

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik B
– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c.mult. W. Domschke –

Charakterisierung der *Y.* *enterocolitica* – Infektion in der CCR6 defizienten Maus

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae dentium

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

von Wedel, Julia
aus Salzkotten
2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan Univ.-Prof. Dr. V. Arolt

1. Berichterstatter Priv.-Doz. Dr. A. Lügering

2. Berichterstatter Prof. Dr. T. Kucharzik

Tag der mündl. Prüfung 7. November 2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster – Medizinische Klinik und Poliklinik B

– Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c.mult. W Domschke –

Referent: Priv.-Doz. Dr. A. Lügering

Koreferent: Prof. Dr. T. Kucharzik

Zusammenfassung

Charakterisierung der *Y. enterocolitica* – Infektion in der CCR6 defizienten Maus
von Wedel, Julia

Tag der mündlichen Prüfung: 7. November 2008

M – Zellen sind spezialisierte intestinale Epithelzellen innerhalb des FAE der Peyer'schen Plaques (PP). Chemokin Rezeptor 6 (CCR6) – Gen - defiziente Mäuse weisen eine signifikant erniedrigte Anzahl dieser Zellpopulation auf. *Yersinia enterocolitica*, ein gramnegatives Stäbchenbakterium, invadiert in M – Zellen der PP. Diese dienen den Erregern als Ausgangspunkt zur Vermehrung und Verbreitung im Organismus. Das Ziel dieser Studie war es, den Verlauf einer Yersinien Infektion in CCR6 –/– Mäusen zu untersuchen und so zu klären, ob die CCR6 –/– Maus als *in vivo* Modell zur Ermittlung der M – Zell Funktion genutzt werden kann. C57BL/6 Kontroll Mäuse und CCR6 defiziente Mäuse wurden oral oder intraperitoneal mit *Y. enterocolitica* infiziert. Die Bakterieninvasion der PP wurde histologisch und immunhistologisch ausgewertet. Die Bakterienbesiedlung wurde anhand von Stuhl-, und Gewebeproben (PP) untersucht. Die Zytokin Expressionen in PP und Milzzellen wurden mittels RT – PCR und ELISA gemessen. Nach oraler Infektion mit *Y. enterocolitica* zeigten C57BL/6 Mäuse eine septische Infektion mit letalem Verlauf, während CCR6 –/– Mäuse keinerlei oder milde klinische Symptome einer Erkrankung aufwiesen. Immunhistochemische Analysen konnten zeigen, dass eine Bakterieninvasion der PP von C57BL/6 Mäusen stattgefunden hatte, wohingegen die PP von CCR6 –/– Mäusen frei von Bakterien waren. Zusätzlich konnte eine signifikante Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in C57BL/6 Mäusen gezeigt werden, während die Zytokinlevel in der CCR6 –/– Maus unverändert gegenüber den Ausgangswerten blieben. Demgegenüber verursachte eine intraperitoneale Infektion mit *Y. enterocolitica* eine schwere systemische Yersiniose beider Mausgruppen. Ergebnisse nach oraler Infektion mit *Y. enterocolitica* in CCR6 –/– Mäusen zeigen die Wichtigkeit der CCR6 Expression für die M – Zell Differenzierung. Sie bestätigen die direkte und indirekte Notwendigkeit der Mip3 α -CCR6 Interaktion für die Differenzierung von M - Zellen und betonen die funktionelle Bedeutung der M – Zellen in der mikrobiellen Aufnahme. CCR6 –/– Mäuse stellen daher ein probates Hilfsmittel dar, um die M – Zell Funktion *in vivo* zu untersuchen.

Für meine Mutter — In Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das intestinale Immunsystem	1
1.2	Peyer'sche Plaques	3
1.3	M – Zellen	5
1.4	Yersinien	9
1.5	Chemokine und der CCR6 Rezeptor	11
1.6	Frage- und Problemstellung	13
2	Material	14
2.1	Chemikalien	14
2.2	Enzyme	15
2.3	Antikörper und Proteine	16
2.4	Oligonukleotide	17
2.5	Versuchstiere	18
2.6	Bakterien und Wachstumsbedingungen	18
2.7	Puffer und Lösungen	19
3	Methoden	22
3.1	Tierversuch	22
3.1.1	Induktion und Kontrolle der bakteriellen Infektion von Mäusen mit <i>Y. enterocolitica</i>	22
3.1.2	System zur Einschätzung der Erkrankung von Mäusen mit <i>Y. enterocolitica</i>	23
3.2	Molekularbiologische Methoden	24
3.2.1	RNA Isolierung aus Gewebe nach der TRIzol Methode	24
3.2.2	Reverse Transkriptase — Polymerase Kettenreaktion (RT — PCR)	25

3.2.3	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (Realtime quantitative RT- PCR)	30
3.3	Immunologische Methoden	32
3.3.1	Quantitative Immunoassays - Enzyme – linked – Immunosorbent – Assay (ELISA)	32
3.3.2	Immunhistochemie	34
3.4	Histologische Methoden	35
3.4.1	Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin- Eosin	35
3.5	Statistische Methoden	36
3.5.1	Ermittlung der statistischen Signifikanz mit Hilfe des zweiseitigen t – Testes	36
4	Ergebnisse	38
4.1	Orale Yersinien Infektion	38
4.2	Intraperitoneale Yersinien Infektion	41
4.3	Bakterienlast im Stuhl, in den Peyer’schen Plaques und der Milz nach oraler Infektion	43
4.4	Histopathologische Aufarbeitung der Yersinien Infektion	46
4.5	Die immunhistochemische Aufarbeitung mit anti – inv Antikörper	47
4.6	Zytokin Expression während der Yersinien Infektion	49
5	Diskussion	52
6	Lebenslauf	61
7	Danksagung	62
	Literaturverzeichnis	63

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema GALT	4
4.1	C57BL/6 Maus 6 Tage nach oraler Infektion	38
4.2	C57BL/6 Maus 6 Tage nach oraler Infektion - Organe	39
4.3	CCR6 $-/-$ Maus 6 Tage nach oraler Infektion - Organe	40
4.4	Krankheitsaktivität nach oraler Infektion	40
4.5	3 Tage nach i.p. Infektion – Organe	41
4.6	3 Tage nach i.p. Infektion – Krankheitsaktivität	42
4.7	3 Tage nach i.p. Infektion – Bakterienlast	43
4.8	Bakterienlast im Stuhl	44
4.9	Bakterienlast in den PP	44
4.10	Bakterienlast in der Milz	45
4.11	Histologie PP C57BL/6	46
4.12	Histologie PP CCR6 $-/-$	47
4.13	Inv Immunhistologie PP	48
4.14	Inv Immunhistologie LN	48
4.15	Zytokin Expression von T – Zellen der Milz	49
4.16	Zytokin Expression der Leukozyten	50

Tabellenverzeichnis

2.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Enzyme	15
2.3	Primärantikörper	16
2.4	Sekundäre Antikörper	16
2.5	Rekombinante Proteine	16
2.6	Oligonukleotide	17
2.7	Tris-Acetat-EDTA-Puffer	19
2.8	Phosphate Buffered Saline (PBS)	19
2.9	DNA-Ladepuffer	19
2.10	DNA-Längenstandard	19
2.11	Methylenblau – Lösung	19
2.12	LB (Luria–Bertani) Medium	19
2.13	TNB blocking Puffer	20
2.14	Tris-Puffer 0,5 M	20
2.15	Coating Puffer für TNF- α , Il-10, Il-12	20
2.16	Phosphate Buffered Saline (PBS) für ELISA	20
2.17	Coating Puffer für IFN- γ , Il-4	20
2.18	Wasch Puffer für TNF- α , Il-10, Il-12	20
2.19	Wasch Puffer für IFN- γ , Il-4	20
2.20	Block Puffer für TNF- α , Il-10, Il-12	20
2.21	Block Puffer für IFN- γ , Il-4	21
2.22	Substrat Lösung für TNF- α , Il-10, Il-12	21
2.23	Substrat Lösung für IFN- γ , Il-4	21
2.24	OPD Puffer für IFN- γ , Il-4	21
3.1	Infektionsparameter	23

3.2 System zur Einschätzung der *Y. enterocolitica* Infektion 24

1 Einleitung

1.1 Das intestinale Immunsystem

Der Darm gehört zu den wichtigsten lymphatischen Organen, da die Oberfläche des Darms die größte Kontaktfläche des Organismus zur Aussenwelt darstellt. Hauptangriffsstelle für Antigene sind die Schleimhäute des Körpers. Die erste Stelle der Immunantwort im Darm bildet das intestinale Epithel. Selbst sehr kleine Moleküle können die Barriere der Enterozyten nicht passieren [64]. Das Epithel bildet protektive Substanzen wie Defensine [5], es transportiert sekretorisches IgA [63] und bildet Mukus und Trefoil Peptide [79]. Sekretorisches IgA wird nach lokaler antigener Stimulation u.a. in lymphatischen Geweben des Verdauungs- und Respirationstrakts gebildet [82] und dient dem Schutz der Schleimhäute [49]. Mukus besteht im wesentlichen aus Mukoproteinen sog. Muzinen, die von der Haut und den Schleimhäuten zum Schutz gegen mechanische und chemische Einwirkungen ausgeschieden werden [82]. Zusammengefasst werden die lymphatischen Organe als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (GALT= *gut associated lymphatic tissue*). Zum Immunsystem des GALT gehören u.a. aggregierte Lymphfollikel (Peyer'sche Plaques), solitäre Lymphfollikel (ILFs= *isolated lymphoid follicles*), Cryptopatches und die mesenterialen Lymphknoten. Neben den organisierten Formen des Immunsystems gibt es in der Darmmukosa diffus verteilte intraepitheliale Lymphozyten (IEL) und Lamina propria Lymphozyten (LPL), Makrophagen, dendritische Zellen.

In der Mukosa lokalisiert sind die Peyer'schen Plaques (PP). Die PP haben eine kuppelförmige Struktur darmlumenwärts gerichtet. Man findet sie als aggregierte Lymphfollikel hauptsächlich im distalen Ileum des Dünndarms. Eine Besonderheit der PP ist das Follikelassoziierte Epithel. In diesem spezialisierten Epithel übernehmen M- Zellen (*microfold cells*) die Aufgabe, Antigene transepithelial zu transportieren [58]. Das FAE ist zum Darmlumen hin lokalisiert und besteht neben den M- Zellen aus Enterozyten und vereinzelt Becherzellen.

Der Darm weist einige Besonderheiten auf. Es findet nur dort eine extrathymische Rei-

fung von T – Zellen statt. An einem Mausmodell konnte gezeigt werden, dass sich unreife Vorläufer- T – Zellen in den Krypten der Lamina propria befinden [100]. Diese Bereiche, sog. Cryptopatches, wurden im gesamten Darmtrakt isoliert. Die Cryptopatches sind möglicherweise für die Entwicklung von bestimmten intraepithelialen Lymphozyten (IEL) von Bedeutung. Diese Population zeichnet sich durch die Expression von 2 α Homodimeren im CD8 – Komplex aus. Die Funktion dieser Subpopulation ist weitestgehend unbekannt. Sie befinden sich teilweise in aktiviertem Status, besitzen protektive Effekte im Rahmen intestinaler Entzündungen und unterstützen die Wiederherstellung der Epithelbarriere nach Verletzungen. Ausserdem spielen sie bei der oralen Toleranz von Nahrungsantigenen eine Bedeutung.

Eine weitere Besonderheit ist, dass das intestinale Immunsystem in der Lage sein muss, zwischen Kommensalen und Pathogenen zu unterscheiden [65]. Zu dieser Differenzierungsmöglichkeit dienen Toll – like Rezeptoren (TLR) auf Makrophagen. Diese Rezeptoren sind in der Lage, Pathogen – assoziierte molekulare Muster (PAMPs) zu identifizieren [2]. Dieses System funktioniert besonders gut in den Peyer’schen Plaques, da sich Makrophagen und dendritische Zellen (DC) direkt unterhalb der M – Zellen befinden, die für die Einschleusung der Pathogene unter die epitheliale Barriere zuständig sind [50]. Weiterhin vermitteln TLRs Signale, die die *gatekeeping* Funktionen des FAE in der Antigenaufnahme durch DCs in organisierten mukosalen lymphatischen Gewebe fördern [14]. Durch die Bindung der PAMPs an TLRs werden intrazelluläre Signalwege aktiviert, co – stimulierende Signale hochreguliert und native T – Zellen durch das Signal aktiviert [52]. Die Rezeptoren, die PAMPs aufweisen, können sich sowohl auf gefährlichen als auch harmlosen Mikroorganismen befinden. Der Organismus besitzt verschiedene Schutzmaßnahmen. Zum einen bietet der Mukus Schutz vor direktem Kontakt mit dem FAE. Ausserdem schützt die bloße Anwesenheit von nicht pathogenen Keimen durch Kolonisierung vor pathogenen Keimen [7]. Es wird weiterhin angenommen, dass dendritische Zellen verschiedene Arten von Toll - like Rezeptoren haben. Sie induzieren bei Aktivierung verschiedene Zytokinantworten in Abhängigkeit unterschiedlicher Keime. Es scheint möglich, dass dendritische Zellen nicht invasive, harmlose Keime erkennen und die weitere Signalkette unterbrochen wird [76]. Diese Fähigkeit des intestinalen Immunsystems, auf mit der Nahrung aufgenommene Antigene keine Immunantwort zu generieren, bezeichnet man als orale Toleranz [69]. In Mausmodellen, bei denen die Bildung der Peyer’schen Plaques gehemmt war und die Bildung von M – Zellen ausblieb, konnte

gezeigt werden, dass trotzdem eine orale Toleranz gegenüber löslichen Proteinen induziert werden konnte [98]. Es wird ein komplexes interagierendes Immunsystem benötigt, um die Körperfunktionen aufrecht zu erhalten.

1.2 Peyer'sche Plaques

Peyer'sche Plaques sind schon makroskopisch an der Aussenseite des Maudünndarms zu erkennen. Es sind kleine, ca 1 – 2 mm weißlich erhabene Vorwölbungen. Mikroskopisch ist ein Peyer'scher Plaque aus Lymphfollikeln aufgebaut (8 PP/ Maus) Die Anzahl dieser Lymphfollikel variiert. Sie ist abhängig vom Alter als auch vom Immunstatus des Tieres. Im Darm des Menschen existieren 100 – 240 solcher Strukturen [60]. Ein Peyer'scher Plaque besteht aus verschiedenen Anteilen, die man mikroskopisch gliedern kann. Man unterscheidet das Zentrum, die Mantelzone, den Dom und die interfollikuläre Zone. Im Zentrum des Follikels befinden sich überwiegend IgA positive B – Zellen. Die Mantelzone umgibt das Zentrum. Hier findet man vorwiegend T – Zellen und vereinzelt B – Zellen. Der Dom sitzt der Mantelzone darmlumenwärts auf. Die Struktur des Doms entspricht einer Kappe. Hier befinden sich B – Zellen (Plasmazellen), T – Zellen (CD4⁺ Helferzellen), myeloide CD11b positive dendritische Zellen und Makrophagen [16, 51]. Die interfollikuläre Zone liegt zwischen benachbarten Follikeln. Hier sind unterschiedliche Subpopulationen von T – Zellen anzutreffen. Ein Peyer'scher Plaque ist über kleine spezialisierte Venen (HEV= *high endothelial venules*) an die Blutbahn angeschlossen. Die HEV ermöglichen Lymphozyten die Wanderung vom Blut in die PP [72]. Ein wichtiger Bestandteil des PP ist das Follikel – assoziierte Epithel (FAE). Dieses ist ein spezialisiertes Epithel, welches zum Darmlumen gelegen ist. Es besteht aus Enterozyten, wenigen Becherzellen und den M – Zellen. Das FAE unterscheidet sich wesentlich vom Villusepithel: Die Epithelzellen des FAE sind dem Inhalt des Darmlumens und damit Antigenen mehr ausgesetzt und stehen in engerem Kontakt mit dem Immunsystem [40].

Es gibt drei Phasen bei der Ontogenese eines Peyer'schen Plaques. Beim Menschen beginnt die Phase der Bildung um die 16. Gestationswoche [11]. Die erste Phase schließt die Genese der Lymphgefäße ein, danach kommt eine Phase, in der Blutgefäße einwachsen und sich primitive lymphatische Vorläuferzellen ansiedeln. In der dritten Phase kommt es zur Organisation auf zellulärer Ebene. Für die Histogenese der Peyer'schen Plaques sind einige

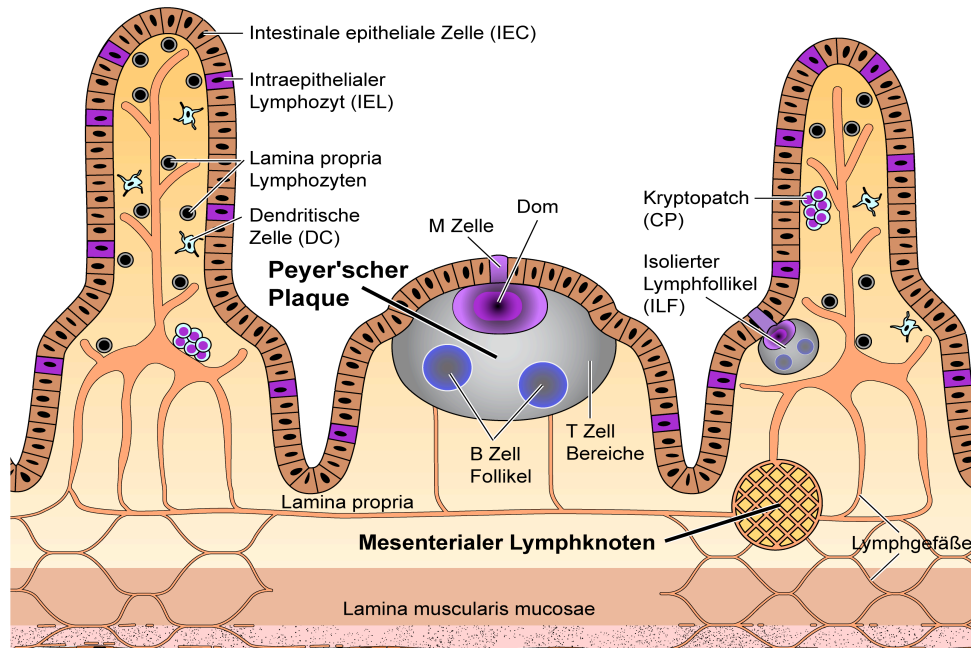


Abbildung 1.1: zeigt schematisch den Aufbau der Darmwand mit Zotten, Peyer'schen Plaques, M-Zellen sowie dem Lymphgefäßsystem.

Faktoren unentbehrlich. Hierzu zählen $\text{TNF-}\alpha$, die TNF Rezeptor Familie und der Interleukin 7 Rezeptor [30]. $\text{Il} - 7$ defiziente Mäuse sind nicht in der Lage, Peyer'sche Plaques zu bilden [1]. Ein wichtiger Ligand der TNF Rezeptor Familie ist Lymphotoxin α ($\text{Lt}\alpha$) [57]. Die Mehrzahl der $\text{Lt}\alpha$ Rezeptor und alle $\text{Lt}\beta$ Rezeptor Knockout Mäuse haben keine Peyer'schen Plaques oder periphere Lymphknoten [20]. Lymphotoxin α und β regulieren wie nur wenige andere Zytokine die Entwicklung der intestinalen Lymphorgane [99].

Ein weiterer Mechanismus der Bildung von Peyer'schen Plaques wurde an CXCR5 defizienten Mäusen gezeigt. Durch den Chemokin Liganden CXCL13 wird ein Integrin auf $\text{CD4}^+\text{CD3}^-\text{CD45}^+$ Lymphozyten aktiviert. Im Verlauf interagieren diese Zellen mit intestinalen Stromazellen, die über Lymphotoxine die Bildung der Peyer'schen Plaques ermöglichen. CXCR5 defiziente Mäuse können daher keine Peyer'schen Plaques bilden [26]. Daher spielen Lymphotoxine eine grosse Rolle bei der Histogenese der Peyer'schen Plaques. Die

Funktion der Peyer'schen Plaques besteht in der Induktion der Immunantwort auf Pathogene. Antigene werden aus dem Darmlumen, besonders über M – Zellen aufgenommen, und an tieferliegende Antigen – präsentierenden Zellen weitergereicht. Tierexperimentelle Daten zeigen, dass abhängig vom induzierenden Agens vermutlich unter dem Einfluss verschieden differenzierter Antigen präsentierender Zellen und des lokalen Zytokinmilieus spezifische T – Zellantworten in den Peyer'schen Plaques induziert werden [112, 70]. Die Grundlage für die Ausbildung einer protektiven, inflammatorischen oder tolerogenen Immunreaktion ist die Differenzierung der CD4 – T – Zellen in verschiedene T – Helfer – Zellen und T – Effektor – Zellen. Die Differenzierung der CD4 – T – Zellen in T_H1 – Zellen oder T_H2 – Zellen wird beeinflusst durch die Interaktion zwischen Krankheitserregern mit dendritischen Zellen, Makrophagen und natürlichen Killer (NK) – Zellen [68]. T_H1 – Zellen sind ausschlaggebend für die Makrophagenaktivierung im Rahmen der zellulären Immunantwort. Sie sezernieren proinflammatorische Zytokine wie Interferon – γ und Tumor – Nekrose – Faktor α ($TNF\alpha$). T_H2 – Zellen hingegen stimulieren B – Zellen zur Antikörperproduktion. Sie sezernieren hauptsächlich IL – 4, IL – 5 und IL – 13 [70, 18]. Auch CD8 – Zellen sind ein wichtiger Bestandteil beim Immunschutz besonders bei viralen Infektionen oder anderen intrazellulären Erregern. Sie binden an über MHC I Komplexe präsentierte Antigene und führen zur Zerstörung der befallenen Zellen [48]. Aktivierte CD4 - und CD8 – T – Lymphozyten erreichen über efferente Lymphgefäße die mesenterialen Lymphknoten und danach über den Blutstrom die Lamina propria. Die adaptive Immunantwort beseitigt im Idealfall die Erreger und verleiht dem Wirt durch die Ausbildung von Gedächtniszellen einen Immunschutz. Durch eine erneute Infektion mit demselben Erreger wäre der Wirt in der Lage, schneller und effektiver die Erreger zu bekämpfen.

1.3 M – Zellen

M- Zellen sind nach Owen *et al.* [75] spezialisierte intestinale Epithelzellen. Microfold oder membraneous Zellen, wie sie auch bezeichnet werden, kommen in organisiertem Mukosa assoziiertem lymphatischem Gewebe (*O- Malt*) und zwar ausschliesslich im Follikel- assoziiertem Epithel (FAE) vor [54]. Das FAE mit M- Zellen unterscheidet sich wesentlich vom Villusepithel. M- Zellen haben morphologisch keinen geordneten Bürstensaum, nur Mikrovilli ähnliche Strukturen und keine ausgeprägte Glykokalix. Der Antigenkontakt von M- Zellen

wird anscheinend durch die kaum vorhandene Glykokalix begünstigt [73]. Auch werden im FAE weniger Mukus und Defensine produziert. Paneth Zellen sind weniger vorhanden und es kann kein protektives IgA ins Darmlumen transportiert werden. Durch die Mukusreduktion wird ein schnellerer Kontakt zwischen Antigenen und Epithel erreicht [74]. Die Aufgabe der M- Zellen besteht darin, antigenes Material durch Endozytose aufzunehmen. Durch Transzytose wird das antigene Material an die immunkompetenten Zellen in der basolateralen Tasche des PP weitergeleitet. Diese Endo-, bzw. Transzytose geschieht relativ schnell (10 – 15 Minuten) [71, 104] und ist relativ unspezifisch. Die Antigene werden nicht an Lysosomen gekoppelt. Die mukosale Immunantwort wird nach Aufnahme des Antigens durch M- Zellen unverzüglich gestartet. Als Immunantwort werden Plasmazellen im Keimzentrum generiert. Plasmazellen produzieren IgA. Über afferente Blutgefäße gelangen Plasmazellen in den Blutkreislauf. Über diesen Weg erreichen sie entferntere mukosale Oberflächen. Dort induzieren sie eine humorale Immunantwort. Durch die Induktion der humoralen Immunantwort können z.B. Enterotoxine oder andere schädliche Makromoleküle eliminiert werden [83]. M- Zellen nehmen eine Vielzahl an Substanzen und Mikroorganismen auf (Partikel und Makromoleküle, Bakterien, Viren und Parasiten) [34]. Basolateral bilden M- Zellen eine M-Zell - Tasche. In dieser M – Zell – Tasche findet man verschiedene Zellen des Immunsystems wie dendritische Zellen, T – Lymphozyten, B – Lymphozyten oder auch sporadisch vorkommende Makrophagen. Fast alle T - Zellen in der M – Zell – Tasche sind T – Gedächtniszellen (CD45R0 und CD4⁺). Bei den B – Zellen gehören 60 % zu den B – Gedächtniszellen (sIgD⁻ und CD20⁺), die restlichen 40 % sind B – Zellen, die noch nicht mit Antigenen in Kontakt getreten sind (sIgD⁺ und CD20⁻) [25]. B/ T- Zell Interaktionen finden in der M – Zell Tasche statt und dabei kommt es zur Formierung und Klonierung von B- Gedächtniszellen. In der M-Zell Tasche sind B- Zellen durch ihre große Anzahl die wichtigsten antigen-präsentierenden Zellen [71, 72]. Daher werden M- Zellen häufig als *Tor* zu den immunkompetenten Zellen der intestinalen Mukosa bezeichnet.

Die Entstehung der M – Zellen wird kontrovers diskutiert. Während eine Hypothese besagt, dass sich M – Zellen aus Stammzellen im Bereich der Krypten entwickeln, geht eine zweite Hypothese von der Entwicklung durch Konversion aus bereits differenzierten Enterozyten aus. Die Hypothese, dass sich M – Zellen wie andere Epithelzellen aus Stammzellen entwickeln, wurde hauptsächlich am Darm erforscht. Alle Epithelzellen werden aus Stammzellen, die in den Krypten des Darms lokalisiert sind, generiert. Einen ringförmig angeord-

neten Pool von Stammzellen (Vorläuferzellen) findet man in jeder Krypte. Die Wandlung zu ausdifferenzierten Epithelzellen findet erst nach Migration in den Dom der Peyer'schen Plaques oder des Villus statt [92]. Aus morphologischen und immunhistochemischen Studien [12, 35, 33, 37] konnte geschlossen werden, dass das Differenzierungsprogramm von spezifischen Stammzellen in den Krypten der Peyer'schen Plaques auch die Differenzierung der nur dort vorkommenden M – Zellen beinhaltet.

Bei der zweiten genannten Hypothese spielen Konversionsvorgänge bei der Ontogenese der M – Zellen eine Rolle. Es konnte ein Ansteigen der Anzahl der M – Zellen im FAE innerhalb weniger Stunden gezeigt werden, wenn der Darm einem nicht – intestinalen Bakterium ausgesetzt wird [10]. Dies lässt vermuten, dass es Enterozyten im FAE gibt, die in der Lage sind, sich zu M – Zellen auszdifferenzieren. Auch wurden Hinweise gefunden, dass bei der Ontogenese von M – Zellen Zell zu Zell – Kontakte sowie lösliche Faktoren eine Rolle spielen [90]. Lymphozyten sollen bei der Differenzierung von M – Zellen ebenso eine Rolle spielen, da M -Zellen an das Vorhandensein von Lymphfollikeln gebunden sind [47]. B – Zellen scheinen hierbei eine besondere Rolle zu spielen. Bei speziellen B – Zell defizienten Mäusen ist die Größe und die Anzahl der M – Zellen stark vermindert [38, 58]. B – Zellen beeinflussen Formation und Bildung der M – Zellen. Diese Schlussfolgerung zieht man vor allem aus Versuchen mit dem Igh – Mausstamm. In diesem Mausstamm finden sich durch den Genknockout des μ Membransegmentes (Igh-6) keine B – Zellen. Die Mäuse sind nicht in der Lage, FAE und M – Zellen in normaler Größe und Form zu bilden. Nach transgener Expression von membranständigem IgM bildeten sich bei diesem Mausstamm FAE sowie M – Zellen in normaler Größe und Form aus [38]. KERNEIS *et al.* [55] zeigten ein *in vitro* Modell von B – Zellen und Enterozyten der Caco – 2 Linie in Co – Kulturen. Hierbei fanden sie heraus, dass sich Enterozyten in M – Zell – artige Zellen umwandeln können. SCHULTE *et al.* [93] konnten bei diesen M – Zell – artigen Zellen einen Umbau der Mikrovilli zeigen, ferner einen temperaturabhängigen Transport von *Y. enterocolitica* und *V. cholera*. Auch TYRER *et al.* [106] zeigten, dass ein Teil der intestinalen Enterozyten eine M – Zell – Morphologie *in vitro* annehmen, wenn sie in Peyer'schen Plaques kultiviert wurden. Ausserdem fanden sie einen wesentlichen Einfluss von *in vitro* CD4+ Zellen auf die Entwicklung der M – Zellen. Ein weiterer Versuch zeigte, die Möglichkeit der Induktion von FAE und M – Zellen durch Lymphozyten der Peyer'schen Plaques. Bei diesem Experiment wurden SCID – Mäusen Lymphozyten aus Peyer'schen Plaques von gesunden Mäusen i.v. gegeben. Das

Ergebnis war eine *de novo* Synthese von Lymphfollikeln mit FAE und M – Zellen im Darm von SCID – Mäusen [89]. Ein im Jahre 2000 vorgestelltes Modell stellt die Hypothese einer Differenzierung von Enterozyten zu M – Zellen unter dem Einfluss des einzigartigen Umfeldes im FAE auf [97]. Diese Annahme wurde von Chin *et al.* [15] unterstützt. Sie zeigten die Stimulation der Differenzierung der M – Zellen im FAE unter physiologischen Bedingungen durch eine einheimische, bakterielle Kolonisation im FAE. Dabei fördert die Bakterienaufnahme durch die M – Zellen die Entwicklung einer einheimischen, bakteriellen Kolonisation des Dünndarms. Schlussendlich ergeben sich einige Hinweise darauf, dass M – Zellen eine eigene Zelllinie darstellen, jedoch deuten neuere Untersuchungen darauf hin, dass sich M – Zellen aus regulären Epithelzellen unter Einfluss der in der SED befindlichen mononukleären Zellen differenzieren.

M- Zellen dienen als Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen. Im Tiermodell wurden Untersuchungen zur Invasion von Bakterien wie Yersinien, Shigellen oder Salmonellen durchgeführt. Diese Ergebnisse tragen, obwohl am Tiermodell untersucht, zum Verständnis des Infektionsverlaufs beim Menschen bei [43]. Der erste Schritt der Invasion von Mikroorganismen an den M – Zellen besteht in der Adhärenz an diese. Ziel der Bakterien sind Strukturen wie Cadherine und Integrine [103]. Diese befinden sich an der Zytoplasmamembran der M – Zellen. Da M – Zellen die aufgenommenen Antigene im Wesentlichen unverändert aufnehmen und transportieren, gelangen die Bakterien unter die Basalmembran. Die Bakterien lösen eine Infektion im Wirt aus. Abhängige Faktoren, die eine Infektion beeinflussen, sind Virulenz- oder Pathogenitätsfaktoren. Schlüsselfaktoren in der Erkennung von intestinalen Antigenen durch die M-Zellen zur Vorbereitung der mukosalen Immunantwort sind Mustererkennende Rezeptoren wie die Toll-like Rezeptoren in Interaktion mit molekularen Mustern auf den jeweiligen Pathogenen [105]. Der Übertritt der Bakterien in die Blutbahn ist abhängig von der körpereigenen Abwehr. Setzt diese frühzeitig ein, kann die Infektion lokalisiert bleiben.

Verschiedene Mikroorganismen heften sich bevorzugt an M – Zellen. Manche haben Methoden entwickelt, M – Zellen als Eintrittspforte zu nutzen, um die Epithelbarriere zu überwinden. Salmonellen heften sich bevorzugt an M- Zellen. Nach Eintritt der Salmonellen unter das Epithel kommt es zur Auslösung einer Membranveränderung der M - Zellen. Durch Transzytose in einer membrangebundenen Vakuole erreichen die Bakterien unverändert die M-Zell Tasche. Dort beginnt die Phagozytose durch mononukleäre Zellen. Das Überleben der

Salmonellen hängt u.a von ihren Virulenzfaktoren und der Verhinderung des oxidativen Burst ab. Werden sie nicht phagozitiert, gelangen sie über die Barriere in den Kreislauf [27, 53, 43]. Auch Shigellen und E.coli versuchen u.a. M – Zellen als Eintrittspforte zu nutzen. Die Invasion von *Shigella flexneri* ist nicht von der apikalen Seite des Darms aus möglich. *Shigella flexneri* greift von der basolateralen Seite nach Transzytose durch die M – Zellen benachbarte Enterozyten an [72, 96]. Enteropathogene E. coli versuchen über die Adhärenz an Pili der M – Zelle in diese zu gelangen. Die Aufnahme des Bakteriums wird dadurch verhindert, dass sich unterhalb des Bakteriums Aktinansammlungen bilden, die die Einschleusung in die M – Zelle unmöglich machen [27]. Ausser Bakterien (z.B. *Shigella flexneri*, E. coli, *Salmonella*, *Y. enterocolitica* etc.) können neben Partikeln und Makromoleküle auch Viren (z.B. Reovirus Typ 1 und 3, Poliovirus Typ 1, Human Immunodeficiency Virus Typ 1) und Parasiten über die M - Zelle aufgenommen werden. Die Vielzahl der unterschiedlichen Antigene, die durch M – Zellen aufgenommen werden, spiegelt die Bedeutung der M – Zelle in der mikrobiellen Aufnahme und Weiterleitung an immunkompetente Zellen wieder.

1.4 Yersinien

Die Gattung *Yersinia* (alte Bezeichnung *Pasteurella*) wird phylogenetisch in die Familie der *Enterobacteriaceae* eingeordnet. Es gibt 11 Arten, von denen nur *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis* humanpathogen sind. Nach Salmonellen- oder *Campylobacter jejuni*- Infektionen stellen diese die dritthäufigste Gruppe bakterieller Enteritiserreger dar. Yersinien sind gramnegative, fakultativ anaerobe, nicht sporenbildende Stäbchen. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 28 ° C und der Wachstumsbereich zwischen 4 ° C und 42 ° C. Während *Y. pestis* stets unbeweglich ist, sind die beiden anderen humanpathogenen Bakterien bei 28 ° C beweglich, jedoch nicht mehr bei 37 ° C. Die Unterscheidung verschiedener fakultativ anaerober gramnegativer Stäbchen der Familie der Enterobakterien oder auch innerhalb einer Art (z.B *Y. pseudotuberculosis* von *Y. enterocolitica*) erfolgt biochemisch. *Y. enterocolitica* stellt hierbei eine sehr heterogene Art dar. Sowohl biochemisch als auch serologisch kommen verschiedene pathogene und apathogene Untergruppen vor. Man kann 6 Biovare und ca. 60 Serovare (O- und H- Antigene) unterscheiden [111]. *Y. pseudotuberculosis* stellt biochemisch eine einheitliche Art dar. Man kann 8 Serogruppen unterscheiden, von denen in Europa die Serovare I, II und III von humanmedizinischer Bedeutung sind.

Enteropathogene Yersinien invadieren M- Zellen der Peyer'schen Plaques [44, 13]. Diese dienen den Erregern als Ausgangspunkt zur Vermehrung und Verbreitung im Organismus. Sie sind in der Lage, generalisierte Infektionen mit Lymphadenitis und Abszessbildung auszulösen. Das Vorhandensein mobiler genetischer Elemente bestimmt die Pathogenität der Yersinien. *Y. enterocolitica* (in diesem Modell verwendet) trägt ein 70 kb großes hochkonserviertes Virulenzplasmid *pYV*. Dieses Virulenzplasmid kodiert u.a. die Pathogenitätsfaktoren wie das Typ III – Sekretionssystem mit seinen Effektorproteinen *Yops* und *Yad A* [36, 46, 80]. Durch diese unterschiedlichen Pathogenitätsfaktoren haben sie einen Schutz vor der angeborenen Immunantwort wie z.B. Makrophagen. So setzen sich die Bakterien gegen Phagozytose, reaktive Sauerstoffintermediate und Defensine zur Wehr. Neben den plasmidkodierten Pathogenitätsfaktoren existieren auch chromosomale Faktoren, die entscheidend die Virulenz von *Y. enterocolitica* beeinflussen. Hierzu zählen die Außenmembranproteine *Inv*, *Ail* und *Myf*, das sezernierte und hitzestabile Toxin *Yst* und das Yersiniabactin – Siderophorsystem *FyuA* mit *Irp1-9* [17].

Nach Aufnahme bilden Yersinien das Außenmembranprotein Invasin (*Inv*). Das Invasin ist ein 18 nm langes, stabförmiges Protein mit fünf Domänen und zeigt Ähnlichkeiten mit integrinbindenden Bereichen von Fibronectin [41]. Das *Inv* interagiert mit $\beta 1$ - Integrinen benachbarter epithelialer Zellen [103]. Über die Interaktion von *Inv* mit $\beta 1$ - Integrinen auf der luminalen Seite der M - Zelle im FAE der PP gelingt die Invasion epithelialer Zellen [93].

Das Außenmembranprotein *Ail* (*attachment invasive locus*) fördert die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* und führt zur Invasion in Epithelzellen. Die Virulenz des Erregers konnte durch eine Inaktivierung von *Ail* im Infektionsversuch (Mausmodell) nicht beeinflusst werden [110]. Das Außenmembranprotein *Myf* (*mucoïd Yersinia fibrillae*) wird nur von pathogenen *Y. enterocolitica* – Serotypen exprimiert. Die Funktion von *Myf* ist bisher noch ungeklärt.

Nach Zelladhärenz werden *Yops* (*Yersinia Outer Proteins*), Effektorproteine, über das Typ III – Sekretionssystem in die Zelle injiziert. Diese Injektion von Effektorproteinen führt zu einer Veränderung intrazellulärer Signalwege. Es gibt mehr als ein Dutzend identifizierte und auf ihre Funktion untersuchte *Yops*. Das *Yersinia Adhäsion A* (*YadA*) ist ein bedeutender Pathogenitätsfaktor für die Virulenz von *Y. enterocolitica* [77]. *YadA* ist ein Adhäsion, welches multifunktionelle Eigenschaften besitzt. *YadA* adhärert sowohl an epitheliale Zellen [45] als auch an Proteine der extrazellulären Matrix (ECM – Proteine) wie Kollagen Typ I, II, IV u.a. [23, 94, 84], an Laminin [29, 101] und an zelluläres Fibronectin [102, 94].

Das *Yersinia Adhäsion A* kann sich auch in unopsoniertem Zustand an humane Granulozyten binden [85]. Dies ermöglicht die Inaktivierung der Granulozyten durch Injektion von *Yersinia Outer Proteins (Yops)* über das Typ III – Sekretionssystem. Weiterhin wird *YadA* ein protektiver Effekt gegen die Defensine von Granulozyten zugesagt [109]. Auch beeinflusst die *YadA* Expression in hohem Maße die Serumresistenz von *Y. enterocolitica* [78, 86]. Mittels Transzytose werden Yersinien auf die basolaterale Seite der M - Zelle gebracht. Durch die Interaktion von Yersinien mit $\beta 1$ - Integrinen der Enterozyten induzieren diese die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie $\text{IL} - 8$.

In Studien konnte die Bedeutung von Zytokinen wie Interferon $-\gamma$, $\text{TNF} - \alpha$, $\text{IL} - 12$ und $\text{IL} - 18$ für die Immunantwort demonstriert werden. Andere Zytokine dagegen wie $\text{IL} - 1\beta$ fördern die Entwicklung der Infektion [9, 21]. Zytokine wie $\text{IL} - 8$ aktivieren PMN (Polymorphkernige neutrophile Granulozyten) [39], diese migrieren in befallene Zellen. Die Migration der PMNs durch das Epithel führt zur Zerstörung des Gewebes. Dies begünstigt und verstärkt die Translokation der Yersinien in die PP. Yersinien können sich aufgrund der Expression von anti- phagozytotischen Proteinen *Yad A* und *Yops* weiterhin ungehindert vermehren. *Yops* migrieren in das Zytosol der Wirtszelle. Dort unterdrücken sie durch Apoptose- Induktion eine Immunantwort [39]. Die Ausbreitung der Bakterien erfolgt in die mesenterialen Lymphknoten, die Milz und die Leber.

Typische Zeichen einer Yersiniose ist eine Ileitis (Dünndarmentzündung) und Ileocolitis (Dünn- und Dickdarmentzündung). Hinzu treten Pseudoappendizitis sowie akute mesenteriale Lymphadenitis (Lymphknotenentzündung). Als postinfektiöse Komplikationen sind reaktive Arthritis (Gelenkentzündung), Uveitis (Augenentzündung) und Thyreoiditis (Schilddrüsenentzündung) beschrieben. Unbehandelt geht die Yersinien Infektion in ein septisches und zuletzt letales Stadium über.

1.5 Chemokine und der CCR6 Rezeptor

Chemokine sind chemotaktische Zytokine, die von Leukozyten, Endothelzellen und Keratinozyten gebildet werden. Nach Bindung an ihre Rezeptoren können sie ihre intrazelluläre Wirkung entfalten [49]. Chemokine sind eine Unterfamilie der Zytokine mit starker chemotaktischer Aktivität als Antwort auf Entzündungssignale. Alle Chemokine sind strukturell verwandt (3 β Blattblätter und 1 α Helix). Sie werden in 2 große und 2 kleine Familien unter-

teilt. Die Bezeichnung richtet sich nach 2 konservierten, aminoterminalen Cysteinen in der Sequenz.

- Cysteine benachbart: CC Chemokine
- 1 Aminosäure dazwischen: CXC Chemokine
- 3 AS dazwischen: C(X)3C Chemokine
- nur 1 Cystein: C Chemokine

Die dazugehörigen Rezeptoren sind 7 Transmembran-Domän-Rezeptoren. Chemokinrezeptoren sind gekoppelt an G-Proteine mit 3 intra- und 3 extrazellulären Loops. Sie gehören der Rhodopsin Oberfamilie an. Die Signaltransduktion erfolgt über heterotrimere G-Proteine. Im Allgemeinen verwenden Chemokine ihre Rezeptoren redundant.

Der CCR6 Rezeptor besitzt im Gegensatz zu anderen Chemokinrezeptoren nur einen Liganden: Mip- 3 α (LARC, Exodus, CCL20). Im humanen System konnte der CCR6 Rezeptor auf DC, B- Zellen und Unterformen von CD4⁺ und CD8⁺ T- Zellen nachgewiesen werden. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigt sich in der Maus [81]. Der Rezeptor CCR6 hat eine große Bedeutung für die Entwicklung des organisierten lymphatischen Systems. Nahezu alle peripheren B – Zellen und Teile dendritischer Zellen exprimieren CCR6. 10 -20 % der peripheren CD4⁺ T – Zellen und wenige CD8⁺ T – Zellen tragen den Chemokinrezeptor auf ihrer Oberfläche [59].

Der Ligand Mip - 3 α kommt spezifisch im FAE der Peyer'schen Plaques vor. Dies lässt vermuten, dass die Interaktion von CCR6 mit Mip-3 α für die Migration von CCR6 - positiven Zellen und T – Zellen in der Mukosa zur Induktion einer Immunantwort notwendig ist [95]. Der CD4/CD8 Quotient der T- Zell - Population ist in der CCR6 –/– Maus deutlich erniedrigt. Die Zytokin Sekretion ist verändert. Die PP sind deutlich grössenreduziert (50,6% +/- 9) und in ihrer Anzahl verringert. Elektronenmikroskopisch und durch Färbung mit dem M – Zell spezifischen Marker UEA – 1 konnte eine deutliche Erniedrigung an M- Zellen im FAE der PP nachgewiesen werden [61].

Initiale Arbeiten beschrieben, dass der CCR6 Gen Knock – out in der Maus zu einem Verlust von CCR6 – exprimierenden myeloiden dendritischen Zellen in der subepithelialen

Domregion (SED) der Peyer'schen Plaques und zu einer diffusen Expansion der intraepithelialen Lymphozyten (IEL) und der Lamina propria T – Zellen führt [113, 16, 107]. Neuere Arbeiten dagegen zeigen, dass in CCR6 defizienten Mäusen sich trotzdem diese Subpopulation dendritischer Zellen (CCR6 – exprimierende myeloide dendritische Zellen) innerhalb der subepithelialen Domregion (SED) beobachten lässt. Ihre Migration ist von anderen Chemokinen abhängig [115]. Der Verlust des Chemokinrezeptors führt auch in anderen Zellpopulationen nicht zu einer Beeinträchtigung des Migrationsverhaltens Rezeptor – exprimierender Zellen. Die unveränderte Lokalisation der Zellen deutet auf eine weitere Funktion des Rezeptors *in vivo* hin [61].

1.6 Frage- und Problemstellung

Erste Beobachtungen in der CCR6 –/– Maus zeigen vor allem histologische Veränderungen in den Peyer'schen Plaques mit einer Größenreduktion der PP und einem Verlust von M – Zellen im FAE [62].

Da Yersinien die M – Zellen als Eintrittspforte in die PP nutzen und die CCR6 –/– Maus eine Größenreduktion der PP und eine Reduktion in der Zahl der M – Zellen aufweist, sind diese Erreger zur Untersuchung des Invasions- und Infektionsverlauf an der CCR6 defizienten Maus geeignet. In dieser Arbeit wurde anhand eines Infektionsmodells mit *Y. enterocolitica* [22, 42] die Funktion der Peyer'schen Plaques und der M – Zellen in Abwesenheit von CCR6 im Vergleich zu Mäusen mit intaktem Chemokinrezeptor geprüft. Kriterium für die Funktionalität der M - Zellen war folgerichtig bei den über diese Zellen invadierenden Yersinien ein Unterschied in der Infektion der verschiedenen Mausstämmen mit dem Bakterium.

C57BL/6 Kontroll Mäuse und CCR6 defiziente Mäuse wurden oral oder intraperitoneal mit *Y. enterocolitica* infiziert. Die Bakterieninvasion der PP wurde histologisch und immunhistologisch ausgewertet. Die Bakterienbesiedlung wurde anhand von Stuhl-, und Gewebeproben (PP) untersucht. Die Zytokin Expressionen in PP und Milzzellen wurden mittels RT – PCR und ELISA gemessen.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien / Verbrauchsmaterial	Hersteller
Marker DNA (Agarosegelelektrophorese, 100 bp Ladder)	Invitrogen, Karlsruhe
Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Aqua ad inj.	Braun, Melsungen
Äther	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Sigma, Deisenhofen
DEPC Wasser (Diethyl-Pyrocbonat)	Sigma, Deisenhofen
DNase I Reaktionspuffer 10 *	Invitrogen, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
dNTPs	Qiagen, Hilden
Dulbeccos PBS (phosphatgepufferte Salzlsg.) mit bzw. ohne Calcium/Magnesium	Cambrex Bioscience, Verviers, Belgien
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Mol. biol. grade	Sigma, Deisenhofen
Ethanol 96%	Merck, Darmstadt
Fetales Rinderserum (FBS)	PAA, Pasching, Österreich
Hämatoxylinlösung	Sigma, Deisenhofen
Isopentan (2-Methybutan)	Merck, Darmstadt

Tabelle 2.1: Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (Forts.)

Chemikalien / Verbrauchsmaterial	Hersteller
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
MgCl ₂	Invitrogen, Karlsruhe
Nalidixinsäure	Sigma, Deisenhofen
OCT Tissue Tek Compound	Sakura, Zoeterwonde, NL
o-Phenylendiamine	Sigma, Deisenhofen
PCR Puffer 10*	Invitrogen, Karlsruhe
Perhydrol 30 % H ₂ O ₂	Merck, Darmstadt
SYBR Green I™ Mastermix	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Tetramethylbenzidine	Sigma, Deisenhofen
TNB Blocking Puffer	Perkin Elmer, Boston, MA, USA
TRIZol	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Vitro-Clud	Langenbrinck, Teningen
Xylol	Merck, Darmstadt

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien in p.A. Qualität eingesetzt. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden in p.A. Qualität bei der Firma Sigma (Deisenhofen) erworben.

2.2 Enzyme

Tabelle 2.2: Enzyme

Enzym	Hersteller
SuperScript II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Thermus aquaticus</i> Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxyribonuklease I	Stratagene, La Jolla, CA, USA
RNase	Promega, Mannheim

2.3 Antikörper und Proteine

Tabelle 2.3: Primärantikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Maus <i>inv</i> (aus Kaninchen) pAb	mit freundlicher Genehmigung von Dr. Gerhard Heusipp, Inst. für Infektiologie, WWU Münster
anti-Maus IFN- γ (aus Ratte) pAb & Biotin-konjugierter pAb	Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus IL-4 (aus Ratte) pAb & Biotin-konjugierter pAb	Pharmingen, Heidelberg
anti-Maus IL-10 mAb & Biotin-konjugierter mAb	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
anti-Maus IL-12 mAb & Biotin-konjugierter mAb	BD Biosciences, Erembodegem, B
anti-Maus TNF- α mAb & Biotin-konjugierter mAb	BD Biosciences, Erembodegem, B

Tabelle 2.4: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Kaninchen IgG (aus Ziege), Biotin konjugiert	Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin, HRP konjugiert	BD Biosciences, Erembodegem, B

Tabelle 2.5: Rekombinante Proteine

Protein	Hersteller
Maus IFN - γ , rekombinant, lyophilisiert	Pharmingen, Heidelberg
Maus IL - 4, rekombinant, lyophilisiert	Pharmingen, Heidelberg

Tabelle 2.5: Rekombinante Proteine (Forts.)

Protein	Hersteller
Maus Il – 10, rekombinant, lyophilisiert	Pharmingen, Heidelberg
Maus Il – 12, rekombinant, lyophilisiert	BD Biosciences, Erembodegem, Belgien
Maus TNF - α , rekombinant, lyophilisiert	BD Biosciences, Erembodegem, B
Streptavidin Alexa Fluor 546	Molecular Probes, Eugene, OR, USA

2.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotidprimer für die Polymerasekettenreaktion wurden mit dem Programm PrimerExpress 2.0 (Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) entworfen, als Rohdaten wurden die kodierenden Sequenzen für die einzelnen Gene aus der *Gene Bank* des National Institute of Health, Bethesda, ML, USA (<http://ncbi.nlm.nih.gov>) entnommen. Besondere Beachtung fanden beim Primerdesign die Anforderungen des Realtime-PCR-Systems an die Oligonukleotidprimer (Fragmentlänge zwischen 150 - 200 bp, Schmelzpunkt 58-62 ° C).

Tabelle 2.6: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz 5 – 3
Il-4 sense	ACA GGA GAA GGG ACG CCA T
Il-4 antisense	GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA
Il-6 sense	GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC
Il-6 antisense	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
Il-10 sense	GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA
Il-10 antisense	ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT
Il-12 sense	GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA
Il-12 antisense	AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG
TGF- β sense	CGG GGC GAC CTG GGC ACC ATC CAT GAC
TGF- β antisense	CTG CTC CAC CTT GGG CTT GCG ACC CAC
TNF- α sense	ATG AGC ACA GAA AGC AGT ATC
TNF- α antisense	TAC AGG CTT GTC ACT CGA ATT
β -Aktin sense	GAG GGA AAT CGT GCG TGA CA

Tabelle 2.6: Oligonukleotide (Forts.)

Oligonukleotid	Sequenz 5 – 3
β -Aktin antisense	GAA CCG CTC GTT GCC AAT AG
Il-1 β sense	GAA GTT GAC GGA CCC CAA AAG
Il-1 β antisense	ACA GCT TCT CCA CAG CCA CAA

2.5 Versuchstiere

Die *in vivo* Studien wurden an Mäusen durchgeführt. Bei den Tieren handelte es sich um die Mausstämme C57BL/6J, bezogen von der Firma The Charles River Laboratory, Sulzfeld, Deutschland und CCR6 $-/-$ Mäusen, die in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universität (UKM) Münster gezüchtet wurden. CCR6 $-/-$ Mäuse wurden von Prof. Kucharzik (Leiter der Arbeitsgruppe GMI, Universität Münster) und Prof. Ifor Williams (Leiter der Arbeitsgruppe an der Emory University in Atlanta) generiert. Die CCR6 $-/-$ Mäuse sind EGFP gelabelt, d.h. in den CCR6 - Locus wurde ein EGFP Gen einkloniert, mit dessen Hilfe das Expressionsprofil von CCR6 näher charakterisiert werden kann. Homozygote CCR6 $-/-$ Mäuse wurden 8-9 mal auf C57BL/6J Mäuse rückgekreuzt. Die Mäuse waren ausschließlich weiblichen Geschlechts und wogen im Durchschnitt 18 g. Um sie an die neue Umgebung zu gewöhnen, wurde eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche eingehalten. Die Tiere wurden im Institut für Mikrobiologie der Westfälische Wilhelms Universität Münster unter sterilen Standardbedingungen mit einem 12- stündigen Tag/ Nacht Rhythmus gehalten. Die Mäuse erhielten uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Laborfutter.

2.6 Bakterien und Wachstumskonditionen

Y. enterocolitica Typ JB580v ist ein Stamm, der abgeleitet wurde von einem virulenten amerikanischen Stamm, 8081v, Serogruppe 0:8, Biotyp 1B, Nal^{r18}. JB580v wurde über Nacht bei 26-28 ° C auf Luria- Bertani (LB) Medium (siehe Tabelle 2.12) + 20 μ g/ml Nalidixinsäure (Sigma, Deisenhofen) angezogen. Die Anzahl an CFU (Colony forming unit) wurde ermittelt durch Ausplattieren von jeweils 100 μ l. Das Ausplattieren erfolgte in serieller Verdünnung auf LB Medium in Duplikation.

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.7: Tris-Acetat-EDTA-Puffer

Chemikalie	Menge
Tris-Base	242 g
Essigsäure	57,1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
aqua dest. ad	1000 ml

Tabelle 2.9: DNA-Ladepuffer

Chemikalie	Menge
Glycerin	50 % (v/v)
SDS	0,2 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,05 % (w/v)
1x TAE - Puffer	ad 100 %

Tabelle 2.11: Methylenblau – Lösung

Chemikalie	Menge
Methylenblau	1 g
Borsäure	2 g
aqua dest. ad	1000 ml

Tabelle 2.8: Phosphate Buffered Saline (PBS)

Chemikalie	Menge
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ * 2 H ₂ O	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
aqua dest. ad	1000 ml

Tabelle 2.10: DNA-Längenstandard

Chemikalie	Menge
1 * TAE Puffer	7 µl
1bp DNA ladder	1 µl
DNA Ladepuffer	2 µl

Tabelle 2.12: LB (Luria-Bertani) Medium

Chemikalie	Konz.
Trypton	1 %
Hefe Extrakt	0,5 %
NaCl	1 %
pH	7,0

Tabelle 2.13: TNB blocking Puffer

Chemikalie	Menge
Tris HCl	0,5 M
NaCl	0,15 M
blocking Reagenz	0,5 %
pH	7,6

Tabelle 2.15: Coating Puffer für TNF- α , Il-10, Il-12

Chemikalie	Menge
Natrium Phosphat	0,2 M pH 6,5
Na ₂ HPO ₄	11,8 g
NaH ₂ PO ₄	16,1 g pH 6,5
aqua dest. ad	1000 ml
Verwendung	Innerhalb 7 Tagen
Lagerung	2–8 °C

Tabelle 2.17: Coating Puffer für IFN- γ , Il-4

Chemikalie	Menge
Na ₂ CO ₃	0,1 M
NaHCO ₃	0,1 M
aqua dest. ad	1000 ml, pH 9,6

Tabelle 2.19: Wasch Puffer für IFN- γ , Il-4

Chemikalie	Menge
D-PBS	
Tween 20	0,1 %

Tabelle 2.14: Tris-Puffer 0,5 M

Chemikalie	Menge
Tris-Base	60,55 g
aqua dest. ad	1000 ml
pH einstellen auf	6,8 bzw. 8,8

Tabelle 2.16: Phosphate Buffered Saline (PBS) für ELISA

Chemikalie	Menge
NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	11,6 g
KH ₂ PO ₄	2 g
KCl	2 g
aqua dest. ad 10000 ml	pH 7,0

Tabelle 2.18: Wasch Puffer für TNF- α , Il-10, Il-12

Chemikalie	Menge
D-PBS	
Tween 20	0,05 %

Tabelle 2.20: Block Puffer für TNF- α , Il-10, Il-12

Chemikalie	Menge
D-PBS	
FBS	10 %
pH	7,0
Verwendung	Innerhalb 3 Tagen
Lagerung	2–8 °C

Tabelle 2.21: Block Puffer für IFN- γ , Il-4

Chemikalie	Menge
D-PBS	
BSA	1 %
pH	7,3
Verwendung	Innerhalb 3 Tagen
Lagerung	2-8 ° C

Tabelle 2.22: Substrat Lösung für TNF- α , Il-10, Il-12

Chemikalie	Menge
Tetramethybenzidine	150 μ l
Na-Acetat	15 ml
H ₂ O ₂ 30 %	1,5 μ l

Tabelle 2.23: Substrat Lösung für IFN- γ , Il-4

Chemikalie	Menge
OPD-Puffer	11 ml
o-Phenylendiamin	11 mg
H ₂ O ₂ 30 %	11 μ l

Tabelle 2.24: OPD Puffer für IFN- γ , Il-4

Chemikalie	Menge
NaH ₂ PO ₄	0,2 M
Na Citrat	0,1 M
pH	5,0

3 Methoden

3.1 Tierversuch

3.1.1 Induktion und Kontrolle der bakteriellen Infektion von Mäusen mit *Y. enterocolitica*

Prinzip Zur Untersuchung der Invasionseigenschaften von *Y. enterocolitica* wurde ein Tiermodell (Mausmodell) verwendet. Die Infektion erfolgte oral oder intraperitoneal. Verglichen wurden C57BL/6J Mäuse versus CCR6 $-/-$ Mäuse (zu Mäusen siehe Abschnitt 2.5, Versuchstiere).

benötigtes Material

- *Y. enterocolitica* (mit freundlicher Genehmigung von Dr. Gerhard Heusipp, Institut für Infektiologie, Universität Münster)
- C57BL/6J bezogen von der Firma The Charles River Laboratory, Sulzfeld, Deutschland
- CCR6 $-/-$ Mäuse, von Prof. Kucharzik (Leiter der Arbeitsgruppe GMI, WWU Münster) und Prof. Ifor Williams (Leiter der Arbeitsgruppe an der Emory University in Atlanta) generiert.
- LB – Medium + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Nalidixinsäure (Sigma - Aldrich, Deisenhofen)
- D – PBS (ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} , Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)

Protokoll Die Mäuse (CCR6 $-/-$ sowie auch die C57BL/6J) wurden jeweils mit $2,5 \cdot 10^7$ CFU *Y. enterocolitica* oral gavagiert. Eine intraperitoneale Infektion (i.p.) erfolgte mit $1 \cdot 10^6$ CFU *Y. enterocolitica* je Maus. Die Kontrolle der Infektion erfolgte zum einen über die Bakterienlast im Stuhl. Kot (2-3 Proben pro Maus) wurde an Tag 2 und 6 gesammelt. Nach

dem Abwiegen (Gewicht safe lock + Kot – Leergewicht safe lock) wurde 1 ml D-PBS pro 0,2 g Stuhl hinzugegeben. Die Proben wurden mit Hilfe eines Rüttlers (HS2 Minishaker IKA) homogenisiert. 100 μ l je Probe wurden bei einer Verdünnung von 10^7 , 10^8 und 10^9 auf LB Medium (+ 20 μ g/ ml Nalidixinsäure) bei 28 ° C kultiviert. Nach einem Tag erfolgte die Auswertung.

Eine weitere Kontrolle erfolgte über die Bakterienlast in der Milz und den Peyer'schen Plaques (PP) der Mäuse. Hierbei wurden die unter sterilen Bedingungen entnommenen Organe durch ein Sieb gepresst, zentrifugiert und mit 2 ml PBS je Probe resuspendiert. 100 μ l der Proben wurden daraufhin auf LB Medium (+ 20 μ g/ ml Nalidixinsäure) ausplattiert und am darauf folgenden Tag ausgezählt.

3.1.2 System zur Einschätzung der Erkrankung von Mäusen mit *Y. enterocolitica*

Tabelle 3.1: Infektionsparameter

Parameter	Punktverteilung
Allgemeinzustand	0: gesund, 1: eingeschränkte Vitalität, 2: eindeutige Symptome wie Buckel machen, zotteliges Aussehen, Augenentzündung, 3: apathisch
Mitbeteiligung von Organen	0: keine Organbeteiligung, 1: ein Organ ist beteiligt, 2: zwei Organe sind beteiligt, 3: drei oder mehr Organe sind beteiligt
Dünndarm	0: normaler Befund, 1: leichte Entzündungserscheinungen im Bereich des Dünndarms, 2: moderate Entzündungserscheinungen, Peritoneum rötlich, 3: schwere Entzündung einschliesslich des Magens und des Dickdarms, 4: Abszesse im Bereich des Diaphragmas und/ oder im Bereich des Mesenteriums
Peyer'sche Plaques (PP)	0: normal, 1: geschwollen, 2: abszediert, 3: geplatzt
Mesenteriale Lymphknoten (MLN)	0: normal, 1: geschwollen, 2: abszediert

Prinzip Um eine Erkrankung festzustellen und dokumentieren zu können, wurde ein System zur Beurteilung der Krankheitsaktivität entwickelt, welches folgende Parameter enthält: allgemeiner Zustand der Tiere, Mitbeteiligung von Organen, Zustand des Dünndarms, der

Peyer'sche Plaques (PP) und der mesenteriale Lymphknoten (MLN) (siehe Tabelle 3.1)

Basierend auf diesen Parametern wurde ein System zur Einschätzung der Infektionserkrankung entwickelt (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: System zur Einschätzung der *Y. enterocolitica* Infektion

Diagnose	Punkte
Keine Infektion:	0 Pkt.
Milde Infektion	1-5 Pkt.
Moderate Infektion	6-9 Pkt.
Schwere Infektion	10-15 Pkt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA Isolierung aus Gewebe nach der TRIzol Methode

Prinzip Herkömmliche Verfahren zur Isolierung von RNA basieren auf Phenol – und Guanidin – Isothiocyanat – Lösungen gefolgt von organischer Extraktion und Alkoholpräzipitation der RNA. Die TRIzol Methode ist die verbesserte Version dieser Ein – Stufen – Methode. Erstmals beschrieben wurde sie von Chomczynski und Sacchi *et al.* [67].

benötigtes Material

- Stickstoff
- Trizol (Invitrogen, Karlsruhe)
- dd H₂O (Braun, Melsungen)
- Chloroform (Sigma - Aldrich, Deisenhofen)
- Zentrifuge 5417K (Eppendorf, Hamburg)
- Isopropanol (Roth, Karlsruhe)
- EtOH 70 % (Roth, Karlsruhe)

Protokoll Das Gewebe wurde aus getöteten Mäusen isoliert, in Eppendorfgefäße (Eppendorf, Hamburg) transferiert und in Stickstoff gefroren. 1,0 ml Trizol wurde je Eppendorfgefäß hinzugegeben und bei 4 ° C für 1-2 Stunden homogenisiert. Danach wurde je 0,22 ml Chloroform pro 1 ml Trizol hinzugegeben und für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Inkubation der Lösung für 2-3 Minuten bei RT und zentrifugieren bei 14000 rpm über 20 min bei 4 ° C. Die obere wässrige Schicht (500-600 μ l), die die RNA enthält, wurde mit einer Pipette entnommen und in ein sauberes 2,0 ml Eppendorfgefäß transferiert. Zur Präzipitation wurde zu der wässrigen RNA Phase 0,6 ml Isopropanol pro Eppendorfgefäß gegeben. Nach weiterer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde wiederum bei 14000 rpm für 30 min bei 4 ° C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 0,7 ml 70 % EtOH je Eppendorfgefäß hinzugegeben und nochmals bei 14000 rpm für 20 - 30 min bei 4 ° C zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand entfernt, das Pellet luftgetrocknet und je 30 μ l dd H₂O hinzugegeben. Die danachfolgende photometrische Messung erfolgte bei 260 nm in dem Gerät Spectronic GENESYS 10 Bio.

3.2.2 Reverse Transkriptase — Polymerase Kettenreaktion (RT — PCR)

Enzymatischer Verdau der DNA zur Vorbereitung auf die Herstellung von cDNA für die PCR

Prinzip Vor der cDNA Erststrangsynthese kann optional, wie bei unseren Versuchen, eine Hydrolyse eventuell vorhandener DNA- Reste erfolgen. Hierfür benötigt man die Desoxyribonuclease I, Amplification Grade von Stratagene (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

benötigtes Material

- 2 μ g Gesamt – RNA
- dd H₂O (Braun, Melsungen)
- 25 mM EDTA (Sigma - Aldrich, Deisenhofen)
- 10x DNase I Reaktions Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)
- Desoxyribonuclease I, Amplification Grade (Stratagene, La Jolla, CA, USA)

Protokoll 2 μg der Gesamt- RNA wurden mit dd H₂O auf 8 μl in einem sterilen 0,2 ml Eppendorfgefäß (Eppendorf, Hamburg) aufgefüllt. Hiernach erfolgte die Zugabe von 1 μl DNase I Reaktions Puffer (10x). Zu dem Gemisch pipettierte man 1 μl DNase I (Amp Grade, Stratagene). Danach wurde das Gemisch für 15 Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 1 μl der 25 mM EDTA zu der Lösung hinzugegeben und diese für 10 Minuten bei 65 ° C erhitzt. Durch kurze Zentrifugation wurde die RNA separiert und gesammelt. Zusätzlich wurden RNA Kontrollen entnommen, um sie bei der β – Aktin PCR mitlaufen zu lassen. Dies diente zur Kontrolle, ob die RNA Proben DNA frei waren. Hierzu wurde je 1 μl RNA pro Eppendorfgefäß entnommen und in sterile Eppendorfgefäße gefüllt. Die fehlenden 1 μl je Eppendorfgefäß wurden mit jeweils der gleichen Menge an dd H₂O aufgefüllt.

Herstellung von cDNA mit reverser Transkriptase

Prinzip Die gewonnene RNA wurde zunächst mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann durch eine Polymerase- Kettenreaktion amplifiziert. Das Prinzip der Herstellung von cDNA beruht auf dem kurzzeitigen Erhitzen (ca. 70 ° C) der RNA. Dadurch werden die Sekundärstrukturen der RNA aufgeschmolzen. Dies ermöglicht die Hybridisierung des hinzugegebenen Oligo(dT) Primer in der darauf folgenden Abkühlphase. Darauf gibt man die Reverse Transkriptase, den Reaktionspuffer sowie Nukleotide im Überschuss hinzu und inkubiert bei 42 ° C, dem Arbeitsoptimum der SuperScript TM II Rnase H- Reverse Transkriptase.

Benötigtes Material

- 2 μg Gesamt – RNA
- Oligo dT – Primer (Invitrogen, Karlsruhe)
- 10x PCR Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)
- 25 mM MgCl₂ – Lsg. (Invitrogen, Karlsruhe)
- 10 mM dNTPs (Konz. 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Qiagen, Hilden)
- 0,1 mM DTT – Lsg. (Sigma - Aldrich, Deisenhofen)

- dd H₂O (Braun, Melsungen)
- RNase (Promega, Mannheim)
- SuperScriptTM II RNase H- Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe)

Protokoll Für die Herstellung der cDNA wurde die SuperScriptTM II RNase H- Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) laut Herstellerangaben verwendet. Zunächst wurden 2 µg der Gesamt RNA mit 1 µl Oligo(dT) Primer (500 µg/ ml) gemischt und mit sterilem dd H₂O auf 12 µl ergänzt. Dieses Gemisch wurde bei 65 ° C für 5 Minuten denaturiert und unmittelbar für mindestens 1 Minute auf Eis gebracht. Hiernach wurde 2 µl Erststrang Puffer (10 X), 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl eines dNTPs Gemisches (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) und 2 µl 0,1 mM DTT hinzugegeben (entspricht 7 µl je Probe). Der Inhalt wurde vermischt und für 2 Minuten bei 42 ° C inkubiert. Danach wurde 1 µl des Enzyms (SUPERSRIPT II, Invitrogen, Karlsruhe) pro Reaktionsgefäß hinzugegeben, gemischt und bei 42 ° C für 50 Minuten inkubiert. Nach der 50 minütigen Inkubation erfolgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 70 ° C für 15 Minuten. Zuletzt wurde 1 µl RNase und 20 µl dd H₂O je Probe hinzugegeben und für 20 Minuten bei 37 ° C inkubiert.

Polymerase Kettenreaktion

Prinzip Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren, um bestimmte Zielsequenzen exponentiell zu amplifizieren. Dies geschieht mittels einer thermostabilen DNA- Polymerase und zweier spezifischer Oligonukleotidprimer. Hierdurch wird ein qualitativer Nachweis dieses speziellen Produktes ermöglicht. Erstmals wurde dieses Verfahren von SAIKI *et al.* beschrieben [87]. Die PCR- Reaktion erfolgt temperaturgesteuert in einem Thermocycler. Es gibt drei verschiedene temperaturabhängige Reaktionszustände:

1. Denaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 ° C
2. *Annealing*: Anlagerung von Oligonukleotidprimer bei 55 ° C
3. DNA- Strangsynthese bei 72 ° C durch Anlagerung komplementärer Basen

Die quantitative PCR vergleicht in derselben DNA- Probe ein konstitutiv in Zellen produziert Gen wie GAPDH oder β- Aktin mit dem zu untersuchenden Gen. Dadurch kann

eine semiquantitative Aussage zur Expression des jeweiligen zu untersuchenden Gens bei mehreren verschiedenen DNA- Proben gemacht werden.

Benötigtes Material

- cDNA – Probe (Template DNA)
- Thermocycler TRIO Thermoblock (Fa. Biometra, Göttingen)
- Oligonukleotidprimer (siehe Tabelle 2.6, Seite 17/18)
- 50 mM dNTP- Lsg. (Qiagen, Hilden)
- 50 mM MgCl₂- Lsg.(Invitrogen, Karlsruhe)
- Taq Polymerase (5 U/ μ l, Invitrogen, Karlsruhe)
- 10 * PCR Puffer (Invitrogen, Karlsruhe)
- DEPC Wasser (Sigma -Aldrich, Deisenhofen)

Protokoll Reaktionsansatz in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß: β - Aktin (dient als interne Kontrolle - *housekeeping gene*)

- je 1 μ l cDNA (Template DNA)
- je 1 μ l sense und antisense Primer (25 pmol/ Ansatz) (MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland)
- 1 μ l dNTPs
- je 0,75 μ l MgCl₂ (50 mM)
- je 2,5 μ l 10 x PCR Puffer
- je 0,5 μ l Taq Polymerase (2,5 units/ Ansatz)
- je 17,25 μ l DEPC Wasser

Die PCR- Reaktion erfolgte temperaturabhängig in einem Thermocycler TRIO Thermoblock (Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) Um die PCR zu starten programmiert man das Gerät folgendermaßen:

1. 5 Minuten 95 ° C (initialer Denaturierungsschritt)
2. 1 Minute 95 ° C (30 Zyklen, entspricht der Denaturierungsphase)
3. 1 Minute 60 ° C (30 Zyklen, entspricht der Phase des Annealing)
4. 1 Minute 72 ° C (30 Zyklen, entspricht der Phase der Elongation)
5. 10 Minuten 72 ° C (einmaliger verlängerter Denaturierungsschritt um eine komplett verlaufende Elongation sicher zu stellen)

Die Amplifikate, die bei der PCR entstanden sind, können bei 4 ° C gelagert werden. Zur Analyse werden sie auf ein Agarosegel aufgetragen und mit der Agarosegelelektrophorese verarbeitet und ausgewertet.

Agarosegelelektrophorese

Prinzip Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese basiert auf der elektrophoretischen Auftrennung von DNA. Dazu wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2% verwendet. Die Nukleotide der Nukleinsäuren liegen unter Elektrophoresebedingungen als Polyanionen vor. Dadurch bewegt sich die DNA entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Durch den mit der Doppelhelix der DNA interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid kann nach Abschluss der Elektrophorese die DNA im Gel angefärbt werden. Im UV- Licht kann die DNA visualisiert und dokumentiert werden.

Benötigtes Material

- Agarose
- 1 x TAE Puffer (Tris- Acetat- EDTA- Puffer, siehe Tabelle 2.7, Seite 19)
- Probenauftragspuffer (DNA- Ladepuffer, siehe Tabelle 2.9, Seite 19)

- DNA – Längenstandard (siehe Tabelle 2.10, Seite 19)
- Ethidiumbromid – Färbelösung (Sigma -Aldrich, Deisenhofen)
- horizontale Gelelektrophoreseapparatur und Transformator

Protokoll 1g Agarose wurde zunächst in 50 ml 1 x TAE – Puffer gelöst und in einem Mikrowellengerät zum Kochen gebracht. Anschließend wurde das Gemisch auf ca. 60 ° C abgekühlt. Währenddessen setzte man den Gelkamm an der Kathodenseite ein (ca. 10 mm vom Gelrand entfernt). Nach dem Abkühlen des Gemisches auf ca. 60 ° C goss man dieses blasenfrei in die Gelkammer. Nach 30 – 60 Minuten (Abkühlungsphase der Agarose – Lösung) wurde der Gelkamm vorsichtig aus dem festen Gel gelöst. Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt und mit 1 x TAE – Puffer überschichtet. Jeweils 10 μ l DNA – Probe wurde mit 2 μ l DNA – Probenpuffer auf einer Mikrotiterplatte gemischt. Dieses Gemisch wurde in die Geltasche pipettiert. Die Elektrophorese wurde daraufhin gestartet. (unterschiedliche Einstellungen möglich z.B. 30 Minuten bei 125 V) Nach Beendigung des Elektrophoreselaufs wurde das Gel mit Ethidiumbromid – Färbelösung (Konz. 50 μ g/ml) bei einer Inkubationszeit von 15 Minuten gefärbt. Die photographische Dokumentation des Gels konnte man mit Hilfe eines Transilluminators (Fa. -Itf- Labortechnik, Wasserburg/Bodensee, Deutschland) in UV – Licht bei 366 nm Wellenlänge erreichen.

3.2.3 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion (Realtime quantitative RT-PCR)

Prinzip Bei der Methode zur quantitativen Bestimmung der DNA wird ein Farbstoff verwendet. Dieser Farbstoff SYBR Green ITM (Fa. Molecular Probes, Eugene, OR, USA) ist eine mit der DNA- Doppelhelix interkalierende Substanz. Unter UV- Licht kann aus der Fluoreszenz während der Reaktion die Menge doppelsträngiger DNA ermittelt werden. Die Amplifikation der Ziel - DNA (*template* DNA) verläuft nur während der ersten Reaktionszyklen exponentiell. Daher erfolgt die Bestimmung des C_T- Wertes (*Threshold Cycle* = Schwellenwert - Zyklus) einer Reaktion durch Auftragung der Fluoreszenzkurve mit logarithmischem Maßstab während der Reaktionszyklen. Der C_T- Wert liegt somit im Bereich der exponentiellen Amplifikation. Der Logarithmus der anfänglich eingesetzten DNA- Menge

wird errechnet und gegen den C_T - Wert aufgetragen. Hieraus errechnet sich eine Standardkurve, die es ermöglicht, aus den C_T - Werten der Versuchsansätze die ursprünglich vorhandene amplifizierte DNA- Menge zu bestimmen (relative Bewertung). Mit Hilfe eines housekeeping genes, also eines konstitutiv in Zellen produzierten Gens, wie β - Aktin, ist es möglich durch Mitamplifikation eine Normalisierung der verschiedenen Ansätze zu erreichen. Dies ist durch anschließende Verrechnung der bestimmten DNA- Mengen mit denen aus den Versuchsansätzen möglich.

Benötigtes Material

- Realtime- PCR Maschine ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 96- Well Platten (Fa. Applied Biosystems)
- Oligonukleotidprimer (Konz. 25 pmol, siehe Tabelle 2.6, Seite 17/18)
- SYBR GreenTM Mastermix (Fa. Applied Biosystems, mit DNA- Polymerase, Puffer, Magnesium und Fluoreszenzfarbstoff)
- dd H₂O (Braun, Melsungen)
- *Template* DNA
- DEPC Wasser (Sigma -Aldrich, Deisenhofen)

Protokoll Pro Ansatz einer 96 – well Platte pipettieren:

1. je 1 μ l cDNA (Template DNA)
2. je 1 μ l sense und antisense Primer (MWG Biotech AG, Ebersberg)
3. je 30 μ l Master Mix
4. je 27 μ l DEPG Wasser

Die RT-PCR Reaktion erfolgte temperaturgesteuert in einer Realtime PCR Maschine ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Fa. Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Die Herstellerangaben wurden berücksichtigt.

Dazu programmierte man die Maschine folgendermaßen:

1. 2 Minuten 50 ° C (initialer Denaturierungsschritt)
2. 10 Minuten 95 ° C (initialer Denaturierungsschritt)
3. 1 Minute 95 ° C (40 Zyklen, entspricht der Denaturierungsphase)
4. 2.30 Minuten 60 ° C (40 Zyklen, entspricht der Phase des Annealing und der Elongation)

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Quantitative Immunoassays - Enzyme – linked – Immunosorbent – Assay (ELISA)

Prinzip Beschrieben wurde der ELISA bereits in den frühen 1970er Jahren. Er wurde parallel von zwei Arbeitsgruppen in Frankreich (AVRAMEAS und GUILBERT, 1971 [4]) und Schweden (ENGVALL und PERLMAN, 1971 [24]) entwickelt. Der ELISA ist eine Antigen – Antikörper Reaktion. Bei dem ELISA wird ein Enzym als Marker verwendet. So kann die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes bestimmt werden. Weiterhin besagt schon der Name, dass eine Komponente an einer festen Phase absorbiert ist. Das kann der Antikörper oder das Antigen sein. Durch Waschen allein kann man freies Antigen von gebundenem abtrennen.

Benötigtes Material

- 96 – well Mikrotiterplatte (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien)
- Coating Puffer (siehe Tabellen 2.17, Seite 20 und 2.15, Seite 20)
- Capture Antikörper (siehe Tabelle 2.3, Seite 16)
- Wasch Puffer (siehe Tabellen 2.19, Seite 20 und 2.18, Seite 20)

- Block Puffer (siehe Tabellen 2.21, Seite 21 und 2.20, Seite 20)
- Standard (siehe Tabelle 2.5, Seite 17)
- Detection Antikörper (siehe Tabelle 2.3, Seite 16)
- Avidin, horseradish peroxidase, HRP konjugiert (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien)
- Substrat Lösung (siehe Tabellen 2.23, Seite 21 und 2.22, Seite 21)
- Stop Lösung (1 M H₂SO₄)

Protokoll Der erste Schritt eines ELISA besteht im Coating, d.h. es erfolgt die Bindung des Antikörpers an die feste Phase. Dazu wurde in eine 96 – well Mikrotiterplatte 100 μ l / well eines Capture Antikörpers gegeben und über Nacht bei 4 ° C inkubiert. Der Antikörper wurde mit Coating Puffer verdünnt (TNF- α 1:250, Il – 10 1:125, Il – 12 1:250, IFN – γ 1:1000, Il – 4 1:500). Nach der Inkubationszeit wurde der Coating Puffer entfernt und 3x mit einem Wasch Puffer (300 μ l/ well) in dem MRW Washer gespült. Nach dem Waschen ließ man die Mikrotiterplatte abtropfen um verbliebenen Puffer zu entfernen. Hiernach folgte das Blocken. Das Blocken ist ein entscheidender Punkt, da ein Problem beim ELISA die Hintergrundaktivität ist. Diese wird durch unspezifisch absorbierte enzymmarkierte Antikörper bzw. Antigenmoleküle verursacht. Ein essentieller Schritt beim ELISA ist daher das Abblocken freier Proteinbindungsstellen, um die Hintergrundaktivität auf ein Minimum zu senken. Geblockt wurde mit einem Block Puffer (200 μ l/ well) für 1 Stunde (bei TNF- α , Il – 10, Il – 12) oder 2 Stunden (bei IFN - γ und Il – 4) bei RT. Nach dem Blocken erfolgte wiederum ein Waschschrift. Es wurde 3x mit einem Wasch Puffer (300 μ l/ well) in dem MRW Washer gespült. Danach wurden 100 μ l/ well Standard und die jeweiligen zu untersuchenden Proben hinzugegeben und bei RT 2 Stunden (bei TNF- α , Il – 10, Il – 12) oder 3 Stunden (bei IFN - γ und Il – 4) inkubiert. Nach der Inkubationszeit erfolgte eine 5 x Spülung mit einem Wasch Puffer (300 μ l/ well). Die Zugabe von 100 μ l / well Detection (Nachweis) Antikörper + Avidin – horseradish- Peroxidase Reagenz folgte und eine Inkubationszeit von 1 Stunde bei RT wurde eingehalten. Der Detection Antikörper wurde mit Block Puffer (TNF- α , Il – 10, Il- 12 – 1:250) und mit Wasch Puffer (IFN – γ , Il – 4 - 1:1000) verdünnt. Das HRP (horseradish

peroxidase) konjugierte Avidin wurde in zuvor verdünntem Detection Antikörper (TNF- α , Il - 10, Il- 12 - 1:250) gegeben. Bei dem Elisa für IFN - γ und Il - 4 erfolgte eine separate Zugabe des Avidin (HRP konjugiert) nach der Inkubationszeit mit dem Detection Antikörper. Es erfolgte ein Wasch Zwischenschritt (3x), danach die Zugabe von 100 μ l/ well Avidin (verdünnt in Waschpuffer 1:1000); die Inkubationszeit von 1 Stunde wurde eingehalten. Mit dem Gerät MRW wurde daraufhin 7 x mit einem Wasch Puffer gespült. Eine Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 100 μ l/ well Substrat Lösung gestartet. Die Inkubationszeit dauerte 30 Minuten (TNF- α , Il - 10, Il- 12) oder 2-15 Minuten (IFN - γ , Il - 4) bei RT im Dunkeln. Beim ELISA erfolgte eine so genannte Endpunkt - Bestimmung, so dass die Enzymreaktion durch Zugabe einer entsprechenden Stop Lösung beendet werden musste (50 μ l/ well). Die Messung erfolgte im Photometer (Dynatech MR4000) bei entsprechender Wellenlänge (450 nm und als Referenzwellenlänge bei 570 nm) innerhalb der nächsten 30 Minuten.

3.3.2 Immunhistochemie

Präparation der Peyer'schen Plaques für immunhistochemische Zwecke

Die Tötung der Mäuse erfolgte nach Narkose mit Äther mittels Genickbruch. Der Bauchraum wurde über einen Schnitt, der vom Processus xiphoideus bis ins kleine Becken reichte, eröffnet. Nach Auffinden des Magenausgangs wurde das Duodenum vom Pylorus scharf abgetrennt. Am Übergang vom terminalen Ileum in das Coecum erfolgte ebenfalls eine scharfe Durchtrennung. Das Präparat wurde in einer Petrischale mit eisgekühlter D-PBS (Dulbecos PBS , phospatgepufferte Salzlösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gelagert. Danach erfolgte die Präparation der Peyer'schen Plaques, die an der Aussenseite des Dünndarms makroskopisch sichtbar sind. Nach der Präparation wurden die isolierten PP nochmals ausgiebig in D-PBS gespült.

Anfertigung von Gefriergewebsschnitten zur immunhistochemischen Aufarbeitung und Auswertung

Mit Hilfe der Gefriergewebsschnittmethode wurde das isolierte Material histologisch aufgearbeitet und ausgewertet. Die isolierten Gewebstücke wurden in Cryomolds eingebettet. Die Cryomolds waren mit O.C.T. Tissue- Tek (Tissue- Tek, Sakura, Zoeterwonde, Niederlande) gefüllt. Die Aushärtung erfolgte in einer Stickstoff gekühlten, mit Isopentan (2- Methylbu-

tan) gefüllten Wanne. Die gewonnenen Proben ließen sich durch diese Art der Konservierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Alufolie verpackt für mehrere Wochen lagern. Aufgearbeitet wurden die Gewebelöckchen an einem Kryostat (Microm HM 550) bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Sie wurden mit einer Dicke von $5\text{ }\mu\text{m}$ geschnitten. Die Auftragung der Schnitte erfolgte auf Superfrost Objektträger. Die Schnittlage wurde durch eine Übersichtsfärbung mit Methylblau regelmäßig kontrolliert. Hierbei wurden die unfixierten Kryostatgewebsschnitte direkt mit Methylblaulösung fixiert (ca. 15 Sekunden). Danach erfolgt das Abspülen des Methylblau mit Leitungswasser und das Abdecken des Objektträgers. Qualität und Schnittlage des Präparats wurden anschließend unter dem Lichtmikroskop kontrolliert.

Gewebsschnittfixierung

Zur Haltbarmachung erfolgte die Fixierung des Gewebeschnitts mit Aceton (Roth, Karlsruhe) Nach Lufttrocknung der Gewebsschnitte wurden diese bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Minuten in Aceton gelegt. Nach vollständiger Verdunstung des Acetons wurden die Schnitte in frostfeste Objektträgerkästen gelegt. Gelagert wurden die Präparate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Immunhistochemische Färbung

Die Schnitte wurden mit TNB blocking Puffer (Perkin Elmer, Boston, MA, USA) für 1 Stunde bei RT geblockt. Danach Inkubation der Schnitte über Nacht mit anti – Maus inv Antikörper (1:1000, siehe Tabelle 2.3, Seite 16) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach Inkubation wurde $2,5\mu\text{l/ml}$ von anti – Kaninchen IgG (siehe Tabelle 2.4, Seite 16) und $10\mu\text{l/ml}$ Streptavidin Alexa Fluor 546 (siehe Tabelle 2.5, Seite 17) hinzugegeben jeweils für 1 Stunde. Die Auswertung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Mikroskop Leica DM LB).

3.4 Histologische Methoden

3.4.1 Übersichtsfärbung mit Hämatoxylin- Eosin

Prinzip Die Färbung mit Hämatoxylin- Eosin dient als Übersicht zur Einschätzung der intestinalen Entzündung. Dabei färbt Hämatoxylin Zellkerne, Kalk und Bakterien blau- violett. Eosin färbt Cytoplasma, Bindegewebe und Interzellularräume rot.

Benötigtes Material

- Eosinlösung:
 - *Stammlösung*: 1% Eosin in 70% EtOH
 - *Gebrauchslösung*: Stammlösung 1: 10 in 70% EtOH verdünnt + 1-2 Tropfen Essig
- Hämatoxylinlösung nach MEYER: Hämatoxylinlösung (Sigma, Deisenhofen) vor Gebrauch tiefrieren (die Lösung sollte pflaumenblau sein)

Protokoll Nach dem Schneiden und Fixieren der Gewebsschnitte auf Superfrost Objektträger erfolgte die H. E. Färbung. Hierfür wurden die Schnitte in einen speziellen Halter gestellt und für 2 Minuten in 70% EtOH gelegt. Danach erfolgte eine Zwischenwässerung in einem Gefäß mit aqua dest., darauf wurden die Schnitte 5-10 Minuten in die Hämatoxylinlösung gestellt. Anschließend wurden sie 5-10 Minuten unter fließendem Leitungswasser abgespült und danach in ein Gefäß mit aqua dest. gegeben. In der darauf folgenden Eosinlösung blieben die Schnitte 2 Minuten und wurden danach wiederum in Aqua dest. zwischen gewässert. Hiernach wurden die Schnitte in 70% EtOH für ca. 2 Minuten gegeben, danach in 96% EtOH 2x, folgend 99% EtOH und zuletzt erfolgte die Waschung in Xylol 2x für je 2 Minuten. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte mit Vitro-Clud (R. Langenbrinck, Labor und Medizintechnik, Teningen, Deutschland) eingedeckelt und ausgewertet.

3.5 Statistische Methoden

3.5.1 Ermittlung der statistischen Signifikanz mit Hilfe des zweiseitigen t – Testes

Der t – Test ist ein parametrischer Test. Bei diesem Test werden Hypothesen über den Erwartungswert einer Normalverteilung geprüft. Es wird eine Nullhypothese und eine Alternativhypothese formuliert. Die Nullhypothese war in dieser Arbeit, dass der Erwartungswert der CCR6 defizienten Mäuse gleich dem Erwartungswert der C57BL/6 Mäuse ist. Als alternative Hypothese galt die Aussage, dass die beiden Werte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ nicht übereinstimmen. Folgende Formel wurde zur Berechnung der Prüfgröße genutzt:

$$t = \frac{|\overline{X_{CCR6}} - \overline{X_{C57BL/6}}|}{s} * \sqrt{n}$$

Hierbei steht t für die Prüfgröße, $(\overline{X_{CCR6}})$ für den Mittelwert bei den CCR6 defizienten Mäusen zum Untersuchungszeitpunkt, $(\overline{X_{C57BL/6}})$ für den Mittelwert der C57BL/6 Kontrollgruppe zum Untersuchungszeitpunkt, s für die Standardabweichung der CCR6 defizienten Mäuse und n für die Anzahl der Versuche des Ereignisses. Die Prüfgröße wurde mit dem Quantil der t – Verteilung mit f Freiheitsgraden (Freiheitsgrad $f = n - 1$) verglichen. Die Testentscheidung lautet Nullhypothese und wird verworfen, wenn die Prüfgröße größer als das Quantil ist. Die Testentscheidung lautet Nullhypothese und wird beibehalten, wenn die Prüfgröße kleiner als das Quantil ist.

4 Ergebnisse

4.1 Orale Yersinien Infektion

Bei den Versuchen wurden C57BL/6 und CCR6 defiziente Mäuse mit $2,5 \times 10^7$ CFU *Y. enterocolitica* oral infiziert. Je nach Fragestellung wurden die Mäuse nach verschiedenen Tagen getötet. Bereits am 2. Tag nach der Infektion konnten Unterschiede zwischen den beiden Mausgruppen festgestellt werden. Während bei den C57BL/6 Mäusen die Peyer'schen Plaques im distalen Ileum signifikant angeschwollen waren, zeigten im Kontrast dazu CCR6 $-/-$ Mäuse keine Zeichen einer Infektion. Der Allgemeinzustand der Mäuse in beiden Gruppen (C57BL/6 und CCR6 $-/-$) war gut und die Mäuse wiesen keine Krankheitszeichen auf. Dieser Zustand änderte sich drastisch ab dem 6. Tag nach der Infektion. Zu dieser Zeit zeigten die C57BL/6 Mäuse mehrere Symptome der Infektion. Es lagen deutliche Krankheitszeichen vor.

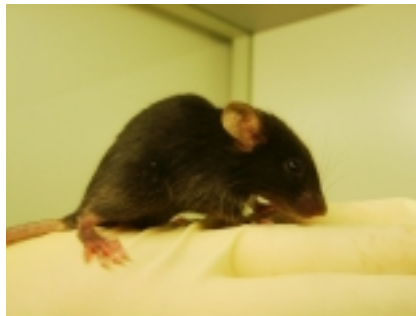


Abbildung 4.1: zeigt eine C57BL/6 Maus 6 Tage nach der oralen Infektion mit $2,5 \times 10^7$ CFU *Y. enterocolitica*

Die Tiere sahen struppig aus, waren buckelig und manche erschienen apathisch (siehe Abb. 4.1). Die Peyer'schen Plaques waren stark vergrößert und vereitert (siehe Abb. 4.2). Zum Teil waren die Peyer'schen Plaques im distalen Ileum bereits rupturiert. Die mesenterialen Lymphknoten (MLN) waren ebenfalls geschwollen und vereitert. Der Dünndarm

und der Magen waren extrem mit Gas aufgebläht und die Mäuse zeigten Symptome einer Augenentzündung. Einige Mäuse hatten zusätzlich Abszesse in der Milz und in der Leber. Klinisch zeigten diese Mäuse alle Zeichen, die für eine Yersiniose charakteristisch sind. Im Kontrast dazu zeigten die CCR6 defizienten Mäuse 6 Tage post infectionem keine oder sehr milde Symptome einer Infektion. Sie erschienen gesund. Die Peyer'schen Plaques, die mesenterialen Lymphknoten, der Magen, die Milz und die Leber dieser Mäuse wiesen keinerlei Läsionen auf (Abb. 4.3). Lediglich der Dünndarm einiger Mäuse wies aufgrund der Bakterieninfektion leichte Entzündungserscheinungen auf, deshalb die Bezeichnung milde Symptome einer Infektion. Selbst bei längerer Versuchsdauer entwickelten die CCR6 defizienten Mäuse keine oder sehr milde Erkrankungszeichen der intestinalen Entzündung. Bei den Langzeitversuchen mussten die C57BL/6 Mäuse an Tag 10 nach der Infektion aufgrund der weit fortgeschrittenen Krankheit getötet werden. Die CCR6 defizienten Mäuse wurden am 20. Tag post infectionem getötet. Sie wiesen zu diesem Zeitpunkt keinerlei Krankheitszeichen auf und waren frei von Yersinien (Langzeitversuche siehe Abschnitt 4.3).

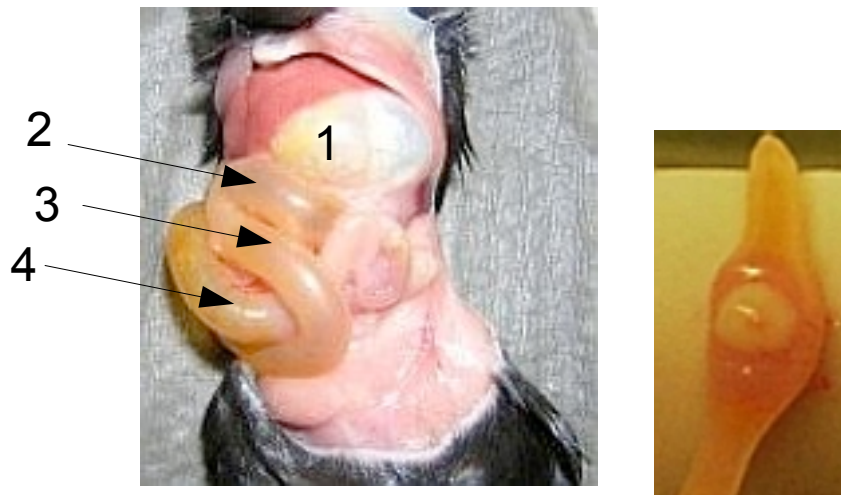


Abbildung 4.2: links: C57BL/6 Maus 6 Tage nach der oralen Infektion mit *Y. enterocolitica*. Man erkennt starke Symptome einer Yersiniose. Der Magen und der Dünndarm sind geschwollen (1 und 2) und extrem mit Gas gefüllt (4). Die Peyer'schen Plaques sind stark vergrößert und vereitert (3). **Rechts:** Detailaufnahme eines geschwollenen, vereiterten Peyer'schen Plaques einer C57BL/6 Maus am 6. Tag nach der oralen Infektion mit *Y. enterocolitica*.

In allen Versuchen konnte gezeigt werden, dass C57BL/6 Mäuse im Krankheitsscore (siehe Abschnitt 3.1.2, Seite 23) eine schwere Krankheitsaktivität aufwiesen, welche im Durch-

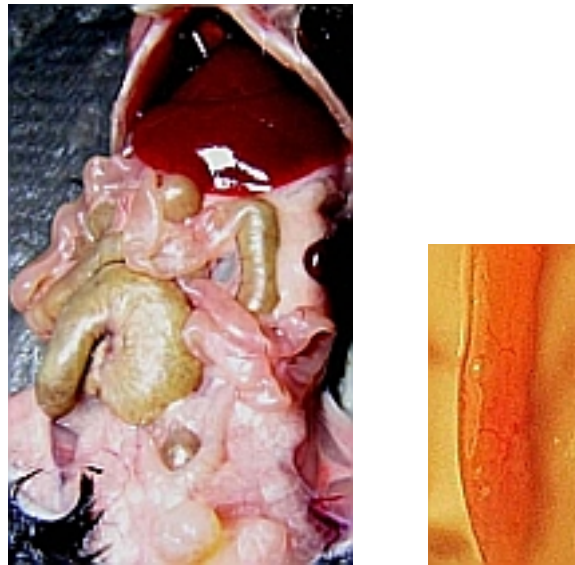


Abbildung 4.3: Links: CCR6 defiziente Maus, die keinerlei Krankheitszeichen am 6. Tag nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* aufweist. Rechts: Detailaufnahme eines Peyerschen Plaques einer CCR6 $-/-$ Maus am 6. Tag nach der oralen Infektion mit *Y. enterocolitica*. Der Peyersche Plaques ist größenreduziert und zeigt keine Anzeichen einer Infektion.

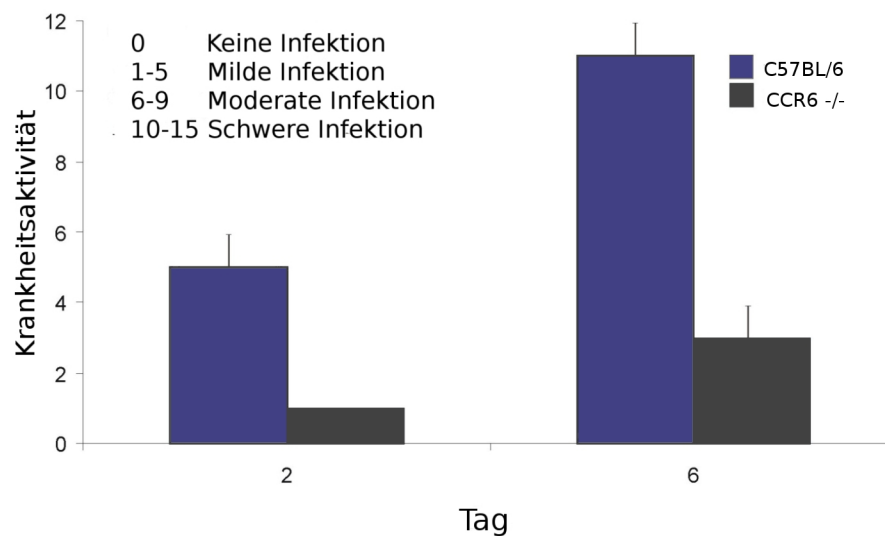


Abbildung 4.4: Krankheitsaktivität der C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen an Tag 2 und 6 nach oraler Infektion mit *Y. enterocolitica*.

schnitt zwischen 10 -12 Punkten (Schwere Infektion 10-15 Punkte) am 6. Tag post infektionem lag. Dagegen zeigten die CCR6 defizienten Mäuse keinerlei oder eine milde Krankheitsaktivität. Der Score lag im Durchschnitt zwischen 2 und 3 Punkten (Milde Infektion 1-5 Punkte) am 6. Infektionstag (siehe Abbildung 4.4).

4.2 Intraperitoneale Yersinien Infektion



Abbildung 4.5: Links: CCR6 $-/-$ Maus an Tag 3 nach intraperitonealer Infektion mit $1 \cdot 10^6$ CFU *Y. enterocolitica*. Die Maus zeigt starke Anzeichen einer Yersiniose. Leber, Milz, mesenteriale Lymphknoten, Mesenterium und Diaphragma sind abszediert. Die Peyer'schen Plaques der CCR6 defizienten Maus erscheinen normal. Die Milz und die Nieren sind offensichtlich geschwollen. Weiterhin ist der Dünndarm und der Magen mit Gas aufgebläht. **Rechts:** C57BL/6 Maus an Tag 3 nach intraperitonealer Infektion mit $1 \cdot 10^6$ CFU *Y. enterocolitica*. Die C57BL/6 Maus zeigt ebenfalls Symptome einer Yersinien Infektion mit Abszedierungen in Leber, Milz, mesenterialen Lymphknoten, Mesenterium und Diaphragma. Die Peyer'schen Plaques der C57BL/6 Maus weisen nur geringe Veränderungen bezüglich ihrer Größe und des Infektionsstatus auf. Die Milz und die Niere sind geschwollen und Dünndarm und Magen sind aufgebläht.

Eine Resistenz der CCR6 defizienten Mäuse gegenüber einer bakteriellen oralen Infektion mit *Y. enterocolitica* hängt von der Aufnahme durch die M – Zellen in den Peyer'schen Plaques ab. Sind die Yersinien in der Lage, sich an eine Zielzelle (M -Zelle) zu heften, so dringen sie in die Peyer'schen Plaques ein und verbreiten sich weiter über die Lymphgefäße. Um die Bedeutung der M-Zellen und Peyer'schen Plaques zu verdeutlichen, wurde in weiteren Versuchen ein alternativer Weg für die Infektion mit *Y. enterocolitica* gewählt. Die Mäuse wurden dabei intraperitoneal (i.p.) infiziert. Nach der i.p Infektion mit $1 \cdot 10^6$ CFU *Y. entero-*

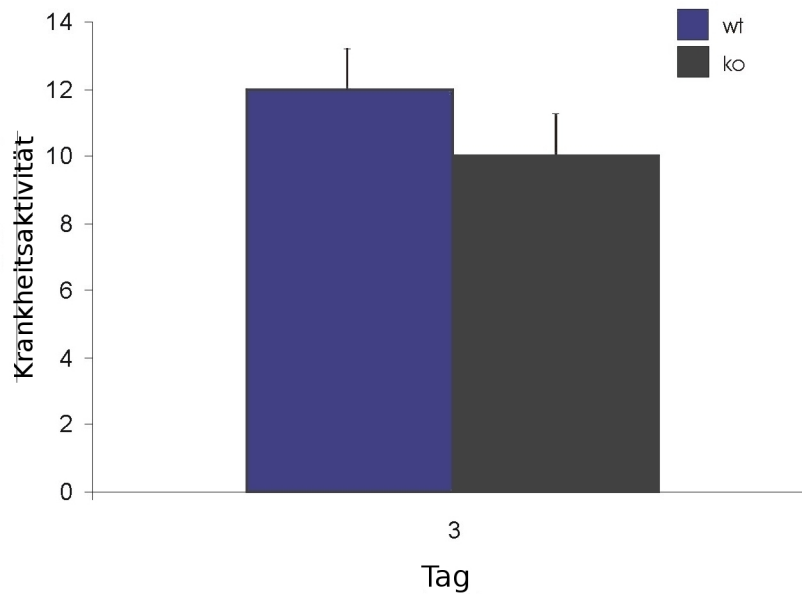


Abbildung 4.6: Krankheitsaktivität der C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen an Tag 3 nach intraperitonealer Infektion mit $1 \cdot 10^6$ CFU *Y. enterocolitica*.

colitica zeigten beide Gruppen, sowohl die C57BL/6 als auch die CCR6 $-/-$ Mäuse starke Symptome einer Yersiniose. Diese Symptome traten bereits 3 Tage nach der Infektion auf. Leber, Milz, mesenteriale Lymphknoten, Mesenterium und Diaphragma waren abszediert (Abb. 4.5).

Es konnte kein signifikanter Unterschied im Infektionsverlauf zwischen den beiden Mausgruppen festgestellt werden. C57BL/6 wie auch die CCR6 defizienten Mäuse zeigten starke Symptome der Yersinien Erkrankung und hatten eine Krankheitsaktivität zwischen 10 und 12 Punkten (Schwere Infektion 10-15 Punkte) bereits 3 Tage nach der Infektion (Abb. 4.6).

Analysen über die Bakterienbesiedlung im Stuhl, in den Peyer'schen Plaques und der Milz von C57BL/6 im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen wiesen sehr ähnliche Werte auf. Die Bakterienlast im Stuhl an Tag 3 nach der Infektion betrug im Durchschnitt $2,38 \cdot 10^{12}$ CFU/g Stuhl bei den C57BL/6 Mäusen und $2,50 \cdot 10^{12}$ CFU/g Stuhl bei den CCR6 defizienten Mäusen. In den mesenterialen Lymphknoten wurde eine durchschnittliche Bakterienlast von $3,90 \cdot 10^{10}$ CFU/g Gewebe in C57BL/6 Mäusen und $5,63 \cdot 10^{10}$ CFU/g Gewebe in CCR6

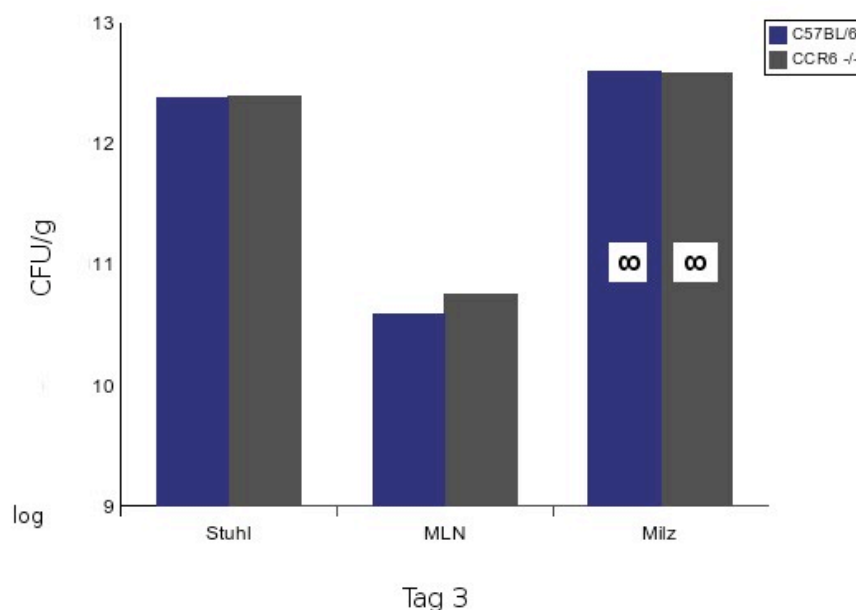


Abbildung 4.7: Bakterienlast im Stuhl, in den MLN und der Milz in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen an Tag 3 nach der intraperitonealen Infektion mit $1 \cdot 10^6$ CFU *Y. enterocolitica*.

-/- Mäusen an Tag 3 post infektionem gefunden. Die Bakterienlast in der Milz war in beiden Mausgruppen (C57BL/6 und CCR6 -/-) unzählbar. Die Ergebnisse der intraperitonealen Infektion zeigen, dass eine veränderte Immunantwort in der CCR6 defizienten Maus ausgeschlossen werden kann. Die Krankheitsaktivität, der Krankheitsverlauf sowie die Bakterienbesiedlungen sind in den CCR6 -/- im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen nahezu identisch.

4.3 Bakterienlast im Stuhl, in den Peyer'schen Plaques und der Milz nach oraler Infektion

Um zu bestimmen, ob der Unterschied zwischen beiden Gruppen möglicherweise eine verspätete Infektion reflektiert, wurden Analysen über die Bakterienbesiedlung im Stuhl, in den Peyer'schen Plaques und der Milz von C57BL/6 im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen durchgeführt.

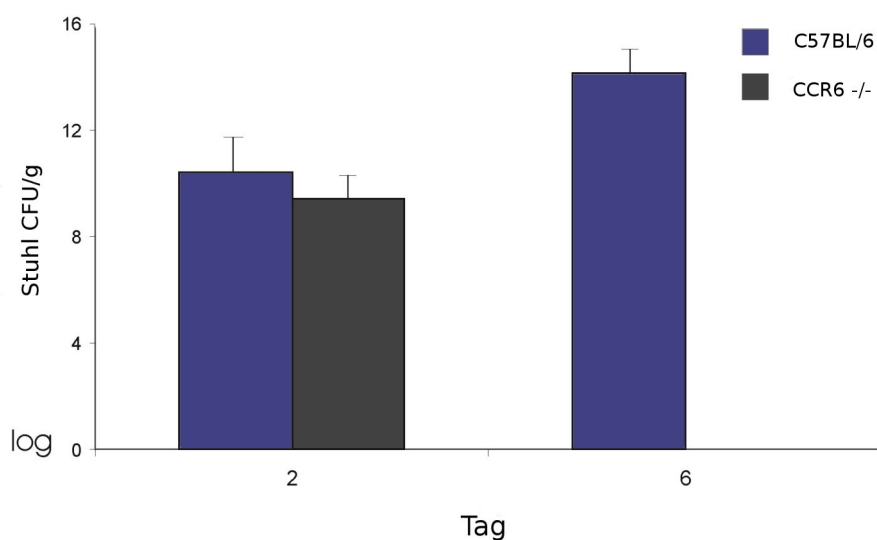


Abbildung 4.8: Bakterienlast im Stuhl in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen an Tag 2 und 6 nach oraler Infektion mit $2,5 \cdot 10^7$ CFU *Y. enterocolitica*.

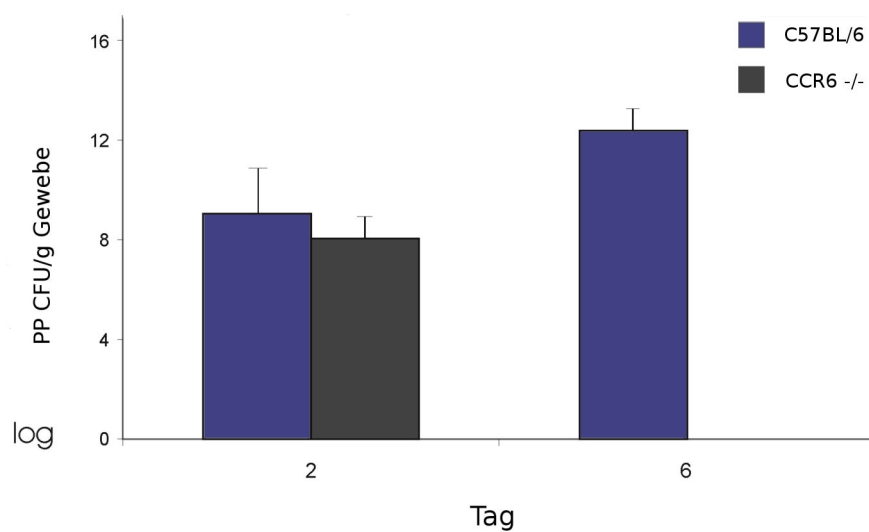


Abbildung 4.9: Bakterienlast in den Peyer'schen Plaques von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen an Tag 2 und 6 nach oraler Infektion mit $2,5 \cdot 10^7$ CFU *Y. enterocolitica*.

In den Versuchen wurden Stuhl und Gewebe auf ihre Bakterienlast an Tag 2 und 6 nach oraler Infektion mit $2,5 \cdot 10^7$ CFU *Y. enterocolitica* untersucht. Am 2. Tag nach der Infektion wiesen die C57BL/6 Mäuse im Durchschnitt eine Bakterienausscheidung von $2,55 \cdot 10^{11}$

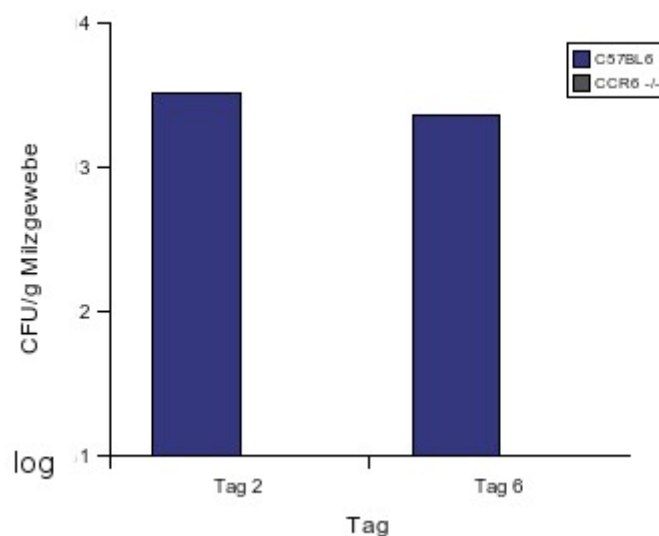


Abbildung 4.10: Bakterienlast in der Milz von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen an Tag 2 und 6 nach oraler Infektion mit $2,5 \cdot 10^7$ CFU *Y. enterocolitica*.

CFU *Y. enterocolitica* /g Stuhl auf. Die Bakterienlast in den Peyer'schen Plaques betrug 2 Tage nach der Infektion im Durchschnitt $2,53 \cdot 10^8$ CFU/ g Gewebe. Die Bakterienlast in der Milz der C57BL/6 Mäuse betrug im Durchschnitt $3,34 \cdot 10^3$ CFU/ g Gewebe. CCR6 $-/-$ Mäuse zeigten eine ähnliche Bakterienlast im Stuhl am 2. postinfektiösem Tag. Die Bakterienausscheidung im Stuhl betrug im Durchschnitt $2,50 \cdot 10^{10}$ CFU/g Stuhl. In den Peyer'schen Plaques wurde durchschnittlich eine Bakterienlast von $2,76 \cdot 10^7$ CFU/g Gewebe nachgewiesen (Abbildungen 4.8, 4.9, 4.10). Die Milz war frei von Bakterien. 6 Tage nach der Infektion waren keine Yersinien bei der CCR6 defizienten Maus nachweisbar: Weder im Stuhl noch in den Peyer'schen Plaques und der Milz konnte der Erreger (*Y. enterocolitica*) gefunden werden. Im Vergleich dazu zeigte sich eine stark gesteigerte Bakterienlast bei den C57BL/6 Mäusen. Diese lag 6 Tage nach der Infektion im Durchschnitt bei $1,5 \cdot 10^{14}$ CFU/g Stuhl, bei $5,52 \cdot 10^{11}$ CFU/g Gewebe in den Peyer'schen Plaques und bei $2,33 \cdot 10^3$ CFU/g Gewebe in der Milz (Abbildungen 4.8, 4.9, 4.10). Auch bei Langzeitversuchen, die bis zu 20 Tagen dauerten, zeigte sich ein ähnliches Bild. C57BL/6 Mäuse und CCR6 defiziente Mäuse wurden mit $2,5 \cdot 10^6$ CFU *Y. enterocolitica* infiziert. Durchgeführt wurden Analysen über die Bakterienbesiedlung im Stuhl, in den Peyer'schen Plaques und der Milz von C57BL/6 im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen. An Tag 10 nach der Infektion konnten keine

Yersinien im Stuhl der CCR6 defizienten Mäuse nachgewiesen werden. Dagegen zeigte sich eine gesteigerte Bakterienlast im Stuhl der C57BL/6 Mäuse. Diese betrug im Durchschnitt $4,0 \cdot 10^{12}$ CFU/g Stuhl (Abb. 4.10). Die Bakterienlast in den Peyer'schen Plaques und der Milz wurde an Tag 10 bei den C57BL/6 Mäusen und an Tag 20 bei den CCR6 defizienten Mäusen untersucht. An Tag 10 nach der Infektion wiesen die C57BL/6 Mäuse eine durchschnittliche Bakterienlast in den Peyer'schen Plaques von $1,27 \cdot 10^6$ CFU/g Gewebe auf. Die Peyer'schen Plaques der CCR6 defizienten Mäuse waren am 20. postinfektiösem Tag frei von Bakterien. In der Milz der C57BL/6 Mäuse (10. Tag) und der CCR6 $-/-$ Mäuse (20. Tag) konnten keine Yersinien nachgewiesen werden.

4.4 Histopathologische Aufarbeitung der Yersinien Infektion

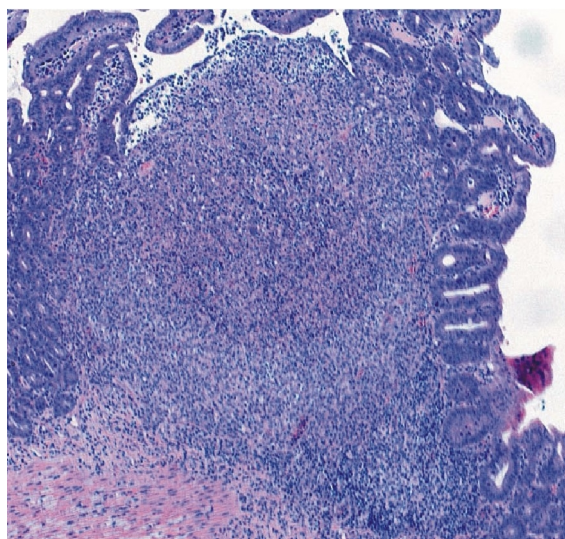


Abbildung 4.11: Histologische Aufarbeitung eines Peyer'schen Plaques einer C57BL/6 Maus 6 Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Der Peyer'sche Plaque weist starke Anzeichen einer Entzündung auf. Er ist eitrig und zeigt eine massive Ansammlung von neutrophilen Granulozyten. Die normale Architektur des PP scheint komplett zerstört zu sein.

Histologische Untersuchungen der Peyer'schen Plaques von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen zeigten 6 Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* signifikante Unterschiede. Bei den Peyer'schen Plaques der C57BL/6 Mäuse konnte eine massive Ansammlung neutrophiler Granulozyten festgestellt werden. In manchen Fällen war die

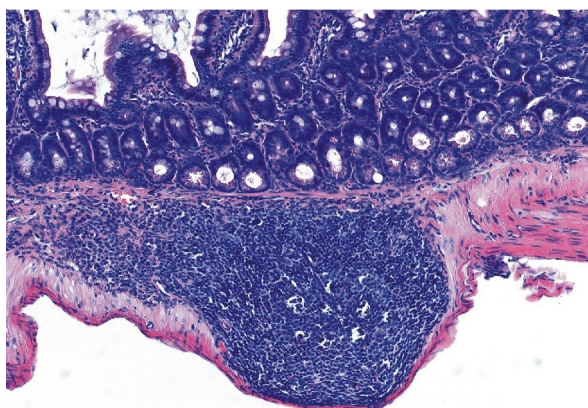


Abbildung 4.12: Histologische Aufarbeitung eines Peyer'schen Plaques einer CCR6 defizienten Maus 6 Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Der Peyer'sche Plaque der CCR6 defizienten Maus erscheint in seiner Morphologie normal.

normale Architektur der Peyer'schen Plaques komplett zerstört (Abb. 4.11). Im Vergleich erschienen die Peyer'schen Plaques der CCR6 defizienten Mäuse im histologischen Bild normal (Abb. 4.12). Die histologische Aufarbeitung der mesenterialen Lymphknoten zeigten die gleichen Ergebnisse. Während bei den C57BL/6 Mäuse Vereiterungen in den mesenterialen Lymphknoten nachgewiesen wurden, blieben die mesenterialen Lymphknoten der CCR6 defizienten Mäuse ohne pathologischen Befund.

4.5 Die immunhistochemische Aufarbeitung mit anti – inv Antikörper

Invasin ist eines der Hauptproteine, welches die Aufnahme von *Y. enterocolitica* über die M- Zellen im FAE der Peyer'schen Plaques fördert. Eine immunhistochemische Anfärbung der Peyer'schen Plaques und der mesenterialen Lymphknoten von C57BL/6 im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen mit einem inv Antikörper zeigte 6 Tage nach der Infektion Unterschiede.

Bei C57BL/6 Mäusen wurde eine Ansammlung von *Y. enterocolitica* speziell in Abszessen der PP und MLN gefunden (Abb. 4.13 und 4.14). Bei den CCR6 defizienten Mäusen konnte man im Vergleich keine Bakterien innerhalb der PP und MLN beobachten (Abb. 4.13 und 4.14).

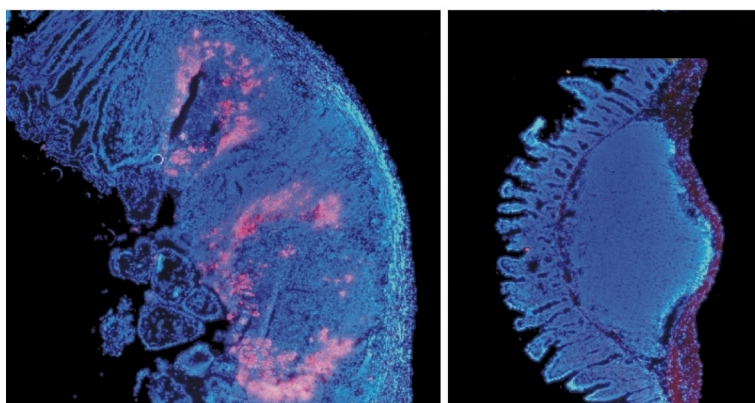


Abbildung 4.13: Links: Immunhistochemische Anfärbung eines Peyer'schen Plaques einer C57BL/6 Maus 6 Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Die Anfärbung erfolgte mit einem Invasin Antikörper. *Y. enterocolitica* konnte nur in C57BL/6 Gewebe nachgewiesen werden. Die Ansammlung der Bakterien im Bereich des PP der C57BL/6 Maus sind deutlich sichtbar. **Rechts:** Immunhistochemische Anfärbung eines Peyer'schen Plaques einer CCR6 defizienten Maus 6 Tage nach der Infektion mit *Y. enterocolitica*. Man kann deutlich erkennen, dass es zu keiner Ansammlung von *Y. enterocolitica* im Bereich des PP der CCR6 defizienten Maus gekommen ist.

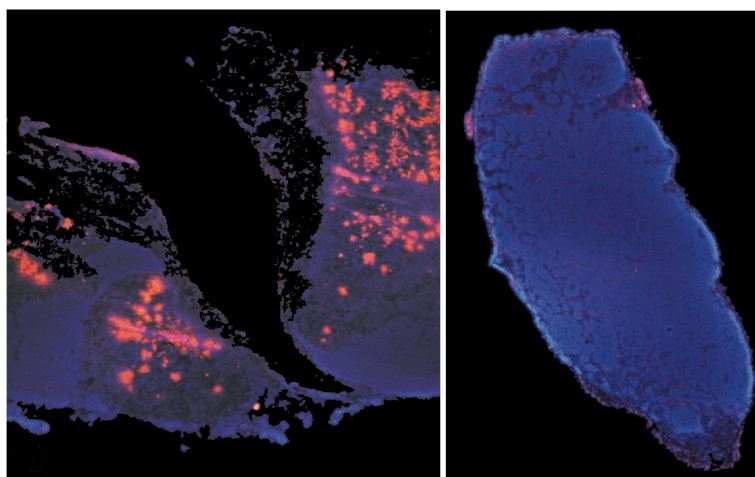


Abbildung 4.14: Links: Anfärbung der mesenterialen Lymphknoten einer C57BL/6 Maus mit dem Invasin Antikörper. Es ist deutlich, dass es zu einer Ansammlung von *Y. enterocolitica* in den mesenterialen Lymphknoten der C57BL/6 Maus gekommen ist. **Rechts:** Anfärbung der mesenterialen Lymphknoten einer CCR6 defizienten Maus mit dem Invasin Antikörper. Im Kontrast dazu, weist die CCR6 defiziente Maus keine Ansammlung der Bakterien in den mesenterialen Lymphknoten auf.

4.6 Zytokin Expression während der Yersinien Infektion

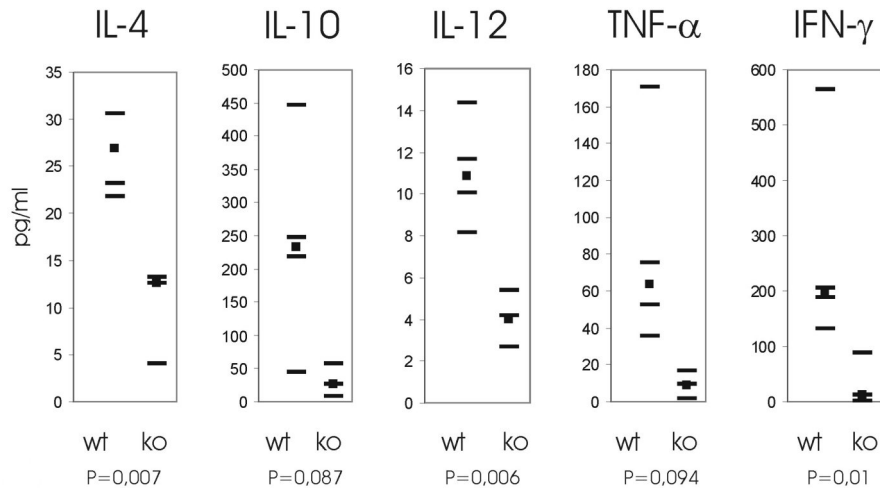


Abbildung 4.15: Zytokin Expression von T – Zellen der Milz bei C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* mit nachfolgender CD3-Stimulation und Ermittlung mit Hilfe des ELISA

Eine bakterielle Infektion - so wie z.B die Yersiniose - erzeugt eine schnelle Produktion pro – inflammatorischer Zytokine im Wirtsorganismus. C57BL/6 und CCR6 defiziente Mäuse wiesen ein unterschiedliches klinisches Bild auf. Mit Hilfe des ELISAs wurde die Zytokin Expression von T – Zellen der Milz nach der bakteriellen Infektion mit nachfolgender CD3 - Stimulation gemessen. Milzzellen der C57BL/6 Mäuse stellten eine 15fach gesteigerte Proteinexpression von IFN – γ nach Infektion mit *Y. enterocolitica* im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen dar. Andere pro – inflammatorische Zytokine in der Milz wie z.B. IL – 12 und TNF – α waren ebenso erhöht.

Milzzellen der C57BL/6 Mäuse stellten eine 6,9fach gesteigerte Expression von TNF – α und eine 2,7fach gesteigerte Produktion von IL – 12 nach Infektion im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen dar. IL – 10, ein immunregulatorisches Zytokin, welches von Th2-Zellen, Monozyten und Makrophagen gebildet wird, wurde ebenfalls auf einem deutlich gesteigerten Level (8,3 fache Erhöhung) in der C57BL/6 Maus im Vergleich zur CCR6 –/– Maus exprimiert. IL – 4 stellte eine 2,1fach gesteigerte Expression in den Milzzellen der C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu den CCR6 defizienten Mäusen dar (Abb. 6A).

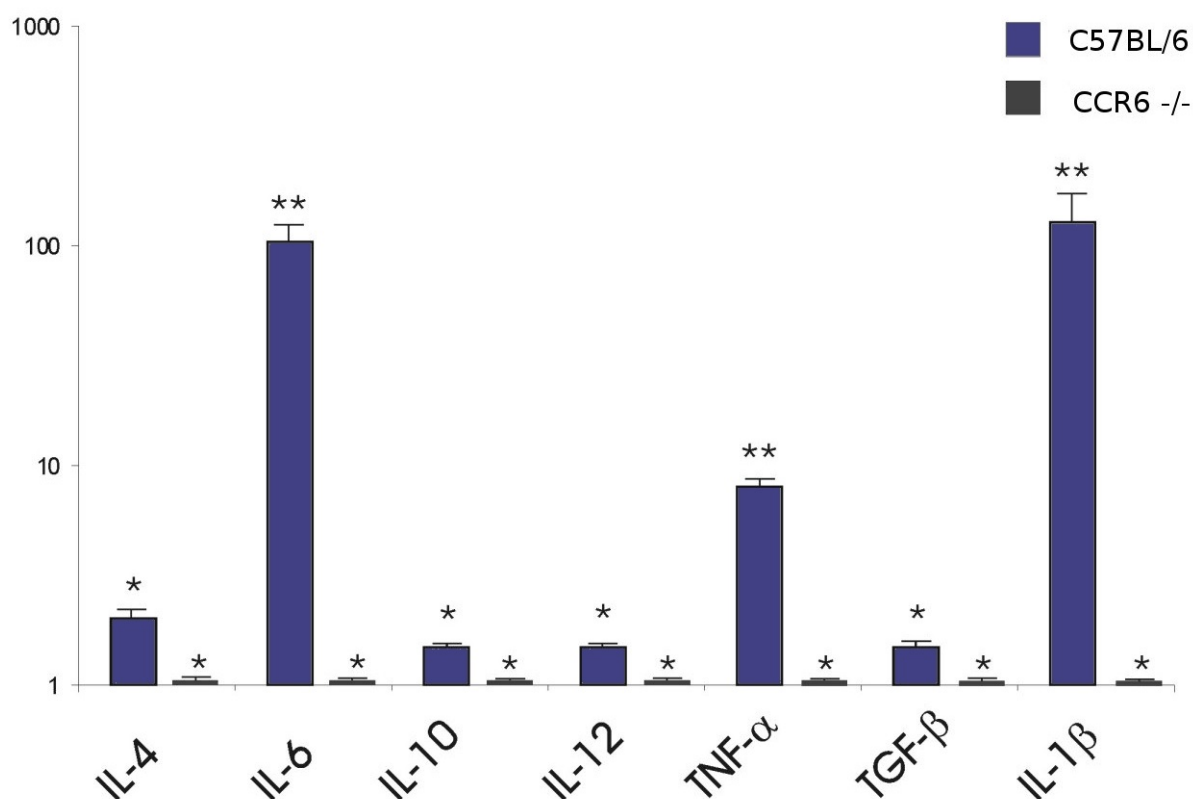


Abbildung 4.16: Zytokin Expression der Leukozyten in Peyer'schen Plaques von C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* ermittelt mit Hilfe der RT - PCR. Angegeben ist die relative Expression des jeweiligen Zytokins in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen (Standard=1)

Zusätzlich wurde mit Hilfe der RT - PCR die Zytokin Expression der Leukozyten in Peyer'schen Plaques ermittelt. IL - 4, IL - 10, IL - 12 und TGF - β wurden annähernd auf demselben Level wiedergegeben (C57BL/6 im Vergleich zur CCR6 defizienten Maus). IL - 4 stellte eine 2,0fach und TGF - β eine 1,7fach gesteigerte Hochregulation in der C57BL/6 Maus im Vergleich zur CCR6 defizienten Maus dar. Die Zytokin Expression von IL - 10 und IL - 12 war um das 1,5fache und um das 1,6fache in der CCR6 defizienten Maus im Vergleich zur C57BL/6 Maus hochreguliert. IL - 1 β wies eine 126fach, IL - 6 eine 82fach und TNF - α eine 7,6fach gesteigerte Expression in C57BL/6 Mäusen in Relation zu CCR6 defizienten Mäusen auf. Die Zytokin Niveaus von infizierten und nicht infizierten Peyer'schen Plaques

der CCR6 defizienten Mäuse waren vergleichbar (Abb. 4.16).

5 Diskussion

Der CCR6 Rezeptor und die Interaktion mit seinem Liganden Mip3 α hat eine große Bedeutung für die Entwicklung des organisierten lymphatischen Systems innerhalb des Darms. Die Deletion von CCR6 beeinträchtigt die Entwicklung der Peyer'schen Plaques. Die Anzahl von M – Zellen ist im FAE der Peyer'schen Plaques deutlich erniedrigt. Die Mikroarchitektur der Peyer'schen Plaques mit korrekt positionierten CCR6 exprimierenden T-, B- und dendritischen Zellen bleibt auch in Abwesenheit von CCR6 erhalten [61]. Ebenfalls ist die Entwicklung der isolierten Lymphfollikel (ILF) aus Cryptopatches (CP) beeinträchtigt [66]. Es wurde gezeigt, dass innerhalb der Cryptopatches CCR6 von DCs nicht exprimiert wird. CCR6 wird im humanen System von dendritischen Zellen, B – Zellen und Unterformen von CD4 – und CD8 – positiven T – Zellen exprimiert. Ein vergleichbares Expressionsmuster zeigt sich in der Maus [81] Trotz der verminderten Größe der Peyer'schen Plaques besitzen CCR6 defiziente Mäuse normale anatomische Eigenschaften mit adäquater mukosaler Immunantwort [61].

In dieser Arbeit wurde anhand eines Infektionsmodells mit *Y. enterocolitica* [22, 42] die Funktion der Peyer'schen Plaques und der M – Zellen in Abwesenheit von CCR6 im Vergleich zu Mäusen mit intaktem Chemokinrezeptor geprüft. Kriterium für die Funktionalität der M – Zellen war folgerichtig bei den über diese Zellen invadierenden Yersinien ein Unterschied in der Infektion der verschiedenen Mausstämme mit dem Bakterium. Ziel dieser Arbeit war es, die Wichtigkeit der CCR6 Expression für die M – Zell Differenzierung zu belegen. Die Ergebnisse bestätigen die direkte und indirekte Notwendigkeit der Mip3 α - CCR6 Interaktion für die M – Zell Differenzierung und betonen die funktionelle Bedeutung der M – Zellen in der mikrobiellen Aufnahme.

Es konnte gezeigt werden, dass CCR6 defiziente Mäuse und die Infektion mit dem über M – Zellen invadierenden Bakterium *Y. enterocolitica* ein angemessenes Modell darstellen, um die M – Zell Funktion *in vivo* zu ermitteln. Zum Erzielen vergleichbarer Ergebnisse wurde in dieser Arbeit der Wildtyp ebenfalls mit dem Bakterium infiziert.

Nach der Aufnahme des Bakteriums durch die M – Zelle erfolgt die systemische Ausbreitung. Durch afferente Lymphgefäße sind die Peyer’schen Plaques mit den mesenterialen Lymphknoten verbunden, die wiederum mit efferenten Lymphgefäßen verbunden sind. Diese münden über den Brustmilchgang (*Ductus thoracicus*) in den Blutstrom. Die Verbreitung der Bakterien durch das lymphatische System spiegelt sich wider in der nachfolgenden Besiedlung von Organen wie den Peyer’schen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten, der Milz, der Leber und der Lunge. Die Erkrankung geht bei Nagern unbehandelt in ein septisches Stadium mit letalem Ausgang über.

C57BL/6 Mäuse entwickelten nach oraler Infektion mit $2,5 \cdot 10^7$ CFU *Y. enterocolitica* eine deutliche Yersinien Infektion mit den typischen Symptomen einer Yersiniose. Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wurde in dieser Arbeit ein Krankheitsscore entwickelt (siehe Abschnitt 3.1.2, Seite 23). Er enthält folgende Parameter: Allgemeiner Zustand der Tiere, Mitbeteiligung von Organen, Zustand des Dünndarms, der Peyer’sche Plaques (PP) und der mesenteriale Lymphknoten (MLN). Der verwendete Krankheitsscore lag nach Infektion von Kontrolltieren im Durchschnitt zwischen 10 – 12 Punkten. Es lag demnach eine schwere Infektion vor (Schwere Infektion 10 – 15 Punkte).

Im Vergleich dazu wiesen die CCR6 defizienten Mäuse keine klinischen Symptome einer Infektion auf. Sie erschienen im wesentlichen gesund. Der Krankheitsscore von durchschnittlich 2 – 3 Punkten (Milde Infektion 1 - 5 Punkte) lässt sich folgendermaßen erklären: Der Allgemeinzustand der CCR6 defizienten Mäuse war insbesondere im Vergleich zu den C57BL/6 Mäusen als gesund zu beurteilen, einige CCR6 defizienten Mäuse etwas reduziert als Folge der oralen Infektion mit signifikanter Bakterienlast, auch wenn diese systemisch nicht zum Ausbruch kam. Bei Beurteilung des Dünndarm schienen manche CCR6 defiziente Mäuse leichte Entzündungserscheinungen im Bereich des Dünndarms aufzuweisen (1: leichte Entzündungserscheinungen im Bereich des Dünndarms). Dies erklärt sich ebenso durch die den Dünndarm durchlaufende Bakterieninfektion nach oraler Bakteriengabe. Unter dem Punkt Mitbeteiligung von Organen war demnach bei einigen CCR6 defizienten Mäusen ein Organ, der Dünndarm, beteiligt (1: ein Organ beteiligt). In den meisten Fällen lag der Krankheitsscore bei 2 und zwar leichte Entzündungserscheinungen im Bereich des Dünndarms und somit Mitbeteiligung eines Organs ohne jedoch dem typischen Bild einer Yersiniose zu entsprechen.

Die Auswertung der Bakterienlast im Stuhl, im Gewebe der Peyer’schen Plaques und der Milz unterstützt die klinische Beobachtung der Unfähigkeit von *Y. enterocolitica*, CCR6

defiziente Mäuse zu infizieren. Der Stuhl und die Peyer'schen Plaques der CCR6 defizienten Mäuse waren an Tag 6 frei von Bakterien. Bakterienbesiedelung in der Milz konnte weder an Tag 2 noch an Tag 6 nachgewiesen werden. Der Nachweis von *Y. enterocolitica* an Tag 2 nach der Infektion in den Peyer'schen Plaques von CCR6 defizienten Mäusen spiegelt lediglich eine befristete Adhärenz der Bakterien an Mukus wieder.

Auch bei längerer Versuchsdauer (bis zum 20. Tag) konnten keine oder sehr milde Krankheitszeichen bei CCR6 defizienten Mäusen festgestellt werden. Die angesprochenen positiven Scores bei den Mäusen sind nur Folge der akuten Belastung des Darmes mit *Y. enterocolitica* und nicht Zeichen einer Infektion. Ebenso zeigt die immunhistochemische Anfärbung der Peyer'schen Plaques und der mesenterialen Lymphknoten mit einem anti - Invasin Antikörper, dass sich im Gewebe der C57BL/6 Mäuse *Y. enterocolitica* nachweisen lässt. Bei CCR6 defizienten Mäusen erfolgt dagegen keine Ansammlung von *Y. enterocolitica* in den Peyer'schen Plaques und den mesenterialen Lymphknoten (Abb. 4.13, 4.14). Die histopathologische Aufarbeitung der Peyer'schen Plaques nach der Infektion mit *Y. enterocolitica* unterstreicht die Aussage über das Nichteindringen der Bakterien in die CCR6 defizienten Mäuse.

Histologisch findet man keine Veränderung der normalen Architektur des Peyer'schen Plaques einer CCR6 defizienten Maus an Tag 6 (Abb. 4.12). Würde eine Bakterienbesiedelung der Peyer'schen Plaques vorliegen, könnten in der histologischen Aufarbeitung Veränderungen wie z.B. eine massive Ansammlung von neutrophilen Granulozyten im Gewebe nachgewiesen werden, da an Tag 6 die Erkrankung schon sehr weit fortgeschritten ist [3]. Die C57BL/6 Maus zeigt dagegen an Tag 6 starke Veränderungen der normalen Architektur des Peyer'schen Plaques (Abb. 4.11). So kann die Unfähigkeit von *Y. enterocolitica*, CCR6 defiziente Mäuse zu infizieren, histologisch gezeigt werden.

Das Eindringen von *Y. enterocolitica* in die Peyer'sche Plaques wird von einer Hochregulation einer Vielzahl von Zytokinen einschließlich TNF - α und Il - 1β begleitet [8]. Eine massive Hochregulation (auf RNA Ebene) in den PP kann nur in C57BL/6 Mäusen, aber nicht in der CCR6 -/- Maus nachgewiesen werden (Tabelle 4.16). Il - 1β ist ein von Makrophagen und Epithelzellen gebildeter, entzündungsfördernder Signalstoff. Die Hochregulation von Il - 1β führt unter anderem zu Fieberreaktionen, T - Zell Aktivierung und Makrophagen Aktivierung. Auf RNA-Ebene ist die Il - 1β Expression in den Peyer'schen Plaques der C57BL/6 Mäuse um das 126fache im Vergleich zu den CCR6 defizienten Mäusen erhöht

(Tabelle 4.16). Auch die Expression von Tumor Nekrose Faktor α (TNF α) und TGF β (Transforming Growth Factor β) sowie Interferon γ (IFN γ) war in C57BL/6 Mäusen in Relation zu CCR6 defizienten Mäusen deutlich erhöht.

Die Untersuchung der Expressionslevel der Interleukine Il 4 , Il 6 , Il 10 und Il 12 auf RNA $-$ Ebene und auf Proteinebene zeigte eine signifikant höhere Produktion von mRNA für alle genannten Zytokine in der Wildtyp-Maus. Auf Proteinebene konnte diese relativ erhöhte Expression nur bei Il 10 und Il 12 nicht beobachtet werden.

Die Expressionsdaten zeigen, dass es nach Infektion mit *Y. enterocolitica* in den Pey-er'schen Plaques der C57BL/6 Mäuse zu einer starken akuten Entzündungsreaktion mit Bildung pro-inflammatorischer Zytokine kommt, dagegen weisen CCR6 defizienten Mäuse auch auf Zytokinebene keine Reaktion auf. Zu bedenken ist bei der Interpretation dieser Ergebnisse, dass eine Bestimmung einer erhöhten Expression eines Genes auf RNA - Ebene nicht automatisch eine Transkription mit konsekutivem biologischem Effekt zur Folge hat. Bei Untersuchungen auf RNA - Ebene wird eine Regulation um Größenordnungen unterhalb des Faktors 5 als kaum biologisch bedeutsam eingestuft [108]. Die hier gezeigten Regulationen oberhalb dieses Schwellenwertes für die Gene Il 1β , Il 6 und TNF α zeigen deutlich die Stellung pro-inflammatorischer Zytokine in den C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu CCR6 defizienten Mäusen während der Yersinien Infektion.

Die Expressionsdaten aus der Milz der infizierten Tiere wurden auf Proteinebene gemessen, biologisch haben sie eine höhere Aussagekraft als RNA-Werte. Auch in der Milz konnte ein deutlicher Anstieg pro - inflammatorischer Zytokine nur bei den C57BL/6 Mäusen gezeigt werden. Zusammenfassend unterstützen die gemessenen Expressionswerte für Zytokine aus PP und Milz die These einer Unfähigkeit von Yersinien, über die M $-$ Zellen in die PP und weiter bis in die Milz zu invadieren. Die Expressionswerte für Zytokine in CCR6 defizienten Mäusen sind nicht erhöht, da keine Bakterien in die jeweiligen Organen bzw. Strukturen eingedrungen sind und somit auch kein Anlass für eine entzündliche Reaktion vorliegt.

Im Kontrast dazu entwickelten CCR6 defiziente Mäuse bei parenteraler Infektion eine ähnlich ausgeprägte Infektion wie bei C57BL/6 Mäusen. Die parenterale Infektion (i.p. Infektion) wurde als alternative Infektionsroute gewählt, da die Bakterien so nicht über die M $-$ Zellen in den Organismus invadieren. Es sollte gezeigt werden, dass bei CCR6 defizienten Mäusen kein systemischer Immundefekt zugrunde liegt, sondern es zu einer lokalen Funktionsstörung der M $-$ Zellen kommt. Durch die Ergebnisse der intraperitonealen Infektion

kann eine durch den Gen Knockout entstandene lokalisierte Funktionsstörung im Bereich der M – Zellen der Peyer’schen Plaques bewiesen werden, die eine Infektionsresistenz der CCR6 defizienten Mäuse bewirkt. Eine veränderte Immunantwort in den CCR6 defizienten Mäusen kann ausgeschlossen werden, da die intraperitoneale Infektion mit *Y. enterocolitica* in beiden Mausgruppen zu identischen Infektionsverläufen führt.

Auch kann aufgrund von Langzeitergebnissen eine verspätete Immunantwort als Ursache des Gen-Knockouts ausgeschlossen werden. Bei den Langzeitversuchen mussten die C57BL/6 Mäuse an Tag 10 nach der Infektion aufgrund der weit fortgeschrittenen Krankheit getötet werden. Die CCR6 defizienten Mäuse wurden am 20. Tag post infectionem getötet. Sie wiesen zu diesem Zeitpunkt keinerlei Krankheitszeichen auf und waren frei von Yersinien (Langzeitversuche siehe Abschnitt 4.3).

Vielmehr verhindert eine Funktionsstörung der M – Zellen in der CCR6 defizienten Maus die Infektion mit M – Zell gerichteten Yersinien. Die genaue Ursache dieser Funktionsstörung der M – Zellen ist noch unbekannt. M – Zellen entstehen aus Epithelzellen des Follikel – assoziierten Epithels durch lympho – epitheliale Interaktion. Der Verlust von M – Zellen in der CCR6 defizienten Maus lässt vermuten, dass die Mip3 α – CCR6 Interaktion in den PP für die Differenzierung von M – Zellen wichtig ist. Es ist ungeklärt, ob eine direkte Interaktion Mip3 α – CCR6 die Funktionsstörung verursacht oder es zu einer indirekten Interaktion kommt. Weiterhin ist nicht bekannt welche CCR6 exprimierenden lymphatischen Zellen an der Differenzierung von M – Zellen in den PP beteiligt sind und welche Signale durch die Mip3 α – CCR6 Interaktion vermittelt werden. Dies sollte Gegenstand weiterer Forschung sein.

Wir konnten zeigen, dass das Bakterium unfähig ist, in die Peyer’schen Plaques der CCR6 defizienten Mäuse einzudringen. Dies konnte durch die immunhistochemische Aufarbeitung mit einem anti – Invasin Antikörper und die Zytokindaten belegt werden. Das Bakterium scheitert am initialen Invasionsweg - der Aufnahme durch die M – Zelle. Mögliche Ursachen sind neben der Verlust von M-Zellen jedoch auch eine nicht erzielte Adhärenz der Bakterien an die M – Zellen oder eine gestörte Aufnahme der adhärenierten Bakterien.

Die Adhärenz von *Yersinia* an das Epithel wird vermittelt durch Cadherine und Integri-ne [103], die sich auf der Zytoplasmamembran der M – Zelle befinden [93]. Die Cadherin und/ oder Integrin Struktur kann durch den CCR6 Knockout so verändert sein, dass eine Adhärenz mit nachfolgender Aufnahme des Bakteriums nicht mehr möglich ist. Weiterhin

ist denkbar, dass die Bakterienadhärenz an die Zielstrukturen (Cadherine und Integrine) zustande kommt, die Weiterleitung durch Endo -, bzw. Transzytose durch Membranveränderungen verhindert wird. Es gibt jedoch bisher keine Hinweis darauf, dass die Interaktion von CCR6 mit seinem Liganden eine Modifikation dieser Zielstrukturen bewirkt.

Ein weiterer möglicher Grund für die Nichtinfektion der CCR6 defizienten Mäusen könnte die für eine M – Zell gerichtete Yersinien Infektion relativ zu geringe Anzahl an M – Zellen in den CCR6 defizienten Mäusen sein. Dies kann allerdings durch die immunhistochemische Aufarbeitung und die orale Infektion mit höheren Bakterienkonzentrationen widerlegt werden. Würde die Resistenz lediglich auf einer verminderten M – Zell Anzahl beruhen, würde man in der immunhistochemischen Aufarbeitung das Bakterium im Peyer’schen Plaques der CCR6 defizienten Maus nachweisen können. Trotz verminderter M – Zell – Anzahl würde ein Teil der Yersinien in die Peyer’schen Plaques gelangen. Auch bei höheren Bakterienkonzentrationen, bei denen mehr Bakterien in die Peyer’schen Plaques eindringen, können keine Bakterien in CCR6 defizienten Mäusen nachgewiesen werden.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass der Genknockout von CCR6 eine M – Zell gerichtete Infektion mit *Y. enterocolitica* unterdrückt, aber die Beseitigung von CCR6 die Immunantwort nicht signifikant verändert. Daher stellt das CCR6 Modell ein geeignetes *in vivo* M – Zell – Modell dar. Es gibt bereits eine Reihe verschiedener *in vitro* und *in vivo* M – Zell – Modelle, die bei genauer Betrachtung jedoch nur bedingt adäquaten M – Zell – Modelle repräsentieren.

SALAZAR–GONZALEZ *et al.* [88] zeigten die Bedeutung der CCR6 Expression in dendritischen Zellen für die Aktivierung von pathogen spezifischen T – Zellen innerhalb der Peyer’schen Plaques. In dieser Studie wurden Mäuse oral mit dem die M-Zellen als Invasionsort nutzenden Bakterium *Salmonella typhimurium* infiziert. Allerdings invadieren die Bakterien auch über verschiedene andere Wege so z.B. über dendritische Zellen und Villusepithelzellen. In diesem Modell war die Menge an Bakterien, die lokal innerhalb der Peyer’schen Plaques und systemisch in Milz und Leber entdeckt wurden, vergleichbar zwischen C57BL/6 Mäusen und CCR6 defizienten Mäusen. Die Ergebnisse zeigen, dass verschiedene Pathogene die M – Zellen innerhalb des FAE zur Invasion nutzen können; die Signifikanz dieser Interaktion unterscheidet sich wesentlich zwischen verschiedenen Pathogenen. Die Studie verdeutlicht, dass der Verlust von CCR6 nicht allein die M – Zell Entwicklung hemmt, sondern auch andere Effektorbahnen wie z.B. die T – Zell Aktivierung beeinflusst.

Bei CCR6 defizienten Mäusen wurden merklich weniger Antigen – spezifische Antikörper produzierende Zellen nach oraler Gabe von *Keyhole limpet Hämocyanin* (KLH) gefunden [16]. Diese Beobachtung kann man als eine Reduzierung der Antigen Aufnahme mittels M – Zellen interpretieren; aber auch andere Mechanismen wie eine fehlerhafte T – Zell – Antwort innerhalb der Peyer’schen Plaques können nicht ausgeschlossen werden.

Bei den bisher vorgestellten *in vitro* M – Zell – Modellen muss diskutiert werden, ob die Modelle ein adäquates *in vitro* M – Zell – Modell darstellen. Andere Mechanismen, wie die Antigenaufnahme über intestinale Epithelzellen und dendritische Zellen, die mit den M – Zell gerichteten Funktionen *in vivo* interferieren, können *in vitro* nicht nachgestellt werden. Die meisten *in vitro* M – Zell – Studien verwenden das Modell nach KERNEIS *et al.* [55, 56]. In diesem Modell werden Lymphozyten mit Caco -2 Zellen kokultiviert, um die Hauptcharakteristika von M – Zellen zu reproduzieren. Die kokultivierten Epithelzellen entwickeln M – Zell - ähnliche Eigenschaften. Es ist aber unklar, ob dieses künstliche Modell alle Charakteristika von M – Zellen repräsentiert.

Weitere *in vitro* M – Zell Modelle [93, 106] zeigen die Entwicklung einer M – Zell – Morphologie bei einem Teil der intestinalen Enterozyten. Bisher ist aber der Einfluss des einzigartigen Darmumfeldes auf die Differenzierung und Funktion der M – Zellen ungeklärt. Daher ist nicht sicher, ob die M – Zell - artigen Zellen, die *in vitro* generiert wurden mit den *in vivo* entstandenen M – Zellen identisch sind. SIERRO *et al.* [97] und CHIN *et al.* [15] zeigten, dass die Stimulation zur Differenzierung der M – Zellen und die bakterielle Kolonisation am FAE im Darm interferieren. Deshalb wird die Aussagekraft der *in vitro* M – Zell - Modelle *in vivo* kontrovers diskutiert.

Die *in vivo* vorgestellten M – Zell – Modelle verwenden *knockout* Modelle mit Fehlern in der Entwicklung des organisierten Darm–assozierten lymphatischen Gewebes. Die meisten dieser Modelle haben allerdings den Nachteil, dass sie mit einer ausgesprochenen Beeinträchtigung der mukosalen und systemischen Immunantwort einhergehen. Sie sind daher zur Untersuchung der M – Zell – Funktion *in vivo* eingeschränkt brauchbar.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an ungeeigneten *in vivo* M – Zell – Modellen vorgestellt wie z.B. $LT\alpha^{-/-}$ [6, 20], $LT\beta^{-/-}$ [32], $Il7R^{-/-}$ [1], $Relb^{-/-}$ [114] und $Light^{-/-}$ [91]. Diese gendefizienten Mäuse haben eine reduzierte Anzahl an Peyer’schen Plaques oder in Gänze fehlende PP. $LT\alpha$ defizienten Mäusen fehlen Lymphknoten und Peyer’sche Plaques, die Milz zeigt undeutliche, follikular marginale Zonen [6]. Des Weiteren findet man

bei $LT\alpha -/-$ eine T-/B-Zell Störung, die Bildung von B – Zell Follikeln, follikular dentritischen Netzen und Keimzentren unterbleibt [20]. Nach Infektion der $Lt\alpha$ defizienten Mäusen mit *Y. enterocolitica* war der Ablauf der Infektion schwerwiegender mit systemischer Ausbreitung der Bakterien in die Milz [42], MLN und in andere Organe. Offensichtlich verursacht ein Defekt im Immunsystem anders als die Abwesenheit der Peyer’schen Plaques und der mesenteriale Lymphknoten schwere Beeinträchtigung der Barrierefunktion des Darmes. Dies führt maßgeblich zur systemischen Kolonisierung mit *Y. enterocolitica* in diesen Mäusen. In Folge sind diese Modelle nicht brauchbar, um die M – Zell Funktion *in vivo* zu untersuchen.

Da das CCR6 Modell ein geeignetes *in vivo* M – Zell – Modell darstellt, sollte es Gegenstand weiterer Forschung sein. In Zukunft sollte erforscht werden, in wieweit die $Mip3\alpha - CCR6$ Interaktion die Entwicklung von Peyer’schen Plaques beeinflusst bzw. welche CCR6 exprimierenden lymphatischen Zellen an der Differenzierung von M – Zellen in PP beteiligt sind und welche Signale durch die $Mip3\alpha - CCR6$ Interaktion vermittelt werden. Weiterhin wäre interessant, ob sich CCR6 als mögliches Zielmolekül für anti-entzündliche Strategien bei der Therapie chronisch – entzündlicher Darmerkrankungen (CED) eignet.

Das FAE und die M – Zellen haben eine mögliche Rolle in der Pathogenese des Morbus Crohn [19, 31]. Der Einfluss der CCR6 Expression in Zusammenhang mit CED ist noch zu klären. Eine Ursache der Entstehung von CED besteht in einem Ungleichgewicht immunaktivierender und immunsupprimierender Faktoren des Immunsystems. Die genauen Mechanismen der Entstehung und Aufrechterhaltung der CED sind bis heute ungeklärt. Unterschiedliche Studien konnten zeigen, dass unter physiologischen Bedingungen luminale Antigene und Bakterien v.a. durch die M – Zellen des FAE aufgenommen werden und eine Immunantwort des GALT induzieren [28]. Daneben scheinen weitere immunologische sowie genetische Eigenschaften für die Entstehung und den Verlauf der Erkrankung wichtig zu sein.

Da der CCR6 Rezeptor nur einen Liganden ($Mip3\alpha$) besitzt und beim Zusammenspiel immunmodulatorische Eigenschaften entwickelt, kann das Verständnis der Interaktion $Mip3\alpha - CCR6$ neue Wege im Bereich der Therapiekonzepte eröffnen. Die Betrachtung der Unterschiede im Infektionsverlauf mit *Y. enterocolitica* in C57BL/6 und $CCR6 -/-$ Mäusen könnte genauere Hinweise auf die Modulationen der Immunantwort aufgrund von Interaktionen $Mip3\alpha - CCR6$ geben. Das Modell ist besonders interessant, da mit den M – Zellen und den CD4 positiven T – Zellen zwei wesentliche Komponenten im Infektionsverlauf in der $CCR6$ defizienten Maus betroffen sind. Weiterhin ist nicht näher erforscht, inwieweit die

Immunität sowie der Zytokinstatus in den Peyer'schen Plaques der CCR6 defizienten Maus verändert ist.

Die beschriebenen weitergehenden Forschungsprojekte, die auf dem in dieser Arbeit beschriebenen Modell für die M-Zell Funktion aufbauen, könnten also zu einem umfassenderen Verständnis der Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen und somit auch unter Umständen zu verbesserten, zielgerichteten Therapiemöglichkeiten führen.

6 Lebenslauf

Name	von Wedel, Julia, Zahnärztin
Geburtstag, -ort	11. Dezember 1980 in Salzkotten
Eltern	Dres. med. Cornelia und Hasso von Wedel
Abitur	Juni 2000, St. Michaels Gymnasium, Paderborn
Studium	WS 2000/2001 – WS 2006/2007 Studium der Zahnmedizin an der WWU Münster SS 2001 naturwiss. Vorprüfung WS 2002/2003 zahnärztl. Vorprüfung 21. Dezember 2006 zahnärztliche Prüfung
Approbation	29. Januar 2007, Bezirksregierung Münster
z.Zt.	Weiterbildungsassistentin Oralchirurgie, Dr. Dr. Addicks, Gütersloh

7 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Kucharzik und Herrn Priv.-Doz. Dr. Lügering für die Überlassung des hochinteressanten Themas und ihre stets offenen Ohren für Fragen und Anregungen. Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Westphal für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, ihre Mühe bei der Korrektur der vorliegenden Arbeit und ihre überaus freundliche Begleitung dieses Projektes bedanken.

Weiterhin sei gedankt Herrn Dr. Martin Floer für seine kollegiale Unterstützung bei der Durchführung und Korrektur dieser Arbeit. Sonja Dufentester und Elke Weber danke ich für ihre exzellente technische Unterstützung.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mir das Studium und diese Arbeit ermöglicht haben und mich auch darüber hinaus immer unterstützt haben.

Auch bei meinem Freund Dr. Moritz Kebschull möchte ich mich dafür bedanken, dass er nie die Geduld mit mir verloren hat und mich immer mit Rat und Tat unterstützt hat.

Literaturverzeichnis

- [1] S Adachi, H Yoshida, K Honda, K Maki, K Saijo, K Ikuta, T Saito, and S I Nishikawa. Essential role of il-7 receptor alpha in the formation of peyer's patch anlage. *Int Immunol*, 10(1):1–6, 1998.
- [2] S Akira, K Takeda, and T Kaisho. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, 2(8):675–680, 2001.
- [3] I B Autenrieth and R Firsching. Penetration of m cells and destruction of peyer's patches by yersinia enterocolitica: an ultrastructural and histological study. *J Med Microbiol*, 44(4):285–294, 1996.
- [4] S Avrameas and B Guilbert. A method for quantitative determination of cellular immunoglobulins by enzyme-labeled antibodies. *Eur J Immunol*, 1(5):394–396, 1971.
- [5] T Ayabe, D P Satchell, C L Wilson, W C Parks, M E Selsted, and A J Ouellette. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*, 1(2):113–118, 2000.
- [6] T A Banks, B T Rouse, M K Kerley, P J Blair, V L Godfrey, N A Kuklin, D M Bouley, J Thomas, S Kanangat, and M L Mucenski. Lymphotoxin-alpha-deficient mice. effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol*, 155(4):1685–1693, 1995.
- [7] W L Beatty and P J Sansonetti. Role of lipopolysaccharide in signaling to subepithelial polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun*, 65(11):4395–4404, 1997.
- [8] E Bohn, J Heesemann, S Ehlers, and I B Autenrieth. Early gamma interferon mrna expression is associated with resistance of mice against yersinia enterocolitica. *Infect Immun*, 62(7):3027–3032, 1994.

- [9] E Bohn, A Sing, R Zumbihl, C Bielfeldt, H Okamura, M Kurimoto, J Heesemann, and I B Autenrieth. Il-18 (ifn-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J Immunol*, 160(1):299–307, 1998.
- [10] C Borghesi, M J Taussig, and C Nicoletti. Rapid appearance of m cells after microbial challenge is restricted at the periphery of the follicle-associated epithelium of peyer’s patch. *Lab Invest*, 79(11):1393–1401, 1999.
- [11] C P Braegger, J Spencer, and T T MacDonald. Ontogenetic aspects of the intestinal immune system in man. *Int J Clin Lab Res*, 22(1):1–4, 1992.
- [12] W A Bye, C H Allan, and J S Trier. Structure, distribution, and origin of m cells in peyer’s patches of mouse ileum. *Gastroenterology*, 86(5 Pt 1):789–801, 1984.
- [13] P B Carter. Pathogenecity of yersinia enterocolitica for mice. *Infect Immun*, 11(1):164–170, 1975.
- [14] Sophie Chabot, Jessica S Wagner, Stephanie Farrant, and Marian R Neutra. Tlrs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium. *J Immunol*, 176(7):4275–4283, 2006.
- [15] Keigi Chin, Sachiko Onishi, Midori Yuji, Tetsurou Inamoto, Wang-Mei Qi, Katsuhiko Warita, Toshifumi Yokoyama, Nobuhiko Hoshi, and Hiroshi Kitagawa. Differentiation of epithelial cells to m cells in response to bacterial colonization on the follicle-associated epithelium of peyer’s patch in rat small intestine. *J Vet Med Sci*, 68(10):1023–1028, 2006.
- [16] D N Cook, D M Prosser, R Forster, J Zhang, N A Kuklin, S J Abbondanzo, X D Niu, S C Chen, D J Manfra, M T Wiekowski, L M Sullivan, S R Smith, H B Greenberg, S K Narula, M Lipp, and S A Lira. Ccr6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity*, 12(5):495–503, 2000.
- [17] G R Cornelis, A Boland, A P Boyd, C Geuijen, M Iriarte, C Neyt, M P Sory, and I Stainier. The virulence plasmid of yersinia, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(4):1315–1352, 1998.

- [18] M Croft and S L Swain. B cell response to fresh and effector t helper cells. role of cognate t-b interaction and the cytokines il-2, il-4, and il-6. *J Immunol*, 146(12):4055–4064, 1991.
- [19] C A Cuvelier, J Quatacker, H Mielants, M De Vos, E Veys, and H J Roels. M-cells are damaged and increased in number in inflamed human ileal mucosa. *Histopathology*, 24(5):417–426, 1994.
- [20] P De Togni, J Goellner, N H Ruddle, P R Streeter, A Fick, S Mariathasan, S C Smith, R Carlson, L P Shornick, and J Strauss-Schoenberger. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science*, 264(5159):703–707, 1994.
- [21] P H Dube, P A Revell, D D Chaplin, R G Lorenz, and V L Miller. A role for il-1 alpha in inducing pathologic inflammation during bacterial infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19):10880–10885, 2001.
- [22] Peter H Dube, Scott A Handley, James Lewis, and Virginia L Miller. Protective role of interleukin-6 during yersinia enterocolitica infection is mediated through the modulation of inflammatory cytokines. *Infect Immun*, 72(6):3561–3570, 2004.
- [23] L Emody, J Heesemann, H Wolf-Watz, M Skurnik, G Kapperud, P O’Toole, and T Wadstrom. Binding to collagen by yersinia enterocolitica and yersinia pseudotuberculosis: evidence for yopa-mediated and chromosomally encoded mechanisms. *J Bacteriol*, 171(12):6674–6679, 1989.
- [24] E Engvall and P Perlman. Enzyme-linked immunosorbent assay (elisa). quantitative assay of immunoglobulin g. *Immunochemistry*, 8(9):871–874, 1971.
- [25] I N Farstad, T S Halstensen, O Fausa, and P Brandtzaeg. Heterogeneity of m-cell-associated b and t cells in human peyer’s patches. *Immunology*, 83(3):457–464, 1994.
- [26] D Finke, H Acha-Orbea, A Mattis, M Lipp, and J Kraehenbuhl. Cd4+cd3- cells induce peyer’s patch development: role of alpha4beta1 integrin activation by cxcr5. *Immunity*, 17(3):363–373, 2002.

- [27] B B Finlay and S Falkow. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(2):136–169, 1997.
- [28] C Fiocchi. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology*, 115(1):182–205, 1998.
- [29] A Flugel, H Schulze-Koops, J Heesemann, K Kuhn, L Sorokin, H Burkhardt, K von der Mark, and F Emmrich. Interaction of enteropathogenic yersinia enterocolitica with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins collagen type iv, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *J Biol Chem*, 269(47):29732–29738, 1994.
- [30] Y X Fu and D D Chaplin. Development and maturation of secondary lymphoid tissues. *Annu Rev Immunol*, 17:399–433, 1999.
- [31] Y Fujimura, R Kamoi, and M Iida. Pathogenesis of aphthoid ulcers in crohn’s disease: correlative findings by magnifying colonoscopy, electron microscopy, and immunohistochemistry. *Gut*, 38(5):724–732, 1996.
- [32] A Futterer, K Mink, A Luz, M H Kosco-Vilbois, and K Pfeffer. The lymphotoxin beta receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity*, 9(1):59–70, 1998.
- [33] A Gebert. Identification of m-cells in the rabbit tonsil by vimentin immunohistochemistry and in vivo protein transport. *Histochem Cell Biol*, 104(3):211–220, 1995.
- [34] A Gebert, M Goke, H J Rothkotter, and C F Dietrich. [the mechanisms of antigen uptake in the small and large intestines: the roll of the m cells for the initiation of immune responses]. *Z Gastroenterol*, 38(10):855–872, 2000.
- [35] A Gebert, H J Rothkotter, and R Pabst. M cells in peyer’s patches of the intestine. *Int Rev Cytol*, 167:91–159, 1996.
- [36] P Gemski, J R Lazere, T Casey, and J A Wohlhieter. Presence of a virulence-associated plasmid in yersinia pseudotuberculosis. *Infect Immun*, 28(3):1044–1047, 1980.

- [37] P J Giannasca, K T Giannasca, P Falk, J I Gordon, and M R Neutra. Regional differences in glycoconjugates of intestinal m cells in mice: potential targets for mucosal vaccines. *Am J Physiol*, 267(6 Pt 1):G1108–21, 1994.
- [38] T V Golovkina, M Shlomchik, L Hannum, and A Chervonsky. Organogenic role of b lymphocytes in mucosal immunity. *Science*, 286(5446):1965–1968, 1999.
- [39] Guntram A Grassl, Erwin Bohn, Yvonne Muller, Oliver T Buhler, and Ingo B Autenrieth. Interaction of yersinia enterocolitica with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol*, 293(1):41–54, 2003.
- [40] Elisabet Gullberg and Johan D Soderholm. Peyer’s patches and m cells as potential sites of the inflammatory onset in crohn’s disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1072:218–232, 2006.
- [41] Z A Hamburger, M S Brown, R R Isberg, and P J Bjorkman. Crystal structure of invasin: a bacterial integrin-binding protein. *Science*, 286(5438):291–295, 1999.
- [42] Scott A Handley, Peter H Dube, Paula A Revell, and Virginia L Miller. Characterization of oral yersinia enterocolitica infection in three different strains of inbred mice. *Infect Immun*, 72(3):1645–1656, 2004.
- [43] C Hanski, A Grutzkau, M Naumann, and E O Riecken. [interaction of enterobacteriaceae with m-cells: a joint step in invasion of the intestinal mucosa]. *Z Gastroenterol Verh*, 25:62–66, 1990.
- [44] C Hanski, U Kutschka, H P Schmoranzler, M Naumann, A Stallmach, H Hahn, H Menge, and E O Riecken. Immunohistochemical and electron microscopic study of interaction of yersinia enterocolitica serotype o8 with intestinal mucosa during experimental enteritis. *Infect Immun*, 57(3):673–678, 1989.
- [45] J Heesemann, U Gross, and L Gruter. Genetic manipulation of virulence of yersinia enterocolitica. *Contrib Microbiol Immunol*, 9:312–316, 1987.
- [46] J Heesemann, C Keller, R Morawa, N Schmidt, H J Siemens, and R Laufs. Plasmids of human strains of yersinia enterocolitica: molecular relatedness and possible importance for pathogenesis. *J Infect Dis*, 147(1):107–115, 1983.

- [47] W R Hein. Organization of mucosal lymphoid tissue. *Curr Top Microbiol Immunol*, 236:1–15, 1999.
- [48] P A Henkart. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity*, 1(5):343–346, 1994.
- [49] Gerd Herold. *Innere Medizin*. Gerd Herold, 2003.
- [50] S A Hopkins, F Niedergang, I E Corthesy-Theulaz, and J P Kraehenbuhl. A recombinant salmonella typhimurium vaccine strain is taken up and survives within murine peyer’s patch dendritic cells. *Cell Microbiol*, 2(1):59–68, 2000.
- [51] A Iwasaki and B L Kelsall. Localization of distinct peyer’s patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (mip)-3alpha, mip-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med*, 191(8):1381–1394, 2000.
- [52] C A Jr Janeway. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect*, 3(13):1167–1171, 2001.
- [53] B Jones, L Pascopella, and S Falkow. Entry of microbes into the host: using m cells to break the mucosal barrier. *Curr Opin Immunol*, 7(4):474–478, 1995.
- [54] Anton J. Kroesen und Bodo Klump Jörg C. Hoffmann, editor. *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*. Thieme Verlag Stuttgart, New York, 2004.
- [55] S Kerneis, A Bogdanova, J P Kraehenbuhl, and E Pringault. Conversion by peyer’s patch lymphocytes of human enterocytes into m cells that transport bacteria. *Science*, 277(5328):949–952, 1997.
- [56] S Kerneis, E Caliot, H Stubbe, A Bogdanova, J Kraehenbuhl, and E Pringault. Molecular studies of the intestinal mucosal barrier physiopathology using cocultures of epithelial and immune cells: a technical update. *Microbes Infect*, 2(9):1119–1124, 2000.
- [57] H Korner and J D Sedgwick. Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunol Cell Biol*, 74(5):465–472, 1996.

- [58] J P Kraehenbuhl and M R Neutra. Epithelial m cells: differentiation and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 16:301–332, 2000.
- [59] Torsten Kucharzik, James T 3rd Hudson, Rebekah L Waikel, W David Martin, and Ifor R Williams. Ccr6 expression distinguishes mouse myeloid and lymphoid dendritic cell subsets: demonstration using a ccr6 egfp knock-in mouse. *Eur J Immunol*, 32(1):104–112, 2002.
- [60] J A Laissue, B B Chappuis, C Muller, J C Reubi, and J O Gebbers. The intestinal immune system and its relation to disease. *Dig Dis*, 11(4-5):298–312, 1993.
- [61] Andreas Lugering, Martin Floer, Sabine Westphal, Christian Maaser, Thomas W Spahn, M Alexander Schmidt, Wolfram Domschke, Ifor R Williams, and Torsten Kucharzik. Absence of ccr6 inhibits cd4+ regulatory t-cell development and m-cell formation inside peyer’s patches. *Am J Pathol*, 166(6):1647–1654, 2005.
- [62] Andreas Lugering and Torsten Kucharzik. Induction of intestinal lymphoid tissue: the role of cryptopatches. *Ann N Y Acad Sci*, 1072:210–217, 2006.
- [63] A J Macpherson, D Gatto, E Sainsbury, G R Harriman, H Hengartner, and R M Zinkernagel. A primitive t cell-independent mechanism of intestinal mucosal iga responses to commensal bacteria. *Science*, 288(5474):2222–2226, 2000.
- [64] J L Madara. Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol*, 60:143–159, 1998.
- [65] V J McCracken and R G Lorenz. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol*, 3(1):1–11, 2001.
- [66] Keely G McDonald, Jacquelyn S McDonough, Caihong Wang, Torsten Kucharzik, Ifor R Williams, and Rodney D Newberry. Cc chemokine receptor 6 expression by b lymphocytes is essential for the development of isolated lymphoid follicles. *Am J Pathol*, 170(4):1229–1240, 2007.
- [67] H J Monstein, A G Nylander, and D Chen. Rna extraction from gastrointestinal tract and pancreas by a modified chomczynski and sacchi method. *Biotechniques*, 19(3):340–344, 1995.

- [68] M Moser and K M Murphy. Dendritic cell regulation of th1-th2 development. *Nat Immunol*, 1(3):199–205, 2000.
- [69] C Nagler-Anderson and H N Shi. Peripheral nonresponsiveness to orally administered soluble protein antigens. *Crit Rev Immunol*, 21(1-3):121–131, 2001.
- [70] Markus F Neurath, Susetta Finotto, and Laurie H Glimcher. The role of th1/th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med*, 8(6):567–573, 2002.
- [71] M R Neutra, A Frey, and J P Kraehenbuhl. Epithelial m cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 86(3):345–348, 1996.
- [72] M R Neutra, E Pringault, and J P Kraehenbuhl. Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. *Annu Rev Immunol*, 14:275–300, 1996.
- [73] R L Owen. M cells—entryways of opportunity for enteropathogens. *J Exp Med*, 180(1):7–9, 1994.
- [74] R L Owen and D K Bhalla. Cytochemical analysis of alkaline phosphatase and esterase activities and of lectin-binding and anionic sites in rat and mouse peyer’s patch m cells. *Am J Anat*, 168(2):199–212, 1983.
- [75] R L Owen and A L Jones. Epithelial cell specialization within human peyer’s patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, 66(2):189–203, 1974.
- [76] A Ozinsky, D M Underhill, J D Fontenot, A M Hajjar, K D Smith, C B Wilson, L Schroeder, and A Aderem. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(25):13766–13771, 2000.
- [77] J C Pepe, M R Wachtel, E Wagar, and V L Miller. Pathogenesis of defined invasion mutants of yersinia enterocolitica in a balb/c mouse model of infection. *Infect Immun*, 63(12):4837–4848, 1995.

- [78] D Pilz, E Wachter, J Heesemann, and V Brade. Evasion of yersinia enterocolitica serotype 03 from complement-mediated killing. *Behring Inst Mitt*, (88):183–193, 1991.
- [79] D K Podolsky. Mucosal immunity and inflammation. v. innate mechanisms of mucosal defense and repair: the best offense is a good defense. *Am J Physiol*, 277(3 Pt 1):G495–9, 1999.
- [80] D A Portnoy and R J Martinez. Role of a plasmid in the pathogenicity of yersinia species. *Curr Top Microbiol Immunol*, 118:29–51, 1985.
- [81] C A Power, D J Church, A Meyer, S Alouani, A E Proudfoot, I Clark-Lewis, S Sozzani, A Mantovani, and T N Wells. Cloning and characterization of a specific receptor for the novel cc chemokine mip-3alpha from lung dendritic cells. *J Exp Med*, 186(6):825–835, 1997.
- [82] Pschyrembel. *Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, Berlin, 1998.
- [83] Zinkernagel R.M. *Grundlagen der Immunologie*. Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1998.
- [84] A Roggenkamp, H R Neuberger, A Flugel, T Schmoll, and J Heesemann. Substitution of two histidine residues in yada protein of yersinia enterocolitica abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol*, 16(6):1207–1219, 1995.
- [85] A Roggenkamp, K Ruckdeschel, L Leitritz, R Schmitt, and J Heesemann. Deletion of amino acids 29 to 81 in adhesion protein yada of yersinia enterocolitica serotype o:8 results in selective abrogation of adherence to neutrophils. *Infect Immun*, 64(7):2506–2514, 1996.
- [86] Andreas Roggenkamp, Nikolaus Ackermann, Christoph A Jacobi, Konrad Truelzsch, Harald Hoffmann, and Jurgen Heesemann. Molecular analysis of transport and oligomerization of the yersinia enterocolitica adhesin yada. *J Bacteriol*, 185(13):3735–3744, 2003.
- [87] R K Saiki, S Scharf, F Faloona, K B Mullis, G T Horn, H A Erlich, and N Arnheim. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354, 1985.

- [88] Rosa Maria Salazar-Gonzalez, Jan H Niess, David J Zammit, Rajesh Ravindran, Aparna Srinivasan, Joseph R Maxwell, Thomas Stoklasek, Rajwardhan Yadav, Ifor R Williams, Xiubin Gu, Beth A McCormick, Michael A Pazos, Anthony T Vella, Leo Lefrancois, Hans-Christian Reinecker, and Stephen J McSorley. Ccr6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific t cells in peyer's patches. *Immunity*, 24(5):623–632, 2006.
- [89] T C Savidge, M W Smith, and P S James. A confocal microscopical analysis of peyer's patch membranous (m) cell and lymphocyte interactions in the scid mouse. *Adv Exp Med Biol*, 371A:243–245, 1995.
- [90] T C Savidge, M W Smith, P S James, and P Aldred. Salmonella-induced m-cell formation in germ-free mouse peyer's patch tissue. *Am J Pathol*, 139(1):177–184, 1991.
- [91] Stefanie Scheu, Judith Alferink, Tobias Potzel, Winfried Barchet, Ulrich Kalinke, and Klaus Pfeffer. Targeted disruption of light causes defects in costimulatory t cell activation and reveals cooperation with lymphotoxin beta in mesenteric lymph node genesis. *J Exp Med*, 195(12):1613–1624, 2002.
- [92] G H Schmidt, M M Wilkinson, and B A Ponder. Cell migration pathway in the intestinal epithelium: an in situ marker system using mouse aggregation chimeras. *Cell*, 40(2):425–429, 1985.
- [93] R Schulte, S Kerneis, S Klinke, H Bartels, S Preger, J P Kraehenbuhl, E Pringault, and I B Autenrieth. Translocation of yersinia enterocolitica across reconstituted intestinal epithelial monolayers is triggered by yersinia invasin binding to beta1 integrins apically expressed on m-like cells. *Cell Microbiol*, 2(2):173–185, 2000.
- [94] H Schulze-Koops, H Burkhardt, J Heesemann, T Kirsch, B Swoboda, C Bull, S Goodman, and F Emmrich. Outer membrane protein yada of enteropathogenic yersiniae mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infect Immun*, 61(6):2513–2519, 1993.
- [95] Evemie Schutyser, Sofie Struyf, and Jo Van Damme. The cc chemokine ccl20 and its receptor ccr6. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(5):409–426, 2003.

- [96] A Siebers and B B Finlay. M cells and the pathogenesis of mucosal and systemic infections. *Trends Microbiol*, 4(1):22–29, 1996.
- [97] F Sierro, E Pringault, P S Assman, J P Kraehenbuhl, and N Debard. Transient expression of m-cell phenotype by enterocyte-like cells of the follicle-associated epithelium of mouse peyer’s patches. *Gastroenterology*, 119(3):734–743, 2000.
- [98] T W Spahn, A Fontana, A M Faria, A J Slavín, H P Eugster, X Zhang, P A Koni, N H Ruddle, R A Flavell, P D Rennert, and H L Weiner. Induction of oral tolerance to cellular immune responses in the absence of peyer’s patches. *Eur J Immunol*, 31(4):1278–1287, 2001.
- [99] Thomas W Spahn, Michael K Muller, Wolfram Domschke, and Torsten Kucharzik. Role of lymphotoxins in the development of peyer’s patches and mesenteric lymph nodes: relevance to intestinal inflammation and treatment. *Ann N Y Acad Sci*, 1072:187–193, 2006.
- [100] K Suzuki, T Oida, H Hamada, O Hitotsumatsu, M Watanabe, T Hibi, H Yamamoto, E Kubota, S Kaminogawa, and H Ishikawa. Gut cryptopatches: direct evidence of extrathymic anatomical sites for intestinal t lymphopoiesis. *Immunity*, 13(5):691–702, 2000.
- [101] A Tamm, A M Tarkkanen, T K Korhonen, P Kuusela, P Toivanen, and M Skurnik. Hydrophobic domains affect the collagen-binding specificity and surface polymerization as well as the virulence potential of the yada protein of yersinia enterocolitica. *Mol Microbiol*, 10(5):995–1011, 1993.
- [102] R Tertti, M Skurnik, T Vartio, and P Kuusela. Adhesion protein yada of yersinia species mediates binding of bacteria to fibronectin. *Infect Immun*, 60(7):3021–3024, 1992.
- [103] G Tran Van Nhieu and R R Isberg. Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. *EMBO J*, 12(5):1887–1895, 1993.

- [104] J S Trier. Structure and function of intestinal m cells. *Gastroenterol Clin North Am*, 20(3):531–547, 1991.
- [105] Peter Tyrer, A Ruth Foxwell, Allan W Cripps, Michael A Apicella, and Jennelle M Kyd. Microbial pattern recognition receptors mediate m-cell uptake of a gram-negative bacterium. *Infect Immun*, 74(1):625–631, 2006.
- [106] Peter C Tyrer, A Ruth Foxwell, Jennelle M Kyd, Diana C Otczyk, and Allan W Cripps. Receptor mediated targeting of m-cells. *Vaccine*, 25(16):3204–3209, 2007.
- [107] R Varona, R Villares, L Carramolino, I Goya, A Zaballos, J Gutierrez, M Torres, C Martinez-A, and G Marquez. Ccr6-deficient mice have impaired leukocyte homeostasis and altered contact hypersensitivity and delayed-type hypersensitivity responses. *J Clin Invest*, 107(6):R37–45, 2001.
- [108] Dorothee Viemann, Matthias Goebeler, Sybille Schmid, Kerstin Klimmek, Clemens Sorg, Stephan Ludwig, and Johannes Roth. Transcriptional profiling of ikk2/nf-kappa b- and p38 map kinase-dependent gene expression in tnf-alpha-stimulated primary human endothelial cells. *Blood*, 103(9):3365–3373, 2004.
- [109] L G Visser, P S Hiemstra, M T van den Barselaar, P A Ballieux, and R van Furth. Role of yada in resistance to killing of yersinia enterocolitica by antimicrobial polypeptides of human granulocytes. *Infect Immun*, 64(5):1653–1658, 1996.
- [110] M R Wachtel and V L Miller. In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of yersinia enterocolitica. *Infect Immun*, 63(7):2541–2548, 1995.
- [111] G Wauters, K Kandolo, and M Janssens. Revised biogrouping scheme of yersinia enterocolitica. *Contrib Microbiol Immunol*, 9:14–21, 1987.
- [112] H L Weiner. Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of th3-type tgfbeta-secreting regulatory cells. *Microbes Infect*, 3(11):947–954, 2001.
- [113] Ifor R Williams. Chemokine receptors and leukocyte trafficking in the mucosal immune system. *Immunol Res*, 29(1-3):283–292, 2004.

- [114] Z Buket Yilmaz, Debra S Weih, Vallabhapurapu Sivakumar, and Falk Weih. Relb is required for peyer's patch development: differential regulation of p52-relb by lymphotoxin and tnf. *EMBO J*, 22(1):121–130, 2003.
- [115] Xinyan Zhao, Ayuko Sato, Charles S Dela Cruz, Melissa Linehan, Andreas Luegering, Torsten Kucharzik, Aiko-Konno Shirakawa, Gabriel Marquez, Joshua M Farber, Ifor Williams, and Akiko Iwasaki. Ccl9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region peyer's patch cd11b+ dendritic cells. *J Immunol*, 171(6):2797–2803, 2003.

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik B
Domagkstraße 3a

48129 Münster

total 96
2005 68

Veterinär- und Lebensmittel-
überwachungsamt

MS-Roxel, Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:
Frau Feldkamp
Zimmer: 105
Telefon: 02534/971 - 304
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
feldkamp@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:

Mein Zeichen:
39.32.5.4

Münster,
26.12.2004

Tierschutz

Tierversuch: G 85/2004

Versuchsleiter: PD Dr. Torsten Kucharzik

Stellvertreter: Dr. Andreas Lügering

Sehr geehrter Herr Dr. Kucharzik,

gemäß § 11 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der z.Z. gültigen Fassung erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von

96 Mäusen für das Versuchsvorhaben.

Diese Erlaubnis ergeht unter folgenden Nebenbestimmungen:

1. Die Tiere werden im S2-Tierstall der Medizinischen Mikrobiologie des Universitätsklinikums Münster, Domagkstraße 10, 48149 Münster gehalten.
2. Treten bei der Zucht von gentechnisch veränderten Tieren Anomalien auf, die besondere Haltungsbedingungen erforderlich machen, ist dieses dem Veterinäramt der Stadt Münster umgehend mitzuteilen.
3. Es ist dafür zu sorgen, dass den Tieren - ihrer Art entsprechend - ausreichende Beschäftigungsmöglichkeiten geboten werden.
4. Es ist ein Tierbestandsbuch zu führen. Sie haben über die Herkunft und den Verbleib der Tiere Aufzeichnungen zu machen und diese drei Jahre lang aufzubewahren. Außerdem sind die Tiere zu kennzeichnen.
5. Die Verantwortung für die Haltung, Unterbringung und Pflege der Tiere liegt bei Ihnen. Bei einem Wechsel der verantwortlichen Person erlischt diese Erlaubnis.
6. Für die Pflege und Betreuung sind die Tierpfleger des S2-Tierstalls in der Medizinischen Mikrobiologie Herr Olaf Schütt und Frau Sonja Jansen benannt.

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 1 36-461	(BLZ 440 100 46)	Dresdner Bank Münster
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 305 100	(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster eG
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 306 002	(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00	(BLZ 400 400 28)
Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 80)
Kto.-Nr. 606 465 600	(BLZ 400 800 40)
Kto.-Nr. 4 200 800	(BLZ 401 600 50)
Kto.-Nr. 61 226	(BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

• Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J *0251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de

7. Die medizinische Versorgung der Tiere hat durch Herrn Dr. M. Lücke, Leiter der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Münster (ZTE), zu erfolgen. Über die Haltung ist er ebenfalls zu informieren.
8. **Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei der Tierart und der Tierzahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.**
9. Für den Fall von erheblichen oder wiederholten Verstößen gegen die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behalte ich mir den Widerruf dieser Erlaubnis vor.
10. Die nachträgliche Aufnahme, Änderung und Ergänzung von Nebenbestimmungen behalte ich mir vor.
11. Diese Genehmigung gilt für die Versuchsdauer, längstens jedoch bis zum 30.11.2007.

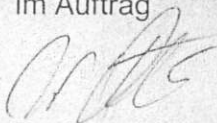
Hinweis:

Bei Arbeiten mit genmanipulierten Tieren müssen die Vorschriften nach dem Gentechnikrecht eingehalten werden.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diese Erlaubnis können Sie innerhalb eines Monats, nachdem Ihnen die Erlaubnis bekannt gegeben worden ist, schriftlich oder zur Niederschrift bei dem Oberbürgermeister der Stadt Münster (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, 48127 Münster) Widerspruch erheben. Der Nachbriefkasten befindet sich am Stadthaus I, Klemensstraße 10. Sie können den Widerspruch auch direkt beim Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt (Postanschrift: Der Oberbürgermeister, Amt 39, 48127 Münster, Hausanschrift: Schelmenstiege 1, 48161 Münster) erheben.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag



Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

PD Dr. med. Torsten Kucharzik

Herrn

Dr. med. Andreas Lügering

Medizinische Klinik und Poliklinik B

Universitätsklinikum Münster

Domagkstr. 3a

48129 Münster

Dienstgebäude:
Domplatz 1 - 3
48143 Münster
Telefon: 0251 411-0
Durchwahl: 411-2104
Telefax: 411-
Raum: 431
Auskunft erteilt:
Kerstin Stichling
E-Mail:
dez50@bezreg-muenster.nrw.de
Aktenzeichen:
50.0835.1.0 (G 85/2004)

20. Dezember 2004

Tierschutz;

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Ihr Antrag vom November 2004

Genehmigungsbescheid

Sehr geehrter Herr Dr. Kucharzik,
sehr geehrter Herr Dr. Lügering,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) in der zur Zeit geltenden Fassung, wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

„Der Infektionsverlauf des enteropathogenen Erregers *Yersinia enterocolitica* soll die Bedeutung des Chemokinrezeptors CCR6 für die Entwicklung des gastrointestinalen Immunsystems und seiner Immunantworten sowie die Bedeutung dieses Rezeptors im Hinblick auf entzündliche Darmerkrankungen näher charakterisieren.“

Diese Genehmigung gilt bis zum **30. November 2007**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

96 Mäuse.

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
PD Dr. med. Torsten Kucharzik
Medizinische Klinik und Poliklinik B
Universitätsklinikum Münster
Domagkstr. 3a
48129 Münster

Herr
Dr. med. Andreas Lügering
Medizinische Klinik und Poliklinik B
Universitätsklinikum Münster
Domagkstr. 3a
48129 Münster

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

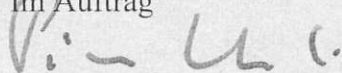
Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Der Mit Antragsteller, Herr PD Dr. med. Torsten Kucharzik, erhält eine gleichlautende Ausfertigung dieses Bescheides.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Piontkowski