

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Institut für Immunologie des Zentrums für Diagnostik

Institutsleiter: Prof. Dr. med. Bernhard Fleischer

Stellvertretung des Direktors: Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker

## **Die Rolle des Purinrezeptors P2X7 bei der Regulation von T-Zellen**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Merete Bock  
aus Hamburg

Hamburg 2011

**Angenommen von der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.12.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der**

**Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. H.-W. Mittrücker**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. F. Haag**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. B. Fleischer**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 T-Lymphozyten.....	1
1.3 Das Immunsystem des Darms.....	3
1.4 Der Purinrezeptor P2X7 .....	4
1.5 <i>Listeria monocytogenes</i> -Infektionsmodell .....	6
1.6 <i>Salmonella typhimurium</i> -Infektionsmodell.....	8
1.7 Ziel der Arbeit.....	10
<b>2. Material .....</b>	<b>12</b>
2.1 Feinchemikalien und sonstige Reagenzien.....	12
2.2 Puffer und Medien .....	13
2.3 Antikörper.....	14
2.4 Bakterienstämme .....	14
2.5 Mausstämme.....	15
2.6 Geräte und Materialien .....	15
2.7 Software .....	15
<b>3. Methoden.....</b>	<b>16</b>
3.1 Bakterienkultur und Infektion .....	16
3.2 OT1-Transfer.....	16
3.3 CFSE-Färbung .....	17
3.4 Isolierung von Leukozyten aus Milz, Leber, Darm und Lymphknoten .....	18
3.4.1 Milzaufreinigung.....	18
3.4.2 Leberaufreinigung .....	19
3.4.3 Lymphknotenaufreinigung.....	19
3.4.4 Darmaufreinigung IEL .....	19
3.4.5 Darmaufreinigung LPL .....	20

3.5 Bestimmung der Zellzahl .....	20
3.6 Bakterientiterbestimmung .....	20
3.7 Stimulation der Zellen .....	21
3.8 Antikörperfärbung .....	21
3.8.1 Extrazelluläre Antikörperfärbung .....	21
3.8.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung .....	21
3.9 Durchflusszytometrie .....	22
3.10 Statistik .....	23
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
4.1 Akkumulation und Proliferation von wildtyp und P2X7ko OT1-T-Zellen in LmOVA infizierten C57BL/6-Mäusen .....	24
4.2 Akkumulation und Proliferation von OT1-T-Zellen in oral mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen .....	31
4.3 Akkumulation und Proliferation von OT1-T-Zellen in intravenös mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen .....	37
4.4 Akkumulation und Proliferation von OT1-Zellen in SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen .....	41
4.5 Akkumulation und Proliferation von P2X7-positiven und P2X7-negativen T-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen .....	45
4.6 Akkumulation und Proliferation von OT1-Zellen in oral mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen .....	53
4.7 Expression von P2X7 auf Th17-Zellen und T-Zellen mit $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor .....	61
4.7.1 Expression von P2X7 auf Th17-Zellen .....	61
4.7.2 Expression von P2X7 auf T-Zellen mit dem $\gamma\delta$ -TZR .....	65
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>70</b>
5.1 Gewebsspezifische Expression des P2X7-Rezeptors auf Th17-Zellen und $\gamma\delta$ -TCR-T-Zellen .....	70
5.2 Induktion einer spezifische T-Zellantwort in OT1-T-Zellen durch LmOVA und SL7207-OVA .....	71
5.3 Abhängigkeit der T-Zellantwortstärke vom verabreichten Pathogen .....	72

5.5 Akkumulation der transferierten OT1-Zellen am Ort der Entzündung.....	75
5.6 Die Rolle des P2X7-Rezeptor bei der Regulation der T-Zellantwort.....	77
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>80</b>
<b>7. Summary .....</b>	<b>81</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>84</b>
<b>10. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>87</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>95</b>
<b>12. Lebenslauf.....</b>	<b>96</b>
<b>13. Eidesstattliche Versicherung.....</b>	<b>98</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Körper vor den schädlichen Auswirkungen einer Infektion, indem es Krankheitserreger und deren Toxine im Rahmen einer Entzündungsreaktion erkennt und unschädlich macht. Wird das Immunsystem nur unzureichend reguliert, kann es zu unangemessenen Immunantworten kommen. Zum Beispiel bei Allergien und Autoimmunerkrankungen überreagiert das Immunsystem gegen eigentlich harmlose Fremdstoffe oder körpereigene Strukturen und löst somit aufgrund einer fehlerhaften Regulation eine Krankheit aus. Hier zeigt sich wie wichtig die Regulation der Immunantwort für die Gesundheit des Menschen ist.

### 1.2 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entstammen dem Knochenmark und reifen im Thymus zu naiven T-Zellen heran. Sie erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) Peptidfragmente fremder Antigene, die ihnen mittels Proteinen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) präsentiert werden (MHC-Restriktion). MHC-Moleküle sind spezialisierte Oberflächenmoleküle, die unter anderem eine wichtige Rolle in der Transplantatabstoßung oder -akzeptanz spielen. Es werden zwei verschiedene Klassen von MHC-Molekülen unterschieden. MHC-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen im menschlichen Körper. Die über MHC-I-Moleküle präsentierten Peptide stellen ein Abbild der in der Zelle synthetisierten Proteine dar. Sie spielen damit eine wichtige Rolle bei der Erkennung des „Selbst“, der Erkennung von Virenbefall und transformierten Zellen. MHC-I-Moleküle, die zellfremde Peptide präsentieren, werden von zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen erkannt und zerstört.

$CD4^+$  T-Zellen erkennen MHC-II-Moleküle, welche nur von den professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC) getragen werden. MHC-II-Moleküle präsentieren Peptide, die von extrazellulären Proteinen stammen, welche z.B. durch rezeptorvermittelte Endo- oder Phagozytose in die Zelle aufgenommen wurden. MHC-II-Moleküle sind damit wichtig für die Erkennung extrazellulärer Antigene.

Mit Hilfe eines Vorgangs der Cross-Präsentation genannt wird, können extrazelluläre Antigene auch über MHC-I-Moleküle präsentiert werden und dann  $CD8^+$  T-Zellen stimulieren. Zur Cross-Präsentation fähig sind vor allem die professionellen APC. Dabei nehmen diese Zellen über Endozytose Proteine auf und verarbeiten sie so, dass sie mit Hilfe des MHC-I-Moleküls auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die genauen Mechanismen dafür sind allerdings noch unklar. Diese Cross-Präsentation

scheint unter anderem eine wichtige Rolle bei der Immunantwort gegen *Listeria monocytogenes* zu spielen (Reinicke *et al.* 2009, Heath und Carbone 2001).

MHC-Antigen-Komplexe werden von T-Zellen mit Hilfe ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors erkannt. Durch den Kontakt wird die naive T-Zelle aktiviert und beginnt zu proliferieren und weiter zu differenzieren. Das Ergebnis dieser Differenzierung ist vom Zytokinumfeld abhängig. Aufgrund verschiedener Oberflächenmoleküle und Effektorfunktionen lassen sich T-Zellen in mehrere Subpopulationen aufteilen.

T-Helferzellen sind CD4-positive Zellen. Mit Hilfe ihres spezifischen T-Zell-Rezeptors erkennen sie Antigene, die ihnen von professionellen APC mittels MHC-II-Molekülen präsentiert werden. T-Helferzellen differenzieren abhängig vom Zytokinumfeld zu verschiedenen Effektorzellen (Zhu *et al.* 2010). Diese lassen sich in mindestens drei Untergruppen aufteilen. Th1-Zellen entstehen durch Interleukin-12-Stimulation (IL-12). Sie produzieren vor allem Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) und aktivieren so Makrophagen, die dadurch intrazelluläre Bakterien effizienter zerstören können. Th1-Zellen sind ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene (O'Garra und Robinson 2004, Zhu *et al.* 2010). Die zweite Gruppe, die Th2-Zellen, differenzieren unter dem Einfluss von IL-4. Sie bilden IL-5 und IL-4, welches B-Lymphozyten zur Differenzierung, Proliferation und Antikörperbildung bewegt. Th2-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung extrazellulärer Bakterien und Parasiten (Paul und Zhu 2010). Die dritte Gruppe der T-Helferzellen sind die Th17-Zellen. Sie entstehen unter dem Einfluss vom Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-6 und IL-23. Th17-Zellen produzieren vor allem IL-17A, IL-17F und IL-22. IL-17-Rezeptoren finden sich auf Fibroblasten, Epithelzellen und Keratinozyten. Durch IL-17-Stimulation produzieren diese Zellen verschiedene Zytokine, Chemokine und hämatopoetische Faktoren, wie z.B. den Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF). IL-22 stimuliert die Produktion von Defensinen in den Keratinozyten der Epidermis. Damit spielen Th17-Zellen eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten (Neutrophilen) sowie bei der Granulopoese und werden für die Bekämpfung von Pilzen und extrazellulären Bakterien benötigt. Außerdem scheinen sie eine wichtige Bedeutung bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen zu spielen. (O'Quinn *et al.* 2008, Stockinger *et al.* 2007, Kolls und Khader 2010)

Zytotoxische T-Zellen sind CD8-positiv. Sie erkennen Zellen, welche Peptidfragmente von zytosolischen Pathogenen über ihre MHC-I-Moleküle präsentieren. Sie eliminieren die Erreger über eine antigenspezifische Zytolyse der infizierten Zellen. Die Zytolyse erfolgt entweder über die Freisetzung von Inhaltsstoffen zytolytischer Granula (Perforin, Granzyme u.a.) der T-Zellen oder über eine nichtkonstitutive Expression von Fas und dessen Wechselwirkung mit dem Fas-Ligand. Intrazelluläre Bakterien werden

durch die Lyse der infizierten Zellen freigesetzt und können dann durch Phagozyten eliminiert werden. Durch die Produktion von Zytokinen, wie z.B. IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) oder TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ), induzieren zytotoxische T-Zellen in Phagozyten antibakterielle Effektormechanismen (z.B. Freisetzung von Stickstoffmonoxid). CD8<sup>+</sup> T-Zellen dienen damit vor allem der Virusabwehr und der Eliminierung intrazellulärer Bakterien sowie entarteter Zellen (Harty *et al.* 2000).

Regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) haben vor allem die Aufgabe Immunantworten zu modulieren. Sie sind für die Unterdrückung einer überschießenden Immunantwort, z.B. gegen körpereigene Zellen oder im Verlauf chronischer Infektionen, verantwortlich. Ihre Aufgabe erfüllen sie sowohl durch zellkontaktabhängige Mechanismen als auch durch die Produktion immunsupprimierender Zytokine, wie IL-10 oder TGF- $\beta$ . Treg-Zellen spielen daher auch eine zentrale Rolle in der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen. Sie sind CD4 sowie CD25-positiv und exprimieren den Transkriptionsfaktor FoxP3 (Campbell und Koch 2011).

Im Rahmen einer Immunantwort differenziert ein Teil der T-Zellen zu T-Gedächtniszellen. T-Gedächtniszellen sind langlebige Zellen, die bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger schnell reagieren und die Infektion rasch bekämpfen können (Pepper und Jenkins 2011).

### 1.3 Das Immunsystem des Darms

Das darmassoziierte Lymphgewebe (gut associated lymphoid tissue, GALT) ist Teil des mukosalen Immunsystems. Es spielt eine wichtige Rolle in der Infektabwehr, gewährleistet aber auch die orale Toleranz, d.h. es muss zwischen ungefährlichen Nahrungsbestandteilen, kommensalen Bakterien und pathogenen Mikroorganismen unterscheiden.

Das Immunsystem des Darms lässt sich in zwei Anteile aufteilen. Der erste, induktive Anteil ist verantwortlich für den initialen Kontakt mit den Antigenen. Dazu zählen die Peyer'schen Plaques mit den M-Zellen und die Lymphfollikel der Mukosa. Als zweiten, effizienten Anteil werden die Zellen bezeichnet, die nach erneutem Kontakt die Effektorfunktionen ausüben. Dazu zählen die Lamina propria Lymphozyten (LPL) und die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) (Brandtzaeg *et al.* 2008).

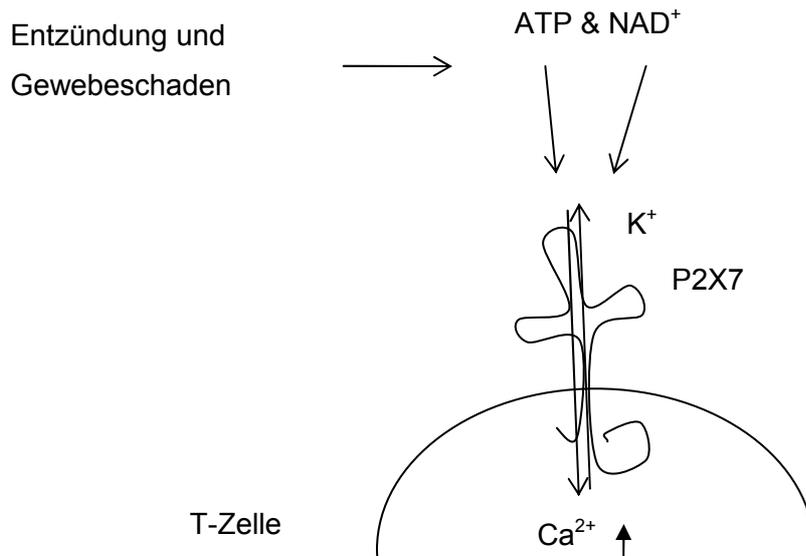
Peyer'sche Plaques finden sich nur im Dünndarm. Sie besitzen zum Darmlumen hin einen sogenannten Dom, der von M-Zellen überlagert wird. Diese M-Zellen befinden sich auch vereinzelt zwischen den Epithelzellen. Sie besitzen im Gegensatz zu Epithelzellen keine Mikrovilli, sondern eine basolaterale mikro-gefaltete Struktur und sind zur Endo- und Transzytose fähig. Sie transportieren das aufgenommene Material

in den Follikel, wo der Kontakt des Antigens mit immunkompetenten Zellen stattfindet. Viele Erreger benutzen die M-Zellen als Eintrittspforte in die Darmschleimhaut. In den Peyer'schen Plaques aktivierte T-Zellen gelangen aus den intestinalen Lymphfollikeln in die mesenterialen Lymphknoten (MLN). Von dort migrieren sie über die Lymphgefäße in die Blutbahn, von wo sie erneut in die Mukosa des Darms, aber auch in die Mukosa anderer Organe (z.B. die der Bronchien) einwandern können. T-Zellen in den MLN können auch direkt über dendritische Zellen (DC) der Lamina propria aktiviert werden. Diese DC haben lange, astartige Fortsätze, mit denen sie bis in das Darmlumen reichen und dort Pathogene aufnehmen können. Sie wandern in die MLN, wo dann die T-Zellen aktiviert werden (Mowat und Viney 1997, Lefrançois und Puddington 2006). Die T-Zellen aus der Lamina propria, den Peyer'schen Plaques und den mesenterialen Lymphknoten sind den peripheren T-Zellen phänotypisch sehr ähnlich. Es handelt sich überwiegend um konventionelle T-Zellen, die im Thymus heranreifen und später in den Darm einwandern. Das Darmepithel hingegen enthält eine deutlich anders zusammengesetzte T-Zellpopulation. Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) sind vorwiegend CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten (>80%). Nur 5-10% aller IEL sind CD4-positiv (Ishikawa *et al.* 2007). Auch finden sich hier doppelt positive (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) und doppelt negative (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) T-Zellen, wohingegen B-Lymphozyten im intestinalen Epithel nicht anzutreffen sind. Normalerweise tragen periphere T-Zellen einen TZR, der aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette besteht ( $\alpha\beta$ TZR) sowie einen CD8-Heterodimer aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette (CD8 $\alpha\beta$ ). Diese Zellen werden als konventionelle T-Zellen bezeichnet. In Mäusen sind aber etwa zwei Drittel der IEL unkonventionelle T-Zellen. Sie tragen ein CD8-Homodimer aus zwei  $\alpha$ -Ketten (CD8 $\alpha\alpha$ ) anstatt des CD8-Heterodimers. Ein großer Teil dieser Zellen hat außerdem einen TZR aus einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Kette ( $\gamma\delta$ TZR) anstatt des  $\alpha\beta$ TZR. Diese unkonventionellen T-Zellen erkennen keine konventionellen MHC-Moleküle. Sie interagieren mit MHC-Ib-Molekülen und spielen anscheinend bei der Regulation der Immunantwort im Darm eine wichtige Rolle (Agace 2008, Hayday *et al.* 2001, Johansson-Lindbom und Agace 2007, Kunisawa *et al.* 2007, van Wijk und Cheroutre 2009).

#### **1.4 Der Purinrezeptor P2X7**

Bei Entzündungsreaktionen und Gewebszerstörung werden Purin-Nukleotide freigesetzt, die über purinerge Rezeptoren die Funktion von Zellen beeinflussen können (Haag *et al.* 2007). T-Zellen besitzen den purinerge Rezeptor P2X7. P2X7 ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal aus der Gruppe der P2X-Familie. Die Aktivierung von P2X7 erfolgt entweder direkt durch eine ATP-Bindung oder indirekt durch NAD<sup>+</sup>

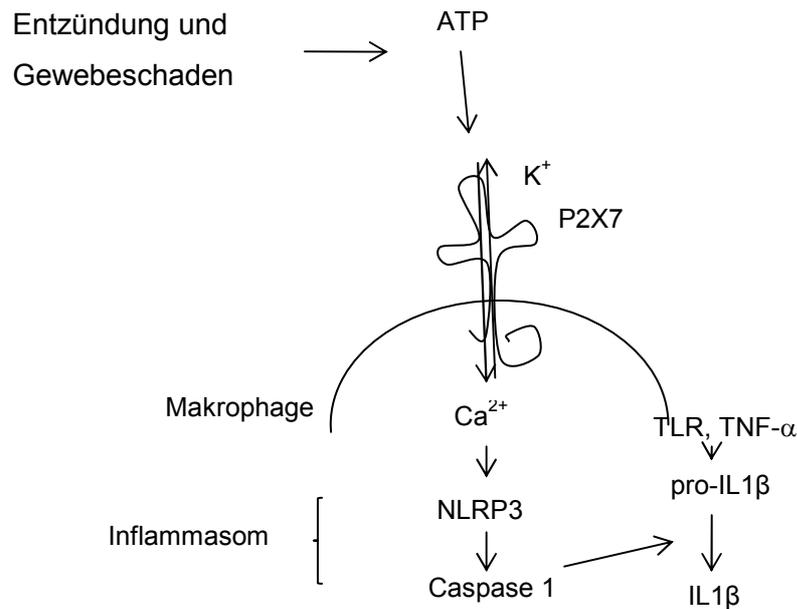
über eine ADP-Ribosyl-Transferase (ART), die  $\text{NAD}^+$  spaltet und eine ADP-Ribosylgruppe auf den Rezeptor überträgt. Die Aktivierung des Rezeptors führt zu einem Calciuminflux, der bei T-Zellen zur Abspaltung verschiedener Oberflächenmoleküle (Shedding), zu Veränderungen der Zellmembran (z.B. Externalisierung von Phosphatidylserin) und bei andauernder Stimulation zur Apoptose der Zelle führt. (Seman *et al.* 2003, Adriouch *et al.* 2008, Heiss *et al.* 2008, Scheuplein *et al.* 2009, Schwarz *et al.* 2009).



**Abb. 1: P2X7 auf T-Zellen**

Bei Entzündungen und Gewebeschäden werden ATP und  $\text{NAD}^+$  freigesetzt. Diese können direkt oder ART-vermittelt den P2X7-Rezeptor aktivieren. Es kommt zu einem Calciuminflux in die T-Zelle. Die andauernde Stimulation führt schließlich zur Apoptose der T-Zelle.

P2X7 ist auch auf Makrophagen und anderen professionell antigenpräsentierenden Zellen zu finden. Hier führt eine Stimulation des Rezeptors zur Aktivierung des so genannten IL-1-Inflammasoms. Das IL-1-Inflammasom wirkt als ein intrazellulärer Sensor für Pathogene und Beschädigungen der Zelle. P2X7 aktiviert NLRP3 (NLR family, pyrin domain containing 3), wobei der genaue Mechanismus hierfür noch unklar ist. Die Aktivierung könnte direkt über den Calciuminflux stattfinden oder auch über den Influx von anderen Ionen über andere Kanäle (z.B. über die Pannexin-Pore, die von P2X7 geöffnet wird). NLRP3 aktiviert die Caspase-1, welche für die proteolytische Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  zu IL-1 $\beta$  verantwortlich ist. Die Expression von pro-IL-1 $\beta$  wird durch die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (TLR) und durch TNF- $\alpha$  induziert. IL-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Zytokin und bei Entzündungen unter anderem an der Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten beteiligt. Es sorgt für eine vermehrte Produktion von Akut-Phase-Proteinen und für einen Temperaturanstieg (Ghiringhelli *et al.* 2009, Ferrari *et al.* 2006, Kanneganti *et al.* 2007).



**Abb. 2: P2X7 auf Makrophagen**

Die Aktivierung von P2X7 auf Makrophagen und anderen professionellen APC führt zur Aktivierung des IL-1-Inflammasoms, welches für die Reifung und Sekretion des proinflammatorischen IL-1 $\beta$  verantwortlich ist.

In Mäusen ist P2X7 vor allem auf Treg-Zellen, NKT-Zellen (Natürliche Killer-T-Zellen) und T-Zellen der Darmmukosa stark exprimiert (Aswad *et al.* 2005, Hubert *et al.* 2010, Kawamura *et al.* 2006, Heiss *et al.* 2008), wodurch eine höhere Sensitivität dieser Zellen gegenüber extrazellulären Nukleotiden gegeben ist. P2X7 scheint auf Grund seiner proapoptotischen Wirkung vor allem eine inhibitorische Funktion bezüglich der T-Zellantwort zu haben. Diese Funktion könnte z.B. bei Infektionen und Entzündungen eine Rolle spielen, da hier durch Gewebeschaden unter anderem ATP freigesetzt wird, welches den Purinrezeptor aktiviert (Chen und Brosnan 2006).

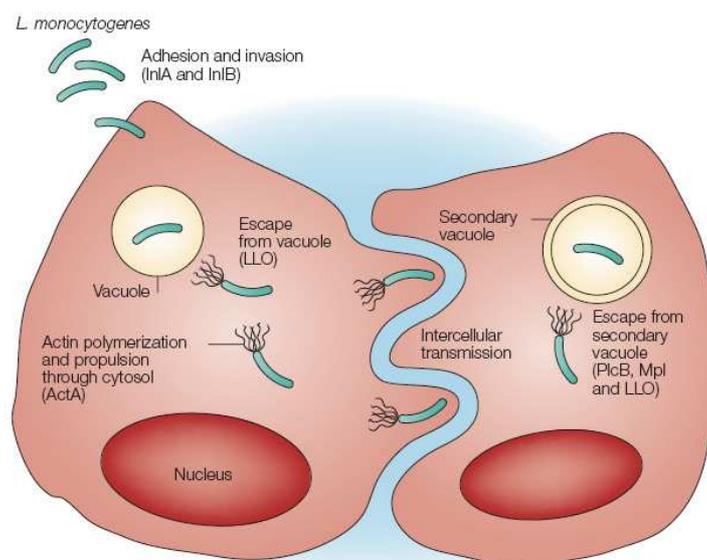
In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die T-Zellantwort in P2X7 knock-out (ko) Mäusen während einer Listerieninfektion stärker ausgeprägt ist als in wildtyp (wt) Mäusen. Daraus lässt sich folgern, dass Zellen ohne P2X7 möglicherweise einen Proliferations- oder Überlebensvorteil in entzündetem Gewebe haben (Heiss *et al.* 2008).

### 1.5 *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell

*Listeria monocytogenes* (Lm) ist ein ubiquitär vorkommendes, grampositives und fakultativ anaerobes Bakterium. Es findet sich im Boden, in Gewässern, auf Pflanzen und im Verdauungstrakt vieler Wild- und Haustiere (Hahn *et al.* 2008). Die häufigste Infektionsquelle sind nicht-konservierte Nahrungsmittel, wie z.B. Rohmilchkäse oder

rohes Fleisch. Die Infektion mit Listerien wird als Listeriose bezeichnet. Für den Menschen sind Listerien nur fakultativ pathogen. Die meisten Infektionen verlaufen bei immunkompetenten Personen klinisch inapparent oder mit nur leichten Symptomen im Bereich des Magen-Darm-Trakts, wie Übelkeit, Durchfall und Erbrechen. Bei immungeschwächten Patienten kann es allerdings auch zu schweren Erkrankungen, wie einer Enzephalitis, kommen. Schwangere sind besonders gefährdet, da die Listerien plazentagängig sind und zu Früh-, Tod- oder Fehlgeburten führen können (Herold 2008).

Listerien vermehren sich fakultativ intrazellulär. Aus diesem Grund sind besonders CD8<sup>+</sup> T-Zellen entscheidend für eine erfolgreiche Immunantwort (Mittrücker *et al.* 2000a, Kursar *et al.* 2004). Listerien besitzen mehrere Pathogenitätsfaktoren, von denen Listeriolysin O (LLO) ausschlaggebend für die Virulenz ist. Listerien sind invasive Erreger. Sie gelangen nach oraler Aufnahme mit Hilfe des Internalin A (InIA) durch das Darmepithel in den Kreislauf und damit auch in Milz und Leber. Durch das Internalin B (InIB) gelangen die Bakterien in die Phagosomen von Makrophagen, welches sie mit Hilfe des LLO und verschiedener Phospholipasen wieder verlassen können. Im Zytoplasma vermehren sich die Listerien und bewegen sich mit einer Aktinpolymerase (ActA). Durch Ausstülpungen der Plasmamembran in angrenzende Zellen kann sich der Erreger weiter ausbreiten, ohne den extrazellulären Raum zu betreten. Somit ist er vor der humoralen Immunabwehr geschützt (Hamon *et al.* 2006, Pamer 2004, Vázquez-Boland 2001).



**Abb. 3: Pathogenese der *Listeria monocytogenes* Infektion**

Mittels Internalin A und B (InIA und B) gelangen die Listerien in die Wirtszelle, wo sie mit Hilfe des Listeriolysin O (LLO) die phagosomale Membran lysieren können. Im Zytoplasma vermehren sich die Bakterien und können durch die Aktinpolymerase (ActA) in die Nachbarzelle eindringen, ohne den extrazellulären Raum zu betreten. Dort verlassen sie dann mithilfe der Phosphatyl-Cholin-spezifischen Phospholipase C (PlcB), einer Metalloprotease (Mpl) und dem LLO die sekundäre Vakuole und liegen im Zytoplasma vor (nach Pamer 2004).

In dem für diese Arbeit verwendeten Infektionsmodell wurde ein rekombinanter Bakterienstamm (LmOVA) eingesetzt, in dessen Genom das Gen für das Ovalbumin integriert wurde (Shen *et al.* 1995). Diese Listerien exprimieren Ovalbumin unter einem LLO-Promotor. Weiterhin trägt das Ovalbumin am N-Terminus zusätzlich das Leader-Peptid vom LLO. Daher entsprechen Expression und Sekretion von Ovalbumin weitgehend der des LLO. Wie alle zytoplasmatischen Proteine steht Ovalbumin damit für eine Prozessierung und Präsentation im MHC-I-Weg zur Verfügung und kann von OT1-T-Zellen erkannt werden, da diese einen transgenen T-Zellrezeptor gegen das OVA-Peptid tragen (Foulds *et al.* 2002, Hogquist *et al.* 1994).

### **1.6 *Salmonella typhimurium*-Infektionsmodell**

Salmonellen sind gramnegative Stäbchenbakterien, die zur Gattung *Salmonella* zusammengefasst und der Familie der Enterobacteriaceae zugeordnet werden. Sie vermehren sich hauptsächlich intrazellulär in Makrophagen, aber auch in nicht phagozytierenden Zellen, z.B. Darmepithelzellen. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) verursacht in Menschen eine akute Gastroenteritis. Meistens werden Bakterien über verunreinigte Lebensmittel, z.B. Eier und Hühnerfleisch, aufgenommen und sind damit die Erreger der klassischen „Lebensmittelvergiftung“. Es kann aber auch zu einer schwerwiegenden Enterocolitis kommen (Ina *et al.* 2003) In der Maus verursacht *S. typhimurium* eine dem humanen Typhus ähnelnde systemische Erkrankung (Carter und Collins 1974, Hapfelmeier und Hardt 2005, Mittrücker und Kaufmann 2000).

Um auch in Mäusen eine Entzündung des Darms zu verursachen, müssen die Mäuse mit einer hohen Einzeldosis Streptomycin vorbehandelt werden. Streptomycin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das vor allem gegen gramnegative Keime wirksam ist. Salmonellen hingegen besitzen eine natürliche Resistenz gegen Streptomycin. Mit Hilfe des Antibiotikums wird die Zahl der Darmbakterien drastisch reduziert und so eine Nische für die Salmonellen im Darm geschaffen. (Miller und Bohnhoff 1963) Die Salmonellen vermehren sich in Coecum und Colon und verursachen eine schwere Entzündung dieser Gewebe. Sie breiten sich aber auch über das GALT in zentrale Organe wie Milz und Leber aus. Damit können in diesem Modell gleichzeitig eine Entzündung im Darm (Colitis) und eine systemische Entzündung (Typhus) untersucht werden (Hapfelmeier und Hardt 2005, Barthel *et al.* 2003).

Um auch in nicht-phagozytierende Zellen zu gelangen, benötigen Salmonellen Typ III Sekretionssysteme (TTSS). Diese agieren als „molekulare Spritze“ und vermitteln den direkten Transport von bakteriellen Virulenzfaktoren in die Wirtszelle. Wichtig für die

Pathogenität sind vor allem das TTSS-1, welches vom *Salmonella pathogenicity island-1* (SPI-1) codiert wird, und das TTSS-2, welches von SPI-2 codiert wird. TTSS-1 wird von extrazellulär vorliegenden Bakterien exprimiert. Die Effektorproteine, die über das TTSS-1 in die Zielzellen gelangen, lösen die Invasion in Fibroblasten und Epithelzellen aus. Zudem reorganisieren sie die Struktur der Wirtszelle so, dass sich eine Nische für die intrazellulären Salmonellen bildet. Das TTSS-2 wird nur von Bakterien produziert, die sich intrazellulär befinden. Über diesen Transporter werden Effektorproteine sezerniert, die den endozytotischen Transport manipulieren (Galán und Wolf-Watz 2006, Patel und Galan 2005).

Durch die 3-Enolpyruvylshikimat-5-phosphat-Synthetase, die von dem Gen *aroA* codiert wird, sind Salmonellen in der Lage, autark von der Wirtszelle aromatische Amine zu produzieren. Sie sind damit unabhängig vom Wirt und können im Bedarfsfall schnell die „molekulare Spritze“ und weitere Pathogenitätsfaktoren, sowie alle anderen benötigten Proteine, produzieren (Hoiseth und Stocker 1981, Hormaeche *et al.* 1991).

Eine wichtige Rolle in der Eliminierung der Salmonellen spielt das Nramp-1 (*natural resistance-associated macrophage proteins*), welches in Makrophagen vorkommt. Es reguliert die intrazelluläre Replikation von Bakterien in Makrophagen. Nramp-1 ist ein Metalltransporter, der besonders für den Eisenmetabolismus eine wichtige Rolle spielt. Mit Hilfe dieses Transporters werden Eisenionen aus Vakuolen, welche die Salmonellen enthalten, heraus transportiert. Der daraus folgende lokale Eisenmangel begrenzt die Replikation der Salmonellen. C57BL/6-Mäuse haben eine Mutation im Nramp-1 Gen, sodass das Nramp-1 inaktiv ist. Dadurch ist dieser Mausstamm sehr viel suszeptibler gegenüber Salmonellen als andere Mausstämme, die die aktive Form des Nramp-1 tragen (Mittrücker und Kaufmann 2000, Valdez *et al.* 2009). Alle in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme wurden mittels PCR auf den Nramp-1 Genotyp hin überprüft und zeigten alle den Nramp1<sup>s</sup> Genotyp, also das inaktive Gen.

Die Salmonellen-Stämme aus den vorliegenden Experimenten sind zum einen der SL7207-OVA Stamm und zum anderen der SL7207-8.8 Stamm. SL7207 ist ein attenuierter Stamm, der eine Mutation im *aroA* Gen hat, sodass diese Bakterien keine aromatischen Amine mehr produzieren können und somit von der Versorgung mit Aromaten durch den Wirtstoffwechsel abhängig sind (Hoiseth und Stocker 1981). Dadurch sind ihre Replikationsfähigkeit und ihre Virulenz stark beeinträchtigt, die letale Dosis für C57BL/6 Mäuse liegt bei über 10<sup>6</sup> Bakterien bei intravenöser Gabe. Analog zu LmOVA produziert der SL7207-OVA Stamm einen Teil des Ovalbumins (OVA<sub>257-264</sub>). Das Gen dafür liegt zusammen mit einer Ampicillinresistenz auf einem Plasmid (Qimron *et al.* 2004). Der SL7207-8.8 Stamm verfügt über ein ähnliches Plasmid mit

einer Ampicillinresistenz sowie einem Gen, das für ein Peptidfragment des LLO (LLO<sub>91-99</sub>) codiert.

## 1.7 Ziel der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Funktion von P2X7 für die Regulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen näher untersucht werden. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass im Mausmodell CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Darmmukosa im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen anderer Gewebe eine sehr hohe P2X7-Expression aufweisen. Weiterhin entwickelten P2X7ko-Mäuse eine verstärkte T-Zellantwort gegenüber einer Infektion mit *Listeria monocytogenes*. Diese beiden Ergebnisse führen zur Hypothese, dass P2X7 eine inhibitorische Funktion bei T-Zellantworten besitzt und dass diese Funktion vor allem im Darmmilieu eine Rolle spielt. Diese Hypothese wird auch durch die Funktion von P2X7 als Rezeptor für extrazelluläre Nukleotide unterstützt. Durch P2X7 sind T-Zellen in der Lage, extrazelluläres ATP und NAD<sup>+</sup>, das im Rahmen von Entzündungen und Gewebeschäden freigesetzt werden, wahrzunehmen. In peripheren Geweben, insbesondere in der Darmmukosa, könnte P2X7 T-Zellantworten begrenzen und dadurch eine exzessive Gewebeschädigung verhindern.

Um die Funktion von P2X7 näher zu untersuchen, sollte die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort in verschiedenen Mausmodellen charakterisiert werden. Hierfür standen das bereits im Labor etablierte *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell sowie ein weniger gut charakterisiertes *Salmonella typhimurium*-Infektionsmodell zur Verfügung. In beiden Infektionsmodellen sollten T-Zell-Transferexperimente durchgeführt werden. Durch den Transfer von wildtyp und P2X7ko CD8<sup>+</sup> T-Zellen in wildtyp Mäuse bzw. von wildtyp CD8<sup>+</sup> T-Zellen in wildtyp und P2X7ko-Mäuse sollte einerseits die Funktion von P2X7 auf den CD8<sup>+</sup> T-Zellen selbst und andererseits die Funktion von P2X7 auf Zellen im Umfeld der Immunantwort geklärt werden. Da das verwendete *S. typhimurium*-Infektionsmodell zu einer schweren Entzündungsreaktion in der Darmmukosa führt, sollte in diesem Modell vor allem die T-Zellantwort im Darm untersucht werden.

P2X7 ist einerseits auf bestimmten T-Zellsubpopulationen, wie NKT-Zellen oder regulatorischen T-Zellen, verstärkt ausgeprägt. Andererseits zeigt P2X7 eine vom Gewebe abhängige Expression. Vor allem T-Zellen der Darmmukosa tragen sehr viel P2X7 auf ihrer Oberfläche, und es gibt Hinweise, dass eine Aktivierung von konventionellen T-Zellen in der Darmmukosa zur Induktion von P2X7 führt. Th17-Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zellen sind T-Zellsubpopulationen, die in allen Geweben, insbesondere aber in der Darmmukosa vorkommen. Für beide Populationen gab es zu Beginn der Arbeit keine Informationen zur Expression von P2X7. Im zweiten Teil des

Projekts sollte daher die P2X7-Expression auf Zellen dieser beiden T-Zellpopulationen bestimmt werden. Hier stellte sich auch die Frage, ob in beiden Populationen die P2X7-Expression ein gewebespezifisches oder eine zelltypspezifisches Expressionsprofil besitzt.

## 2. Material

### 2.1 Feinchemikalien und sonstige Reagenzien

Ampicillin	Roche (Grenzach-Whylen)
$\beta$ -2-Mercaptoethanol (1000x für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Bacto Agar	BD Bioscience (Heidelberg)
Brefeldin A (BFA)	Sigma (Steinheim)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva (Heidelberg)
Carbenicillin	Roche (Grenzach-Whylen)
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen (Karlsruhe)
Fötale Kälberserum (FCS)	PAA (Paschingen)
Gentamycin (1000x für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Glutamin (100x für Zellkultur)	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Ionomycin	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Kollagenase D	Roche (Grenzach-Whylen)
Kollagenase VIII	Sigma (Steinheim)
Luria Agar Base (LB-Agar)	BD (Heidelberg)
Luria Broth Base (LB-Medium)	Invitrogen (Karlsruhe)
Normales Rattenserum (NRS)	Jackson Immuno Research (Baltimore)
Percoll Seperating Solution	Biochrom AG (Berlin)
Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	Sigma (Steinheim)
RPMI (Roswell Park Memorial Institut)1640	GIBCO invitrogen (Karlsruhe)
Saponin	Sigma (Steinheim)
Streptomycin	Sigma (Steinheim)
Trypan blau	Biochrom AG (Berlin)
Tryptic Soy Broth (TSB)	BD (Heidelberg)

Alle Standardchemikalien stammen von Serva (Heidelberg), Sigma (Steinheim), Merck (Darmstadt) oder Carl Roth (Karlsruhe).

## 2.2 Puffer und Medien

PBS (phosphate buffered saline) Sigma

Saponinpuffer in PBS

- 0,1% BSA
- 0,3% Saponin

Erythrozytenlysepuffer

- 8,25 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$
- 1,0 g  $\text{KHCO}_3$
- 0,037 g EDTA
- auf 1000 ml Aqua destillata

RPMI komplett

- RPMI 1640 (500 ml)
- 5% FCS
- 2 mM Glutamin
- 50  $\mu\text{g/ml}$  Gentamycin
- 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ 2-Mercaptoethanol

TSB-Medium

- 30 g TSB
- auf 1000 ml Aqua destillata
- für Agar-Platten wird 2% Bacto Agar hinzugefügt

LB-Medium

- 25 g LB Medium
- auf 1000 ml Aqua destillata

LB-Agar (+ Carbenicillin)

- 12,2 g LB Agar
- auf 400 ml Aqua destillata
- z.T. 100  $\mu\text{g/ml}$  Carbenicillin hinzugefügt

## 2.3 Antikörper

Tab. 1: Verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Firma
CD16/CD23	2.4G2	-	Institut für Immunologie (UKE)
CD8 $\alpha$	53.6.7	PerCP	BD Pharmingen (Heidelberg)
V $\alpha$ 2	B20.1	FITC	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD90.1	Ox7	FITC	Serotec (Düsseldorf)
CD90.2	53-2.1	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD4	YTS191	Pacific blue	Institut für Immunologie (UKE)
P2X7	K1G	Alexa647	Institut für Immunologie (UKE)
P2X7	RH23A44	Alexa647	Institut für Immunologie (UKE)
P2X7	RH24A43	Alexa647	Institut für Immunologie (UKE)
CD4	YTS191	APC	Institut für Immunologie (UKE)
CD8 $\beta$	H35-17.2	Pacific blue	Institut für Immunologie (UKE)
IL-17A	TC11-18H10.1	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
IFN $\gamma$	XMG 1.2	FITC	eBioscience (San Diego)
$\gamma\delta$ TCR	GL-3	FITC	Institut für Immunologie (UKE)
CD8 $\alpha$	53-6.7	Pacific blue	BD Horizion (Heidelberg)
CD90.1	His51	PE	BD Pharmingen (Heidelberg)
CD90.2	53-2.1	Pacific blue	eBioscience (San Diego)

## 2.4 Bakterienstämme

*Listeria monocytogenes*

Stamm OVA (LmOVA)

bereitgestellt durch Dr. Shen (Philadelphia)

(Shen *et al.* 1995)

*Salmonella typhimurium*

Stamm SL7207 OVA (SL7207-OVA)

(Qimron *et al.* 2004)

*Salmonella typhimurium*

Stamm SL7207 8.8 (SL7207-8.8)

Institut für Immunologie (UKE)

Die Bakterienstämme SL7207-OVA und SL7207-8.8 enthalten beide ein Plasmid mit einem Mini-Gen, welches entweder für das Ovalbumin-Peptid OVA<sub>257-264</sub> (SL7207-OVA) oder für das Listeriolysin O-Peptid LLO<sub>91-99</sub> (SL7207-8.8) codiert. An den Anfang der beiden Peptidsequenzen wurde jeweils ein Startcodon gesetzt. Damit lautet die Peptidsequenz für das OVA<sub>257-264</sub> Peptid M-SIINFEKL und für das LLO<sub>91-99</sub> Peptid M-GYKDGNEYI. Die Konstruktion von SL7207-OVA ist in der Literatur beschrieben (Qimron *et al.* 2004), die Konstruktion des SL7207-8.8 lief vergleichbar dazu ab.

## 2.5 Mausstämme

C57Bl/6J	Jackson, Bar Harbour
B6.PI-Thy1a/CyJ	Jackson, Bar Harbour
OT1	(Hogquist <i>et al.</i> 1994) rückgekreuzt auf C57BL/6, bereitgestellt durch das MPI Infektionsbiologie (Berlin)
OT1 × B6.PL-Thy1a/CyJ	Institut für Immunologie (UKE)
P2X7ko	(Solle <i>et al.</i> 2001) >8 Rückkreuzungen auf C57BL/6 Institut für Immunologie (UKE)
P2X7ko × OT1	Institut für Immunologie (UKE)

Der P2X7 <sup>-/-</sup> Genotyp wurde mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) kontrolliert, die TZR-transgen-Kontrolle der OT1-Mäuse erfolgte mittels FACS-Analyse (Antikörper (Ak) gegen V $\alpha$ 2-TZR). Alle Mauslinien wurden mittels PCR auf den *Nramp1* Genotyp hin überprüft und zeigten alle den *Nramp1*<sup>S</sup> Genotyp (Vidric *et al.* 2006).

Die Mäuse wurden in der zentralen Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gezüchtet. Alle Tierversuche wurden nach den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

## 2.6 Geräte und Materialien

BD FACS Canto II	BD (Heidelberg)
------------------	-----------------

Bei den Geräten für Bakterienkultur und Lymphozytenaufreinigung handelt es sich um Standardlaborausstattung. Die Standardlabormaterialien (z.B. Plastikpipetten, Reaktionsröhrchen und Petrischalen) stammen von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), Greiner (Frickenhäusen), Nunc (Langenselbold), BD (Heidelberg) und Eppendorf (Hamburg).

## 2.7 Software

FACS Diva Software	BD (Heidelberg)
GraphPad Prim Version 4.0	GraphPad Software, Inc. (La Jolla)
CorelDRAW X3	Corel Corporation

### 3. Methoden

#### 3.1 Bakterienkultur und Infektion

Für die intravenöse Infektion lagen Bakterienstocks mit bekannter Konzentration bei  $-80^{\circ}\text{C}$  vor. Die Stocks wurden mit PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Für eine orale Infektion wurden 100 ml TSB (Tryptic Soy Broth) Medium mit 100  $\mu\text{l}$  LmOVA Stock-Aliquots angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttler inkubiert. Die *S. typhimurium* Stocks (50  $\mu\text{l}$ ) wurden in 66 ml LB (Luria Soy Base) Medium und 33 ml 1 M NaCl-Lösung (entspricht einer Endkonzentration von NaCl von 0,3 M) sowie Ampicillin (Endkonzentration 100  $\mu\text{g/ml}$ ) über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen zweimal mit PBS gewaschen und die Bakteriendichte photometrisch anhand der Absorption bei 600 nm bestimmt, wobei eine optische Dichte ( $\text{OD}_{600}$ ) von 1 einer Bakterienkonzentration von  $10^9$  Bakterien/ml entspricht. Die Bakteriensuspensionen wurden mit PBS auf die benötigte Konzentration eingestellt (Mittrücker *et al.* 2000b)

Die Mäuse wurden entweder durch intragastrische Gavage mit einer Schlundsonde oder intravenös in die laterale Schwanzvene infiziert. Die Bakterien wurden jeweils in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  verabreicht. Zur Kontrolle der Infektion wurde das Inokulum in einer seriellen Verdünnungsreihe auf TSB bzw. LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und nach 24 h (Listerien) oder 48 h (Salmonellen) ausgezählt (Mittrücker *et al.* 2000b, Kursar *et al.* 2002, Kursar *et al.* 2004)

#### 3.2 OT1-Transfer

In den Experimenten wurde mit einem T-Zell-Transfermodell gearbeitet. Dies hatte den Vorteil, dass antigenspezifische Zellpopulationen analysiert werden konnten. Außerdem konnten verschiedene Zelllinien in dieselbe Maus transferiert und durch eine unterschiedliche Expression von Oberflächenmarkern später wieder differenziert werden. Dieses erlaubte einen direkten Vergleich der Akkumulation verschiedener Zellenlinien bei identischen Bedingungen.

In dieser Arbeit wurde mit dem OT1-Transfermodell gearbeitet. OT1-Mäuse tragen auf ihren  $\text{CD8}^+$  T-Zellen einen transgenen Rezeptor, mit dem sie das OVA<sub>257-264</sub>-Peptid im Kontext mit MHC-I-Molekülen erkennen. Dieses OVA-Peptid wiederum wird von verschiedenen rekombinanten Bakterienstämmen sezerniert, z.B. von den in dieser Arbeit verwendeten Listerien- und Salmonellenstämmen (LmOVA und SL7207-OVA).

Die Kombination der Bakterien mit den OT1-Zellen ermöglicht die Analyse einer antigenspezifischen T-Zellpopulation.

Um beim Transfer der OT1-Zellen in C57BL/6-Mäuse keine Abstoßungsreaktion zu erzeugen, wurden alle verwendeten Mausstämme auf den C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt. Die OT1-Mäuse sowie auch die P2X7ko-Mäuse haben also den genetischem C57BL/6 Hintergrund.

Um die Zellen nach dem Transfer wiederfinden zu können, wurde der Oberflächenmarker CD90.1/CD90.2 (= Thy1.1/Thy1.2) betrachtet. CD90 ist ein GPI-verankertes Oberflächenprotein, das in der Maus auf allen T-Zellen vorkommt. Die normale C57BL/6-Maus ist homozygot für das CD90.2 Allel. Somit tragen auch die P2X7ko-Mäuse nur diesen Oberflächenmarker. Der B6.PL-Thy1a/CyJ-Stamm ist ein für CD90.1 congener Mausstamm zu C57BL/6. Das bedeutet, diese Mäuse sind bis auf das CD90.1 Protein identisch zu C57BL/6 Tieren.

In einigen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde ein kompetitiver Transfer vorgenommen, d.h. Zellen aus zwei verschiedenen Mauslinien wurden zeitgleich in eine B6.PL-Thy1a/CyJ Maus transferiert. Hierfür wurden zwei verschiedene OT1-Mauslinien benötigt. Zum einen wurde eine wildtyp OT1-Maus verwendet (Hogquist *et al.* 1994), die auf dem (C57BL/6 × B6.PL-Thy1a/CyJ)F1 Hintergrund vorhanden war und deren T-Zellen CD90.1<sup>+</sup> und CD90.2<sup>+</sup> sind. Diese OT1-Mauslinie wurde auch in den übrigen Versuchen verwendet. Um den Einfluss von P2X7 zu untersuchen, wurden für die zweite Mauslinie beim kompetitiven Transfer transgene OT1-Mäuse mit P2X7ko-Mäusen verpaart, um OT1-Zellen zu erhalten, die kein P2X7 mehr auf den Zellen tragen. T-Zellen der OT1×P2X7ko-Mäuse tragen nur CD90.2 auf der Oberfläche. Durch diese unterschiedliche Expression des Oberflächenmarkers CD90 konnten die Zellen in den Experimenten wieder identifiziert und einzeln analysiert werden (Mittrücker *et al.* 2000a).

Für den Transfer wurden die OT1-Mäuse getötet, die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und die Lymphozyten aufgereinigt (siehe 3.4). Anschließend erfolgte eine Markierung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (siehe 3.3), um die Proliferation der Zellen überprüfen zu können. Diese Zellen wurden dann in die laterale Schwanzvene der Rezipienten injiziert.

### 3.3 CFSE-Färbung

Die Proliferation einer Zellpopulation kann mit Hilfe von CFDA (5-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester) durchflusszytometrisch gemessen werden. CFDA ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die Zelle diffundiert und dort durch

intrazelluläre Esterasen in CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) umgewandelt wird. In dieser Form ist der Farbstoff nicht mehr membranpermeabel und verbleibt in der Zelle. Teilt sich diese, wird auch die Fluoreszenzintensität halbiert. Der Verlust der Fluoreszenzintensität ist daher ein sensitiver Parameter für die Zellteilung.

CFDA (10 mM Stocklösung) wurde 1:10 mit DMSO (Dimethylsulfoxid) verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 1 µl je 1 ml Zellsuspension verwendet (Endkonzentration 1 µM). Die Zellen wurden 3 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit 12,5 ml PBS + 0,2% BSA gewaschen.

### **3.4 Isolierung von Leukozyten aus Milz, Leber, Darm und Lymphknoten**

Für die durchflusszytometrische Untersuchung der Zellen wurden die Organe entnommen und daraus die Lymphozyten aufgereinigt. Sollten die gereinigten Zellen in eine andere Maus transferiert werden, erfolgten die Entnahme und die Aufreinigung unter sterilen Bedingungen.

Die Mäuse wurden mit einer Mischung aus 80% CO<sub>2</sub> und 20% O<sub>2</sub> narkotisiert und mit reinem CO<sub>2</sub> und anschließendem Genickbruch getötet. Die Haut wurde mit 70% Ethanol desinfiziert. Dann erfolgte der Hautschnitt. Über einen weiteren Schnitt durch das Peritoneum wurde der Bauchraum eröffnet, sodass die Bauchorgane entnommen werden konnten. Die Leber wurde vor der Entnahme durch Injektion von 5 ml PBS in die linke Herzkammer perfundiert. Vom Darm wurden nach der Entnahme das Fettgewebe, die Mesenterien und im Dünndarm die Peyerschen Plaques entfernt. Anschließend wurde der Darm aufgeschnitten und zweimal in PBS gespült. Die Organe wurden nach der Entnahme bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis aufbewahrt (Kursar *et al.* 2002, Kursar *et al.* 2004).

#### **3.4.1 Milzaufreinigung**

Zuerst wurde die Milz mechanisch zerkleinert, indem sie mit dem Stempel einer Spritze durch ein Metallsieb gedrückt wurde. Das Sieb wurde danach mit 10 ml PBS gespült und die so entstandene Zellsuspension bei 1100 rpm für 5 min abzentrifugiert. Alle weiteren Zentrifugationsschritte wurden mit diesen Einstellungen durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen. Um die Erythrozyten zu entfernen, wurde das Zellpellet in 3 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Hierbei wurden selektiv die Erythrozyten zerstört, die anderen Zellen blieben weitgehend unbeschädigt. Durch die Zugabe von 12,5 ml PBS mit 0,2% BSA (Rinderserumalbumin) wurde die Erythrozytenlyse gestoppt. Anschließend wurde die

Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porendurchmesser 70 µm) gegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Zellpellet wurde in 5 ml PBS gelöst und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt (Kursar *et al.* 2002, Kursar *et al.* 2004).

### **3.4.2 Leberaufreinigung**

Die Aufreinigung begann mit der Herstellung einer Einzelzellsuspension, wofür die Leber durch ein Metallsieb gedrückt wurde. Das Sieb wurde mit 20 ml PBS abgespült und die Zellsuspension wurde über ein 70µm Zellsieb gegeben. Die filtrierte Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Auftrennung der Lymphozyten von anderen Zellpopulationen erfolgte ein Dichtegradienten-Zentrifugation mit Percoll. Das Zellpellet wurde in 5 ml 40% Percoll-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde auf 3 ml 70% Percoll-Lösung geschichtet. Der Gradient wurde bei 1600 rpm 20 min lang ohne abbremesen zentrifugiert. Die oberste Schicht mit Hepatozyten wurde abgetragen, und die Zellen aus der Interphase des Gradienten wurden in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 45 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde mit 3 ml Erythrozytenlysepuffer für 3 min eine Erythrozytenlyse durchgeführt, die mit 12,5 ml PBS mit 0,2% BSA gestoppt wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in der benötigten Menge PBS gelöst (Kursar *et al.* 2002, Kursar *et al.* 2004).

### **3.4.3 Lymphknotenaufreinigung**

Die Lymphknoten wurden durch ein Sieb gedrückt, welches anschließend mit 10 ml PBS gespült wurde. Die Zellsuspension wurde über ein 70 µm Zellsieb gegeben und abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in der benötigten Menge PBS gelöst.

### **3.4.4 Darmaufreinigung IEL**

Zur Aufreinigung der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) wurde der gespülte Darm in RPMI komplett bei 37°C im Wasserbad für 30 min gerührt. Danach wurde der Darm auf ein Metallsieb gegeben. anschließend mit 10 ml PBS mehrfach geschüttelt und erneut über das Sieb gegeben. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Zellsuspension wurde über ein 70 µm Zellsieb gegeben und abzentrifugiert. Auch hier erfolgte die weitere Aufreinigung über einen Dichtegradienten mit Percoll. Das Zellpellet wurde in 5 ml 40% Percoll-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde auf 3 ml 70% Percoll-Lösung geschichtet und der Gradient wurde bei 1600 rpm für 20 min ohne abbremesen zentrifugiert. Die oberste Schicht, welche Epithelzellen enthält, wurde verworfen. Der

restliche Gradient wurde mit PBS gewaschen und zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Zellpellet in der benötigten Menge PBS resuspendiert (Kursar *et al.* 2002, Kursar *et al.* 2004).

#### **3.4.5 Darmaufreinigung LPL**

Zur Aufreinigung der Lymphozyten der Lamina propria (LPL) wurde der Darm nach der Aufreinigung der IEL zerkleinert und in 20 ml RPMI komplett mit 5 mg Kollagenase D, 5 mg Kollagenase VIII und DNase bei 37°C für 45 min im Wasserbad unter Rühren inkubiert. Nach den 45 min wurde der Darm über ein Sieb und die so entstandene Zellsuspension über ein Zellsieb in ein Reaktionsgefäß gegeben und mit 30 ml PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in der benötigten Menge PBS resuspendiert (Kursar *et al.* 2002, Kursar *et al.* 2004).

#### **3.5 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl einer Zellsuspension wurden 10 µl mit 90 µl Trypanblau versetzt. Die Zugabe des Vitalfarbstoffs Trypanblau dient der Identifikation von toten Zellen. 10 µl des Ansatzes wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden unter dem Mikroskop die Leukozyten in den beiden oberen Quadranten (jeweils 16 Kästchen) gezählt und ein Mittelwert gebildet. Um die Zellzahl pro Milliliter zu errechnen, dient folgende Formel:

Mittelwert beider Quadranten  $\times 10^4$  (Kammerfaktor)  $\times 10$  (Verdünnung) = Zellzahl/ml Zellsuspension

Anschließend wurde die gewünschte Konzentration eingestellt.

#### **3.6 Bakterientiterbestimmung**

Zur Bestimmung des Bakterientiters wurde ungefähr ein Drittel der Organe direkt nach der Entnahme in sterile Tüten mit 1 ml sterilem PBS gegeben und auf Eis aufbewahrt. Diese Organe wurden zerquetscht, sodass eine Suspension entstand. Davon wurden 100 µl auf eine Agarplatte steril ausplattiert. Wurden die Tiere mit Listerien infiziert, wurden TSB-Agarplatten benutzt. Bei einer Salmonelleninfektion wurden LB-Agarplatten verwendet zugesetzt wurde. Nach 24 Stunden (Listerien) oder 48 Stunden (Salmonellen) bei 37°C im Brutschrank wurden die Kolonien gezählt, die sich auf der Agarplatte gebildet hatten.

### **3.7 Stimulation der Zellen**

Die Stimulation der Zellen zur Zytokinproduktion erfolgte mittels Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und Ionomycin, wobei PMA bestimmte Isoformen der Proteinkinase C aktiviert und Ionomycin ein Kalziumionophor ist. Die Wirkung dieser Stimulation ist derer des TZR sehr ähnlich. Zur Stimulation wurden immer  $2 \times 10^6$  Lymphozyten aus der Milz, alle aufgereinigten Lymphozyten aus der Leber und dem Darm verwendet. Dabei wurden 100  $\mu$ l Zellsuspension mit 900  $\mu$ l RPMI komplett, 1  $\mu$ l Ionomycin-Stocklösung (Endkonzentration: 1  $\mu$ M) und 5  $\mu$ l PMA-Stocklösung (Endkonzentration: 50 ng/ml) versetzt. Die Zellen wurden bei 37°C insgesamt 4h inkubiert. Nach den ersten 30 min wurde 1  $\mu$ l BFA-Stocklösung (Brefeldin A, gelöst in Ethanol) + 50  $\mu$ l PBS hinzupipetiert (Endkonzentration 10  $\mu$ g/ml), um den intrazellulären Proteintransport und die Proteinsekretion zu unterbinden. Nach den restlichen 3½ h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und konnten dann für die FACS-Analyse gefärbt werden (Mittrücker *et al.* 2007, Heiss *et al.* 2008).

### **3.8 Antikörperfärbung**

#### **3.8.1 Extrazelluläre Antikörperfärbung**

Um spezifisch bestimmte Oberflächenmoleküle anzufärben, wurden fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte monoklonale Antikörper (Ak) verwendet. Für die Messung am FACS wurden ungefähr  $2 \times 10^6$  Zellen/100  $\mu$ l verwendet. Bei den Leber- und Darmzellen wurden alle aufgereinigten/stimulierten Zellen eingesetzt.

Um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden, wurden die Zellen zuerst mit 1  $\mu$ l Rattenserum, 0,5  $\mu$ l Fc-Reagenz (anti-CD16/CD32 Ak) und 18,5  $\mu$ l PBS 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Antikörperfärbung je nach Versuchsziel. Die Inkubationszeit betrug 20 min unter Lichtausschluss bei 4°C. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS. Die Zellen wurden in 100  $\mu$ l PBS resuspendiert und bis zur Analyse lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt.

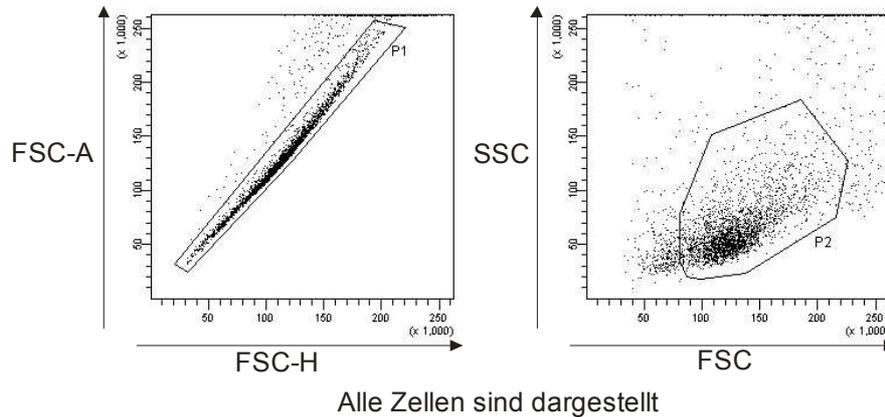
#### **3.8.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung**

Für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l PBS + 2% PFA (Paraformaldehyd) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS + 0,2% BSA gewaschen. Wie auch bei der extrazellulären Färbung wurden zuerst die unspezifische Bindungen mit einem Fc-Block (0,5  $\mu$ l Fc-Reagenz, 1  $\mu$ l Rattenserum + 18,5  $\mu$ l Saponinpuffer) gesättigt, wobei hier der Fc-Block mit Saponinpuffer angesetzt wurde. Saponin macht als mildes Detergenz die Zellmembran porös und sorgt dafür,

dass die intrazellulären Strukturen für die Antikörper zugänglich werden. Anschließend erfolgte die eigentliche Antikörperfärbung mit den entsprechenden Antikörpern des Versuchs, die auch in Saponin-Puffer verdünnt wurden. Die Inkubationszeit betrug hier 15 min unter Lichtausschluss. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und entweder im FACS analysiert oder mit 100 µl PBS + 1% PFA fixiert und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt (Mittrücker *et al.* 2007).

### 3.9 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS = fluorescence activated cell sorting) können Zellen in Bezug auf ihre Oberflächenmoleküle und auch die intrazelluläre Zytokinproduktion näher analysiert werden. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf Lichtemissionen seitens der Zelle, wenn sie den Laserstrahl passiert. Die Zellen in der Zellsuspension werden vom Durchflusszytometer durch eine Kapillare angesaugt und passieren einzeln einen Laserstrahl. Dieser Laserstrahl wird beim Auftreffen auf die Zelle gestreut, was von mehreren Lichtdetektoren registriert wird. Die Menge des gestreuten Lichts korreliert mit der Größe und der Granularität der Zellen. So kann die relative Zellgröße anhand des Vorwärtsstreulicht (forward scatter = FSC) bestimmt werden, die Granularität mit Hilfe des Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC). Auch kann mit Hilfe von FSC-H und FSC-A bestimmt werden, ob die Zellen, die den Laserstrahl passieren, wirklich einzelne Zellen sind, oder ob es Zelldoubletten sind, also zwei Zellen, die aneinander hängen. Dabei steht FSC-H für „height“, also für die Höhe des FSC-Signals und FSC-A für „area“, also für die Fläche des Signals. FSC-A und FSC-H sind bei einzelnen Zellen proportional zueinander und bilden für eine Zellpopulation eine Gerade, bei Zelldoubletten hingegen ist FSC-A größer als FSC-H, sodass die Doubletten nicht mehr auf der Geraden mit den einzelnen Zellen liegen. Mittels dieser Parameter können einzelne Lymphozyten im FACS markiert werden. Dies ist exemplarisch in Abb. 4 dargestellt.



**Abb. 4: Identifizierung der Lymphozyten mittels FACS-Analyse**

Mittels FSC-A/FSC-H Dot-Plots (links) können die einzelnen Zellen (P1) von Zeldubletten unterschieden werden. Im SSC/FSC Dot-Plot (rechts) sind die Lymphozyten markiert (P2). Sie lassen sich anhand ihrer Größe gut von toten Zellen, Zelltrümmern und anderen Zellen unterscheiden. Diese beiden markierten Populationen werden kombiniert, sodass in den weiteren Dot-Plots nur noch einzelne Lymphozyten angezeigt werden.

Gleichzeitig kann das Durchflusszytometer auch Fluoreszenzfarben messen. Dazu werden Antikörper gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül der Zelle oder gegen ein bestimmtes Zytokin verwendet, welche mit einem Fluorochrom gekoppelt sind. So können die Zellen anhand ihrer Expression von Oberflächenmolekülen oder Zytokinen sortiert werden. Die im FACS gesammelten Daten werden mit Hilfe eines Rechners in Dot-Plots dargestellt, in denen meist zwei Parameter gleichzeitig betrachtet werden. In diesen Plots können dann Subpopulationen mittels „Gates“ ausgewählt und näher untersucht werden. In der Regel wurde so lange gemessen, bis mindestens 250.000 Lymphozyten aufgezeichnet waren, bei den Proben aus dem Darm wurden alle Zellen erfasst. Die resultierenden Daten wurden mit der FACS Diva Software analysiert.

### 3.10 Statistik

Alle Graphen wurden mit dem Programm GraphPad Prism erstellt und mittels CorelDRAW modifiziert. Die Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe der Statistikprogramme von GraphPad Prism und Excel. In den Experimenten wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung bestimmt. Ein Ergebnis wurde als signifikant angesehen wenn der p-Wert im t-Test kleiner als 0,5 war.

## 4. Ergebnisse

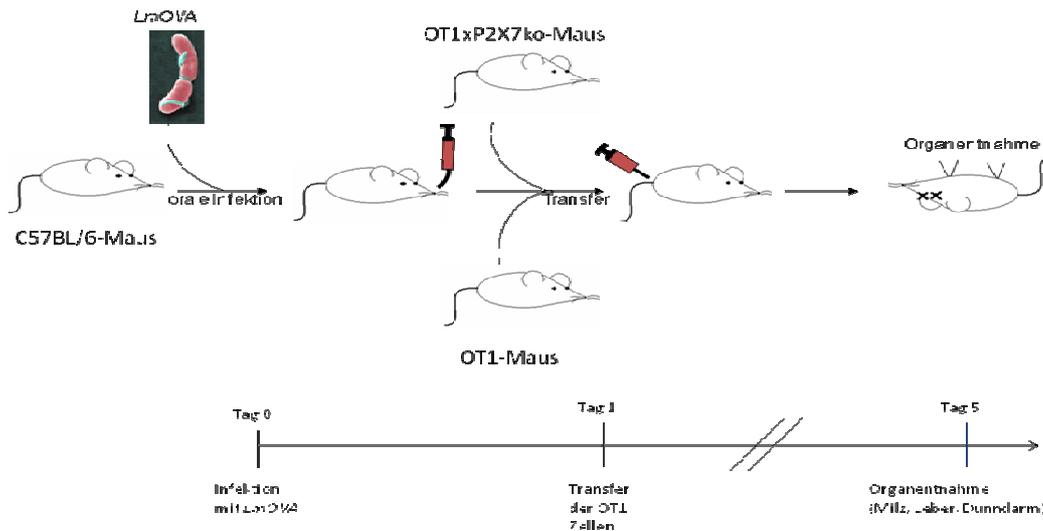
### 4.1 Akkumulation und Proliferation von wildtyp und P2X7ko OT1-T-Zellen in LmOVA infizierten C57BL/6-Mäusen

Der Purinrezeptor P2X7, ein ligandengesteuerter Ionenkanal, kommt in der Maus auf verschiedenen Zellpopulationen, wie z.B. T-Zellen, NKT-Zellen und Makrophagen, vor. Bei T-Zellen führt die Aktivierung des Rezeptors zu einem Calciuminflux in die Zelle, wodurch es unter anderem zur proteolytischen Abspaltung (Shedding) verschiedener Oberflächenmoleküle kommt (Scheuplein *et al.* 2009). Eine andauernde Stimulation des P2X7-Rezeptors führt zur Apoptose der T-Zelle. Aufgrund dessen wird für P2X7 eine inhibitorische Funktion bei T-Zellantworten postuliert. Diese Funktion könnte z.B. bei Infektionen und Entzündungen eine Rolle spielen, da hier durch den hervorgerufenen Gewebeschaden unter anderem ATP freigesetzt wird, welches den Purinrezeptor aktiviert (Haag *et al.* 2007, Seman *et al.* 2003).

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die T-Zellantwort in P2X7ko-Mäusen während einer Listerieninfektion stärker ausgeprägt ist als in wildtyp (wt) Mäusen. Daraus lässt sich folgern, dass Zellen ohne P2X7 möglicherweise einen Proliferations- oder Überlebensvorteil in entzündetem Gewebe haben (Heiss *et al.* 2008).

Um diese These weiter zu untersuchen, wurde ein OT1-Transfer während einer Infektion mit LmOVA in C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Die CD8<sup>+</sup> OT1-Zellen exprimieren einen transgenen T-Zellrezeptor, mit denen sie das OVA-Peptid erkennen können, welches von dem hier gebrauchten Listerienstamm produziert wird. Im verwendeten Transfermodell können die antigenspezifischen T-Zellen wieder gefunden und analysiert werden, da diese sich in Bezug auf das Oberflächenprotein CD90 von endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheiden.

Dieses Experiment wurde als kompetitiver Transfer durchgeführt. Dafür wurden zwei verschiedene OT1-Mausstämme benutzt. Zum einen die „normale“ OT1-Maus (OT1 wt), deren Zellen CD90.1<sup>+</sup> und CD90.2<sup>+</sup> sind. Um den Einfluss von P2X7 auf den transferierten T-Zellen zu untersuchen, wurden zum anderen auch OT1-Zellen verwendet, die kein P2X7 auf der Oberfläche tragen (OT1×P2X7ko). Diese Zellen sind nur CD90.2-positiv. Die C57BL/6-Maus, in die diese beiden Zellen zeitgleich transferiert wurden, ist nur CD90.1-positiv. Dieser Versuchsaufbau hat den großen Vorteil, dass sich die beiden verschiedenen OT1-Zelllinien in exakt der gleichen Umgebung befinden und somit die Akkumulation der beiden Zellpopulationen gut miteinander verglichen werden kann. In Abbildung 5 ist der Versuchsaufbau dargestellt.



**Abb. 5: Versuchsaufbau: Transfer von wt und P2X7ko OT1-T-Zellen in LmOVA infizierten C57BL/6-Mäusen**

Vier C57BL/6-Mäuse wurden oral mit  $3 \times 10^9$  LmOVA infiziert. Am nachfolgenden Tag erfolgte der Transfer mit OT1- und OT1xP2X7ko-Zellen. Dazu wurden jeweils eine OT1-Maus und eine OT1xP2X7ko-Maus getötet, die Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen und die Lymphozyten aufgereinigt, um anschließend  $6 \times 10^6$  dieser Zellen per Injektion in die Schwanzvenen der C57BL/6-Mäuse zu transferieren. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und analysiert. Als Kontrolle wurde der Transfer zeitgleich an zwei nicht infizierten Tieren vorgenommen. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Nachfolgend ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

An Tag 0 wurden vier C57BL/6-Mäuse mit  $3 \times 10^9$  LmOVA oral infiziert, am nächsten Tag erfolgte der Transfer der wt OT1- und OT1xP2X7ko-Zellen per Injektion in die laterale Schwanzvene der infizierten C57BL/6-Mäuse mit insgesamt ca.  $6 \times 10^6$  Zellen. Um sicherzugehen, dass bei dem Transfer dieselbe Anzahl OT1- wie OT1xP2X7ko-Zellen in eine Maus transferiert werden, wurden vor dem Transfer zwei FACS-Messungen durchgeführt. Die dazugehörigen Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet.

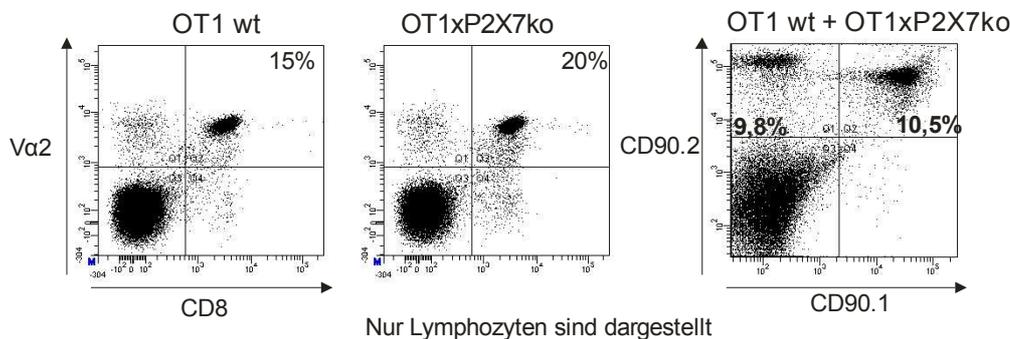
**Tab.2: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die für Bestimmung des OT1:OT1xP2X7ko-Quotienten verwendet wurden.

Färbung 1		Färbung 2	
Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP	CD90.1	FITC
V $\alpha$ 2	FITC	CD90.2	PE

Hierzu wurde nach der Aufreinigung die Zahl der isolierten Lymphozyten aus den Milzen bestimmt und die Zellzahl auf  $2 \times 10^6$  Zellen pro 100  $\mu$ l je Milz eingestellt. Danach wurden die beiden Zellpopulationen jeweils mit den Antikörpern aus Färbung 1 (Tab.2) gefärbt und im FACS analysiert. Zuerst wurden die Lymphozyten identifiziert (siehe 3.6 Durchflusszytometrie) und anschließend CD8 $\alpha$  gegen TZR-V $\alpha$ 2 aufgetragen. Da V $\alpha$ 2

eine Kette des transgenen OT1-T-Zellrezeptors ist, konnte festgestellt werden, wie viel Prozent der Lymphozyten den transgenen Rezeptor tragen.



**Abb. 6: Kontrolle des OT1:OT1xP2X7ko Quotienten**

Die Milzen der OT1- und der OT1xP2X7ko-Mäuse wurden entnommen, die Lymphozyten aufgereinigt und im FACS analysiert. Die ersten beiden Dot-Plots stellen die Prozentzahlen der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit transgenem Rezeptor an allen Lymphozyten dar. Im dritten Dot-Plot sind die Prozentzahlen der CD90.1<sup>+</sup>/2<sup>+</sup> Zellen (OT1 wt) und der CD90.1<sup>+</sup>/2<sup>+</sup> Zellen (OT1xP2X7ko) im Mix zu sehen.

15% der Lymphozyten der wt OT1-Maus (erster Dot-Plot) trugen den transgenen T-Zellrezeptor, wohingegen die Lymphozyten der OT1xP2X7ko-Maus (zweiter Dot-Plot) zu 20% den transgenen Rezeptor besaßen, was ungefähr der Anzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen entsprach. Aufgrund dieser Analyse wurden die Zellen im Verhältnis 4:3 gemischt und gleichzeitig die passende Konzentration eingestellt ( $3 \times 10^7$  Zellen/ml). Dieser Mix wurde auf CD90.1 und CD90.2 analysiert (Abb. 6 rechts), um den Quotienten der Zellpopulationen vor dem Transfer festzuhalten. Hierbei war zu sehen, dass beide OT1-Zellpopulationen ungefähr den gleichen Anteil an allen gemessenen Lymphozyten ausmachen (Quotient (ko/wt) ca. 1). Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Tiere ungefähr gleich viele OT1- wie OT1xP2X7ko-Zellen transferiert bekommen haben.

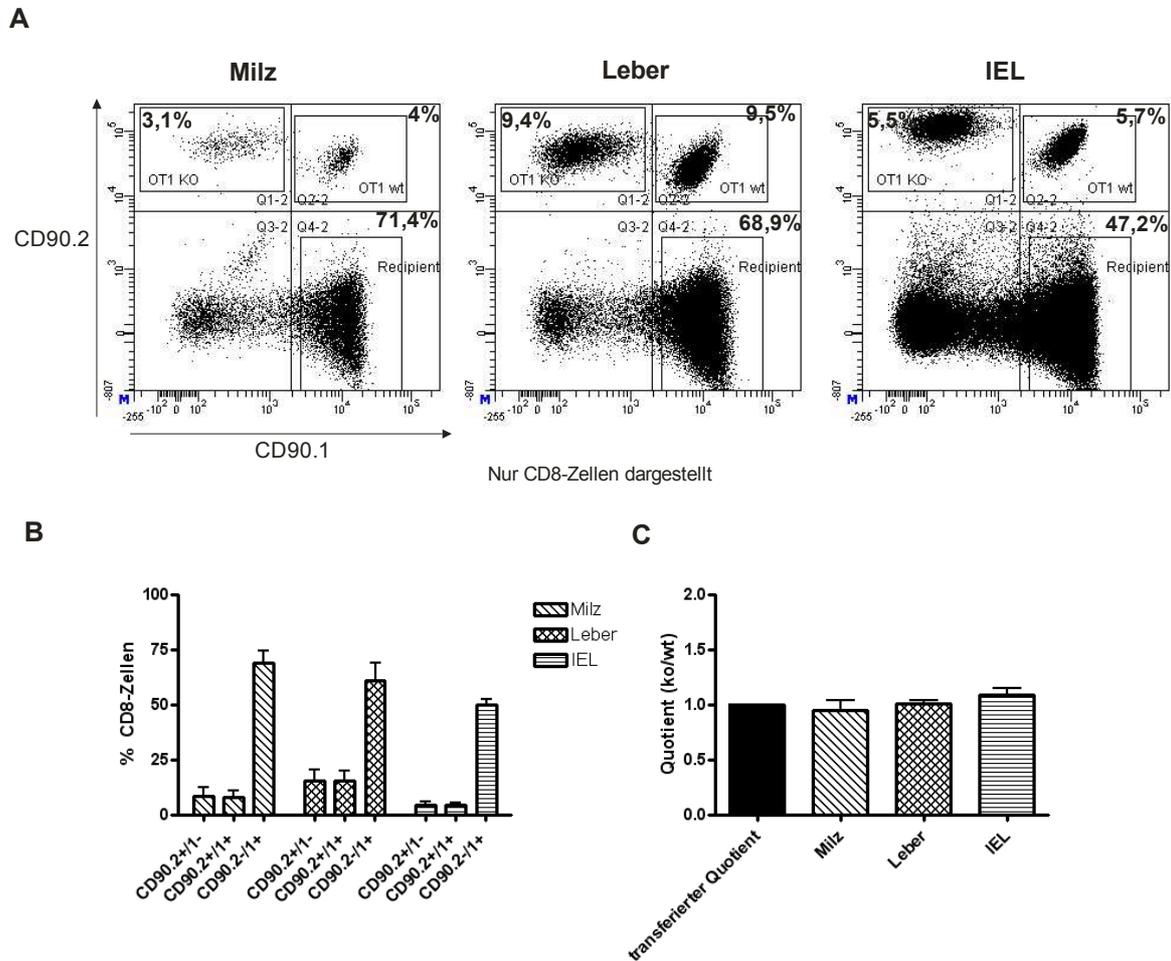
Vier Tage nach dem Transfer wurden die Mäuse getötet und die Lymphozyten aus Milz, Leber und dem Epithel des Dünndarms (intraepitheliale Lymphozyten = IEL) aufgereinigt. Anschließend erfolgte die extrazelluläre Färbung mit den Antikörpern aus Tab. 3. Als Kontrolle wurde der Transfer zeitgleich an nicht infizierten C57BL/6-Mäusen durchgeführt.

**Tab. 3: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die für den kompetitiven Transfer bei oraler LmOVA-Infektion verwendet wurden.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP
CD4	Pacific blue
CD90.1	FITC
CD90.2	PE
P2X7	Alexa 647

In Abbildung 7 ist das Ergebnis der FACS-Analyse zu sehen. Es wurden zuerst die Lymphozyten identifiziert, dann CD4 gegen CD8 aufgetragen, um die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu identifizieren und weiter analysieren zu können. In den nachfolgenden Dot-Plots sind nur noch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt.



**Abb. 7: Akkumulation der OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in LmOVA-infizierten C57BL/6-Mäusen**

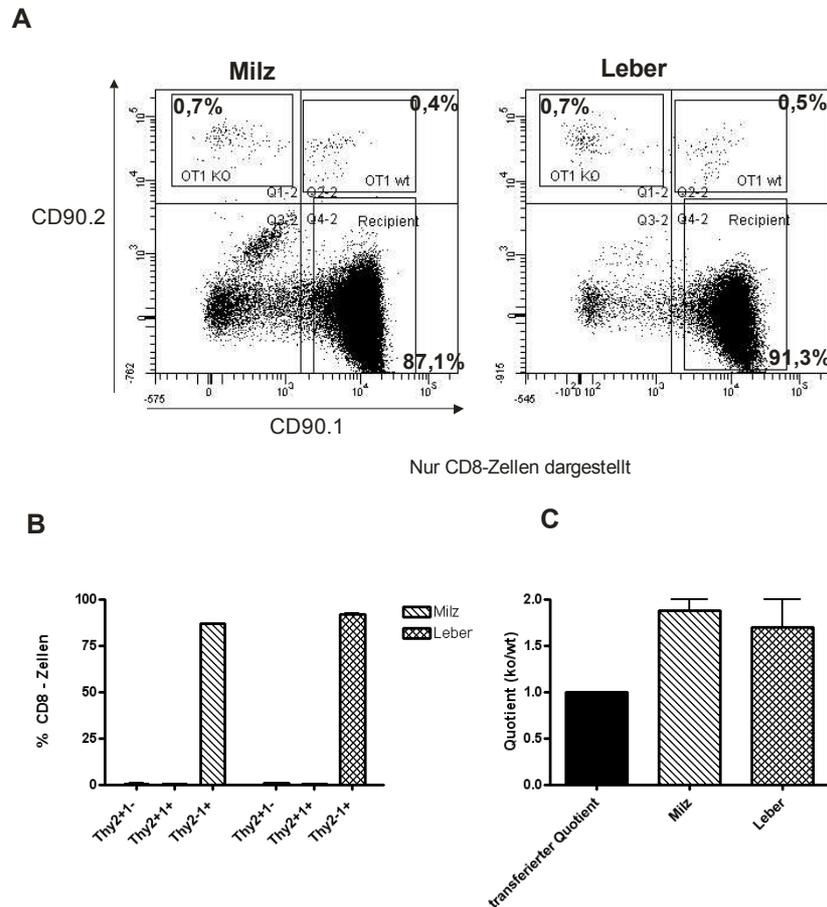
Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer Maus. Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere dar. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Hier ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

- A) Akkumulation von OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in Milz, Leber und intestinalem Epithel einer mit LmOVA infizierten C57BL/6-Maus
- B) Balkendiagramm des Anteils der CD90.1<sup>+</sup>, CD90.2<sup>+</sup> und CD90.1<sup>+</sup>/CD90.2<sup>+</sup> Zellen von allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber und intestinalem Epithel des Dünndarms
- C) Balkendiagramm des Quotienten der OT1×P2X7ko-Zellen und OT1-Zellen (ko/wt) in Milz, Leber und intestinalem Epithel des Dünndarms

In Abb. 7A ist zu erkennen, dass in allen analysierten Organen beide OT1-Zellpopulationen ungefähr gleich stark akkumulierten. In der Milz machten sie jeweils ca. 4% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus, in der Leber 10% und im Darm ca. 6%. Die Mittelwerte dieser Prozentangaben von allen vier Tieren sind in Abb. 7B zu sehen. Im Mittel waren 10% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz, 20% in der Leber und 5% im intestinalen Epithel OT1- bzw. OT1×P2X7ko-Zellen. Der Quotient in Abb. 7C wurde folgendermaßen

gebildet: Anzahl der OT1×P2X7ko-Zellen zur Anzahl der wt OT1-Zellen. Dieser Quotient lag in allen Organen nahe bei 1.

Das gleiche Transferexperiment wurde als Kontrolle mit nicht infizierten C57BL/6-Mäusen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 8 dargestellt.



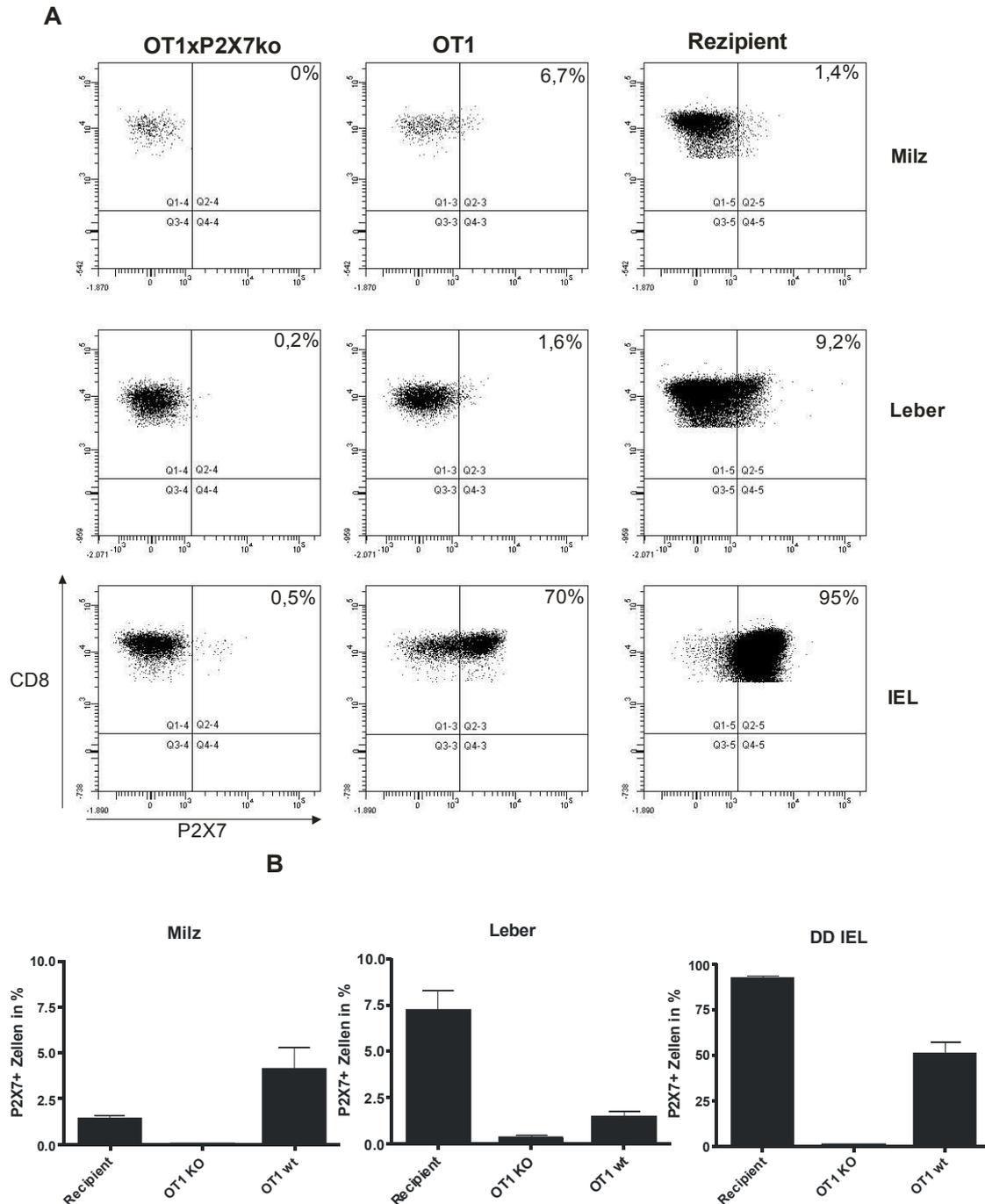
**Abb. 8: Nachweis der OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in nicht infizierten C57BL/6-Mäusen**

Dieses Experiment wurde mit zwei Mäusen durchgeführt. Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer Maus. Die Balkendiagramme stellen die Mittelwerte und Standardabweichungen beider Tiere dar. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Hier ist ein repräsentatives Ergebnis gezeigt.

- A) Nachweis von OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in Milz und Leber einer nicht infizierten C57BL/6-Maus
- B) Balkendiagramm des Anteils der CD90.1<sup>+</sup>, CD90.2<sup>+</sup> und CD90.1<sup>+</sup>/CD90.2<sup>+</sup> Zellen von allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Leber
- C) Balkendiagramm des Quotienten der OT1×P2X7ko-Zellen und OT1-Zellen (ko/wt) in Milz und Leber

In den nicht infizierten C57BL/6-Mäusen fand sich eine viel geringere Zahl der transferierten Zellen im Vergleich zu den infizierten Tieren wieder. Hier machten die transferierten Zellen durchschnittlich nur 0,5% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Leber aus. In Abb. 8C ist der Quotient (ko/wt) dargestellt, der bei ungefähr 1,7 lag. Im Darm konnten nur sehr vereinzelt OT1-Zellen nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Gleichzeitig zur Akkumulation der Zellen wurde auch die P2X7-Expression per FACS-Analyse auf den unterschiedlichen Zellpopulationen in Milz, Leber und Epithel des Dünndarms untersucht.



**Abb. 9: Expression von P2X7 auf den transferierten und endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von LmOVA infizierten C57BL/6-Mäusen**

Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Zellen einer Maus. Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert sowie die Standardabweichungen aus allen Versuchen dar.

- A) Expression von P2X7 auf den verschiedenen Zellpopulationen in Milz, Leber und Dünndarmepithel
- B) Balkendiagramm der Prozentzahlen der P2X7 positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen der entsprechenden Subpopulationen (endogene Zellen, OT1×P2X7ko, OT1)

Die endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Rezipient) in Milz und Leber trugen nur wenig P2X7 auf der Oberfläche. In der Milz waren nur ca. 1% der Zellen P2X7-positiv, in der Leber ca. 7%. Auch von den hier wiedergefundenen wt OT1-Zellen trugen nur wenige P2X7 auf der Oberfläche, in der Milz waren es etwa 4% und in der Leber 1,5%. Im Dünndarmepithel zeigte sich ein anderes Bild. Hier waren über 90% der endogenen Zellen und 50% der wt OT1-Zellen P2X7-positiv. Wie zu erwarten, zeigte sich in allen Organen, dass die OT1×P2X7ko-Zellen kein P2X7 auf der Oberfläche trugen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in Milz, Leber und im Epithel des Dünndarms bei einer mit LmOVA infizierten Maus akkumulierten. Interessanterweise konnte in diesem Experiment eine Akkumulation der OT1-Zellen auch im Darm nachgewiesen werden. Ohne Infektion konnten in Milz und Leber nur eine geringe Anzahl an OT1-Zellen wieder gefunden werden. Unter diesen Bedingungen fand keine Migration der OT1-Zellen in den Dünndarm statt.

Die wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen akkumulierten in den jeweiligen Organen gleich stark. Keine der beiden Zellpopulationen schien einen Proliferations- oder Überlebensvorteil zu haben.

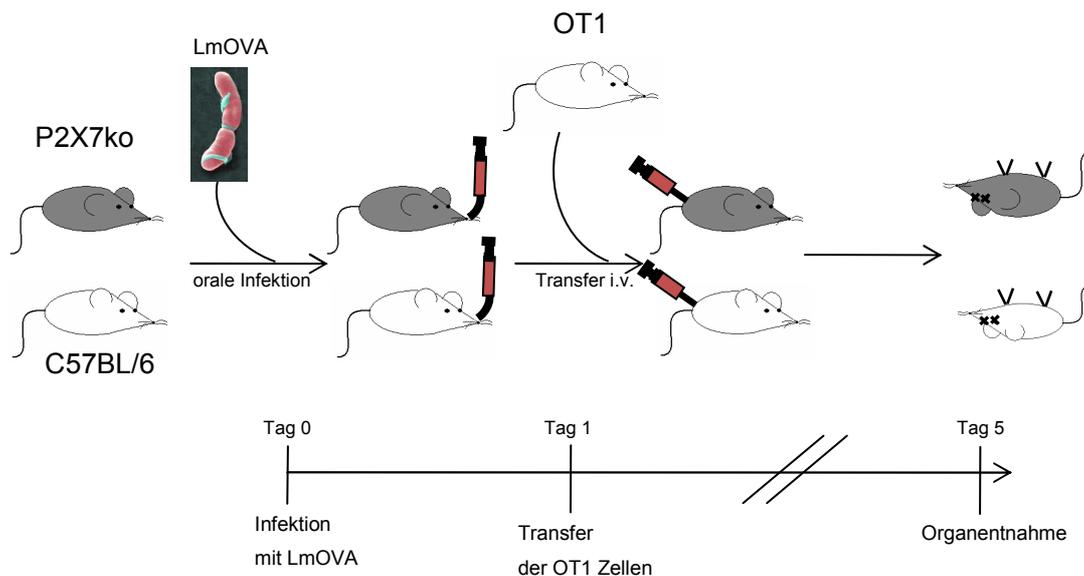
Die Untersuchung der P2X7-Expression der verschiedenen Zellpopulationen zeigte, dass nur wenige endogene CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Leber P2X7 auf der Oberfläche trugen, wohingegen nahezu alle CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Darmepithel P2X7-positiv waren.

Auch bei den transferierten Zellen zeigte sich ein ähnliches Bild. Die transferierten wt OT1-Zellen, die in Milz und Leber akkumuliert waren, zeigten eine geringe Expression von P2X7. Die Zellen jedoch, die in den Darm eingewandert waren, zeigten schon nach vier Tagen Infektionszeit eine hohe P2X7-Expression.

## 4.2 Akkumulation und Proliferation von OT1-T-Zellen in oral mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass wildtyp OT1-Zellen und OT1×P2X7ko-Zellen ungefähr gleichstark in einer mit LmOVA infizierten Maus akkumulieren.

Da nicht nur CD8<sup>+</sup> T-Zellen P2X7 auf der Oberfläche tragen, sondern z.B. auch Makrophagen, sollte im nachfolgenden Experiment untersucht werden, ob die P2X7-Expression auf Zellen des immunologischen Umfelds, in dem sich die Infektion und die Immunantwort abspielt, einen Einfluss auf die Aktivierung und Proliferation der Zellen, welche die Bakterien bekämpfen, hat. Auch in diesem Experiment wurde auf den OT1-Transfer und die Infektion mit LmOVA zurückgegriffen. Hier wurden wt OT1-Zellen in C57BL/6- und P2X7ko-Mäuse transferiert, um die Akkumulation dieser Zellen in den verschiedenen Mauslinien bei einer Infektion mit LmOVA zu untersuchen. Die T-Zellen des Rezipienten trugen CD90.2 auf der Oberfläche. Die transferierten Zellen aus der OT1 Maus waren dahingegen CD90.1<sup>+</sup>. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 10 dargestellt.



**Abb. 10: Versuchsaufbau: Transfer von OT1-T-Zellen in oral mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Jeweils drei C57BL/6- und drei P2X7ko-Mäuse wurden mit etwa  $5 \times 10^9$  LmOVA infiziert (die Bestimmung des Inokulums ergab für die einzelnen Experimente Werte zwischen  $3 \times 10^9$  und  $8 \times 10^9$ ). Am nächsten Tag erfolgte der Transfer von CFSE-markierten OT1-Zellen. Dazu wurde eine OT1-Maus getötet, die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und aufgereinigt, um anschließend ca.  $1,5 \times 10^6$  Zellen per Injektion in die Schwanzvene zu transferieren (Schwankungen von  $0,75 \times 10^6$  bis  $3 \times 10^6$  Zellen zwischen den einzelnen Experimenten). Nach 4 Tagen wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und analysiert. Dieses Experiment wurde sechsmal unabhängig voneinander durchgeführt.

An Tag 0 wurden die C57BL/6- und die P2X7ko-Mäuse oral mit LmOVA infiziert. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer von CFSE-markierten OT1-Zellen in die laterale Schwanzvene. Um sicherzustellen, dass die OT1-Zellen auch den transgenen

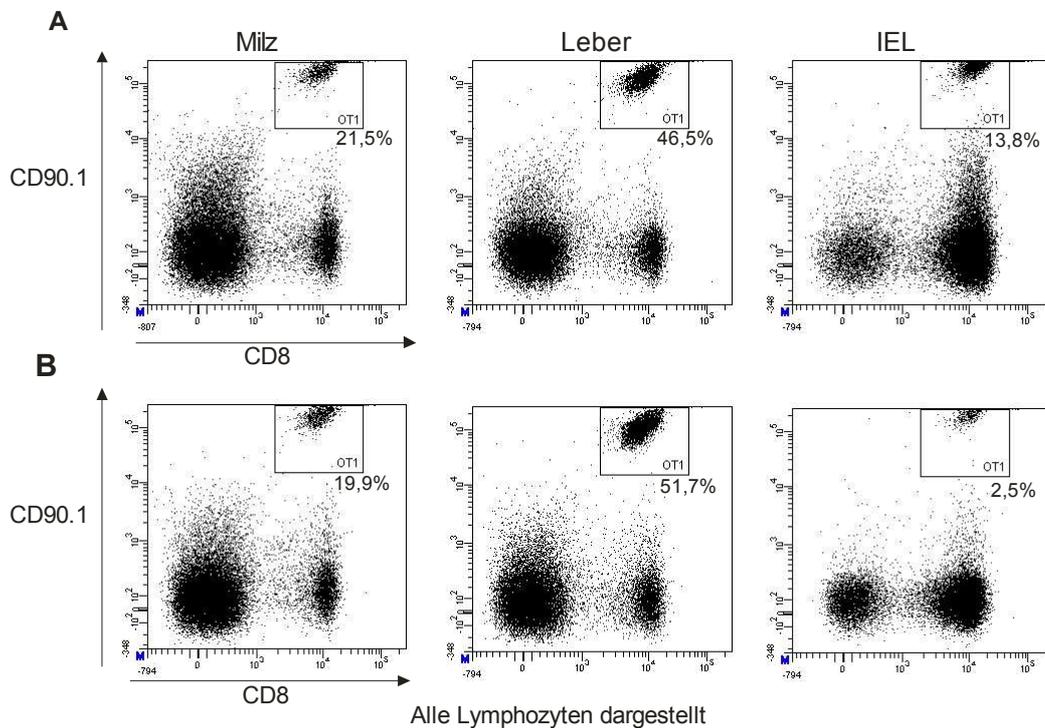
Rezeptor für das Ovalbumin tragen, wurden die Zellen vor dem Transfer im FACS analysiert. Hierbei wurde, wie im ersten Experiment, die Expression von CD8 und TZR- $V\alpha 2$  kontrolliert. Vier Tage später wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und die Lymphozyten aufgereinigt. Die Antikörper für die FACS-Analyse sind in Tab. 4 aufgelistet.

**Tab. 4: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die für den Nachweis von OT1-Zellen verwendet wurden.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP
CD4	Pacific blue
CD90.1	PE
P2X7	Alexa 647

In Abbildung 11 ist exemplarisch das Ergebnis einer FACS-Analyse zu sehen. Zuerst wurden die Lymphozyten identifiziert. Danach erfolgte die Bestimmung des Anteils der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber und Epithel des Dünndarms.

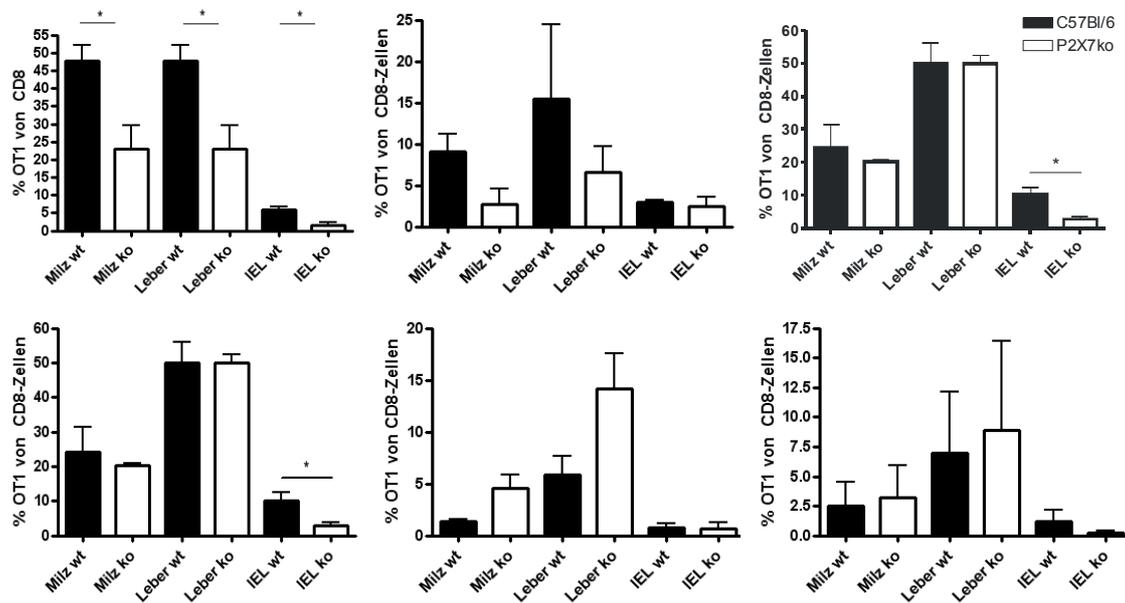


**Abb. 11: Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und Epithel des Dünndarms in LmOVA-infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die Abbildungen zeigen die Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und intestinale Epithel einer mit LmOVA infizierten C57BL/6-Maus (A) oder einer P2X7ko-Maus (B). Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Daten jeweils einer Maus. Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an. Dieses Experiment wurde sechsmal unabhängig voneinander durchgeführt.

Dieser Versuch wurde sechsmal unabhängig voneinander durchgeführt, da die Ergebnisse der einzelnen Versuche deutlich voneinander abwichen. In Abbildung 12

sind die Ergebnisse der Versuche in Form von Balkendiagrammen zu sehen, wobei ein Balkendiagramm einem Versuch entspricht.



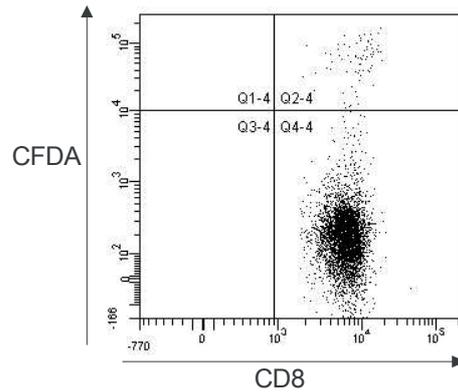
**Abb. 12: Anzahl der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber und Dünndarmepithel in mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Dieser Versuch wurde sechsmal mit jeweils drei C57BL/6- und drei P2X7ko-Mäusen durchgeführt. Jedes Balkendiagramm zeigt ein Versuchsergebnis. Die Diagramme zeigen die Prozentzahl der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber und Dünndarmepithel (IEL) entweder der C57BL/6 (wt; schwarz) oder der P2X7ko (ko; weiß) Mäuse. (\*: p<0,05)

Im Dünndarmepithel zeigte sich in drei Experimenten eine signifikant verringerte Akkumulation der OT1-Zellen in den P2X7ko-Rezipienten. In zwei Experimenten war ein Trend in die gleiche Richtung zu sehen und in einem Experiment war kein Unterschied nachweisbar. In den anderen Organen, also in Milz und Leber, ergab sich kein einheitliches Bild. In einzelnen Experimenten war eine stärkere, eine schwächere oder auch eine vergleichbare Akkumulation der OT1-Zellen in den beiden Mauslinien messbar.

In allen Versuchen war die absolute Zahl der isolierten Lymphozyten in den Organen in beiden Mauslinien immer ähnlich. Auch der prozentuale Anteil von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in beiden Mauslinien gleich und beide Mauslinien zeigten eine ähnliche Bakterienlast in Milz und Leber (Daten nicht gezeigt).

Durch die Markierung der transferierten Zellen mit CFSE konnte auch bei einer geringen Akkumulation der Zellen sichergestellt werden, dass die OT1-Zellen proliferiert waren (Abb. 13).

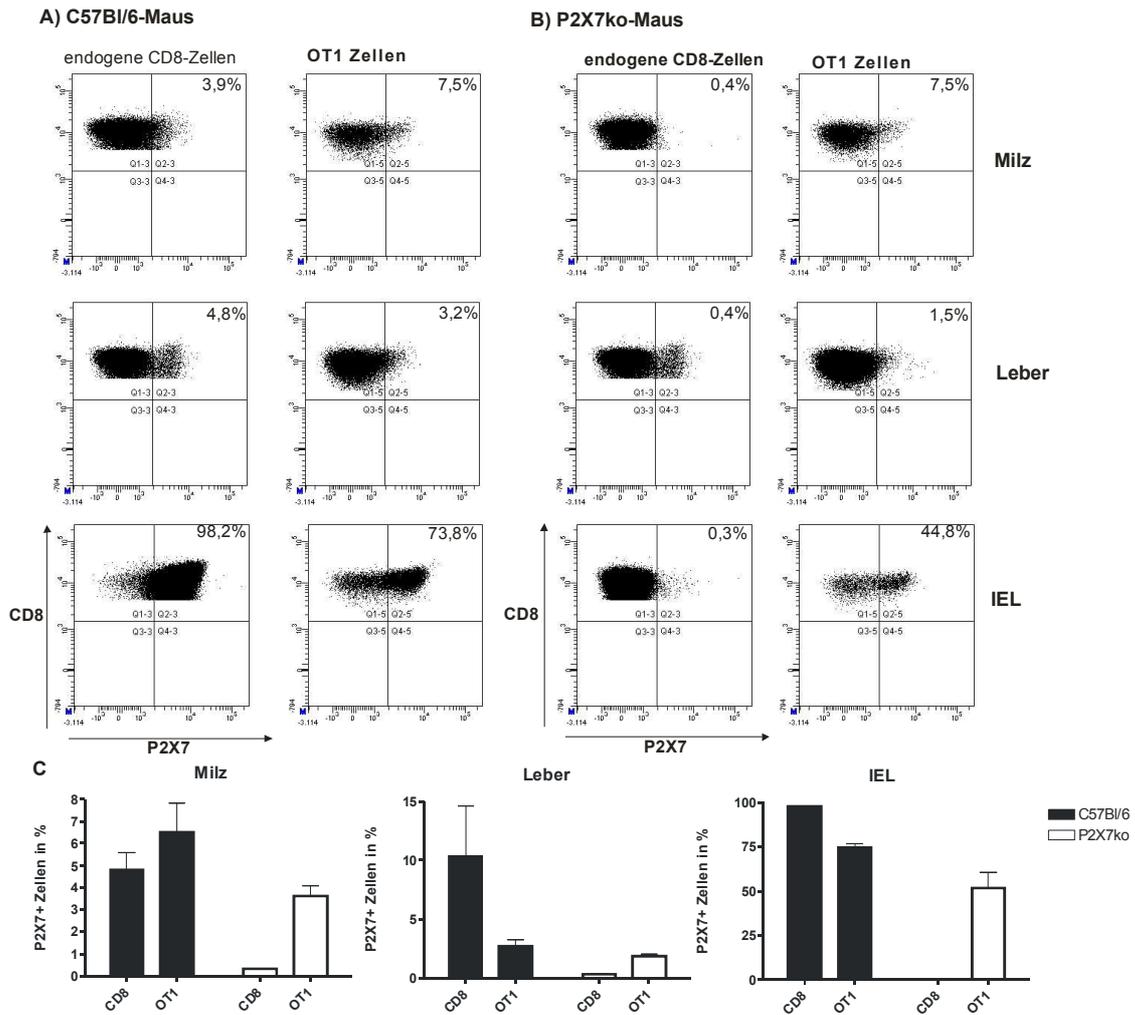


**Abb. 13: Proliferation der OT1-Zellen**

Dieser Dot-Plot zeigt exemplarisch die Proliferation der OT1-Zellen in einer Milz einer C57BL/6-Maus. Hier ist zu sehen, dass die OT1-Zellen größtenteils nur noch wenig bis gar kein CFSE in der Zelle tragen, d.h. sie haben sich mindestens fünf- bis sechsmal geteilt. Ein ähnliches Bild ergab sich für alle untersuchten Mäuse und Organe.

Hier zeigte sich, dass die OT1-Zellen in allen untersuchten Organen das CFSE fast vollständig verloren hatten. Die transferierten Zellen hatten also mindestens fünf bis sechs Teilungen durchgemacht (die Bestimmung höherer Teilungsraten ist mit diesem Testsystem nicht möglich). Da sich in allen Organen ein ähnliches Bild ergab, ist in Abbildung 13 nur ein exemplarisches Ergebnis für eine wt Milz dargestellt.

Auch in diesem Experiment wurde wie im vorherigen die Expression von P2X7 auf den endogenen und den transferierten Zellen untersucht. Nachfolgend ist die P2X7-Expression auf den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und den transferierten OT1-Zellen in den unterschiedlichen Organen und den unterschiedlichen Mauslinien zu sehen.



**Abb. 14: Expression von P2X7 auf den transferierten und endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in LmOVA-infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Zellen jeweils einer Maus. Die Balkendiagramme zeigen die Ergebnisse aller Mäuse des Experimentes. Hier wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichungen berechnet.

- A) Expression von P2X7 auf den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und OT1-Zellen in Milz, Leber und intestinalem Epithel von LmOVA-infizierten C57BL/6-Mäusen
- B) Expression von P2X7 auf den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und OT1-Zellen in Milz, Leber und intestinalem Epithel von LmOVA-infizierten P2X7ko-Mäusen
- C) Balkendiagramm der Prozentzahlen der P2X7 positiven Zellen der entsprechenden Subpopulationen

Auch in diesem Versuch wurde die unterschiedliche Expression von P2X7 in den verschiedenen Organen deutlich. Nur wenige endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der C57BL/6-Maus in Milz und Leber exprimierten P2X7 auf der Oberfläche. In der Milz waren es ungefähr 5% und in der Leber 10%. Im Gegensatz dazu trugen im Darm fast alle endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen P2X7 auf der Oberfläche. In den P2X7ko-Mäusen war wie erwartet nur eine sehr geringe Anzahl von endogenen Zellen P2X7-positiv.

Bei den transferierten OT1-Zellen war zu erkennen, dass der Anteil der P2X7-positiven OT1-Zellen in der Milz dem entsprechendem Anteil der endogenen Zellen glich, während in der Leber und im Dünndarmepithel die P2X7-Expression der transferierten Zellen geringer war als die der endogenen. Dieses war in beiden Mauslinien zu

beobachten, wobei die P2X7-Expression der OT1-Zellen im P2X7ko-Hintergrund etwas geringer zu sein schien als im wt-Hintergrund. Allerdings war dies kein signifikanter Unterschied.

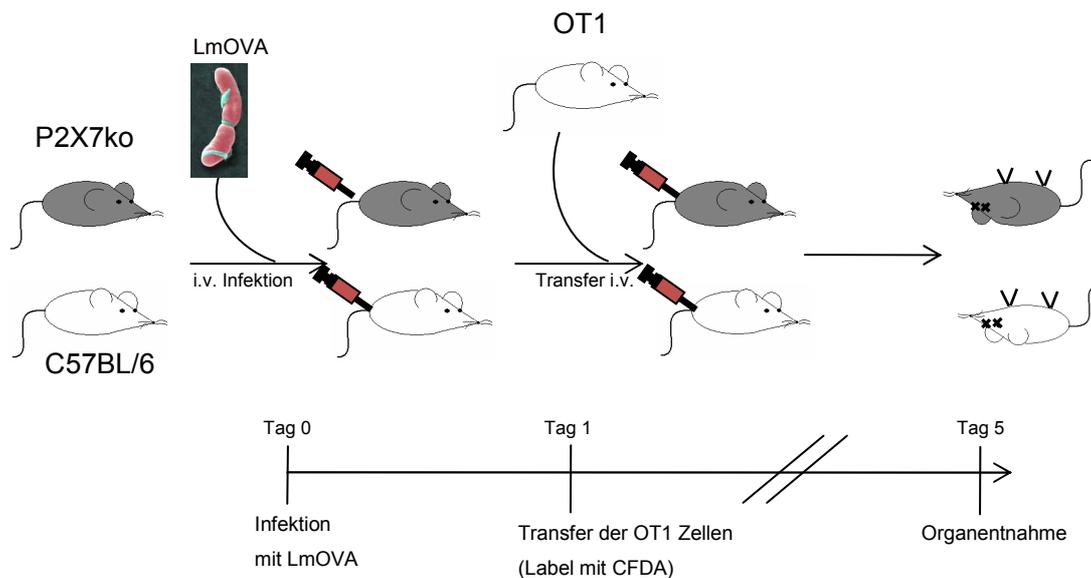
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in beiden Mauslinien eine Proliferation und Akkumulation der OT1-Zellen stattfand. In der Milz und in der Leber schien es keinen Unterschied in der Akkumulation der OT1-Zellen zwischen C57BL/6 und P2X7ko-Mäusen zu geben. Im Darm hingegen war ein Trend zu erkennen. Im Dünndarm der P2X7ko-Mäuse waren weniger OT1-Zellen zu finden als im Darmepithel der wt-Maus. Allerdings ließ sich der Unterschied in der Akkumulation der OT1-Zellen im Dünndarm der C57BL/6-Mäuse und P2X7ko-Mäuse nicht mit zufriedenstellender Sicherheit belegen.

Wie auch im vorherigen Experiment zeigte sich die höchste P2X7-Expression der endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Dünndarmepithel, in Milz und Leber war die Expression geringer. Die P2X7-Expression der transferierten Zellen glich auch hier der der endogenen Zellen. In Milz und Leber waren nur wenige OT1-Zellen P2X7-positiv. Im Dünndarm hingegen fanden sich viele P2X7-positive OT1-Zellen wieder, auch wenn die Expressionsstärke hinter der der endogenen Zellen zurückblieb. Der P2X7-Genotyp des Rezipienten hatte keinen Einfluss auf die P2X7-Expression der transferierten OT1-Zellen. In beiden Mauslinien zeigten die transferierten Zellen eine ähnliche, vom Organ abhängige, P2X7-Expression.

### 4.3 Akkumulation und Proliferation von OT1-T-Zellen in intravenös mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen

Im vorherigen Experiment konnte kein zufriedenstellendes Ergebnis zu der Fragestellung gefunden werden, ob es eine unterschiedliche CD8-Zellakkumulation bei einer Infektion im P2X7<sup>+/+</sup> oder P2X7<sup>-/-</sup> Hintergrund gibt. Das könnte zum einen an der Qualität der transferierten T-Zellen liegen, die durch die Aufreinigung nicht immer vollständig reproduziert werden konnte. Ein weiteres Problem stellt die Infektionsdosis dar. Von den oral applizierten Bakterien schafft es normalerweise nur ein Bruchteil das Darmepithel zu überwinden. Selbst innerhalb einer Tiergruppe während eines Experimentes treten hierbei große Schwankungen auf. Daher kommt es auch zu individuellen Unterschieden in der Schwere der systemischen Infektion und folglich auch in der Stärke der Immunantwort. Um dieses prinzipielle Problem zu umgehen, wurden in der folgenden Serie von Experimenten die Listerien direkt systemisch, d.h. durch intravenöse Gabe verabreicht. Dies erlaubte eine bessere Kontrolle der systemischen Infektionsdosis.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 15 dargestellt.



**Abb. 15: Versuchsaufbau: Transfer von wt OT1-Zellen in wt- und P2X7ko-Mäuse bei intravenöser LmOVA-Infektion**

Jeweils drei C57BL/6- und drei P2X7ko-Mäuse wurden mit  $10^5$  LmOVA intravenös infiziert, am nächsten Tag erfolgte der Transfer mit CFSE-markierten OT1-Zellen. Dazu wurde eine OT1-Maus getötet, die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und aufgereinigt, um anschließend  $3 \times 10^6$  Zellen per Injektion in die Schwanzvene zu transferieren. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und analysiert. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Drei P2X7ko-Mäuse und drei C57BL/6-Mäuse wurden an Tag 0 mit  $10^5$  LmOVA mittels Injektion in die laterale Schwanzvene infiziert. Ein Tag später wurden  $3 \times 10^6$  OT1-Zellen in diese Mäuse transferiert, nach vier weiteren Tagen erfolgte die Organentnahme, wobei Milz, Leber, die mesenterialen Lymphknoten und der

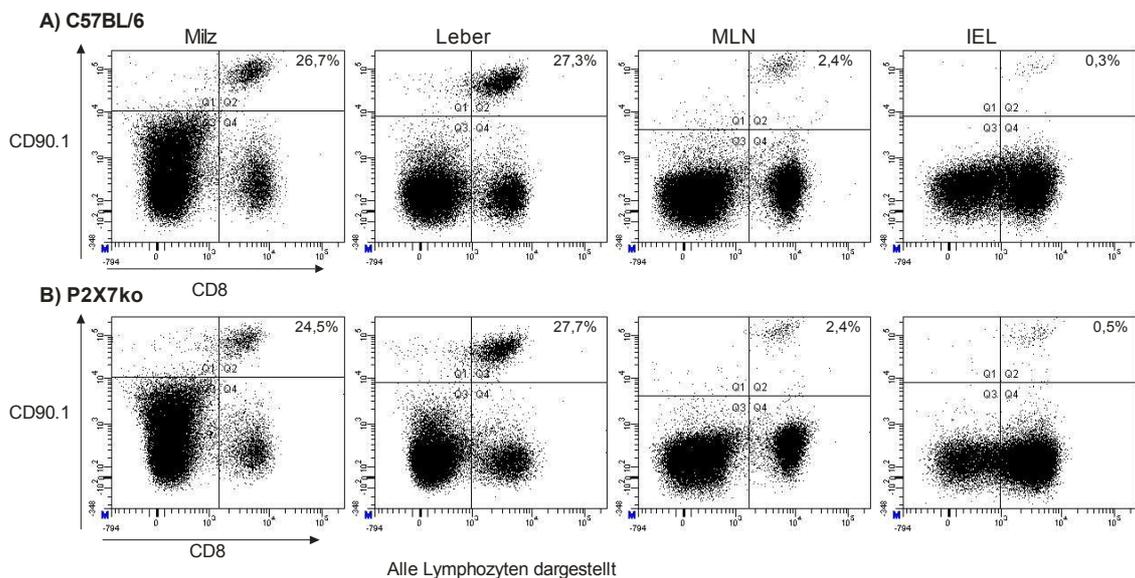
Dünndarm entnommen wurde. Die Lymphozyten wurden aufgereinigt, mit den Antikörpern aus Tab. 5 gefärbt und mittels FACS analysiert.

**Tab. 5: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die für den Nachweis der OT1-Zellen verwendet wurden.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP
CD4	Pacific blue
CD90.1	PE
P2X7	Alexa 647

Zuerst wurden die Lymphozyten mittels FSC/SSC ermittelt. In Abbildung 16 sind alle Lymphozyten dargestellt und die Akkumulation der OT1-Zellen in den analysierten Organen ist zu sehen.

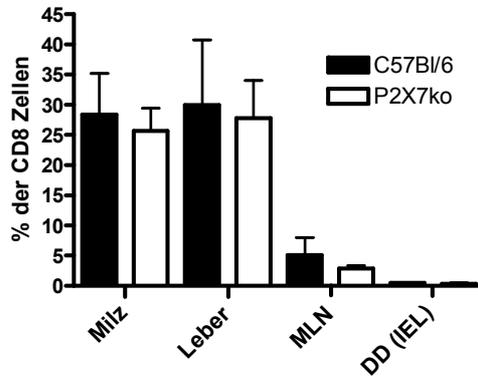


**Abb. 16: Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber, MLN und im Epithel des Dünndarms in einer C57BL/6-Maus und in einer P2X7ko-Maus bei i.v. LmOVA-Infektion**

Die Abbildungen zeigen die Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber, MLN und intestinalem Epithel einer mit LmOVA infizierten C57BL/6-Maus (A) oder einer P2X7ko-Maus (B). Die Zahlen geben den prozentualen Anteil der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an. Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Daten jeweils einer Maus.

In Milz und Leber fand eine starke Anreicherung der transferierten Zellen statt, ungefähr 20-30% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren in diesen Organen OT1-Zellen. In den mesenterialen Lymphknoten waren hingegen nur ungefähr 3% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen OT1-Zellen. Im Gegensatz zur oralen Bakteriengabe führte die intravenöse Infektion zu keiner Anreicherung von OT1-Zellen im Dünndarmepithel, nur 0,4% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Dünndarmepithel waren OT1-Zellen. Mit Hilfe der CFSE-Färbung der OT1-Zellen vor dem Transfer konnte festgestellt werden, dass die wiedergefundenen Zellen alle proliferiert waren (Daten nicht gezeigt).

Um einen Unterschied in der Akkumulation der transferierten Zellen in den beiden Mauslinien zu erkennen, wurde für alle Versuchstiere ein Balkendiagramm erstellt, das den Anteil der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigt (Abb. 17).

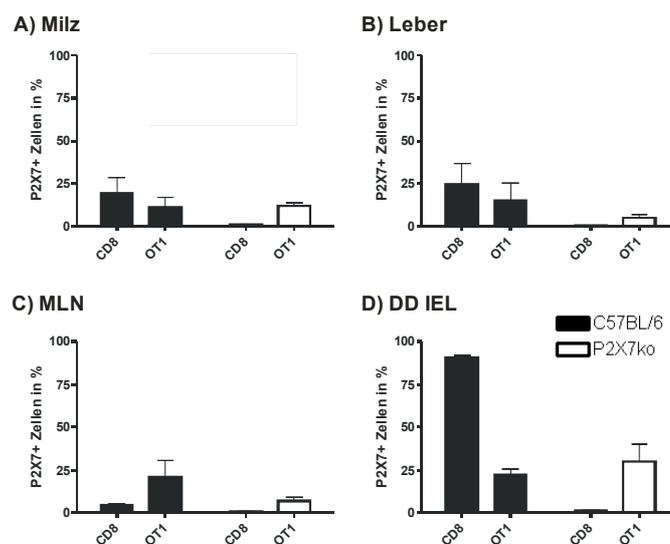


**Abb. 17: Anteil der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Das Diagramm zeigt den Mittelwert sowie die Standardabweichung des Anteils der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber, MLN und Dünndarmepithel (IEL) entweder der C57BL/6- (schwarz) oder der P2X7ko-Mäuse (weiß).

Es konnte kein Unterschied in der Akkumulation der OT1-Zellen in den untersuchten Organen zwischen den beiden Mauslinien gefunden werden.

Auch nach der intravenösen Infektion wurden die OT1-Zellen und die endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf ihre P2X7-Expression hin untersucht. In Abbildung 18 ist die P2X7-Expression auf den endogenen CD8<sup>+</sup> sowie die der transferierten OT1-Zellen zu sehen.



**Abb. 18: Expression von P2X7 auf den transferierten und endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen von LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert sowie die Standardabweichung der Expression von P2X7 auf den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und den OT1-Zellen in der Milz (A), Leber (B), MLN (C) und im Dünndarmepithel (D) von C57BL/6- (schwarz) und P2X7ko-Mäusen (weiß) dar.

In Milz und Leber waren ca. 20% aller endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen positiv für P2X7, in den mesenterialen Lymphknoten waren es nur 7%, wohingegen fast 95% der endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Dünndarmepithel P2X7-positiv waren. Die endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen der P2X7ko-Mäuse zeigten wie erwartet keine P2X7-Expression. Die Anzahl der P2X7-positiven OT1-Zellen war in der Milz etwas geringer als die der endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Allerdings schien hier der Hintergrund keinen Einfluss auf die P2X7-Expression zu nehmen, da in beiden Mauslinien ungefähr gleich viele P2X7-positive OT1-Zellen gefunden werden konnten. Auch in der Leber fanden sich im Vergleich zu den endogenen Zellen weniger P2X7-positive OT1-Zellen. In den mesenterialen Lymphknoten fanden sich mehr P2X7-positive OT1-Zellen als endogene Zellen. Auch ist hier, wie in der Leber, ein geringer Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien zu beobachten. Von den wenigen Zellen, die in das Epithel des Dünndarms einwanderten, waren im Vergleich zu den endogenen Zellen in beiden Mauslinien lediglich ca. 25% der Zellen P2X7-positiv.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass auch bei einer intravenösen Infektion die OT1-Zellen in beiden Mauslinien ungefähr gleich stark proliferierten und in den untersuchten Geweben akkumulierten. Im Gegensatz zur oralen Infektion fanden sich bei dieser Infektionsroute nur wenige OT1-Zellen im Dünndarmepithel.

Die P2X7-Expression der OT1-Zellen schien unabhängig vom Hintergrund zu sein, in dem die Zellen proliferieren. Es konnte kein signifikanter Unterschied in der P2X7-Expression der OT1-Zellen zwischen den beiden Mauslinien gezeigt werden.

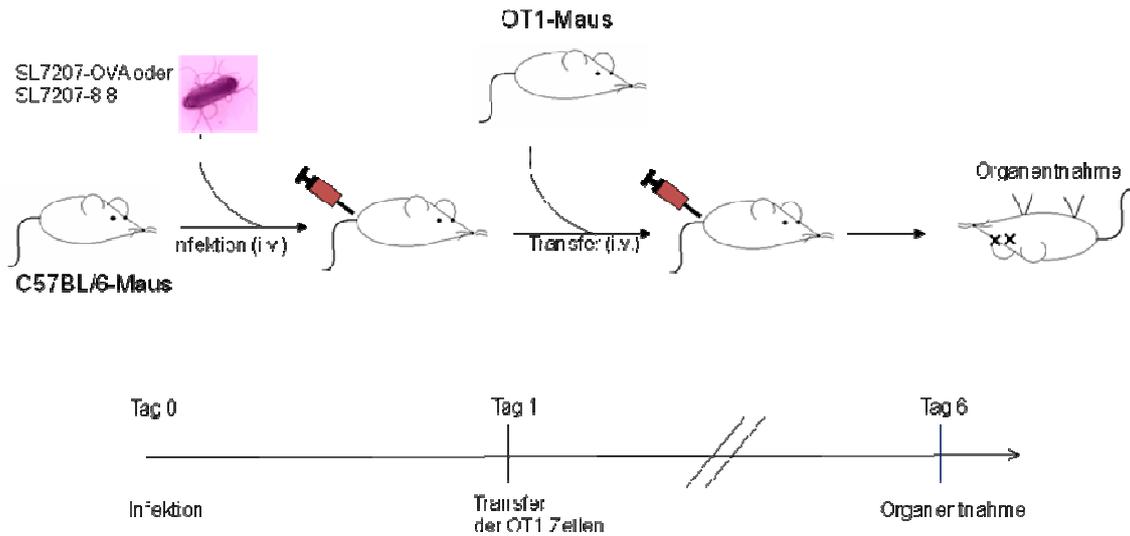
#### **4.4 Akkumulation und Proliferation von OT1-Zellen in SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen**

Um generelle Aussagen zur Funktion von P2X7 für CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu treffen, wurden vergleichbare Experimente in einem zweiten Infektionsmodell durchgeführt. In diesem Infektionsmodell wurden C57BL/6-Mäuse mit dem *Salmonella typhimurium* Stamm SL7207-OVA infiziert. SL7207-OVA ist ein attenuierter *aroA*<sup>-</sup> Salmonellenstamm, der das Plasmid-codierte Ovalbuminpeptid SIINFEKL (OVA<sub>257-264</sub>) sezerniert. Die Infektion wurde wie in den vorherigen Versuchen mit einem OT1-T-Zelltransfer kombiniert, sodass die antigenspezifischen Zellen, die auf die Salmonelleninfektion reagieren, wiedergefunden und analysiert werden konnten.

Das Salmonellen-Infektionsmodell wurde ausgewählt, da Salmonellen im Unterschied zu Listerien eine schwere Dickdarmentzündung (Colitis) hervorrufen können. Normalerweise löst *S. typhimurium* in der Maus eine systemische Infektion aus, die ein ähnliches Krankheitsbild wie der humane Typhus zeigt. Um eine Infektion im Darm hervorzurufen, müssen die Mäuse mit dem Antibiotikum Streptomycin vorbehandelt werden. Dadurch wird die Zahl der Darmbakterien drastisch reduziert und eine Nische für die oral verabreichten Salmonellen geschaffen. Diese Salmonellen vermehren sich im Coecum und Colon, sie breiten sich aber auch über das GALT in zentrale Organe, wie Milz und Leber aus. Damit können in diesem Modell gleichzeitig eine Colitis und eine systemische Entzündung (Typhus) untersucht werden (Hapfelmeier und Hardt 2005, Barthel *et al.* 2003).

Da insbesondere die T-Zellen im Darm den P2X7-Rezeptor auf der Oberfläche tragen, wurde die Aufmerksamkeit vor allem auf die schwere Darminfektion gerichtet.

Da dieses Infektionsmodell im Gegensatz zum Listerien-Infektionsmodell noch nicht etabliert war, wurde ein Vorversuch durchgeführt. Hierbei wurde getestet, ob OT1-Zellen (CD90.2<sup>+</sup>) überhaupt in mit SL707-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen (congen für CD90.1) proliferieren. In Abbildung 19 ist der Versuchsaufbau gezeigt.



**Abb. 19: Versuchsaufbau: Transfer von OT1-Zellen in SL7207-OVA und SL7207-8.8 infizierten C57BL/6-Mäusen**

Zwei C57BL/6-Mäuse ( $CD90.1^+$ ) wurden i.v. mit  $10^6$  SL7207-OVA infiziert, als Kontrollgruppe dienten zwei mit  $10^6$  SL7207-8.8 infizierte C57BL/6-Mäuse. Am folgenden Tag erfolgte der Transfer von  $6 \times 10^6$  CFSE-markierten OT1-Zellen ( $CD90.2^+$ ) in die Schwanzvenen der infizierten Tiere. Nach weiteren fünf Tagen wurden Milz, Leber und mesenteriale Lymphknoten analysiert.

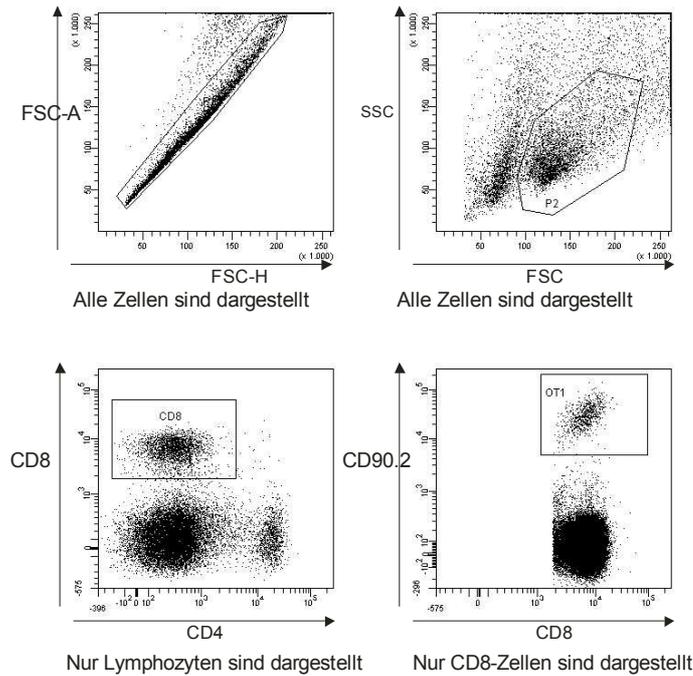
Zwei C57BL/6-Mäuse wurden per intravenöser Injektion mit SL7207-OVA infiziert. Als Kontrollgruppen dienten zwei mit SL7207-8.8 infizierte Mäuse. Dieser Salmonellenstamm produziert statt des OVA-Peptids einen Teil des Listeriolysins O und diente als Negativkontrolle. Am Tag nach der Infektion erfolgte der T-Zelltransfer von CFSE-markierten OT1-Zellen. Weitere fünf Tage später wurden Milz, Leber und mesenteriale Lymphknoten entnommen und die Lymphozyten aufgereinigt. Diese wurden mit den in Tabelle 6 aufgelisteten Antikörpern gefärbt.

**Tab. 6: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die für die Messung der Proliferation der OT1-Zellen in mit Salmonellen infizierten Mäusen verwendet wurden.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP
CD4	Pacific blue
CD90.2	PE
P2X7	Alexa 647

Anschließend erfolgte die Analyse mittels FACS. Um die Proliferation der OT1-Zellen ( $CD90.2^+$ ) analysieren zu können, wurden diese, wie in Abbildung 20 dargestellt, identifiziert.

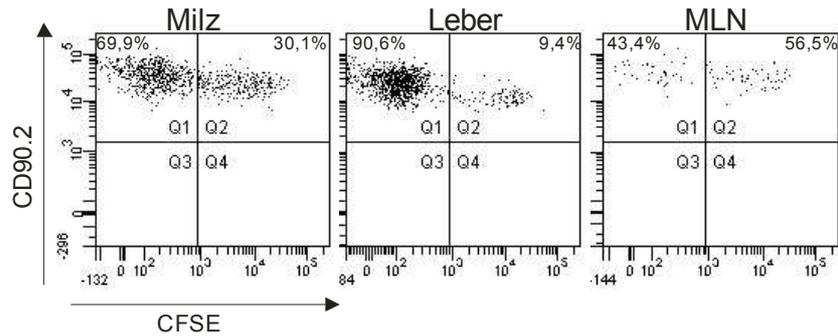


**Abb. 20: Identifikation der OT1-Zellen**

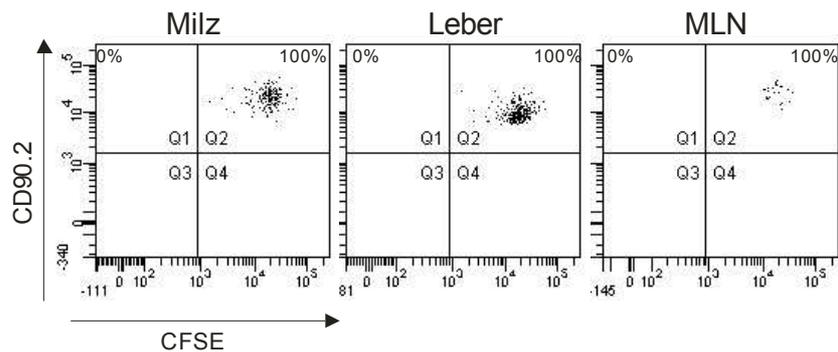
Zuerst wurden die Lymphozyten wie auch in den vorherigen Versuchen mittels FSC-A/FSC-H und FSC/SSC Dot-Plots ermittelt. Dann wurde CD8 gegen CD4 aufgetragen und die CD8<sup>+</sup> Zellen markiert. Für diese Zellpopulation wurde CD90.2 aufgetragen, um die transferierten OT-1 Zellen zu identifizieren.

Um die Proliferation der transferierten OT1-Zellen zu untersuchen, wurde CFSE gegen CD90.2 aufgetragen. In Abbildung 21 ist die Proliferation der OT1-Zellen in Milz, Leber und MLN in mit SL7207-OVA und SL7207-8.8 infizierten C57BL/6-Mäusen zu sehen.

## A) SL7207 OVA



## B) SL7207 8.8



Nur OT1 Zellen dargestellt

**Abb. 21: Proliferation von OT1-Zellen in mit SL7207-OVA und SL7207-8.8 infizierten C57BL/6-Mäusen**

Die Abbildungen stellen jeweils die Proliferation der OT1-Zellen in Milz, Leber und MLN in einer mit SL7207-OVA infizierten (A) oder einer mit SL7207-8.8 infizierten (B) C57BL/6-Maus dar.

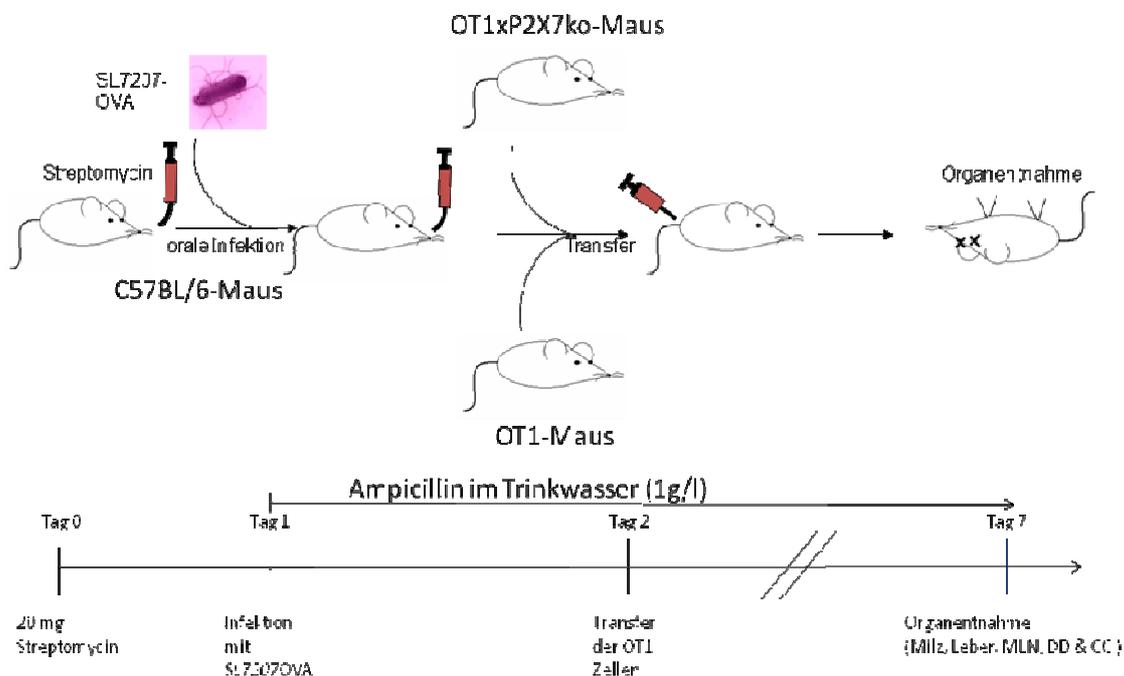
Bei der Infektion mit SL7207-OVA nahm die Fluoreszenzintensität der OT1-Zellen in allen untersuchten Organen deutlich ab. Das heißt die Zellen waren proliferiert. In der mit SL7207-8.8 infizierten Maus war keine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen, die Zellen hatten sich also nicht geteilt.

Mit Hilfe dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass der Versuchsaufbau funktioniert. Die OT1-Zellen proliferierten bei einer SL7207-OVA Infektion und somit konnten die antigenspezifischen Zellen näher analysiert werden. Auch konnte gezeigt werden, dass diese Proliferation spezifisch für die Infektion mit SL7207-OVA war, denn bei einer Infektion mit einem anderen Salmonellenstamm konnte keine Proliferation der OT1-Zellen nachgewiesen werden. Dies bedeutet auch, dass die schwere Entzündung im Rahmen der Salmonellen-Infektion alleine nicht ausreicht, um eine Proliferation hervorzurufen.

#### 4.5 Akkumulation und Proliferation von P2X7-positiven und P2X7-negativen T-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen

Um die Fragestellung, ob P2X7-defiziente CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Überlebensvorteil in entzündetem Gewebe haben, weiter zu klären, wurde ein kompetitiver Transfer durchgeführt. Dazu wurden zeitgleich wt OT1- (CD90.1<sup>+</sup>/CD90.2<sup>+</sup>) und OT1×P2X7ko-Zellen (CD90.2<sup>+</sup>) in mit SL7207-OVA infizierte C57BL/6-Mäuse (CD90.1<sup>+</sup>) injiziert. Somit befanden sich die beiden OT1-Zelllinien in der gleichen Umgebung und es konnte die Akkumulation und Proliferation der Zellen bei identischen Bedingungen verglichen werden.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 22 dargestellt.



**Abb. 22: Versuchsaufbau: Transfer von wt und P2X7ko OT1-Zellen in SL7207-OVA infizierte C57BL/6-Mäuse**

An Tag 0 wurden sechs C57BL/6-Mäuse mit 20 mg Streptomycin oral vorbehandelt. Vier Tiere wurden am nächsten Tag mit  $9 \times 10^9$  SL7207-OVA oral infiziert, zwei Tiere dienten als nicht infizierte Kontrollen. Zeitgleich zur Infektion wurde das Trinkwasser aller Mäuse mit Ampicillin versetzt. An Tag 2 erfolgte der Transfer mit  $3 \times 10^6$  CFSE-markierten wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen per intravenöser Injektion in die laterale Schwanzvene der Tiere. Nach weiteren 5 Tagen erfolgten die Entnahme von Milz, Leber, mesenterialen Lymphknoten (MLN), Dünndarm (DD) und Colon/Coecum (CC) und die FACS-Analyse der gereinigten Lymphozyten. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, nachfolgend ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Die C57BL/6-Mäuse wurden an Tag 0 mit 20 mg Streptomycin vorbehandelt, um die normale Darmflora zu reduzieren. So konnten die an Tag 1 oral gegebenen Salmonellen den Darm besiedeln und zu einer Entzündung desselben führen. Um zu verhindern, dass die Salmonellen das OVA-Plasmid verlieren, wurde das Trinkwasser mit 1 g/l Ampicillin versetzt. An Tag 2 erfolgte der Transfer der CFSE-markierten wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in die laterale Schwanzvene. Dazu wurden eine wt

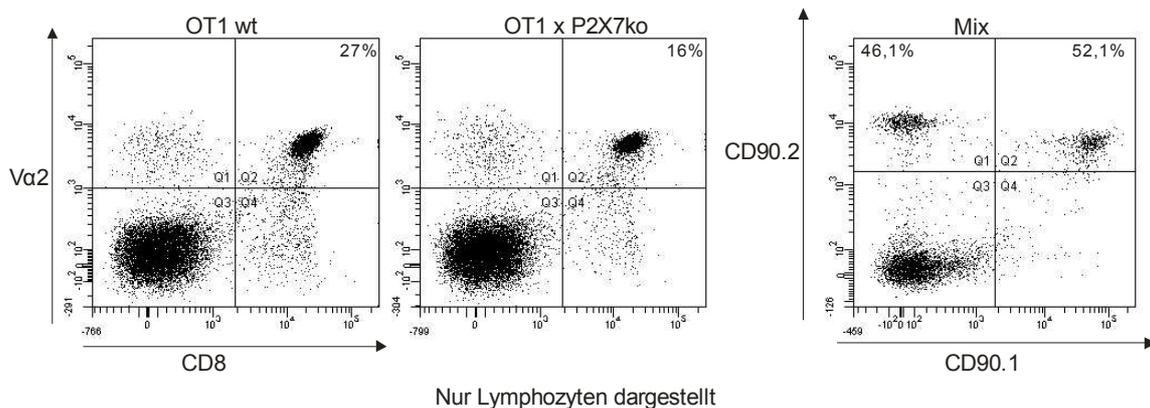
OT1- und eine OT1×P2X7ko-Maus getötet, die Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen und die Lymphozyten aufgereinigt. Nach der Aufreinigung wurde die Zahl der isolierten Lymphozyten pro Milz bestimmt und die Zellzahl beider Milzen auf  $2 \times 10^7$ /ml eingestellt. Die Zellen wurden mit den Antikörpern aus Tab. 7 Färbung 1 gefärbt und im FACS analysiert.

**Tab. 7: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die für Bestimmung des OT1:OT1×P2X7ko-Quotienten verwendet wurden.

Färbung 1		Färbung 2	
Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP	CD90.1	FITC
V $\alpha$ 2	FITC	CD90.2	Pacific blue

In Abb. 23 sind die resultierenden Dot-Plots dargestellt.



**Abb. 23: Kontrolle des OT1:OT1×P2X7ko Quotienten**

Die ersten beiden Dot-Plots stellen die Prozentzahl der CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit transgenem OT1-T-Zellrezeptor der jeweiligen Maus von allen Lymphozyten dar. Im dritten Dot-Plot ist die Prozentzahl der CD90.1<sup>+/2+</sup> Zellen (OT1 wt) und die CD90.1<sup>1/2+</sup> Zellen (OT1×P2X7ko) von allen CD90.2<sup>+</sup> Zellen im Mix zu sehen.

27% der Lymphozyten der wt OT1-Maus (Abb. 23 links) und 16% der Lymphozyten der OT1×P2X7ko-Maus (Abb. 23 Mitte) waren CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem OT1-T-Zellrezeptor. Um jeweils die gleiche Anzahl der transgenen Zellen zu transferieren, wurden die Zellen entsprechend der prozentualen Angaben gemischt und erneut im FACS analysiert (Antikörper Tab. 7, Färbung 2), um den Quotient der transferierten Zellen zum Zeitpunkt des Transfers festzuhalten (Abb. 23 rechts). Ungefähr die gleiche Anzahl transgener Zellen beider Mauslinien befand sich im Mix. Diese Zellsuspension wurde mit CFSE markiert und anschließend über die laterale Schwanzvene in die infizierten und nicht infizierten C57BL/6-Mäuse injiziert.

An Tag 7 wurde die Organentnahme durchgeführt, wobei Milz, Leber, die mesenterialen Lymphknoten sowie Dick- und Dünndarm entnommen wurden. Aus dem Darm wurden jeweils die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und die Lamina propria

Lymphozyten (LPL) aufgereinigt. Die Lymphozyten wurden zur FACS-Analyse aufgereinigt und mit den Antikörpern aus Tab. 8 gefärbt.

**Tab. 8: Verwendete Antikörper**

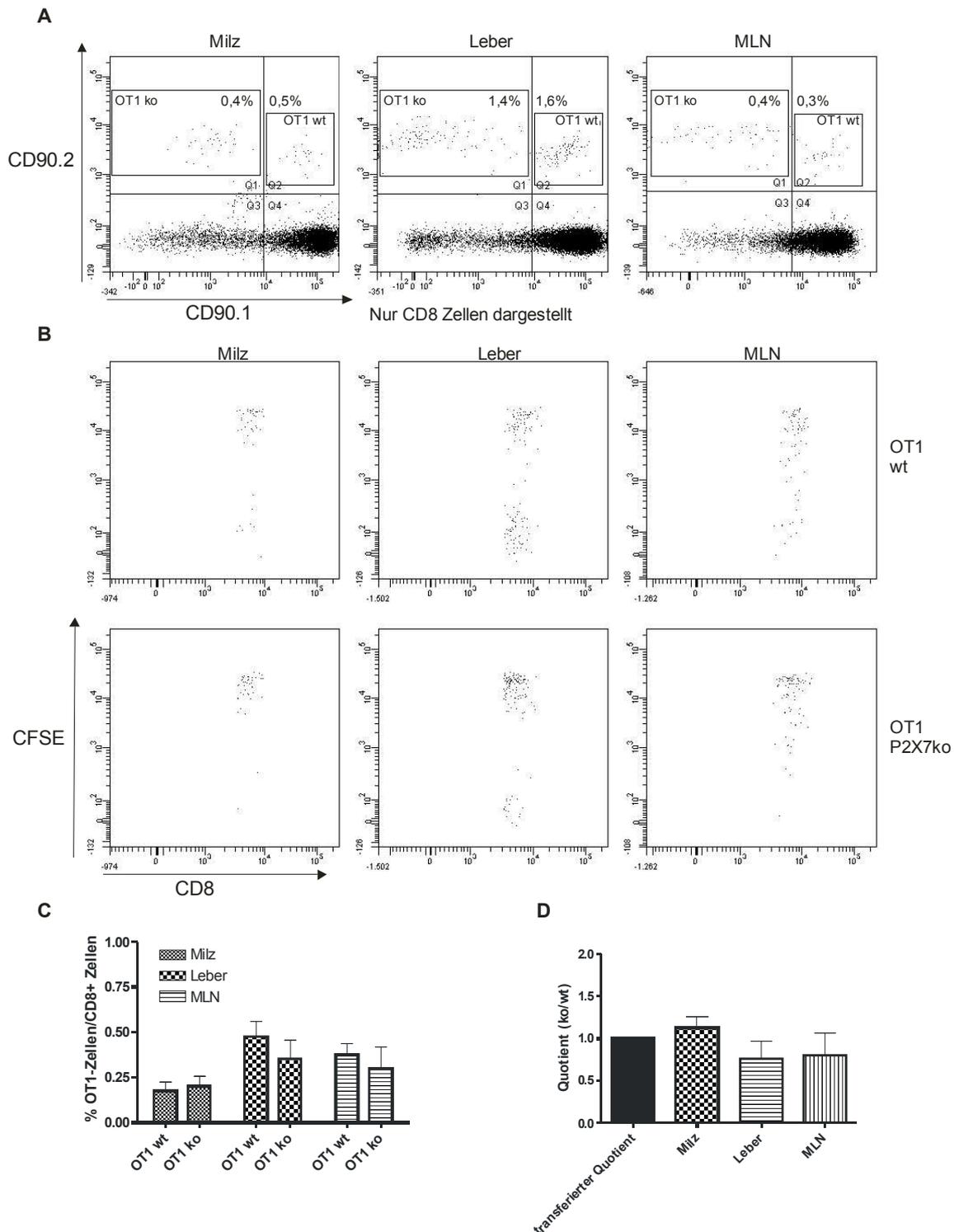
Fluoreszenzfarbstoffgekoppelte Antikörper, die für den kompetitiven Transfer bei oraler SL7207-OVA-Infektion verwendet wurden.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP
CD90.1	PE
CD90.2	Pacific blue
P2X7	Alexa 647

Zur übersichtlicheren Darstellung werden die Versuchsergebnisse in zwei Teilen vorgestellt, zuerst die Ergebnisse für Milz, Leber und MLN und dann die Antwort in der Darmmukosa (Dünndarm und Colon/Coecum).

Bei der FACS-Analyse wurden zuerst die Lymphozyten identifiziert und anschließend die CD8<sup>+</sup> T-Zellen. In den nachfolgenden Abbildungen sind daher nur die CD8<sup>+</sup> T-Zellen analysiert.

Um die Akkumulation der verschiedenen Zellpopulationen zu untersuchen, wurden, wie in Abbildung 24 dargestellt, die wt OT1- (CD90.1<sup>+</sup>/CD90.2<sup>+</sup>) und die OT1 $\times$ P2X7ko-Zellen (CD90.2<sup>+</sup>), sowie die endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (CD90.1<sup>+</sup>) in den unterschiedlichen Organen identifiziert (Abb. 24A). Mittels der CFSE-Färbung konnte auch die Proliferation der OT1-Zellen ermittelt werden (Abb. 24B).



**Abb. 24: Akkumulation und Proliferation der wt OT1- und OT1xP2X7ko-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen**

Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer Maus, die Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen aller vier Tiere.

- A) Akkumulation von wt OT1- und OT1xP2X7ko-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus
- B) Proliferation der wt OT1- (oben) und OT1xP2X7ko-Zellen (unten) in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus.
- C) Balkendiagramm des Anteils der wt OT1- und OT1xP2X7ko-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten.
- D) Balkendiagramm des Quotienten der OT1xP2X7ko-Zellen und wt OT1-Zellen (ko/wt) in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten.

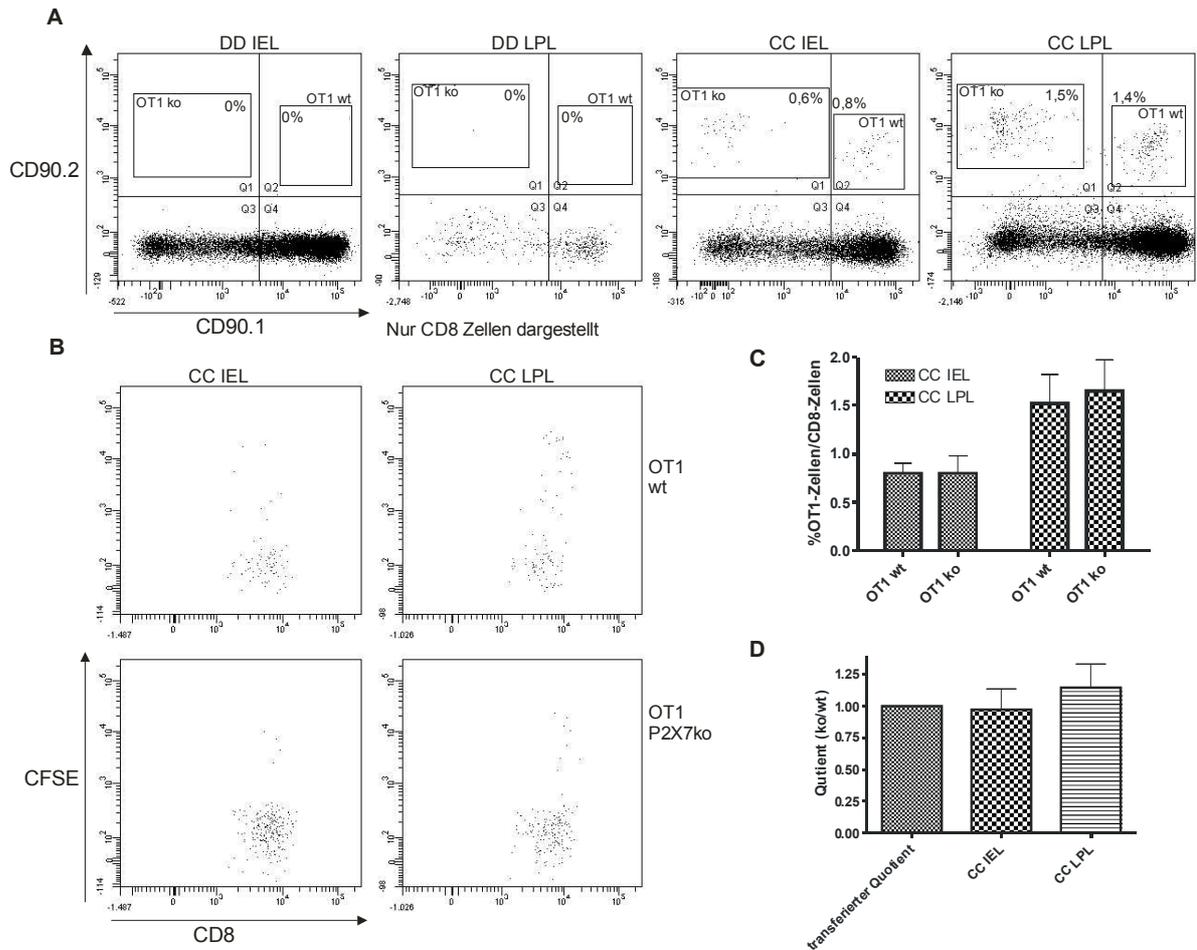
In Milz, Leber und den mesenterialen Lymphknoten waren nur wenige OT1-Zellen wiederzufinden. Unter 1% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren wt OT1- bzw. OT1×P2X7ko-Zellen. Gleichwohl war zu beobachten, dass ungefähr gleich viele wt OT1- wie OT1×P2X7ko-Zellen in den drei Organen wiedergefunden werden konnten.

Auch die Proliferation dieser beiden Zellpopulationen wurde untersucht. Nur ein kleiner Teil der Zellen war tatsächlich proliferiert. Die meisten der OT1-Zellen schienen sich nicht geteilt zu haben.

Um die Akkumulation der OT1-Zellen deutlicher darzustellen, wurden die Ergebnisse aller Mäuse in einem Balkendiagramm (Abb. 24C und D) zusammengefasst. Beide Zellpopulationen kamen in allen drei untersuchten Organen ungefähr gleich häufig vor. Der Quotient der Zellen nach der Infektion entsprach beinahe dem transferierten Quotienten.

Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse der Analyse der T-Zellen aus dem Darm vorgestellt. Der Dünndarm (DD) wurde getrennt vom Colon und Coecum (CC) aufgereinigt. Colon und Coecum wurden vereint und zusammen analysiert. Von den zwei unterschiedlichen Darmabschnitten wurden jeweils die intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und die Lamina propria Lymphozyten (LPL) aufgereinigt.

In Abbildung 25 sind die Versuchsergebnisse dargestellt.



**Abb. 25: Akkumulation und Proliferation der wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen**

Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer Maus, die Balkendiagramme den Mittelwert und die Standardabweichung aller vier Mäuse.

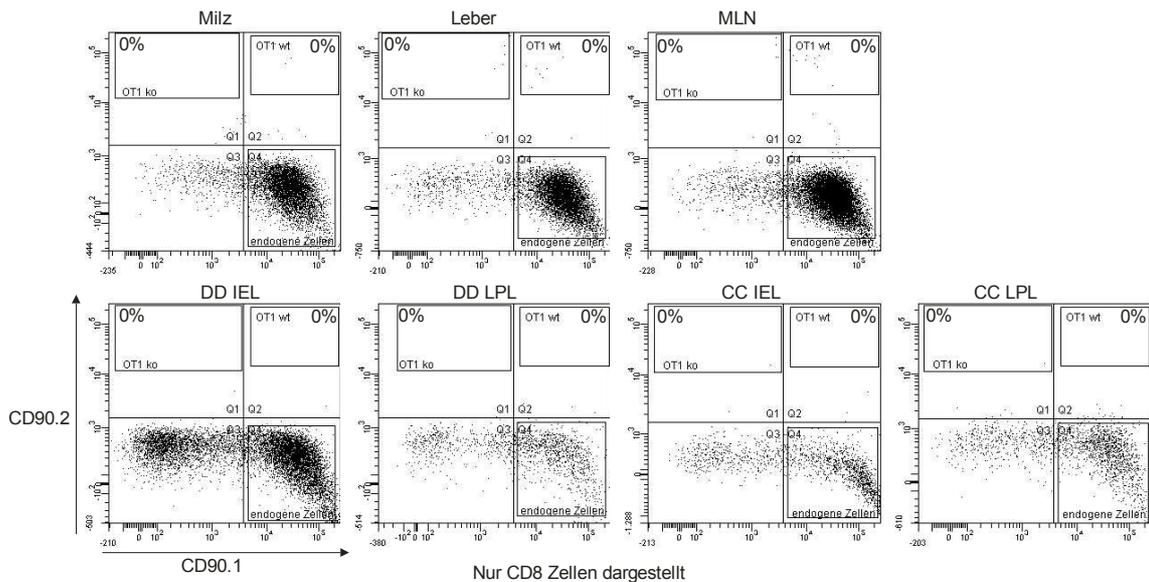
- A) Akkumulation von wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in Dünn- und Dickdarm (jeweils IEL und LPL) einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus
- B) Proliferation der wt OT1- (oben) und OT1×P2X7ko-Zellen (unten) im Epithel und der Lamina propria des Dickdarms einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus.
- C) Balkendiagramm des Anteils der wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen von allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Epithel und der Lamina propria des Colons/Coecums.
- D) Balkendiagramm des Quotienten der OT1×P2X7ko-Zellen und wt OT1-Zellen (ko/wt) im Epithel und in der Lamina propria des Colon/Coecums.

Auch hier wurden zuerst die wt OT1- und die OT1×P2X7ko-Zellen identifiziert. Dabei war auffällig, dass im Epithel und in der Lamina propria des Dünndarms so gut wie keine OT1-Zellen zu finden waren, weder von dem einen noch von dem anderen Donor. Im Colon und Coecum war eine deutliche Population an OT1-Zellen zu finden, besonders in der Lamina propria, wo sie 1,5% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausmachten. Im Gegensatz zu den OT1-Zellen aus den zentralen Organen waren diese auch proliferiert. Durch den vollständigen Verlust der Fluoreszenzintensität war zu erkennen, dass diese Zellen mindestens 5 Zellteilungen durchgemacht hatten.

Die Diagramme zeigen zudem deutlich, dass keine der beiden Zelllinien einen Überlebensvorteil hatte. In allen untersuchten Darmgeweben fanden sich gleich viele

wt OT1- wie OT1×P2X7ko-Zellen wieder. Der Quotient der wiedergefundenen Zellen lag nahe beim transferierten Quotienten.

Als Kontrolle wurde dieses Experiment mit nicht infizierten Tieren durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 26 zu sehen. Auch hier wurden zuerst die CD8<sup>+</sup> Lymphozyten identifiziert, die mit Hilfe der Oberflächenproteine CD90.1 und CD90.2 in die verschiedenen Subpopulationen eingeteilt werden konnten.



**Abb. 26: Akkumulation der wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in nicht infizierten C57BL/6-Mäusen**  
Die Dot-Plots zeigen exemplarisch die CD8<sup>+</sup> T-Zellen einer Maus.

Im Darm fanden sich keine OT1-Zellen wieder. In Milz, Leber und den mesenterialen Lymphknoten konnten nur vereinzelte Zellen nachgewiesen werden. In keinem der entnommenen Organe konnten genügend OT1-Zellen wiedergefunden werden, um eine Aussage über den Quotienten der beiden gereinigten Zellpopulationen zu machen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen ohne eine Salmonelleninfektion nur in sehr geringer Anzahl in Milz, Leber und MLN nachweisbar waren. Im Darm konnten überhaupt keine transferierten Zellen wiedergefunden werden.

Nach oraler Infektion mit SL7207-OVA akkumulierten in Milz, Leber und den mesenterialen Lymphknoten nur wenige, kaum proliferierte OT1-Zellen. Im Dünndarmepithel wie auch in der Lamina propria des Dünndarms konnten auch bei einer Salmonelleninfektion keine OT1-Zellen nachgewiesen werden. Die Akkumulation der proliferierten OT1-Zellen fand vor allem im Colon und Coecum der infizierten

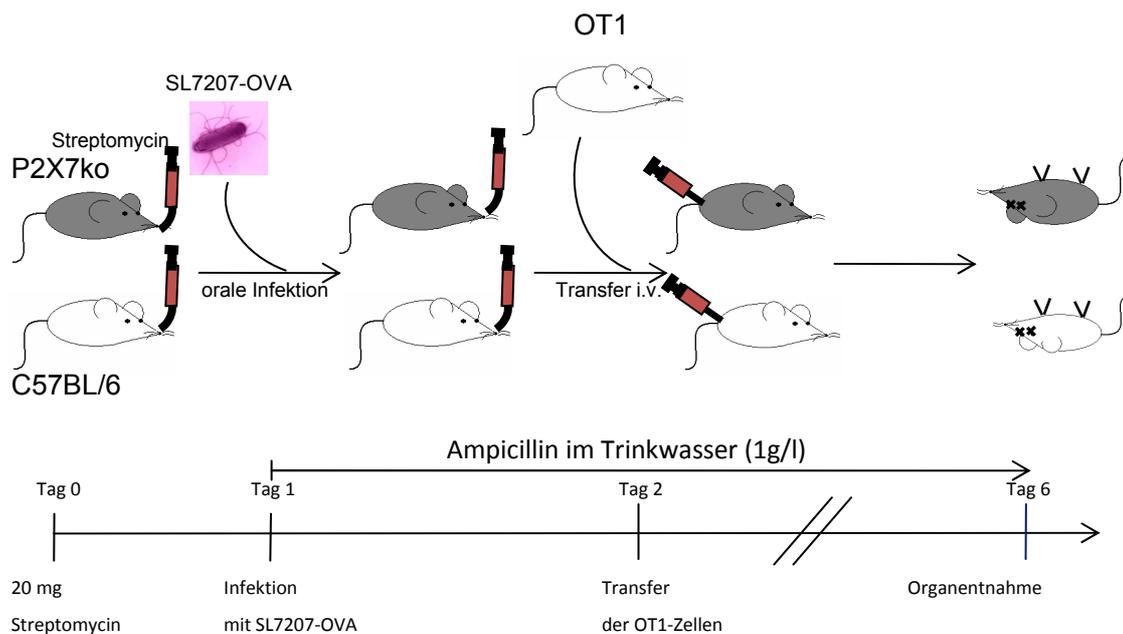
Mäuse statt. Besonders in der Lamina propria fand sich eine Anreicherung der transferierten Zellen wieder.

Die wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen akkumulierten in den jeweiligen Organen gleich stark. Der Quotient der gereinigten OT1-Zellen entsprach in etwa dem Quotient der transferierten Zellen. Keine der beiden Zellpopulationen schien einen Proliferations- oder Überlebensvorteil zu haben.

#### 4.6 Akkumulation und Proliferation von OT1-Zellen in oral mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen

In diesem Experiment sollte die Abhängigkeit der Proliferation und Akkumulation der OT1-Zellen vom immunologischen Umfeld bei einer Infektion mit SL7207-OVA untersucht werden. Wie oben erwähnt, kommt P2X7 nicht nur auf Lymphozyten, sondern auch auf anderen immunologisch bedeutsamen Zellen, wie z.B. Makrophagen vor. Mit Hilfe dieses Experiments sollte geklärt werden, ob das Fehlen des P2X7-Rezeptors im Umfeld der Infektion eine Auswirkung auf die Proliferation und Akkumulation der transferierten OT1-T-Zellen hat. Dazu wurden OT1-Zellen (CD90.1<sup>+</sup>) in mit SL7207-OVA infizierte C57BL/6- und P2X7ko-Mäuse (CD90.2<sup>+</sup>) transferiert und die Akkumulation dieser Zellen in den unterschiedlichen Organen zwischen den beiden Mauslinien verglichen.

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 27) ist der Versuchsaufbau abgebildet.



**Abb. 27: Versuchsaufbau: Transfer von wt OT1-Zellen in wt- und P2X7ko-Mäuse bei SL7207-OVA-Infektion**

Jeweils drei C57BL/6- und drei P2X7ko-Mäuse wurden am ersten Tag mit 20 mg Streptomycin vorbehandelt und an Tag 1 mit  $10^{10}$  SL7207-OVA oral infiziert. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer mit CFSE-markierten OT1-Zellen. Dazu wurde eine OT1-Maus getötet, die Milz unter sterilen Bedingungen entnommen und aufgereinigt, um anschließend  $0,75 \times 10^6$  Zellen per Injektion in die Schwanzvenen der infizierten Tiere zu transferieren. Nach weiteren 4 Tagen erfolgten die Entnahme von Milz, Leber, mesenterialen Lymphknoten (MLN), Dünndarm (DD) und Colon/Coecum (CC) und die FACS-Analyse der aufgereinigten Lymphozyten. Dieses Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, nachfolgend ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

An Tag 0 wurden die C57BL/6- und die P2X7ko-Mäuse mit Streptomycin oral vorbehandelt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion. Der Transfer wurde am darauffolgenden Tag mit CFSE-markierten OT1-Zellen vorgenommen. Vier Tage später

wurden die Mäuse getötet, die Organe entnommen und die Lymphozyten aufgereinigt. Die FACS-Analyse erfolgte mit den Antikörpern aus Tab. 9.

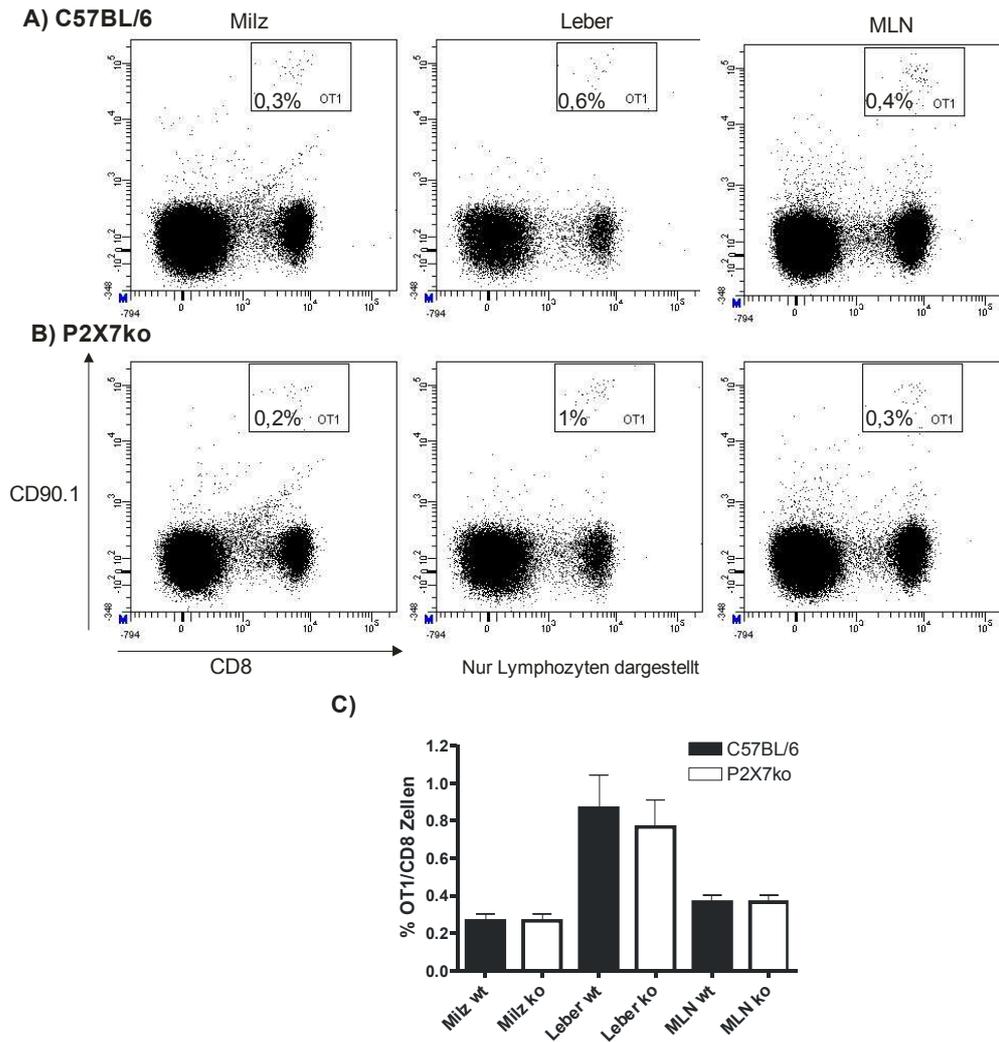
**Tab. 9: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die zum Nachweis der OT1-Zellen in SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen verwendet wurden.

Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD8 $\alpha$	PerCP
CD4	Pacific blue
CD90.1	PE
P2X7	Alexa 647

Auch für dieses Experiment werden die Ergebnisse zur besseren Übersicht in zwei Abschnitten vorgestellt.

In Abbildung 28 ist die Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und den mesenterialen Lymphknoten der C57BL/6 und P2X7ko-Mäuse zu sehen. Hierfür wurden zuerst die Lymphozyten identifiziert und anschließend CD8 gegen CD90.1 aufgetragen, um die OT1-Zellen von den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu unterscheiden.



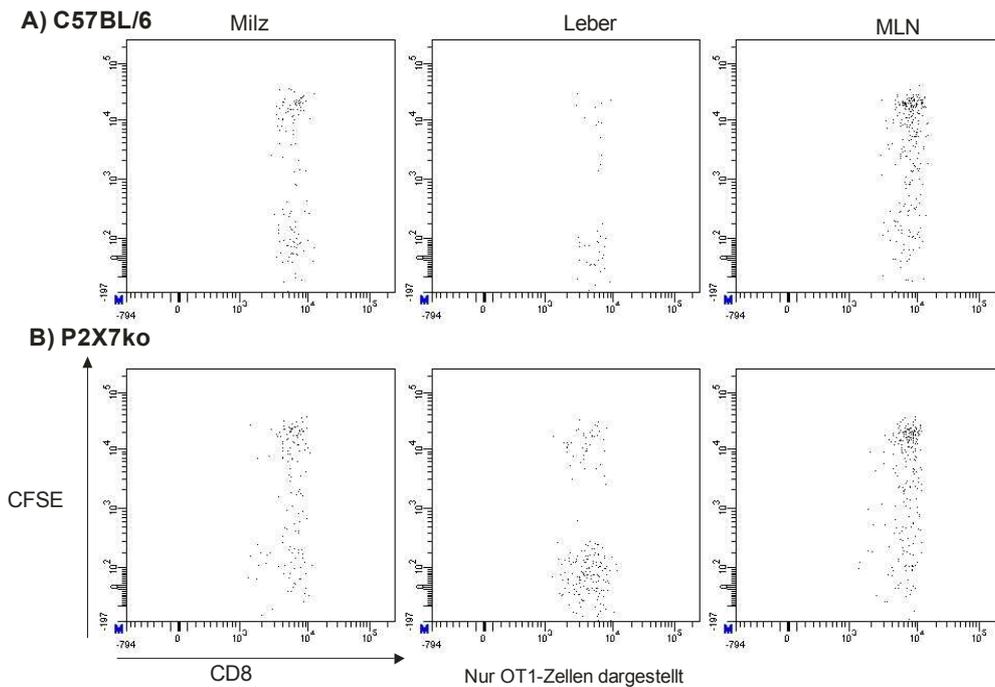
**Abb. 28: Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die Zahlen in den Dot-Plots geben den prozentualen Anteil der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an. Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Lymphozyten jeweils einer Maus, die Balkendiagramme die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere.

- A) Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus.
- B) Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten einer mit SL7207-OVA infizierten P2X7ko-Maus.
- C) Balkendiagramm des Anteils der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten.

In allen drei hier dargestellten Organen fanden sich OT1-Zellen wieder, allerdings nur im geringen Ausmaß. In der Milz waren nur 0,3% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen OT1-Zellen. In den mesenterialen Lymphknoten waren es mit 0,4% nur wenige mehr. In der Leber waren mit ca. 1% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen die meisten transferierten Zellen vorhanden. Zwischen den beiden Mauslinien war kein Unterschied in der Akkumulation zu erkennen.

Auch in diesem Experiment wurde die Proliferation der OT1-Zellen untersucht, dies ist in Abbildung 29 dargestellt.

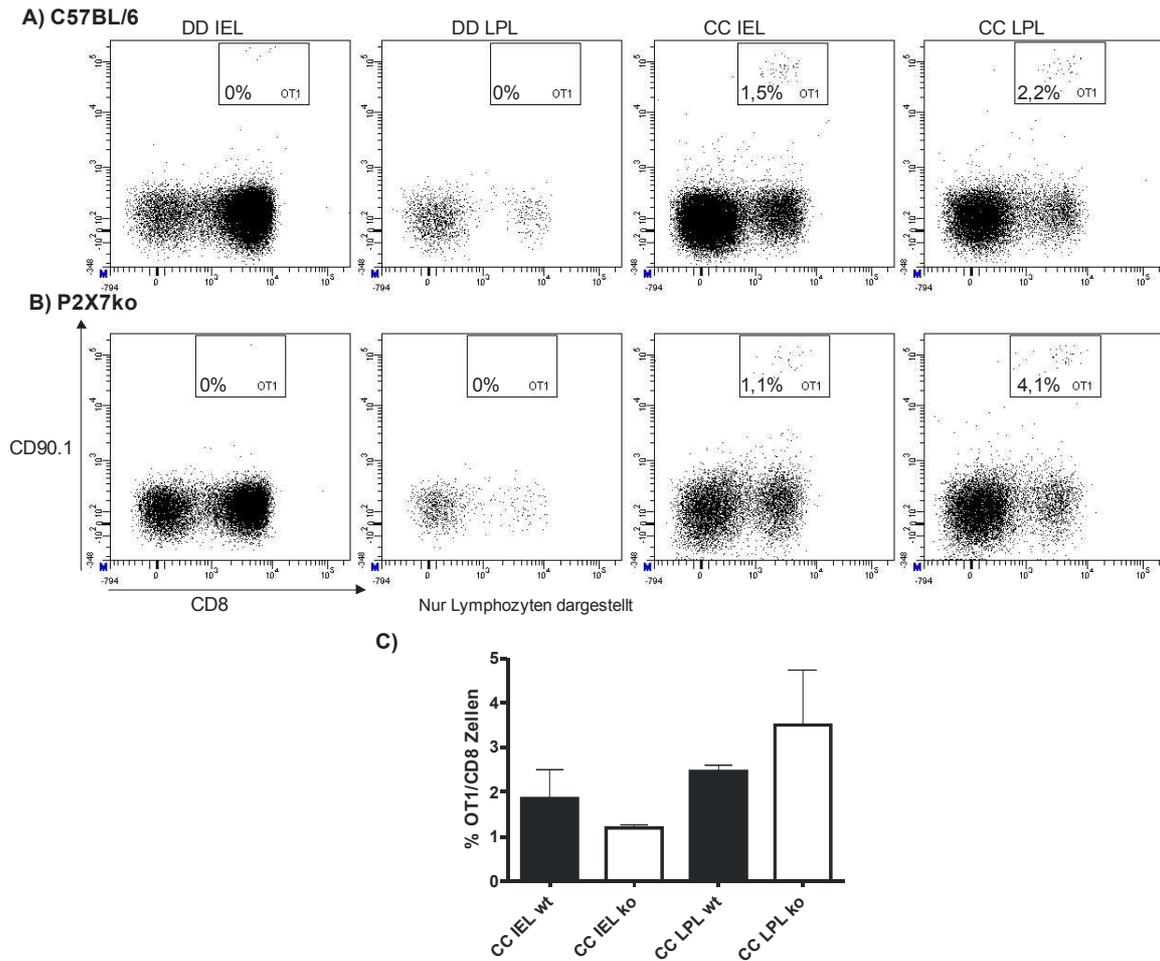


**Abb. 29: Proliferation der OT1-Zellen in Milz, Leber und den mesenterialen Lymphknoten in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Proliferation der OT1-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus (A) oder einer P2X7ko-Maus (B).

In Bezug auf die Proliferation fand sich kein Unterschied zwischen den aus den verschiedenen immunologischen Umfeldern isolierten OT1-Zellen. Der Verlust der Fluoreszenzintensität der CFSE-markierten OT1-Zellen war in allen Organen nahezu identisch. In der Milz hatten ungefähr die Hälfte und in der Leber zwei Drittel der transferierten Zellen die gesamte Fluoreszenzintensität verloren und sich somit mindestens fünfmal geteilt. In den MLN fand sich, neben vielen nicht proliferierten Zellen, die ganze Bandbreite der mit diesem System detektierbaren Proliferationsstufen.

In der nächsten Abbildung (Abb. 30) ist die Akkumulation der OT1-Zellen im Darm gezeigt. Hierbei wurde zwischen Dünndarm (DD) und Colon mit Coecum (CC) unterschieden. Aus beiden Kompartimenten wurden jeweils die intraepithelialen und die Lamina propria Lymphozyten aufgereinigt. Auch hier wurden zuerst die Lymphozyten identifiziert, sodass in Abbildung 30 nur diese Zellen zu sehen sind.



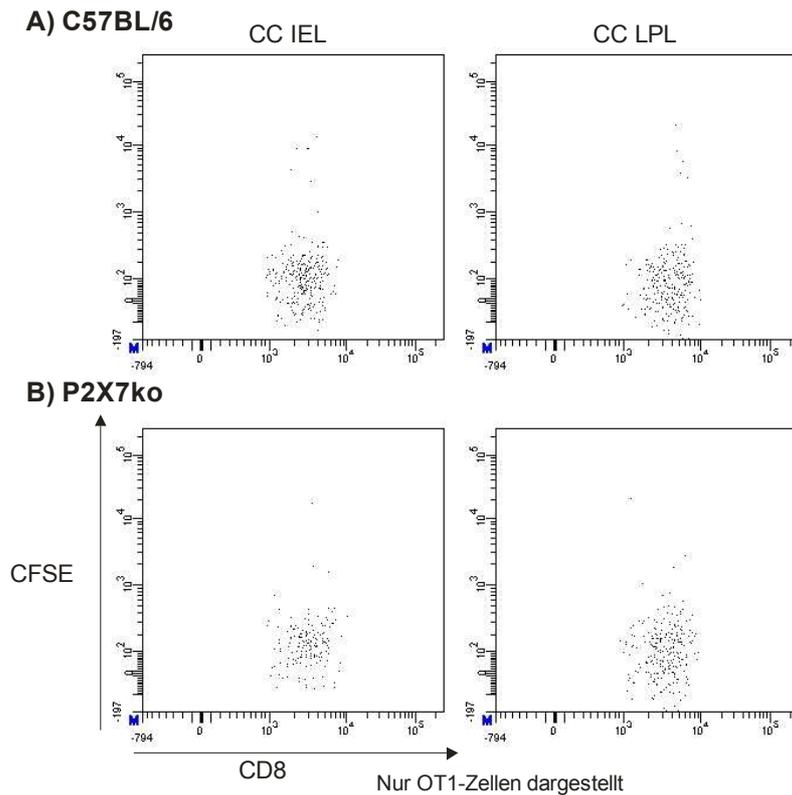
**Abb. 30: Akkumulation der OT1-Zellen im Dün- und Dickdarm in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die Zahlen in den Dot-Plots geben den prozentualen Anteil der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen an. Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Lymphozyten jeweils einer Maus, die Balkendiagramme die Mittelwerte und Standardabweichungen aller Tiere.

1. Akkumulation der OT1-Zellen in Dün- und Dickdarm (IEL und LPL) einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus.
2. Akkumulation der OT1-Zellen in Dün- und Dickdarm (IEL und LPL) einer mit SL7207-OVA infizierten P2X7ko-Maus.
3. Balkendiagramm des Anteils der OT1-Zellen an allen CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Dickdarm (IEL und LPL).

In beiden Mauslinien konnten im Epithel sowie in der Lamina propria des Dünndarms nur vereinzelte OT1-Zellen identifiziert werden. Im Colon und Coecum waren mehr OT1-Zellen zu finden, vor allem in der Lamina propria. Hier waren etwa 3% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen OT1-Zellen. Aber auch im Epithel des Colons fanden sich OT1-Zellen wieder. Hier machten sie ca. 1,5% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus. Es war kein signifikanter Unterschied in der Akkumulation der OT1-Zellen zwischen den beiden Mauslinien festzustellen.

Für die OT1-Zellen aus Coecum und Colon ist in der Abbildung 31 die Proliferation dargestellt.

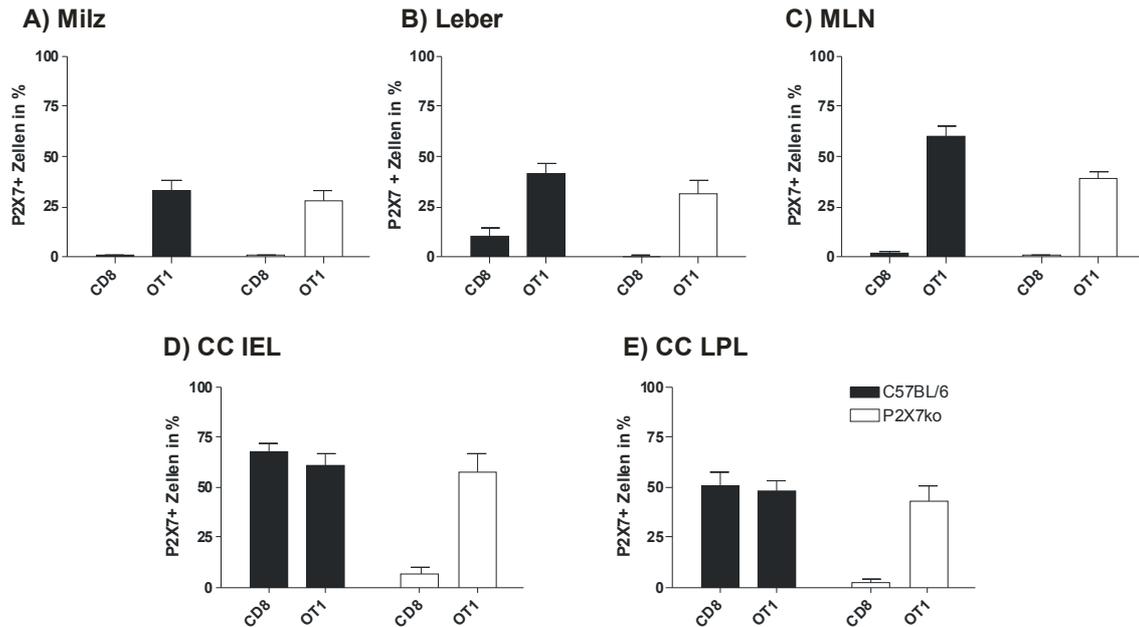


**Abb. 31: Proliferation der OT1-Zellen im Colon und Coecum in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die FACS-Bilder zeigen exemplarisch die Proliferation der OT1-Zellen in Colon und Coecum (IEL bzw. LPL) einer mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Maus (A) und einer P2X7ko-Maus (B).

Zwischen den beiden Mausstämmen war kein Unterschied in der Proliferation der OT1-Zellen erkennbar. Im Colon und Coecum waren die meisten der Zellen proliferiert, es fanden sich nur sehr wenige Zellen, die sich nicht geteilt hatten.

Abschließend wurden die Zellen hinsichtlich ihrer P2X7-Expression untersucht. Dafür wurde für die einzelnen Zellpopulationen CD8 gegen P2X7 aufgetragen und so der Anteil der P2X7-positiven Zellen bestimmt. Dieser Anteil ist in Abbildung 32 dargestellt.



**Abb. 32: Expression von P2X7 auf den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und den transferierten OT1-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen**

Die Balkendiagramme zeigen die Expression von P2X7 auf den endogenen CD8<sup>+</sup> und den OT1-Zellen in Milz (A), Leber (B), MLN (C), Colon und Coecum (IEL) (D) und Colon und Coecum (LPL) (E) in C57BL/6- (schwarz) und P2X7ko-Mäusen (weiß). Die Balkendiagramme stellen den Mittelwert sowie die Standardabweichung von den drei untersuchten Mäusen dar.

In Milz, Leber und MLN fanden sich in den C57BL/6-Mäusen nur wenige endogene CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die P2X7 auf der Oberfläche trugen. In der Milz waren ca. 1%, in der Leber ca. 10% und in den MLN ca. 2% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen P2X7-positiv. Der Anteil der P2X7-positiven endogenen Zellen der P2X7ko-Tiere lag im Bereich des Hintergrunds. Die transferierten OT1-Zellen hingegen zeigten eine deutlich höhere P2X7-Expression. Hier betrug der Anteil der P2X7-positiven Zellen in beiden Mauslinien in der Milz ca. 30%, in der Leber 40% und in den MLN zwischen 45-55%.

In Colon und Coecum der C57BL/6 fanden sich wieder mehr P2X7-positive endogene CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Im Epithel waren ca. 70% der endogenen, sowie auch der transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen P2X7-positiv. In der Lamina propria lag der Anteil der P2X7-positiven Zellen bei endogenen und transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen bei 50%. Die endogenen Zellen der P2X7ko-Mäuse zeigten hier eine zu vernachlässigende P2X7-Expression.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass wie im vorherigen Versuch in Milz, Leber und den mesenterialen Lymphknoten nur wenige OT1-Zellen wieder gefunden werden konnten, die dann auch nur teilweise proliferiert waren. Auch im Dünndarm waren keine OT1-Zellen zu finden. Die Akkumulation und Proliferation der OT1-Zellen fand vor allem im Colon und Coecum statt.

Die P2X7-Expression der OT1-Zellen war in den zentralen Organen Milz, Leber und in den MLN deutlich höher als die Expression der endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Im Colon

fand sich eine ungefähr gleich hohe P2X7-Expression zwischen den endogenen und den transferierten Zellen. Bezüglich der Stärke der Akkumulation sowie des P2X7-Expressionslevels der endogenen und der OT1-Zellen ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Mauslinien feststellen.

## 4.7 Expression von P2X7 auf Th17-Zellen und T-Zellen mit $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor

In den oben beschriebenen Experimenten konnte eine typische Verteilung von P2X7-positiven T-Zellen in verschiedenen Organen gezeigt werden. Die T-Zellen in Milz und Leber trugen nur zu einem geringen Anteil P2X7 auf der Oberfläche, wohingegen im Dünndarm fast alle CD8<sup>+</sup> T-Zellen P2X7-positiv waren. Auch in vorangegangenen Arbeiten zeigte sich eine hohe Expression von P2X7 auf T-Zellen im Epithel des Dünndarms (Heiss *et al.* 2008). P2X7 scheint daher für T-Zellen ein gewebespezifischer Marker zu sein, der bei der primären Aktivierung der T-Zellen im Darm hochreguliert wird.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit analysierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen gibt es Hinweise auf für eine vom Darm unabhängige P2X7-Expression für andere T-Zellsubpopulationen. Für NKT-Zellen wurde z.B. eine konstitutive P2X7-Expression in der Leber nachgewiesen. Auch für regulatorische T-Zellen wurde eine hohe P2X7-Expression, unabhängig vom Gewebe, beschrieben (Aswad *et al.* 2005, Hubert *et al.* 2010, Kawamura *et al.* 2006).

Vor kurzem wurde eine neue Subpopulation der T-Helferzellen beschrieben, die Th17-Zellen. Th17-Zellen produzieren unter anderem Interleukin-17A (IL-17A) und spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und bei der Bekämpfung von extrazellulären Bakterien (Stockinger *et al.* 2007). Th17-Zellen kommen vor allem in der Darmmukosa und in entzündetem Gewebe vor. Im Blut und in sekundären Lymphgeweben ist normalerweise nur eine geringe Anzahl dieser Zellen zu finden. Hier stellt sich nun die Frage, ob auch Th17-Zellen P2X7 auf der Oberfläche tragen und ob dies eine gewebespezifische oder eine zelltypspezifische Expression ist. Neben T-Zellen mit einem  $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor (TZR) existiert auch eine kleine T-Zellsubpopulation mit einem alternativen TZR, dem  $\gamma\delta$ -TZR. Zellen mit diesem TZR liegen nur in sehr geringen Frequenzen in Milz, Lymphknoten und Leber vor. In der Darmmukosa trägt aber ein größerer Anteil der T-Zellen den  $\gamma\delta$ -TZR (Agace 2008, Hayday *et al.* 2001, Ishikawa *et al.* 2007).

### 4.7.1 Expression von P2X7 auf Th17-Zellen

Um die oben genannte Fragestellung zu klären, wurde die Expression von P2X7 auf Th17-Zellen in Milz, Leber und im Dünndarmepithel von gesunden C57BL/6-Mäusen untersucht. Hierzu wurden C57BL/6-Mäuse getötet und Milz, Leber sowie Dünndarm entnommen. Die Lymphozyten wurden gereinigt und mit PMA/Ionomycin für 4h stimuliert. Danach erfolgten extra- und intrazelluläre Färbungen mit den in Tabelle 10

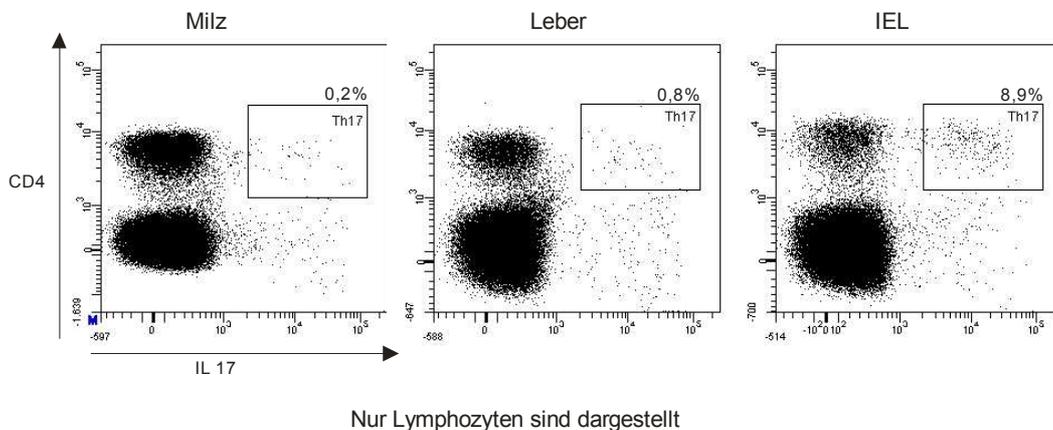
aufgelisteten Antikörpern. Als Kontrolle wurde dasselbe Experiment mit P2X7ko-Mäusen durchgeführt.

**Tab. 10: Verwendete Antikörper**

Antikörper, die zum Nachweis von P2X7 auf Th17-Zellen (Färbung1) und Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR (Färbung 2), verwendet wurden. Oben sind die Antikörper für die extrazelluläre, unten die für die intrazelluläre Färbung aufgeführt.

Färbung 1		Färbung 2	
Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff	Antikörper	Fluoreszenzfarbstoff
CD4	PerCP	CD8 $\alpha$	PerCP
CD8 $\alpha$	Pacific blue	CD8 $\beta$	Pacific blue
P2X7	Alexa 647	P2X7	Alexa 647
		$\gamma\delta$ TZR	FITC
IL-17	PE	IL-17	PE
IFN $\gamma$	FITC		

Nach der Färbung erfolgte die FACS-Analyse. Hierbei wurden zuerst die Lymphozyten identifiziert und anschließend wurde CD4 gegen IL-17 aufgetragen (Abb.33), um die Th17-Zellen zu identifizieren.

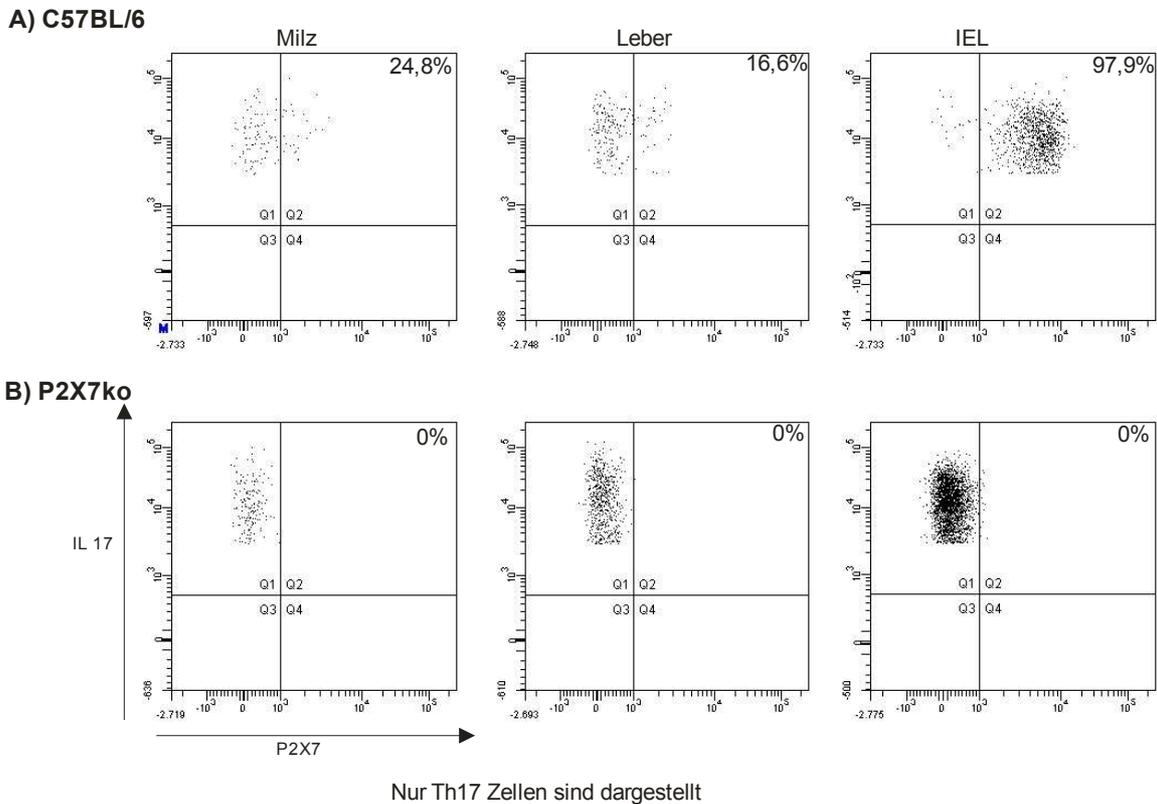


**Abb. 33: Identifikation der Th17-Zellen**

Um die Th17-Zellen zu identifizieren, wurden zuerst die Lymphozyten markiert und anschließend CD4 gegen IL-17 aufgetragen. CD4<sup>+</sup>, IL-17-produzierende Zellen sind definitionsgemäß Th17-Zellen. Dies ist für Milz, Leber und die Lymphozyten des Dünndarms einer C57BL/6-Maus dargestellt. Die Prozentangaben stellen den Anteil an Th17-Zellen von allen CD4<sup>+</sup> Zellen dar.

Die doppelpositiven Zellen sind definitionsgemäß Th17-Zellen. In der Milz waren ca. 0,2% der CD4<sup>+</sup> Lymphozyten Th17-Zellen, in der Leber ungefähr 1% und im Dünndarmepithel ca. 9%. In den P2X7ko-Mäusen fand sich annähernd der gleiche Anteil an Th17-Zellen wieder wie in den wildtyp Mäusen (nicht gezeigt).

In der folgenden Abbildung wird für die Th17-Zellen aus Milz, Leber und Dünndarmepithel die P2X7-Expression dargestellt, als Kontrolle dienten die Th17-Zellen aus den P2X7ko-Mäusen (Abb.34).



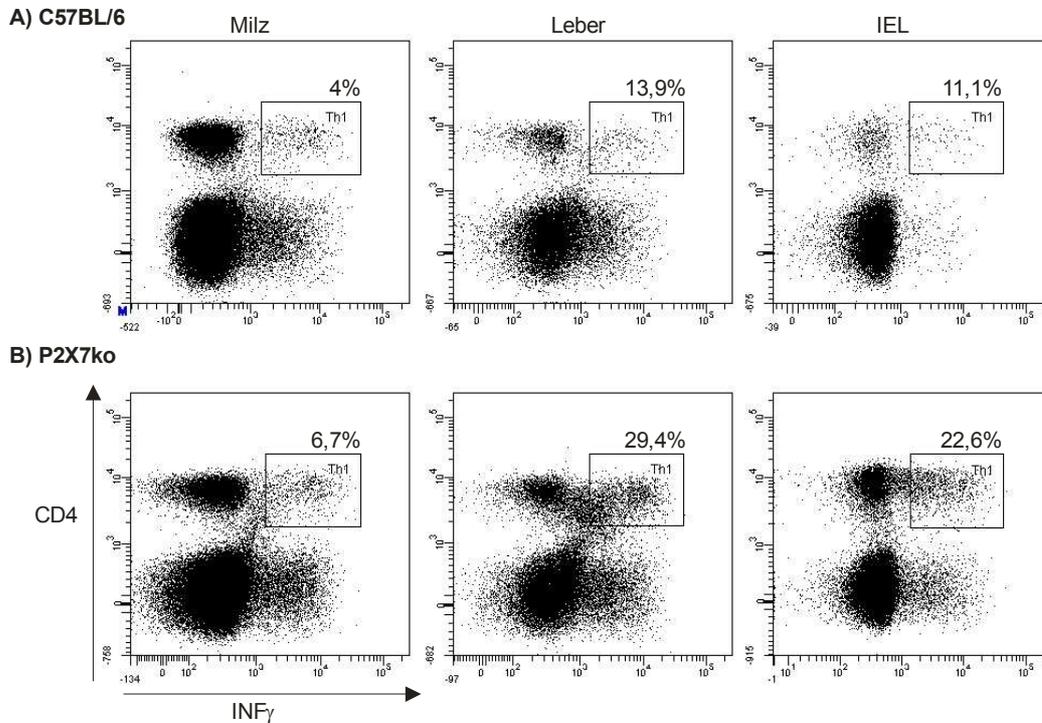
**Abb. 34: Expression von P2X7 auf Th17-Zellen**

Die Abbildungen zeigen die Expression von P2X7 auf Th17-Zellen aus Milz, Leber und intestinalem Epithel einer C57BL/6-Maus (A) oder einer P2X7ko-Maus (B). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt, hier ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Die aus der Milz isolierten Th17-Zellen waren zu ca. 25% P2X7-positiv. Die Leber-Th17-Zellen zeigten mit ca. 17% P2X7-positiven Zellen eine geringere Expression. Im Gegensatz dazu waren im Epithel des Dünndarms deutlich mehr P2X7-positive Th17-Zellen zu finden, hier trugen fast alle Th17-Zellen P2X7 auf der Oberfläche (Abb. 34A). Auch ist hier die Expressionsstärke pro Zelle höher als in den anderen untersuchten Organen. Bei den P2X7ko-Tieren waren in allen Organen nur P2X7 negative Th17-Zellen nachzuweisen.

Da bei dieser Zellpopulation eine unterschiedliche P2X7-Expression in den verschiedenen Organen mit einer hohen Expression im Darm nachgewiesen werden konnte, ist von einer gewebespezifischen Expression des P2X7 Rezeptors auf den Th17-Zellen auszugehen. Zudem war kein Unterschied in der Zahl der Th17-Zellen zwischen den C57BL/6 und P2X7ko-Mäusen zu finden.

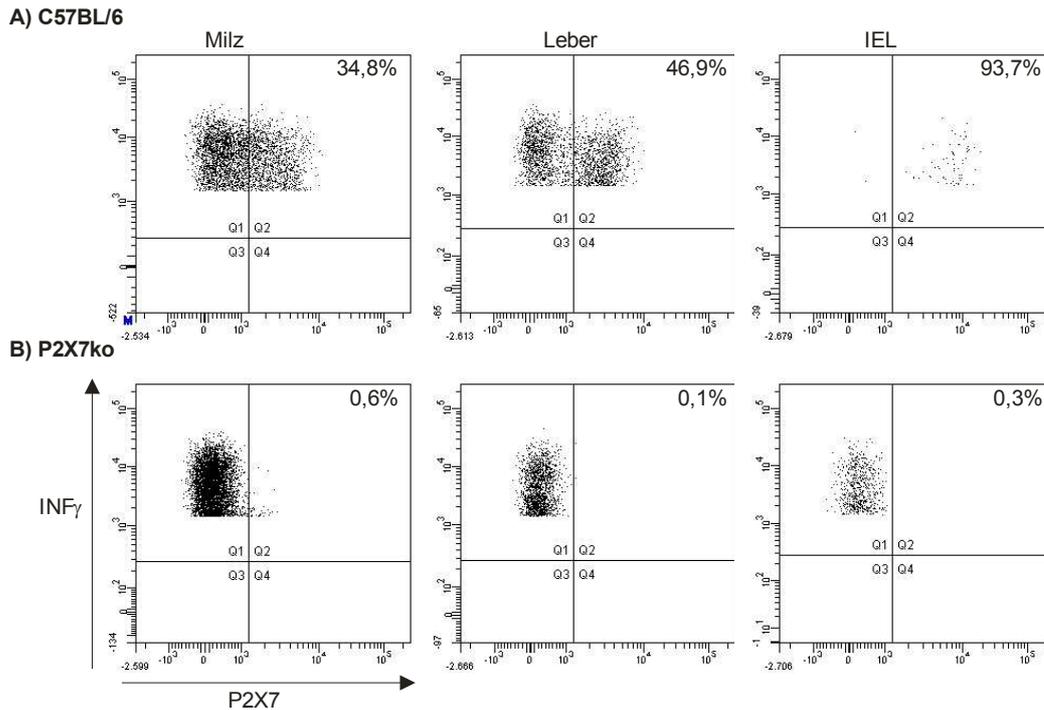
Zum Vergleich wurde die P2X7-Expression auf Th1-Zellen der gleichen Organe bestimmt. Dazu wurden entsprechend zu den Th17-Zellen die Lymphozyten identifiziert und CD4 gegen  $\text{INF}\gamma$  aufgetragen. Der Anteil der Th1-Zellen an allen  $\text{CD4}^+$  Lymphozyten in C57BL/6 und P2X7ko-Mäusen ist in der nächsten Abbildung dargestellt.



**Abb. 35: Identifizierung der Th1-Zellen**

Um die Th1-Zellen zu identifizieren, wurden zuerst die Lymphozyten markiert und anschließend  $\text{CD4}$  gegen  $\text{INF}\gamma$  aufgetragen.  $\text{CD4}^+$ ,  $\text{INF}\gamma$  produzierende Zellen sind definitionsgemäß Th1-Zellen. Dies ist für Milz, Leber und die Lymphozyten des Dünndarms einer C57BL/6-Maus (A) und einer P2X7ko-Maus (B) dargestellt. Die Prozentangaben stellen den Anteil an Th1-Zellen von allen  $\text{CD4}^+$  Zellen dar.

Auffällig war der Unterschied in der Anzahl der Th1-Zellen zwischen den beiden Mauslinien. In allen hier untersuchten Organen der P2X7ko-Mäuse fanden sich fast doppelt so viele Th1-Zellen wieder wie in den C57BL/6 Tieren. In der Leber waren mit 14% bzw. 30% die meisten Th1-Zellen zu finden. Im Darm waren es etwas weniger und in der Milz waren mit 4 bzw. 7% die wenigstens Th1-Zellen anzutreffen. In der nächsten Abbildung ist die P2X7-Expression dieser Zellen dargestellt.



**Abb. 36: Expression von P2X7 auf Th1-Zellen**

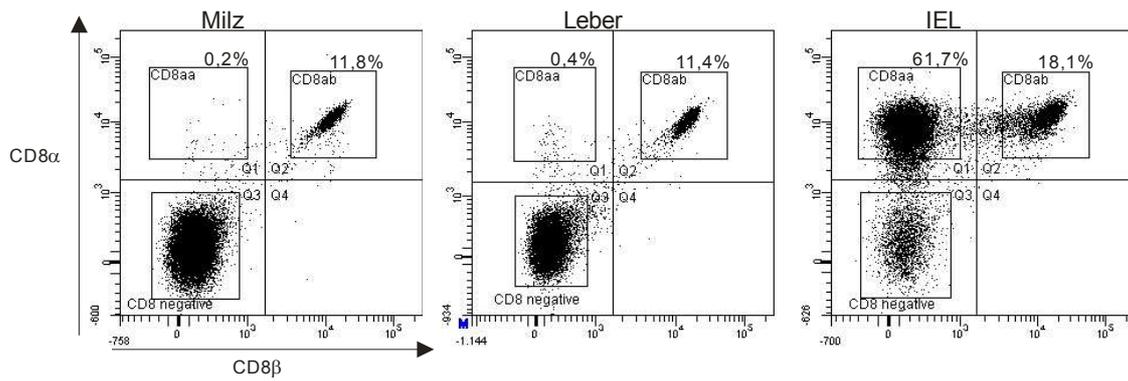
Die Abbildungen zeigen die Expression von P2X7 auf Th1-Zellen aus Milz, Leber und intestinalem Epithel einer C57BL/6- (A) oder einer P2X7ko- (B) Maus. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt, hier ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Die intraepithelialen Th1-Zellen des Dünndarms trugen zu über 90% den P2X7-Rezeptor auf ihrer Oberfläche. In der Leber waren fast 50% der Th1-Zellen für P2X7 positiv. Auch in der Milz war der Anteil der P2X7 positiven Th1-Zellen mit ca. 35% relativ groß. Die Th1-Zellen aus den P2X7ko-Mäusen trugen kein P2X7 auf der Oberfläche.

Interessanterweise ließ sich hier ein Unterschied in der Anzahl der Th1-Zellen zwischen C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen beobachten. In allen untersuchten Organen fanden sich in den P2X7ko Tieren mehr Th1-Zellen wieder. Zudem ließ sich auch bei dieser Zellpopulation ein gewebespezifischer Unterschied in der P2X7-Expression nachweisen.

#### 4.7.2 Expression von P2X7 auf T-Zellen mit dem $\gamma\delta$ -TZR

Um die Expression von P2X7 auf T-Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR zu untersuchen, wurde wie im vorherigen Versuch verfahren, allerdings wurde Färbung 2 (Tab. 10) verwendet. Die Lymphozyten wurden identifiziert und CD8 $\alpha$  gegen CD8 $\beta$  aufgetragen, sodass die konventionellen T-Zellen von den unkonventionellen sowie den CD8 $^+$  Zellen unterschieden werden konnten.



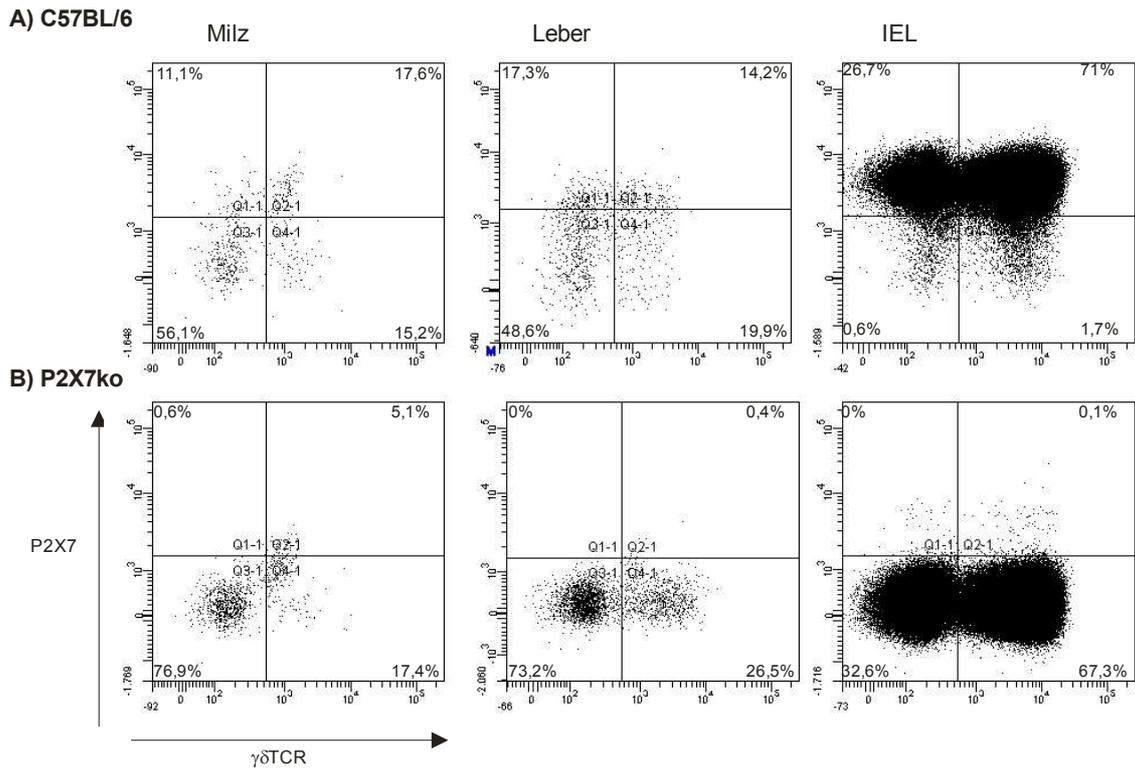
Nur Lymphozyten sind dargestellt

**Abb. 37: Identifizierung der CD8αα-, CD8αβ- und CD8<sup>-</sup> T-Zellen**

Die Lymphozyten wurden identifiziert und CD8α gegen CD8β aufgetragen. Die unterschiedlichen Subpopulationen konnten so klar voneinander abgrenzt werden.

In der Milz fanden sich vor allem CD8αβ-T-Zellen (12% aller Lymphozyten), wohingegen die CD8αα-T-Zellen nur vereinzelt vorkamen. Die restlichen 85 bis 90% waren CD8-negative Zellen. Auch in der Leber waren wenig CD8αα-T-Zellen (~0,5%) zu finden. Die CD8αβ-T-Zellen machten mit ca. 12% aller Lymphozyten den Großteil der CD8<sup>+</sup> Zellen aus. Bei den intraepithelialen Lymphozyten des Dünndarms waren hingegen vor allem die CD8αα-T-Zellen nachzuweisen. Sie bildeten hier mit ungefähr 65% den Großteil aller Lymphozyten. Die CD8αβ-T-Zellen waren mit 20% vertreten, wohingegen die CD8-negative Zellen mit 13% die Minderheit ausmachten. Diese Verteilung fand sich auch in den P2X7ko-Tieren wieder (nicht gezeigt).

In der folgenden Abbildung (Abb. 38) ist die P2X7-Expression für CD8αα-T-Zellen mit γδ-TZR dargestellt. Abbildung 39 zeigt die P2X7-Expression für CD8αβ-T-Zellen mit γδ-TZR, Abbildung 40 die für CD8-negative Zellen mit γδ-TZR.

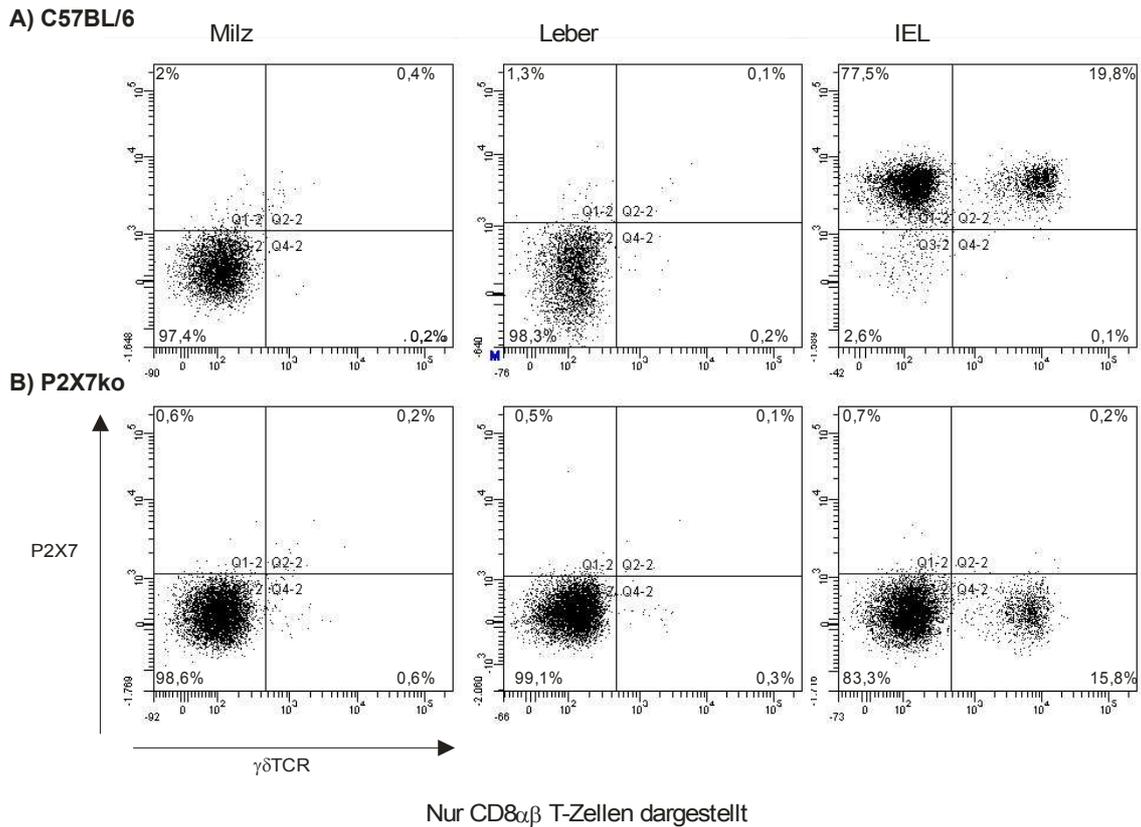


Nur CD8 $\alpha\alpha$  T-Zellen dargestellt

**Abb. 38: Expression von P2X7 auf CD8 $\alpha\alpha$ - $\gamma\delta$ -T-Zellen**

Die Abbildungen zeigen die Expression von P2X7 auf CD8 $\alpha\alpha$ -Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR aus Milz, Leber und intestinalem Epithel einer C57BL/6-Maus (A) oder ein P2X7ko-Maus (B). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt, hier ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Die wenigen CD8 $\alpha\alpha$ -T-Zellen, die in der Milz gefunden werden konnten, trugen zu ungefähr 30% den  $\gamma\delta$ -TZR. Hiervon war wiederum ungefähr die Hälfte für P2X7-positiv. In der Leber zeigte sich ein sehr ähnliches Bild. Im Dünndarm hingegen war die Coexpression fast hundertprozentig. Beinahe alle Zellen, die den  $\gamma\delta$ -TZR trugen, hatten auch P2X7 auf der Oberfläche. Auch die CD8 $\alpha\alpha$ -Zellen mit  $\alpha\beta$ -TZR waren hier P2X7-positiv. Generell zeigten die T-Zellen im Darm eine höhere P2X7-Expressionsstärke. Bei den P2X7ko-Tieren war eine sehr geringe Expression von P2X7 zu finden. Aber es zeigte sich ungefähr die gleiche Verteilung zwischen  $\alpha\beta$ - und  $\gamma\delta$ -TZR wie bei den C57BL/6-Mäusen.

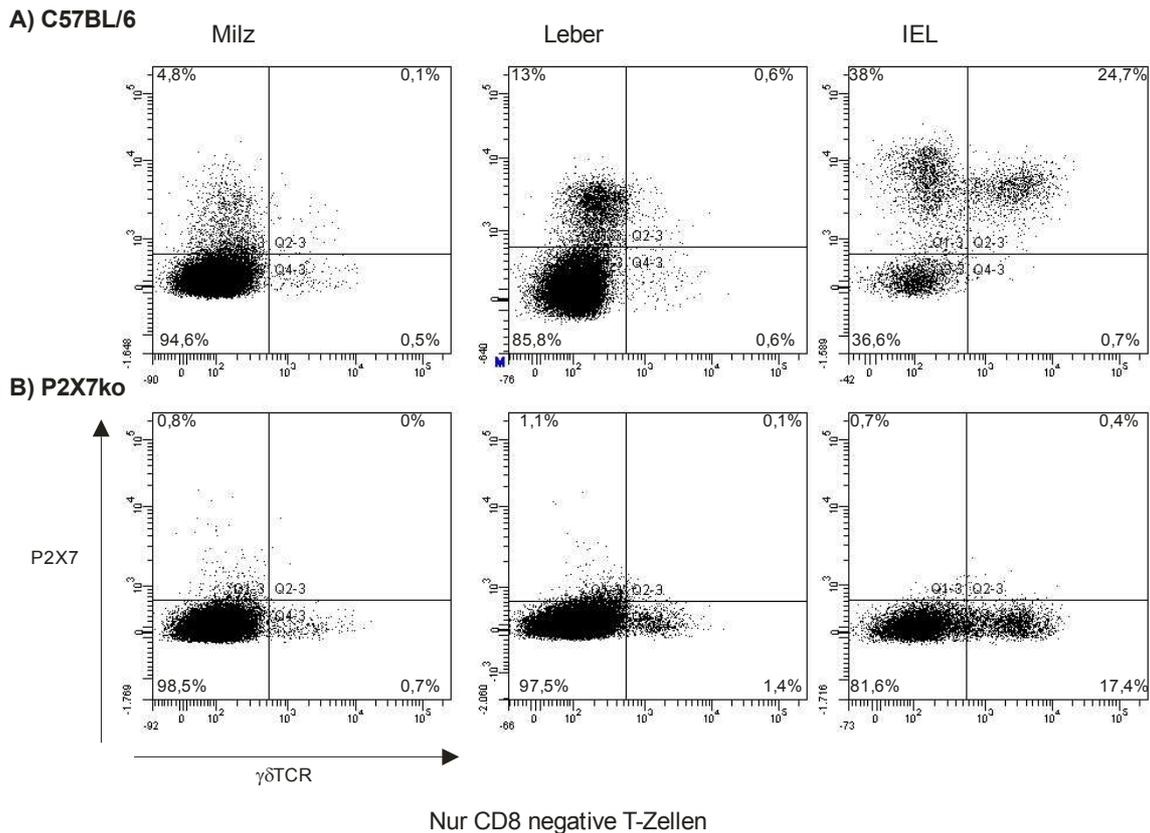


**Abb. 39: Expression von P2X7 auf CD8 $\alpha$  $\beta$ -T-Zellen mit  $\gamma$  $\delta$ -TZR**

Die Abbildungen zeigen die Expression von P2X7 auf CD8 $\alpha$  $\beta$ -Zellen mit  $\gamma$  $\delta$ -TZR aus Milz, Leber und intestinalem Epithel einer C57BL/6-Maus (A) oder einer P2X7ko-Maus (B). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt, hier ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

In Milz und Leber waren keine CD8 $\alpha$  $\beta$ -T-Zellen mit einem  $\gamma$  $\delta$ -TZR vorhanden. Im Dünndarm trugen ungefähr ein Viertel der CD8 $\alpha$  $\beta$ -T-Zellen den  $\gamma$  $\delta$ -TZR. Fast alle davon waren auch für P2X7-positiv, wie auch der Großteil der CD8 $\alpha$  $\beta$ -T-Zellen mit  $\alpha$  $\beta$ -TZR.

Auch hier war bei den P2X7ko-Tieren nur eine minimale Expression von P2X7 und ungefähr die gleiche Expression des  $\gamma$  $\delta$ -TZR zu finden.



**Abb. 40: Expression von P2X7 auf CD8-negativen T-Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR**

Die Abbildungen zeigen die Expression von P2X7 auf CD8-negativen Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR aus Milz, Leber und intestinalem Epithel einer C57BL/6-Maus (A) oder einer P2X7ko-Maus (B). Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt, hier ist ein repräsentatives Ergebnis dargestellt.

Bei den CD8-negativen Zellen in Milz und Leber war nur ein sehr geringer Anteil der Zellen für den  $\gamma\delta$ -TZR positiv. Von diesen Zellen trugen in der Milz nur wenige P2X7 auf der Oberfläche. In der Leber war hingegen ungefähr die Hälfte der CD8-negativen Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR auch P2X7-positiv.

Im Darm trugen ungefähr ein Viertel der CD8-negativen Zellen den  $\gamma\delta$ -TZR auf der Oberfläche, diese Zellen waren dann auch P2X7-positiv.

Zusammenfassend konnten in Milz und Leber insgesamt nur wenige Zellen mit dem  $\gamma\delta$ -TZR nachgewiesen werden. In der Milz trug nur ein kleiner Anteil dieser Zellen P2X7 auf der Oberfläche. In der Leber waren ungefähr die Hälfte aller T-Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR P2X7-positiv. Im Darm fand sich eine fast 100%ige Coexpression von P2X7 und dem  $\gamma\delta$ -TZR, allerdings waren hier auch die Zellen mit dem  $\alpha\beta$ -TZR P2X7-positiv.

## 5. Diskussion

### 5.1 Gewebespezifische Expression des P2X7-Rezeptors auf Th17-Zellen und $\gamma\delta$ -TCR-T-Zellen

P2X7 ist einerseits auf bestimmten T-Zellsubpopulationen, wie NKT-Zellen oder regulatorischen T-Zellen, verstärkt ausgeprägt, andererseits zeigen bestimmte T-Zellpopulationen eine vom Gewebe abhängige P2X7-Expression. So ist P2X7 auf peripheren CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur schwach vorhanden. CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Darmmukosa sind aber fast ausnahmslos P2X7-positiv (Aswad *et al.* 2005, Hubert *et al.* 2010, Kawamura *et al.* 2006, Heiss *et al.* 2008).

Th17-Zellen und  $\gamma\delta$ T-Zellen sind T-Zellsubpopulationen, die in allen Geweben insbesondere aber in der Darmmukosa vorliegen (Stockinger *et al.* 2007, Ishikawa *et al.* 2007). Für beide Populationen gab es zu Beginn der Arbeit keine Informationen zur Expression von P2X7. Hier stellte sich die Frage, in welchem Umfang beide Populationen eine P2X7-Expression zeigen und ob diese Expression abhängig vom Gewebe ist.

Für Th17-Zellen wie auch für Th1-Zellen konnte eine unterschiedliche P2X7-Expression in den verschiedenen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Der Anteil an P2X7-positiven Zellen war im Darm hoch und in den zentralen Organen eher gering. Für P2X7 kann daher von einer gewebespezifischen Expression auf Th17-Zellen ausgegangen werden. Unsere Ergebnisse zeigen bisher auch keine Unterschiede in der Frequenz an Th17-Zellen zwischen C57BL/6 und P2X7ko-Mäusen. P2X7 spielt daher wahrscheinlich keine Rolle in der Differenzierung dieser T-Zellen.

In der Milz und Leber waren nur wenige Zellen mit einem  $\gamma\delta$ -TZR zu finden, während sie im Darm mit ca. 60% der intraepithelialen CD8 $\alpha\beta$ -T-Zellen einen großen Anteil bildeten. Auch für diese T-Zellpopulation wurde die P2X7-Expression in erste Linie durch die Lokalisation bestimmt. Die wenigen  $\gamma\delta$ -T-Zellen in Milz und Leber zeigten nur eine geringe P2X7-Expression. Im Darm waren diese Zellen zu beinahe 100% P2X7-positiv.

Insgesamt verhielten sich  $\gamma\delta$ -T-Zellen und Th17-Zellen wie konventionelle T-Zellen. Die Expression war für beide Populationen vor allem von der Gewebelokalisation abhängig. Für Treg-Zellen und NKT-Zellen, die konstitutiv P2X7-positiv sind, konnte in früheren Untersuchungen eine Rolle für P2X7 in der Induktion der Apoptose nachgewiesen werden (Hubert *et al.* 2010, Schwarz *et al.* 2009). Aufgrund des Expressionsprofils ist eine vergleichbare Funktion von P2X7 für auf Th17-Zellen und

$\gamma\delta$ -T-Zellen fraglich, gewebespezifische Regulationsmechanismen können aber nicht ausgeschlossen werden.

## **5.2 Induktion einer spezifischen T-Zellantwort in OT1-T-Zellen durch LmOVA und SL7207-OVA**

In den hier durchgeführten Experimenten wurden zwei verschiedene Infektionsmodelle benutzt. Zum einen das *Listeria monocytogenes*-Infektionsmodell, welches schon in mehreren Vorarbeiten verwendet wurde und im Labor etabliert ist. Für dieses Modell ist eine spezifische Proliferation der OT1-Zellen aufgrund einer Infektion mit LmOVA bekannt (Foulds *et al.* 2002, Kursar *et al.* 2005). Dies konnte auch in den hier durchgeführten Versuchen reproduziert werden. Bei einer Infektion mit LmOVA per os akkumulierten OT1-Zellen in Milz, Leber und im Epithel des Dünndarms der Mäuse. Bei einer intravenösen Infektion akkumulierten die OT1-Zellen vor allem in Milz und Leber. Ohne Infektion konnten in Milz und Leber nur geringe Zahlen an OT1-Zellen wiedergefunden werden. Unter diesen Bedingungen fand keine Migration der OT1-Zellen in den Dünndarm statt.

Zum anderen wurde ein weiteres Infektionsmodell eingeführt, die Infektion mit *Salmonella typhimurium* SL7207-OVA (Qimron *et al.* 2004, Seibert *et al.* 2010, Barthel *et al.* 2003). Da dieses Infektionsmodell im Gegensatz zum Listerien-Infektionsmodell im Labor noch nicht etabliert war, musste zuerst überprüft werden, ob SL7207-OVA in der Lage ist, OT1-Zellen *in vivo* zu aktivieren. Hierzu wurden CFSE-markierte OT1-Zellen intravenös in Mäuse transferiert, die mit SL7207-OVA oder mit dem Kontrollstamm SL7207-8.8 infiziert worden waren. Die Proliferation wurde anhand des Verlustes der Fluoreszenzintensität gemessen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenzintensität nur bei den OT1-Zellen deutlich abnahm, die in die mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäuse transferiert worden waren. Die OT1-Zellen in den mit SL7207-8.8 infizierten Tieren zeigten keine Änderung der Fluoreszenzintensität. Eine schwere Infektion war daher nicht ausreichend, um diese Zellen zur Proliferation zu bringen. Die Aktivierung war strikt von dem OVA-Peptid abhängig. Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass in beiden Infektionsmodellen eine spezifische Proliferation der OT1-Zellen stattfindet.

### 5.3. Abhängigkeit der T-Zellantwortstärke vom verabreichten Pathogen

Generell fällt bei einem Vergleich der beiden Infektionsmodelle auf, dass bei einer Infektion mit Listerien, unabhängig vom untersuchten Organ, eine deutlich stärkere T-Zellantwort der transferierten OT1-Zellen stattfand, als bei einer Infektion mit Salmonellen.

Nach Infektion von C57BL/6-Mäusen mit LmOVA waren in der Milz ca. 20% der isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen OT1-Zellen. In der Leber war diese Zahl sogar noch höher. Hier waren ca. die Hälfte aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen OT1-Zellen. Die Frequenzen waren bei einer Infektion mit SL7207-OVA erheblich niedriger. Hier waren nur ca. 0,3% aller CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und ca. 0,8% in der Leber OT1-Zellen. Aufgrund der Abnahme der Fluoreszenzintensität nach CFSE-Markierung der transferierten OT1-Zellen konnten aber gezeigt werden, dass auch bei einer SL7207-OVA Infektion eine Proliferation der OT1-Zellen stattgefunden hatte.

Die unterschiedliche Stärke der T-Zellantwort beider Infektionsmodelle kann verschiedene Ursachen haben. Eine Begründung liegt sicherlich in der unterschiedlichen Biologie der Bakterien. Listerien können nach der Phagozytose das Phagosom der Makrophagen mithilfe des Listeriolysin O und verschiedener Phospholipasen verlassen und in das Zytoplasma der Zelle eindringen und sich dort replizieren. Im Zytoplasma sind die Bakterien nicht mehr dem niedrigen pH-Wert und dem antibakteriellen Umfeld des Phagosoms bzw. Lysosoms ausgesetzt (Hamon *et al.* 2006, Pamer 2004, Vázquez-Boland 2001, Hahn *et al.* 2008). In diesem Zusammenhang ist auch die Modalität der Expression des Ovalbumins von Bedeutung. Der hier verwendete rekombinante Listerienstamm exprimiert Ovalbumin unter einem LLO-Promotor. Weiterhin trägt das Ovalbumin am N-Terminus zusätzlich das Leader-Peptid von LLO (Foulds *et al.* 2002, Shen *et al.* 1995). Als Konsequenz entsprechen Expression und Sekretion weitgehend der des LLO. Eine Folge davon ist, dass Ovalbumin in hohen Konzentrationen im Zytoplasma vorliegt und, wie alle zytoplasmatischen Proteine, daher einer Prozessierung und Präsentation im MHC-I-Weg zur Verfügung steht. Demzufolge können Listerien eine CD8-T-Zellantwort effektiv induzieren und sind infolgedessen sehr potente Auslöser für CD8-T-Zellantworten.

Salmonellen sind zwar auch intrazelluläre Erreger, sie zeigen aber ein völlig anderes Verhalten in der infizierten Zelle. Im Gegensatz zu Listerien bleiben Salmonellen im Phagosom. Durch das SPI-2 codierte Typ III Sekretionssystem (TTSS) sezernieren Salmonellen verschiedene Mediatoren in die infizierte Zelle und verhindern dadurch die Reifung des Phagosoms zum Lysosom. In der von der Reifung abgekoppelten Vakuole

können sich die Salmonellen dann vermehren (Galán und Wolf-Watz 2006, Patel und Galan 2005). Diese Lokalisation bedeutet aber auch, dass die Salmonellen-Proteine nicht direkt in den MHC-I-Präsentationsweg eingeschleust werden können. Auch die Lokalisation des OVA-Gens im Genom ist verschieden zu der der Listerien. In unserem rekombinanten Salmonellenstamm liegt die OVA-Peptid-Sequenz als Minigen episomal auf einem Plasmid vor. Dieses Minigen codiert nur für das Ovalbuminpeptid, das zusätzlich noch ein formyl-Methionin am N-Terminus trägt. Es sind aber keine Leadersequenzen oder Konsensussequenzen vorhanden, die eine Sekretion ermöglichen würden (Qimron *et al.* 2004). Es ist daher unklar, in welchem Umfang das OVA-Peptid überhaupt in das Zytoplasma der infizierten Zellen gelangt. Sowohl die intrazelluläre Lokalisation der Salmonellen in einer Vakuole, als auch die unklare Effizienz der Ovalbuminsekretion könnten daher für die schwache Aktivierung der OT1-Zellen verantwortlich sein. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Salmonellen die Präsentation von Proteinen aktiv unterdrücken. Hinweise hierfür gibt es sowohl für die Präsentation durch MHC-I-Moleküle, als auch für die Präsentation durch MHC-II-Moleküle (Qimron *et al.* 2004). Schließlich gibt es Anhaltspunkte für eine generelle Immunsuppression im Verlauf der Salmonelleninfektion (Cheminay *et al.* 2005, Bueno *et al.* 2009)

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in beiden Infektionsmodellen die OT1-Zellen zwar antigenspezifisch proliferieren, die Stärke der T-Zellantwort aber sehr unterschiedlich ist. Die Gründe dafür liegen wahrscheinlich in der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisation der Bakterien und in der Art der Expression des OVA-Peptids. Aber auch andere Mechanismen, wie eine aktive Unterdrückung der MHC-I-Präsentation oder auch eine generelle Immunsuppression durch die Salmonellen, wären denkbar.

#### **5.4 Gewebeabhängige Regulation der P2X7-Expression der OT1-Zellen**

In den Versuchen wurde die P2X7-Expression der endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie die der transferierten Zellen untersucht. Bei den endogenen Zellen zeigte sich in allen Versuchen ein ähnliches Bild. Nur wenige CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die aus der Milz isoliert wurden, trugen P2X7 auf der Oberfläche. Der Anteil lag um die 5%. Bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Leber konnte ein größerer Anteil an P2X7-positiven Zellen gefunden werden. Hier waren durchschnittlich 10% der CD8<sup>+</sup> T-Zellen für P2X7 positiv. Auch in den MLN war nur ein geringer Anteil der CD8<sup>+</sup> T-Zellen P2X7-positiv. Im Dünndarm zeigte sich

ein anderes Bild, hier trugen bis zu 95% der isolierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen P2X7 auf der Oberfläche. Im Colon und Coecum war der Anteil an P2X7-positiven Zellen mit ca. 40% immer noch hoch, aber deutlich niedriger als im Dünndarm. Diese Resultate bestätigen und ergänzen die Ergebnissen aus vorherigen Untersuchungen (Heiss *et al.* 2008).

Die Darmmukosa enthält nicht nur eine große Zahl verschiedener, nicht-konventioneller T-Zellen. Auch die konventionellen CD8<sup>+</sup> T-Zellen des Darms zeigen Besonderheiten in ihrem Oberflächenphänotyp. Dies lässt sich z.T. auf die primäre Aktivierung („Priming“) im darmassoziierten Lymphgeweben zurückführen. Dendritische Zellen der Darmmukosa sind in der Lage Vitamin A zu Retinolsäure zu oxidieren. Die primäre Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Gegenwart von Retinolsäure führt zur Induktion von CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$  in diesen Zellen (Iwata *et al.* 2009). Sowohl CCR9 als auch  $\alpha 4\beta 7$  sind für die Migration der T-Zellen in die Dünndarmmukosa entscheidend (Johansson-Lindbom und Agace 2007, Gofu *et al.* 2009, Mora *et al.* 2003, Stenstad *et al.* 2006).

Heiss *et al.* konnten zeigen, dass P2X7, ähnlich wie CCR9 und  $\alpha 4\beta 7$ , durch Retinolsäure induziert werden kann (Heiss *et al.* 2008). Die Expression von P2X7 kann daher auch als Merkmal für eine Aktivierung in einem darmassoziierten Lymphgewebe verwendet werden. Diese Annahme wird zusätzlich durch das hohe Expressionslevel von P2X7 auf Zellen der Darmmukosa bekräftigt. Unklar ist das Vorhandensein von P2X7-positiven konventionellen T-Zellen in anderen Geweben. Es könnte sich um im Darm aktivierte Zellen handeln, aber auch darmunabhängige Mechanismen der P2X7 Induktion sind möglich.

Bei einer intravenösen Infektion mit Listerien zeigten die transferierten OT1-Zellen in Milz, Leber und den MLN hinsichtlich ihrer P2X7-Expression ein den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen vergleichbares Profil. Das P2X7-Expressionniveau dieser Zellen ist dem der endogenen Zellen sehr ähnlich und unabhängig vom Hintergrund des Rezipienten (P2X7<sup>hi</sup> oder <sup>lo</sup>). Im Darm zeigte sich ein anderes Bild. Die P2X7-Expression der OT1-Zellen, die in den Darm eingewandert waren, war deutlich geringer als die Expression der intestinalen CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dies lässt sich wahrscheinlich darauf zurückführen, dass die Infektion bei einer intravenösen Gabe der Bakterien weitgehend auf Milz und Leber beschränkt ist. Als Folge davon findet wahrscheinlich auch das Priming der T-Zellen in der Milz und in drainierenden Lymphknoten der Leber und nicht im darmassoziierten Lymphgeweben statt. Infolgedessen erwerben die T-Zellen auch keinen für den Darm typischen Oberflächenphänotyp. Diese würde auch die geringe Frequenz an OT1-Zellen in der Darmmukosa nach einer intravenösen Gabe von Listerien erklären.

Auch nach einer intravenösen Infektion mit Salmonellen zeigen die OT1-Zellen nur ein niedriges Expressionsniveau an P2X7. Im Darm war keine Analyse möglich, da die Frequenz der OT1-Zellen an oder unter der Nachweisgrenze des verwendeten Messsystems lag. Da nach einer Salmonellen-Infektion aber generell deutlich niedrigere T-Zellantworten als nach einer Listerien-Infektion zu beobachten waren, war die sehr niedrige Frequenz an OT1-Zellen in der Darmmukosa nicht unerwartet.

Wurden die Mäuse oral mit Listerien infiziert, konnten höhere Frequenzen an OT1-Zellen in der Darmmukosa nachgewiesen werden. Diese OT1-Zellen zeigten auch eine deutliche P2X7-Expression. Über 50% der Zellen trugen P2X7 auf der Oberfläche. Der Phänotyp der OT1-Zellen passt zu einem Priming in einem darmassoziierten Gewebe, wie es bei einer oralen Listerien-Infektion zu erwarten war. In Milz und Leber waren die OT1-Zellen überwiegend P2X7-negativ. Da Listerien auch nach oraler Gabe relativ schnell zu einer generalisierten Infektion führen (Hamon *et al.* 2006, Pamer 2004, Vázquez-Boland 2001), ist es durchaus möglich, dass dann OT1-Zellen in zentralen Lymphgeweben primär aktiviert werden und daher einen P2X7-negativen Phänotyp erwerben.

Interessant ist das Ergebnis der oralen Salmonellen-Infektion. Nach oraler Infektion finden sich OT1-Zellen in Milz und Leber, nun aber auch in der Darmmukosa. Erstaunlicherweise zeigen die OT1-Zellen, unabhängig vom Ort der Isolation, eine relativ hohe P2X7-Expression. Unter der Annahme, dass P2X7 ein Hinweis für eine primäre Aktivierung im darmassoziierten Lymphgewebe ist, würde dieses bedeuten, dass die T-Zellantwort hier fast ausschließlich im Darm generiert wurde. Das ist nicht unwahrscheinlich, da die attenuierten Salmonellen, die für die vorliegende Studie verwendet wurden, nur in sehr geringem Umfang in tiefere Gewebe eindringen konnten und nur marginale Bakterientiter in Milz und Leber nachweisbar waren.

## **5.5 Akkumulation der transferierten OT1-Zellen am Ort der Entzündung**

In den hier durchgeführten Experimenten war die Verteilung der OT1-Zellen im Körper der Maus von der Infektionsroute abhängig und unterschied sich auch zwischen den verwendeten Bakterien. Wie bereits diskutiert, fanden sich nach einer intravenösen Salmonellen- und Listerien-Infektion die höchsten Frequenzen an OT1-Zellen in Milz und Leber. In der Darmmukosa waren in bei einer intravenösen Infektionen nur wenige Zellen nachweisbar.

Nach einer oralen Listerieninfektion zeigten sich hohe T-Zellfrequenzen in Milz und Leber, nun fand sich aber auch eine deutliche Anzahl an OT1-Zellen im Epithel des Dünndarms, was aufgrund der oralen Gabe der Bakterien mit anschließender Darminfektion und relativ rascher Generalisierung der Infektion erklärt werden kann.

Bei einer oralen Infektion mit SL7207-OVA akkumulierten die proliferierten, CFSE-negativen OT1-Zellen vor allem im Epithel und in der Lamina propria des Colons und des Coecums. Überraschenderweise waren kaum transferierte Zellen im Dünndarm nachzuweisen. Auch in den zentralen Organen waren nur relativ wenige, kaum proliferierte OT1-Zellen zu finden. Die Verteilung der aktivierten OT1-Zellen entsprach weitgehend der der attenuierten Salmonellen im Streptomycin-Infektionsmodell. Es konnte gezeigt werden, dass die *aroA*<sup>-</sup> Salmonellen in diesem Modell vorwiegend im Coecum und Colon akkumulieren und hier eine relativ hohe Dichte erreichen (> 10<sup>9</sup>) (Barthel *et al.* 2003, unveröffentlichte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe). In allen anderen Geweben, darunter auch im Dünndarm, waren die Bakterienkonzentrationen deutlich niedriger. Die hohe Bakterienlast in Coecum und Colon ist zudem mit einer schweren Entzündung in diesen Geweben verbunden (Hapfelmeier und Hardt 2005).

Die Mechanismen, die unter homöostatischen Bedingungen für die Migration von T-Zellen in den Dickdarm verantwortlich sind, sind unklar. Ähnlich wie für den Dünndarm scheint das  $\alpha 4\beta 7$ -Integrin eine Rolle zu spielen (Agace 2008). Die beteiligten Chemokin/Chemokin-Rezeptor-Systeme sind aber noch unbekannt. Aufgrund der schweren Entzündungsreaktion muss aber auch davon ausgegangen werden, dass inflammatorische Migrationsmechanismen wesentlich an der Akkumulation der transferierten OT1-Zellen beteiligt sind. Hier könnten z.B. die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 eine Rolle spielen, die im Rahmen von Listerien-Infektionen auf spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen hochreguliert werden (unveröffentlichte Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe). Die Liganden dieser Rezeptoren (CCL3, CCL4 und CCL5 bzw. CXCL9, CXCL10 und CXCL11) werden normalerweise im Verlauf bakterieller Infektionen in den infizierten Geweben produziert und könnten für die Migration verantwortlich sein (Luster *et al.* 2005, Rot und von Andrian 2004). Dieses Infektionsmodell bietet daher auch die Möglichkeit zu untersuchen, welche der genannten Mechanismen die Migration von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in entzündetes Dickdarmgewebe regulieren.

Eine weitere, erstaunliche Beobachtung in diesem Modell ist die komplette Abwesenheit der OT1-Zellen in der Dünndarmmukosa. Die generell erhöhte P2X7-Expression nach oraler Infektion deutet auf eine erhöhte Expression von  $\alpha 4\beta 7$  und CCR9 hin. Weiterhin finden sich Salmonellen im Dünndarm, wenngleich auch in niedrigeren Konzentrationen als im Coecum und Colon (Barthel *et al.* 2003,

unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppe). Sowohl unter homöostatischen, als auch unter inflammatorischen Gesichtspunkten sollten OT1-Zellen ebenfalls im Dünndarm nachweisbar sein. Eine mögliche Erklärung ist die generell niedrige Stärke der OT1-Antwort im Salmonellenmodell. Die schwere Entzündung im Colon könnte zu einer so dominanten Rekrutierung der OT1-Zellen in dieses Gewebe führen, dass eine eventuell vorhandene T-Zellakkumulation im Dünndarm unter der Nachweisgrenze bleibt.

## **5.6 Die Rolle des P2X7-Rezeptor bei der Regulation der T-Zellantwort**

Um die Funktion des P2X7-Rezeptors auf T-Zellen näher zu untersuchen, wurden wt OT1-Zellen und OT1-Zellen aus P2X7ko Tieren in infizierte Mäuse transferiert. Dieser Ansatz erlaubt den direkten Vergleich der T-Zellantwort der beiden Zelllinien im identischen Umfeld und ist daher weitgehend unabhängig von Schwankungen im Infektionsverlauf zwischen verschiedenen Versuchstieren. Infolgedessen können auch geringe Unterschiede in der T-Zellantwort zuverlässig nachgewiesen werden. In diesen Experimenten zeigte sich, dass sich wt OT1 und OT1×P2X7ko Zellen in beiden verwendeten Infektionsmodellen (Listerien, Salmonellen) gleich verhielten. Das Ergebnis bestätigte sich in jedem untersuchten Gewebe und war außerdem unabhängig von der Infektionsroute. Dies bedeutet, dass in den hier verwendeten Modellen P2X7 keinen Einfluss auf die Induktion und den Verlauf der CD8-T-Zellantwort hatte.

In einem parallelen Ansatz wurden wt OT1-Zellen in infizierte wt und P2X7ko Tiere übertragen. Dieser Versuchsaufbau erlaubt die Analyse der Bedeutung von P2X7 auf Zellen im immunologischen Umfeld der T-Zellantwort, unabhängig von der Expression von P2X7 auf den reagierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Dies wären z.B. Zellen, die an der Antigenpräsentation beteiligt sind, aber auch T-Helferzellen und Treg-Zellen, die z.T. eine hohe P2X7-Expression zeigen (Aswad *et al.* 2005). Auch die P2X7-Expression auf Zellen, die nicht direkt an der T-Zellaktivierung beteiligt sind, könnte den Verlauf der Immunantwort beeinflussen.

Bei intravenöser LmOVA Infektion sowie bei oraler SL7207-OVA Infektion ließ sich feststellen, dass die wt OT1-Zellen in wt und P2X7ko-Mäusen ungefähr gleich stark proliferierten und in den untersuchten Geweben ähnlich akkumulierten. Nur bei der oralen Infektion mit LmOVA zeigten sich in einem Teil der Experimente Unterschiede in

der Akkumulation der OT1-Zellen im Dünndarm. Hierbei waren in den P2X7ko-Mäusen weniger OT1-Zellen zu finden als in den wt Tieren. Leider konnte dieses Ergebnis nicht in allen Experimenten zufriedenstellend reproduziert werden. Daher ist dieses Ergebnis auch nur unter Vorbehalt zu werten. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in diesem Versuchsansatz ebenfalls keine Bedeutung von P2X7 für die CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort sicher nachgewiesen werden konnte.

Eine zentrale Hypothese dieser Arbeit war, dass der P2X7-Rezeptor eine Rolle in der Regulation der T-Zellantwort spielt. Diese Hypothese basiert auf Analysen der endogenen T-Zellantwort von P2X7ko-Mäusen im Verlauf einer Listerieninfektion (Heiss *et al.* 2008). In diesen Experimenten war eine verstärkte T-Zellantwort in der Darmmukosa von P2X7ko Tieren nachweisbar. Dieses Ergebnis passt zum hohen Expressionslevel von P2X7 auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen der Darmmukosa und zu der erhöhten Sensitivität dieser Zellen gegenüber extrazellulären Nukleotiden. Gegenüber den relativ resistenten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus Milz und Lymphknoten reagierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Darmmukosa mit einer hohen Apoptoserate auf extrazelluläre Nukleotide. Dies könnte einen Proliferations- oder Überlebensvorteil von P2X7-defizienten Zellen in entzündetem Gewebe zur Folge haben. Da aber P2X7 nicht nur auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sondern auch auf anderen T-Zellen, sowie auf Makrophagen und anderen professionellen antigenpräsentierenden Zellen vorkommt und hier eine wichtige Rolle spielt, könnte auch eine P2X7-Funktion auf diesen Zellen für die veränderte CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort verantwortlich sein.

In den hier durchgeführten Versuchen konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden. Die An- bzw. Abwesenheit des P2X7-Rezeptors hatte keinen Einfluss auf die Akkumulation und Proliferation der transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Eine Erklärung bieten möglicherweise die verschiedenen Versuchsansätze. Ein wichtiger Unterschied liegt in der Verwendung eines Transfermodells gegenüber der Analyse der endogenen Antwort. Im Transfermodell erfolgt die Analyse der T-Zellantwort nach 4 Tagen, die endogene Antwort wird nach 9-10 Tagen analysiert. Durch den längeren Infektionszeitraum könnten geringe Unterschiede in der Proliferations- oder Apoptoserate deutlicher hervortreten. Ein weiterer wichtiger Unterschied ist sicher auch die Anzahl der reagierenden Zellen (Precursor-Frequenz). Durch den Transfer von T-Zellrezeptor-transgenen OT1-T-Zellen stehen den injizierten Listerien 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> ovalbuminspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegenüber. Bei der endogenen T-Zellantwort sind wahrscheinlich deutlich weniger spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen vorhanden. Eine grobe Abschätzung würde bei einer antigen-spezifischen Zelle in 10<sup>5</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen liegen und bei etwa 20-50 × 10<sup>6</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Maus und damit eine Precursor-Frequenz von 200-500 spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ergeben (Jenkins *et al.* 2010, Smith

*et al.* 2000). Selbst in dieser groben Abschätzung wird der extreme Unterschied in der Precursor-Frequenz deutlich, und es ist wahrscheinlich, dass dieser Unterschied auch deutliche Auswirkungen auf die T-Zellaktivierung und den Verlauf der T-Zellantwort haben kann.

Letztendlich sind weitere Experimente notwendig, um die unterschiedlichen Ergebnisse im Listerienmodell zu erklären. Für die Experimente im Salmonellenmodell liegen bisher nur Ergebnisse aus dem T-Zelltransferexperimenten vor. Hier wäre es sicher aufschlussreich, die endogene T-Zellantwort genauer zu charakterisieren. Schließlich beschränken sich die Analysen dieser Arbeit auf die Proliferation und Gewebeakkumulation von T-Zellen. P2X7 könnte aber auch andere Aspekte der T-Zellantwort, etwa das Zytokinprofil oder die Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, beeinflussen. Auch hier wären detaillierte Analysen sinnvoll.

## 6. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt Ergebnisse zur CD8-T-Zellantwort in bakteriellen Infektionsexperimenten in der Maus. Der Schwerpunkt der Analysen liegt in der Expression und der Funktion des Purinrezeptors P2X7.

Für verschiedene T-Zellsubpopulationen, insbesondere für CD8<sup>+</sup> T-Zellen,  $\gamma\delta$ -T-Zellen und CD4<sup>+</sup> Th17-Zellen kann eine vom Gewebe abhängige Expression gezeigt werden. Diese Zellen weisen vor allem in der Darmmukosa ein hohes P2X7-Expressionslevel auf. In anderen Geweben ist nur eine geringe Anzahl dieser T-Zellen P2X7-positiv.

Nach einer oralen Infektion mit Listerien wird eine starke Akkumulation von Bakterien-spezifischen T-Zellen vor allem in der Darmmukosa, aber auch in Milz und Leber beobachtet. Auch hier zeigt sich eine deutliche P2X7-Expression auf T-Zellen der Darmmukosa, nicht aber auf den Zellen aus Milz und Leber. Im Gegensatz zur oralen Listerieninfektion führt die orale Infektion mit Salmonellen zu einer geringen Akkumulation spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Milz und Leber. In der Darmmukosa werden proliferierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden, erstaunlicherweise konzentrieren sich diese T-Zellen aber auf die Mukosa von Coecum und Colon. In der Dünndarmmukosa sind dagegen fast keine spezifischen T-Zellen nachweisbar. Auch nach der oralen Salmonelleninfektion, nicht aber nach einer systemischen Infektion, zeigen die spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine deutliche Oberflächenexpression von P2X7.

Die hohe P2X7-Expression von T-Zellen in der Darmmukosa legt eine besondere Funktion von P2X7 in diesem lokalen Umfeld nahe. Diese Hypothese konnte aber nicht bestätigt werden. In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich, unabhängig von der Infektionsroute und dem verwendeten Pathogen, dass die An- oder Abwesenheit des P2X7-Rezeptors auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie auf den Zellen im lokalen Umfeld keinen Einfluss auf die Induktion und den Verlauf der CD8-T-Zellantwort hat.

## 7. Summary

This doctoral thesis presents results of the analysis of the T-cell responses in bacterial mouse infection models. The main focus of the study is the expression profile as well as the function of the purinoreceptor P2X7 for different T cell subsets.

For a variety of T-cell subpopulations, particularly for CD8<sup>+</sup> T-cells,  $\delta\gamma$ -T-cells and CD4<sup>+</sup> Th17-cells, a tissue-dependent expression of P2X7 can be demonstrated. Especially in the intestinal mucosa, T-cells of these subtypes are characterized by high P2X7-Expression level whereas in other tissues, only a small fraction of these cells is P2X7-positive.

After oral infection with *Listeria monocytogenes*, we observe a strong accumulation of listeria-specific T-cells in the intestinal mucosa as well as in spleen and liver. T-cells isolated from the intestinal mucosa show significant P2X7 expression. In contrast, T-cells from spleen and liver reveal only a low expression level. Compared to oral *L. monocytogenes* infection, oral *Salmonella typhimurium* infection results only in a limited accumulation of specific CD8<sup>+</sup> T-cells in spleen and liver. Proliferating specific CD8<sup>+</sup> T-cells can be found in the intestinal mucosa. Surprisingly, these cells are mainly located in the mucosa of cecum and colon. In contrast, hardly any specific CD8<sup>+</sup> T-cells are detected in the small intestine. After oral Salmonella infection, but not after systemic infection, specific CD8<sup>+</sup> T-cells show a significant surface expression of P2X7.

The high P2X7 expression of T-cells in intestinal mucosa suggests a specific function for P2X7 in this environment. However, this hypothesis could not be confirmed. Studies with P2X7 deficient mice reveal that the presence or absence of the P2X7 on CD8<sup>+</sup> T-cells or on cells of the local environment does not affect the induction and progression of CD8<sup>+</sup> T-cell response, regardless of the infection pathway and the type of pathogen.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ActA	Actinpolymerase
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zellen
ART	ADP-Ribosyl-Transferase
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CFDA	5-Carboxy-fluoresceindiacetat-acetoxymethylester
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
DC	Dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FSC	forward scatter
GALT	gut associated lymphoid tissue,
G-CSF	Granulozyten-Colonie stimulierender Faktor
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IL	Interleukin
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Internalin A/B	InIA/B
ko	knock out
LB	Luria Broth
LLO	Listeriolysin O
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
LmOVA	<i>Listeria monozytogenes</i> Stamm OVA
LPL	Lamina propria Lymphozyten
MALT	mucosa associated lymphoid tissue,
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MLN	mesentriale Lymphknoten
Mpl	Metalloprotease
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3

## Abkürzungsverzeichnis

---

Nramp	natural resistance-associated macrophage proteins
NRS	normales Rattenserum
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
PlcB	Phospholipase B
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
SSC	side scatter
SL	<i>Salmonella typhimurium</i>
SL7207-OVA	<i>Salmonella typhimurium</i> Stamm OVA
SL7207-8.8	<i>Salmonella typhimurium</i> Stamm 8.8
SPI-1 und 2	Salmonella pathogenicity island-1 und 2
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Treg	regulatorische T-Zellen
TSB	Tryptic Soy Broth
TTSS	Salmonellen Typ III Sekretionssysteme
T-Zellen	T-Lymphozyten
TZR	T-Zellrezeptor
wt	wildtyp

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: P2X7 auf T-Zellen.....	5
Abb. 2: P2X7 auf Makrophagen .....	6
Abb. 3: Pathogenese der <i>Listeria monocytogenes</i> Infektion.....	7
Abb. 4: Identifizierung der Lymphozyten mittels FACS-Analyse .....	23
Abb. 5: Versuchsaufbau: Transfer von wt und P2X7ko OT1-T-Zellen in LmOVA infizierten C57BL/6-Mäusen.....	25
Abb. 6: Kontrolle des OT1:OT1×P2X7ko Quotienten .....	26
Abb. 7: Akkumulation der OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in LmOVA-infizierten C57BL/6-Mäusen.....	27
Abb. 8: Nachweis der OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in nicht infizierten C57BL/6-Mäusen.....	28
Abb. 9: Expression von P2X7 auf den transferierten und endogenen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von LmOVA infizierten C57BL/6-Mäusen .....	29
Abb. 10: Versuchsaufbau: Transfer von OT1-T-Zellen in oral mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen .....	31
Abb. 11: Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und Epithel des Dünndarms in LmOVA-infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen.....	32
Abb. 12: Anzahl der OT1-Zellen an allen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in Milz, Leber und Dünndarmepithel in mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen.....	33
Abb. 13: Proliferation der OT1-Zellen.....	34
Abb. 14: Expression von P2X7 auf den transferierten und endogenen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in LmOVA-infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen.....	35

Abb. 15: Versuchsaufbau: Transfer von wt OT1-Zellen in wt- und P2X7ko-Mäuse bei intravenöser LmOVA-Infektion .....	37
Abb. 16: Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber, MLN und im Epithel des Dünndarms in einer C57BL/6-Maus und in einer P2X7ko-Maus bei i.v. LmOVA-Infektion .....	38
Abb. 17: Anteil der OT1-Zellen an allen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen in mit LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen .....	39
Abb. 18: Expression von P2X7 auf den transferierten und endogenen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen von LmOVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen .....	39
Abb. 19: Versuchsaufbau: Transfer von OT1-Zellen in SL7207-OVA und SL7207-8.8 infizierten C57BL/6-Mäusen.....	42
Abb. 20: Identifikation der OT1-Zellen.....	43
Abb. 21: Proliferation von OT1-Zellen in mit SL7207-OVA und SL7207-8.8 infizierten C57BL/6-Mäusen.....	44
Abb. 22: Versuchsaufbau: Transfer von wt und P2X7ko OT1-Zellen in SL7207-OVA infizierte C57BL/6-Mäuse.....	45
Abb. 23: Kontrolle des OT1:OT1×P2X7ko Quotienten .....	46
Abb. 24: Akkumulation und Proliferation der wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen .....	48
Abb. 25: Akkumulation und Proliferation der wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6-Mäusen .....	50
Abb. 26: Akkumulation der wt OT1- und OT1×P2X7ko-Zellen in nicht infizierten C57BL/6-Mäusen.....	51
Abb. 27: Versuchsaufbau: Transfer von wt OT1-Zellen in wt- und P2X7ko-Mäuse bei SL7207-OVA-Infektion.....	53

Abb. 28: Akkumulation der OT1-Zellen in Milz, Leber und mesenterialen Lymphknoten in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen ..... 55

Abb. 29: Proliferation der OT1-Zellen in Milz, Leber und den mesenterialen Lymphknoten in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen ..... 56

Abb. 30: Akkumulation der OT1-Zellen im Dün- und Dickdarm in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen ..... 57

Abb. 31: Proliferation der OT1-Zellen im Colon und Coecum in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen ..... 58

Abb. 32: Expression von P2X7 auf den endogenen CD8<sup>+</sup> T-Zellen und den transferierten OT1-Zellen in mit SL7207-OVA infizierten C57BL/6- und P2X7ko-Mäusen..... 59

Abb. 33: Identifikation der Th17-Zellen ..... 62

Abb. 34: Expression von P2X7 auf Th17-Zellen..... 63

Abb. 35: Identifizierung der Th1-Zellen ..... 64

Abb. 36: Expression von P2X7 auf Th1-Zellen..... 65

Abb. 37: Identifizierung der CD8 $\alpha\alpha$ -, CD8 $\alpha\beta$ - und CD8<sup>-</sup> T-Zellen..... 66

Abb. 38: Expression von P2X7 auf CD8 $\alpha\alpha$ -  $\gamma\delta$ -T-Zellen ..... 67

Abb. 39: Expression von P2X7 auf CD8 $\alpha\beta$ -T-Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR ..... 68

Abb. 40: Expression von P2X7 auf CD8-negativen T-Zellen mit  $\gamma\delta$ -TZR ..... 69

## 10. Literaturverzeichnis

- Adriouch S, Bannas P, Schwarz N, Fliegert R, Guse AH, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F (2008) ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. *FASEB J.* 22(3):861-9.
- Agace WW (2008) T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol.* 29(11):514-22.
- Aswad F, Kawamura H, Dennert G (2005) High sensitivity of CD4+CD25+ regulatory T cells to extracellular metabolites nicotinamide adenine dinucleotide and ATP: a role for P2X7 receptors. *J Immunol.* 175(5):3075-83.
- Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, Kremer M, Rohde M, Hogardt M, Pfeffer K, Rüssmann H, Hardt WD (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun.* 71(5):2839-58.
- Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW (2008) Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue. *Mucosal Immunol.* 1(1):31-7.
- Bueno SM, González PA, Kalergis AM (2009) Use of genetically modified bacteria to modulate adaptive immunity. *Curr Gene Ther.* 9(3):171-84.
- Campbell DJ, Koch MA (2011) Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol.* 11(2):119-30.
- Carter PB, Collins FM (1974) The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med.* 139(5):1189-203.
- Cheminay C, Möhlenbrink A, Hensel M (2005) Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol.* 174(5):2892-9.
- Chen L, Brosnan CF (2006) Regulation of immune response by P2X7 receptor. *Crit. Rev. Immunol.* 26: 499-513

- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli RM, Curti A, Idzko M, Panther E, Di Virgilio F (2006) The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *J. Immunol.* 006. 176:3877- 3883.
- Foulds KE, Zenewicz LA, Shedlock D, Jiang J, Troy AE, Shen H (2002) CD4 and CD8 T cells are intrinsically different in their proliferative responses. *J. Immunol.* 168: 1528-1532.
- Galán JE, Wolf-Watz H (2006) Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature.* 444(7119):567-73.
- Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, Perfettini J-L, Schlemmer F, Tasdemir E, Uhl M, Gènin P, Civas A, Ryffel B, Kanellopoulos J, Tschopp J, André F, Lidereau R, McLaughlin NM, Haynes NK, Smyth MJ, Kroemer G, Zitvogel L (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine.* 15: 1170-1178.
- Gorfu G, Rivera-Nieves J, Ley K (2009) Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med.*9(7):836-50.
- Haag F, Adriouch S, Braß A, Jung C, Möller S, Scheuplein F, Bannas P, Seman M, Koch-Nolte F (2007) Extracellular NAD and ATP: Partners in immune cell modulation. *Purinergic Signal.* 3(1-2):71-81.
- Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S (2008) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, 6. Auflage, Springer-Verlag, Berlin.
- Hamon M, Bierne H, Cossart P (2006) *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol.* 4(6):423-34.
- Harty JT, Tvinnereim AR, White DW (2000) CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol.* 18:275-308.
- Hapfelmeier S, Hardt W-D (2005) A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends in Microbiology.* 13(10): 497-503.

- Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J (2001) Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nature Immunology*. 2(11): 997-1003.
- Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-Presentation in Viral Immunity and Self-Tolerance. *Nat Rev Immunol*. 1(2):126-34.
- Heiss K, Jänner N, Mähnß B, Schumacher V, Koch-Nolte F, Haag F, Mittrücker H-W (2008) High Sensitivity of Intestinal CD8<sup>+</sup> T Cells to Nucleotides Indicates P2X7 as a Regulator for Intestinal T Cell Response. *The Journal of Immunology*. 181: 3861-3869.
- Herold G (2008) *Innere Medizin*. Gerd Herold, Köln.
- Hogquist K, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR (1994) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17–27.
- Hoiseth SK, Stocker BA (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature*. 291(5812):238-9.
- Hormaeche CE, Joysey HS, Desilva L, Izhar M, Stocker BA (1991) Immunity conferred by Aro- *Salmonella* live vaccines. *Microb Pathog*. 10(2):149-58.
- Hubert S, Rissiek B, Klages K, Huehn J, Sparwasser T, Haag F, Koch-Nolte F, Boyer O, Seman M, Adriouch S (2010) Extracellular NAD<sup>+</sup> shapes the Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell compartment through the ART2-P2X7 pathway. *J Exp Med*. 207(12):2561-8.
- Ina K, Kusugami K, Ohta M (2003) Bacterial hemorrhagic enterocolitis. *J Gastroenterol*; 38(2):111-20.
- Ishikawa H, Naito T, Iwanaga T, Takahashi-Iwanaga H, Suematsu M, Hibi T, Nanno M (2007) Curriculum vitae of intestinal intraepithelial T cells: their developmental and behavioral characteristics. *Immunol Rev*. 215:154-65.
- Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, Song SY (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity*. 21(4):527-38.

- Johansson-Lindbom B, Agace WW (2007) Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol Rev.* 215:226-42.
- Kanneganti TD, Lamkanfi M, Kim YG, Chen G, Park JH, Franchi L, Vandenabeele P, Núñez G (2007) Pannexin-1-mediated recognition of bacterial molecules activates the cryopyrin inflammasome independent of Toll-like receptor signaling. *Immunity.* 26: 433-443.
- Kawamura H, Aswad F, Minagawa M, Govindarajan S, Dennert G (2006) P2X7 Receptors Regulate NKT Cells in Autoimmune Hepatitis. *The Journal of Immunology.* 176: 2152-2160.
- Kolls JK, Khader SA (2010) The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21(6):443-8.
- Kunisawa J, Takahashi I, Kiyono H (2007) Intraepithelial lymphocytes: their shared and divergent immunological behaviours in the small and large intestine. *Immunological Reviews* 215: 136-153.
- Kursar M, Bonhagen K, Köhler A, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrücker HW (2002) Organ-specific CD4+ T cell response during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.* 168(12):6382-7.
- Kursar M, Bonhagen K, Köhler A, Kamradt T, Kaufmann SH, Mittrücker HW (2004) Antigen-specific CD8+ T cell responses in intestinal tissues during murine listeriosis. *Microbes Infect.* 6(1):8-16
- Kursar M, Höpken UE, Koch M, Köhler A, Lipp M, Kaufmann SH, Mittrücker HW (2005) Differential requirements for the chemokine receptor CCR7 in T cell activation during *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med.* 201(9):1447-57.
- Lefrançois L, Puddington L (2006) Intestinal and pulmonary mucosal T cells: local heroes fight to maintain the status quo. *Annu Rev Immunol.* 24:681-704.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH (2005) Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol.* 6(12):1182-90.

- Miller CP, Bohnhoff M (1963) Changes in the mouse's enteric microflora associated with enhanced susceptibility to Salmonella infection following Streptomycin treatment. *J Infect Dis.* 113:59-66
- Mittrücker H-W, Kaufmann SH (2000) Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *J. Leukoc. Biol.* 67: 457-463.
- Mittrücker HW, Köhler A, Kaufmann SH (2000a) Substantial in vivo proliferation of CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes during secondary Listeria monocytogenes infection. *Eur J Immunol.* 30(4):1053-9.
- Mittrücker HW, Raupach B, Köhler A, Kaufmann SH (2000b) Cutting edge: role of B lymphocytes in protective immunity against Salmonella typhimurium infection. *J Immunol.* 164(4):1648-52.
- Mittrücker H-W, Köhler A, Kaufmann SH (2002) Characterization of the murine T-lymphocyte response to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 70: 199-203.
- Mittrücker HW, Steinhoff U, Köhler A, Krause M, Lazar D, Mex P, Miekley D, Kaufmann SHE (2007) Poor correlation between BCG vaccination-induced T cell responses and protection against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(30):12434-9.
- Mora JR, Bono MR, Manjunath N, Weninger W, Cavanagh LL, Roseblatt M, Von Andrian UH (2003) Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature.* 424(6944):88-93.
- Mowat AM, Viney JL (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev.* 156:145-66.
- O'Garra A, Robinson D (2004) Development and function of T helper 1 cells. *Adv Immunol.* 83:133-62.
- O'Quinn DB, Palmer MT, Lee YK, Weaver CT (2008) Emergence of the Th17 pathway and its role in host defense. *Adv Immunol.* 99:115-63.

- Patel JC, Galan JE (2005) Manipulation of the host actin cytoskeleton by Salmonella-- all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* 8: 10-15.
- Pamer EG (2004) Immune responses to *listeria monocytogenes*. *Nature*. 4:812-823.
- Paul WE, Zhu J (2010) How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified? *Nat Rev Immunol*. 10(4):225-35.
- Pepper M, Jenkins MK (2011) Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. *Nat Immunol*. 131(6):467-71.
- Qimron U, Madar N, Mittrücker HW, Zilka A, Yosef I, Bloushtain N, Kaufmann SH, Rosenshine I, Apte RN, Porgador A (2004) Identification of Salmonella typhimurium genes responsible for interference with peptide presentation on MHC class I molecules: Deltayej Salmonella mutants induce superior CD8+ T-cell responses. *Cell Microbiol*. 6(11):1057-70.
- Reinicke AT, Omilusik KD, Basha G, Jefferies WA (2009) Dendritic Cell Cross-Priming Is Essential for Immune Response to *Listeria monocytogenes*. *PLoS One*. 4(10): e7210.
- Rot A, von Andrian UH (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokinese grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*. 22:891-928.
- Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Krebs C, Bannas P, Rissiek B, Seman M, Haag F, Koch-Nolte F (2009) NAD<sup>+</sup> and ATP released from injured cells induce P2X7-dependent shedding of CD62L and externalization of phosphatidylserine by murine T cells. *J Immunol*. 182(5):2898-908.
- Schwarz N, Fliegert R, Adriouch S, Seman M, Guse AH, Haag F, Koch-Nolte F (2009) Activation of the P2X7 ion channel by soluble and covalently bound ligands. *Purinergic Signal*. 5(2):139-49.
- Seibert SA, Mex P, Köhler A, Kaufmann SH, Mittrücker HW (2010) TLR2-, TLR4- and Myd88-independent acquired humoral and cellular immunity against Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Immunol Lett*. 4;127(2):126-34.

- Seman M, Adriouch S, Scheuplein F, Krebs C, Freese D, Glowacki G, Deterre P, Haag F, Koch-Nolte F (2003) NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. *Immunity*. 19(4):571-82.
- Shen H, Slifka MK, Matloubian M, Jensen ER, Ahmed R, Miller JF (1995) Recombinant *Listeria monocytogenes* as a live vaccine vehicle for the induction of protective anti-viral cell-mediated immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(9):3987-91
- Smith AL, Wikstrom ME, Fazekas de St Groth B (2000) Visualizing T cell competition for peptide/MHC complexes: a specific mechanism to minimize the effect of precursor frequency. *Immunity*. 13(6):783-94.
- Solle M, Labasi J, Perregaux DG, Stam E, Petrushova N, Koller BH, Griffiths RJ, Gabel CA (2001) Altered cytokine production in mice lacking P2X<sub>7</sub> receptors. *J. Biol. Chem*. 276: 125-132.
- Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, Svensson M, Marsal J, Mack M, Picarella D, Soler D, Marquez G, Briskin M, Agace WW (2006) Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4<sup>+</sup> T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood*. 107(9):3447-54.
- Stockinger B, Veldhoen M, Martin B (2007) Th17 T cells: linking innate and adaptive immunity. *Semin Immunol*. 19(6):353-61.
- Valdez Y, Grassl GA, Guttman JA, Coburn B, Gros P, Vallance BA, Finlay BB (2009) Nramp1 drives an accelerated inflammatory response during *Salmonella*-induced colitis in mice. *Cell Microbiol*. 11(2):351-62.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*. 14(3):584-640.
- van Wijk F, Cheroutre H (2009) Intestinal T cells: facing the mucosal immune dilemma with synergy and diversity. *Semin Immunol*. 21(3):130-8.

Vidric M, Bladt AT, Dianzani U, Watts TH (2006) Role for inducible costimulator in control of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *Infect Immun.* 74(2):1050-61.

Zhu J, Yamane H, Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol.* 28:445-89.

## 11. Danksagung

Abschließend möchte ich allen Menschen danken, die mich in der Zeit meiner Doktorarbeit so großartig unterstützt und mir so viel geholfen haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Willi Mittrücker, der immer Zeit für mich und meine Probleme hatte. Ohne ihn hätte ich niemals Licht am Ende der Doktorarbeit gesehen. Vielen Dank für das stets offene Ohr, die großartige Betreuung und Unterstützung sowie das engagierte Korrekturlesen.

Ein großer Dank geht auch an mein Laborteam, insbesondere an Valéa, die mir mit großer Geduld das Pipettieren und das wissenschaftliche Arbeiten beigebracht hat. Auch an Julia, Kira, Friederike, Michael, Matthias, Björn und alle anderen aus dem Institut geht mein herzlicher Dank für die Hilfe und die schöne Zeit. Danke für die hilfreichen Anregungen, guten Ratschläge und netten Kaffeerunden. Ohne euch hätte es nur halb so viel Spaß gemacht.

Außerdem möchte ich meinem Vater danken, ohne Ihn wären mein Studium und meine Doktorarbeit nie möglich gewesen. Ein großer Dank geht auch an Anna, Jenny und Nina sowie meine Schwestern Agi und Maica, die mich immer wieder motiviert und stets wieder aufgebaut haben. Tausend Dank auch an Dieter für das Korrekturlesen und das Einfügen der ganzen vergessenen Kommata.

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

.....

Name	Merete Charlotte Christine Bock
Anschrift	Friedrich-Ludwig-Jahn-Str. 17 21073 Hamburg Tel.: 040/55564205 oder 0172/2469732 E-Mail: Merete_Bock@gmx.de
Geburtsdatum	14.04.1986
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig

### Schulbildung

.....

1992 - 1996	Grundschule Maschen
1996 - 1998	Orientierungsstufe Maschen
1998 - 2005	Gymnasium Meckelfeld Abschluss: Abitur (1,8)

### Studium

.....

Oktober 2005	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
Frühjahr 2006	Wahlfach Molekulare Medizin (1,0)
August 2007	Physikum (3,0)
Oktober 2007	Beginn des klinischen Abschnittes des Medizinstudiums
August 2010	Beginn des Praktischen Jahrs

### Praktische Ausbildung

.....

August – September 2006	Krankenpflegedienst Krankenhaus Mariahilf Innere Abteilung
März 2007	Krankenpflegedienst Universitätsklinikum Münster Dermatologie
August 2008	Famulatur Evang. Krankenhaus Johannisstift Münster Innere Abteilung
April 2009	Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus
September 2009	Famulatur Universitätsklinikum Eppendorf Klinische Immunologie

## Lebenslauf

---

Mai 2010	Famulatur Asklepios Klinik Harburg Anästhesie
Juli 2010	Famulatur Marienkrankenhaus Zentrale Notaufnahme
August 2010	Beginn des Praktischen Jahres

### **Promotion**

.....

Seit April 2009

„Die Rolle des Purinrezeptors P2X7 bei  
der Regulation von T-Zellen“ am Institut  
für Immunologie an der Universitätsklinik  
Hamburg-Eppendorf

Hamburg, den 09.06.2011

### **13. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: ..... Hamburg, den