

**UNIVERSITÄTSKLINIKUM
HAMBURG-EPPENDORF**

Abteilung für Pathologie, Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin

Prof. Dr. Paul Racz

**Das nasal assoziierte lymphatische Gewebe
im *Macaca mulatta***

Dissertation

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

vorgelegt von:

Jill Knips
aus Hamburg

2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 8.4.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. P. Racz

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. R.E. Friedrich

Inhaltsverzeichnis

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

2. Einleitung

- 2.1. Das nasal assoziierte lymphatische Gewebe, NALT
- 2.2. Das human immunodeficiency Virus, HIV
- 2.3. Die Rolle des NALT bei der Immunisierung gegen HIV/SIV

3. Material und Methoden

3.1. Material

- 3.1.1. Die Rhesusaffen

3.2. Methoden

- 3.2.1. Die Gewebeentnahme
- 3.2.2. Die histologischen Färbungen
 - 3.2.2.1 Die Entparaffinierung
 - 3.2.2.2. Hämatoxylin-Eosin (HE)
 - 3.2.2.3. Giemsa
- 3.2.3. Die Immunhistochemie
 - 3.2.3.1. Das Prinzip
 - 3.2.3.2. Der Ablauf der Immunhistochemie
 - 3.2.3.2.1. Die Antigendemaskierung
 - 3.2.3.2.2. Die Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)- Methode
 - 3.2.3.2.3. Die Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Methode
 - 3.2.3.2.4. Die Streptavidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode
 - 3.2.4. Die In-situ-Hybridisierung, ISH
 - 3.2.4.1. Das Prinzip
 - 3.2.4.2. Der Ablauf
 - 3.2.5. Die Auswertung der Präparate

4. Ergebnisse

4.1. Histologie und Immunhistochemie

4.1.1. Die histologische und immunhistochemische Charakterisierung des NALT bei unbehandelten Tieren

4.1.2. Mikroskopische Veränderungen im NALT in den verschiedenen Behandlungsgruppen

4.2. Die Veränderungen in der CD4 und CD8 Zellzahl im NALT, der Tonsilla pharyngealis und der Lamina propia

4.3. Die In situ Hybridisierung

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Abkürzungsverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

9. Danksagung

10. Lebenslauf

11. Eidesstattliche Erklärung

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

In der Erforschung der Pathogenese vieler Infektionskrankheiten aber auch in der Vakzineforschung steht der Schutz der Schleimhäute oft im Fokus des Interesses. Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass das in unserem Körper von Schleimhaut bedeckte Areal etwa 200mal größer ist als das welches von der Haut bedeckt wird. (Brandzaeg et al. 2009) Daher sind Kenntnisse über die Mechanismen, die diese Oberfläche schützen von großer Bedeutung.

Die nasale Immunisierung wird von vielen Vakzineforschern in Tierexperimenten angewandt. Die Bedeutung der nasalen Impfung besteht darin, dass durch ein nasales Aerosol das Immunsystem beeinflusst werden kann ohne das Risiken einhergehen, die mit einer perkutanen oder einer intramuskulären Injektion verbunden sind. Diese Aspekte sind besonders in Entwicklungsländern wichtig, in denen die notwendigen hygienischen Voraussetzungen nicht immer eingehalten werden können. Ein weiterer Vorteil der nasal verabreichten Immunisierung gegenüber der oralen Impfung ist, dass die inkorporierten Antigene, nicht durch Verdauungssekrete verändert oder durch den sauren pH-Wert des Magens denaturiert werden.

Das Immunsystem der Schleimhäute in höheren Säugetieren, ebenso wie beim Menschen, besitzt zwei anatomisch und funktionell unterschiedliche Komponenten: es besteht aus organisiertem, Schleimhaut-assoziierten lymphatischem Gewebe (MALT, abgekürzt aus der englischen Terminologie: mucosa-associated lymphoid tissue) sowie immunologisch aktiven Zellen verteilt in der Lamina propria. Das MALT nimmt Antigene auf, bearbeitet sie und danach wird das Antigen immunkompetenten Zellen präsentiert. Mit anderen Worten, hier wird eine Immunantwort induziert (*inductive site* des mukosalen Immunsystems). Die aktivierten B- und T-Zellen sowie die Gedächtniszellen verlassen die *inductive site* durch die Lymphbahnen, gelangen in das Blut und werden in die Lamina propria der Schleimhäute dirigiert wo sie durch ihre spezifische Funktion (zellgebundene Immunität, Zytotoxizität, Produktion von antigen-spezifischen Antikörpern) die Schleimhäute schützen (*effector site* des mukosalen Immunsystems). (McGhee et al. 1999)

Im Bereich des Verdauungstraktes aller Säugetieren einschließlich der Primaten und des Menschen stellen die Peyer'schen Plaques (PP) und die solitären Follikeln die *inductive site* des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT) dar. Im Gegensatz zu den PP, die bereits während der Embryogenese gebildet werden (Pabst und Tschernig 2010) entwickeln sich die solitären Follikel nur nach Stimulation durch Antigene bzw. entzündliche Prozesse. Das Ausmaß des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebe (BALT) scheint auch mit der vorangegangenen Antigenbelastung zusammen zu hängen (Bienenstock et al. 1999)

Die strukturelle und funktionelle Reaktionen der PP und des BALT wurden sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen untersucht. (Kelsall und Stroder 1999, McIntyre und Strober 1999, Bienenstock et al. 1999, Brandzaeg 2009) . Dem gegenüber sind unsere Kenntnisse bezüglich des nasal-assoziierten lymphatischen Gewebes (NALT) lückenhaft. Ob lymphatische Strukturen in der Nasenschleimhaut existieren, die ähnliche Funktionen erfüllen wie die PP oder das BALT, ist Gegenstand wissenschaftlicher Diskussionen.

Bei Nagetieren ist NALT gut bekannt. Es handelt sich um ein paariges, organisiertes lymphatisches Organ welches unterhalb des harten und des weichen Gaumens in der Nasenschleimhaut nachgewiesen werden kann. (Sminia und Kraal 1999, Kuper et al. 1992). Es kann als Eintrittspforte für Infektionen dienen, es lassen sich hier aber auch gezielte Immunantworten beobachten.

Viele Autoren gehen davon aus, dass es sich bei dem NALT der Nagetiere um das Äquivalent des Waldeyer'schen Rachenrings beim Menschen handelt. Beim Menschen werden die Mandeln und die nasopharyngealen Tonsillen oft als NALT beschrieben (McGhee et al. 1999). Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass bei Kindern unter 2 Jahren, die am plötzlichen Kindstod gestorben sind, im Bereich der Nasenmuscheln ein organisiertes lymphatisches Gewebe nachzuweisen war, das strukturell große Ähnlichkeiten mit den PP aufweist (Debertin et al. 2003). Beim Primaten ist jedoch noch nicht gezielt nach NALT gesucht worden.

Die Beschreibung des NALT bei Kindern führte uns zu der *Arbeitshypothese*, dass auch bei Primaten solche Strukturen vorhanden sein könnten. Falls NALT vorhanden

sein sollte, könnte dieses organisierte lymphatische Gewebe in der Lage sein auf Antigene zu reagieren und als immunkompetente *inductive site* zu der mukosalen und der systemischen Immunantwort beizutragen.

Das Ziel meiner Arbeit war es daher festzustellen, ob beim Primaten ein NALT, d.h. ein organisiertes lymphatisches Gewebe in der Nasenschleimhaut vorhanden ist. Besondere Aufmerksamkeit habe ich den folgenden Aspekten gewidmet:

1. Eine Methode auszuarbeiten, die es erlaubt das NALT aufzufinden und ohne mechanische Schädigungen zu präparieren.
2. Falls NALT gefunden werden sollte, dieses durch histologische Untersuchungen zu analysieren und festzustellen, ob die mikroanatomischen Bestandteile eines MALTs (Lymphoepithelium, Domareal, primäre oder sekundäre Follikel, T-abhängige Zone, abführende Lymphbahnen, keine Kapsel) nachzuweisen sind.
3. Untersuchungen mit einem breiten Spektrum von Antikörpern durchzuführen um zu sehen, ob diese Strukturen auch immunhistochemisch analysierbar sind.
4. Molekularpathologische Untersuchungen durchzuführen, um zu analysieren ob bei einer chronischen Infektion mit dem pathogenen *Simian Immunodeficiency Virus* (SIV) das NALT mitreagiert. Sollte das lymphatische Gewebe befallen sein, stellt sich die Frage, ob die Veränderungen im NALT mit denen vereinbar sind, die bei Lymphknoten oder im GALT beschrieben worden sind. Besonders wichtig ist, ob folliculäre dendritische Zellen (FDC) vorhanden sind und diese viralen Komponenten einzufangen und an ihrer Zelloberfläche binden. Ein solcher Befund wäre nicht nur bezüglich der Bedeutung des NALTs als Virusreservoir bei der Pathogenese von SIV von Bedeutung, sondern würde zeigen, dass die FDC des NALT Antigene binden können und dadurch in der Lage sein könnten eine positive oder negative Selektion der B-Zellen innerhalb des Keimzentrums zu steuern.

Ein wichtiger Teil meiner Arbeit ist es gewesen eine Vielzahl von Gesichtsschädeln der *Macaca mulatta* zu untersuchen. Ich hatte das Glück mehr als 120 Macacacn präparieren zu können. Zu betonen ist, dass kein einziges Tier für meine

Untersuchungen geopfert worden ist. Das Untersuchungsmaterial entstammt aus mehreren, von der EU-Kommission geförderten Forschungsprojekten. In diesen Versuchen, in denen die Effektivität verschiedener experimenteller Vakzine gegen SIV getestet wurden, besaß keine der beteiligten Forschungsgruppen ein Interesse oder Verwendung für den Gesichtsschädel, weshalb mir das Material großzügigerweise zur Verfügung gestellt wurde. Dafür möchte ich meinem Doktorvater, Prof. Dr. Paul Racz, sowie Dr. Christiane Stahl-Hennig aus dem Deutschen Primatenzentrum in Göttingen und den vielen Kollegen, die an den unterschiedlichen EU-Projekten arbeiten meinen ganz herzlichen Dank aussprechen.

2. Einleitung

2.1. Das nasal assoziierte lymphatische Gewebe, NALT

Die nasale Schleimhaut ist die erste Kontaktstelle des Körpers mit eingeatmeten Antigenen und spielt eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen. (Kuper et al. 1992) Bei der Beseitigung von größeren Partikeln spielen die Flimmerhäarchen eine wichtige Rolle, bei kleineren Erregern wie Bakterien oder Viren ist das Schleimhaut-assoziierte-lymphatische Gewebe (MALT) für die Abwehr zuständig. Abgesehen von seiner Aufgabe lokal gegen Pathogene des oberen Respirationstrakts vorzugehen, steht das MALT in Verbindung mit dem systemischen Immunsystem, so dass durch seine Aktivierung auch Antigen spezifische immunologische Reaktionen in entfernten Geweben hervorrufen werden können, wie zum Beispiel dem urogenital Trakt oder dem Darm. (Berquist et al. 1997, Zuercher 2003)

In den letzten Jahrzehnten wurde bei Nagetieren das NALT entdeckt und untersucht. (Spit et al. 1989) Im Nagetier befinden sich paarige Lymphozyten-Aggregate auf beiden Seiten der Nasenhöhle unterhalb des weichen und harten Gaumens, die vom Naseneingang bis zum Rachenraum reichen. Die histologische Untersuchung dieses lymphatischen Gewebes zeigt, dass es eine ähnliche Struktur wie die der Peyer'schen Plaques im Darm besitzt. Direkt unterhalb des Epithels befinden sich die Dome, bestehend aus dicht gepackte Lymphozyten in einem Netz von Kollagenfasern und Retikulumzellen. Dieses lymphozytenreiche Areal ist umgeben von einem Randsaum von weniger dicht gepackten Lymphozyten, in dem sich auch postkapilläre Venolen mit hohem Endothel, HEV (*high endothelial venules*) befinden, sowie myelinisierte und unmyelinisierte Nerven. Es lassen sich folliculäre B- und parafollikuläre T-Zellbereiche abgrenzen. (Zuercher et al. 2002)

Vergleichbar mit den Domen der Peyerschen Plaques wird das NALT von einem Lymphoepithelium bedeckt anstelle eines respiratorischen Epithels wie die restliche Nasenhöhle. Hier wurden M-Zellen nachgewiesen, die für die Antigenaufnahme verantwortlich sind. (Kuper et al. 1992) Im Bereich des respiratorischen Epithels ist die Antigenaufnahme nicht möglich.

Das mukosale Immunsystem besitzt eine immunologische *inductive* und *effector site*. (Zuercher et al. 2002) Beim NALT handelt es sich ebenso wie bei den Peyerschen Plaques im Ileum um eine *inductive site*, die Lamina propria und das Epithel bilden die *effector site*. In der *inductive site* werden Klone von naive B- und T-Zellen selektiert und nach Antigenkontakt vervielfacht. Im Reaktionsbereich versammeln sich aktivierte B- und T-Zellen nachdem sie durch Antigenkontakt spezialisiert worden sind.

Im Gegensatz zu anderen Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Geweben wie z.B. den Peyerschen Plaques, die bereits während der Embryogenese gebildet werden (Pabst und Tschernig 2010), entsteht das NALT bei Mäusen erst nach der Geburt und scheint seine maximale Größe im Alter von 8 Wochen zu erreichen. (Kiyono und Fukuyama 2004) Die Entstehung des NALT scheint Antigen abhängig zu sein.

Viele Autoren gehen davon aus, dass es sich bei dem NALT der Nagetiere und das Äquivalent der paarigen Tonsillen des Waldeyer'schen Rachenrings beim Menschen handelt. Es gibt jedoch nur wenige Untersuchungen der Nasenschleimhaut des Menschen (Debertin et al. 2003) um festzustellen, ob sich hier ebenfalls organisiertes lymphatisches Gewebe in der Region unterhalb des Gaumens finden lässt. Auch beim Primaten ist in dieser Region noch nicht gezielt nach NALT gesucht worden. Da das NALT offensichtlich mit dem systemischen Immunsystem in Verbindung steht, scheint es sich als Ort für eine Impfstoffapplikation zu eignen. Die nasale Immunisierung ist weniger invasiv und weniger komplikationsträchtig als die intravenöse, intramuskuläre oder subkutane Immunisierung.

Nach intranasaler Immunisierung mit Oberflächen- Proteinen von Streptokokken mutans konnten im NALT als auch im Urogenitaltrakt der Mäuse Zellen nachgewiesen werden, die antigen-spezifische Antikörper, hauptsächlich vom IgA Typ sezernierten. (Wu et al. 1995) Nach nasaler Immunisierung mit verschiedenen Antigenen wie zum Beispiel HIV gp160 Protein, plasmid DNA sowie viralen und bakteriellen Vektoren konnte eine antigen-spezifische IgA-Antwort im vaginalen Sekret erzeugt werden. (Csencsits et al. 1999)

Die Möglichkeiten der oralen Immunisierung sind durch die mögliche Denaturierung der Impfstoffe während der Magen-Darm-Passage eingeschränkt.

Es gibt Vergleichsstudien, die beweisen, dass die intranasale Immunisierung eine effektivere generalisierte Immunantwort im Bereich der Schleimhaut hervorruft als die orale Immunisierung.

Eine weitere Studie zeigte, dass bei gleicher Dosierung eines Cholera Toxins die Immunantwort in den Peyerschen Plaques (PP) nach intragastraler Immunisierung von der Immunantwort im NALT nach intranasaler Immunisierung um das 3-fache übertroffen wurde, gemessen an den Antikörper-Titern. Bei der Immunantwort in den PP handelte es sich lediglich um eine Antwort von Antikörpern der Immunglobulin-Klasse A, während im NALT auch Antikörper der Klassen IgG und IgM festgestellt werden konnten. (Heritage et al. 1997)

Des Weiteren unterscheiden sich die Adressin Profile der HEV im NALT und in den PP. Adressine interagieren mit den spezifischen „homing“ Rezeptoren die von B- und T-Zellen exprimiert werden und sind verantwortlich für die Wanderung dieser Zellen aus dem Blut in das lymphatische Gewebe. Die Adressin Profile sind also entscheidend für das Migrationsverhalten der Lymphozyten und könnten dafür verantwortlich sein, dass nach intranasaler Immunisierung auch an anderen Schleimhäuten spezifische Antikörper nachweisbar sind. (Csencsits et al. 1999)

Eine weitere Besonderheit des NALT besteht darin, dass im Gegensatz zum Darm assoziierten lymphatischen Gewebe (GALT), welches mit zunehmendem Alter seine Fähigkeit zur Induktion der oralen Toleranz verliert und nur eine abgeschwächte spezifische IgA-Antikörper Immunantwort produziert, die Funktion des NALT weiterhin unverändert bleibt. Dieses Verhalten spricht besonders für die Nutzung der nasalen Immunisierung bei Senioren. (Fujihashi und Kiyono 2009)

2.2. Das Human Immunodeficiency Virus (HIV)

Das humane immunodeficiency Virus (HIV) wurde 1983 als verursachender Erreger von AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) entdeckt. (Barre-Sinoussi et al. 1983) Das HI Virus gehört in die Gruppe der Retroviren. Das HIV Genom verschlüsselt 2 Strukturproteine Gag und Env, 3 Proteine Polymerase, Integrase und Protease, sowie 6 Gene die notwendig für die Virusreplikation sind: tat, vif, vpu, vpr, nef und rev.

Für die Übertragung des HI- Virus ist eine erfolgreiche Interaktion zwischen Virus und Zelloberfläche notwendig. Der wichtigste Zellrezeptor für HIV ist das CD4 Oberflächenmolekül. (Dalglish et al. 1984, Klatzmann et al. 1984) Der CD4-Rezeptor ist aber allein nicht ausreichend, es werden auch noch Co-Rezeptoren benötigt, zum Beispiel CCR-5 und CXCR-4. (Atchinson et al. 1996, Zhang et al. 1996)

Auch andere CD4 positive Zellen können infiziert werden, wie zum Beispiel dendritische Zellen (DCs), jedoch findet in diesen Zellen keine relevante Virusreplikation statt. (Brack-Werner et al. 1992, Mellert et al. 1990)

Nach Verschmelzung der Membran des Virus mit der Zellmembran tritt die virale RNA in die Zelle ein. Mit Hilfe der Reversetranskriptase wird von der viralen RNA eine DNA Kopie angefertigt und das virale Genom in das Zellchromosom integriert. Danach erfolgt die Produktion von viraler mRNA und virale genomisch RNA von der integrierten proviralen DNA. Im Anschluß erfolgt die Produktion von viralen Proteinen aus der mRNA. Die Eingliederung der viralen genomischen RNA in ein Kapsid erfolgt an der Zellmembran. Die Virusreplikation ist abgeschlossen.

Die HIV-Infektion verläuft in mehreren Phasen. In der frühen oder akuten Phase der Viruserkrankung kommt es zunächst zu einer Infektion der CD4 positiven Lymphozyten und Makrophagen. Die Mukosazellen und Epithelzellen der Darmschleimhaut, der Brust oder des Uterus können auch infiziert werden, wie in *in-vitro* Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Tan et al 1993, Furuta et al. 1994, Toniolo et al. 1995). In den ersten Wochen kommt es zur akuten Infektion, die sich durch eine hohe Viruslast auszeichnet. Dies wurde im Tiermodell mit SIV infizierten Primaten nachgewiesen (Chakrabarti et al. 1994, Reimann et al. 1994,

Veazey et al. 1998, Wang et al. 2007, Haase 2011). Nach intravaginaler Infektion findet man das Virus zunächst nur in den lokalen Zellen der Lamina propria, nach 2 Tagen können infizierte Zellen ebenfalls in den regionären iliacaalen Lymphknoten und nach 5 Tagen auch im Blut nachgewiesen werden. (Spira et al. 1996) Nach atraumatischer Infektion über die linguale und die palatinale Tonsille konnten nach 2 Tagen virusproduzierende Zellen in der Tonsille, nach 3 Tagen im Blut und nach 3-4 Tagen in der Milz und den regionalen Lymphknoten nachgewiesen werden. (Stahl-Hennig et al. 1999)

Danach folgt ein Anstieg der CD8 positiven Zellen als Immunreaktion auf die Infektion. (Blomberg und Schoolery 1985) In dieser Zeit kann das Virus viele weitere Zellen infizieren, da noch keine spezifische antivirale Abwehr besteht. Es kommt ebenfalls zu einem Abfall der CD4 positiven Lymphozyten in der Lamina propria des gastrointestinalen Traktes (Mehandru et al. 2006). Nach einigen Wochen kommt es zu einer Reduktion der Viruslast aufgrund der körpereigenen Immunantwort. Da zu diesem Zeitpunkt noch keine neutralisierenden Antikörper nachgewiesen werden können, scheinen die CD8 positiven Zellen für diese Reduktion verantwortlich zu sein. (Borrow et al. 1994, Clerici et al. 1992, Koup et al. 1994) Im Blut und in den Lymphknoten finden sich zu diesem Zeitpunkt nur noch wenige Virus produzierende Zellen.

In der Latenzphase der Infektion nach 3 bis 4 Monaten steigt die Zahl der CD4 positiven Zellen in vielen Fällen wieder auf ein normales Niveau an. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einem stetigen Abfall der CD4- Zellzahl um 25-60 Zellen/ μ l pro Jahr (Lang et al. 1989). Die Zellzahl der CD8 positiven Zellen bleibt leicht erhöht. In dieser asymptomatischen Phase findet die Virusreplikation überwiegend in den Lymphknoten statt. (Tenner-Racz et al. 1986, Biberfeld et al. 1986, Pantaleo et al. 1993, Embretson et al. 1993)

In der symptomatischen Phase ist die Anzahl der CD4 Zellen unter 300 Zellen/ μ l abgefallen und die Viruslast im Blut und in den Lymphknoten ist im Vergleich zur Latenzphase deutlich angestiegen. Zeitgleich kommt es zu einer Verminderung der CD8 positiven Zellen. (Landay et al. 1993, Mackewicz et al. 1991) In einigen Fällen

kann das Niveau der CD4 Lymphozyten innerhalb weniger Monate rapide abfallen. (Schellekens et al. 1992, Levy 1998)

Im Laufe der HIV Infektion lassen sich ebenfalls Veränderungen der B-Zellen feststellen. Es kommt zu phenotypischen Veränderungen, erhöhtem Auftreten von B-Zell-Malignomen, Vermehrung von Immunglobulinen und einer Verschlechterung der antigen-spezifischen Immunantwort gegen andere Antigene (Moir et al. 2001).

Im lymphatischen Gewebe kann ein Strukturverlust festgestellt werden. Die morphologischen Veränderungen in den Keimzentren sind am auffälligsten. Anhand der histologischen Veränderungen in den Lymphknoten HIV infizierter Patienten ist ebenfalls eine Unterteilung in verschiedenen Stadien möglich: folliculäre Hyperplasie mit/ohne schwerer Fragmentierung, folliculäre Involution und diffuse Muster und Lymphozytenmangel (Öst et al. 1989, Racz et al. 1991). Zwischen den klinischen Stadien und den morphologischen Veränderungen lässt sich eine Korrelation feststellen, allerdings lassen sich diese Veränderungen nicht ausschließlich bei einer HIV-Infektion nachweisen.

Obwohl es seit einigen Jahren erprobte antivirale Kombinationstherapien gibt, welche dafür sorgen, dass HIV-infizierte Personen eine nur wenig geringere Lebenserwartung haben als HIV negative Patienten, ist die Suche nach einem Impfstoff weiterhin wichtig. Trotz langjähriger HAART-Therapie zeigt sich, dass es im weiteren Krankheitsverlauf zwar zu einer normalen CD4-Zellzahl im Blut kommt, aber im Bereich der gastrointestinalen Mukosa die Struktur des MALT geschädigt und die CD4 Zellzahl erniedrigt bleibt. (Mehandru et al. 2006) Durch eine Immunisierung könnten diese irreversiblen Veränderungen verhindert werden.

Für eine spezifische Immunantwort ist eine geregelte Migration der Lymphozyten zwischen der Peripherie und dem lymphatischen Gewebe erforderlich. Diese Migration wird durch Chemokine und die entsprechenden Rezeptoren auf den Lymphozyten gesteuert. (Cagigi et al. 2008, Carlsen et al. 2004) Ein von FDCs gebildete Chemokine CXCL13 ist für die Migration von B-Zellen verantwortlich. So wurden CXCL13 positive B-Lymphozyten in den Lymphknoten von HIV positiven Patienten gefunden, nicht aber in der vergleichbaren Kontrollgruppe.

2.3. Die Rolle des NALT bei der Immunisierung gegen HIV

Da die HIV Übertragung typischerweise im Bereich der Schleimhäute verläuft, liegt ein Schwerpunkt bei der Suche nach einem Impfstoff darin, eine anti-HIV Immunität im Bereich der Schleimhäute hervorzurufen, sodass es zu keiner systemischen Ausbreitung des Virus kommt. Durch die nasale Immunisierung kann sowohl eine durch Antikörper als auch eine zelluläre Immunreaktion in den Schleimhäuten initiiert werden. (Bielinska et al. 2008)

Die nasale Schleimhaut eignet sich sowohl um Veränderungen während der frühen Infektionen, als auch nach Immunisierung zu untersuchen. Da sich als Tiermodell für die HIV-Infektion die SIV-Infektion bei Macacen etabliert hat, ist es wichtig zu erfahren, ob Rhesusaffen ein Äquivalent zum NALT der Nagetiere besitzen.

In der Vergangenheit wurden verschiedene Strategien entwickelt um eine Schleimhautimmunisierung zu provozieren, zum Beispiel mit Hilfe von inaktivierten HI-Viren, *live-attenuated* viralen Vektoren, bakteriellen Vektoren, virus-ähnlichen Partikeln, nackter DNA, Toxinen und Zytokinen. Bis jetzt ist die Entwicklung eines Impfstoffes der eine anschließende Infektion mit einem *wild-typ* Virus verhindert noch nicht gelungen.

Durch die nasale Immunisierung gelang es die wichtigen antigen-spezifischen CD8+ Gedächtnis-Zellen in die Schleimhaut zu dirigieren und auch dort zu halten. (Ahlers und Belyakov 2009) Auch durch eine i.m. oder s.c. Immunisierung werden hohe IgA Antikörper Level in der Vagina oder im Rektum hervorgerufen, aber der Memory Effekt der für eine dauerhafte Immunität verantwortlich ist, wird durch Immunisierung über das MALT verstärkt. (Ahlers und Belyakov 2009)

In einigen Fällen wurde durch eine Immunisierung von Rhesusaffen mit einem SIV Protein-verschlüsselten Vektor basierend auf dem Rhesus Cytomegalie Virus eine Kontrolle der anschließenden SIV-Infektion im Bereich der Rektumschleimhaut erreicht ohne das es zu einer systemischem Ausbreitung des Virus kam. (Hansen et al. 2009)

Für eine lokale Immunisierung scheinen die regionären Lymphknoten jedoch eine wichtigere Rolle zu spielen als das MALT. In einer Studie von Sabirov und Metzger (2008) konnte gezeigt werden, dass auch nach der Entfernung des NALT bei jungen Mäusen nach nasaler Immunisierung eine IgA Antikörperantwort sowohl in der Nase als auch im Serum festgestellt werden konnte. Diese Antikörperantwort blieb nach Entfernung der regionären Lymphknoten aus.

Das gleiche Ergebnis konnte nach Entfernung der Peyerschen Plaques, bzw. der regionären Lymphknoten des Darms und entsprechender oraler Immunisierung nachgewiesen werden. (Sabirov und Metzger 2008) Da die untersuchten Mäuse jedoch erst 8 Tage alt waren und zu diesem Zeitpunkt das NALT noch nicht vollständig entwickelt ist, kann es sein, dass das NALT im Laufe des Alters an Bedeutung gewinnt.

3 Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Rhesusaffen

Bei den untersuchten Rhesusaffen handelten es sich um Mitglieder der Spezies *Macaca mulatta*. Es handelt sich um Tiere indischen Ursprungs. Die Macacacn entstammen unterschiedlichen EU geförderten Projekten zur Erprobung von SIV Impfstoffen und Herstellung einer Schleimhautimmunität. Da keiner der Kooperationspartner Interesse an den Gesichtschädeln hatte, wurden uns diese freundlicher Weise zur Verfügung gestellt. Die Tierhaltung erfolgte im Deutschen Primaten Zentrum in Göttingen. Alle Behandlungen und Untersuchungen der Primaten erfolgten in Einklang mit den deutschen Tierschutz-Richtlinien.

Bei den Tieren handelte es sich um männliche und weibliche Exemplare der Spezies *Macaca mulatta*. Das Alter der Affen variierte zwischen 2-6 Jahre zum Zeitpunkt der Opferung. Keines der Tiere starb eines natürlichen Todes. Das Gewicht der Tiere zum Zeitpunkt des Todes schwankte zwischen 2960g - 8037g. Insgesamt wurden die Köpfe von über 120 Affen untersucht.

Die folgenden experimentellen Vakzine wurden verabreicht:

1. Virus-like Particles (VLP). Die Vakzine exprimiert das lentivirale gag. Um die Aufnahme der Vakzine durch dendritische Zellen zu steigern, wurde in der Membrane der Partikel das G-Protein des vesikulären Stomatitisvirus inkorporiert (Kuate et al. 2003).
2. Single cycle lentiviral vector (SCIV) exprimiert gag/pol und env (Kuate et al. 2003).
3. Recombinant adenoviral vector exprimiert the codon-optimierte SIV gag/pol and env (Kuate et al. 2004, Stahl-Hennig et al. 2007)

Auf die unterschiedlichen SIV Vakzine wird in meiner Arbeit nicht weiter eingegangen. Die Impfungen wurden lediglich als Stimulation des Immunsystems

betrachtet. Immunhistologische Färbungen wurden nur an 15 Tieren der insgesamt 120 untersuchten Macacacn durchgeführt. Diese Tiere wurden in 3 Gruppen eingeteilt. (Tabelle 1). In der ersten Gruppe wurden die Tiere mit SIV infiziert, in der zweiten Gruppe handelt sich um Kontrolltiere, die keine Behandlung oder Infektion hatten und die dritte Gruppe besteht aus Tieren, die zunächst immunisiert wurden mit VLP und anschließend eine SIV-Exposition erfahren haben.

Tabelle 1: Einteilung der Rhesusaffen nach Vorbehandlung

Gruppennummer	Behandlung der Tiere	Anzahl der Tiere	Experiment
1	Naive Macacacn. Infektion mit SIVmac239 Verdünnung 1:10 via der Tonsillen	5	127
2	Keine Behandlung Oder Infektion mit RT-SHIV intravaginal Keine Infektionszeichen nachweisbar	4 2	128G
3	Experimentelle Vakzination A) mit Virus-like-Particles (VLP) s.c. in den Wochen 0,4; Boost: 8,16,20,24 B) Immunisierung mit VLP-Spray und Adeno oral Spray in den Wochen 0,4; Boost:12,und 16 C) Immunisierung mit SCIV in der Woche 0 und 4; Boost AdSIV in der Woche 8 und 12 via der Tonsillen Exposition: Infektion mit SIVmac239, Verdünnung 1:10 via der Tonsillen (20, 24 bzw. 32 Wochen nach Immunisierung)	2 2 3	125 127 123

3.2. Methoden

3.2.1. Gewebeentnahme

Nach dem Tod wurde den Affen der Kopf abgetrennt. Danach erfolgte die Skalpierung und die Eröffnung des Hirnschädels zur Entnahme des Gehirns.

Anschließend wurden die Köpfe in 4% Formalin gelegt, dort wurden sie für mindestens 3 Tage fixiert. Vor der Präparation der Nasenschleimhäute wurden die Köpfe für 24 Stunden gewässert.

Um einen großzügigen Zugang zur Nasenschleimhaut zu bekommen und diese bei der Entnahme nicht zu beschädigen, entschieden wir uns für den transpalatinalen Zugangsweg.

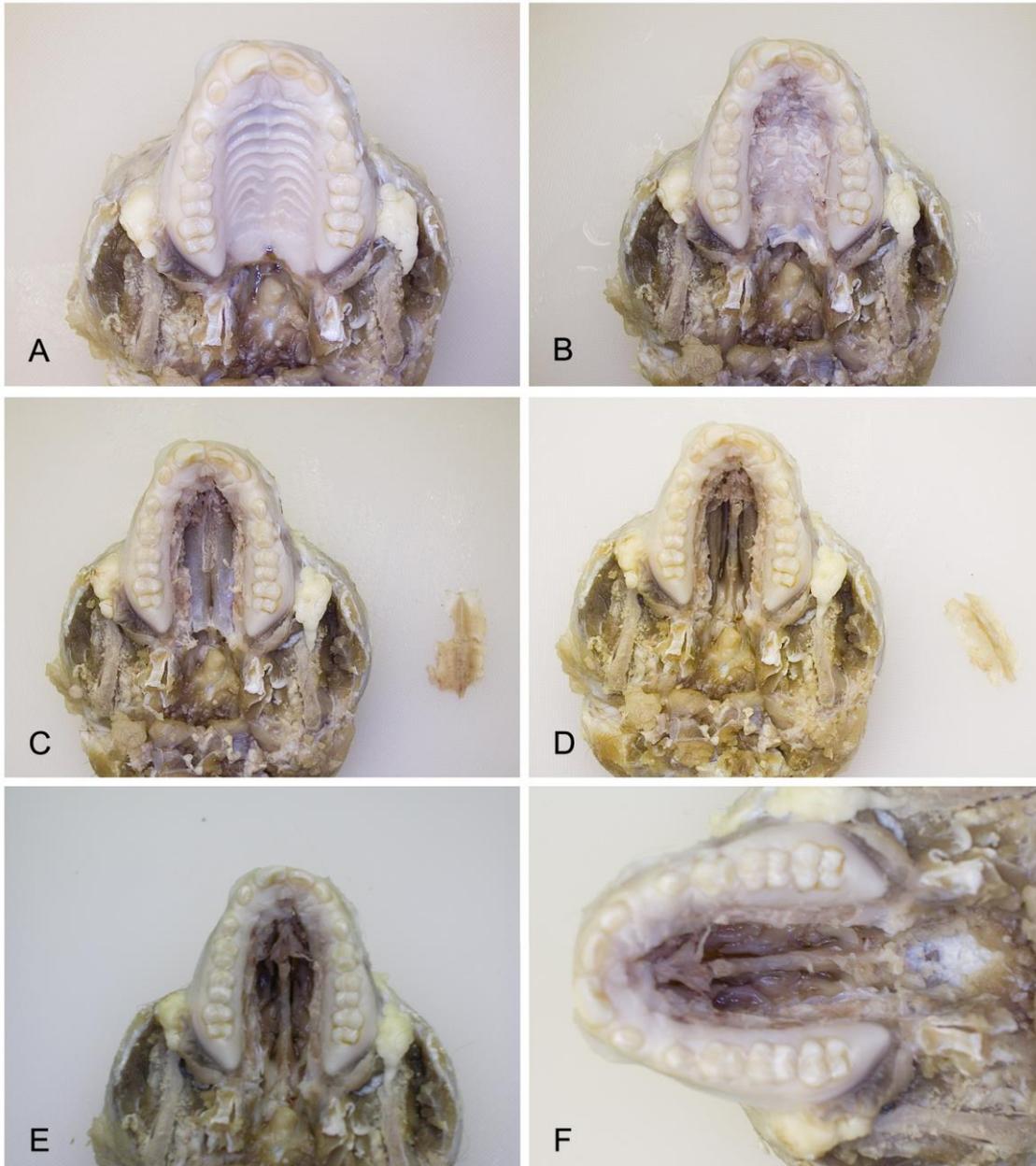


Abb. 1 Schritte zur Entnahme des NALT. Wesentlich ist, dass die Präparation von transoral durchgeführt wird (A). Nach der Entfernung der Schleimhaut palatinal des Zahnbogens und im Bereich des Weichgaumens liegt der harte Gaumen frei (B). Nach Entfernung des harten Gaumens sieht man die nasale Schleimhaut (C). Die nasale Schleimhaut wird vorsichtig an den lateralen Seiten innerhalb des Zahnbogens und in der Mitte des Septums durchtrennt und entnommen. Sichtbar sind der kraniale Rest des Septums und die unteren Nasenmuscheln beidseits (D). Nach Entfernung der mittleren und der unteren Nasenmuscheln liegt die Nasenhöhle frei (E). Die Tonsilla pharyngealis befindet sich noch am Rachendach. Die Tonsilla pharyngealis wird vom Periost abgelöst und entfernt (F).

Zunächst wurde der Unterkiefer entfernt und der Kopf auf die Schnittstelle im Bereich der Schädelkalotte gedreht. Danach erfolgte ein Schnitt palatinal des Oberkieferzahnboogens und die Ablösung der Mundschleimhaut vom harten Gaumen unter Mitnahme des weichen Gaumens. (Abb.1)

Der harte Gaumen wurde ebenfalls innerhalb der Zahnreihe mit dem Meißel gelöst und vorsichtig entfernt ohne die unterliegende Nasenschleimhaut zu verletzen (Abb. 1C). Die Nasenschleimhäute wurden an der lateralen Seite der Nasenhaupthöhle mit dem Skalpell gelöst. Danach erfolgt die Durchtrennung der Nasenschleimhaut gemeinsam mit dem Nasenseptum distal des Naseneingangs und kurz unterhalb des Dachs der Nasenhaupthöhle (Abb. 1D). Die untere und die mittlere Nasenmuscheln werden auf beiden Seiten mit dem Skalpell entfernt (Abb. 1E). Die Rachenmandel wurde vorsichtig mit Hilfe des Skalpells von der pharyngealen Seite herausgelöst (Abb. 1F).

3.2.2. Die histologische Färbungen

3.2.2.1. Die Entparaffinierung

Vor der Färbung erfolgt zunächst die Entparaffinierung der Schnitte. Die Gewebeschnitte werden für zweimal je 7 min in Xylol gebadet. Anschließend wird ein kurzes Schwenken zunächst in 100%igem Ethanol und danach erneut in Xylol. Danach werden die Schnitte zweimal für 7 min in 100%igen Ethanol gebadet. Es folgt ein Bad in 96%igem Ethanol für 5 min welches im Anschluss wiederholt wird, danach ein 5 minütiges Bad in 80%igem und zum Abschluss in 70%igem Ethanol. Die Schnitte werden in Aqua dest getaucht.

3.2.2.2. Hämatoxylin-Eosin (HE)

Vor der Färbung erfolgt zunächst die Entparaffinierung der Schnitte. Nach Abschluss der Entparaffinierung erfolgt die Kernfärbung in Hämalaun nach Meyer für 10 min. Das Bläuen unter Leitungswasser dauert ebenfalls 10 min. Die Schnitte werden für 5 min in 0,1%iges Eosin gestellt und danach mit Aqua dest gespült. Nach Beendigung der Färbung folgen 3 Xylol-Bäder für jeweils 5min. Die Schnitte werden mit Eukit eingedeckelt.

3.2.2.3. Giemsa-Färbung

Vor der Färbung erfolgt zunächst die Entparaffinierung. Danach werden die Schnitte für eine Stunde in 3 ml Lösung Giemsa nach Merck mit 50ml Aqua dest getaucht. Zum Differenzieren werden die Gewebe für 5 Sekunden in Eisessig geschwenkt. Im Anschluss folgt eine weitere Differenzierung in 96%igem Ethanol (2 min), danach ein Bad in Isopropanol für 2 min. Die Schnitte werden dreimal für jeweils 5 min in Xylol gebadet. Am Ende werden die Schnitte mit Eukit eingedeckelt.

3.2.3. Die Immunhistochemie

3.2.3.1. Das Prinzip

Die Immunhistochemie dient dem spezifischen Nachweis von Proteinen. Sie beruht auf der Grundlage der Antigen-Antikörper-Bindung. Das zu untersuchende Gewebe wird mit einer Lösung mit Antikörpern bedeckt, die sich spezifisch an das nachzuweisende Proteine bindet. Der Antikörper wird aus Tierseren gewonnen, wie zum Beispiel Maus, Kaninchen oder Pferd. Dem Tier wurde das entsprechende Protein im Vorfeld als Antigen verabreicht um dann als spezifische Immunabwehr den passenden Antikörper zu bilden.

Die Bindung der Antikörper an das Antigen im Gewebe kann man durch verschiedene Nachweismethoden detektieren. Die direkte Nachweismethode die mit einem gekoppelten Antikörper durchgeführt wird, wird in der Immunhistochemie selten verwendet. Bei der indirekten Nachweismethode wird das Gewebe nach abgeschlossener Antigen-Antikörper-Reaktion mit einem zweiten Antikörper bedeckt, der sich gegen die entstandenen Antigen-Antikörper-Komplexe richtet. Signalverstärkung kann durch Enzym-Antienzym-Komplex-Techniken erreicht werden Dabei sind die häufigsten Techniken die Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP), die Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) und (Strept-) Avidin-Biotin (ABC) Methode.

3.2.3.2. Der Ablauf der Immunhistochemie

3.2.3.2.1. Die Antigendemaskierung

Zunächst werden die Schnitte entparaffiniert. Um die Antigene zu demaskieren werden die Gewebeschnitte je nach Antikörper im Druckkochtopf in Citratpuffer mit einem pH 6,0 oder EDTA-Puffer pH 8,0 oder in Tris/EDTA-Puffer pH 9,0 gekocht (Tabelle 2).

Tabelle 2: Informationen bezüglich der primären Antikörper

Antikörper	Hersteller/ Clone	Spezifität	Kochzeit	Verdünnung	Inkubationszeit
CD20	Dako M0755	B-Zellen	3 min in Citratpuffer	1:50	Über Nacht bei RT
CXCL13	R&D Systems AF801	Chemokine, Migration von B-Zellen	5 min in EDTA-Puffer	1:40	Über Nacht bei RT
CD4	Novocastra NCL-L-CD4-1F6	T-Helferzellen	6 min in EDTA-Puffer	1:20	Über Nacht bei RT
CD8	NeoMarkers LOT9009P50 7C	T suppressor /Zytotoxische Zellen, Teil der NK Zellen	5 min in Citratpuffer	1:200	30 min bei RT
Granzyme B	Dako M7235	zytotoxische T-Zellen, NK Zellen	15 min in EDTA-Puffer	1:25	Über Nacht bei RT
FOXP3	Abcam AB20034	Regulatorische T-Zellen	5 min in Tris/EDTA-Puffer	1:40	2h bei RT
Perforin	Novocastra NCL-Perforin Batch 141006	zytotoxische T-Zellen, NK Zellen	15 min in EDTA-Puffer	1:20	Über Nacht bei RT
DEC-205	Novocastra NCL-L-DEC-205 Batch L154501	Endozytischer Rezeptor bei DC	3 min in Citratpuffer	1:80	Über Nacht bei RT
CD83	Novocastra NCL-1-CD83 Batch142503	Reife/ aktivierte dendritische Zellen	3 min in Citratpuffer	1:30	Über Nacht bei RT
CD35	Novocastra NCL-CD35	Follikulär dendritische Zellen	3 min in EDTA.Puffer	1:50	Über Nacht bei RT
CD68	Dako M0814	Monozyten,	3 min in Citratpuffer	1:20	Über Nacht bei RT
Cyto-Keratin 1	Dako M3515	Plattenepithel	5 min Inkubation mit Protease K	1:30	Über Nacht bei RT
MIB-1	Dako M7240	G ₁ , S, G ₂ und M-Phase des Zellzyklus	6 min in Citratpuffer	1:10	Über Nacht bei RT
S-100	Dako Z0311	dendritische Zellen, Schwann'sche Zellen,	5 min Inkubation mit Protease K	1:100	Über Nacht bei RT
IgA	Dako A0262	IgA, α-Ketten	3 min in Citratpuffer	1:300	Über Nacht bei RT
IgG	Dako A0423	IgG, γ-Ketten	3 min in Citratpuffer	1:50	Über Nacht bei RT
IgM	Dako A0425	IgM, μ-Ketten	3 min in Citratpuffer	1:300	Über Nacht bei RT

3.2.3.3. Die Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) - Methode:

Nach beschriebener Vorbehandlung der Gewebe wurden die Schnitte mit den primären Antikörpern inkubiert (Tabelle 2). Die primären Antikörper wurden alle mit Antibody Diluent (Dako, S3022) verdünnt zur Hemmung der Hintergrundfärbung. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur (RT), die Inkubationszeiten variierten nach Antikörper. Wir verwendeten 100µl Antikörperlösung entsprechend der Verdünnung, die in der Tabelle 2 genannt wird.

Dann wurde 3 Mal für je 5min gespült mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4). Die Inkubation erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur mit dem sekundären Antikörper (Polyclonal Rabbit anti-mouse Immunoglobulin; Dako Z0259), in einer Verdünnung von 1:20 mit Spülpuffer. Danach wurde 3 Mal gespült für je 5 min mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4). Für 30 min wurden die Gewebe mit dem tertiären Antikörper, APAAP (mouse monoclonal; Dako D0651) in einer Verdünnung 1:50 mit Spülpuffer behandelt gefolgt mit 3 x 5 min Spülung mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4). Im Anschluss wurde erneut mit dem polyclonalen Kaninchen-anti-mouse Immunoglobulin (Dako Z0259) für 10 min inkubiert. Nach Spülung (5 min in Tris/NaCl-Puffer pH 7,4) wurden die Schnitte mit dem tertiären Antikörper, APAAP mouse monoclonal (Dako D0651) noch einmal benetzt.

Die Farbentwicklung erfolgte mit einem Neufuchsin-Substratansatz (pH 8,7) unter mikroskopischer Kontrolle. Der Substratansatz besteht aus 31,25ml Propandiol 0,2M, 87,5 ml Aqua tridest, 0,05 g Levamisole, 0,0625 g Naphthol-AS-Bi-Phosphat, 750 µl Dimethylsulfonamid, 625 µl 4%ige Natriumnitrit-Lösung und 250 µl 5%ige Neufuchsinlösung. Zum Stoppen der Farbentwicklung wurden die Schnitte für 5 min in Spülpuffer gestellt. Die Kernfärbung erfolgt mit Hämalaun 1:10 für 4 min mit anschließendem Bläuen für 10 min unter Leitungswasser. Das Eindeckeln erfolgte mit Kaisers Gelatine.

3.2.3.2 Die Peroxidase-Anti-Peroxidase – Methode (PAP):

Nach Entparaffinierung und Vorbehandlung erfolgte eine Inkubation der Schnitte in Methanol-H₂O₂ für 30 min. Danach wurden die Schnitte für 10 min mit normalem Schweineserum (Dako X0901) benetzt. Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper entsprechend der oben genannten Tabelle 2. Die Schnitte wurden mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4) für 3 Mal 5 min gespült. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Schwein-anti-Kaninchen Immunglobulin Dako Z0196, 1:50 in Spülpuffer) dauerte 30min. Die Schnitte wurden 3 Mal 5 min mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4) gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte für 30 min mit dem tertiären Antikörper, PAP (Kaninchen Dako Z0113, 1:100 in Spülpuffer) bedeckt. Danach wird 3 Mal für je 5 min mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4) gespült.

Die Farbentwicklung wurde mit dem DAB (Diaminobenzidine in chromogen-solution)-Kit (Dako K3467) unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt. Die Reaktion wurde durch das Überführen der Schnitte in Spülpuffer gestoppt und die Schnitte wurden dort für 5 min belassen. Zum Schluss wurden die Schnitte gegen gefärbt und eingedeckelt wie oben beschrieben.

3.2.3.3 Die (Streptavidin-Biotin-Complex (ABC) -Methode:

Die Entparaffinierung und Vorbehandlung der Gewebe erfolgte wie oben beschrieben. Zunächst erfolgte die Inkubation für 5 min mit 3%iger H₂O₂-Lösung zur Hemmung der endogenen Peroxidase. Im Anschluss wurden die Schnitte für 3 Mal 5 min gespült mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4) Es folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper entsprechen der Tabelle 2. Die Schnitte wurden 3 mal 5min gespült mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4). Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, Polylink (DCS LD340R050) dauerte 20min. Nach Spülung in Tris/NaCl-Puffer pH 7,4 (3 x 5 min) wurde der tertiäre Antikörper, Peroxidase Label (HRP) (DCS PD330R050) für 20 min mit der Pipette aufgetragen. Die dreimalige Spülung für je 5 min mit Spülpuffer (Tris/NaCl-Puffer pH 7,4) wurde vor der Farbentwicklung mit DCS Detection Line AEC Substratkit (AC 131C100) 20 µl auf 1 ml Puffer unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt und durch Spülpuffer gestoppt. Gegenfärbung und Eindeckelung der Präparate wurde durchgeführt wie bei der APAAP Methode bereits beschrieben.

3.2.4. Die In-situ-Hybridisierung, ISH

3.2.4.1. Das Prinzip

Bei der In-situ-Hybridisierung handelt es sich um ein Verfahren, welches erlaubt, spezifische DNA- oder RNA- Sequenzen in Geweben, Zellen oder Chromosomen-Präparaten nachzuweisen. Einzelsträngige DNA- oder RNA-Fragmente bilden mit einer komplementären DNA- oder RNA-Sequenz Hybride und dadurch entsteht ein stabiler Nukleotid-Doppelstrang.

Hierzu haben wir eine synthetisch erzeugte und mit einer Markierung mit ³⁵S radioaktiv versehene Sonde (SIVmac-Sonde, Lofstrand Labs limited) eingesetzt, welche über Basenpaarung an die nachzuweisende Sequenz bindet (hybridisiert) und sie so markiert. Da dieses Verfahren direkt in der zu untersuchenden Struktur durchgeführt wird, bezeichnet man es als „in-situ“.

4.2.1. Der Ablauf

Sofern nicht anders angegeben, erfolgten die einzelnen Arbeitsschritte bei Raumtemperatur. Es war darauf zu achten, dass sämtliche verwendete Gerätschaften und Reagenzien RNase-frei waren. Die Mengen sind für bis zu 100 Schnitte angegeben. Als Positivkontrolle wurde eine SIV infizierte Milz mitgefärbt. Zunächst erfolgt das Aufziehen der Schnitte auf RNase-freie silanisierte Objektträger. Die Schnitte werden in der absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert: 20 min. baden in Xylol, zweimal 5 min. baden in 100 % Ethanol, 5 min. baden in 96 %igem Ethanol und zweimal spülen mit DEPC-Wasser (200µl Diethylpyrocarbonat (Fluka 32490) auf 1l Tridest, autoklaviert).

Für die Antigendemaskierung wurden Schnitte entweder für 2 min. in Citratpuffer mit einem pH 6,0 gekocht und anschließend in DEPC-Wasser abgekühlt, wobei dieses einmal gewechselt wurde oder es erfolgt eine proteolytische Vorbehandlung des Gewebes mit Protease K zum Aufschluss der Zellmembran in 0,2 N HCl für 20 min. mit anschließendem zweimaligen Spülen in DEPC-Wasser. In der Protease K bestehend aus 10ml Trispuffer mit einem pH von 7,4, 2 ml Calciumchlorid (Merck 2388) und 0,1g Protease K (Sigma P-2308) auf 1l DEPC-H₂O erfolgte die Behandlung für 8 min. bei Raumtemperatur.

Danach wurden die Schnitte für 30 min. in Triethanolamin 0,1M (TEA, Fluka 90290) getaucht. Anschließend kam es zur Acetylierung durch Zugabe von Aceticanhydrid (Sigma A6404) (800 µl auf 500 ml TEA) für weitere 5 min. Die Inkubation in TEA mit Bernsteinsäureanhydrid (Fluka 14089) dauerte 20 min. (5g Bernsteinsäureanhydrid auf 500 ml 0,1M TEA). Danach wurden die Schnitte in 96 % Alkohol für 2 min gespült und anschließend unter dem Abzug getrocknet.

Zur Prähybridisierung wurden die Schnitte für mindestens zwei Stunden bei 45 °C im Wasserbad mit einem Prähybridisierungsmix (75ml 5M NaCl (Merck 6404), 12,5ml 1M Tris (Merck K11503882) pH7,4, 1,25ml 0,5M EDTA (Fluka 03610), 25ml 5% BSA (Sigma A6404), 2,5ml 10% Ficoll (SigmaF2637), 2,5ml 10% PVP (Fluka 81420), 6,2ml DTT, 31ml t-RNA (SigmaR 6750), 468ml DEPC-H₂O, 625ml Formamid, welches zuvor mit Dowex Cat 42,879-5 entionisiert wurde) inkubiert .

Im Anschluss erfolgte die Hybridisierung. Dazu wurden 20µl des Hybridisierungscocktails (240µl 5M NaCl (Merck 6404), 40µl 1M Tris (Merck K11503882) pH7,4, 4µl 0,5M EDTA(Fluka 03610), 8µl 10% Ficoll (SigmaF2637), 8µl 10% PVP (Fluka 81420), 20ml DTT, 100µl t-RNA (SigmaR 6750), 80 µl BSA spezial grande) angemischt.

Parallel dazu wurden 1g Dextransulfat in 5 ml Formamid im kochenden Wasserbad gelöst. Die SIV-Sonde, die mit radioaktivem Schwefel (S^{35}) markiert war, wurde mit 1,25ml Dextransulfat, 0,31ml Hybridisierungscocktail, 0,73ml DEPC-Wasser und 0,2ml der α -sense SIV-Probe angesetzt. Ein Deckglas wurde aufgelegt, dieses dann mit Rubber verklebt und in einer wasserdichten Plastikdose über Nacht bei 45°C im Wasserbad belassen.

Die Posthybridisierung erfolgte nach dem Entfernen der Deckgläser mittels der unten genannten Waschlösungen.

Direkt nach dem Entfernen der Deckgläser wurden die Schnitte in der Lösung E (500ml SSC (350g NaCl (Merck 6404), 176,5g Na-Citrat (Fluka 71405) auf 2l Tridest, pH 7,4), und 10ml EDTA auf 5l Tridest auffüllen und 25ml DTT) aufgefangen um sie kurz zu spülen. Danach wurden sie 15 min. bei 45°C in Lösung F (250ml SSC (350g NaCl (Merck 6404), 176,5g Na-Citrat (Fluka 71405) auf 2l Tridest, pH 7,4 und 10ml

EDTA auf 5l Tridest auffüllen und 25ml DTT), 5ml Triton (Fluka 93218) und 250ml Formamid (Fluka 47670)) gespült.

Im Anschluss erfolgte die dreimalige Spülung der Schnitte für 25 min. bei 60°C in Lösung B (250ml SSC (350g NaCl (Merck 6404), 176,5g Na-Citrat (Fluka 71405) auf 2l Tridest, pH 7,4 und 10ml EDTA auf 5l Tridest auffüllen mit 25ml DTT), 5ml Triton). Abschließend wurden die Schnitte zweimal für 15 min. bei 60°C in Lösung C (20ml SSC (350g NaCl (Merck 6404), 176,5g Na-Citrat (Fluka 71405) auf 2l Tridest, pH 7,4 und 10ml EDTA auf 5l Tridest auffüllen mit 25ml DTT) gespült.

Zum Verdau nicht gebundener RNA-Sonden wurden die Schnitte in ein RNase-Bad (50ml 5M NaCl (Merck 6404), 5ml 1M Tris (Merck K11503882) pH7,4, 2,5ml DTT (Sigma D-0623) auf 500ml Tridest auffüllen, 20mg RNase A (Sigma R-4875), 24µl RNase T1(Sigma R-1003) bei 37°C für 40 min gebadet und danach mit der Waschlösung D für zweimal 15 min. bei 60°C gewaschen. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte für 2 min. in 1l 70 % Ethanol und 27,5g Ammoniumacetat (Fluka 09690) gewaschen, um im Anschluss für 2 min. in 1l 96 % Ethanol und 25,7g Ammoniumacetat (Fluka 09690) überführt zu werden. Die Schnitte wurden für 15 min unter dem Abzug getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in einer Dunkelkammer in eine Autoradioemulsion (Kodak NTB) getaucht und anschließend in einem lichtundurchlässigen Kasten im Kühlschrank bei 6° C für eine Woche gelagert.

Die Entwicklung der Autoradiographie erfolgt im Dunkeln. Zunächst wurden die Schnitte für 4 min. mit einer Entwickler-Lösung bedeckt und dann mit Aqua dest gespült. Danach wurden sie für 12 min. mit einer Fixier-Lösung behandelt und danach in Aqua dest. überführt.

Die Kernfärbung erfolgte für 10 min. in Hämalaun nach Mayer und im Anschluss erfolgt das Bläuen unter fließendem Wasser für 10min. Die Schnitte wurden mit Kaiser's Gelantine eingedeckelt.

3.2.5. Die Auswertung der Präparate:

Die Präparate wurden, mit Ausnahme der *in situ* Hybridisierung, mit einem AxioImager M1 Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) ausgewertet. Bei der quantitativen Bestimmung der CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten habe ich die Software AxioVision Release 4.6 verwendet. Die Autoradiographie für SIV RNA wurde mit dem Axioscope Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) ausgestattet mit einem Plan Neofluar und einer 3 CD Farbkamera sowie der entsprechenden Software ausgewertet.

Wir führten im NALT, in der Lamina propria (LP) und der Tonsilla pharyngealis (TP) die quantitative Bestimmung der CD4 und der CD8 positiven Zellen durch. Dazu wurden für die Lamina propria bis zu 10 nicht überlappende Areale in einer 40x Vergrößerung ausgewählt und photographiert, Fotogröße 220 x 160µm. Im NALT und in der pharyngealen Tonsille wurden ebenfalls bis zu 10 nicht überlappende Areale ausgesucht und in der gleichen Vergrößerung im Bereich der Keimzentren und der T abhängigen Zone photographiert. Anschließend wurden mit der o.g. Software die Zellen gezählt. Aus den einzelnen Ergebnissen wurde der Mittelwert für die jeweilige Region berechnet.

In der Tonsilla pharyngealis und im NALT wurden die T-Zellzonen ausgezählt. In den Fällen, in denen das Gewebe zu klein war um 10 Gesichtsfelder auszuzählen, wurden so viele Gesichtsfelder ausgezählt wie ohne Überlappung eingestellt werden konnten. In einigen Tieren konnten aufgrund der Gewebeschädigung die CD4 und CD8 positiven Zellen nicht ausgezählt werden. Durch diese Unterschiede in der Größe der anatomischen Strukturen können die Ergebnisse verfälscht sein.

4. Ergebnisse

4.1. Histologie und Immunhistochemie

4.1.1. Die histologische und immunhistochemische Charakterisierung des NALT bei unbehandelten Tieren

Bei der Untersuchung und Auswertung des Materials haben wir die Nomenklatur verwendet, die von Bradtzaeg et al 2004 vorgeschlagen und von der Society for Mucosal Immunology akzeptiert wurde. Nach dieser Nomenklatur repräsentiert das NALT ein organisiertes lymphatisches Gewebe das der *inductive site* des Immunsystems der Schleimhäute zuzuordnen ist. Dagegen stellt die Lamina propria und das Epithel die *effector site* dar (Brandtzaeg et al. 2008).

Mikroskopische Lokalisation des NALT in der Nasenhöhle

Zunächst erfolgte die mikroskopische Auswertung der aus verschiedenen Arealen der Nasenhaupthöhle gewonnenen Schleimhaut und die der Nasenmuscheln aller 120 Affen. Im Gegensatz zum Nagetier kann man das lymphatische Gewebe beim Affen makroskopisch nicht erkennen. Bei dieser Arbeit wurden HE und Giemsa Färbungen von allen Macacen und in mehreren Fällen auch eine PAS-Reaktion ausgewertet.

Bei der Durchsicht der Nasenschleimhaut ließ sich bei jedem der Macacen im Bereich, der dem harten und weichen Gaumen unterliegenden Schleimhaut umschriebenes lymphatisches Gewebes feststellen.



Abb. 2. Mikroskopische Lokalisation des NALT. Mehrere lymphatische Gewebe (durch Kreise markiert) liegen in dem subepithelialen Gewebe. Die histologischen Gebiete zwischen dem lymphatischen Gewebe repräsentieren die *effector site* des mukosalen Immunsystems. Giemsa Färbung.

In 80% der Tiere konnten auch Lymphozytenansammlungen mit oder ohne Sekundärfollikel im Bereich der Nasenmuscheln festgestellt werden. Es wurde nicht unterschieden, ob es sich um den ventralen oder den dorsalen Abschnitt der Nasenmuschel handelte oder zwischen der mittleren und der unteren Nasenmuschel. Im Vergleich zur Häufigkeit und Größe der Ansammlungen ließ sich beim Affen deutlich weniger lymphozytäres Gewebe an der Oberfläche der Conchae feststellen als im Bereich des Nasenhöhlenbodens. 73 % des NALT konnte ich in der Nasenschleimhaut im dorsalen Bereich der Cavitas nasi unterhalb des harten Gaumens finden, 8% konnten im ventralen Abschnitt der Cavitas nasi in der Nasenschleimhaut gefunden werden. 15% des NALT befand sich im seitlichen Bereich der Nasenhöhle und auf den Nasenmuscheln. In der Schleimhaut, die den kranialen Abschnitt der Nasenhöhle auskleidet, konnte kein NALT gefunden werden.

Im Bereich des Pharynxdaches konnte bei allen untersuchten Tieren die Tonsilla pharyngealis makroskopisch und mikroskopisch identifiziert werden.

Bei der genaueren Untersuchung der Schleimhaut des Nasenhöhlenbodens, die dem harten Gaumen aufliegt zeigte sich, dass die Menge des lymphatischen Gewebes deutlich zunimmt vom Naseneingang/ Vestibulum nasi in Richtung Pharynx/ Pars nasalis pharyngealis.

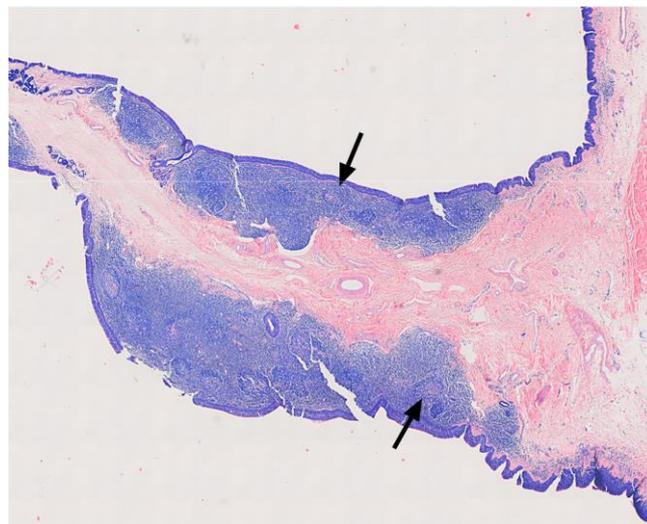


Abb. 3. Pharyngeale Tonsille. Ausgedehntes lymphatisches Gewebe mit Keimzentren (Pfeile). Giemsa Färbung.

Die mikroanatomische Struktur des NALT

Die oberen Atemwege sind mit respiratorischem Epithel ausgekleidet. Es handelt sich um ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel dessen Zellen am apikalen Zellpol mit dichten Flimmerhärchen (Kinozilien) ausgestattet sind. Innerhalb des Epithels sind Becherzellen eingestreut (Abb. 4 A und B)

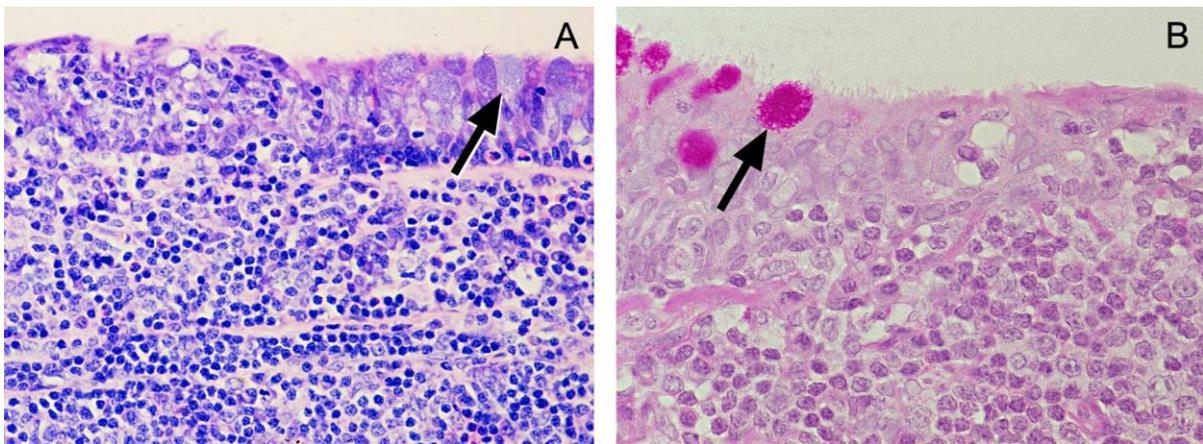


Abb. 4 Das Lymphoepithel des NALT. Das Epithel wird durch mononukleäre Zellen, überwiegend Lymphozyten infiltriert. Becherzellen (Pfeile) und Flimmerhärchen, die in dem respiratorischen Epithel vorhanden sind, fehlen hier. A.: Giemsa Färbung. B: PAS Reaktion .

Im Bereich des NALT ändert sich die epitheliale Auskleidung der Nasenhöhle das respiratorische Epithel geht in ein Lymphoepithel (LE) über. Die Epithelzellen sind abgeflacht und tragen keine Flimmerhärchen. Auch die Becherzellen fehlen. Zwischen den Epithelzellen sieht man eine Infiltration bestehend aus Lymphozyten und einzelnen großen Zellen nicht lymphatischen Ursprungs (Abb. 4 und Abb. 5B).

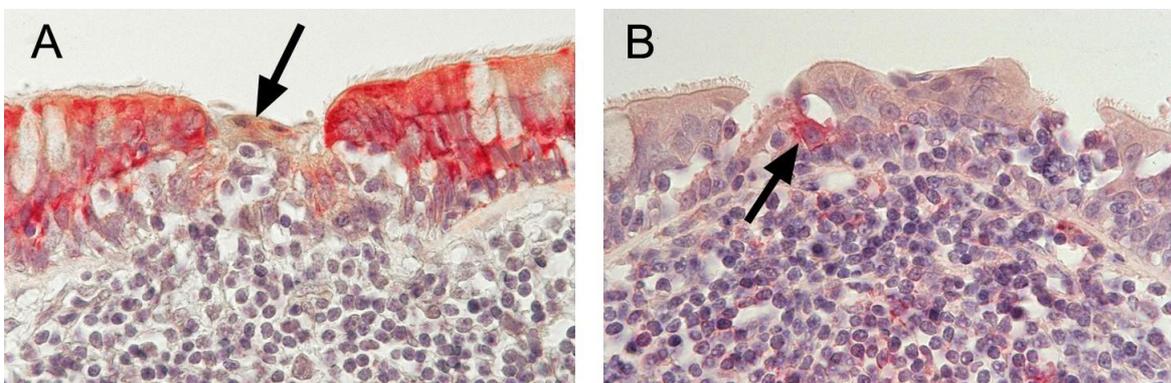


Abb. 5 Der Pfeil zeigt auf Zellen des LE, die an M Zellen erinnern (A). Zytokeratin Reaktion. B. Reife, CD83⁺ dendritische Zellen (Pfeil) im LE.

Mit Hilfe der Zytokeratinfärbung lässt sich das respiratorische Epithel, beziehungsweise der Übergang ins das Lymphoepithel besonders gut darstellen, da die Unterbrechung der Basallamina in diesem Bereich erkennbar wird. Lymphoepithel lässt sich sowohl im Bereich der Tonsilla pharyngealis nachweisen, wie über den Domen im Bereich des NALT, vergleichbar mit den Peyerschen Plaques.

Einige Epithelzellen sind derart flach, dass sie an Antigen-transportierende M Zellen erinnern (Abb. 5 A). Die Basallamina, die das Epithel von der Lamina propria trennt, ist unter dem LE unterbrochen und man sieht einen fließenden Übergang des LE zu dem darunter liegenden lymphatischen Gewebe.

Unterhalb des LE findet sich ein Domareal (Abb. 6). In unmittelbarer Nähe findet sich ein primärer oder sekundärer Lymphfollikel. Die primären Lymphfollikel bestehen überwiegend aus Lymphozyten. Das Keimzentrum des sekundären Lymphfollikels besitzt eine dicht besiedelte und eine dünn besiedelte Zone. Die dicht besiedelte Zone besteht aus Zentroblasten, Sternhimmelzellen, d.h. Makrophagen, die apoptotische Zellen phagozytiert haben, und gelegentlich auch Plasmazellen. Charakteristische Zellen der dünn besiedelten Zone sind die Zentrozyten.

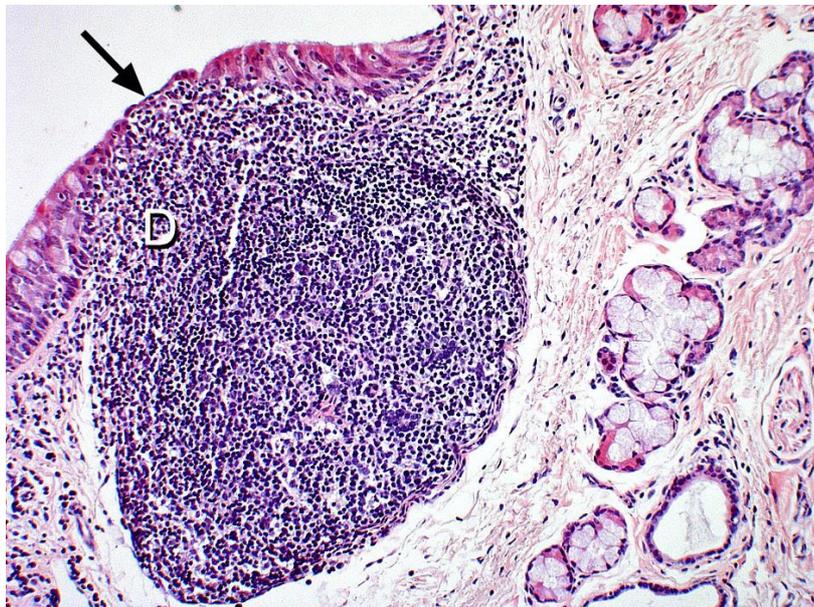


Abb. 6: Histologische Struktur des NALT. Das LE mit den vielen infiltrierenden Lymphozyten ist dargestellt (Pfeil). Diese Region geht fließend in das Domareal über (D). Darunter befinden sich die T-abhängige und B-abhängige Zone, die immunhistochemisch gut detektierbar sind (dargestellt auf Abb. 7 und 9). HE.

Die Zentroblasten besitzen ein schmales, tief basophiles Zytoplasma und mehrere mittelgroße Nukleolen in einem rundlichen Kern der eine lockere Chromatinstruktur aufweist. Dem gegenüber sind die Kerne der Zentrozyten unregelmäßig geformt, oft gekerbt. Der hell gefärbte Zytoplasmasaum ist schmal. Die Mantelzone umgibt etwa zwei Drittel des Keimzentrums.

Durch die Anwendung der immunhistochemischen Färbung sieht man, dass der Löwenanteil der Zellen der primären und sekundären Follikel sowie der Mantelzone das CD20 Antigen trägt (Abb. 7). Dieser Befund, wie auch die klassische Histologie, spricht dafür, dass das NALT *eine B-Zell abhängige Zone* besitzt. Sowohl im NALT als auch in der Tonsilla pharyngealis nehmen die B-Zell abhängigen Zonen große Areale ein. B-Zellen sind auch in dem parafollikulären lymphatischen Gewebe und im LE vorhanden. Sehr viele CD20⁺ Lymphozyten befinden sich in dem Domeareal. Die B Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche IgG, IgM oder IgA (Abb. 7).

Eine wichtige nicht lymphatische Zellpopulation stellen in den primären und der sekundären Follikeln die follikulären dendritischen Zellen (FDC) dar, die ein Netzwerk bilden (Abb. 7). Immunhistochemisch haben wir sie mit Hilfe von Antikörper gegen Komplementrezeptor 1 (CR1), CD35, dargestellt. CD35 ist auch auf B Zellen nachweisbar. Bei der Beurteilung der FDC ist jedoch die Expression von CD35 auf B-Zellen ist nicht störend, da in Paraffinschnitten die Immunreaktion bei den B Zellen nur eine mäßige Intensität aufweist. Dem gegenüber führt die hohe Antigendichte des CR1 auf den FDC zu einer sehr markanten Immunfärbung. Durch die hohe und niedrige Farbindensität lassen sich die zwei Zellpopulationen mit Sicherheit voneinander unterscheiden. Mit Hilfe der Anwendung des Antikörpers gegen CXCL13 lässt sich dieser Chemokine-Ligand in einigen Keimzentren nachweisen (Abb. 7).

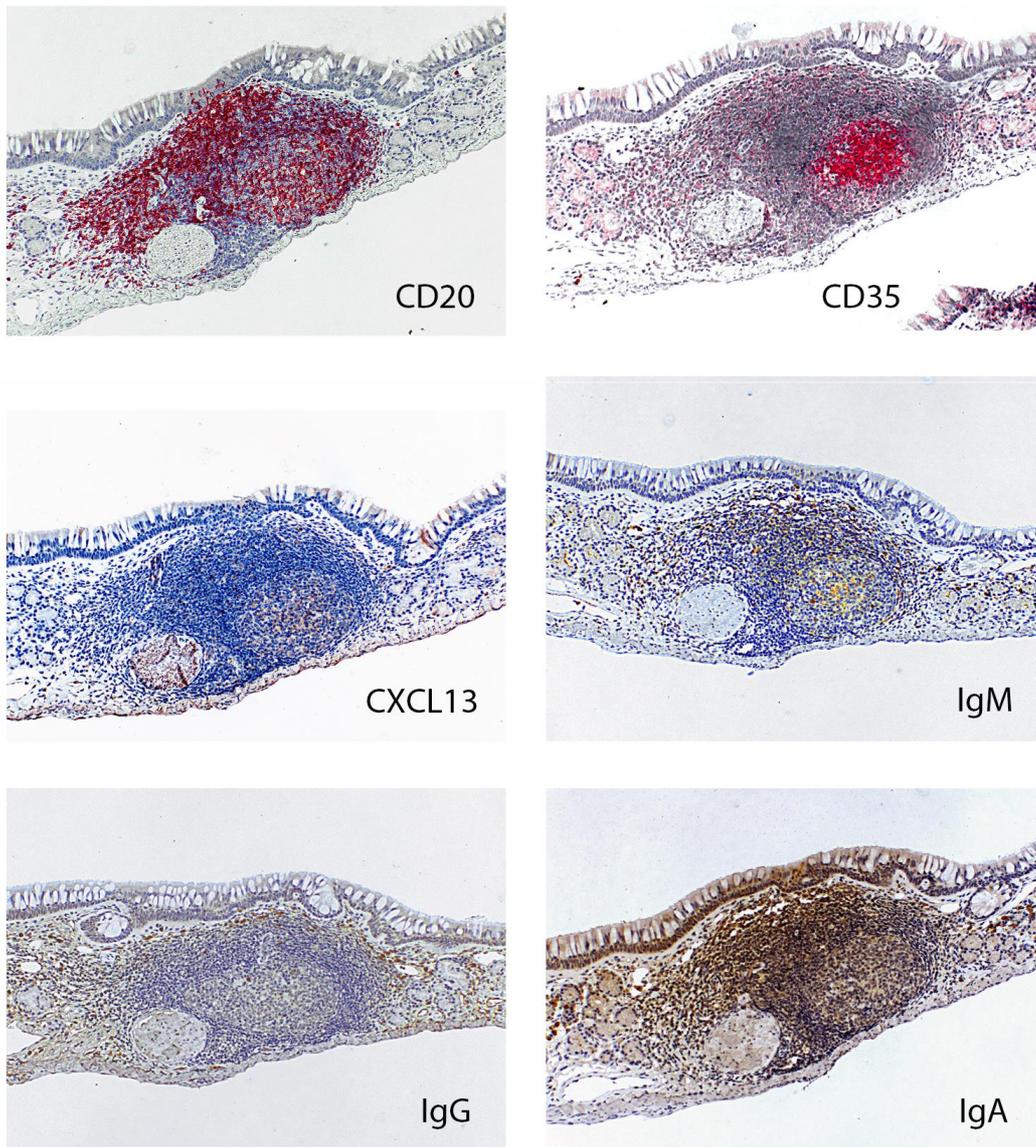


Abb. 7 Immunhistochemische Charakterisierung des NALT. B-Zell abhängige Areale. Der B Zellmarker CD20 ist überwiegend in dem sekundären Follikel und im Domareal exprimiert. Positive Zellen sind auch im Lymphoepithel zu finden. Eine starke Expression des Komplementrezeptors CR1 (CD35) ist an den folliculären dendritischen Zellen zu beobachten. Der Rezeptor ist auch auf B Zellen nachweisbar. Der Chemokine-Ligand 13, der auf B Zellen chemotaktisch wirkt, ist im Keimzentrum nachweisbar. Die schweren Immunglobulinketten μ , γ , und α sind in den B Arealen detektierbar.

Die *T-Zell abhängige Zone* befindet sich parafolikulär. Ein Teil des parafolikulären lymphatischen Gewebes enthält Venolen, die mit einem hohen Endothel ausgekleidet sind (*high endothelial venules*, HEV).

Im Lumen dieser HEV und zwischen den Endothelzellen sieht man Lymphozyten (Abb. 8).

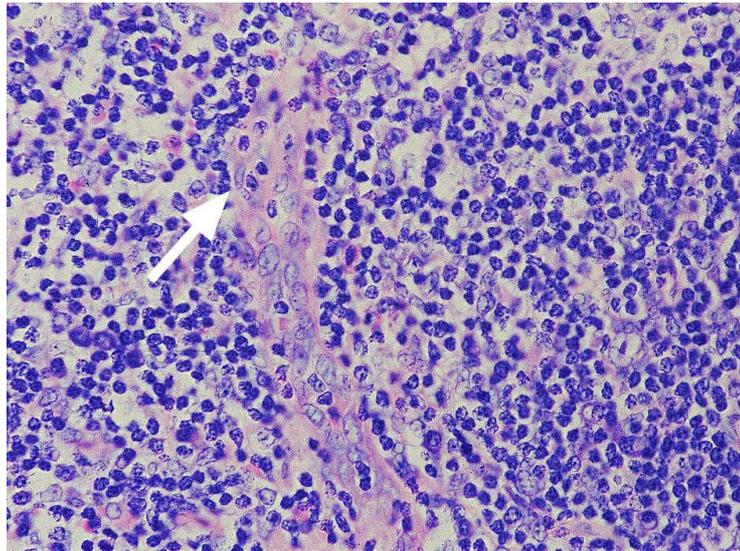


Abb. 8 Charakteristische Struktur der T-Zell abhängigen Zone. Der Pfeil zeigt eine Venole mit hohem Endothel. Es finden sich viele Lymphozyten zwischen den Endothelzellen. Giemsa Färbung

Bei der Beurteilung der T Zellreihe haben wir die Antikörper, die gegen die Antigene CD4, CD8, Perforin, Granzyme B und FOXP3 gerichtet sind, verwendet.

Bei unbehandelten Kontrolltieren stellen die CD4⁺ Lymphozyten die Mehrzahl der lymphatischen Zellen in der T-abhängigen Zone dar (Abb. 9). Die Zellen sind hier dicht gelagert. Positive Zellen findet man sowohl unter kleinen Lymphozyten wie auch unter großen lymphatischen Blasten. Locker eingestreut sind CD4⁺ Lymphozyten auch im Domareal und im LE nachzuweisen. Sie kommen auch in den primären und sekundären Follikeln des NALT (Abb. 9) und der pharyngealen Tonsille vor (Abb. 10A). Sie sind immer locker eingestreut und in der Regel in der dünn besiedelten Zone beheimatet (Abb. 10 A).

Die CD8⁺ Lymphozyten sind überwiegend in der T-abhängigen Zone zu finden. Ihre Anzahl ist wesentlich niedriger als die der CD4⁺ Lymphozyten. Die CD4:CD8 Ratio liegt um 2.6 (Tabelle 3).

CD8⁺ Lymphozyten kommen auch in den Domarealen oder im LE vor. Sowohl im NALT wie auch in der pharyngealen Tonsille findet man in den Keimzentren nur eine sehr geringe Anzahl von CD8⁺ Zellen (Abb. 9 und Abb. 10B). Im Gegensatz zu den CD4⁺ Lymphozyten zeigen die CD8⁺ Zellen keine bevorzugte intrafollikuläre Lokalisation.

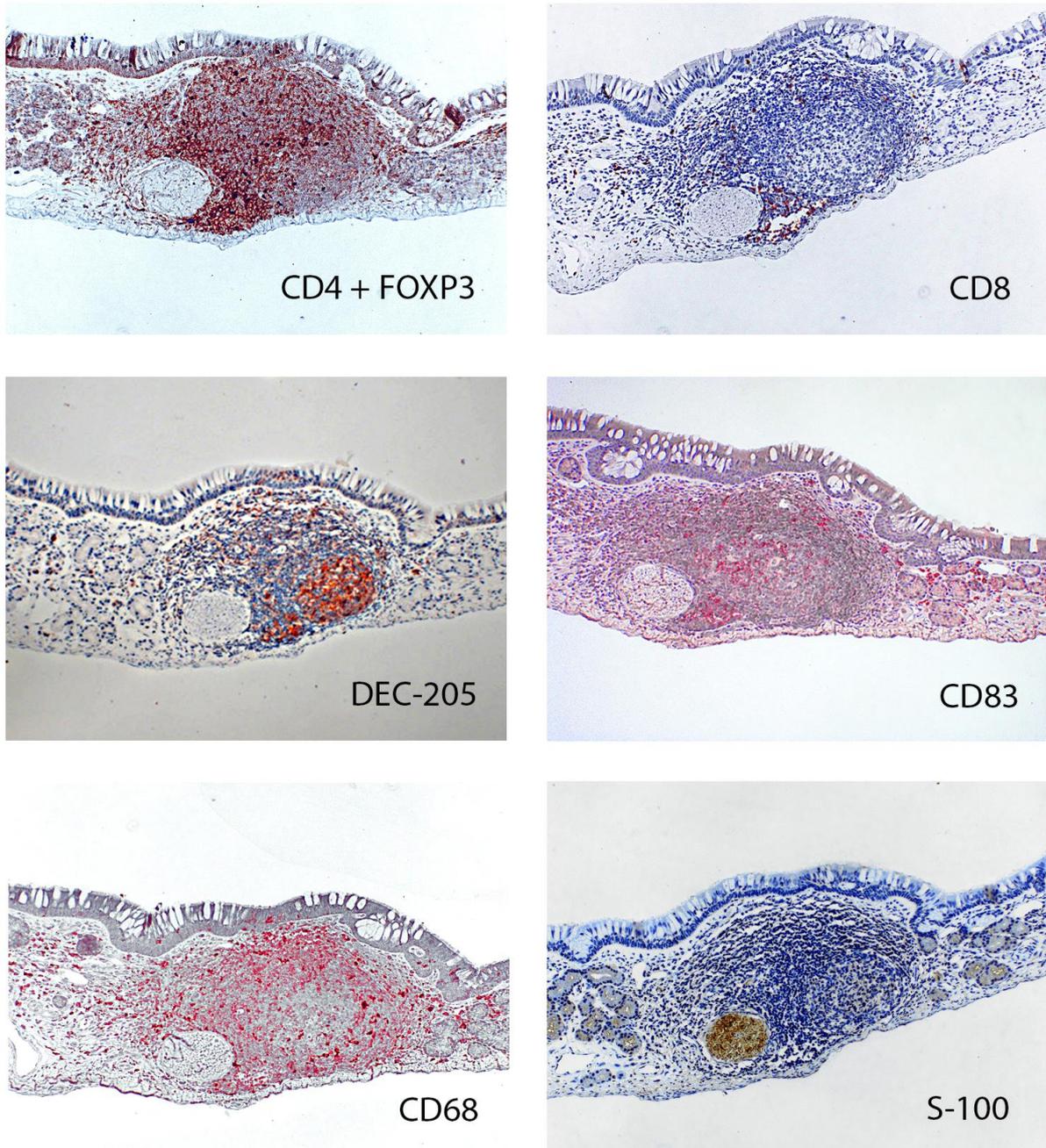


Abb. 9 Immunhistochemische Charakterisierung des NALT. CD4⁺ Lymphozyten sind überwiegend in der T-abhängigen Zone und im Domareal lokalisiert, eine geringe Anzahl befindet sich auch in den Keimzentren und im LE. Die CD8⁺ Zellen findet man in der T-Zell-Zone und nur sehr selten in den Keimzentren. CD205 (DEC-205) und CD83 werden von den dendritischen Zellen und z. T. auch von Makrophagen exprimiert. Die Mehrzahl dieser Zellen befinden sich in der T-abhängigen Zone. Die hohe Densität des CD83 Antigens auf den dendritischen Zellen ist an der Intensität der Färbung gut sichtbar. Das NALT verfügt über viele CD68⁺ Makrophagen. Die Reaktion mit dem S-100 Protein demonstriert ein Abgang des Nervus trigeminus. Der Nerv ist auf allen Aufnahmen auch durch die Hämalaun Kontrastfärbung gut erkennbar Die immunhistochemisch positiven Zellen sind in der Abbildung durch die rote bzw. braune Farbe erkennbar.

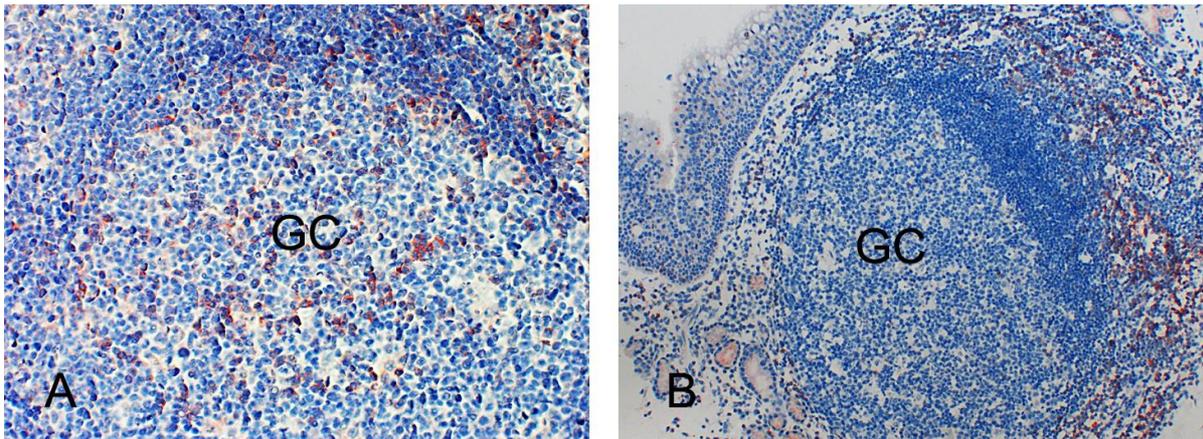


Abb. 10. T-Zellen im Keimzentrum. A: Verteilung der CD4⁺ Lymphozyten (rot) in einem Keimzentrum (*germinal center*, GC). Die positiven Zellen sind in der dünn besiedelten Zone lokalisiert. B: Das Keimzentrum enthält nur eine sehr niedrige Anzahl dieser Zellen. Die CD8⁺ Lymphozyten (rot) befinden sich überwiegend in der T-Zone. Pharyngeale Tonsille. APAAP Reaktion

Die zytotoxischen Granula, über die eine Subpopulation der CD8⁺ Lymphozyten sowie die natürlichen Killer(NK)-Zellen verfügen, wurden mit Antikörpern gegen Granzyme B und Perforin dargestellt. Die Verteilung dieser Zellen entspricht der, der CD8⁺ Zellen. Sie sind hauptsächlich in der T-Zone festzustellen (Abb. 11). Im Dom, im LE und in den Keimzentren sind sie nicht auf allen Schnittebenen nachzuweisen.

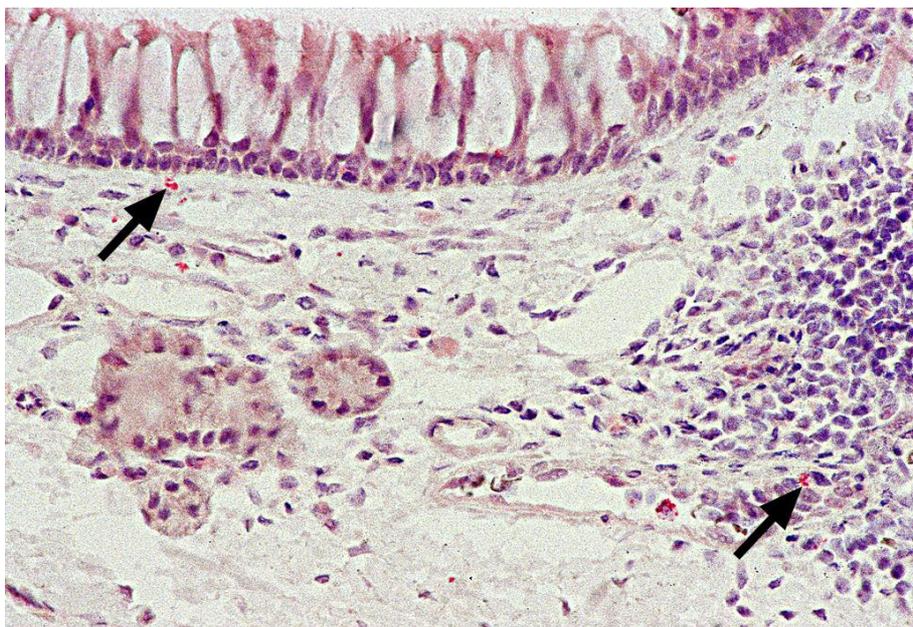


Abb. 11. Perforin positive Zellen (rot und Pfeile) in der T-abhängigen Zone des NALT und der Lamina propria der Nasenschleimhaut. APAAP Reaktion.

Eine andere charakteristische Zellpopulation nicht lymphatischen Ursprungs sind die großen dendritischen Zellen mit einem breiten, sehr blassen Zytoplasmasaum und einem großen ovalen oder irregulär geformten Kern, mit scharfen Kernkonturen und sehr feinem Chromatin. Diese Zellen sind immunhistochemisch, z.B. durch das CD83 Antigen (Abb. 12), CD205 (DEC-205) oder das S-100 Protein gut darstellbar. Diese Eigenschaften sprechen dafür, dass es sich bei diesen Zellen um aus dem Knochenmark stammende dendritische Zellen (DC) handelt.

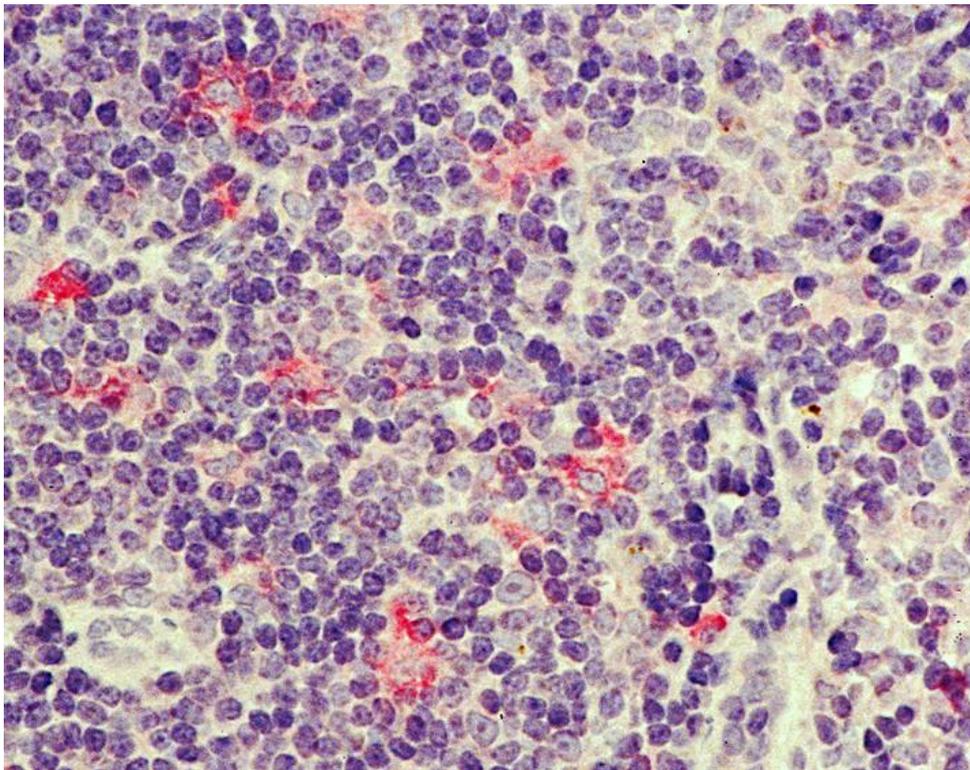


Abb. 12. CD83⁺ dendritische Zellen (rot) in der T-abhängigen Zone. APAAP- Reaktion

Obwohl diese Antikörper nicht linienspezifisch sind, sie erkennen auch einen Teil der Makrophagen oder, wie das S-100 Protein, die Nerven, besitzen sie großen Nutzen bei der Beurteilung von DC. Die hohe Antigendichte auf diesen Zellen führt zu einer immunhistochemischen Reaktion von einer derart ausgeprägten Intensität, die bei Makrophagen nicht zu beobachten ist. Die Mehrzahl der DC befindet sich in der T-Zell-abhängigen Zone des NALTs (Abb. 9) und der pharyngealen Tonsille (Abb. 12). Auch im LE lassen sich vereinzelt CD83⁺ DCs darstellen (Abb. 5 B).

Makrophagen wurden durch CD68 markiert. Diese Zellen finden sich in allen mikroanatomischen Arealen des NALT und der pharyngealen Tonsille: Sie sind im LE, im Domareal, im Keimzentrum und im extrafollikulären Parenchym nachweisbar (Abb. 9).

Bezüglich nicht lymphatischer Gewebekomponenten erscheint uns ein wichtiger Befund der Nachweis von Nerven innerhalb des NALTs zu sein. Nervenbündel kann man auch mit Hilfe der klassischen Histologie erkennen, ihre Darstellung mit dem Antikörper S-100 ist aber besonders beeindruckend (Abb. 9).

Die effector site der Nasenschleimhaut

Im Naseneingang und in Anteilen des Pharyngxs findet man ein mehrschichtiges Plattenepithel. Die Regio respiratoria, die fast die gesamte Nasenhöhle einnimmt, ist von einem mehrreihigen Flimmerepithel ausgekleidet. Eingestreut sind viele Becherzellen (Abb. 4). Das respiratorische Flimmerepithel ist durch eine Basalmembran von der Lamina propria getrennt. In dem lockeren Bindegewebe der Lamina propria liegen einige Lymphozyten, Plasmazellen und Blutkapillaren. Eingestreut finden sich zahlreiche Nasendrüsen.

Immunhistochemisch kann man Zeichen der Immunglobulin-Produktion zeigen. Plasmazellen mit intrazytoplasmatischem IgA, IgG und IgM sind nachweisbar wobei die IgA Produktion im Vordergrund steht (Abb. 13).

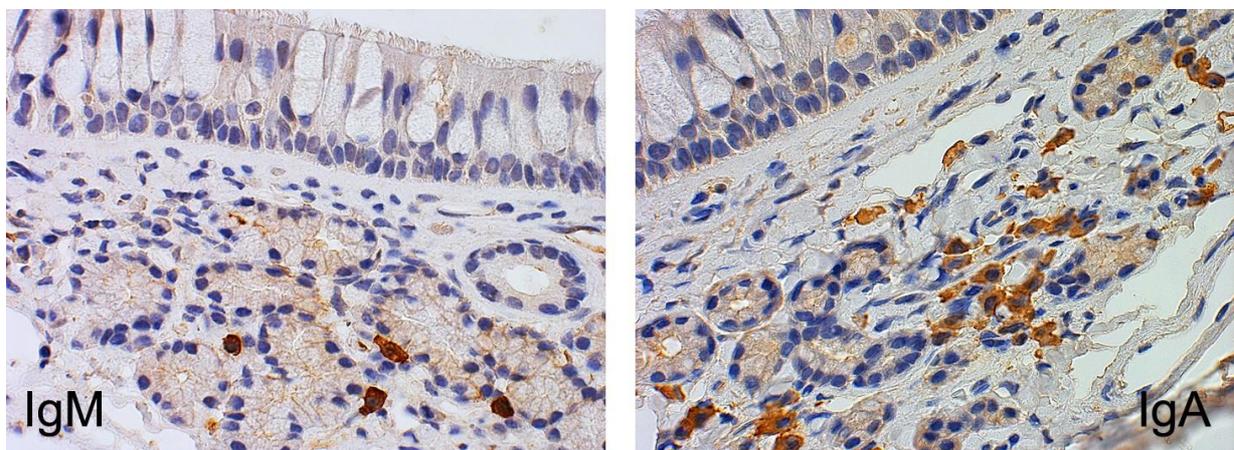


Abb. 13. IgM und IgA-produzierende Plasmazellen (braun) in der Lamina propria bei einem unbehandelten Kontrolltier. PAP-Reaktion

Bei den immunisierten Tieren zeigt sich eine erhöhte Anzahl von IgA positiven Zellen in den Domarealen und in der Lamina propria. Während man bei allen untersuchten Tieren eine sehr starke Expression von IgG in der Tonsille findet, zeigt sich im NALT in einigen Tieren eine sehr viel geringere Anzahl an IgG produzierenden Zellen. IgM produzierende Zellen können im sowohl im NALT als auch in der Tonsille gefunden werden, wenn auch deutlich seltener als IgG oder IgA positive Zellen.

Unter den Lymphozyten waren die CD20⁺ B-Zellen in einer geringen Anzahl vorhanden. Bei den T-Zellen waren sowohl die CD4⁺ Lymphozyten wie auch die CD8⁺ Zellen in der Lamina propria nachweisbar (Abb. 14). Die CD4:CD8 Ratio lag um 2.3.

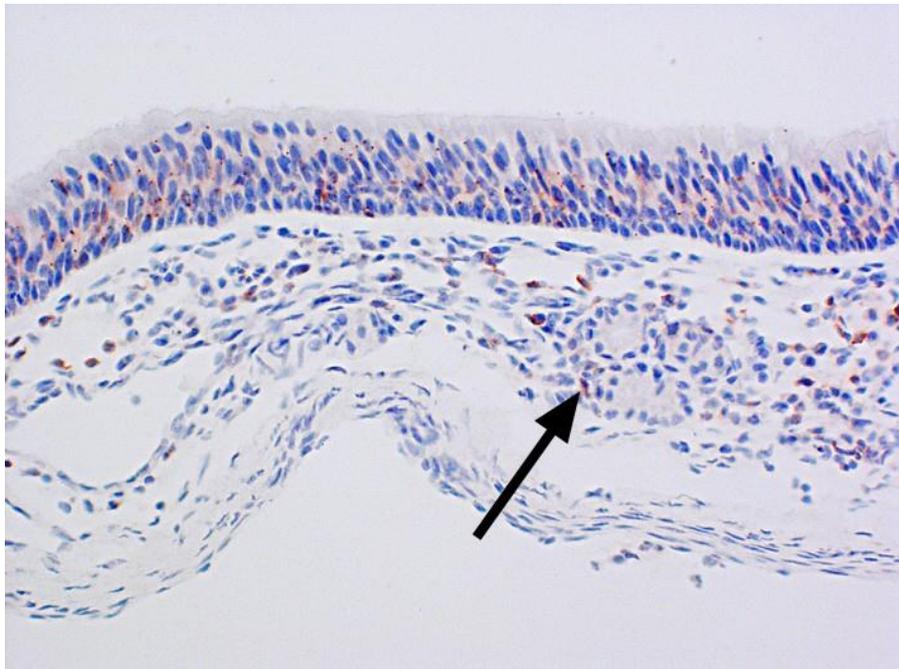


Abb. 14: CD8⁺ Lymphozyten in der Lamina propria (Pfeil). Positive Zellen (rot) sind auch zwischen den Epithelzellen nachzuweisen. APAAP Reaktion

Zellen mit zytotoxischen Granula, d.h. Perforin und Granzyme B positive Zellen sind in das lockere Bindegewebe der Lamina propria eingestreut (Abb. 15 A und B). Bei allen Kontrolltieren (Gruppe 2) war die Anzahl der Granzyme B positiven Zellen höher als die der Zellen mit Perforin-haltigen Granula. Zellen mit zytotoxischen Granula waren auch zwischen den Epithelzellen nachzuweisen.

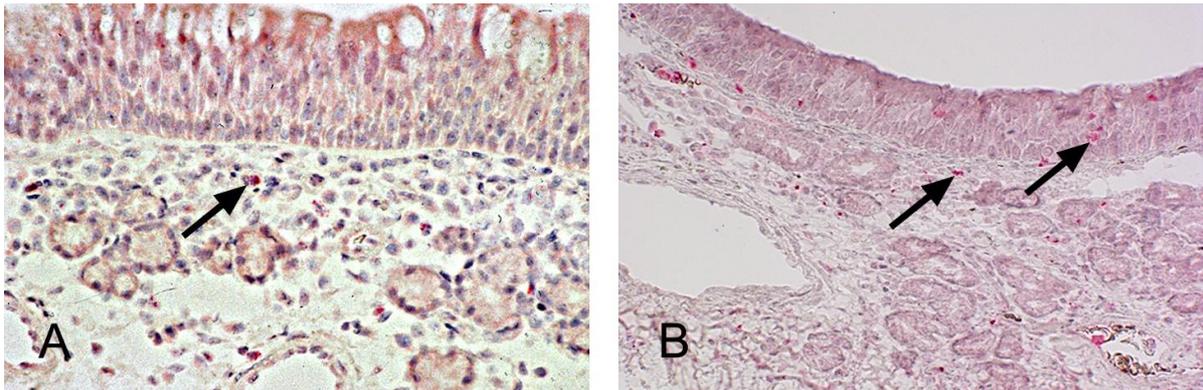


Abb. 15. Verteilung der Perforin (Bild A) und Granzyme B positiven Zellen (Bild B) in der Lamina propria. Die positiven Zellen erscheinen rot und einige sind mit Pfeilen markiert

4.1.2. Mikroskopische Veränderungen im NALT in den verschiedenen Behandlungsgruppen

In den Tieren aus der Gruppe 1 (Z. n. atraumatischer Verabreichung von SIVmac239 via der Tonsilla palatina) und der Gruppe 3 (Z. n. Behandlung mit einer experimentellen Vakzine sowie Vakzinierung mit nachfolgender Exposition mit HIV via der Tonsilla palatina) konnte man gegenüber den unbehandelten Macaccen histologische Veränderungen feststellen. Bei allen Affen der Gruppe 1 und 3 war eine Hyperplasie des NALT erkennbar.



Abb. 16: Mehrere hypertrophe Keimzentren im NALT mit vielen proliferierenden Zellen bei einem Affen der Gruppe 3 (Immunisierung mit VLP in den Wochen 0, 4, 8, 16, 20, 24, 28. Exposition mit SIVmac239: in der Woche 32). MIB-1 Reaktion.

Es zeigten sich viele Sekundärfollikel mit großen Keimzentren, die sich teilweise perlenschnurartig aneinander reihten (Abb. 16) oder sogar miteinander verschmolzen. Auch das parafollikuläre lymphatische Gewebe, einschließlich der T-abhängigen Zone war breiter als in der Kontrollgruppe. Bei allen Affen der Gruppe 1 und 3 zeichneten sich die lymphatischen Gewebe durch eine vermehrte Proliferation aus. Die meisten der MIB-1 positiven Zellen waren im Bereich der vergrößerten Keimzentren (Abb. 16 und 17)

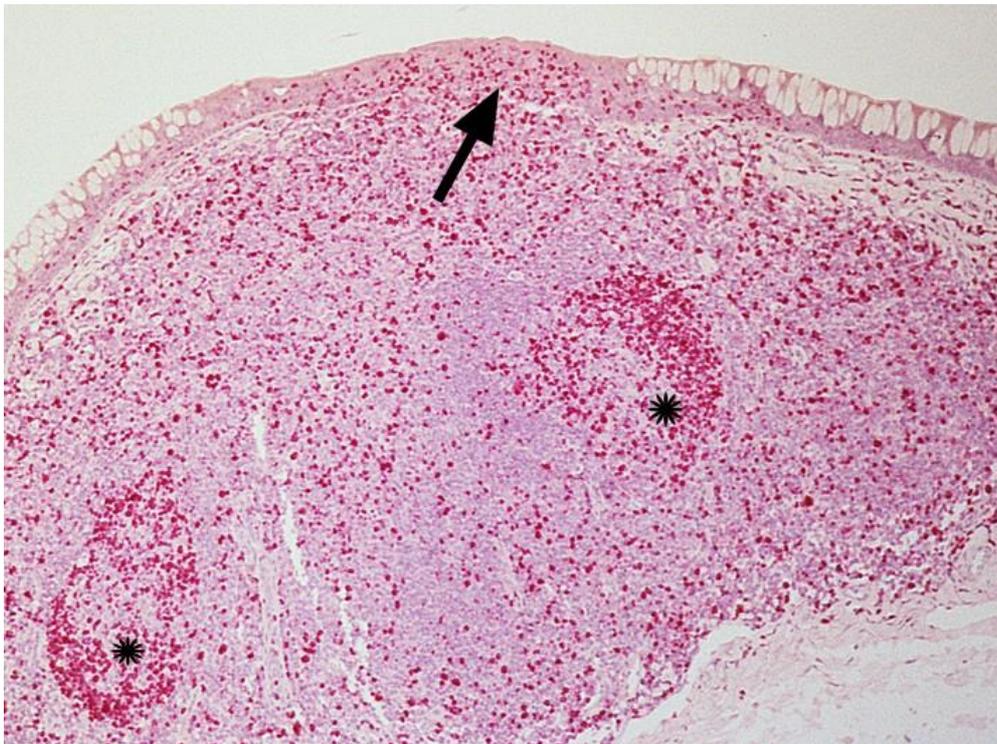


Abb. 17: Chronische SIV-Infektion (Gruppe 1). Stark erhöhte Anzahl von proliferierenden Zellen (rot) nicht nur in den Keimzentren (Sterne), sondern auch in Lymphoepithelium (Pfeil) und im extrafollikulären lymphatischen Parenchym. MIB-1-Reaktion

Nicht nur in den Keimzentren zeigte sich eine erhöhte Zellproliferation, viele proliferierende Zellen waren auch im extrafollikulären lymphatischen Gewebe und im Lymphoepithel (Abb. 17).

Parallel mit der Vergrößerung der B-abhängigen Areale war auch eine Ausdehnung des FDC-Netzwerkes festzustellen. Dieser Befund wurde durch die Anwendung des Antikörper gegen CR1 (CD35) nachgewiesen. Eine Destruktion des FDC-Netzwerkes oder der Keimzentren wurden auch bei SIV infizierten Macaccen nicht

festgestellt. Die Expansion des FDC Netzes konnte man auch durch die Anwendung von CXCL13 sehr gut demonstrieren (Abb. 18). Der Chemokinrezeptor CXCL13 spielt eine wichtige Rolle bei der B-Zellwanderung in die lymphatischen Organe.

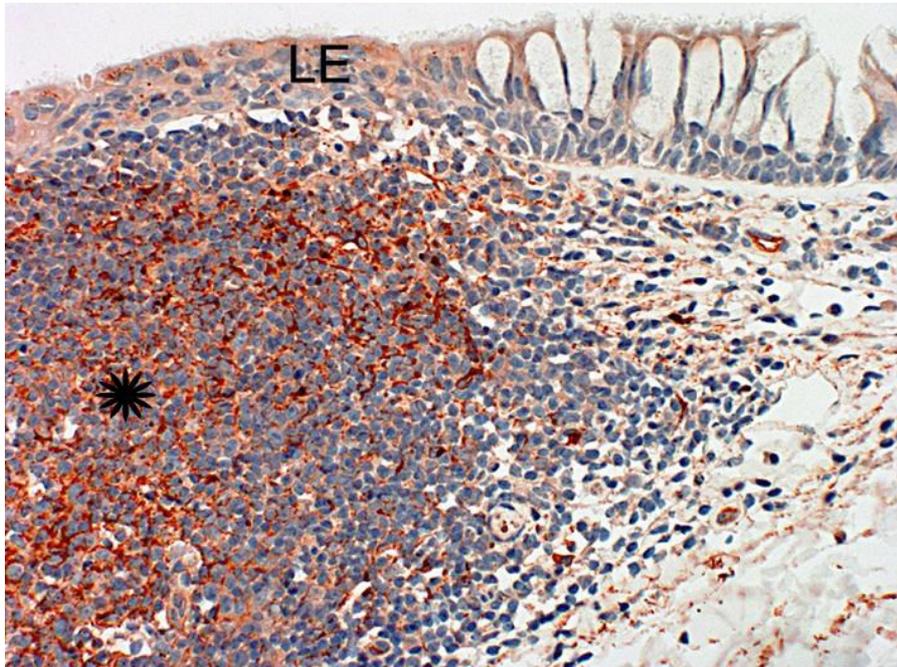


Abb. 18: Immunhistochemische Darstellung von CXCL13 im NALT bei einem Affen aus der Gruppe 3. Das Tier ist mit VLP immunisiert (in den Wochen 0, 6, 24, 32) und mit SIVmac239 exponiert (in der Woche 40). Expandiertes FDC Netzwerk in einem Sekundärfollikel (Stern). Einige positive Zellen befinden sich auch in dem extrafollikulären Parenchym. AEC Reaktion

Die Expression von CXCL13 konnten wir im NALT feststellen. Nicht alle Keimzentren waren positiv. Die Positivität der Keimzentren für CXCL13 war unabhängig von der Vorbehandlung der Affen. Ein wesentlicher Unterschied zwischen infizierten oder immunisierten Affen gegenüber unbehandelten Tieren war, dass bei den Kontrolltieren die CXCL13 positiven FDC nur innerhalb der Keimzentren nachzuweisen war, während man in den anderen Gruppen auch positive FDC in der Mantelzone demonstrieren konnte. Positiv reagierte außerdem die Auskleidung der Venolen mit hohem Endothel.

Ein auffälliger Befund war es, dass auch einzelne Zellen in der T-abhängigen Zone CXCL13 exprimierten. (Abb. 18). Die Zellen waren groß, besaßen einen breiten Zytoplasmasaum und ähnelten Makrophagen oder dendritischen Zellen.

Wir haben die Linienzugehörigkeit dieser Zellen mit Hilfe von Doppelmarkierungen charakterisiert. Wie erwartet, konnten wir CD68⁺CXCL13⁺ Makrophagen nachweisen (keine Abbildung). Überraschenderweise haben wir viele CXCL13 positive Zellen gefunden, die den dendritischen Zellen zuzuordnen sind. Sowohl in der CD205

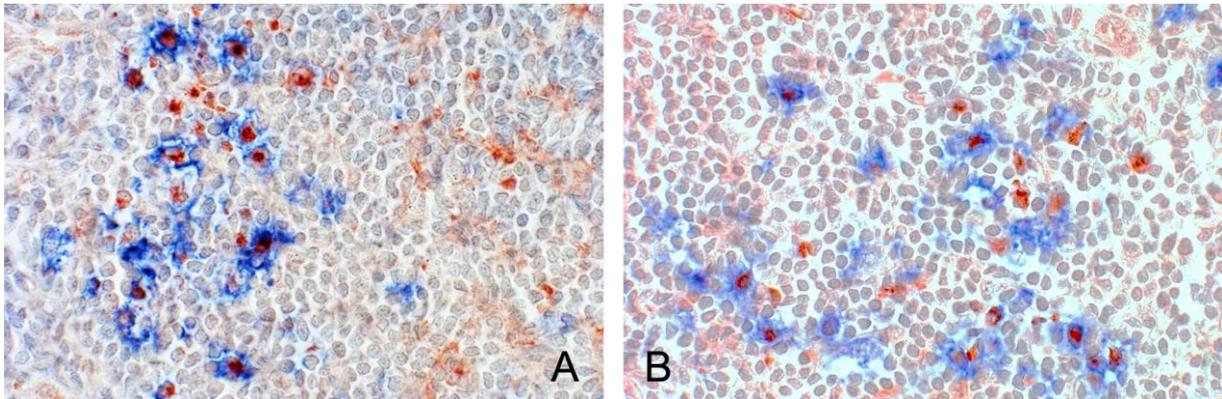


Abb. 19: Mehrere CD205⁺ dendritische Zellen (blau, Bild A) und CD83⁺ dendritischen Zellen (blau, Bild B) exprimieren CXCL13 (rot). Immunhistochemische Doppelmarkierung unter Verwendung des APAAP (blau) und des AEC (rot) Verfahren

(DEC-205) positive Subpopulation, wie auch unter den CD83⁺ reifen dendritischen Zellen fanden wir Zellen, die durch beide immunhistochemische Marker angefärbt wurden (Abb. 19). Der Anteil der doppelpositiven Zellen war hoch. Bei einer Vergrößerung mit dem 40x Objektiv waren etwa 40-65% der dargestellten dendritischen Zellen auch für den Chemokine-Liganden 13 positiv.

Mit dem gegen den Transkriptionsfaktor *forkhead box* (homo sapiens: FOXP3) gerichteten Antikörper haben wir die regulatorischen T- Zellen (Treg) dargestellt.

Wir konnten feststellen, dass FOXP3⁺ Zellen in allen 3 experimentelle Gruppen nachzuweisen sind. Auch die Verteilung in den verschiedenen histologischen Regionen des NALT stimmte überein. Die Mehrzahl der FOXP3⁺ Zellen befindet sich in der T-Zone; sie sind aber auch im Domareal, im LE und in der *effector site* nachweisbar (Abb. 20).

Bei den behandelten Tieren, unabhängig davon, ob sie nur vakziniert oder auch mit SIVmac239 infiziert worden waren, stieg die Anzahl der Treg an. Mit immunhistochemischen Doppelmarkierungen haben wir die FOXP3⁺ Zellen charakterisiert.



Abb. 20 Unbehandelter Kontrollaffe. Dargestellt sind FOXP3⁺ (dunkelblau) und CD4⁺ Zellen (braun) im NALT. Die Treg sind in der T-abhängigen Zone, im Domareal und im LE nachweisbar.

Wie wir erwartet haben, konnte die Mehrzahl der positiven Zellen den CD4⁺ Lymphozyten zugeordnet werden (Abb. 21). Etwa 12 - 23% der FOXP3⁺ Zellen exprimierten jedoch das CD4 Antigen nicht.

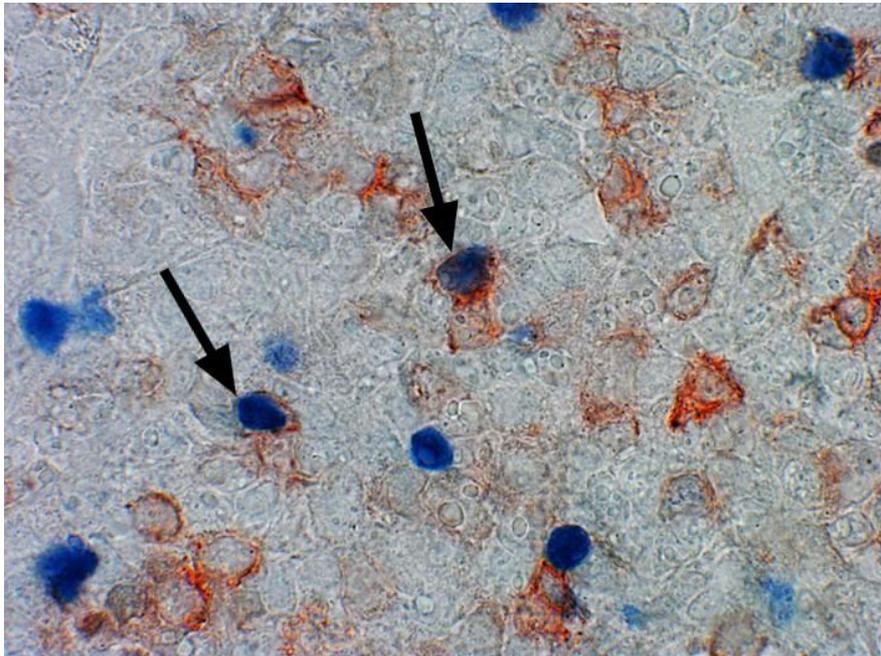


Abb. 21: Expression von FOXP3 innerhalb der CD8⁺ Lymphozytensubpopulation (Pfeile). Vakziniert mit VLP durch Spray oral (Woche 0, 4, 12, 16) und exponiert mit SIVmac239 in der Woche 24. FOXP3 (blau), CD8 (rot)

Zur weiteren Charakterisierung der CD4 negativen FOXP3⁺ Zellen haben wir Doppelmarkierungen mit FOXP3 und mit CD8 durchgeführt. Wir konnten feststellen, dass sowohl in Gruppe 1 wie auch Gruppe 3 doppelpositive Zellen nachweisbar waren. Etwa 5 -8% der FOXP3⁺ Zellen koexprimierten CD8 (Abb. 21).

4.2. . Die Veränderungen in der CD4 und CD8-Zellzahl im NALT, in der pharyngealen Tonsille und in der Lamina propria

Wir führten im NALT, in der Tonsilla pharyngealis (TP) und in der Lamina propria (LP) eine quantitative Bestimmung der CD4 und der CD8 positiven Zellen durch. Dazu wurden für die Lamina propria 10 Standardareale in einer 40x Vergrößerung ausgezählt. In der Tonsilla pharyngealis und im NALT wurden die T-Zellzonen ausgezählt. Da die T-Zonen häufig zu klein waren um 10 Standardareale auszuzählen, wurden so viele ausgezählt wie ohne Überlappung eingestellt werden konnten, im allgemeinen 2 bis 5. In einigen Tieren konnten die CD4 und CD8 positiven Zellen aufgrund der Gewebeschädigung nicht ausgezählt werden. Durch diese Unterschiede in der Größe der anatomischen Strukturen können die Ergebnisse verfälscht sein.

Im NALT stellt man fest, dass es keinen deutlichen Unterschied der durchschnittlichen CD4 Zellzahl zwischen den Kontrolltieren und den SIV infizierten Tieren gibt, wohin gegen in der geimpften Tiergruppe, die CD4 Zellzahl über 100 CD4-positve Zellen pro Gesichtsfeld angestiegen ist. Gegenüber der Kontrollgruppe stellt man eine Erhöhung der durchschnittlichen Zellzahl der CD8⁺ Lymphozyten in der Gruppe 1 und 3 fest wobei der Anstieg dieser Zellen besonders deutlich in der Gruppe der vorher immunisierten und gegen eine SIV Infektion partiell geschützten Tiere war (Tabelle 3).

Vergleicht man die Mittelwerte der CD4 positiven Zellzahl in der pharyngealen Tonsille so stellt man in der Gruppe 1 eine deutlich geringere Anzahl CD4⁺-Lymphozyten im Vergleich zu den zuvor immunisierten und den gesunden Affen fest. In der Gruppe der Kontrolltiere findet sich jedoch ebenfalls ein Tier (Mm 121) mit einer verringerten CD4 Zellzahl.

Tabelle 3: Mittelwerte der positiven Zellen in der T-Zone pro Standardareal bei Benutzung des 40x Objektivs

	Gruppe 1 Naive, SIV-infizierte Affen (n=3)			Gruppe 2 Kontrollen (n= 6)			Gruppe 3 (SIV-Infektion nach Immunisierung (n= 5)		
	NALT	TP	LP	NALT	TP	LP	NALT	TP	LP
CD4	63	98	8	82	187	8	145	197	14
CD8	53	76	4	32	97	3	115	125	4
CD4:CD8 ratio	1,43	1,28	1,95	2,58	1,93	2,37	1,27	1,63	3,72

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den behandelten Gruppen ist, dass in den Keimzentren der letzteren Gruppen eine Erhöhung der CD8⁺ Zellen nachzuweisen ist (Abb.20). Im Vergleich zu den Kontrolltieren war die CD8⁺ Zahl in der T-abhängigen Zone ebenfalls erhöht.

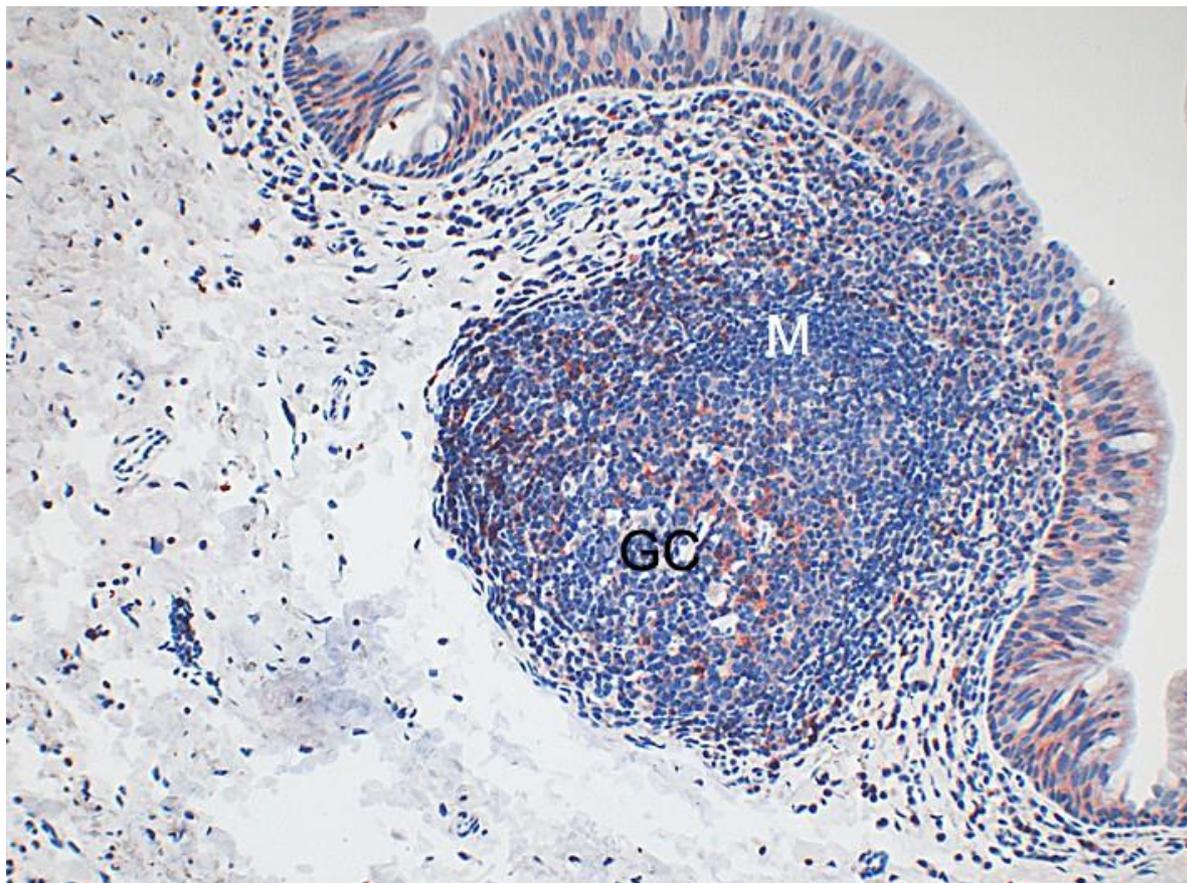


Abb. 22: Vermehrung von CD8⁺ Lymphozyten in einem Keimzentrum (GC) bei einem mit VLP immunisiert (in den Wochen 0, 6, 24, 32) und mit SIVmac239 exponierten (in der Woche 40) Affen. Die sehr niedrige Anzahl von CD8⁺ Zellen in den Keimzentren ist in Abb. 9 und 10 abgebildet. APAAP Reaktion

Besonders auffällig ist die Erhöhung der CD8 Zellzahl in der Gruppe der zuvor immunisierten und mit SIV exponierten Tiere. Es ist jedoch anzumerken, dass ich bei dieser Gruppe durch die Hyperplasie der T-abhängigen Zone in der Lage war mehr Standardareale auszuzählen, die dann die Vergleichbarkeit der Resultate beeinflussen kann.

Die oben angeführten Daten zeigen jedoch den Trend, dass das NALT bei einer Infektion oder Immunisierung mit reagiert. Die CD4:CD8 Ratio ist bei der SIV-Infektion im Vergleich zu den naiven Affen (Gruppe 2) oder zu den immunisierten Tieren, die gegenüber SIV nicht oder nur partiell geschützt waren, deutlich vermindert ist. In der Lamina propria ist eine Verminderung der Ratio nur in Gruppe 1 zu beobachten (Tabelle 3).

NALT

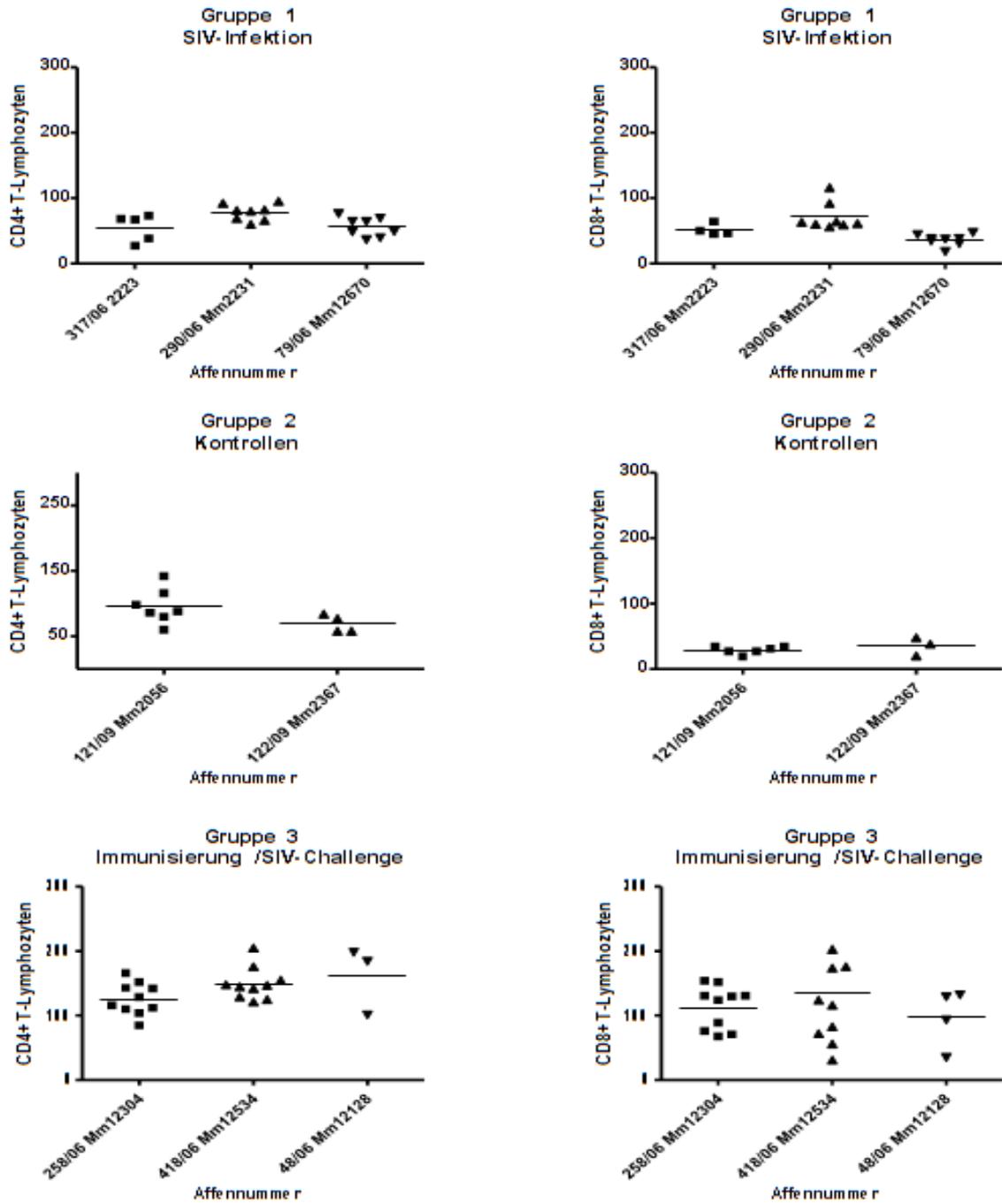


Abb. 23

Tonsille pharyngealis

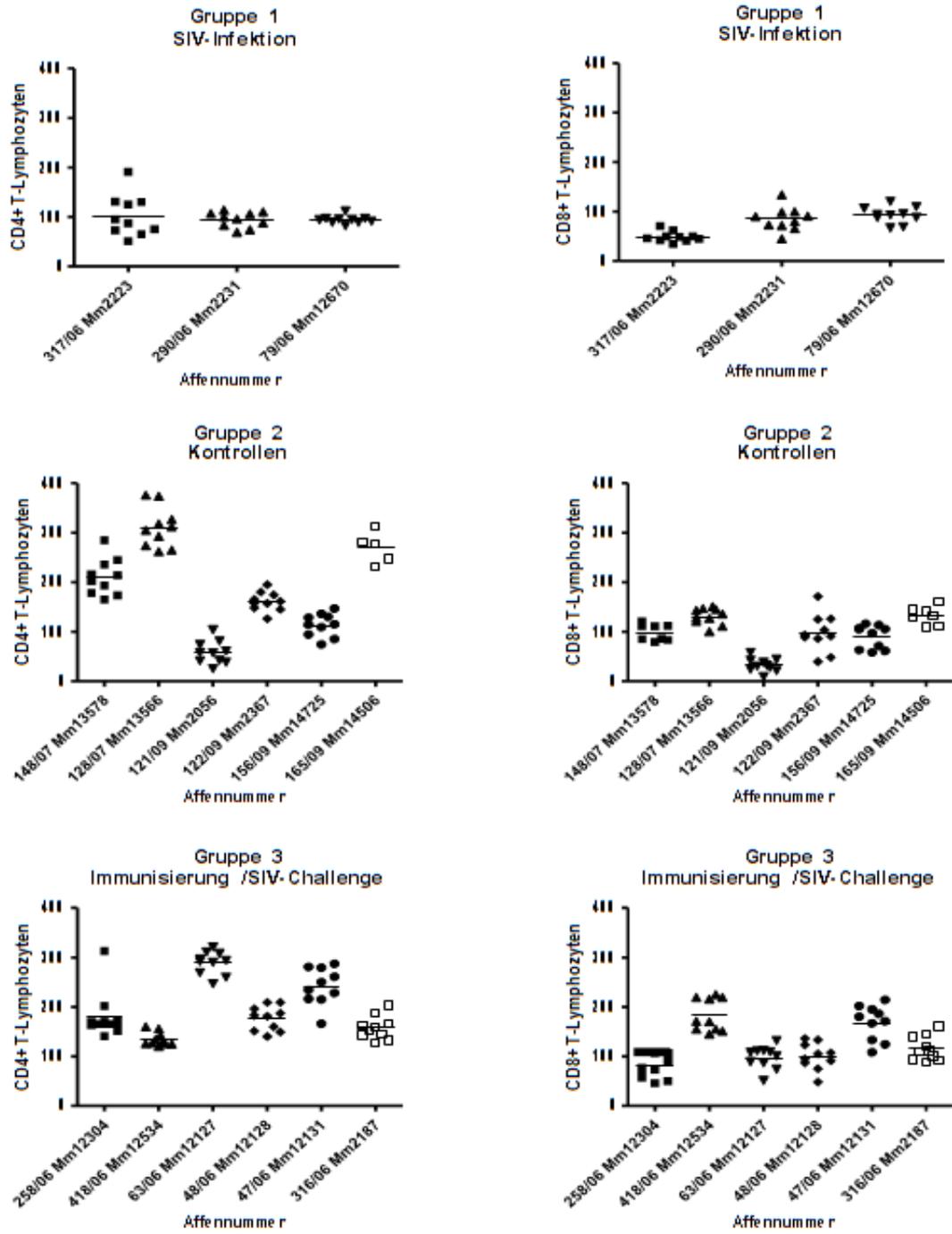


Abb. 24

Lamina Propria

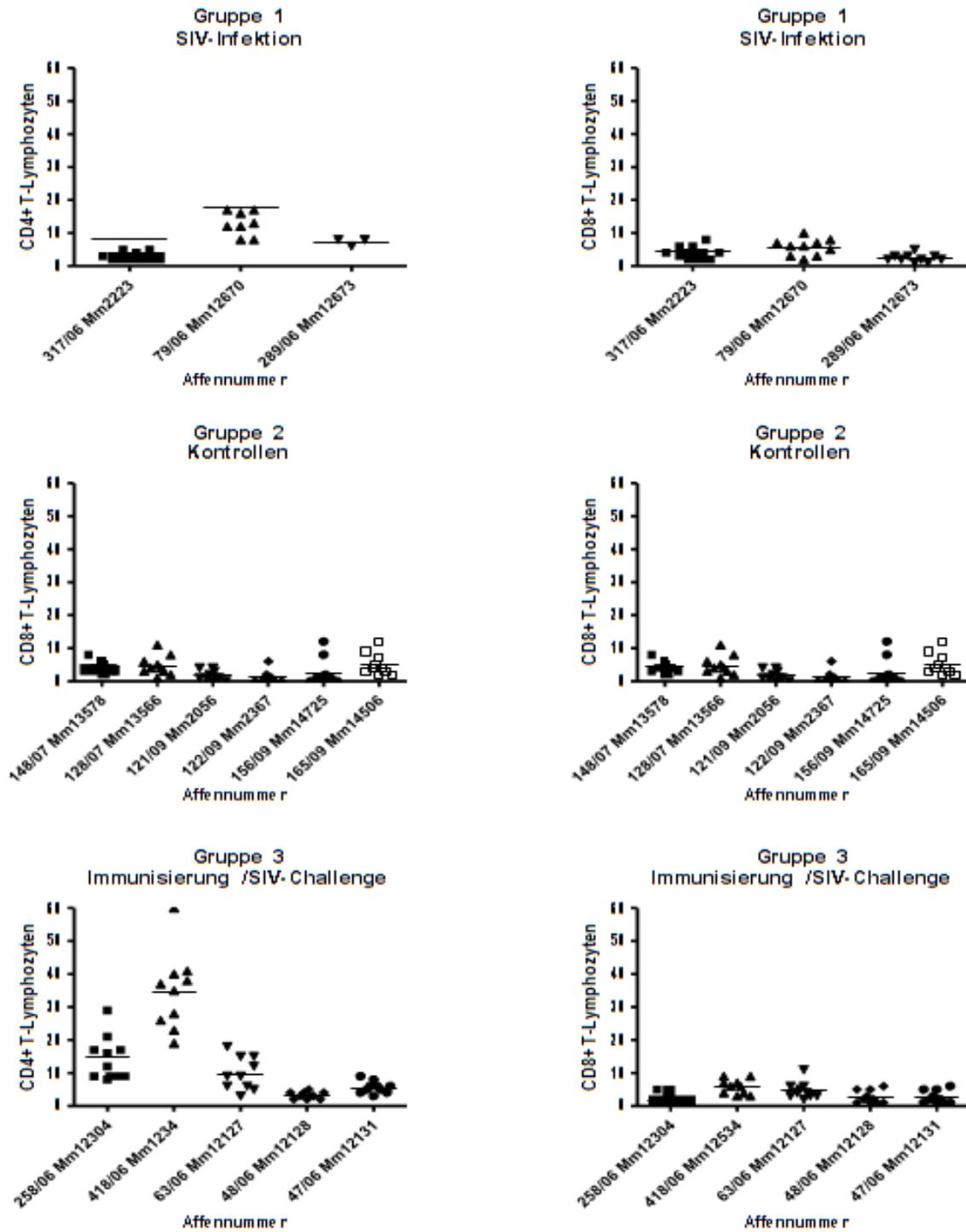


Abb. 25

Abb. 23-25 zeigt die Anzahl der CD4 positiven Zellen (linke Spalte) und die Anzahl der CD8 positiven Lymphozyten (rechte Spalte) in den verschiedenen Behandlungsgruppen, Gruppe 1 SIV-infizierte Affen in der oberen Zeile, Gruppe 2 Kontrolltiere ohne Vorbehandlung in der mittleren Zeile und Gruppe 3 zunächst mehrfach gegen SIV immunisierte und im Anschluss SIV infizierte Affen in der unteren Zeile, im NALT, in der Tonsilla pharyngealis und in der Lamina propria

4.3. Die In-situ-Hybridisierung

Die in-situ Hybridisierung wurde nur bei den Affen der Gruppe 1 und 3 durchgeführt. Es lassen sich in beiden Gruppen sowohl in der Tonsilla pharyngealis als auch im NALT SIV RNA feststellen. Die virale RNA erscheint in zwei Formen: Die autoradiographischen Granula sind über einzelne Zellen lokalisiert oder eine diffuse Verteilung von viraler RNA in den Keimzentren, meist in der dünn besiedelten Zone (Abb. 26). Die autoradiographischen Granula über den Zellen sprechen dafür, dass hier eine Virusproduktion stattfindet.

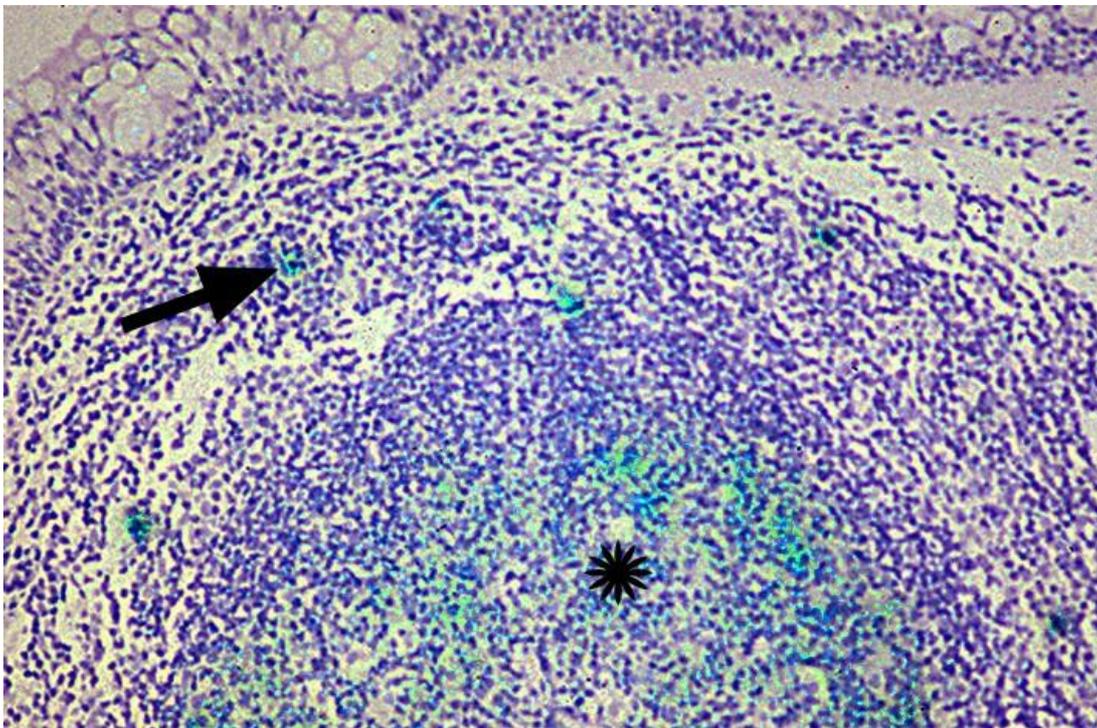


Abb 26. *In-situ* Hybridisierung für SIV RNA. Virale Genexpression (grün) sieht man in einzelnen Zellen (Pfeil), die im extrafollikulären Parenchym und auch in den Keimzentren nachweisbar sind. Als Zeichen des Einfangens (*trapping*) des SIV durch follikuläre dendritische Zellen findet man eine diffuse Ablagerung von SIV RNA in den Keimzentren (Stern). Der Mikrophotograf wurde bei einer doppelten Belichtung (Streulicht und Durchlicht) durchgeführt, daher erscheinen die autoradiographische Signale grün.

Die virusproduzierenden Zellen können in allen mikroanatomischen Regionen des NALT gefunden werden, wie z.B. den Domen und den T-Zellzonen, befinden sich aber vor allem in den Keimzentren. In den Keimzentren sieht man eine diffuse Verteilung von viraler RNA in der dünnbesiedelten Zone des Keimzentrums. Dies lässt, ähnlich wie im Lymphknoten auf ein Virus *trapping* durch die FDCs schließen. RNA positive Zellen für SIV im Nerv konnten nicht nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Das in dieser Arbeit verwendete Affenmaterial entstammt aus verschiedenen EU-Projekten. Da der Gesichtsschädel und die Nasenschleimhäute für diese EU-Projekte nicht benötigt wurden, wurde mir dieses Material für meine Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Es wurden keine Primaten getötet nur um Material für diese Arbeit zu gewinnen.

Um die Nasenschleimhaut möglichst atraumatisch zu entnehmen und die anatomischen Strukturen nicht zu beschädigen, musste ich zunächst einen Zugangsweg mit ausreichender Übersicht zur Nasenhaupthöhle finden. Ich entschied mich deshalb zur Entfernung des Hart- und Weichgaumens. Über diesen Zugang konnte bei allen Affen eine atraumatische Schleimhautentnahme gewährleistet werden.

Die mikroskopische Untersuchung der paraseptal gelegenen und der dem harten Gaumen aufliegenden Schleimhaut hat in allen Tieren lymphatisches Gewebe gezeigt. Diese Lokalisation entspricht der Lokalisation des NALT in der Maus (Wu et al. 1995). In der Mehrzahl der untersuchten Tiere handelte es sich um vereinzelte Lymphfollikel, die sich in der Lamina propria befinden und von respiratorischem Epithel bedeckt sind.

Im Bereich der Nasenmuscheln lassen sich in ca. 80% der Tiere vereinzelte Lymphfollikel feststellen. In keinem der Tiere kam es aber zu einer Aneinanderreihung von mehreren Lymphfollikeln, so wie sie in der Mukosa unterhalb des harten Gaumens nach Immunstimulation festgestellt werden konnte. Daher ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine besondere Lokalisation handelt, vergleichbar mit den Peyerschen Plaques im terminalen Ileum, im Gegensatz zu anderen Dünndarmabschnitten.

Diese Ergebnisse beim Primaten unterscheiden sich im Vergleich zu den Ergebnissen von Debertin et al. aus 2003. Hier wurde die größte Anzahl von Lymphfollikeln im vorderen Bereich der medialen Nasenmuschel entdeckt. In der von uns beschriebenen Lokalisation, die der Lokalisation des NALT beim Nagetier

ähnelt, wurde kein vermehrtes Auftreten von lymphatischem Gewebe beschrieben. Da bei Debertin et al. 2003 nur Kinder im Alter von 6-701 Tagen untersucht wurden, könnten diese Ergebnisse mit dem geringen Alter der untersuchten Patienten zusammenhängen.

Eine Aussage darüber ob die Entstehung des NALT während der Embryogenese stattfindet oder erst postpartal, kann aufgrund meiner Arbeit nicht getroffen werden.

In einigen der Affen, insbesondere in den Tieren die eine Immunstimulation erfahren hatten, erfüllte das lymphatische Gewebe in der Nasenschleimhaut in seinem Aufbau die generellen Anforderungen des MALT. Es lassen sich Lymphfollikel mit einem Keimzentrum nachweisen, welche von einer parafollikulären Region, bestehend aus überwiegend T-Lymphozyten, umgeben sind. In Richtung des Epithels findet man eine zellärmere Mantelzone welche von einem Lymphoepithel bedeckt ist.

Diese morphologische Aufteilung spricht dafür, dass auch eine funktionelle Aufteilung in eine *inductive site* und eine *effector site* möglich ist (Cesta 2006).

Es handelt sich um Aggregate von kapselfreiem organisiertem lymphatischem Gewebe vergleichbar mit den Peyerschen Plaques im Darm (Elmore 2006). Das Vorkommen und der mikroskopische Aufbau des Lymphoepithels lässt vermuten, dass es im NALT auch M-Zellen gibt, die für die Antigenaufnahme von einer Schleimhautoberfläche in das lymphatische Gewebe verantwortlich sind.

Ein Nachweis von M-Zellen ist nur mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen möglich, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurden.

Im Bereich des Lymphoepithels und in dem unterliegenden Domareal, also auch außerhalb der T-Zellzonen, konnten dendritische Zellen mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen nachgewiesen werden. Da es sich bei den dendritischen Zellen um potente Immunstimulatoren handelt, spricht dies ebenfalls dafür, dass es sich bei dieser Lokalisation um eine *inductive site* handelt, in der Antigene durch Kontakt zu den dendritischen Zellen eine spezifische Immunantwort mit Lymphozytenmigration über die efferenten Lymphgefäße hervorrufen.

In den Keimzentren des NALT ließen sich, wie in anderen MALTs, FDCs in den Keimzentren nachweisen. Mit Hilfe der SIV-Infektion bei einigen der Versuchstiere und einer anschließenden in-situ Hybridisierung konnte das Antigen *trapping* im Keimzentrum der NALT bewiesen werden. So konnte ich bei den SIV infizierten Maccacen im NALT aktiv virusproduzierende Zellen darstellen. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass auch die Nasenschleimhaut als Reservoir für SIV produzierende Zellen während des Latenzstadiums der HIV-Infektion in Frage kommen könnte. Auch die weiteren Veränderungen im NALT, die im Rahmen einer SIV-Infektion eintreten, z.B. eine starke Hyperplasie der Lymphfollikel und die Aktivierung der Keimzentren, bestätigen, dass das NALT ähnliche Reaktionen zeigt wie sie z.B. bei einer HIV-Infektion im Lymphknoten hervorgerufen werden.

Vergleicht man das lymphatische Gewebe in der Nasenschleimhaut der Affen der Kontrollgruppe und der Gruppe der immunisierten und anschließend infizierten Tiere miteinander, so konnte ich feststellen, dass sich mehr lymphatisches Gewebe, größere Lymphfollikel und eine erhöhte Anzahl von Lymphfollikel, in den Macacen der letzt genannten Gruppe finden ließ. Dies spricht dafür, dass das NALT ebenso wie andere lymphatische Gewebe selbst nach einer Schleimhautimmunisierung einer weit entfernt Region, z.B. die rektale Immunisierung, mit einer Hyperplasie und Aktivierung reagiert. Diese Reaktion bestätigt, dass das NALT eine entscheidende Rolle bei der nasalen Immunabwehr spielt und sich auch dazu eignet die Schleimhaut-Immunität im Allgemeinen besser zu verstehen.

In der histologischen Untersuchung des NALT konnte ich eine unmittelbare Lagebeziehung zwischen den Nerven in der Nasenschleimhaut und dem NALT feststellen. Dieses Untersuchungsergebnis ist besonders interessant im Hinblick auf die nasale Immunisierung. In einer Studie aus dem Jahr 2004 von Mutsch et al. wurde nach einer nasalen Immunisierung gegen Influenza bei 91 von 412 der immunisierten Patienten eine Facialisparesie festgestellt. Eine mögliche Erklärung für diese unerwünschte Reaktion ist eine Fortleitung des Impfstoffs oder von Bestandteilen des Impfstoffs entlang der Nervenenden aus der Nasenschleimhaut nach intrazerebral. Obwohl eine unmittelbare Lagebeziehung zwischen dem NALT und Nerven im Bereich der Nasenschleimhaut dargestellt werden konnte, so konnte

doch in der ISH keine virale RNA oder virale RNA produzierende Zellen in den Nerven selbst festgestellt werden.

Die immunhistochemische Charakterisierung des NALT hat gezeigt, dass die Verteilung der T- und B-Lymphozyten, der dendritischen und der follikulär dendritischen Zellen, sowie der Makrophagen dem Aufbau anderer sekundär lymphatischer Gewebe gleicht. Wir konnten eine Vergrößerung der B-Zell-Areale zeigen durch eine Infektion oder eine Immunstimulation.

Im NALT lassen sich überwiegend Plasmazellen nachweisen, die IgA und IgG produzieren. Das Auftreten von IgA und IgG produzierenden Plasmazellen ist ungefähr im gleichen Maß festzustellen. Damit unterscheidet sich das NALT vom GALT in dem überwiegend Antikörper vom IgA-Typ sezerniert werden und vom BALT, in welchem die IgG Antikörper Sekretion überwiegt (Zuercher et al. 2002). Dies spricht dafür, dass es sich beim NALT um ein eigenes sekundär lymphatisches Organ handelt, das weder dem GALT noch dem BALT zugeordnet werden kann.

Wir konnten zeigen, dass es durch eine SIV Infektion zu einer vermehrten Migration der CD8⁺ Lymphozyten in das Keimzentrum kommt, sowie CXCL13 positive Zellen bei infizierten Macacacn auch außerhalb der Keimzentren nachgewiesen werden konnten. Diese Veränderungen zeigen eine mikroanatomische Strukturveränderung oder einen Strukturverlust, wie er bei einer Immunschwäche zu erwarten ist.

Die SIV Infektion diente im Rahmen dieser Arbeit lediglich als beispielhafte Erkrankung, um die Reaktion des NALT mit anderen sekundären lymphatischen Geweben und deren Reaktionen vergleichen zu können. Die quantitative Auswertung der CD4 und CD8 positiven Lymphozyten in den verschiedenen Untersuchungsgruppen ist aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Primaten nur sehr begrenzt aussagekräftig. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl von Gesichtsfeldern, die auf die unterschiedliche Organgröße des NALT und der Tonsilla pharyngealis zurück zu führen sind, konnte keine statistische Relevanz berechnet werden. Auch die Veränderungen in der Zahl der CD4 und CD8 Lymphozyten in den verschiedenen Gewebeabschnitten kann durch diese Tatsache verfälscht sein.

Ich bin der Überzeugung, dass aufgrund der Untersuchungsergebnisse meiner Arbeit und obwohl der *Macaca mulatta* ein Äquivalent zum Waldeyerschen Rachenring besitzt, das NALT ein eigenständiges sekundäres lymphatisches Organ ist und eine entscheidende Rolle bei der Antigenaufnahme und bei der nasalen Immunisierung spielt.

6. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob beim Primaten einem dem NALT beim Nagetier entsprechende Struktur zu finden ist und diese durch immunhistologische Untersuchungen zu charakterisieren.

Zunächst wurde eine Methode entwickelt durch die eine atraumatische Entnahme der Nasenschleimhaut bei allen Affen möglich war.

In allen der untersuchten Macacacn konnte lymphatisches Gewebe in der Nasenschleimhaut unterhalb des harten Gaumens gefunden werden. Zwar li eß sich in den meisten Tieren auch lymphatisches Gewebe im bereich der Nasenmuscheln nachweisen, jedoch zeigte sich in dieser Lokalisation nicht die Verschmelzung der Lymphfollikel nach Immunstimulation. In der histologischen Untersuchung konnte außerdem nach gewiesen werden, dass das NALT eine *inductive* und eine *effector site* besitzt, sich Lymphoepithel und Keimzentren in den Lymphfollikeln darstellen ließen und daher den sekundären lymphatischen Organen zugehörig ist.

In den immunhistologischen Untersuchungen zeigt sich, dass sich das NALT beim Primaten in sogenannte T-Zell-Zonen und B-Zell-Zonen einteilen lässt. Diese Aufteilung entspricht der des MALT. Auch die Verteilung der Makrophagen, DC, FDCs und M-Zellen im NALT bestätigt diese Aussage.

Anhand der Unterteilung der Versuchstiere in 3 Gruppen, SIV infizierte Macacacn, Kontrolltiere und gegen SIV immunisierte und dann mit SIV-infizierte Tiere, konnte gezeigte werden, dass die Veränderung im NALT mit den Veränderungen in anderen lymphatischen Organen bei einer SIV Erkrankung zu vergleichen sind. So kommt es zu einer Hyperplasie der Lymphfollikel, zu einer Infiltration der Keimzentren mit CD8 positiven Lymphozyten und zu einer Verschiebung der CD4:CD8 ratio.

Mit Hilfe der in-situ Hybridisierung konnten Virus produzierende Zellen im NALT nachgewiesen werden, sodass auch das NALT als Reservoir für SIV produzierende Zellen in der Latenzphase der Infektion und als Eintrittspforte für eine SIV Infektion in Betracht gezogen werden muss.

Aufgrund unserer Ergebnisse sind wir davon überzeugt, dass sich das NALT sehr gut dazu eignet die Antigenaufnahme bei einer nasalen Immunisierung oder Infektion zu untersuchen oder auch den Erfolg einer Immunisierung zur Verbesserung der mukosalen Immunabwehr zu überprüfen.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABC	(Strept)avidin-Biotin-Complex
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
AIDS	aquired immunodeficiency syndrome
APAAP	Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase
BALT	Bronchus assoziiertes lymphatisches Gewebe
DCs	dendritische Zellen
FDCs	follikuläre dendritische Zellen
GALT	Darm (gut) assoziiertes lymphatisches Gewebe
GC	Germinal center
HEV	high endothelial venules
HIV	human immunodeficiency virus
IHC	in-situ Hybridisierung
LE	Lymphoepithel
LP	Lamina propria
MALT	mucosa assoziiertes lymphatisches Gewebe
Min	Minute
NALT	nasal assoziiertes lymphatisches Gewebe
NK	natürliche Killerzellen
PAP	Peroxidase-Anti-Peroxidase
PP	Peyer'sche Plaques
RT	Raumtemperatur
SCIV	single-cycle immunodeficiency virus vaccine
SIV	simian immunodeficiency virus
TP	Tonsilla pharyngealis
Treg	regulatorische T Zellen
VLP	Virus like particles

8. Literaturverzeichnis

Ahlers JD, Belyakov IM (2009)

Strategies for optimizing targeting and delivery of mucosal HIV vaccines.

Eur J Immunol 39:2657-69

Atchinson RE, Gosling J, Monteclaro FS, Franci C, Digilio L, Charo IF, Goldsmith MA (1996)

Multiple extracellular elements of CCR5 and HIV-1 entry: dissociation from response to chemokines.

Science 274:1924-6

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauquet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983)

Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)

Science 220:868-71

Bergquist C, Johansson EL, Lagergrad T, Holmgren J, Rudin A (1997)

Intranasal vaccination of human with recombinant cholera toxin B subunit induces systemic and local antibody responses in the upper respiratory tract and the vagina.

Infect Immun 65:2676-84

Biberfeld P, Chayt KJ, Marselle LM, Biberfeld G, Gallo RC, Harper M (1986)

HTLV-III expression in infected lymph nodes and relevance to pathogenesis of lymphadenopathy.

Am J Pathol 125:436-42

Bielinska AU, Janczak KW, Landers JJ, Markovitz DM, Montefiori DC, Baker JR (2008)

Nasal Immunization with a recombinant HIV gp120 and Nanoemulsion adjuvant produces Th1 polarized responses and neutralizing antibodies to primary HIV type 1 isolates.

Aids research and human retroviruses 24:271-81

Bienenstock J, McDermott MR (2005)

Bronchus- and nasal-associated lymphoid tissue.

Immunol Review 206:22-31

Blomberg RS, Schoolery RT (1985)

Lymphocyte markers in infectious diseases.

Semin Hematol 22:81-114

Borrow P, Lewicki H, Hahn BH, Shaw GM, Oldstone MBA (1994)

Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with the control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection.

J Virol 68:6103-10

Brack-Werner R, Kleinschmidt A, Ludvigsen A, Mellert W, Neumann M, Herrmann R, Khim MCI, Burny A, Muller-Lantzsch N, Stavrou D, Erfle V (1992)

Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines.

AIDS 6:273-85

Brandzaeg P (2009)

Mucosal immunity: Induction, dissemination, and effector function.

Scand J. Immunol. 70: 505-515

Cagigi A, Mowafi F, Dang LVP, Tenner-Racz K, Atlas A, Grutzmeier S, Racz P, Chiodi F, Nilsson A (2008)

Altered expression of the receptor-ligand pair CXCR5/CXCL13 in B cells during chronic HIV-1 infection.

Blood 112:4401-10

Carlsen HS, Baekkevold ES, Morton C, Haraldsen, Brandtzaeg P (2004)

Monocyte-like and mature macrophages produce CXCL-13 (B cell-attracting chemokine 1) in inflammatory lesions with lymphoid neogenesis.

Blood 104: 3021-7

Cesta MF (2006)

Normal structure, function and histology of mucosa-associated lymphoid tissue.

Toxicol pathol 34:599-608

Chakrabarti L, Isola P, Cumont MC, Claessens-Maire MA, Hurtel M, Montagnier L, Hurtel B (1994)

Early stages of simian immunodeficiency virus infection in lymph nodes. Evidence for high viral load and successive population of target cells.

Am J Pathol, 144:1226-1237

Clerici M, Giorgi JV, Chou CC, Gudeman VK, Zack JA, Gupta P, Ho HN, Nishanian PG, Berzofsky JA, Shearer GM (1992)

Cell-mediated immune response to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in seronegative homosexual men with recent sexual exposure to HIV-1.

J Inf Dis 165:1012-9

Csencsits KL, Jutila MA, Pascual DW (1999)

Nasal-associated lymphoid tissue : phenotypic and functional evidence for the primary role of peripheral node addressin in naive lymphocyte adhesion to high endothelial venules in a mucosal site.

J Immunol 1382-89

Dalgleish AG, Beverly PC, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA (1984)

The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus.

Nature 312:763-7

Debertin AS, Tschernig T, Tönjes H, Kleemann WJ, Tröger HD, Pabst R (2003) Nasal-associated lymphoid tissue (NALT): frequency and localization in young children.

Clin Exp Immunol 134:503-7

Elmore SA (2006)

Enhanced histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue.

Toxicol Pathol 34:687-696

Embretson J, Zupancic M, Ribas JL, Burke A, Racz P, Tenner-Racz K, Haase TC (1993)

Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS.

Nature 362:359-62

Fujihashi K, Kiyono H (2009)

Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases.

Trends Immunol 30(7):334-43

Fujimura Y (2000)

Evidence of M cells as portal of entry for antigens in the nasopharyngeal lymphoid tissue of humans.

Virchows Arch 436:560-6

Furata Y, Eriksson K, Svennerholm B, Fredman P, Horal P, Jeansson S, Vahlne A, Holmgren J, Czerkinsky C (1994)

Infection of Vaginal and colonic epithelial cells by human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120.

Proc. Natl. Acad, Sci 91:12559-63

Haase AT (2011)

Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for intervention.

Annu Rev Med, 62:127-139

Hansen SG, Vieville C, Whizin N, Coyne-Johnson L, Siess DC, Drummond DD, Legasse AW, Axthelm MK, Oswald K, Trubey CM, Piatak M, Lifson JD, Nelson JA, Jarvis MA, Picker LJ (2009)

Effector memory T cell responses are associated with protection of rhesus monkeys from mucosal simian immunodeficiency virus challenge.

Nature Medicine 15:293-99

Hirabayashi Y, Kurata H, Funato H, Nagamine T, Aizawa C, Tamura S, Shimada K, Kurata T (1990)

Comparison of intranasal inoculation of influenza HA vaccine combined with cholera toxin B subunit with oral or parenteral vaccination.

Vaccine 8:243-8

Heritage PL, Underdown BJ, Arsenault L, Snider DP, McDermott MR (1997)

Comparison of murine nasal-associated lymphoid tissue and Peyer's Patches.

Am J Respir Crit Care Med 156:1256-62

Ichimiya I, Kawauchi H, Fufiyoshi T, Tanaka T, Moci G (1991)

Distribution of immunocompetent cells in normal nasal mucosa: comparisons among germ-free, specific pathogen-free, and conventional mice.

Ann Otol Laryngol 100:638-42

Kiyono H, Fukuyama S. (2004)

NALT versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity.

Nat rev Immunol 4:699-710

Klatzmann D, Barre-Sinoussi F, Nugeyre MT, Dauquet C, Vilmer E, Griselli C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Gluckman JC, Chermann JC (1984)

Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper-inducer T-lymphocytes.

Science 222:59-62

Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gurest D, Guetard D, Hercend JC, Gluckmann JC, Montagnier L (1984)

T-lymphocyte T4 molecule behaves as receptor for human retrovirus LAV.
Nature 312:767-778

Koup RA, Safrit JT, Cao Y, Andrews CA, MeLeod G, Borkowsky W, Farthing C, Ho DD (1994)
Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome.
J Virol 68:4650-5

Kuate S, Stahl-Hennig C, ten Haaf P, Heeney J, Ueberla K (2003)
Single-cycle immunodeficiency viruses provide strategies for uncoupling in vivo expression levels from viral replicative capacity and for mimicing live-attenuated SIV vaccines.
Virology 11: 653-62

Kuate S, Stefano D, Hoffmann D, Wildner O, Ueberla K (2004)
Production of lential viral vectors by transient expression of minimal packaging genes from recombinant adenoviruses.
J Gen Med 6(11):1197-205

Kuper CF, Koornstra J, Hamelers DM, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, van Breda Vriesman PJ, Sminia T (1992)
The role of nasopharyngeal lymphoid tissue.
Immunol Today 13(6):219-24

Kuper CF (2006)
Histopathology of mucosa-associated lymphoid tissue
Toxicol pathol 34:609-615

Landay AL, Mackewicz C, Levy JA (1993)
An activated CD8+ T cell phenotype correlates with anti-HIV activity and asymptomatic clinical status.
Clin Immunol Immunopathol 69:106-16

Lang W, Perkins H, Anderson RE, Royce R, Jewell N, Winkelstein W Jr (1989)
Patterns of T lymphocyte changes with human immunodeficiency virus infection: from seroconversion to the development of AIDS.

J AIDS 2:63-9

Mackewicz CE, Ortega HW, Levy JA (1991)
CD8+ cell anti-HIV activity correlates with the clinical state of the infected individual.

J Clin Invest 87:1462-6

Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Jean-Pierre P, Manuelli V, Lopez P, Shet A, Low A, Mohri H, Racz P, Markowitz M (2006)

Lack of mucosal immune reconstitution during prolonged treatment of acute and early HIV-1 infection.

Plos Med 3: 2335-2348

Mellert W, Kleinschmidt A, Schmidt J, Festl H, Elmer S, Roth WK, Erfle V (1990)
Infection of human fibroblasts and osteoblast-like cells with HIV-1.

AIDS 4:527-35

Moir S, Malaspina A, Ogwara KM, Donoghue ET, Hallahan CW, Ehler LA, Liu S, Adelsberger J, Lapointe R, Hwu P, Baseler M, Orenstein JM, Chun TW, Mican JA, Fauci AS (2001)

HIV-1 induces phenotypic and functional perturbations of B cells in chronically infected individuals.

Natl Acad Sci USA 98:10362-67

Mutsch M, Zhou W, Rhodes P, Bopp M, Chen RT, Linder T, Splyr C, Steffen R (2004)
Use of the inactivated intranasal influenza vaccine and the risk of bell's palsy in Switzerland.

N Eng J Med 350:896-903

Öst A, Baroni CD, Biberfeld P, Diebold J, Moragas A, Noel H, Pallersen G, Racz P, Schipper M, Tenner-Racz K, van den Tweel JG (1989)

Lymphadenopathy in HIV infection: histological classification and staging.

APMIS suppl 8:7-15

Pabst R, Tschernig T (2010)

Bronchus-associated lymphoid tissue: An entry site for antigens for successful mucosal vaccinations?

Am J Respir Cell Mol Biol 43:137-41

Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS (1993)

The immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection.

N Engl J Med 328:327-35

Racz P, Tenner-Racz K, van Vloten F, Razzaque Ali A, Dietrich M, Kern P, Gluckman JC (1991)

Classification of Histopathological Changes of Lymph Nodes in HIV-1 Infection.

Antibiotics and Chemotherapy 43:201-13

Reimann KA, Tenner-Racz K, Racz P, Montefiori DC, Yasutomi Y, Lin W, Ransil BJ, Letvin NL (1994)

Immunopathogenetic events in acute infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques.

J Virol 68:2362-2370;

Sabirov A, Metzger DW (2008)

Intranasal vaccination of infant mice induces protective immunity in the absence of nasal-associated lymphoid tissue.

Vaccine 26:1566-76

Schellekens PT, Tersmette M, Roos MT, Koot RP, de Wolf F, Coutinho RA, Miedema (1992)

Biphasic rate of CD4+ cell count decline during progression to AIDS correlates with HIV-1 phenotype.

AIDS 6:665-70

Spira AI, Marx PA, Patterson BK, Mahoney J, Koup RA, Wolinsky SM, Ho DD (1996)

Cellular targets of infection and route of viral dissemination after an intravaginal inoculation of simian immunodeficiency virus into rhesus macaques.

J Exp Med 183:215-25

Spit BJ, Hendriksen EGJ, Bruijntjes JP, Kuper JF (1989)

Nasal lymphoid tissue in the rat.

Cell Tissue Res 255:193-198

Stahl-Hennig C, Steinman RM, Tenner-Racz K, Pope M, Stolte N, Mätz-Rensing K, Großschupff G, Raschdorff B, Hunsmann, Racz P (1999)

Rapid infection of oral mucosal-associated lymphoid tissue with simian immunodeficiency virus.

Science 285:1261-5

Stahl-Hennig C, Kuate S, Franz M, Suh YS, Stoiber H, Sauermann U, Tenner-Racz K, Norley S, Park KS, sung YC, Steinman R, Racz P, Ueberla K (2007)

Ataumatic oral spray immunisation with replication-deficient viral vector vaccines.

J Virol 81(23): 1380-90

Tan X, Pearce-Pratt R, Phillips DM (1993)

Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: Implications for sexual transmission.

J Virol 67(11):6447-52

Tenner-Racz K, Racz P, Bofill M, Schulz-Meyer A, Dietrich M, Kern P, Weber J, Pinching AJ, Veronese-Dimarzo F, Popovic M, Klatzmann D, Gluckman JC, Janossy G (1986)

HTLV-III/LAV viral antigens in lymph nodes of homosexual men with persistent generalized lymphadenopathy and AIDS.

Am J Pathol 123:9-15

Toniolo A, Serrra C, Conaldi G, Basolo F, Falcone V, Dolei (1995)

Productive HIV-1 infection of normal human mammary epithelial cells.

AIDS 9:859-66

Veazey RS, DeMaria M, Chalifoux LV, Shvetz DE, Pauley DR, Knight HL, Rosenzweig M, Johnson RP, Derosiers RC, Lackner AA (1998)
Gastrointestinal tract as a major site of CD4+ T cell depletion and viral replication in SIV infection.
Science 289:427-431

Wang X, Rasmussen T, Pahar B, Poonia B, Alvarez X, Lackner AA, Veazey RS (2007)
Massive infection and loss of CD4+ T cells occurs in the intestinal tract of neonatal rhesus macaques in acute SIV infection.
Blood, 109:1174-1181;

Wu HY, Nguyen HH, Russell MW (1995)
Nasal lymphoid tissue (NALT) as a mucosal immune inductive site
Scand J Immunol 46: 506-13

Zhang L, Huang Y, He T, Cao Y, Ho DD (1996)
HIV-1 subtype and second-receptor use.
Nature 383:768

Zuercher AW, Coffin SE, Thurnheer MC, Fundova P, Cebra JJ (2002)
Nasal-associated lymphoid tissue is a mucosal inductive site for virus-specific humoral and cellular immune responses.
J Immunol 1796-1803

Zuercher AW (2003)
Upper respiratory tract immunity
Viral Immunol 16:279-89

Bienenstock J, McDermott MR, Clancy RL (1999)

Mucosal Immunology Eds.:Ogra P Mestecky J et al. 2nd ed. 1999 Academic Press
San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo Toronto, 283-292

Brandtzaeg P, Kiyono H, Pabst R, Russell MW (2008)

Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue

Mucosal Immunology Eds.:Ogra P Mestecky J et al. 2nd ed. 1999 Academic Press
San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo Toronto 1:31-7

Levy JA (1998)

HIV and the Pathogenesis of AIDS ASM Press Washington DC

Kelsall B, Stroder W (1999)

Gut-associated lymphoid tissue Antigen handling and T-lymphocyte responses.

Mucosal Immunology Eds.:Ogra P Mestecky J et al. 2nd ed. 1999 Academic Press
San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo Toronto , 293-317;

McGhee JR, Lamm ME, Strober W (1999)

Mucosal immune responses

Mucosal Immunology. 2nd Ed. Eds: Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W,
Bienenstock J, McGhee JR. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York,
Sydney, Tokyo, Toronto 1999 pp.485-490

McIntyre TM, Strober W (1999)

Gut-associated lymphoid tissue. Regulation of IgA B-cell development.

Mucosal Immunology Eds.:Ogra P Mestecky J et al. 2nd ed. 1999 Academic Press
San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo Toronto , 319- 356

Sminia T, Kraal G (1999)

Nasal-associated lymphatic tissue

Mucosal Immunology Eds.:Ogra P Mestecky J et al. 2nd ed. 1999 Academic Press San
Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo Toronto, 357-364;

9. Danksagung

Mein Dank gilt besonders meinem Doktorvater Prof. Paul Racz und seiner Frau Dr. Klara Tenner-Racz, die mich die ganze Zeit unterstützt und gefördert haben. Ich danke Paul Racz für seine Geduld, seine ständigen Ermutigungen und sein Lob. Bei Klara Racz möchte ich mich für ihre Hilfe bei der Photographie bedanken und den Korrekturen der Arbeit. Ich war beeindruckt durch ihr umfassendes Fachwissen, welches mir sehr bei der Strukturierung, der Umsetzung und insbesondere bei der Interpretation der Ergebnisse der Arbeit geholfen hat.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei den medizin-technischen Assistentinnen der Pathologie des Tropeninstitutes Birgit Raschdorff, Gudrun Großschupff, Petra Allartz, Anja Schörle und Ingeborg Albrechts bedanken. Ich möchte mich für die gute Zusammenarbeit, die immer freundliche Laune und auch die persönliche Unterstützung bedanken.

Weiterer Dank gilt auch meiner Mitdotorandin Christine Stempel, die immer zur Stelle war, wenn eine Hand bei der Sektion der Affenköpfe gefehlt hat.

Ich danke dem Primatenzentrum im Göttingen für die unkomplizierte Zusammenarbeit und insbesondere bei Dr. Christiane Stahl-Hennig.

Ich möchte auch Prof. Dr. Ralph Steinman danken, mit dessen Hilfe ich zeitweise finanzielle unterstützt wurde während meiner langjährigen wissenschaftlichen Arbeit im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie dafür bedanken, dass sie meine schlechte Laune toleriert hat, wann immer ich mit meiner Arbeit ins Stocken geraten bin.

10. Lebenslauf

Jillian Knips

Höltysstraße 17, 22085 Hamburg

Email: jill.knips@gmx.de, mobil: 01705554781

Name : Jillian Knips

Geburtsdatum : 24.05.1977

Staatsangehörigkeit : deutsch

Schule: 1983-1987 Grundschule Winterhuder Weg, Hamburg

1987-1996 Gymnasium Lerchenfeld, Hamburg

1993-1994 Kent College Pembury, Kent, England

Studium: 1996-2003 Studium der Humanmedizin, Universität Hamburg

2003-2009 Studium der Zahnmedizin, Universität Hamburg

2007-2008 Studium der Zahnmedizin, Université Rene Descartes, Paris, Frankreich

Beruf: 2003-2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin des Instituts für experimentelle Morphologie, Anatomie II, Universitätsklinikum-Eppendorf, Hamburg

2004-2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Viszeral- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum-Eppendorf, Hamburg

Seit 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Klinik für Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, Universitätsklinikum-Eppendorf, Hamburg

Wissenschaftliche Arbeit: Seit 1998 assoziierte Mitglied im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin und Körper Labor für AIDS-Forschung, Hamburg

11. 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: