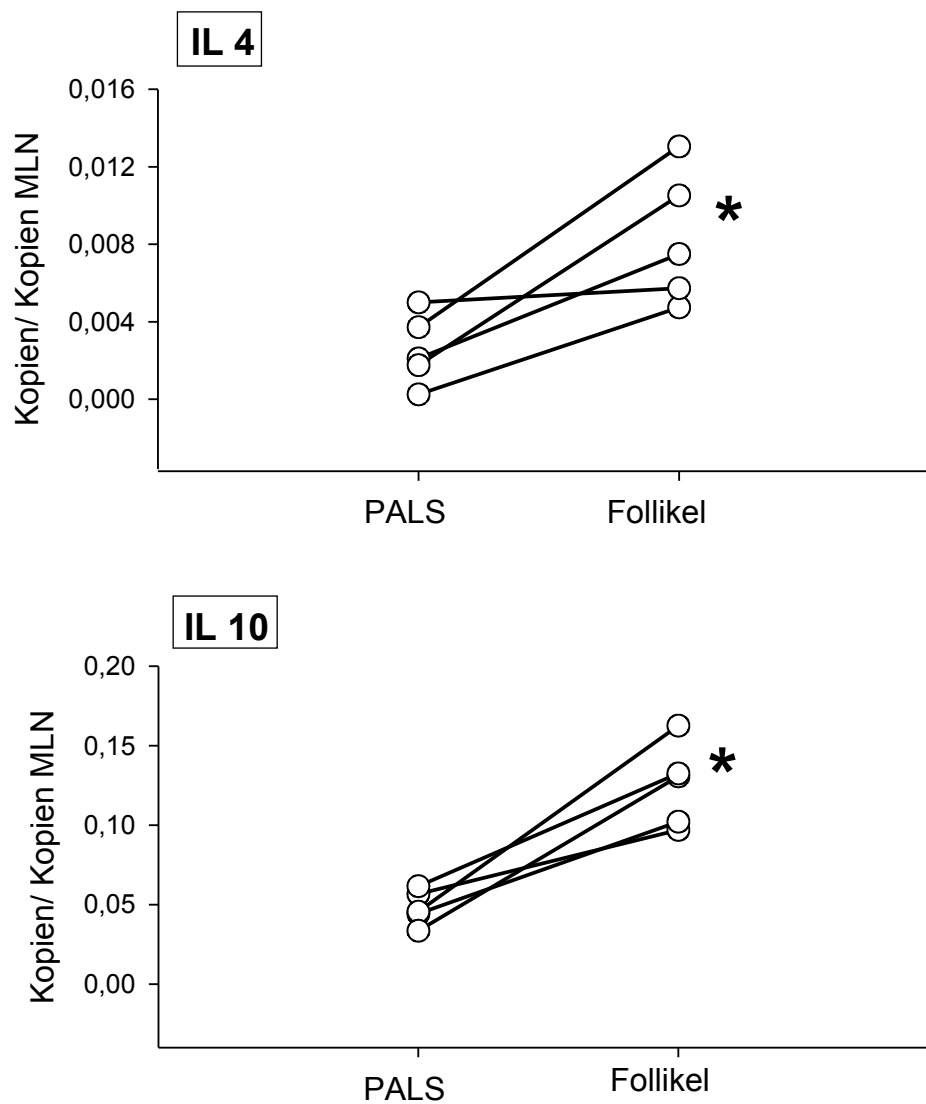


Abbildung 6: TH2-Milieu im unstimulierten Follikel

Untersucht wurden Kryostatschnitte unstimulierter Milzen mit der Mikrodissektion, dabei wurden PALS und Follikel isoliert und die Zytokinexpressionen von IL4 und IL10 gemessen. Die Werte aus jeweils derselben Milz sind verbunden. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung. (n=5).

* : signifikante Abweichung mit $p < 0,05$

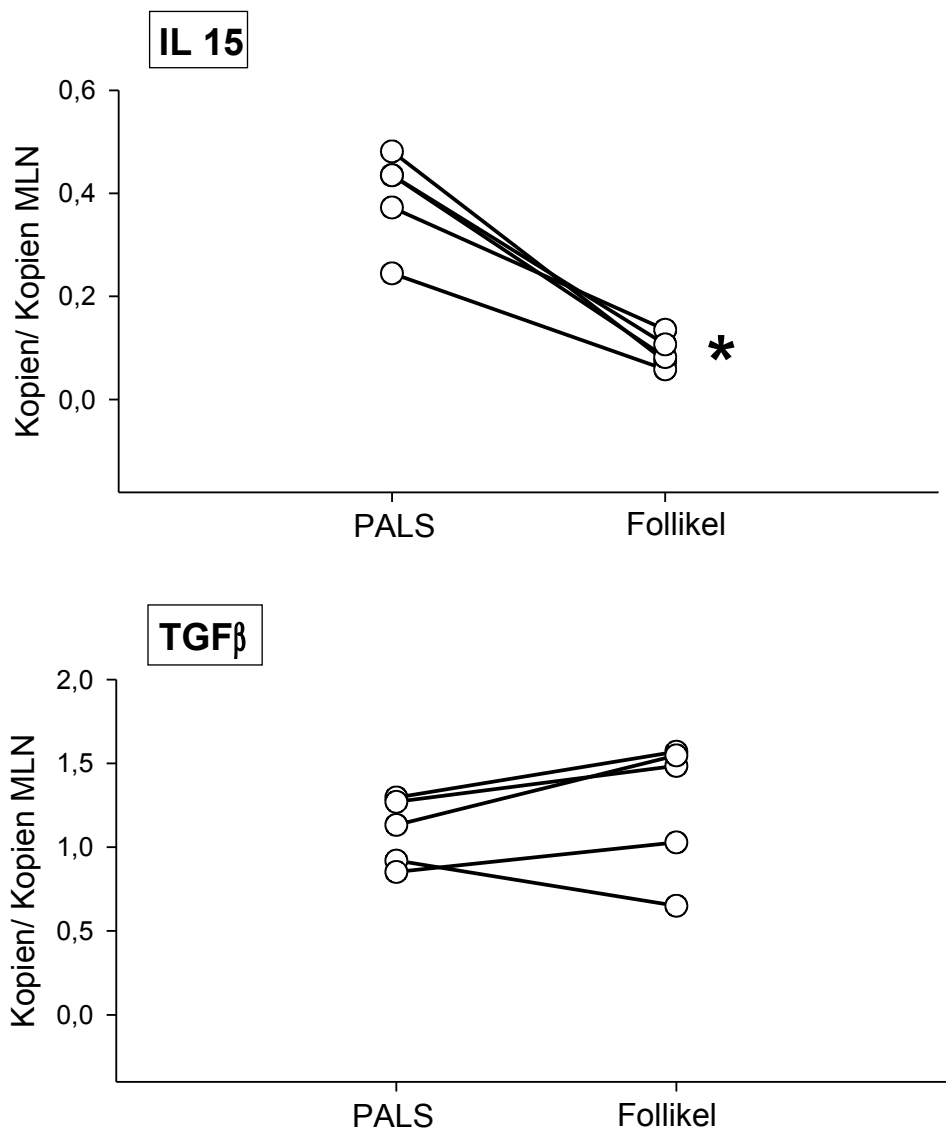


Abbildung 7: Expression von IL15 und TGFβ-1 im Vergleich PALS-Follikel

IL15 zeigt eine stärkere Expression in der PALS, für TGFβ-1 lässt sich kein Unterschied feststellen. Untersucht wurden Kryostatschnitte unstimulierter Milzen mit der Mikrodisektion, dabei wurden PALS und Follikel isoliert und die Zytokinexpressionen von IL15 und TGFβ-1 gemessen. Die Werte aus jeweils derselben Milz sind verbunden. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung. (n=5)

* : signifikante Abweichung mit $p < 0,05$

3.2.2 Vergleichbares Zytokinmuster in Follikel, Marginalzone und roter Pulpa

Die Marginalzone ist wie der Follikel ein sehr B-zellreiches Gewebe und lässt damit auch ein ähnliches Zytokinmilieu wie im Follikel erwarten. Trotzdem fanden wir für IL10 und IL15 signifikante Unterschiede, so wurde IL10 im Follikel deutlich höher exprimiert, IL15 hingegen in der Marginalzone. Die übrigen Zytokine jedoch glichen sich, so dass man insgesamt von einem TH2-geprägten Expressionsmuster ausgehen kann (Abbildung 8).

Die rote Pulpa stellt ein sehr inhomogenes Gewebe dar, in dem sich unregelmäßig verteilt verschiedene Zellen aufhalten. Überraschenderweise fallen jedoch im Vergleich mit dem Zytokinmilieu des Follikels nur wenige signifikante Unterschiede auf. So wurden IL2 und IL15 in der roten Pulpa signifikant erhöht gefunden, für IL15 fanden sich hier sogar im Bezug auf alle Kompartimente die höchsten Werte. IL12, IFN γ , die TH2-Zytokine und TGF β -1 wurden in Follikel und roter Pulpa hingegen in vergleichbarer Höhe exprimiert (Abbildung 9), so dass auch hier ein TH2-Milieu vorliegt.

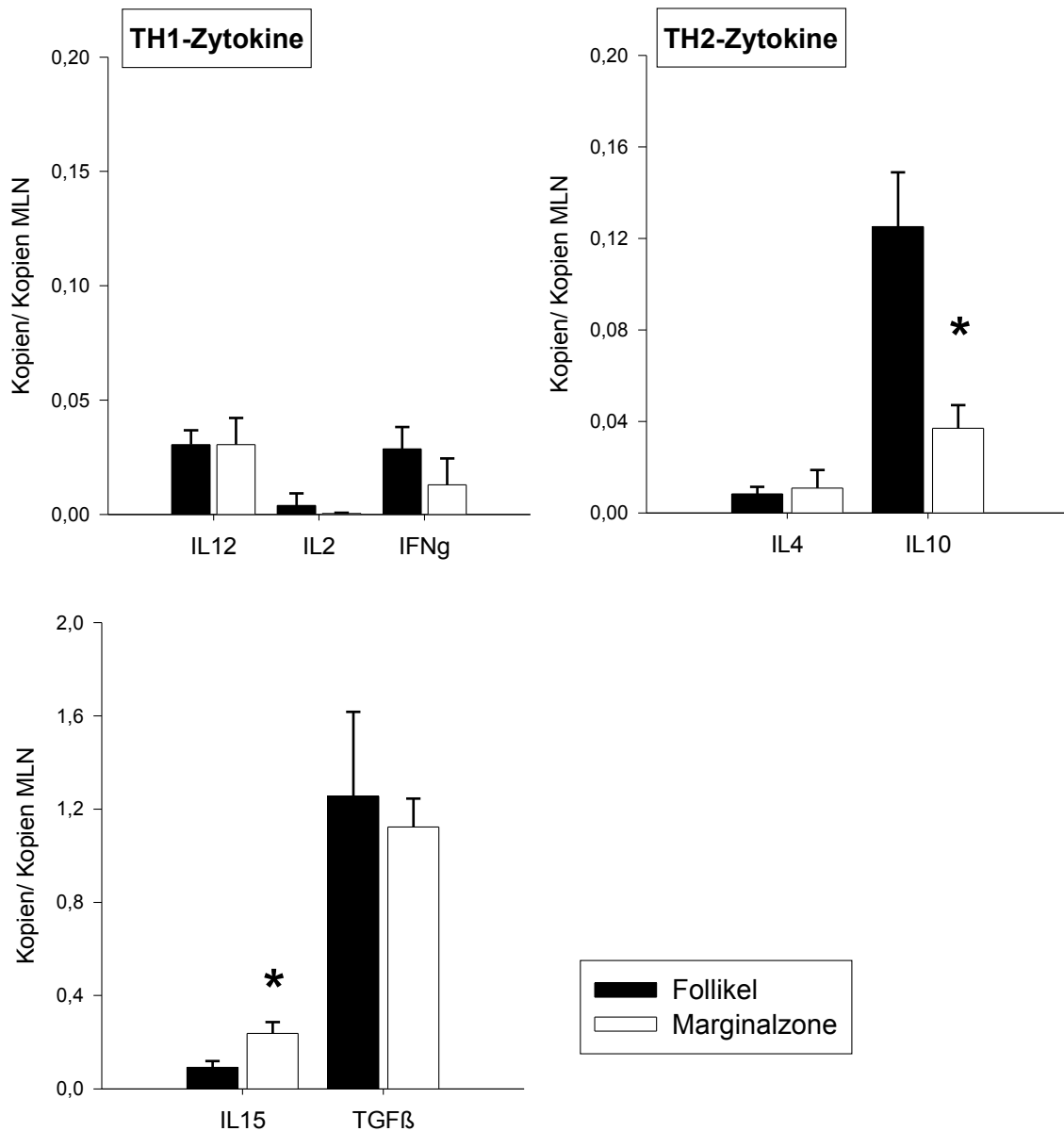


Abbildung 8: Vergleich des Zytokinmilieus von Follikel und Marginalzone

Sowohl Follikel als auch Marginalzone sind B-Zellzonen und wurden im Hinblick auf Unterschiede ihrer Zytokinexpression einander gegenübergestellt. Dabei fanden sich überwiegend ähnliche Expressionshöhen, nur IL10 wurde signifikant niedriger und IL15 höher in der Marginalzone exprimiert. Die Tiere waren nicht stimuliert. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung. (n=5)

* : signifikante Abweichung mit $p < 0,05$

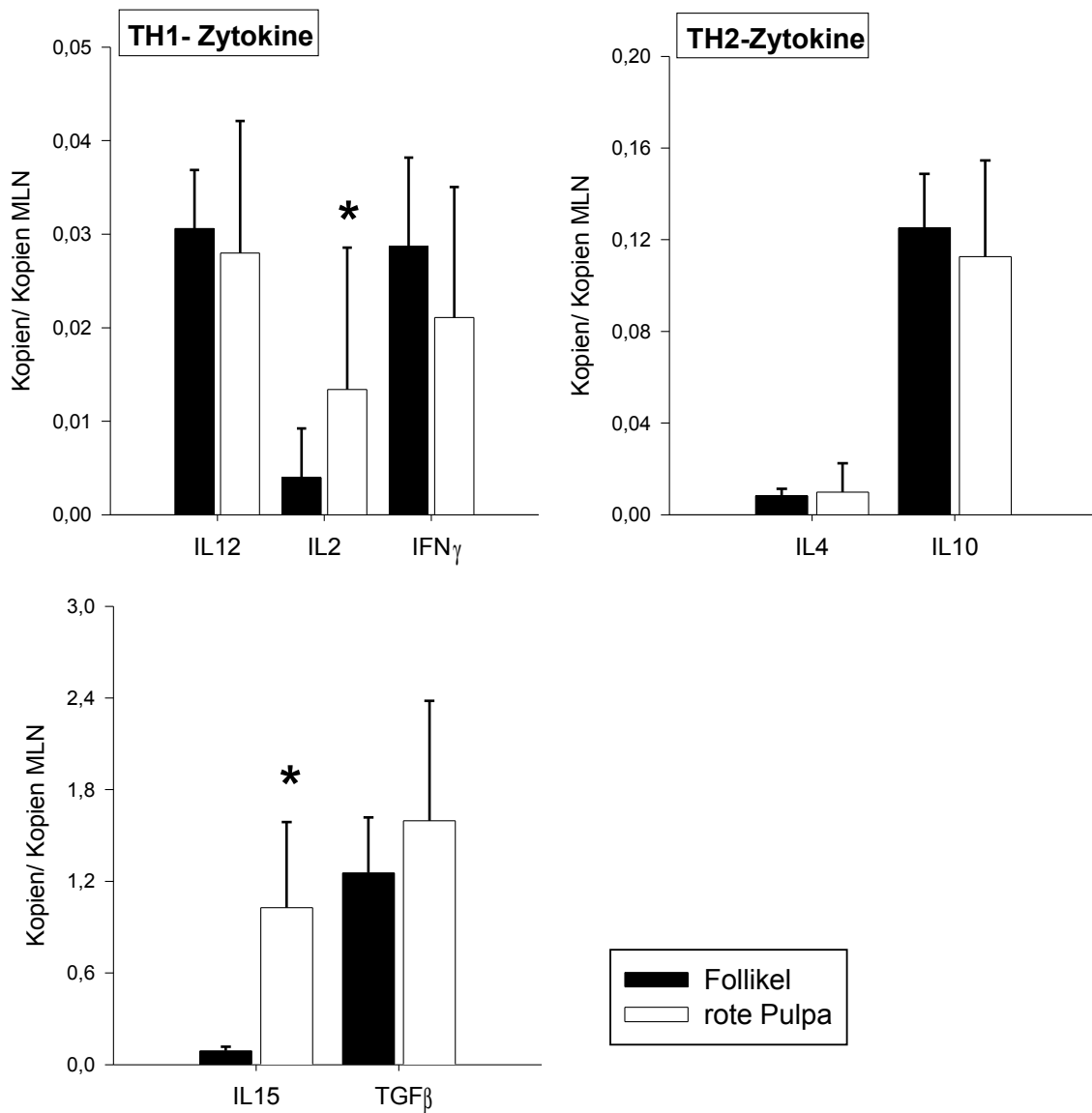


Abbildung 9: Vergleich des Zytokinmilieus von Follikel und roter Pulpa

Die Untersuchung des Zytokinmilieus ergab für die rote Pulpa keine wesentlichen Unterschiede zum Follikel, nur für die Zytokine IL2 und IL15 zeigte sich, dass sie in der roten Pulpa höher expremiert werden. Die Tiere waren nicht stimuliert. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichung. (n=5)

* : signifikante Abweichung mit $p < 0,05$

3.2.3 Untersuchung ganzer Milzschnitte zeigt indifferentes Zytokinbild

Um zu verdeutlichen, welche Vorteile und zusätzlichen Informationen die Untersuchung der in einzelne Kompartimente gegliederten Milz ergibt, haben wir das Verhältnis der TH1- zu den TH2-Zytokinen dargestellt. Dieses Verhältnis bezeichnet man als Ratio; sie wird berechnet, indem zu jedem Tier und für jedes Kompartiment der Mittelwert der drei TH1-Zytokine und der Mittelwert der beiden TH2-Zytokine gebildet und diese Mittelwerte anschließend ins Verhältnis gesetzt werden. Zuletzt werden die errechneten Verhältnisse aller 5 Tiere gemittelt. Bei einer gleich starken Expression von TH1- und TH2-Zytokinen läge die Ratio bei 1; überwiegen die TH1-Zytokine, ist die Ratio größer 1, dominieren die TH2-Zytokine, ist sie kleiner als 1.

Im ganzen Schnitt fanden wir trotz der Tendenz zum TH1-Milieu kein signifikantes in eine Richtung weisendes Ergebnis. Erst die genauere Untersuchung der Kompartimente zeigt die Zuordnung zum TH1- bzw. TH2-Milieu. Dabei erkennt man deutlich, dass die PALS von TH1-Zytokinen dominiert wird, wohingegen in der Marginalzone, dem Follikel und der roten Pulpa ein TH2-Milieu vorliegt (Abbildung 10). Die alleinige Untersuchung des ganzen Schnittes hätte diese Erkenntnisse nicht möglich gemacht.

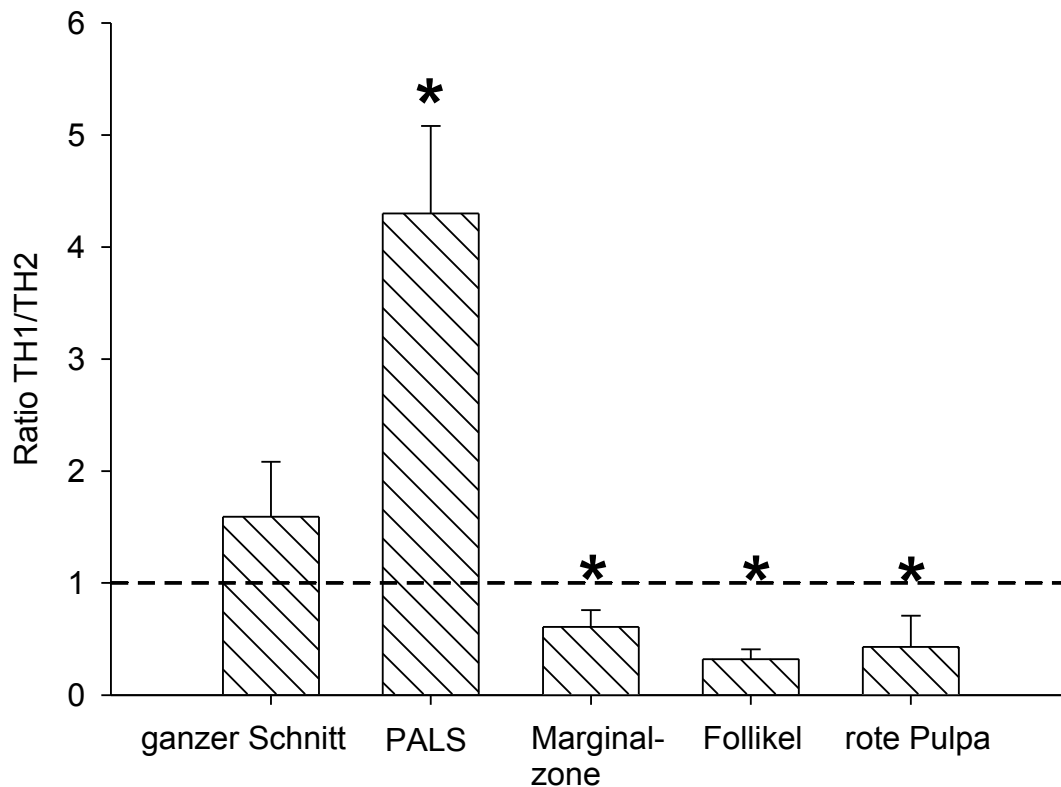


Abbildung 10: Die Aufteilung der Kompartimente in TH1- und TH2-Milieu ist im ganzen Schnitt nicht detektierbar

Die Berechnung der Ratio der TH1- und TH2-Zytokine zeigt in der PALS ein deutliches TH1-Milieu an, in den übrigen Kompartimenten hingegen ein TH2-Milieu. Im ganzen Schnitt kann man keine eindeutige Zuordnung feststellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Ratio mit Standardabweichung. Eine Ratio gleich 1 bedeutet eine gleichmäßige Expression der TH1- und TH2-Zytokine, bei Überwiegen der TH1-Zytokine steigt der Wert auf größer 1, dominieren die TH2-Zytokine, sinkt der Wert auf kleiner 1. Alle Ergebnisse sind signifikant gegenüber dem ganzen Schnitt. (n=5)

* : signifikante Abweichung mit $p < 0,05$

3.3 Induktion einer Immunantwort in der Milz

Um Veränderungen des Expressionsmusters in der Milz bei einer Immunantwort beobachten zu können, haben wir durch die Injektion von Schaferythrozyten eine lokale, T-Zell-abhängige Immunantwort induziert [81]. Wir haben 1, 3, 6, 8 und 10 Tage nach Injektion die Milzen entnommen, sie immunhistologisch analysiert und ihr Zytokinmilieu in den verschiedenen Kompartimenten untersucht, um so den Ablauf dieser Veränderungen auf lokaler Ebene genauer und besser zu verstehen.

Schon immunhistochemisch zeigen sich über die untersuchten Zeitpunkte hinweg deutliche Veränderungen in den Kompartimenten, die in Abbildung 11 und 12 dargestellt sind. Dabei wurden proliferierende Zellen immunhistologisch markiert und durch roten Farbstoff hervorgehoben. Auf den Übersichtsbildern (Abbildung 11) kann man deutlich die Entwicklung von Keimzentren, die von proliferierenden Zellen angefüllt sind, im Zeitraum von Tag 1 zu Tag 10 nachvollziehen. In den stärkeren Vergrößerungen von Abbildung 12 zeigt sich, dass die Induktion einer Immunantwort zuerst zu Proliferation in der PALS führt und sich dann mit fortschreitender Zeit die proliferierenden Zellen in das neu gebildete Keimzentrum verlagern. In den Kompartimenten Marginalzone und rote Pulpa lässt sich nur wenig Proliferation feststellen.

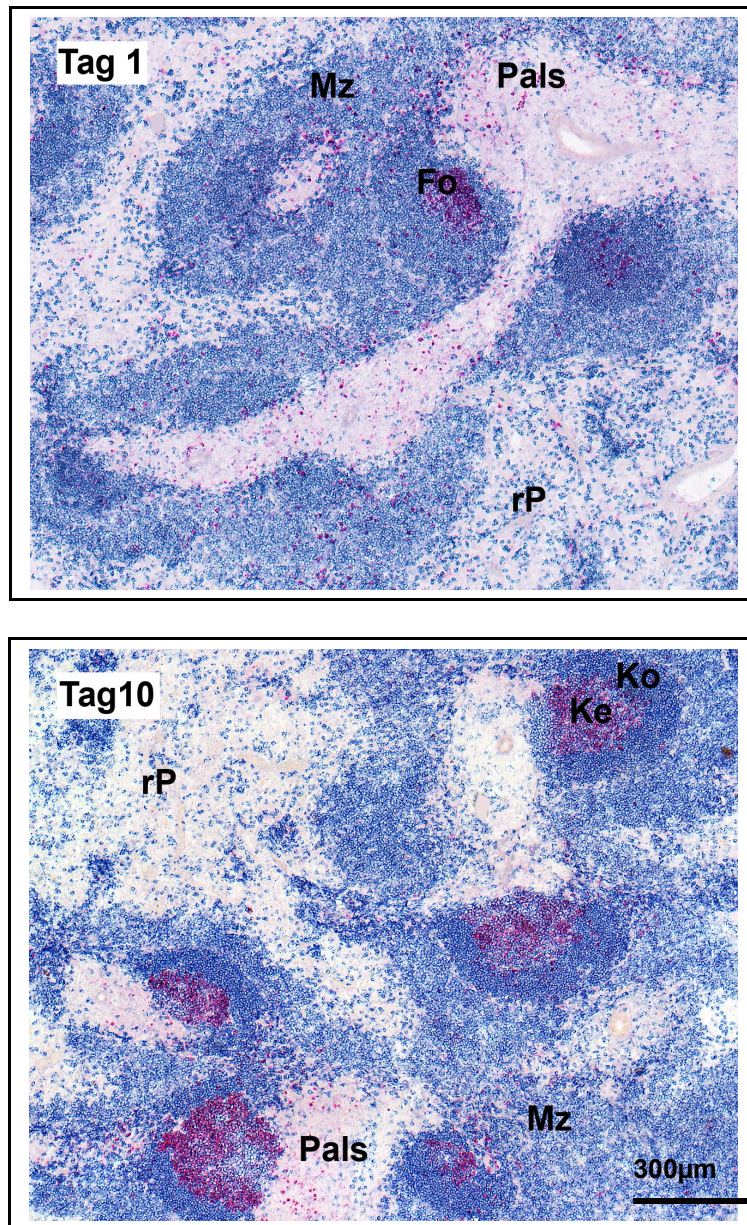


Abbildung 11: Bildung von Keimzentren nach Stimulation der Milz

Die Abbildungen zeigen Ausschnitte immunhistologisch gefärbter Präparate der Milz an Tag 1 und Tag 10 mit 50facher Vergrößerung. B-Zellen sind blau, proliferierende Zellen rot dargestellt. Man kann deutlich die verschiedenen Kompartimente der Milz unterscheiden.

Tag 1: Am Tag nach der Erythrozyteninjektion finden sich noch keine Anzeichen einer spezifischen Immunreaktion. Das Bild entspricht dem einer ruhenden Milz, in der immer einige Zellen proliferieren und somit wenige Keimzentren vorhanden sind.

Tag 10: Am zehnten Tag haben sich in allen Follikeln deutliche Keimzentren mit proliferierenden Zellen gebildet, die sich hier als rote Areale darstellen, der sie umgebende Bereich wird jetzt als Korona bezeichnet.

(rP= rote Pulpa; Mz= Marginalzone; Fo= Follikel; Ke= Keimzentrum; Ko= Korona)

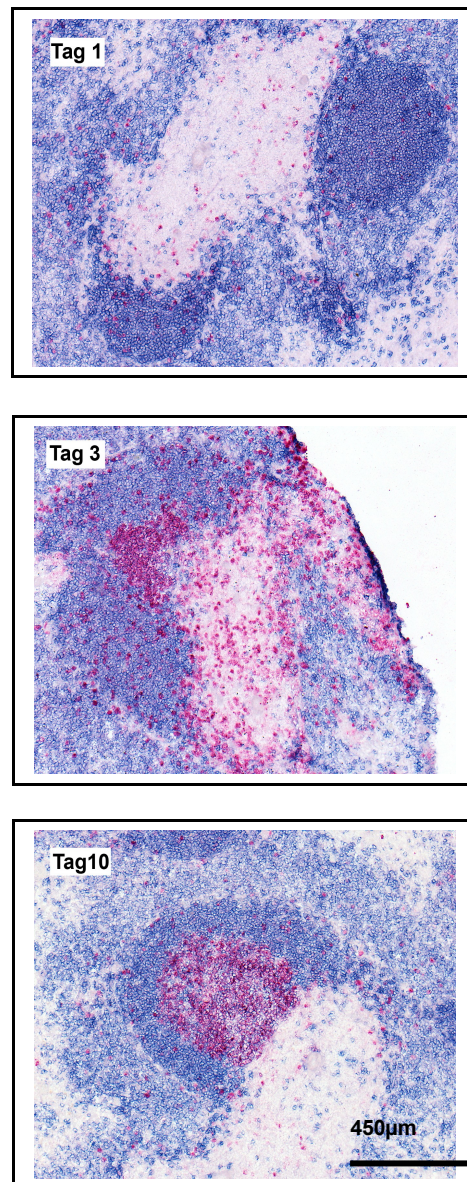


Abbildung 12: Verteilung proliferierender Zellen während einer Immunreaktion

Die Abbildungen zeigen Ausschnitte immunhistologisch gefärbter Präparate der weißen Pulpa an Tag 1, 3 und 10 nach Stimulation. B-Zellen sind blau, proliferierende Zellen rot dargestellt.

Tag 1: Am ersten Tag nach Stimulation gibt es noch keine Anzeichen für eine beginnende Immunreaktion, es finden sich nur vereinzelte proliferierende Zellen.

Tag 3: Am dritten Tag hingegen ist die PALS mit proliferierenden Zellen angefüllt, die sich besonders am äußeren Rand befinden. Auch der Beginn einer Keimzentrumsbildung ist festzustellen.

Tag 10: Am zehnten Tag sind die Veränderungen in der PALS wieder zurückgegangen und sie stellt sich ähnlich wie am ersten Tag dar. Dafür aber hat sich ein deutliches Keimzentrum gebildet. (100fache Vergrößerung)

3.3.1 *Stimulation führt zu frühen Veränderungen der TH1-Zytokine in der PALS*

Wir haben uns die Zytokinexpression der TH1-Zytokine nach Stimulation über einen Zeitraum von 10 Tagen angesehen. Dabei waren im ganzen Milzschnitt keine Veränderungen zu detektieren. Durch die Nutzung der Mikrodissektion konnten wir jedoch auch die einzelnen Kompartimente untersuchen und so die Sensitivität erhöhen und es zeigte sich, dass besonders in der PALS Veränderungen des Milieus stattfanden und dieses ausschließlich zu frühen Zeitpunkten. So war dort die Expression von IL12 an den Tagen 1 und 3 erniedrigt, um danach wieder auf ihren Normalwert zurückzukehren (Abbildung 13a). IL2 (Abbildung 13b) und IFN γ (Abbildung 13c) hingegen verhielten sich genau umgekehrt, indem sie beide deutlich erhöhte Werte an Tag 1 aufwiesen. Im Follikel rief die Stimulation der Milz bei den TH1-Zytokinen keine Veränderungen hervor. Und auch die Marginalzone änderte ihr Zytokinmilieu nicht.

3.3.2 *Keine Expressionänderungen bei den TH2-Zytokinen, IL15 und TGF β -1*

Die Untersuchung der TH2-Zytokine IL4 und IL10 (Abbildung 14), sowie von TGF β -1 und IL15 (Abbildung 15) hat in keinem der Kompartimente Veränderungen in der Expression ergeben.

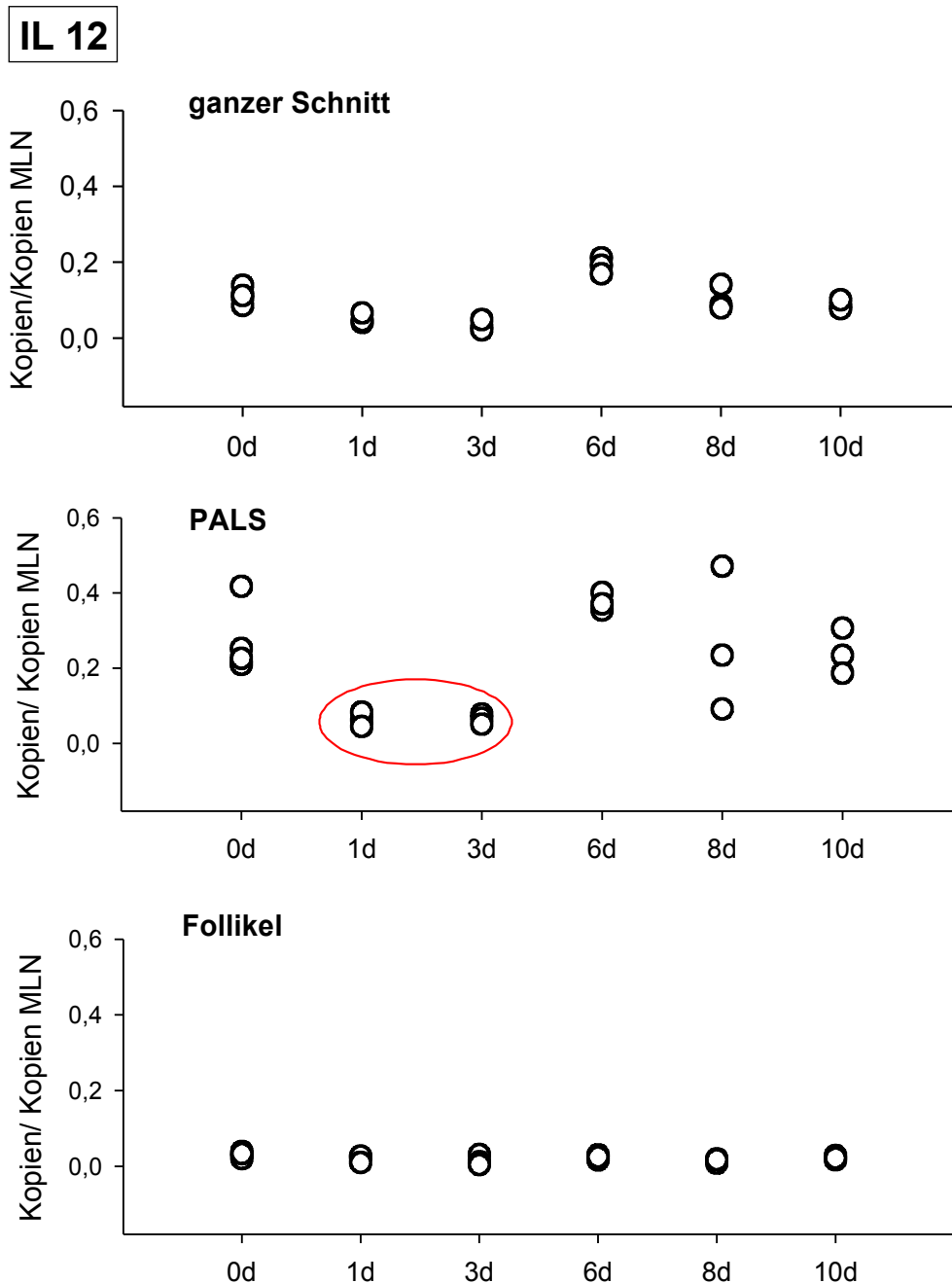


Abbildung 13a: Stimulation führt zum Rückgang von IL12 in der PALS

Der Rückgang der Zytokinexpression lässt sich nicht im ganzen Schnitt nachvollziehen und erfordert die Untersuchung der einzelnen Kompartimente. Dargestellt ist die Zytokinexpression von IL12 im ganzen Schnitt, in der PALS und im Follikel, nachdem den Ratten zum Zeitpunkt 0 Tage Schaferthozyten gespritzt wurden und so eine Immunantwort in der Milz induziert wurde. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Werte für den ganzen Schnitt, für die PALS und für den Follikel bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

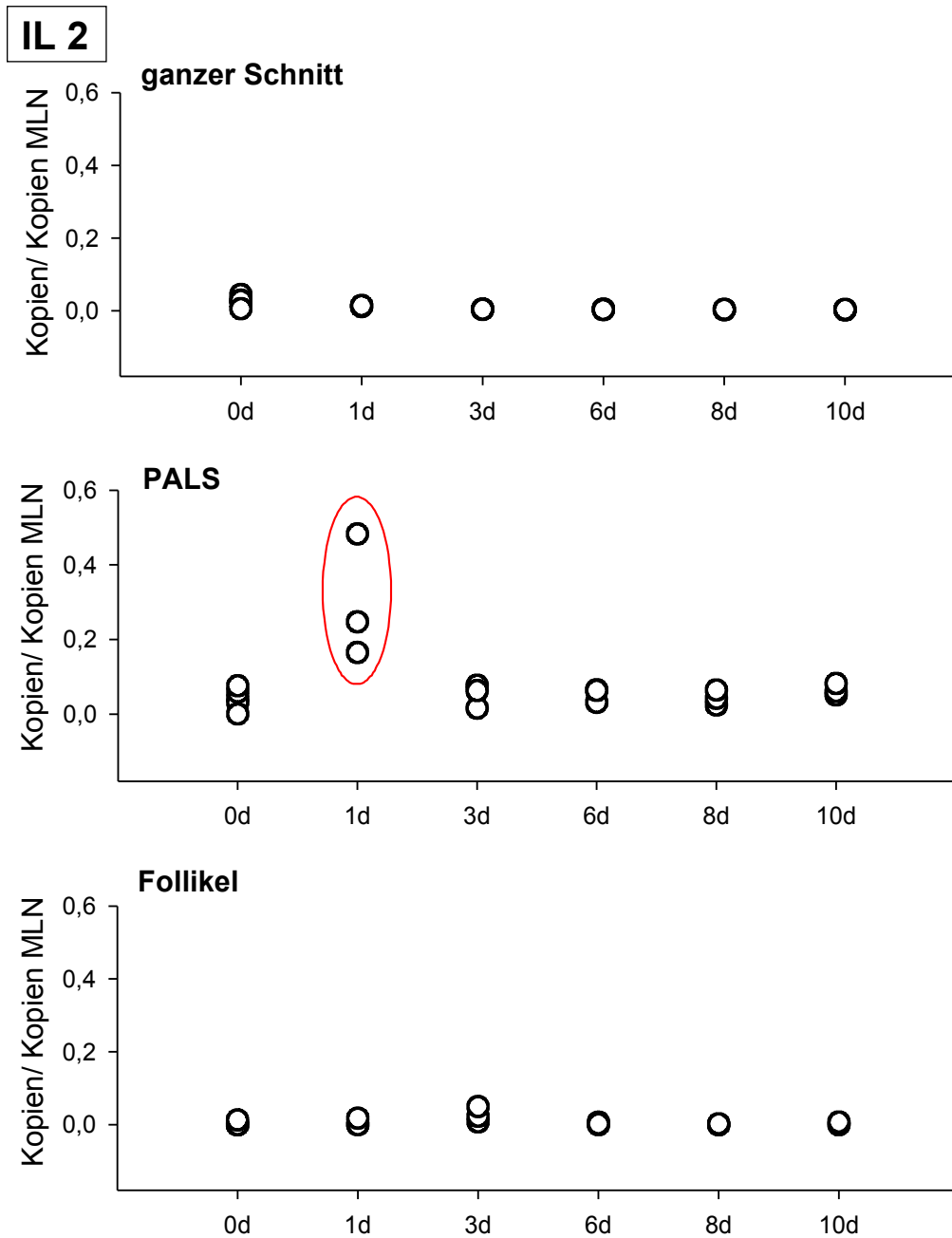


Abbildung 13b: Stimulation führt zu einem Anstieg von IL2 in der PALS

Die Erhöhung der Zytokinexpression lässt sich nicht im ganzen Schnitt nachvollziehen und erfordert die Untersuchung der einzelnen Kompartimente. Dargestellt ist die Zytokinexpression von IL2 im ganzen Schnitt, in der PALS und im Follikel, nachdem den Ratten zum Zeitpunkt 0 Tage Schaferthozyten gespritzt wurden und so eine Immunantwort in der Milz induziert wurde. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden verschiedene Werte für den ganzen Schnitt, für die PALS und für den Follikel bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

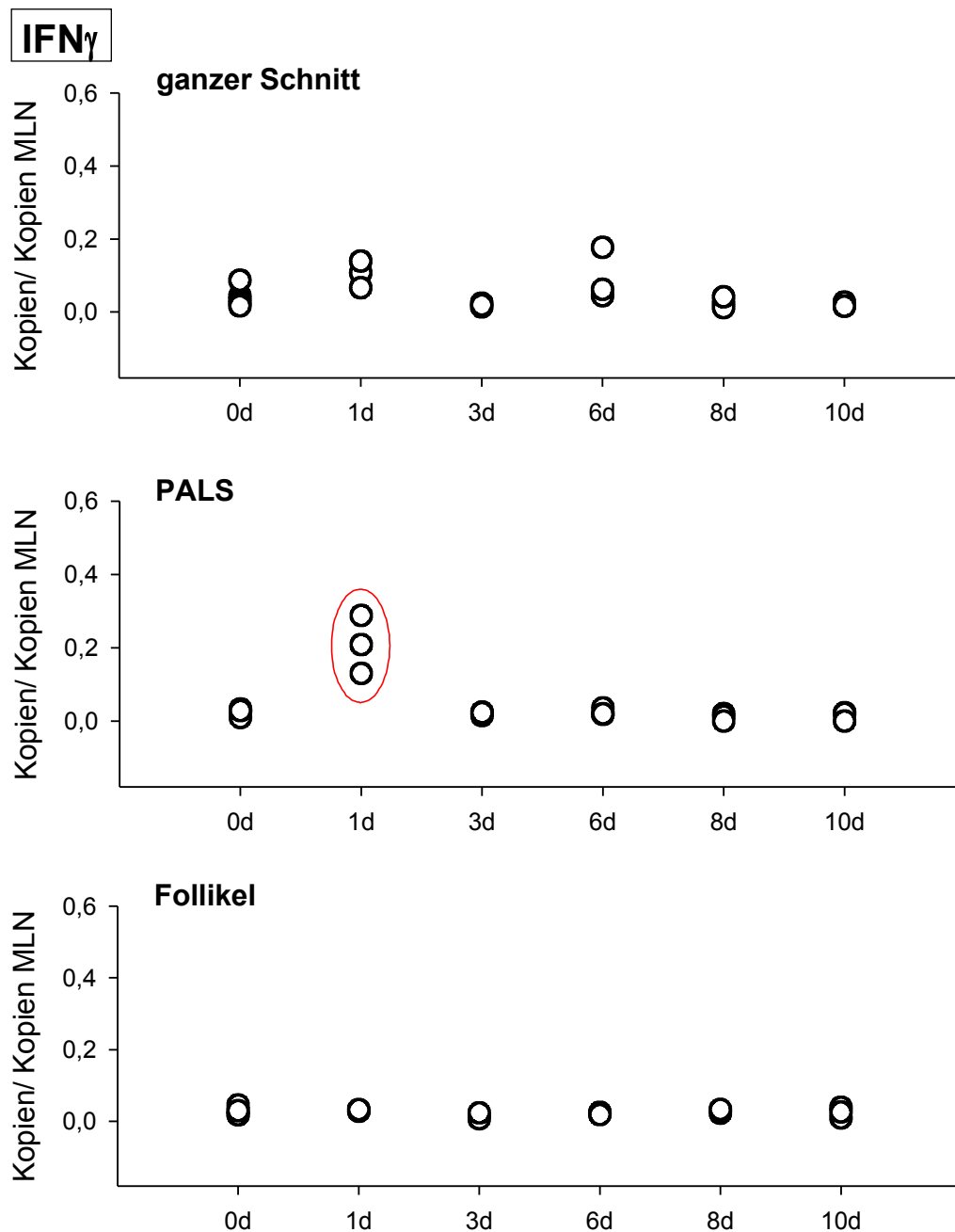


Abbildung 13c: Stimulation führt zu einem Anstieg von IFN γ in der PALS

Die Erhöhung der Zytokinexpression lässt sich nicht im ganzen Schnitt nachvollziehen und erfordert die Untersuchung der einzelnen Kompartimente. Dargestellt ist die Zytokinexpression von IFN γ im ganzen Schnitt, in der PALS und im Follikel, nachdem den Ratten zum Zeitpunkt 0 Tage Schaferthromozyten gespritzt wurden und so eine Immunantwort in der Milz induziert wurde. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Werte für den ganzen Schnitt, für die PALS und für den Follikel bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

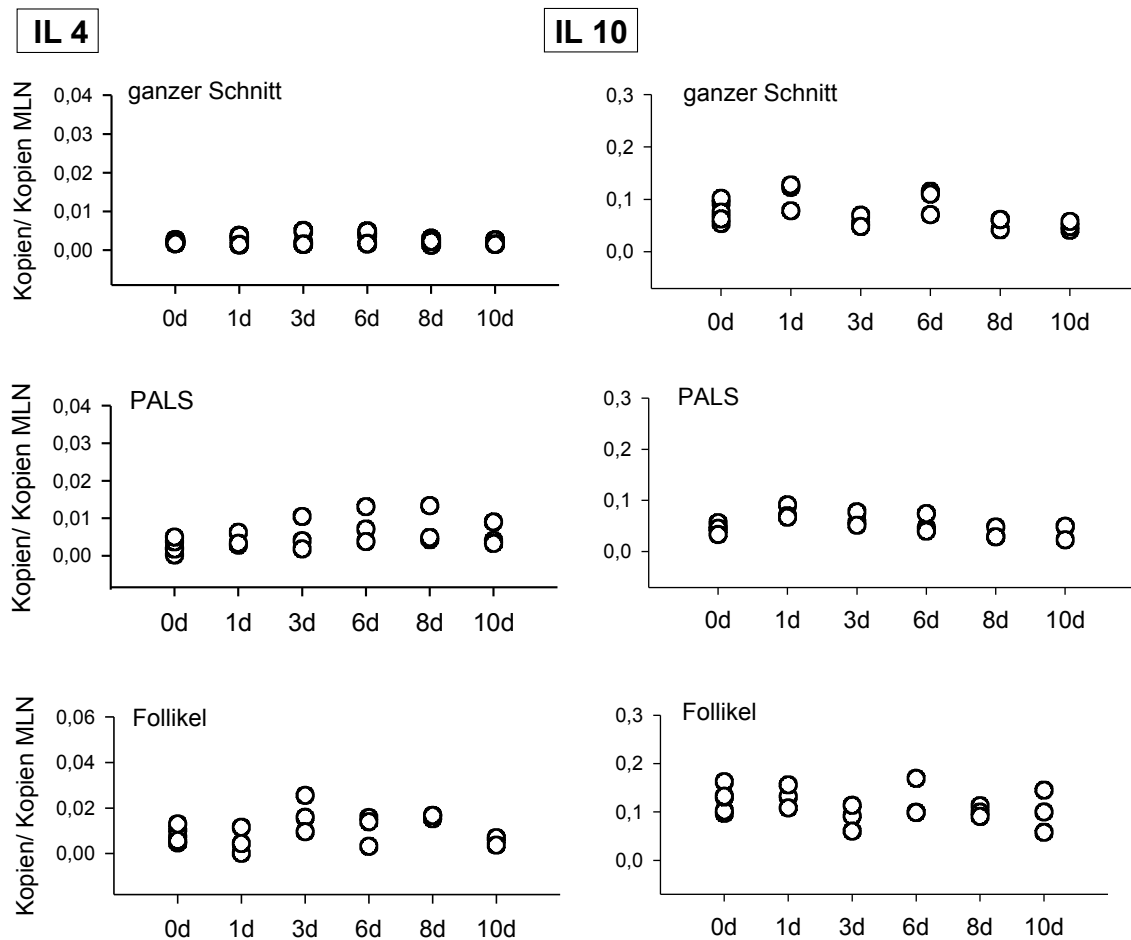


Abbildung 14: Stimulation führt nicht zur Veränderung der Expression der TH2-Zytokine

Dargestellt ist die Zytokinexpression von IL10 und IL4 im ganzen Schnitt, in der PALS und im Follikel, nachdem den Ratten zum Zeitpunkt 0 Tage Schaferthozyten gespritzt wurden und so eine Immunantwort in der Milz induziert wurde. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Werte für den ganzen Schnitt, für die PALS und für den Follikel bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

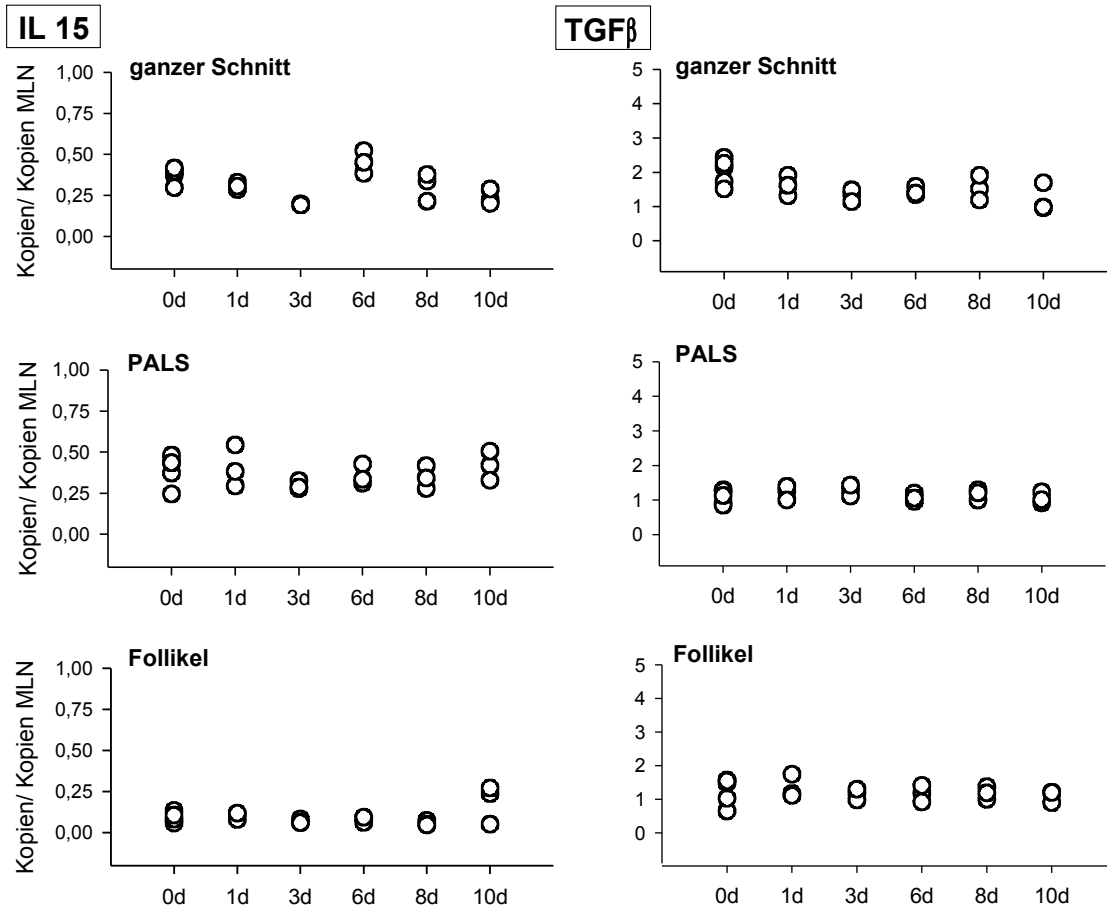


Abbildung 15: Stimulation führt nicht zur Veränderung der Expression von IL15 und TGFβ-1

Dargestellt ist die Zytokinexpression von IL15 und TGFβ-1 im ganzen Schnitt, in der PALS und im Follikel, nachdem den Ratten zum Zeitpunkt 0 Tage Schaferythrozyten gespritzt wurden und so eine Immunantwort in der Milz induziert wurde. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Werte für den ganzen Schnitt, für die PALS und für den Follikel bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

3.3.3 Veränderungen des Zytokinmusters in der roten Pulpa

Das Kompartiment rote Pulpa wird oft den übrigen Kompartimenten der so genannten weißen Pulpa gegenübergestellt, da hier keine spezifischen Immunreaktionen stattfinden, sondern die rote Pulpa vielmehr der Aussortierung roter Blutkörperchen dient. Daneben stellt sie jedoch einen wichtigen Eintritts- und Austrittsweg für Lymphozyten dar. Nach Stimulation waren nur für ein Zytokin Veränderungen detektierbar und zwar stieg die IL12p40-Expression bei allen drei Tieren an Tag deutlich an, um an Tag 8 schon wieder auf dem Ausgangswert zu liegen (Abbildung 16).

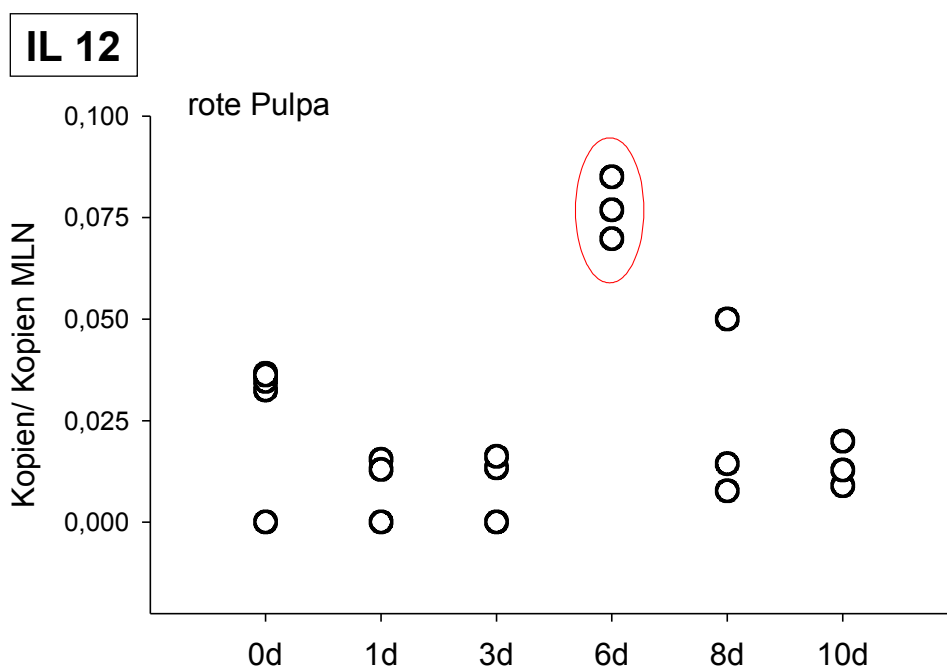


Abbildung 16: In der roten Pulpa zeigt sich ein Expressionsanstieg von IL12

IL12 ist das einzige Zytokin, das nach Stimulation in der roten Pulpa Veränderungen der Expression zeigte. Dabei fand sich eine Erhöhung an Tag 6 (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

3.3.4 Lokalisation der Zytokinveränderungen innerhalb der PALS

Nachdem wir zeigen konnten, dass Reaktionen in der PALS stattfinden, stellte sich die Frage, wo genau in der PALS, denn diese lässt sich funktionell in weitere Subkompartimente gliedern, und zwar in die äußere PALS, die an die Marginalzone angrenzt, und in die innere PALS, die einen Bereich um die Zentralarterie darstellt und das Gefäß mit einschließt. Das Antigen durchwandert, nachdem es in der Marginalzone angekommen ist, zuerst die äußere PALS, um dann in der inneren PALS auf DCs übertragen zu werden, die es dann den T-Zellen präsentieren und sie aktivieren. Die aktivierten T-Zellen haben dann wiederum in der äußeren PALS die Möglichkeit, auf B-Zellen zu treffen und diese ihrerseits bei der Aktivierung zu unterstützen. Deshalb haben wir die PALS nochmals in diese Subkompartimente unterteilt und getrennt untersucht (Abbildung 17a,b,c).

Dabei stellte sich heraus, dass die Veränderungen, die wir in der gesamten PALS gemessen hatten, sich exakt in der inneren PALS widerspiegelten, die äußere hingegen keinerlei Veränderungen des Zytokinmilieus zeigte. Das bedeutet, dass es innerhalb der PALS verschiedene Zytokinprofile gibt und dabei der inneren PALS eine besondere Rolle zuzukommen scheint.

Um ganz sicherzustellen, dass die Expressionsänderungen der TH1-Zytokine in der inneren PALS auf Zellen des Immungewebes und nicht auf Reaktionen und Zellen der Gefäße, die ja in der Definition der inneren PALS eingeschlossen waren, zurückzuführen waren, wurde die PALS an Tag 1 nochmals aufgeteilt, diesmal wurden die Gefäße gesondert ausgeschnitten, dann wiederum die innere PALS, diesmal aber eben ohne Gefäße und schließlich noch die äußere PALS. Da sich in den vorherigen Versuchen gezeigt hatte, dass es keine Veränderungen in der zuvor mit ausgeschnittenen Übergangszone der äußeren PALS gab, wurde diesmal nur bis zum äußeren Rand der PALS geschnitten. Es zeigte sich, dass bei jedem Tier die Werte in der inneren PALS erhöht waren und die Werte der Gefäße und der äußeren PALS deutlich darunter lagen

(Abbildung 18). Die Änderungen der Expression der Zytokine lassen sich somit auf lymphatische Zellen des Milzgewebes in der inneren PALS zurückführen.

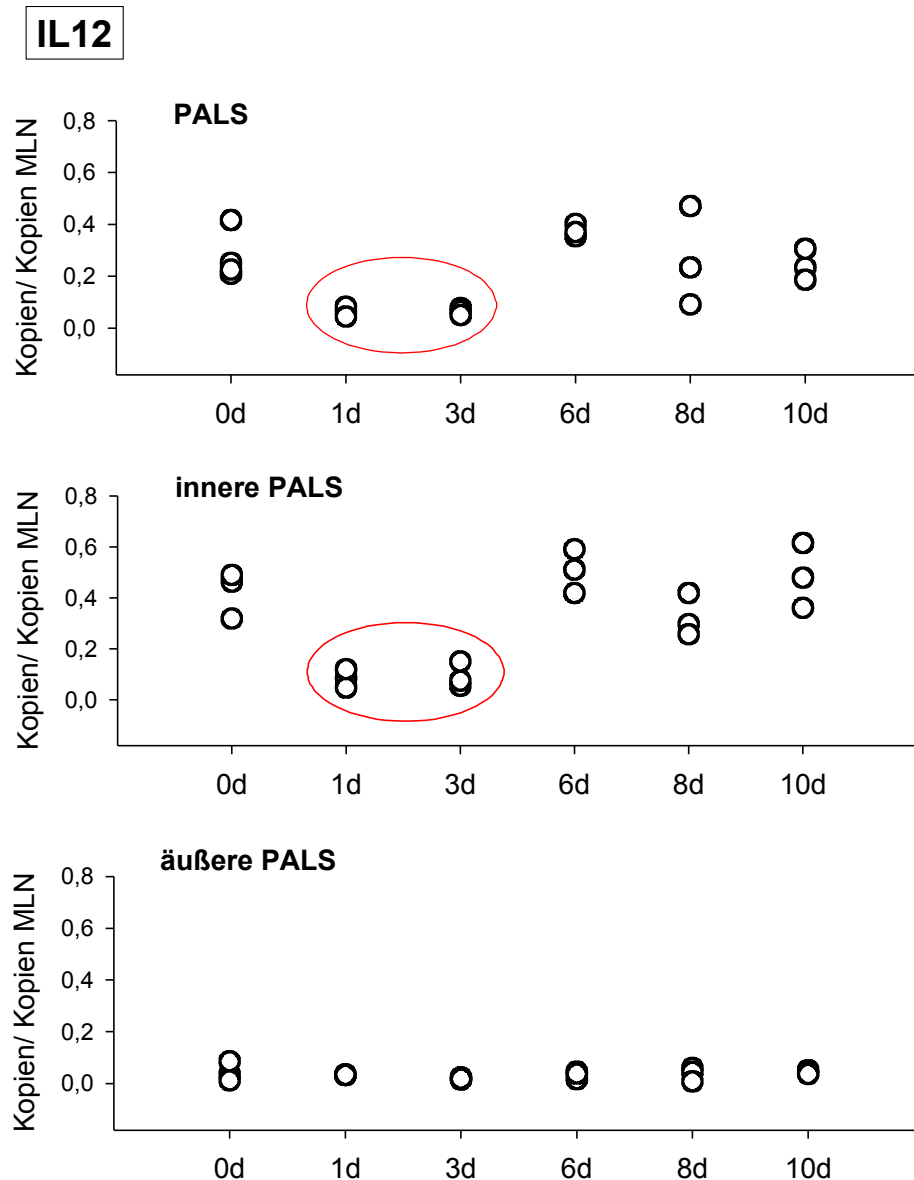


Abbildung 17a: Die Subkompartimente innere und äußere PALS unterscheiden sich in der Expression von IL12

Nachdem sich nach Stimulation mit Schaferythrozyten bei den TH1-Zytokinen Veränderungen in der PALS gezeigt hatten, wurde das Kompartiment weiter in innere und äußere PALS aufgeschlüsselt. Dabei galt als innere PALS der Bereich rund um die Gefäße unter deren Einbeziehung und als äußere PALS die Übergangszone zur Marginalzone. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Werte für die gesamte PALS, innere und äußere PALS bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

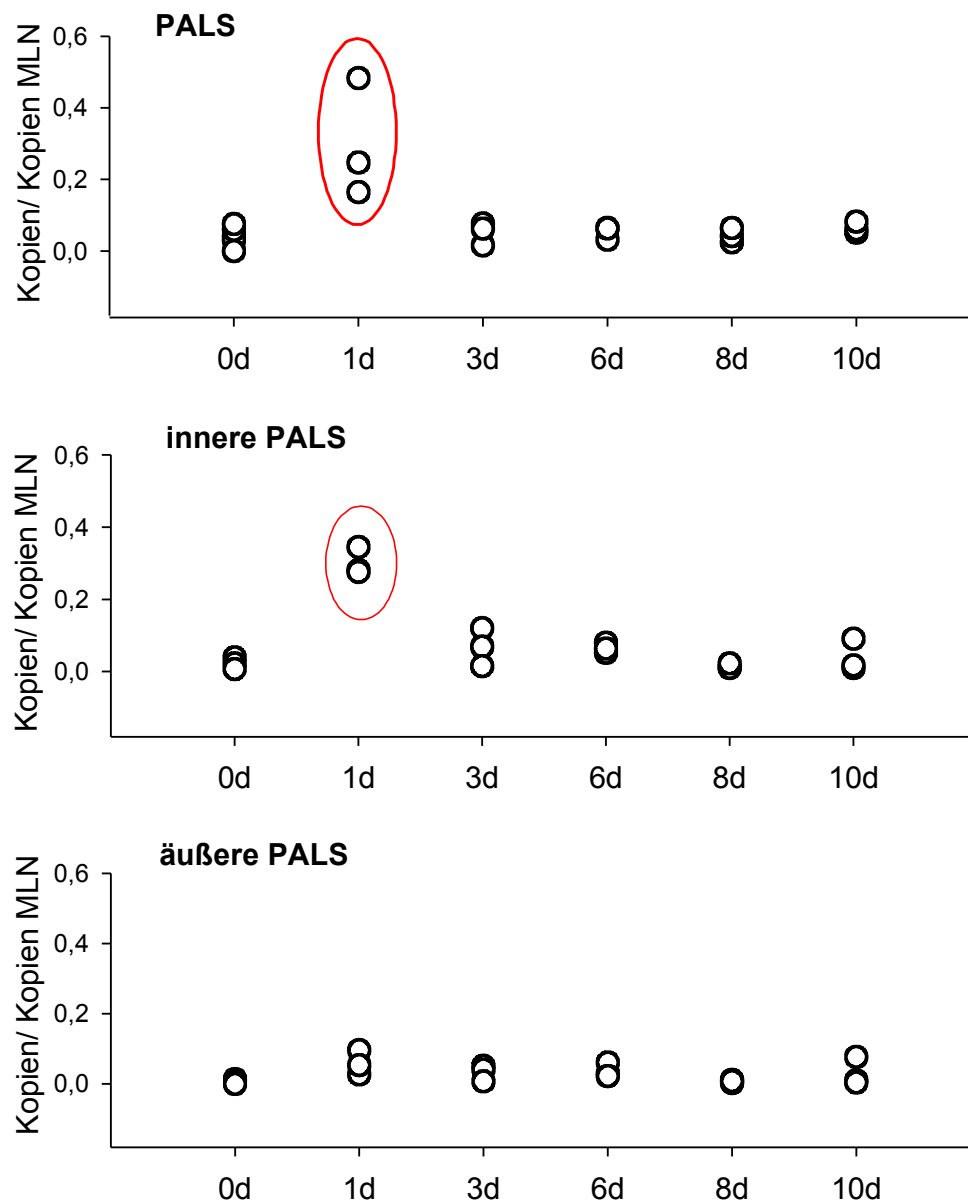
IL2

Abbildung 17b: Die Subkompartimente innere und äußere PALS unterscheiden sich in der Expression von IL2

Nachdem sich nach Stimulation mit Schaferythrozyten bei den TH1-Zytokinen Veränderungen in der PALS gezeigt hatten, wurde das Kompartiment weiter in innere und äußere PALS aufgeschlüsselt. Dabei galt als innere PALS der Bereich rund um die Gefäße unter deren Einbeziehung und als äußere PALS die Übergangszone zur Marginalzone. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Werte für die gesamte PALS, innere und äußere PALS bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

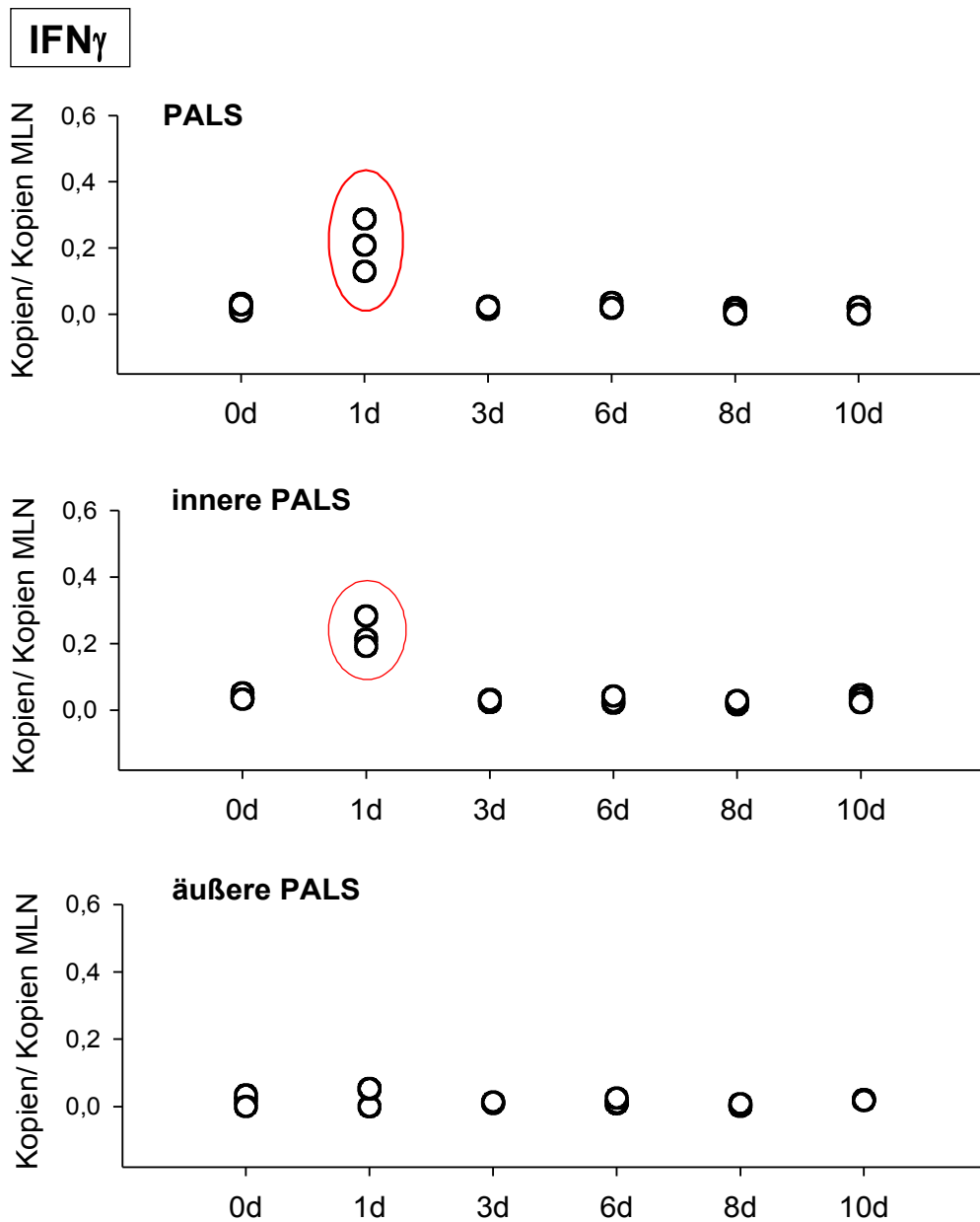


Abbildung 17c: Die Subkompartimente innere und äußere PALS unterscheiden sich in der Expression von IFN γ

Nachdem sich nach Stimulation mit Schaferzythozyten bei den TH1-Zytokinen Veränderungen in der PALS gezeigt hatten, wurde das Kompartiment weiter in innere und äußere PALS aufgeschlüsselt. Dabei galt als innere PALS der Bereich rund um die Gefäße unter deren Einbeziehung und als äußere PALS die Übergangszone zur Marginalzone. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Werte für die gesamte PALS, innere und äußere PALS bestimmt (jedes Symbol entspricht einem Tier, n=5 für den Zeitpunkt 0, n=3 für die übrigen Zeitpunkte).

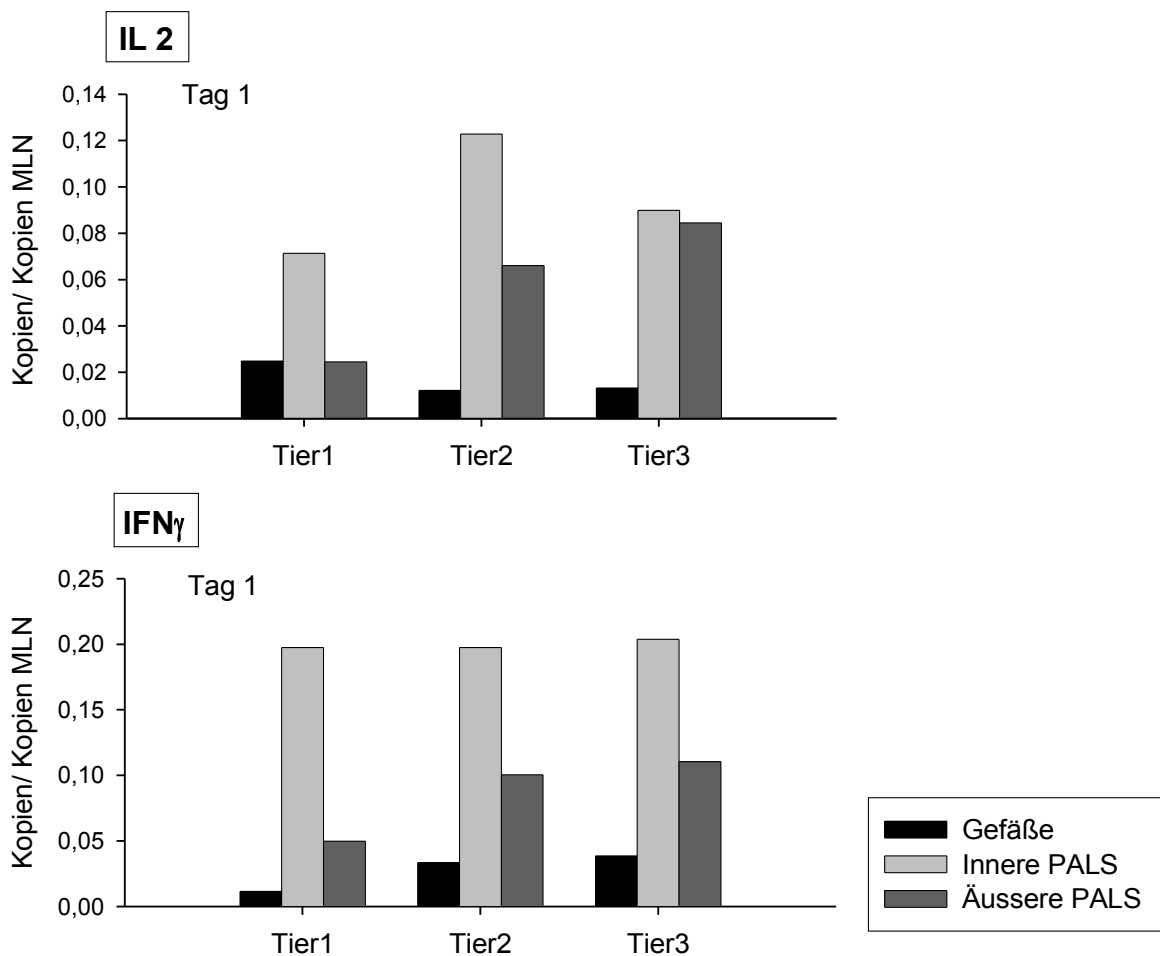


Abbildung 18: Ort der Zytokinveränderungen ist das lymphatische Gewebe der inneren PALS

Um auszuschließen, dass bei den in Abbildung 17a gezeigten Veränderungen der Zytokinexpression die Gefäße, die dort unter der Definition der inneren PALS eingeschlossen waren, ursächlich waren, haben wir nochmals für Tag 1 bei den Zytokinen IL2 und IFN γ die PALS untergliedert und ausgeschnitten. Dabei wurden die Schnittgrenzen so definiert, dass 1.) nur die Gefäße, 2.) die innere PALS als Zone rund um die Gefäße und 3.) die äußere PALS als Randgebiet zur Marginalzone, ohne diese einzuschließen, ausgeschnitten wurden. Dabei zeigte sich, dass sich in die Gefäße umgebende lymphatischen Gewebe der inneren PALS die Veränderungen wieder fanden. Gezeigt sind die einzelnen Tiere mit ihren jeweiligen Werten. (n=3)

3.3.5 Keimzentrum und Korona unterscheiden sich in ihrem Zytokinmilieu

Im Verlauf der Immunantwort werden antigenspezifische B-Zellen mit Hilfe von T-Zellen in der äußeren PALS aktiviert und wandern dann in den Primärfollikel ein, um dort hochaffine Antikörper zu produzieren. Dabei bilden sie als histologisch sichtbares Korrelat das Keimzentrum mit der das Keimzentrum umgebenden Korona. Diese Veränderungen kann man ab Tag 10 im Mikroskop deutlich erkennen (Abbildung 11). Daher haben wir an Tag 10 Korona und Keimzentrum getrennt voneinander ausgeschnitten, auf ihr Zytokinmilieu hin untersucht und den zusammengefassten Primärfollikelwerten der früheren Zeitpunkten gegenübergestellt (Abbildung 19+20+21).

Es zeigte sich, dass die Zytokinexpression der Korona, also des äußeren Teils des Follikels, mit geringen Abweichungen mit denen des Primärfollikels übereinstimmte.

Im Keimzentrum hingegen waren verschiedene Änderungen des Milieus zu detektieren: So war IL10 das einzige Zytokin, das im Keimzentrum einen Anstieg zeigte (Abbildung 20), dieser war dafür aber so deutlich, dass IL10 hier den höchsten aller von uns gemessenen Konzentrationen aufwies. Man kann also von einer Dominanz von IL10 im Keimzentrum sprechen.

Geringere Expressionen als im Primärfollikel konnten wir hingegen für IL2 (Abbildung 19), IL15 und TGF β -1 (Abbildung 21) feststellen.

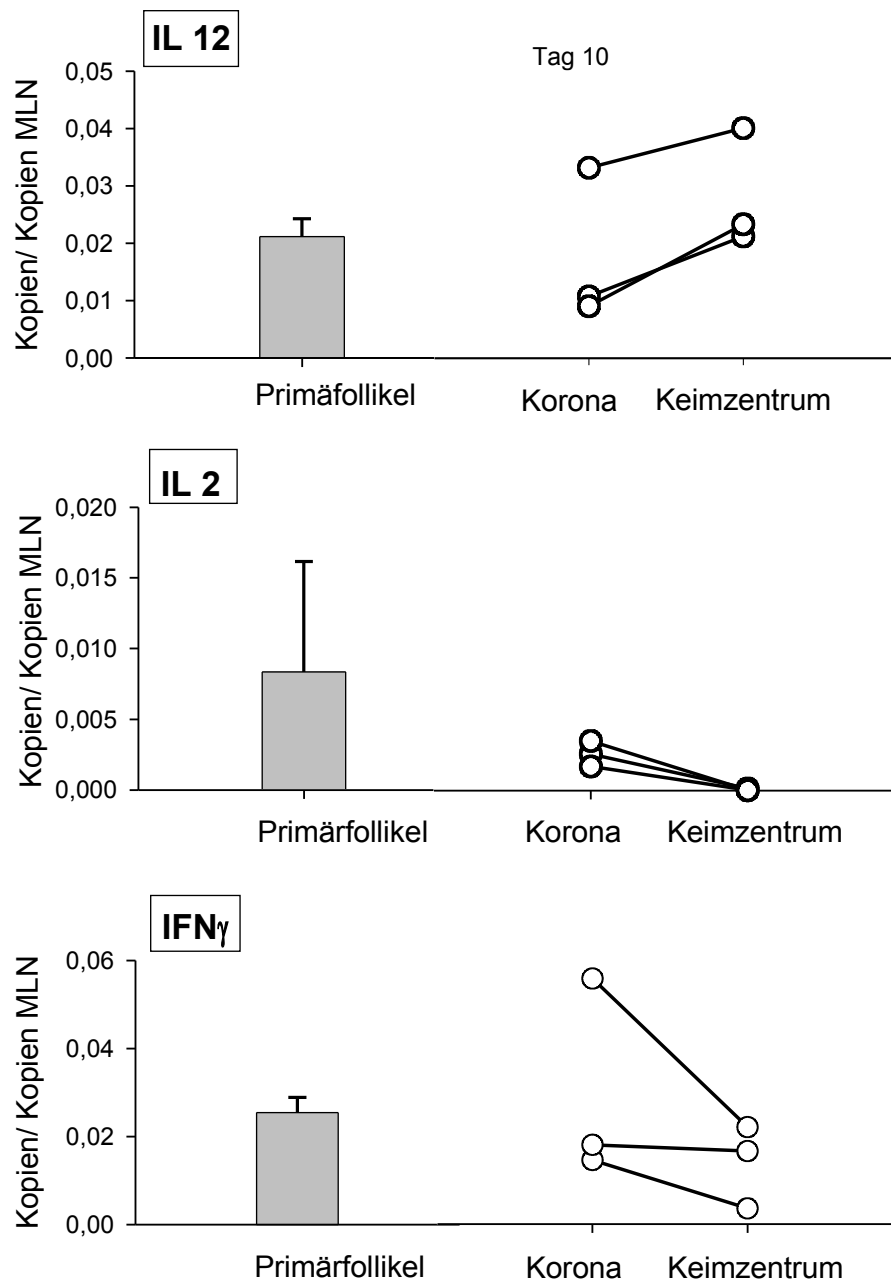


Abbildung 19: Gegenüberstellung von Gesamtfollikel, Korona und Keimzentren für die TH1-Zytokine

Bei den TH1-Zytokinen zeigt sich, dass die Korona überwiegend dem Milieu des Primärfollikels gleicht. Im Keimzentrum lässt sich nur für IL2 deutlich erkennen, dass es niedriger exprimiert wird. Dargestellt ist die Zytokinexpression der drei TH1-Zytokine an Tag 10, nachdem sich aus dem einheitlichen Primärfollikel ein klar abzugrenzendes Keimzentrum mit Korona entwickelt hat. Als Balkendiagramm ist dem gegenübergestellt der Mittelwert und die Standardabweichung des Primärfollikels von Tag 0 bis 8 (n=17; die Symbole stellen die einzelnen Tiere dar, wobei die Werte desselben Tiers jeweils verbunden sind).

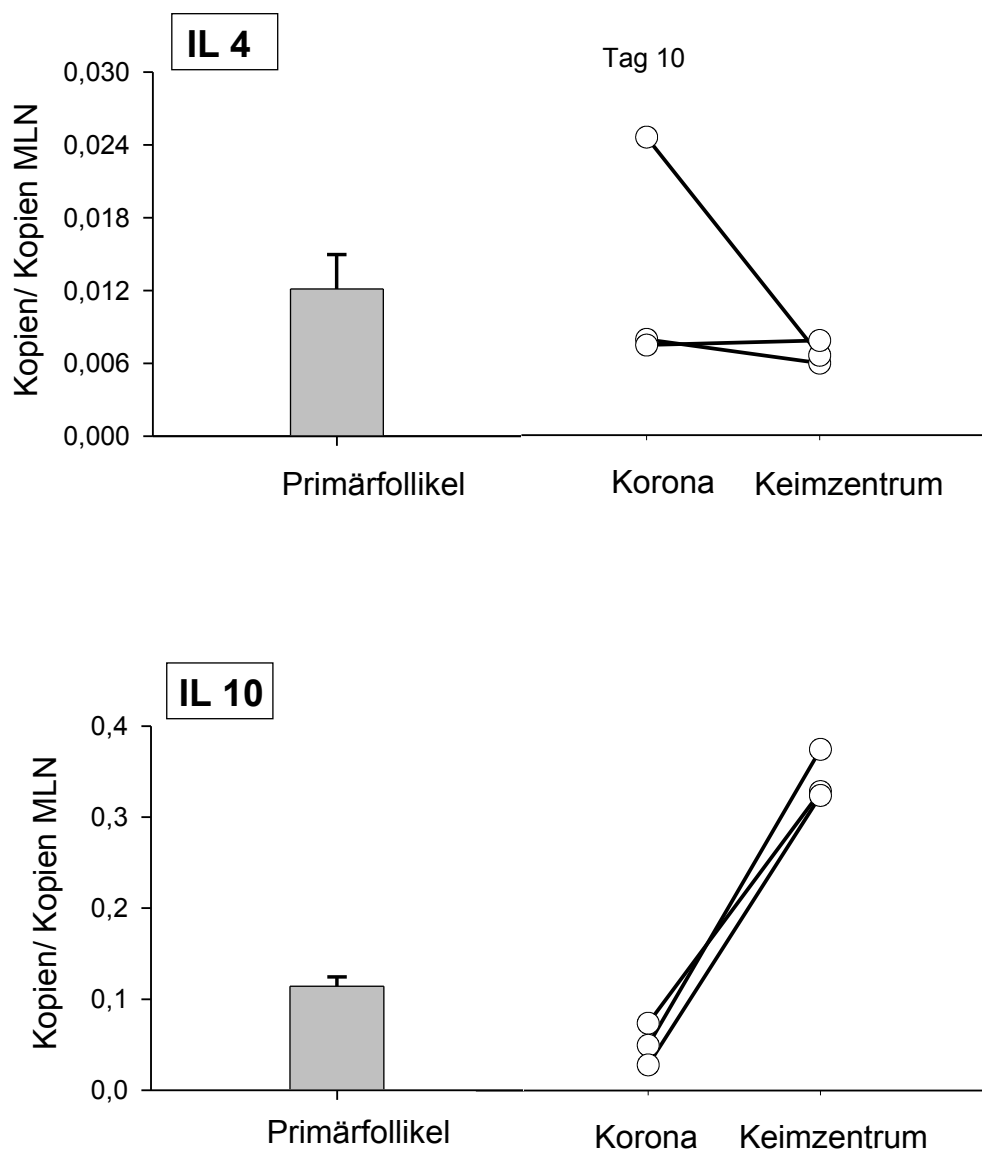


Abbildung 20: Gegenüberstellung von Gesamtfollikel, Korona und Keimzentren für die TH2-Zytokine

Bei den TH2-Zytokinen zeigt sich, dass die Korona überwiegend dem Milieu des Primärfollikels gleicht. Im Keimzentrum zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Expression von IL10. Dargestellt ist die Zytokinexpression der beiden TH2-Zytokine an Tag 10, nachdem sich aus dem einheitlichen Primärfollikel ein klar abzugrenzendes Keimzentrum mit Korona entwickelt hat. Als Balkendiagramm ist dem gegenübergestellt der Mittelwert und die Standardabweichung des Primärfollikels von Tag 0 bis 8 (n=17; die Symbole stellen die einzelnen Tiere dar, wobei die Werte desselben Tiers jeweils verbunden sind).

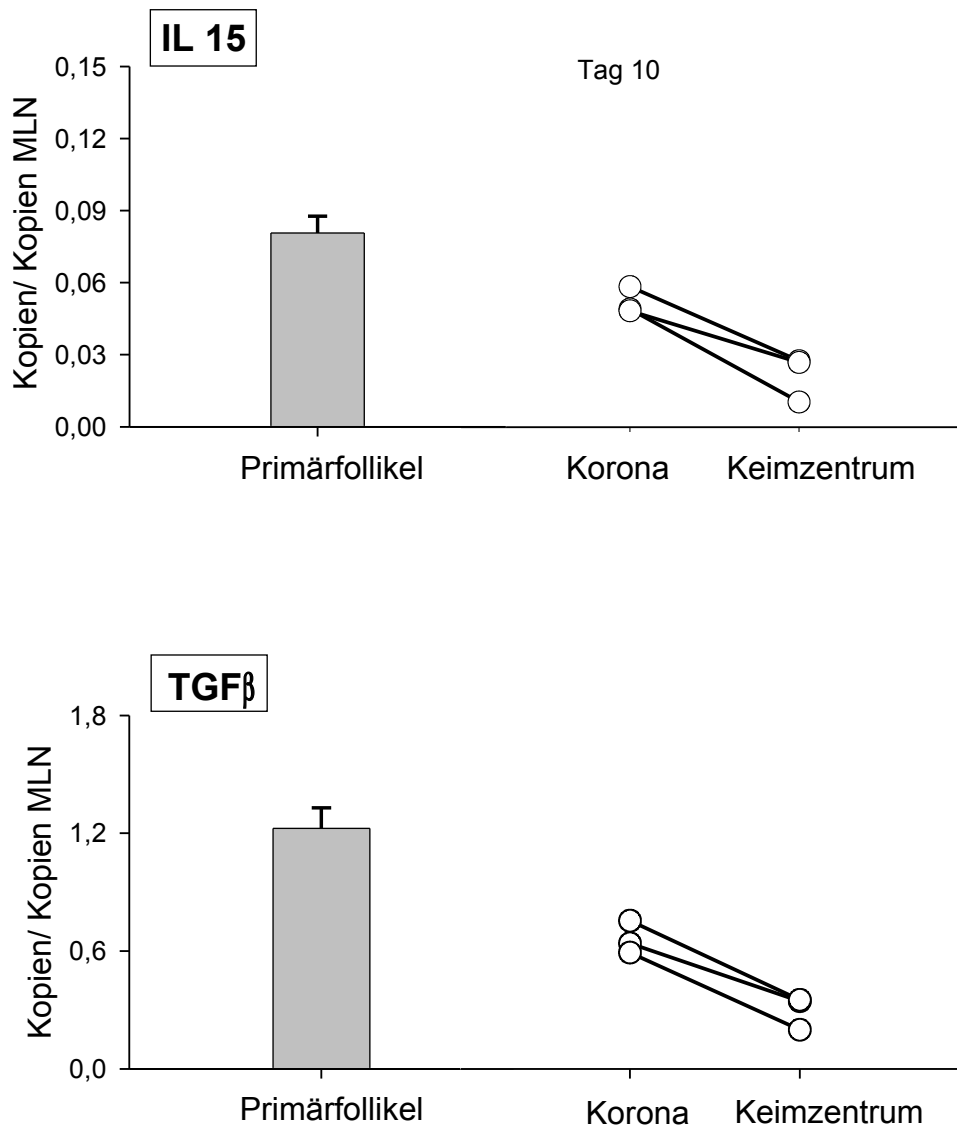


Abbildung 21: Gegenüberstellung von Gesamtfollikel, Corona und Keimzentren für IL15 und TGFβ-1

Bei IL15 und TGFβ zeigt sich, dass die Corona überwiegend dem Milieu des Primärfollikels gleicht. Im Keimzentrum hingegen werden beide Zytokine geringer exprimiert. Dargestellt ist die Zytokinexpression von IL15 und TGFβ-1 an Tag 10, nachdem sich aus dem einheitlichen Primärfollikel ein klar abzugrenzendes Keimzentrum mit Corona entwickelt hat. Als Balkendiagramm ist dem gegenübergestellt der Mittelwert und die Standardabweichung des Primärfollikels von Tag 0 bis 8 (n=17; die Symbole stellen die einzelnen Tiere dar, wobei die Werte desselben Tiers jeweils verbunden sind).

4 Diskussion

Die Unterteilung der Milz in verschiedene Kompartimente ist von fundamentaler Bedeutung für ihre Funktion. Jedes der Kompartimente nimmt unterschiedliche Aufgaben im Immunsystem wahr. Die Marginalzone dient als Haupteintrittsort der Lymphozyten, die PALS stellt den Ort der Antigenpräsentation und Aktivierung der Immunzellen und im Follikel findet die Antikörperproduktion durch aktivierte B-Zellen statt. Die rote Pulpa hingegen dient in erster Linie der Aussortierung alter Erythrozyten [14,40,43,82]. Die Kompartimente stellen Bereiche dar, in denen nur jeweils bestimmte Zelltypen vorkommen und in die andere „falsche“ Zellen auch nicht vordringen; so können in jedem Kompartiment ganz spezifische Zellinteraktionen stattfinden.

In der vorliegenden Arbeit haben wir deshalb die Milz und ihr Zytokinmilieu nicht nur als Ganzes untersucht, sondern sind gesondert auf die verschiedenen Kompartimente eingegangen. Die Untersuchung des lokal in den verschiedenen Kompartimenten vorherrschenden Zytokinmilieus ist uns möglich geworden durch die Entwicklung der Laser-gesteuerten-Mikrodissektion, die von Emmert-Buck et al. [22] 1996 erstmals beschrieben wurde. Das Prinzip beruht darauf, dass man Gewebeschnitte zwischen 7,5 μm und 30 μm über einen Computerbildschirm unter dem Mikroskop betrachtet und dass Bezirke markiert werden können, die dann von dem Laser nachgefahren werden [19,25]. Danach gibt es verschiedene Möglichkeiten, wie das ausgewählte Gewebe eingesammelt wird. Einmal legt sich eine Polymerfilmschicht, die sich auf dem Schnitt befindet und durch den Laser erwärmt wird, um den gewünschten Bezirk und hebt am Ende beim Entfernen des Films genau diesen Bereich mit ab [12,22] oder man umfährt, wie wir es gemacht haben, das Areal und katapultiert es anschließend mit Hilfe des Lasers heraus und fängt es in einem Gefäß zur Weiterverarbeitung auf. Die unerwünschte Kontamination der Proben wird dabei sehr gering gehalten, da kaum Kontakt zwischen Probe und Umwelt besteht. Die Mikrodissektion ermöglicht es auch aus heterogenem Gewebe bestimmte Bereiche, sogar einzelne Zellen zu untersuchen. Dabei kann das Gewebe auch vorher immunhistochemisch bearbeitet werden, um so die Identifizierung bestimmter Zellen zu erleichtern, ohne dass sich das gewonnene

Material quantitativ stark verschlechtert [24,27]. Dadurch, dass nur das gewünschte Gewebe heraussortiert wird, der Rest des Schnittes jedoch intakt bleibt, gibt es immer die Möglichkeit zu kontrollieren, ob man tatsächlich exakt den gewählten Bezirk getroffen hat; außerdem kann der übrige Teil des Schnittes noch weiter bearbeitet werden und so können Vergleiche in ein und demselben Schnitt angestellt werden [12].

Durch die Mikrodissektion findet die Untersuchung der Zellen in ihrer natürlichen Umgebung mit ihren ursprünglich vorhandenen Zell-Zell-Kontakten statt. Das ist ein großer Vorteil gegenüber in-vitro Versuchen, bei denen es zu Kontakten aller enthaltenen Zellen kommen kann, was aber die strenge Aufteilung der Zellen in die einzelnen Kompartimente der Milz nicht berücksichtigt. Auch ist es bei der von uns verwandten Methode nicht notwendig, die Zellen nachträglich künstlich nochmals zu stimulieren, wie es bisher notwendig war, um überhaupt Zytokine messbar zu machen [75].

Besonders deutlich zeigen sich die Vorteile der Mikrodissektion gegenüber anderen Methoden in Bezug auf die Reinheit der Proben [13]. Wenn man zur Bestimmung von Zytokinen heterogene Gewebeproben benutzt, wie z.B. ganze Milzschnitte anstelle der Unterteilung in Kompartimente [75], kommt es durch die Zellen, die das Zytokin nicht produzieren, aber mit untersucht wurden, da man keine Möglichkeit hatte sie auszusortieren, zu einer Mittelung, die das Ergebnis wenig aussagekräftig macht. Die Mikrodissektion verhindert durch ihre Kompartimentspezifität diese Mittelung und so konnten wir in allen Versuchen zeigen, dass in den ganzen Schnitten der Milz keine signifikanten Veränderungen festzustellen waren, dass jedoch, wenn man mit Hilfe der Mikrodissektion genauer in die Kompartimente hineinschaut, durchaus Zytokinveränderungen zu detektieren waren. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mikrodissektion zu einer erhöhten Sensitivität führt und unterstützt die Annahme, dass die Mikrodissektion ein großes Potential besitzt, um physiologische Vorgänge und Immunreaktionen besser verständlich zu machen. Aufgrund ihrer einfachen und raschen Handhabung wird die Methode bereits in verschiedenen Routineuntersuchungen in unterschiedlichsten Bereichen der Medizin benutzt, z.B. in der Pathologie und Onkologie, um

Krebszellen zu detektieren, in der forensischen Medizin und in der pränatalen Diagnostik [13,22] und sicherlich wird ihr Einsatzbereich weiter anwachsen.

Für unsere Untersuchungen haben wir die Mikrodissektion mit einer weiteren relativ neuen Technik kombiniert, der quantitativen real-time PCR. Sie stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar, durch die man die gewünschte DNA nicht nur vervielfältigen, sondern sie auch quantitativ bestimmen kann, indem während der Amplifizierung Fluoreszenzfarbstoffe freigesetzt werden und es so möglich ist, nach jedem Zyklus die entstandene Produktmenge zu bestimmen.

Die für eine bestimmte Fluoreszenzstärke benötigte Zyklusanzahl wird dann in Relation zu einem immer mitbestimmten Standard, dem so genannten Housekeeping-Gen gesetzt, das idealerweise immer und überall gleichmäßig exprimiert wird [42]. Dabei haben wir als Housekeeping-Gen aufgrund von eigenen Ergebnissen MLN51 benutzt [44].

Man kann Zytokine auf der Ebene der mRNA bestimmen oder als sezerniertes Protein, allerdings ist der Nachweis der geringen Proteinmengen sehr aufwendig und hat den Nachteil, dass Proteine, anders als mRNA, nicht amplifiziert werden können. Deshalb haben wir die mRNA bestimmt und den Nachteil in Kauf genommen, dass es nicht vollständig sicher ist, dass eine mRNA auch tatsächlich in ein Protein umgesetzt wird, da es in der Zelle verschiedene Regulationsmöglichkeiten gibt, bevor es zur Sekretion kommt. Diese Regulationsmöglichkeiten lassen sich aufteilen in prätranskriptionell und posttranskriptionell, die bereits vor bzw. erst nach der Bildung der mRNA in Kraft treten [51]. Im ersten Fall wäre es erlaubt, die Messwerte der mRNA denen des Proteins gleichzusetzen, im zweiten Fall jedoch würde das zu falschen Ergebnissen führen. Auch wenn wir also nicht sicher sagen können, dass unsere mRNA-Werte tatsächlich die Sekretion von Zytokinen bedeuten, gibt es doch einige Arbeiten, die sowohl die mRNA- als auch den Proteinspiegel untersucht haben und gute Korrelationen z.B. für IFN γ und IL2 feststellen konnten [29,33,65]. Andere hingegen fanden schlechte Korrelationen z.B. für TGF β -1 [4,15,78] oder je nach Zytokin schwankende [46]. Die von uns gefundenen hohen Veränderungen in der mRNA-Expression, die in engem

zeitlichen Zusammenhang mit der Induktion einer Immunantwort stehen, sind sicherlich ein deutlicher Hinweis auf eine prätranskriptionelle Regulation.

Durch die Möglichkeit der real-time PCR quantitativ Werte zu bestimmen, konnten wir zum ersten Mal die genaue Höhe der Zytokinexpression in den verschiedenen Kompartimenten der ruhenden und der stimulierten Milz bestimmen und so ein Milieu definieren. Wir konnten zeigen, dass alle von uns untersuchten Zytokine schon im Ruhezustand der Milz exprimiert werden, sich in ihrer Höhe dabei allerdings um hohe Werte unterscheiden. Eine Immunreaktion führt zu einem deutlichen Anstieg der Werte (z.B. auf das 13-fache an Tag 1 in der inneren PALS). Die im Ruhezustand am geringsten exprimierten Zytokine IL4, IL2 und IFN γ sind gleichzeitig diejenigen, die bei einer Immunantwort die T-Zellen aktivieren, damit eine sehr spezifische Funktion haben und aus diesem Grund einer starken Regulation unterliegen [6,8,63,72]. Die am höchsten exprimierten Zytokine IL15 und TGF β -1 hingegen werden von vielen verschiedenen Zellen produziert und für TGF β -1 gibt es zudem Hinweise auf eine erst posttranskriptionell stattfindende Regulation [4,30,31,72].

Dieses Ergebnis unterstützt die Meinung über die große Rolle, die Zytokinen in Regulationsvorgängen im Immunsystem zukommt. Zytokine bieten damit Ansätze für Anwendungen in der Medizin, wie sie ja auch teilweise schon verwirklicht sind mit dem Einsatz von Interferonen in der Virustherapie, Hemmung von IL2 als Immunsuppression z.B. nach Organtransplantationen und anderen Medikamenten, die in den Zytokinhaushalt eingreifen [47].

Einen weiteren Ansatzpunkt bieten aber nicht nur die einzelnen Zytokine, sondern auch das von ihnen geschaffene, individuelle Mikromilieu. So hat sich in der Forschung über die Migration [87,90], Proliferation [35,86] und Apoptose [2,83] von Lymphozyten gezeigt, dass das Mikromilieu einen entscheidenden Einfluss auf diese Vorgänge hat und damit einen wichtigen Ansatzpunkt für die Beeinflussung von Immunreaktionen bietet [88]. Es konnte für Lymphknoten gezeigt werden, dass aktivierte T-Effektorzellen wieder am Ort ihrer Aktivierung proliferieren, da sie dort ein entsprechendes Mikromilieu vorfinden [9,10].

Bei der Untersuchung des Mikromilieus der Kompartimente der Milz haben wir uns besonders für die Zytokine interessiert, die als Repräsentanten der TH1-Antwort (IL2, IL12p40, IFN γ) und der TH2-Antwort (IL4, IL10) stehen, zusätzlich haben wir IL15 und TGF β -1 untersucht, denen eine Rolle in der Homöostase von Lymphozyten zukommt.

Unsere Untersuchungen haben ergeben, dass in den verschiedenen Kompartimenten auch tatsächlich unterschiedliche Zytokinmilieus vorliegen. Dabei scheint insbesondere die PALS eine spezielle Rolle zu spielen, da sie sich deutlich von den anderen Kompartimenten abhebt. So herrscht hier im unstimulierten Zustand ein TH1-dominiertes Milieu vor, während in Follikel, Marginalzone und roter Pulpa ein TH2-dominiertes Milieu mit leichten Abweichungen zu finden ist. Und auch nach Stimulation fanden sich Veränderungen der Zytokinexpressionen überwiegend in der PALS.

In der PALS befinden sich überwiegend T-Zellen, von denen der überwiegende Teil CD4⁺-Zellen sind. Neben den T-Zellen finden sich im äußeren Bereich der PALS noch B-Zellen und Makrophagen, sowie als antigenpräsentierende Zellen (APC) die dendritischen Zellen (DCs) [43,81,82]. Es ist nicht bekannt, ob das Zytokinmilieu von den Lymphozyten selbst produziert wird oder ob auch andere Zellen es beeinflussen. Es ist gut möglich, dass die CD4⁺-Zellen die TH1-Zytokine produzieren, da ihre Aufteilung in Subpopulationen darauf beruht, aber auch CD8⁺-Zellen können TH1-Zytokine bilden [28] und tragen so vielleicht zu dem gefundenen Milieu bei, auch wenn sie in viel geringerer Anzahl in der PALS vorkommen als die CD4⁺-Zellen. Außerdem weiß man, dass die APCs IL12 sezernieren können und dadurch bei einer Immunantwort zur TH1-Differenzierung beitragen, ob sie allerdings auch im unstimulierten Zustand Zytokine ausschütten werden weitere Untersuchungen ergeben müssen. Neben den TH1-Zytokinen wird auch IL15 in der PALS verstärkt exprimiert. Es ist bekannt, dass IL15 in einer Rezeptoruntereinheit dem Rezeptor von IL2 gleicht und es auch in seiner biologischen Aktivität IL2 ähnelt; so lässt sich erklären, dass in der PALS die beiden Zytokine gemeinsam erhöht sind [31,68].

Im Gegensatz zur PALS dominieren im Follikel die TH2-Zytokine. Der Follikel wird überwiegend von B-Zellen gebildet, daneben kommen einige CD4⁺-Zellen sowie folliculäre-dendritische Zellen (FDCs) vor. Auch wenn die TH2-Zytokine IL4 und IL10 meist als von T-Zellen produzierte Zytokine dargestellt werden, ist es möglich, dass in diesem Fall die B-Zellen die Quelle sind, da sie nachgewiesenermaßen das Potential zur Produktion dieser Zytokine besitzen [8,54,64]. Da die TH2-Zytokine die humorale Immunantwort unterstützen, an der die B-Zellen maßgeblich beteiligt sind, spielen diese Zytokine eine wichtige Rolle für die Funktion der B-Zellen [63,36]

Die Marginalzone ist ein weiteres Kompartiment, das von B-Zellen dominiert wird, auch wenn sich dort außerdem noch Makrophagen, sowie T-Zellen und natürliche Killer (NK) Zellen befinden. Dementsprechend herrscht hier auch ähnlich wie im Follikel ein TH2-Milieu vor mit dem Unterschied, dass eine höhere Expression von IL15 und eine niedrigere Expression von IL10 vorliegen. Dabei muss man beachten, dass die B-Zellen der beiden Regionen sich zwar morphologisch stark ähneln, sich aber in ihrer Funktion doch in einigen Punkten unterscheiden. Während die B-Zellen des Follikels zur adaptiven Immunantwort gehören und das Erreichen ihrer Effektorfunktion einige Zeit dauert, stellen die B-Zellen der Marginalzone mit ihrer prominenten Lage am Eintrittsort der Pathogene eine Verbindung zur angeborenen Immunantwort dar, da sie die Möglichkeit haben, sehr schnell Antigene zu prozessieren, T-Zellen direkt zu aktivieren und zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen zu differenzieren [5,53]. So konnten auch schon Shen et al. [71] etliche Unterschiede bei der Untersuchung einer Reihe von verschiedenen Genen zwischen Follikel und Marginalzone feststellen.

Erstaunlicherweise ähnelt auch die rote Pulpa in ihrem Zytokinmilieu, das einem TH2-Milieu entspricht, dem Follikel, obwohl hier deutlich weniger B-Zellen vorhanden sind. Die rote Pulpa dient in der Milz dem Abbau alter und funktionsuntüchtiger Erythrozyten, auf der anderen Seite stellt sie aber auch einen Eintrittsweg für Lymphozyten [83]. Entsprechend findet man hier in erster Linie Makrophagen und T-Zellen. Zusätzlich ist die rote Pulpa das Kompartiment mit der größten Zahl an NK-Zellen [77]. Unterschiede zum Milieu

des Follikels finden sich nur in der erhöhten IL2- und IL15- Expression. IL15 spielt neben seinem Einfluss auf T-Zellen auch eine wichtige Rolle für die Entwicklung und die Homöostase von NK-Zellen [18] und kann vielleicht deshalb hier vermehrt detektiert werden.

Da auch in nicht-lymphatischen Organen hauptsächlich ein TH2-Milieu vorherrscht [44], lässt sich daraus folgern, dass ein TH2-Milieu eher immunsuppressiv wirkt, wohingegen ein TH1-Milieu auf aktive lymphatische Zellen hinweist.

Es lässt sich also feststellen, dass auch ohne eine Immunreaktion schon bestimmte Milieus in den Kompartimenten vorhanden sind und natürlich stellt sich die Frage, wie dieses Milieu entsteht und wozu es notwendig ist. Es ist bekannt, dass immer einige Zellen in der Milz stimuliert sind und proliferieren (Abbildung 11) und so können wir momentan nicht sagen, ob das von uns gemessene Milieu von wenigen Zellen, die sehr viele Zytokine produzieren, gebildet wird oder ob viele Zellen wenige Zytokine bilden. Möglicherweise hat das Milieu starken Einfluss darauf, welche Zellen sich in dem Kompartiment bevorzugt aufhalten, wie es für den Lymphknoten gezeigt wurde [9,10]; allerdings sind dies alles Sachverhalte, die weiter abgeklärt werden müssen.

Nachdem das Milieu der unstimulierten Milz bestimmt war, haben wir eine Immunreaktion induziert und die dabei auftretenden Veränderungen untersucht. Dafür haben wir den Ratten Schafererythrozyten gespritzt und damit eine lokale Immunantwort ausgelöst. Die Schafererythrozyten lösen dabei eine T-Zell-abhängige B-Zellantwort aus [81].

Es ist schon viel über die Immunisierung mit Schafererythrozyten geforscht worden, da sie ein gutes System zur Induktion einer allergischen Reaktion vom verzögerten Typ (engl. delayed type hypersensitivity, DTH) darstellt [39]. Dabei wurde festgestellt, dass TH1-Zellen die Grundlage für diese Immunantwort bilden [16]. Mit unseren Untersuchungen konnten wir dies jetzt in vivo bestätigen, da wir in erster Linie einen Anstieg der TH1-Zytokine detektieren konnten. Dabei zeigte sich wiederum die besondere Rolle der PALS, denn nur dort konnten wir entscheidende Veränderungen feststellen. So haben wir einen

Tag nach Injektion der Erythrozyten in der PALS eine deutlich erhöhte Expression der mRNA der TH1-Zytokine IL2 und $IFN\gamma$ gefunden, die aber an Tag 3 schon nicht mehr vorhanden war; eine verminderte Expression von IL12 trat an Tag 3 und 6 auf. Diese frühen Veränderungen entsprechen den Beobachtungen von Van den Eertwegh, der schon 2 h nach der Injektion von partikulären Antigenen diese in der Marginalzone, wo sie von Makrophagen prozessiert werden, finden konnte, 48 h nach Injektion waren dann bereits mit Schaferythrozyten beladene Makrophagen in der inneren PALS detektierbar. Auch Spitz et al. [75] konnten erhöhte IL2 Protein-Werte mit einem Maximum an Tag 3 nach SRBC-Injektion nachweisen, allerdings in Zellsuspensionen der gesamten Milz und erst nach Restimulation. $IFN\gamma$ ist als das Zytokin bekannt, das entscheidend auf die Induktion einer TH1-Antwort hinwirkt, indem es Makrophagen aktiviert, die T-Zell-Differenzierung in Richtung TH1 fördert und gleichzeitig die Proliferation von TH2-Zellen hemmt [66,70]. Auch von IL2 ist bekannt, dass es verstärkt bei TH1-Reaktionen auftritt und essentiell für die Proliferation von T-Zellen ist [73]. Ähnliches gilt für IL12, das besonders von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) produziert [79] wird, in der PALS also wahrscheinlich von den DCs und einen weiteren wichtigen Faktor in der Induktion einer TH1-Antwort darstellt [32,57]. Die von uns gefundene Erniedrigung nach Stimulation erscheint damit erstaunlich, doch auch Kalinski et al. [45] fanden in vitro verschieden hohe IL12-Werte in Abhängigkeit vom Reifungsstadium der dendritischen Zellen; dabei wurden unmittelbar nach Stimulation hohe Werte gemessen, die dann jedoch stark abnahmen und unter den Ausgangswert zurückfielen. Dabei war die höchste Expression schon nach 2 h erreicht und lag 12 h nach Stimulation schon unter dem Ausgangswert. Deshalb ist es denkbar, dass wir den kurzen IL12 Anstieg nicht detektiert haben, da wir erst 24 h nach Stimulation zum ersten Mal nachgesehen haben. Es ist bekannt, dass für TH1-Antworten im Gegensatz zu TH2-Antworten sehr kurze Stimulationszeiten ausreichen können [38] und es ist möglich, dass IL12 schnell herunterreguliert wird, um so zu verhindern, dass Zellen aktiviert werden, die gar nicht das Zielantigen erkannt hatten.

Da die T-Zellen durch die PALS hindurchwandern, hielten wir es für möglich, dass das Zytokinmilieu innerhalb der PALS nicht einheitlich ist. Deshalb nutzten wir die Möglichkeit der Mikrodissektion definierte Bereiche auszuschneiden. Dabei zeigte sich, dass die Veränderungen, die in der gesamten PALS messbar gewesen waren, sich in der inneren PALS widerspiegelten, wohingegen in der äußeren PALS keine Reaktionen im Zytokinmilieu auftraten. Es gibt einen bedeutenden morphologischen Unterschied zwischen innerer und äußerer PALS, der in dem Vorkommen von B-Zellen am äußeren Rand der PALS besteht, die dort aktiviert werden können. Unsere Ergebnisse zeigen aber einen Anstieg der Zytokine in der inneren PALS, eine gute Erklärung bieten dafür mikroskopische Untersuchungen aus den 70'er Jahren [82], die das Vorkommen von DCs ausschließlich auf die innere PALS beschränken. Heutzutage und mit der Hilfe von Antikörperfärbungen geht man jedoch davon aus, dass sich die DCs in der gesamten PALS auffinden lassen; so zeigten sich in der Arbeit von Westermann et al. [89] keine Unterschiede in der Kontakthäufigkeit zwischen DCs und T-Zellen innerhalb der PALS. Was jedoch dort festgestellt wurde, ist, dass sich T-Effektorzellen in der äußeren PALS häufiger in der S-Phase des Zellzyklus befinden als in der inneren PALS. Momentan scheint es keine eindeutige Erklärung für das unterschiedliche Zytokinmilieu innerhalb der PALS zu geben.

Vergleicht man die von uns gefundenen Veränderungen der Zytokinexpression in der PALS mit dem Auftreten von Proliferation nach der Injektion von SRBC's [35], so fällt auf, dass die Proliferation an Tag 3 ihr Maximum erreicht, einem Zeitpunkt, an dem die Zytokinexpression schon wieder auf ihr Normalniveau zurückgekehrt ist. Außerdem findet die Proliferation über die ganze PALS verteilt und nicht nur in der inneren PALS statt. Eine Erklärung dafür wäre, dass die T-Zellen durch die Zytokine zur Proliferation angeregt werden oder sie selber bei Einleitung der Proliferation Zytokine ausschütten, die Zytokinproduktion dann aufgrund der fehlenden weiteren Stimulation durch Antigene (die einmalige Injektion von SRBC's stellt ja eine sehr begrenzte Immunreaktion dar) eingestellt wird und die eigentliche Proliferation erst etwas

verzögert nachfolgt. Obwohl auch in den Follikeln Proliferation stattfindet, konnten wir bei den von uns untersuchten Zytokinen keine entsprechenden frühen Veränderungen feststellen, bevor es zur lichtmikroskopisch erkennbaren Bildung von Sekundärfollikeln kam.

Der Anstieg der Expression von IL12 an Tag 6 in der roten Pulpa lässt sich möglicherweise mit dem Einfluss von IL12 auf natürliche Killer-Zellen, die hier in hoher Anzahl vorkommen, erklären [26,79]. Andererseits muss beachtet werden, dass wir als Marker für IL12 dessen Untereinheit p40 bestimmt haben. Diese Untereinheit wird noch von einem weiteren Zytokin, nämlich IL23, genutzt. Es hat sich gezeigt, dass IL23 zur Stimulation von IL17-produzierenden T-Zellen führt und damit entscheidend bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie Multipler Sklerose mitwirkt. Außerdem wird IL23 eine Rolle in Beziehung auf T-Gedächtniszellen zugeschrieben und es ist möglich, dass wir an Tag 6, einem Zeitpunkt, an dem die initiale Zytokinantwort schon abgeklungen ist, eine Reaktion beobachten, die im Zusammenhang mit der Entstehung oder Auswanderung von diesen Zellen steht [48,60].

Die Bildung von Sekundärfollikeln geht mit der Entstehung eines neuen Kompartimentes, dem Keimzentrum einher, und verbunden damit konnten wir auch ein neues von IL10 geprägtes Zytokinmilieu feststellen, wohingegen die Korona dem ursprünglichen Follikel entsprach. Man stellt sich die Bildung des Sekundärfollikels so vor, dass einige der in der PALS aktivierten B-Zellen in den Follikel einwandern, in der Mitte das Keimzentrum bilden und dabei die ursprünglichen B-Zellen des Follikels an den Rand drängen, der dann als Korona oder Mantelzone bezeichnet wird [50,61,77]. Wir fanden große Ähnlichkeiten zwischen dem Milieu der Korona und des ursprünglichen Primärfollikel, so dass wir die Theorie der Korona als nach außen verdrängter Follikel unterstützen können.

Im Keimzentrum kommt es durch Kontakt mit follikulären dendritischen Zellen (FDCs), die Immunkomplexe präsentieren, und CD4+-T-Zellen zur Reifung und Proliferation der B-Zellen mit gleichzeitig stattfindender somatischer

Hypermutation und Isotypveränderungen. Dabei wandern die jetzt als Centroblasten bzw. Centrozyten bezeichneten Zellen immer weiter nach außen, um schließlich als Antikörper-produzierende Plasmazellen oder als B-Memory-Zellen den Follikel zu verlassen [43,62]. An Tag 10 konnten wir dort eine deutliche Dominanz von IL10 feststellen. In der Arbeit von Choe und Choi [17] zeigte sich bei der in-vitro Untersuchung von Keimzentren, dass IL10 die Reifung der B-Zellen zu Plasmazellen fördert und weniger Memory-Zellen entstehen lässt. Unser Beobachtungszeitraum schloss nur Tag 10 nach Stimulation ein, wo die Bildung des Keimzentrums gerade erst begonnen hat. Wenn die Daten von Choe und Choi sich auf in vivo übertragen lassen, bedeutet das, dass das Keimzentrum zumindest am Anfang in erster Linie der Bildung von Plasmazellen und damit der Produktion von hochaffinen Antikörpern dient. IL10 war bisher bekannt als ein Zytokin, das die TH2-Antwort unterstützt und B-Zellen stimuliert [36]. Im Zusammenhang mit der Forschung an T_{reg}-Zellen hat sich aber gezeigt, dass es immunsupprimierend wirken kann [76]. Demzufolge wäre eine andere Erklärungsmöglichkeit für die hohen Werte im Keimzentrum, dass es dort zur Beendigung der Immunantwort dient und überschießende Reaktionen verhindert.

TGF β -1 ist das einzige der von uns untersuchten Zytokine, das weder zwischen den Kompartimenten der ruhenden Milz noch nach Stimulation Veränderungen in der Expressionstärke zeigt. Gleichzeitig ist es das Zytokin, das am höchsten von allen untersuchten exprimiert wird. TGF β -1 wird von Lymphozyten, Makrophagen und DCs produziert und hat sehr viele unterschiedliche Funktionen. So wirkt es immunsuppressiv durch T_{reg}-Zellen, gleichzeitig kann es Makrophagen aktivieren und auch B-Zellen und DCs beeinflussen [49]. Diese sehr verschiedenen Funktionen zeigen, dass die Bedeutung wohl in erster Linie in der Homöostase lymphatischer Zellen liegt [23,30,72] und es deshalb so konstant gebildet wird.

Insgesamt konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sich die Kompartimente der Rattenmilz in ihrem Zytokinmilieu deutlich voneinander unterscheiden. Für die Detektion dieser Unterschiede ist es notwendig die

einzelnen Kompartimente isoliert voneinander zu untersuchen, da die Messung eines ganzen Milzschnitts zu einem nicht aussagekräftigen Durchschnittswert führt. Das auffälligste Kompartiment stellt die PALS dar, die schon im Ruhezustand ein TH1-geprägtes Zytokinmilieu im Gegensatz zum TH2-Milieu der anderen Kompartimente zeigt. Und auch die Stimulation mit Schaferythrozyten führt in erster Linie in der PALS zu deutlichen Veränderungen im Sinne einer frühen TH1-Antwort. Bei der weiteren Auftrennung der PALS konnten wir feststellen, dass diese Veränderungen in der inneren PALS stattfinden. Das sich im Sekundärfollikel neu bildende Kompartiment, das Keimzentrum, wird stark von IL10 geprägt, wohingegen die Corona wohl dem nach außen verdrängten Follikel entspricht und diesem in ihrem Zytokinmilieu stark ähnelt. Alle unsere Ergebnisse sind erst möglich geworden durch die Kombination der Mikrodissektion mit der real-time PCR, die sich damit als sinnvolle und weitere Erkenntnisse versprechende Methode darstellt.

Aufgrund unserer Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die Zytokine, die in einem bestimmten Kompartiment gebildet werden, in andere Kompartimente hinein diffundieren und so die Zellen durch ein „Gemisch“ aktiviert werden oder ob es notwendig ist, dass die Zellen in ihrem Aktivierungsprozess durch die verschiedenen Milieus hindurchwandern.

Eine weitere interessante Untersuchung wäre es, nach Stimulation die Zeitspanne bis zu Tag 3 in häufigere Untersuchungszeitpunkte zu unterteilen, um so Daten darüber zu gewinnen, wann genau der Anstieg von IL2 und IFN γ , den wir nur an Tag 1 detektieren konnten, stattfindet und ob tatsächlich IL12 vor dem von uns gemessenen Abfall an Tag 1 und 3 einen Anstieg zeigt.

Aufschlussreich wäre es auch herauszufinden, welche Zellen genau die von uns gemessenen Zytokinexpressionen hervorrufen und ob es wenige Zellen, die viele Zytokine produzieren, sind oder aber viele Zellen, die wenig Zytokine produzieren. Dafür kann man vielleicht die sich entwickelnde Zellspezifität der Mikrodissektion nutzen, mit der man zukünftig einzelne Zellen auf ihr Zytokinprofil hin untersuchen können wird.

Insgesamt kann die genaue Kenntnis der Zytokine und ihrer Aufgaben mit ihrer Verteilung und Milieubildung an verschiedenen Orten in Zukunft Möglichkeiten für neue Therapieoptionen bieten. Ein Ansatz dabei ist die direkte Beeinflussung der Immunzellen durch verschiedene Zytokine, wie es ja mit einigen Medikamenten (z.B. Ciclosporin), allerdings mit starken Nebenwirkungen, schon probiert wird. Ein anderer Ansatz wäre die Beeinflussung des Milieus, um bestimmte Zellen dort bevorzugt proliferieren oder sterben zu lassen, und so direkt Einfluss auf das Ergebnis einer Immunantwort nehmen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Bedeutung von Zytokinen für verschiedenste Funktionen im Körper ist in den letzten Jahren immer stärker in den Blickpunkt der Forschung gerückt. Besonders im Immunsystem spielen sie als Koordinatoren, die Immunantworten starten, regulieren und auch beenden können, eine große Rolle. Durch die Entwicklung der Mikrodissektion in Kombination mit der real-time PCR ist es möglich geworden, die oft nur sehr gering exprimierten Zytokine zu detektieren und zu quantifizieren und vor allem ausgewählte Gewebereiche zu untersuchen und damit lokale Informationen zu gewinnen. Dabei besteht ein großer Vorteil darin, dass die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung untersucht werden können. In der vorliegenden Arbeit haben wir deshalb diese neue Methode genutzt und das Zytokinmilieu der Rattenmilz in den verschiedenen Kompartimenten untersucht, zuerst im unstimulierten, dann im stimulierten Zustand. Dabei haben wir aus mehreren Gründen als Organ die Milz gewählt: Einmal, weil sie im Immunsystem eine zentrale Rolle einnimmt, indem sie das Blut filtert und Fremdkörper unschädlich macht, desweiteren, weil sie sowohl sichtbar als auch funktionell in verschiedene Kompartimente unterteilt ist, die zuvor noch nie getrennt voneinander untersucht worden sind und schließlich, weil man dort eine lokal begrenzte Immunantwort auslösen kann, die ein gutes Modell darstellt.

Wir haben die mRNA-Expression von 7 verschiedenen Zytokinen analysiert. IL12, IL2 und IFN γ , die von aktivierten T-Zellen produziert werden und Vertreter der TH1-Zytokine sind, IL4 und IL10, die ebenfalls von aktivierten T-Zellen produziert werden, aber Vertreter der TH2-Zytokine darstellen und schließlich noch IL15 und TGF β -1, die von vielen verschiedenen Zellen exprimiert werden. Als Kompartimente haben wir Marginalzone, PALS, Follikel und rote Pulpa unterschieden, in der stimulierten Milz wurde die PALS noch weiter in innere und äußere PALS und der Sekundärfollikel in Keimzentrum und Corona unterteilt. Für die Induzierung einer lokalen Immunantwort wurden erwachsenen Lewis-Ratten intravenös Schaferythrozyten injiziert. Die Milzen wurden jeweils nach 1, 3, 6, 8 und 10 Tagen entnommen und untersucht.

In der ruhenden Milz fanden wir alle von uns untersuchten Zytokine konstitutiv exprimiert. In der PALS herrschte ein TH1-Milieu, in den B-Zellzonen Follikel und Marginalzone und auch in der roten Pulpa ein TH2-Milieu. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass nicht nur die T-Zellen, sondern auch die B-Zellen an der Produktion der Zytokine beteiligt sind, gleichzeitig wirft es die Frage auf, ob viele Zellen wenig Zytokine produzieren oder ob es einige aktivierte Zellen sind, die dann größere Mengen an Zytokinen produzieren.

Nach Stimulation der Milz waren Veränderungen der TH1-Zytokine zu frühen Zeitpunkten (Tag 1 und 3) in der inneren PALS detektierbar. Damit konnten wir belegen, dass die Stimulation mit Schaferythrozyten zu einer TH1-dominierten Immunantwort führt.

Die Unterteilung des Sekundärfollikels in Keimzentrum und Korona ergab, dass die Mantelzone in ihrem Milieu dem ursprünglichen Follikel entsprach, was die Meinung unterstützt, dass die Korona den vom neu gebildetem Keimzentrum nach außen verdrängten Follikel darstellt. Das Keimzentrum wurde von IL10 dominiert.

Mit unseren Ergebnissen konnten wir zeigen, wie wichtig es ist, die Milz unterteilt in ihre einzelnen Kompartimente zu untersuchen, denn wir konnten sowohl zwischen den Kompartimenten der ruhenden Milz unterschiedliche Zytokinprofile finden, als auch nach Stimulierung Veränderungen in der PALS detektieren, die wir im gesamten Schnitt nicht nachweisen konnten. Nach herkömmlicher Untersuchung des ganzen Organs wären diese Informationen verloren gegangen.

Wir konnten zudem unterstreichen, dass die Mikrodissektion in Kombination mit der real-time PCR eine gute Möglichkeit darstellt Zytokinmuster in vivo zu untersuchen, und neue Erkenntnisse ermöglicht. Um jedoch irgendwann einmal durch die Veränderung von Zytokinen und Zytokinmilieu Immunantworten beeinflussen zu können, ist es sicher noch ein langer Weg, bei dem weitere Modelle untersucht und Gesetzmäßigkeiten erkannt werden müssen.

6 Abkürzungen

APC Antigen präsentierende Zelle

BSA Bovine-serum-albumine

DC Dendritic cell (deutsch: dendritische Zelle)

DEPC Diethylpyrocarbonat

DTH delayed type hypersensitivity (deutsch: allergische Reaktion vom verzögerten Typ)

DTT Dithiotreitol

EDTA Ethylendiamintetraacetat

ELISA Enzyme-linked immunosorbent-assay

FACS Fluorescence-activated cell sorter

FDC Follicular dendritic cell (deutsch: follikuläre dendritische Zelle)

IFN Interferon

IL Interleukin

MLN51 Metastatic lymph node gene

NK-Zelle Natürliche Killerzelle

PALS Periarteriolen lymphatische Scheide

PBS phosphate buffered saline

PCR Polymerase chain reaction

PEN Polyethylenaphtalat

PFA Paraformaldehyd

rpm rounds per minute (deutsch: Umdrehungen pro Minute)

RT II Reverse Transkriptase II

SPF Special-pathogen-free

SRBC Sheep red blood cells (deutsch: Schaferythrozyten)

TBS Tris-buffered-saline

TGF Transforming growth factor

TH-Zellen T-Helferzellen

U Unit (Einheit)

[1] **Abbas, A., Murphy, K.M., Sher, A.:**

Functional diversity of helper T lymphocytes

Nature; 383: 787-793 (1996)

[2] **Akbar, A.N., Salmon, M.:**

Cellular environments and apoptosis: tissue microenvironments control activated T-cell death

Immunol. Today; 18: 72-76 (1997)

[3] **Akira, S.:**

Toll-like receptors and innate immunity

Adv Immunol; 78: 1-56 (2001)

[4] **Assoian, R.K., Fleurdelys, B.E., Stevenson, H.C., Miller, P.J., Madtes, D.K., Raines, E.W., Ross, R., Sporn, M.B.:**

Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages

Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 84: 6020-6024 (1987)

[5] **Attanavanich, K., Kearney, J.F.:**

Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells

J. Immunol.; 172: 803-811 (2004)

[6] **Badovinac, V.P., Tvinnereim, A.R., Harty, J.T.:**

Regulation of antigen-specific CD8⁺ T cell homeostasis by perforin and interferon- γ

Science; 290: 1354-1357 (2000)

[7] **Balkwill, F.R., Burke, F.:**

The cytokine network

Immunol. Today; 10: 299-304 (1989)

[8] **Benjamin, D., Knobloch, T.J., Dayton, M.A.:**

Human B-cell interleukin-10: B-cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukin-10

Blood; 80: 1289-1298 (1992)

[9] **Bode, U., Sahle, A., Sparmann, G., Weidner, F., Westermann, J.:**

The fate of effector T cells in vivo is determined during activation and differs for CD4+ and CD8+ cells

J. Immunol.; 169: 6085-6091 (2001)

[10] **Bode, U., Sparmann, G., Westermann, J.:**

Gut-derived effector T cells circulating in the blood of the rat: preferential redistribution by TGF β -1 and IL-4 maintained proliferation

Eur. J. Immunol.; 31: 2116-2125 (2001)

[11] **Bohnsack, J.F., Brown, E.J.:**

The role of the spleen in resistance to infection

Annu. Rev. Med.; 37: 49-59 (1986)

[12] **Bonner, R.F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S.,**

Liotta, L.A.:

Laser Capture Microdissection: Molecular analysis of tissue

Science; 278: 1481-1483 (1997)

[13] **Burgemeister, R.:**

New aspects of laser microdissection in research and routine

J. Histochem. Cytochem.; 53: 409-412 (2005)

[14] **Chadburn, A.:**

The spleen: Anatomy and anatomical function

Semin. Hematol.; 37 (1 Suppl 1): 13-21 (2000)

[15] **Chen, G., Gharib, T.G., Huang, C.C., Taylor, J.M.G, Misek, D.E.,
Kardia, S.L.R., Giordano, T.J., Iannettoni, M.D. Orringer, M.B., Hanash,
S.M., Beer, D.G.:**

Discordant protein and mRNA expressions in lung adenocarcinomas

Mol. Cell. Proteo.; 1: 304-313 (2002)

[16] **Cher, D.J., Mosmann, T.R.:**

Two types of murine helper T cell clone. Delayed-type hypersensitivity is mediated by TH1 clones

J. Immunol.; 138: 3688-3694 (1987)

[17] **Choe, J., Choi, Y.S.:**

IL-10 interrupts memory B cell expansion in the germinal center by inducing differentiation into plasma cells

Eur. J. Immunol.; 28: 508-515 (1998)

[18] **Colucci, F., Caligiuri, M.A., Di Santo, J.P.:**

What does it take to make a natural killer?

Nat. Rev. Immunol.; 3: 413-425 (2003)

[19] **Curran, S., McKay, J.A., McLeod, H.L., Murray, G.I.:**

Laser capture microscopy

Mol. Pathol.; 53(2): 64-68 (2000)

[20] **Dallmann, M.J., Montgomery, R., Larsen, C.P., Wanders, A., Wells, A.F.:**

Cytokine gene expression: Analysis using northern blotting, polymerase chain reaction and in situ hybridization

Immunol. Rev.; 119: 163-179 (2000)

[21] **Egwuaga, C.E., Yu, C.R., Zhang, M., Mahdi, R.M., Kim, S.J., Gery, I.:**

Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in TH1 and TH2 cells: Implications for TH cell lineage commitment and maintenance

J. Immunol.; 168: 3181-3187 (2002)

[22] **Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., Liotta, L.A.:**

Laser capture microdissection

Science; 274: 998-1001 (1996)

[23] **Fahlen, L., Read, S., Gorelik, L., Hurst, S.D., Coffman, R.L., Flavell, R.A., Powrie, F.:**

T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells

J. Exp. Med.; 201: 737-746 (2005)

[24] **Fend, F., Emmert-Buck, M.R., Chuaqui, R., Cole, K., Lee, J., Liotta, L.A., Raffeld, M.:**

Immuno-LCM: Laser Capture Microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis

Am. J. Pathol.; 154: 61-66 (1999)

[25] **Fend, F., Raffeld, M.:**

Laser capture microdissection in pathology

J. Clin. Pathol.; 53: 666-672 (2000)

[26] **Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T. Bougras, G., Muller, W.A., Moretta, L., Münz, C.:**

Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs

PNAS; 101: 16606-16611 (2004)

[27] **Fink, L., Kinf, T., Seeger, W., Ermert, L., Kummer, W., Bohle, R.M.:**

Immunostaining for cell picking and real-time mRNA quantitation

Am. J. Pathol.; 157: 1459-1466 (2000)

[28] **Fong, T.A.T., Mosmann, T.R.:**

Alloreactive murine CD8⁺ T cell clones secrete the TH1 pattern of cytokines

J. Immunol.; 144: 1744-1752 (1990)

[29] **Gauchat, J.F., Gauchat, D., Qiu, G., Mandallaz, M., Stadler, B.M.:**

Detection of cytokine mRNA in polyclonally-, antigen- or allergen- stimulated mononuclear cells

Immunol. Rev.; 119:147-161 (1991)

[30] **Gorelik, L., Flavell, R.A.:**

Transforming growth factor- β in T-cell biology

Nat. Rev. Immunol.; 2: 46-53 (2002)

[31] **Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K., Rauch, C., Srinivasan, S., Fung, V., Beers, C., Richardson, J., Schoenborn, M.A., Ahdieh, M., Johnson, L., Alderson, M.R., Watson, J.D., Anderson, D.M., Giri, J.G.:**

Cloning of a T cell growth factor that interacts with the β chain of the interleukin-2 receptor

Science; 264: 965-968 (1994)

[32] **Granucci, F., Zanoni, I., Feau, S., Capuano, G., Riccardi-Castagnoli, P.:**

The regulatory role of dendritic cells in the immune response

Int Arch Allergy Immuno.; 134: 179-185 (2004)

[33] **Gupta, A.K., Rusterholz, C., Holzgreve, W., Hahn, S.:**

Constant IFN γ mRNA to protein ratios in cord and adult blood T cells suggests regulation of IFN γ expression in cord blood T cells occurs at the transcriptional level

Clin Exp Immunol; 140: 282-288 (2005)

[34] **Han, S., Zhang, X., Marinova, E., Ozen, Z., Beekha-Escura, R., Guo, L.,**

Wansley, D., Booth, G., Fu, Y.-X., Zheng, B.:

Blockade of lymphotoxin pathway exacerbates autoimmune arthritis by enhancing the TH1 response

Arthritis Rheum.; 52: 3202-3209 (2005)

[35] **Herklotz, J.:**

Die lokale Immunantwort in der Milz: Regulation durch das zentrale Nervensystem und Auswirkungen auf die Bewegungsaktivität von Ratten

Med. Diss.; Hannover (2001)

[36] **Höglund, P.:**

Induced peripheral regulatory T cells: The family grows

Eur. J. Immunol.; 36: 264-266 (2006)

[37] **Howard, M., O'Garra, A.:**

Biological properties of interleukin 10

Immunol. Today; 13: 198-200 (1992)

[38] **Iezzi, G., Scotet, E., Scheidegger, D., Lanzavecchia, A.:**

The interplay between the duration of TCR and cytokine signaling determines T cell polarization

Eur. J. Immunol.; 29: 4092-4101 (1999)

[39] Ignatius, R.:

Analyse des immunmodulatorischen Effekts von BCG auf die T-Zell vermittelte spezifische Immunsuppression der verzögerten Allergie gegen

Schaferythrozyten in der Maus

Med. Diss.; Berlin (1992)

[40] Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Capra, J.D.:

Immunobiology: the immune system in health and disease

Churchill Livingstone, 4th edition (1999)

[41] Janeway, C.A., Medzhitov, R.:

Innate immune recognition

Annual review of Immunology; 20: 197-216 (2002)

[42] Jung, R., Soondrum, K., Neumaier, M.:

Quantitative PCR

Clin. Chem. Lab. Med.; 38(9): 833-836 (2000)

[43] Junqueira, L.C., Carneiro, J.:

Histologie

Springer Verlag, Berlin, 4. Auflage (1996)

[44] Kalies, K., Blessenohl, M., Nietsch, J., Westermann, J.

T cell zones of lymphoid organs constitutively express Th1 cytokine mRNA:

Specific changes during the early phase of an immune response

J. Immunol.; 176: 741-749 (2006)

[45] Kalinski, P., Schuitmaker, J.H.N., Hilkens, C.M.U., Wierenga, E.A., Kapsenberger, M.L.:

Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ and to bacterial IL-12 inducers: Decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells

J. Immunol.; 162: 3231-3236 (1999)

- [46] **Kelso, A., Troutt, A.B., Maraskovsky, E., Gough, N.M., Morris, L., Pech, M.H., Thomson, J.A.:**
Heterogeneity in lymphokine profiles of CD4+ and CD8+ T cells and clones activated in vivo and in vitro
Immunol. Rev.; 123: 85-114 (1991)
- [47] **Kirchner, H., Kruse, A., Neustock, P., Rink, L.:**
Cytokine und Interferone, Botenstoffe des Immunsystems
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1. Auflage (1993)
- [48] **Langrish, C.L., McKenzie, B.S., Wilson, N.J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R.A., Cua, D.J.:**
IL-12 and IL-23: Master regulators of innate and adaptive immunity
Immunol. Rev.; 202: 96-105 (2004)
- [49] **Letterio, J.L., Roberts, A.B.:**
Regulation of immune responses by TGF β
Annu.Rev. Immunol.; 16: 137-161 (1998)
- [50] **Liu, Y.J, Johnson, G.D., Gordon, J., MacLennan, C.M.:**
Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses
Immunol. Today; 13: 17-21 (1992)
- [51] **Löffler, G., Petrides, P.E.:**
Biochemie und Pathobiochemie
Springer Verlag, Berlin, 6. Auflage (1998)
- [52] **Lohoff, M., Mak, T.W.:**
Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation
Nat. Rev. Immunol.; 5: 125-135 (2005)

[53] **Lopes-Carvalho, T., Kearney, J.F.:**

Development and selection of marginal zone B cells

Immunol Rev.; 197: 192-205 (2004)

[54] **Lund, F.E., Garvy, B.A., Randall, T.D., Harris, D.P.:**

Regulatory roles for cytokine-producing B cells in infection and autoimmune disease

Curr Dir Autoimmun; 8: 25-54 (2005)

[55] **MacLennan, I.C.M.:**

Germinal centers

Annu. Rev. Immunol.; 12: 117-139 (1994)

[56] **Mebius, R.E., Kraal, G.:**

Structure and function of the spleen

Nat. Immunol.; 5: 606-616 (2005)

[57] **Moser, M., Murphy, K.M.:**

Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development

Nat. Immunol.; 1: 199-205 (2000)

[58] **Mosmann, T.R., Sad, S.:**

The expanding universe of T-cell subsets: TH1, TH2 and more

Immunol. Today; 17: 138-146 (1996)

[59] **Murphy, K.M., Reiner, S.L.:**

The lineage decisions of helper T cells

Nat. Rev. Immunol.; 2: 933-944 (2002)

[60] **Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y.-J., Abrams, J.S., Moore, K.W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, L.F., Kastelein, R.A.:**

Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12

Immunity; 13: 715-725 (2000)

[61] **Paludan, S.R.:**

Interleukin-4 and interferon- γ : The quintessence of a mutual antagonistic relationship

Scand. J. Immunol.; 48: 459-468 (1998)

[62] **Park, C.S., Choi, Y.S.:**

How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre?

Immunology, 114: 2-10 (2005)

[63] **Paul, W.E.:**

Interleukin 4/ B cell stimulatory factor 1: one lymphokine, many functions

Faseb J.; 1: 456-461 (1987)

[64] **Pistoia, V.:**

Production of cytokines by human B cells in health and disease

Immunol. Today; 18: 343-349 (1997)

[65] **Poston, R.M., Kurlander, R.J.:**

Analysis of the time course of IFN γ mRNA and protein production during primary murine Listeriosis

J. Immunol.; 146: 4333-4337 (1991)

[66] **Romagnani, S.:**

Induction of TH1 and TH2 responses: A key role for the `natural` immune response?

Immunol. Today; 13: 379-381 (1992)

[67] **Sacks, D., Noben-Trauth, N.:**

The immunology of susceptibility and resistance to leishmania major in mice

Nat. Rev. Immunol.; 2: 845-858 (2002)

[68] **Schluns, K.S., Lefrancois, L.:**

Cytokine control of memory T-cell development and survival

Nat. Rev. Immunol.; 3: 269-279 (2003)

[69] **Schnare, M., Röllinghoff, M., Qureshi, S.:**

Toll-like receptors: Sentinels of host defence against bacterial infection

Int. Arch. Allergy. Immunol.; 139: 75-85 (2006)

[70] **Scott, P., Kaufmann, S.H.E.:**

The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection

Immunol. Today; 12: 346-348 (1991)

[71] **Shen, Y., Iqbal, J., Xiao, L., Lynch, R.C., Rosenwald, A., Staudt, L.M., Sherman, S., Dybkaer, K., Zhou, G., Eudy, J.D., Delabie, J., McKeithan, T.W., Chan, W.C.:**

Distinct gene expression profiles in different B-cell compartments in human peripheral lymphoid organs

BMC Immunology; 5: 20 (2004)

[72] **Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Annunziata, N., Doetschmann, T.:**

Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- β 1 gene results in multifocal inflammatory disease

Nature; 359: 693-699 (1992)

[73] **Smith, K.A.:**

Interleukin-2: Inception, impact, and implications

Science; 240: 1169-1176 (1988)

[74] **Sospedra, M., Martin, R.:**

Immunology of multiple sclerosis

Annu. Rev. Immunol.; 23: 683-747 (2005)

[75] **Spitz, M., Gearing, A., Callus, M., Spitz, L., Thorpe, R.:**

Interleukin-2 in vivo: production of and response to interleukin-2 in lymphoid organs undergoing a primary response to heterologous erythrocytes

Immunology; 54: 527-532 (1985)

[76] **Taylor, A., Verhagen, J., Akdis, C.A., Akdis, M.:**

T regulatory cells in allergy and health: A question of allergen specificity and balance

Int. Arch. Allergy. Immunol.; 135: 73-82 (2004)

[77] **Thorbecke, G.J., Amin, A.R., Tsigabe, V.K.:**

Biology of germinal centers in lymphoid tissue

FASEB J; 8: 832-840 (1994)

- [78] **Tian, Q., Stepaniants, S.B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M.C., Doyle, M.J., Yi, E.C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J.P., Gunter, B., Linseley, P.S., Stoughton, R.B., Aerborsold, R., Collins, S.J., Hanlon, W.A., Hood, L.E.:**
Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in mammalian cells
Mol. Cell. Proteo.; 3: 960-969 (2004)
- [79] **Trinchieri, G.:**
Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity
Nat. Rev. Immunol.; 3: 133-145 (2003)
- [80] **Trinchieri, G.:**
Cytokines and cytokine receptors
Immunol. Rev.; 202: 5-7 (2004)
- [81] **Van den Eertwegh, A.J.M., Boersma W.J.A., Claassen, E.:**
Immunological functions and in vivo Cell-Cell interactions of T-cells in the spleen
Crit. Rev. Immunol.; 11(6): 337-380 (1992)
- [82] **Van Rooijen, N., Claassen, E.T., Kraal, G., Dijkstra, C.D.:**
Cytological basis of immune functions of the spleen
Prog. Histochem. Cytochem.; (1989)
- [83] **Vella, A.T., Dow, S., Potter, T.A., Kappler, J., Murrack, P.:**
Cytokine-induced survival of activated T cells in vitro and in vivo
Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 95: 3810-3815 (1998)
- [84] **Veerman, A.J.P.:**
On the interdigitating cells in the thymus-dependent area of the rat spleen: A relation between the mononuclear phagocyte system and T-lymphocytes
Cell Tiss Res; 148: 247-257 (1974)

[85] **Vollmar, A., Dingermann, T.:**

Immunologie- Grundlagen und Wirkstoffe

Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 1.Auflage (2005)

[86] **Westermann, J., Bode, U.:**

Distribution of activated T cells migrating through the body: a matter of life and death

Immunol. Today; 20:302-306 (1999)

[87] **Westermann, J., Ehlers, E.M., Exton, M.S., Kaiser, M., Bode, U.:**

Migration of naive, effector and memory T cells: implications for the regulation of immune responses

Immunol. Rev.; 184: 20-37 (2001)

[88] **Westermann, J., Engelhardt, B., Hoffmann, J.C.:**

Migration of T Cells in vivo: Molecular mechanisms and clinical implications

Ann Intern Med., 135: 279-295 (2001)

[89] **Westermann, J., Bode, U., Sahle, A., Speck, U., Karin, N., Bell, E.B., Kalies, K., Gebert, A.:**

Naive, effector, and memory T Lymphocytes efficiently scan dendritic cells in vivo: contact frequency in T cell zones of secondary lymphoid organs does not depend on LFA-1 expression and facilitates survival of effector T cells

J. Immunol.; 174: 2517-2524 (2005)

[90] **Willführ, K.U., Westermann, J., Pabst, R.:**

Absolute numbers of lymphocyte subsets migrating through the compartments of the normal and transplanted rat spleen

Eur. J. Immunol.; 20: 903-911 (1990)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. J. Westermann. Nach der Überlassung des Themas war er jederzeit für mich ansprechbar und stand mir mit seinem fachlichen Wissen und seinen Ratschlägen immer hilfreich zur Seite. Seine Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten hat mich beeindruckt und immer wieder motiviert.

Auch Frau Dr. rer. nat. K. Kalies möchte ich herzlichst danken. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme und konnte mir meist schnell und unkompliziert weiterhelfen.

Besonders möchte ich mich bei den engagierten medizinisch-technischen Assistentinnen Frau E. Behrens, Frau L. Gutjahr, Frau P. Lau und Frau M.L. Leppin bedanken, die mir mit Geduld vieles erklärt haben und deren Zuarbeit immer unverzüglich und reibungslos geklappt hat.

Und auch den Herren Dr. rer. nat. U. Speck und Dr. rer. nat. K. Nohroudi will ich meinen Dank aussprechen, die mir bei allen Kämpfen mit meinem Computer und mit neu zu lernenden Programmen geholfen haben und auch in anderen Dingen immer den ein oder anderen hilfreichen, praktischen Tipp für mich parat hatten.

Schließlich möchte ich mich noch bei meinem privaten Umfeld bedanken, einmal bei meiner Familie, wobei ich besonders meine Mutter herausstellen möchte, die bei dieser Arbeit vorzüglich Korrektur gelesen hat, und auch bei meinem Freund Frank Zimmermann, der sich geduldig alle Probleme angehört und mir immer wieder Mut gemacht hat.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Maria Deierling
Geboren: 14.05.1981 in Hannover
Eltern: Ulrike Deierling, geb. Lubach; Oberstudienrätin
Friedrich-Wilhelm Deierling; selbstständiger Einzelhandelskaufmann

Geschwister: Alexander Deierling; Student der Rechtswissenschaften
Elisabeth Deierling; Ausbildung zur Physiotherapeutin

Schulischer Werdegang:

1987-1991 Grundschule Uffeln
1991-2000 Wesergymnasium Vlotho
Abschluss: Abitur 2000 (Gesamtnote: 1,3)

Studium:

Herbst 2000 Beginn des Medizinstudiums an der Medizinischen Universität zu Lübeck
Sommer 2002 Ärztliche Vorprüfung (Gesamtnote: 2)
Sommer 2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2)
Frühjahr 2006 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 1,6)
Frühjahr 2007 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 1,49)

Auslandsaufenthalte:

März 2004 Famulatur in der Neurologie in Wien (Österreich)
August 2004 Famulatur in einer Kinderarztpraxis in Detroit (USA)
Sommer 2006 2 Monate Innere Medizin in Wellington (Neuseeland) im Rahmen des praktischen Jahres

Stipendium:

seit Januar 2003 Stipendium der Friedrich-Ebert-Stiftung

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

Oktober 2003 Beginn der Experimente für meine Dissertation im Institut der Anatomie unter Betreuung von Prof. Dr. Westermann
Januar 2005 Fertigstellung des experimentellen Teils der Dissertation

