

**Die Bedeutung von angeborenen
Effektorzellen während einer Typ 2
Immunantwort**

**Funktionelle Charakterisierung von eosinophilen und
basophilen Granulozyten**

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München



vorgelegt von

Caspar Ohnmacht

München, 23. Februar 2009

Meiner Familie

Erstgutachterin: PD Dr. C. Falk
Zweitgutachterin: Prof. Dr. E. Weiß
Betreuer der Arbeit: PD Dr. D. Vöhringer
(Sondergutachter)

Tag der mündlichen Prüfung: 15.10.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	7
1	SUMMARY	8
2	EINLEITUNG.....	9
2.1	Einführung in das Immunsystem	9
2.2	Die Differenzierung von T-Helferzellen.....	10
2.3	Die Th2-Immunantwort	11
2.4	Wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems während einer Th2-Immunantwort	13
2.4.1	Dendritische Zellen.....	13
2.4.2	Eosinophile Granulozyten.....	14
2.4.3	Basophile Granulozyten.....	16
2.4.4	Mastzellen.....	19
2.5	Infektionen mit Nematoden.....	20
2.5.1	Das <i>Nippostrongylus brasiliensis</i> (<i>N. brasiliensis</i>) – Infektionsmodell	21
2.5.2	Weitere Modelle zum Studium von Th2-Immunantworten.....	22
2.6	Zielsetzung der Arbeit.....	24
3	MATERIAL UND METHODEN.....	26
3.1	Material	26
3.1.1	Chemikalien	26
3.1.2	Geräte.....	26
3.1.3	Pufferlösungen und Zellkulturmedien	27
3.1.4	Mausstämme	28
3.2	Methoden	31
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	31

3.2.1.1	RNA-Isolierung und semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	31
3.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
3.2.1.3	Herstellung von Interleukin 3-kodierenden Retroviren	32
3.2.1.4	Retrovirale Transduktion von T-Zellen	32
3.2.2	Zell- und immunbiologische Methoden.....	33
3.2.2.1	<i>Nippostrongylus brasiliensis</i> Infektionen	33
3.2.2.2	Herstellung von NEX _{L3} - und NES _{L3} -Extrakten.....	33
3.2.2.3	Organentnahme und Herstellung von Einzelzellsuspensionen ...	34
3.2.2.4	Zelllinien und Knochenmarkskulturen	37
3.2.2.5	Magnetische Zellseparation (MACS)	37
3.2.2.6	Durchflusszytometrie (FACS)	38
3.2.2.7	5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)-Färbung	39
3.2.2.8	Analyse der Zellmorphologie	39
3.2.2.9	Immunfluoreszenzfärbungen von Geweben	40
3.2.2.10	Adoptiver Transfer und Depletion verschiedener Zellpopulationen	42
3.2.2.11	Stimulation basophiler Granulozyten und Bestimmung der Degranulation.....	44
3.2.2.12	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA).....	44
3.2.2.13	Statistiken.....	45
4	ERGEBNISSE	46
4.1	<i>In vivo</i> Untersuchungen zur Homöostase und Wanderung eosinophiler Granulozyten	46
4.1.1	Die Akkumulation eosinophiler Granulozyten nach einer <i>N.</i> <i>brasiliensis</i> -Infektion beruht auf einem verlängerten Überleben in peripheren Geweben	46
4.1.2	Das Peritoneum dient als Reservoir für reife eosinophile Granulozyten	50

4.2	Untersuchungen zur Effektorfunktion und Homöostase basophiler Granulozyten	53
4.2.1	Differenzierung und Entwicklung von basophilen Granulozyten	53
4.2.2	Basophile Granulozyten gehören zu den ersten IL-4-exprimierenden Zellen und überleben etwa 60 Stunden.....	56
4.2.3	Lokalisierung von Zellen des angeborenen Immunsystems während einer <i>N. brasiliensis</i> -Infektion.....	58
4.2.4	Effektorfunktionen von basophilen Granulozyten.....	60
4.2.5	Basophile Granulozyten fördern die Eosinophilie und tragen zur Eliminierung von <i>N. brasiliensis</i> bei	62
4.2.6	Mastzellen und basophile Granulozyten in c-Kit ^{W-sh} -Mäusen.....	67
4.2.7	c-Kit ^{W-sh} -Mäuse haben niedrigere IgE-Spiegel und zeigen eine verzögerte Eliminierung von <i>N. brasiliensis</i>	69
4.2.8	Basophile Granulozyten sind entscheidend an der Eliminierung von <i>N. brasiliensis</i> während einer Gedächtnisantwort beteiligt	71
4.3	Die Rolle von dendritischen Zellen für die Entwicklung einer Th2-Immunantwort	73
5	DISKUSSION.....	76
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
7	GLOSSAR	91
8	ANHANG	93
9	REFERENZEN	96
10	CURRICULUM VITAE.....	107
11	DANKSAGUNG	110

1 ZUSAMMENFASSUNG

Wurminfektionen und allergische Reaktionen sind mit einer starken Zunahme von Interleukin-4 (IL-4)-produzierenden Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems assoziiert. In dieser Arbeit wurden einige grundlegende Eigenschaften IL-4-produzierender Zellen des angeborenen Immunsystems untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Zunahme eosinophiler und basophiler Granulozyten nach Infektion mit dem gastrointestinalen Nematoden *Nippostrongylus brasiliensis* auf unterschiedliche Art reguliert wird: Basophile Granulozyten nehmen durch eine erhöhte *de novo* Bildungsrate im Knochenmark zu, während die Anzahl eosinophiler Granulozyten durch eine erniedrigte Apoptoserate in peripheren Organen erhöht wird.

Durch Immunfluoreszenzfärbungen *N. brasiliensis*-infizierter Mäuse konnte hier erstmals gezeigt werden, dass sich beide Zelltypen in der roten Pulpa der Milz nahe der Marginalzone ansammeln, während Mastzellen im Marginalsinus lokalisiert sind. Ferner wurde eine Zunahme eosinophiler und basophiler Granulozyten in der Lamina propria des Dünndarms und in der Lunge festgestellt, wobei basophile Granulozyten gleichmäßig verteilt im Parenchym der Lunge vorliegen, während eosinophile Granulozyten hauptsächlich in perivaskulären und peribronchialen Bereichen lokalisiert sind.

Die funktionelle Charakterisierung von basophilen Granulozyten zeigte, dass diese durch sekretorische Produkte von *N. brasiliensis*-Larven aktiviert werden können, wenn sie zuvor mit Serum infizierter Mäuse sensibilisiert worden waren. Zudem können basophile Granulozyten die alternative Aktivierung von Makrophagen veranlassen und die Zunahme eosinophiler Granulozyten *in vivo* verstärken. Die Depletion von basophilen Granulozyten zeigte, dass sie an der Eliminierung einer primären und sekundären *N. brasiliensis*-Infektion entscheidend beteiligt sind. Des Weiteren konnte die Bedeutung von dendritischen Zellen (DC) durch Verwendung von genetisch DC-defizienten Mäusen für die Initiierung einer effizienten Immunantwort gegen *N. brasiliensis* bewiesen werden. Die hier vorgestellten Ergebnisse unterstreichen die entscheidende Rolle von Zellen des angeborenen Immunsystems bei einer Th2-Immunantwort und könnten somit auch zum besseren Verständnis von Th2-assoziierten Krankheitsbildern beitragen.

1 SUMMARY

Worm infections and allergic diseases are associated with a strong increase of interleukin 4 (IL-4)-producing cells of the innate and the adaptive immune system. Since basophils and eosinophils constitute the main IL-4-producing cells of the innate immune system, some basic features of these cells were analyzed. The accumulation of both cell types during infection with the gastrointestinal helminth *N. brasiliensis* is regulated differently: basophil numbers increase due to a higher *de novo* generation rate in the bone marrow whereas eosinophils accumulate due to a prolonged survival in the periphery.

We can show for the first time by immune fluorescence staining that both cell types can be identified in the red pulp close to the marginal zone in the spleen of *N. brasiliensis* infected mice whereas mast cells localize within the marginal sinus. All mentioned cell types accumulate in the lamina propria of the small intestine and in the lung. Basophils are distributed throughout the whole lung parenchyma while eosinophils localize preferentially in perivascular and peribronchial regions.

Functional analysis revealed that basophils can be activated by secretory products of *N. brasiliensis* larvae when they have been sensitized with serum of infected mice. Basophils can also promote the alternative activation of macrophages and amplify eosinophilia *in vivo*. Depletion of basophils indicated that this cell type contributes to worm expulsion during first and secondary infections. Additionally, we could demonstrate by using genetically DC-deficient mice that DCs are required for the induction of an efficient immune response against *N. brasiliensis*. The presented results emphasize the important role of cells of the innate immune system for a Th2 immune response and thereby contribute to a better understanding of Th2-associated diseases.

2 EINLEITUNG

2.1 Einführung in das Immunsystem

Das Immunsystem hat sich entwickelt, um Organismen vor Krankheiten zu schützen, welche durch zahlreiche Pathogene verursacht werden können. Da die Variabilität dieser Pathogene wie z.B. Viren, Bakterien sowie uni- und multizellulärer Parasiten sehr hoch ist, hat das Immunsystem verschiedene Systeme entwickelt, um auf die unterschiedlichen Erreger reagieren zu können. Man unterscheidet das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem hat sich vermutlich viel früher entwickelt, da Teile seiner Komponenten wie z.B. die sogenannten „Toll-like“- Rezeptoren (TLR) auch in Invertebraten und sogar Pflanzen gefunden werden (Ferrandon et al., 2007; Ryan et al., 2007). Neben den löslichen Komponenten des angeborenen Immunsystems, wie z.B. dem Komplementsystem, bilden natürliche Killerzellen (NK-Zellen), Granulozyten und Makrophagen einen wichtigen Teil des zellulären angeborenen Immunsystems. Das Erkennen von potentiellen Pathogenen ist in diesen Zellen auf Keimbahn-kodierte Rezeptoren beschränkt, welche die Anwesenheit von sogenannten „PAMPs“ (*pathogen-associated molecular patterns*) erkennen. Nach Aktivierung setzen sie eine Reihe von Enzymen, Zytokinen und Chemokinen frei, welche dann rasch eine erste Verteidigungslinie aufbauen. Jedoch gibt es immer mehr Hinweise, dass Teile des angeborenen Immunsystems auch adaptive Immunantworten beeinflussen können (Fearon and Locksley, 1996).

Das adaptive Immunsystem kann in einen zellulären und einen humoralen Teil unterteilt werden. Zytolytische T-Lymphozyten (CD8⁺ T-Zellen) und T-Helferzellen (CD4⁺ T-Zellen) bilden dabei den zellulären Teil. B-Lymphozyten besitzen die Fähigkeit, in Antikörper-produzierende Plasmazellen differenzieren zu können. Sie stellen den humoralen Teil des adaptiven Immunsystems dar. Die Hauptvorteile des adaptiven Immunsystems sind einerseits nicht-Keimbahn-kodierte Rezeptoren, welche eine riesige Variabilität besitzen, und andererseits die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis aufzubauen. B- und T-Zell-Rezeptoren werden zufällig aus verschiedenen Gensegmenten

durch somatische Rekombination rearrangiert und sind daher nicht direkt in der Keimbahn fixiert. B-Zellen erkennen Antigene direkt mit ihrem B-Zell-Rezeptor (BCR), während T-Zellen nur Peptide von Antigenen erkennen, welche von Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) auf der Oberfläche von speziellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) präsentiert werden. Der Begriff Antigen bezeichnet allgemein Moleküle, welche eine Immunantwort auslösen können. $CD4^+$ T-Helferzellen erkennen nur Peptide, welche von MHC-II Molekülen präsentiert werden, während zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen nur MHC-I-präsentierte Antigene erkennen und die APC daraufhin lysieren.

Das Immunsystem besteht aus primären und sekundären lymphoiden Organen. In den primären lymphoiden Organen wie Knochenmark und Thymus werden alle Lymphozyten gebildet. In den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten, Milz, Peyer'sche Plaques oder Mukosa-assoziiertes lymphoides Gewebe werden adaptive Immunantworten ausgelöst.

2.2 Die Differenzierung von T-Helferzellen

Naive $CD4^+$ T-Helferzellen können nach der Erkennung eines Antigens in funktionell unterschiedliche Zelltypen differenzieren. Diese Differenzierung bestimmt den Typ der ausgelösten adaptiven Immunantwort und entscheidet daher mit, ob eine Infektion erfolgreich bekämpft werden kann. Klassischerweise teilt man $CD4^+$ T-Effektorzellen entweder in T-Helferzellen des Typs I (Th1) oder T-Helferzellen des Typs II (Th2) ein (Mosmann and Coffman, 1989). Die Einteilung basiert auf dem Expressionsprofil der sezernierten Zytokine. Th1-Zellen werden über die Expression von $IFN-\gamma$ definiert und sollen vor allem die Eliminierung intrazellulärer Pathogene verstärken. Th1-Zellen können außerdem in B-Zellen einen Immunglobulin-Klassenwechsel zu IgG2a und IgG3 induzieren. Diese Antikörper können Viren neutralisieren und an Bakterien binden, womit gleichzeitig auch Phagozyten aktiviert werden können. Th2-Zellen werden durch die Expression von IL-4, IL-5 und IL-13 charakterisiert und scheinen bei der Eliminierung von Parasiten beteiligt zu sein. Allerdings können sie auch zur Entwicklung

von Krankheiten wie Allergien und Asthma beitragen. Sezerniertes IL-4 und IL-13 von Th2-Zellen induziert in B-Zellen einen Klassenwechsel zur Produktion von IgG1 und IgE Antikörpern, welche wiederum an Oberflächenrezeptoren von angeborenen Effektorzellen wie basophile Granulozyten und Mastzellen binden können. Beachtenswert hierbei ist, dass IFN- γ und IL-4 als sogenannte „Signatur-Zytokine“ des jeweiligen polarisierten Zelltyps die eingeleitete Differenzierung weiter verstärken und eine mögliche Differenzierung in die entgegengesetzte Richtung durch positive und negative Rückkopplungsschleifen unterdrücken (Murphy and Reiner, 2002; Szabo et al., 2000; Zheng and Flavell, 1997).

Neuere Studien deuten auf eine dritte Linie von T-Helferzellen hin, welche als charakteristisches Merkmal IL-17 produzieren und deren Differenzierung von dem Transkriptionsfaktor ROR γ abhängt (Harrington et al., 2005; Ivanov et al., 2006). Diese Th17-Zellen tragen zur Immunität gegen Hefen und Bakterien bei (Acosta-Rodriguez et al., 2007; Mangan et al., 2006), können allerdings auch schwere Autoimmunkrankheiten auslösen (Langrish et al., 2005). Der vierte T-Helferzelltyp, die regulatorischen T-Zellen (T_{regs}), wird über die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 definiert (Fontenot et al., 2003). T_{regs} sind ein Teil der peripheren Toleranzmechanismen und verhindern sowohl eine überschießende Immunantwort, können allerdings auch autoimmune T-Zellen, welche der negativen Selektion im Thymus entkommen sind, sowie Zellen des angeborenen Immunsystems in ihrer Aktivität unterdrücken (von Herrath and Harrison, 2003). Jedoch können T_{regs} auch erwünschte Immunantworten wie z.B. gegen Tumore oder Pathogene unterdrücken (Belkaid and Rouse, 2005). Daher wird heutzutage versucht, eine Repolarisierung von T-Helferzellen bei überschießenden Immunantworten oder Autoimmunkrankheiten therapeutisch zu nutzen.

2.3 Die Th2-Immunantwort

Immunantworten des Typs 2 (im Folgenden Th2-Immunantworten) sind charakterisiert durch die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Helferzellen zu Th2-Zellen und beinhalten auch die Aktivierung von Komponenten des angeborenen Immunsystems. Th2-

Immunantworten können durch eine Reihe von Parasiten induziert werden. Unkontrollierte Th2-Immunantworten gegen harmlose Moleküle führen allerdings zur Entwicklung von Allergien, allergischem Asthma und anderen Hypersensibilitätsreaktionen. Charakteristisch für solch eine Th2-Immunantwort sind IL-4-sezernierende CD4⁺ T-Helferzellen, hohe IgE-Spiegel im Serum, sowie eine lokale oder systemische Anreicherung von eosinophilen Granulozyten (Eosinophilie). Je nach Art der Reaktion kann es auch zu einer Akkumulation basophiler Granulozyten (Basophilie) und Mastzellen (Mastozytose), sowie einer vermehrten Schleimproduktion in den betroffenen Geweben kommen. Die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Helferzellen zu Th2-Zellen beruht auf IL-4-abhängigen Signalwegen und der Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat6 (Hou et al., 1994). Dadurch wird der Transkriptionsfaktor Gata-3 exprimiert, welcher die weitere Th2-Differenzierung fördert und die reziproke Th1-Differenzierung unterdrückt (Ouyang et al., 1998; Zheng and Flavell, 1997). Allerdings ist noch unklar, welcher Zelltyp das ursprüngliche IL-4 sezerniert und damit die Differenzierung von Th2-Zellen einleitet. Es wurde gezeigt, dass CD4⁺ T-Helferzellen während der Primärinfektion oder der Sensitivierungsphase von Überempfindlichkeitsreaktionen entscheidend sind, da sie B-Zellen aktivieren und damit auch eine humorale Immunantwort initiieren können. Dabei induzieren Th2-Zellen in B-Zellen einen Klassenwechsel zur Produktion von IgG1 - und IgE Antikörpern, welche an die Fc-Rezeptoren FcγRIII und FcεRI von basophilen Granulozyten und Mastzellen binden können und daher ein Verbindungsglied zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem während einer Th2-Immunantwort darstellen. Jedoch fördern Th2-Zellen auch direkt weitere Effektormechanismen, indem sie Chemokine ausschütten, welche wiederum andere Leukozyten anlocken können. Des Weiteren wirken die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, welche ebenfalls von Th2-Zellen sezerniert werden, auch direkt auf glatte Muskelzellen, sowie epitheliale und mukosale Zellschichten (Dabbagh et al., 1999; Wills-Karp et al., 1998), oder fördern, im Fall von IL-3 und IL-5, die Ausreifung und das Überleben von basophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie von Mastzellen (Dent et al., 1990; Lantz et al., 1998). Da die Biologie von Granulozyten zentrale Themen dieser Arbeit sind, werden sie in separaten Kapiteln eingeführt.

2.4 Wichtige Zelltypen des angeborenen Immunsystems für eine Th2-Immunantwort

Granulozyten und dendritische Zellen (DCs) entwickeln sich wie alle Zellen des Immunsystems von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle. Diese Stammzelle bildet entweder eine Vorläuferzelle für alle lymphoiden Zellen, aus welcher sich z.B. T-Zellen und B-Zellen entwickeln, oder eine myeloide Vorläuferzelle, aus der sich unter anderem Granulozyten entwickeln können (Akashi et al., 2000). Bisher ist noch nicht abschließend geklärt, ob es einen gemeinsamen Vorläuferzelltyp für alle Granulozyten gibt, bzw. ab welchem Differenzierungsstadium eine Granulozytenzelllinie auf ihr Entwicklungsprogramm festgelegt ist. Von DCs existieren unterschiedliche Subpopulationen, welche sich entweder aus der lymphoiden Linie oder der myeloiden Linie entwickeln können.

2.4.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen sind als APCs entscheidend an der Auslösung einer adaptiven Immunantwort beteiligt und haben sehr wahrscheinlich auch eine große Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der zentralen Toleranz von T-Zellen. DCs können durch verschiedene „Gefahrensignale“ aktiviert werden, woraufhin diese die Expression von MHC-II und diverser kostimulatorischer Moleküle verstärken, um anschließend CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren. Die Art der Aktivierung von DCs entscheidet dabei mit, welches Zytokinmuster DCs exprimieren. So induzieren die meisten Liganden von TLR die Expression von IL-1, IL-6, IL-12 und IL-23 (Kapsenberg, 2003). Daher fördern TLR-aktivierte DCs die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th1-Zellen. Im Gegensatz dazu induziert die Aktivierung von DCs durch *thymic stromal lymphopoietin* (TSLP) eher ein Zytokinexpressionsmuster in DCs, welches die nachfolgende Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Zellen erlaubt (Liu et al., 2007). TSLP wird hauptsächlich von Epithelzellen in Lunge, Haut und Darm exprimiert. Interessanterweise können auch aktivierte basophile Granulozyten unter bestimmten

Umständen TSLP exprimieren (Sokol et al., 2008). Der genaue Wirkmechanismus von TSLP auf DCs ist bis heute allerdings noch unbekannt.

Daneben entscheiden auch *Notch*-vermittelte Signalwege über die Differenzierung von DC-aktivierten CD4⁺ T-Zellen. So konnte gezeigt werden, dass von den beiden *Notch*-Ligand-Familien die Aktivierung von *Delta*-abhängigen Signalwegen eine Th1-Differenzierung einleitet, während die Aktivierung von *Jagged*-abhängigen Signalwegen zur alternativen Th2-Differenzierung von T-Helferzellen führt (Amsen et al., 2004; Tanigaki et al., 2004). Die Expression der Liganden für *Notch* kann auf APCs, insbesondere DCs, durch Th1- oder Th2-fördernde Stimuli ausgelöst werden. Interessanterweise ist die *Jagged*-vermittelte Th2-Differenzierung unabhängig von der Expression des Transkriptionsfaktors Stat6. Stattdessen induziert *Jagged* direkt den Transkriptionsfaktor Gata-3 und reguliert auch die Expression des *il4* Gens (Amsen et al., 2004). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass DCs naive CD4⁺ T-Zellen durch Präsentation von (Fremd-) Peptiden in MHC-II Molekülen aktivieren, wobei sie die Polarisierung der CD4⁺ T-Zellen abhängig von den zuvor erhaltenen Stimuli beeinflussen können.

2.4.2 Eosinophile Granulozyten

Unreife eosinophile Granulozyten können schon in der fötalen Leber der Maus am Tag 16,5 der Embryonalentwicklung gefunden werden. Sie sind eine der ersten Zellen in dem sich entwickelnden Immunsystem, welche das IL-4 Transkript exprimieren. Diese unreifen eosinophilen Granulozyten können das gesamte Eosinophil-Kompartiment in bestrahlten Mäusen erneuern und stellen daher einen potentiellen Vorläuferzelltyp dar, welcher bereits auf die Eosinophilen-Linie festgelegt ist (Voehringer et al., 2007). Die adulte Eosinophilopoese findet im Knochenmark statt und wird von der Expression der Transkriptionsfaktoren Gata-1, PU.1 und c/EBP reguliert (McNagny and Graf, 2002). Dabei scheint die Expression von Gata-1 für die Eosinophilen-Linie essentiell zu sein, da die Deletion einer hochaffinen Bindungsstelle für Gata-1 proximal des *gata-1* Promotors zu einem vollständigen und selektiven Verlust der Eosinophilen-Linie führt (Yu et al., 2002). IL-5 ist für die Reifung und das Überleben von eosinophilen Granulozyten und

damit für die Entwicklung einer Eosinophilie von entscheidender Bedeutung. Tatsächlich konnte kürzlich eine für eosinophile Granulozyten spezifische Vorläuferpopulation in adultem, humanem Knochenmark identifiziert werden, welche sich von anderen Vorläuferpopulationen durch Expression des IL-5 Rezeptors unterscheidet (Mori et al., 2009). Jedoch scheint IL-5 nicht absolut notwendig für die Entwicklung zu sein, da IL-5-defiziente Mäuse unter homöostatischen Bedingungen eine normale Anzahl an eosinophilen Granulozyten aufweisen (Kopf et al., 1996). Umgekehrt zeigen Mäuse, welche IL-5 überexprimieren, eine massive, systemische Eosinophilie (Dent et al., 1990). Zudem gibt es Hinweise, dass auch IL-3 und GM-CSF zur Entwicklung eosinophiler Granulozyten beitragen.

Reife eosinophile Granulozyten besitzen charakteristische Granula, welche eine Reihe an vorgefertigten kationischen Proteinen wie z.B. „major basic protein“ (MBP), „eosinophil cationic protein“ (ECP), „eosinophil peroxidase“ (EPO) und „eosinophil-derived neurotoxin“ (EDN) besitzen. Die Funktionen dieser Proteine reichen von direkt zytotoxischen (MBP, EPO, ECP), über antivirale (ECP, EDN), bis hin zu immunmodulierenden Effekten (ECP) (Rothenberg and Hogan, 2006). MBP und ECP können auch direkt die Schleimproduktion in den Atemwegen oder die Kontraktion der glatten Muskulatur, sowie die Degranulation anderer Granulozyten und Mastzellen beeinflussen (Venge et al., 1999; Zheutlin et al., 1984). EPO katalysiert die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen („reactive oxygen species“ ROS), welche oxidativen Stress und damit Zelltod durch Nekrose oder Apoptose auslösen können (MacPherson et al., 2001). Zusätzlich können eosinophile Granulozyten auch Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-12 sezernieren, welche wiederum die Proliferation, die Aktivierung oder die Th1/Th2-Polarisierung von T-Zellen beeinflusst (MacKenzie et al., 2001).

Die Funktionen von eosinophilen Granulozyten sind am besten unter Th2-Bedingungen untersucht, da eine Eosinophilie hauptsächlich unter klassischen Th2-Bedingungen beobachtet wurde. Interessanterweise sezernieren eosinophile Granulozyten nur relativ wenig IL-4 im Vergleich zu basophilen Granulozyten und T-Zellen, obwohl sie über einen offenen IL-4 Locus verfügen, von welchem IL-4 mRNA transkribiert wird (Shinkai et al., 2002; Voehringer et al., 2004).

Reife eosinophile Granulozyten zirkulieren durch den gesamten Körper und können in Blut, Milz, Lymphknoten, Peyer'schen Plaques, im Thymus und im Peritoneum gefunden werden (Voehringer et al., 2007). Über die Lebensdauer dieses Zelltyps ist wenig bekannt, jedoch scheint IL-5 die Apoptose von eosinophilen Granulozyten zu verhindern und damit deren Homöostase regulieren zu können (Simon, 2001). Eosinophile Granulozyten werden durch chemotaktisch wirksame Substanzen wie Zytokine (IL-5), Chemokine (CCL11 und CCL5) und Lipide (Leukotrien B4 (LTB4), LTC4, LTD4, LTE4 und Prostaglandin D2) in entzündete Gewebe rekrutiert, wo sie dann lokal nach Aktivierung degranulieren und ihre Effektorfunktion ausüben (Rothenberg and Hogan, 2006).

Zur Zeit sind zwei genetisch Eosinophil-defiziente Mausstämme bekannt, um die Funktion eosinophiler Granulozyten *in vivo* zu studieren: 1) Δ dbl/GATA-Mäuse, welche die bereits beschriebene Deletion der Gata-1 Bindungsstelle im proximalen *gata-1* Promotor haben (Yu et al., 2002) und 2) PHIL-Mäuse, in welchen Diphterietoxin A unter Kontrolle des Eosinophil-spezifischen EPO Promotors exprimiert wird (Lee et al., 2004).

2.4.3 Basophile Granulozyten

Basophile Granulozyten wurden bereits im Jahr 1879 von Paul Ehrlich identifiziert, spielten jedoch lange Zeit in der Wissenschaft nur eine untergeordnete Rolle. Die Gründe hierfür liegen am Fehlen von spezifischen Oberflächenmarkern und ihrer geringen Frequenz innerhalb der Lymphozyten. Außerdem sind bis heute keine Mäuse verfügbar, welche aufgrund genetischer Modifikationen keine basophilen Granulozyten besitzen. Über ihre frühe Entwicklung ist relativ wenig bekannt, kürzlich konnte jedoch ein potentieller Vorläuferzelltyp im Knochenmark isoliert werden. Für dessen Entwicklung scheint der Transkriptionsfaktor *c/EBP α* essentiell zu sein, jedoch ist die Enddifferenzierung von basophilen Granulozyten unabhängig von diesem Transkriptionsfaktor (Arinobu et al., 2005). Frühere Studien legten einen gemeinsamen Vorläufer für basophile Granulozyten und eosinophile Granulozyten nahe (Arock et al., 2002). Basophile Granulozyten sind funktionell eng mit Mastzellen verwandt, da sie in Nagern die einzigen Zellen sind, welche den hochaffinen Rezeptor für IgE (Fc ϵ RI)

exprimieren. Die Frage, ob es für diese beiden Zelltypen auch einen gemeinsamen Vorläuferzelltyp gibt, ist bis heute noch nicht abschließend geklärt. In der Milz scheint eine Vorläuferpopulation zu existieren, welche *ex vivo* sowohl zu Mastzellen als auch zu basophilen Granulozyten differenzieren kann (Arinobu et al., 2005). IL-3 scheint ein wichtiger Differenzierungs- und/oder Überlebensfaktor für basophile Granulozyten und damit entscheidend für die Entwicklung einer Basophilie zu sein (Valent et al., 1989b). Jedoch führt die komplette Abwesenheit von IL-3 nicht zu einem Stopp in der Differenzierung von basophilen Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen (Lantz et al., 1998). Außerdem scheinen IL-5 und GM-CSF ein gewisses Potential zu besitzen, die Differenzierung dieses Zelltyps zu verstärken (Arock et al., 2002). Im Gegensatz zu Mastzellen verlassen basophile Granulozyten das Knochenmark als reife Zellen und halten sich unter nicht-inflammatorischen Bedingungen hauptsächlich im Blutkreislauf und in der Milz auf. Unter homöostatischen Bedingungen repräsentieren sie nur ca. 0,3% aller Leukozyten im Blut. Th2-Immunantworten aufgrund von Parasiteninfektionen oder allergischen Reaktionen können ihre Frequenz dramatisch erhöhen und führen auch zu einer Rekrutierung in bestimmte Gewebe wie z.B. die Lunge (Lantz et al., 1998; Voehringer et al., 2004). Bisher ist jedoch unbekannt, wie hoch die Lebensdauer von basophilen Granulozyten überhaupt ist und wo genau sie in verschiedenen Geweben lokalisiert sind.

Die Antigen-spezifische Aktivierung von basophilen Granulozyten erfolgt hauptsächlich über eine Kreuzvernetzung von FcεRI-gebundenem IgE durch ein multivalentes Antigen (Turner and Kinet, 1999). Die Bindung von nicht-kreuzvernetztem IgE an den FcεRI-Rezeptor kann allerdings die Expression des Rezeptors, sowie die Funktion und die Lebensdauer von Mastzellen und wohl auch basophilen Granulozyten regulieren (Kawakami and Galli, 2002). Kürzlich konnte in einem murinen Modell für systemische Anaphylaxis gezeigt werden, dass basophile Granulozyten auch durch IgG1 aktiviert werden können (Tsujiura et al., 2008). Außer durch Fc-Rezeptoren können basophile Granulozyten auch durch eine Vielzahl weiterer Moleküle wie Chemokine und Zytokine, sowie durch Allergene mit Protease-Aktivität aktiviert werden (Bischoff et al., 1992; Sokol et al., 2008; Valent et al., 1989a; Yoshimoto et al., 1999). Insbesondere IL-3 scheint die Stärke der Aktivierung von basophilen Granulozyten beträchtlich beeinflussen

zu können (Min, 2008). Die FcεRI-vermittelte Aktivierung führt zur Degranulation und damit zur Freisetzung einer ganzen Reihe an vorgefertigten biologisch aktiven Substanzen wie Serin-Proteasen und gefäßerweiternden Molekülen (z.B. Histamin). Außerdem kommt es zur *de novo* Synthese von Lipid-Mediatoren und zur Synthese und Sezernierung von Chemokinen und Zytokinen (Kawakami and Galli, 2002). Interessant ist dabei vor allem, dass basophile Granulozyten nach Aktivierung sehr rasch IL-4 und IL-13 sezernieren können (Seder et al., 1991). Dieses IL-4 kann dazu beitragen, den Isotyp-Klassenwechsel in Plasmazellen Richtung IgG1 und IgE einzuleiten. Tatsächlich ist schon länger bekannt, dass humane basophile Granulozyten in B-Zellen *in vitro* einen Immunglobulinklassenwechsel zu IgG1 und IgE in der Abwesenheit von T-Zell-Hilfe induzieren können (Gauchat et al., 1993). IL-4 von basophilen Granulozyten dient möglicherweise auch als initiales Zytokin für die T-Helferzellpolarisierung in Richtung Th2-Zelle, insbesondere bei Gedächtnisantworten, da in diesem Fall die Kreuzvernetzung von FcεRI-gebundenem, Antigen-spezifischem IgE zu einer raschen Aktivierung und somit zur IL-4-Sekretion führen kann (Khodoun et al., 2004). Lange Zeit wurde vermutet, dass die einzig „sinnvolle“ Funktion von basophilen Granulozyten ihre Fähigkeit sei, Parasiten zu bekämpfen, obwohl es hierfür keine direkten Beweise gab. Kürzlich hat man jedoch herausgefunden, dass basophile Granulozyten auch eine humorale Immunantwort verstärken können und so dazu beitragen, bakterielle Infektionen schneller und effektiver zu bekämpfen (Denzel et al., 2008). Allerdings scheinen basophile Granulozyten auch an der Entwicklung gewisser Krankheitsbilder beteiligt zu sein. So spielen sie vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von schwerem Asthma und bei der IgG-vermittelten Anaphylaxis (Koshino et al., 1993; Tsujimura et al., 2008).

Bis heute gibt es keine genetisch Basophil-defizienten Mäuse, um deren Funktion *in vivo* zu untersuchen. Die Antikörper-abhängige Depletion ist nur zeitlich begrenzt einsetzbar, da eine mehrmalige Gabe von Antikörpern zu der Bildung von Anti-Antikörpern und somit zur Neutralisation des verabreichten Antikörpers führt. Außerdem war diese Methode lange Zeit auf den Gebrauch von anti-FcεRI Antikörpern beschränkt, welche jedoch auch an Mastzellen binden und diese aktivieren und/oder depletieren können. Ferner ist es schwierig, basophile Granulozyten unter Bedingungen mit einer starken Basophilie (z.B. nach Primärinfektionen mit Wurmparasiten) zu depletieren, da hierbei

meist auch sehr viele Vorläuferzellen generiert werden, welche die depletierten Zellen sehr rasch ersetzen können. Seit kurzem können basophile Granulozyten jedoch selektiv mit Hilfe eines neu entwickelten anti-CD200R3 Antikörpers depletiert werden, womit deren Funktion *in vivo* untersucht werden kann (Obata et al., 2007). Allerdings wird mit diesem Antikörper auch CD200R3 auf Mastzellen aktiviert, was die Interpretation der Ergebnisse erheblich erschwert (Kojima et al., 2007).

2.4.4 Mastzellen

Mastzellen entwickeln sich wie alle anderen hämatopoetischen Zellen im Knochenmark. Im Vergleich zu eosinophilen und basophilen Granulozyten jedoch verlassen sie das Knochenmark als unreife Vorläuferzellen. Diese wandern in interstitielle Bindegewebe und die Submukosa ein und differenzieren dann lokal aus. Die Entwicklung der Mastzelllinie ist abhängig von einer starken Expression des Transkriptionsfaktors Gata-2, benötigt aber auch die Expression von Gata-1 (Harigae et al., 1998). Der wichtigste Differenzierungs- und/oder Überlebensfaktor für Mastzellen ist der Stammzellfaktor (SCF von *stem cell factor* oder auch KIT Ligand), welcher an den Rezeptor c-Kit bindet. Die Bedeutung von c-Kit wird auch durch verschiedene Mausstämme unterstrichen, welche aufgrund von Mutationen in einem regulatorischen Element des c-Kit-Promotors oder im c-Kit Gen selbst genetisch Mastzell-defizient sind (Grimbaldeston et al., 2005; Kitamura et al., 1978). Daneben beeinflussen auch eine Reihe von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren die Anzahl und den Phänotyp von Mastzellen. Dazu gehört in der Maus insbesondere IL-3, jedoch scheinen auch IL-4, IL-9 und TGF β 1 eine wichtige Rolle zu spielen (Kawakami and Galli, 2002).

Mastzellen lassen sich hauptsächlich in der Nähe von Oberflächen finden, welche der Umwelt exponiert sind wie z.B. Haut, Atemwege und Verdauungsorgane. Daher sind sie ähnlich wie dendritische Zellen ideal positioniert, um als eine der ersten Zellen Kontakt mit Umweltantigenen oder auch Allergenen herzustellen. Die Lebensdauer von Mastzellen beträgt mehrere Wochen, wobei sie sogar in der Lage sind, wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich nach entsprechender Stimulation erneut zu teilen (Kawakami and Galli, 2002; Kitamura et al., 1987). Daher kann neben einer verstärkten

Rekrutierung und lokalen Ausreifung auch die Proliferation *in situ* zu einer lokalen Anhäufung von Mastzellen (Mastozytose) führen. Solch eine lokale Mastozytose beruht in der Regel auf einer Infektion mit einem Parasiten, welcher eine klassische Th2-Immunantwort auslöst, oder auf einer chronischen Exposition zu einem Allergen (Ikeda et al., 2003; Uber et al., 1980).

Mastzellen exprimieren wie basophile Granulozyten den hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI). Nach Kreuzvernetzung durch ein multivalentes Antigen sezernieren Mastzellen sehr rasch ihre Granula und setzen eine Reihe an biologisch aktiven Substanzen frei (Galli et al., 2005; Kawakami and Galli, 2002). Die Reihe dieser Substanzen überschneidet sich mit der von basophilen Granulozyten, ist aber nicht ganz identisch. Diese Produkte können je nach Versuchsbedingungen eine entzündungsfördernde, entzündungshemmende oder immunsuppressive Funktion haben (Galli et al., 2008). Die bekanntesten Mediatoren von Mastzellen sind Histamin und Heparin, welche gefäßerweiternd und durchblutungsfördernd wirken. Aufgrund dieser Eigenschaften und der Lokalisierung in den umweltexponierten Organen eines Organismus (Haut, Darm) werden Mastzellen meist mit Überempfindlichkeitsreaktionen und asthmatischen Erkrankungen in Verbindung gebracht.

2.5 Infektionen mit Nematoden

Rund 25% der Bevölkerung weltweit ist ständig mit intestinalen Nematoden infiziert, was vornehmlich in Entwicklungsländern zu einer Reihe von Problemen wie Unterernährung, Anämie und Wachstumsverzögerungen führt. Ein Drittel aller Infektionen beruhen dabei auf einer Infektion mit Hakenwürmern. Diese blutsaugenden Würmer verankern sich in der Mukosa des Dünndarms, wo sie für mehrere Jahre überleben können. Weibliche Hakenwürmer können dabei bis zu 10000 Eier pro Tag produzieren. Bis heute wurde noch kein erfolgreicher Impfschutz gegen diese Parasiten entwickelt, was vor allem am fehlenden Verständnis der protektiven Effektormechanismen des Immunsystems gegen Helmintheninfektionen liegt. Nematoden (auch Rund- oder Fadenwürmer genannt) sind ein Stamm der Helminthen (parasitische Würmer). Nematoden zeichnen sich durch ihre

abgerundete Form ohne Segmente und ihre Getrenntgeschlechtlichkeit aus. Sie besitzen eine kompliziert aufgebaute Körperhülle (Integument) und können sich schlängelnd fortbewegen. Im Allgemeinen induzieren diese Parasiten eine starke Th2-Immunantwort, welche durch hohe IgE-Titer und eine Anreicherung von Th2 T-Zellen und Mastzellen, sowie von basophilen und eosinophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Welche Bedeutung den einzelnen Komponenten für die Beseitigung der Infektion zukommen, hängt sehr wahrscheinlich auch von der Biologie des jeweiligen Parasiten ab. Bei der Untersuchung der ausgelösten Immunantwort muss allerdings auch bedacht werden, dass Helminthen mit ihrem Wirt eine sehr lange Ko-Evolution verbindet, während derer Helminthen eine für ihr Überleben und Verbreitung günstige Modulation der Immunantwort des Wirts entwickeln konnten (Maizels and Yazdanbakhsh, 2003). Die Immunantwort des Wirts hingegen zielt auf eine effiziente Eliminierung der Parasiten bei möglichst geringer Schädigung des körpereigenen Gewebes.

2.5.1 Das *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*)- Infektionsmodell

Der natürliche Wirt des Nematoden *N. brasiliensis* ist die Ratte. In den 1970er Jahren wurde der Parasit auf die Maus adaptiert (Ogilvie and Jones, 1971), in der von adulten Parasiten jedoch keine lebensfähigen Eier produziert werden können. Adulte Würmer leben parasitisch im Dünndarm ihres Wirtes und produzieren dort Eier, welche mit dem Kot den Wirt verlassen. Aus diesen Eiern schlüpfen L1 Larven, welche sich nach zwei weiteren Häutungen in infektiöse L3 Larven entwickeln. In der Natur klettern Larven dieses Stadiums auf Grashalme und bohren sich dann aktiv durch die Haut von vorbeikommenden Nagetieren. Experimentell werden diese L3 Larven subkutan in den Rücken am Schwanzende einer Maus/Ratte gespritzt. Die Larven wandern mit dem Blutkreislauf in die sauerstoffreiche Lunge, treten in die Atemwegsgefäße ein und entwickeln sich dort bis zum Tag 4 nach Infektion zu L4 Larven. Daraufhin werden die Larven hochgehustet, um anschließend wieder verschluckt zu werden. Die Ausreifung zu adulten Würmern erfolgt von Tag 5-9 im Dünndarm. Während ihrer Entwicklung lösen

diese Helminthen zunächst in der Lunge und später im Dünndarm lokale Entzündungen aus. Dabei kommt es auch zu einer lokalen und systemischen Basophilie/Eosinophilie und zur Akkumulation von Th2-Zellen, sowie zu einem massiven Anstieg des IgE-Spiegels im Serum. Zeitlich etwas verzögert kommt es auch zu einer Mastozytose im Dünndarm. Die meisten Inzuchtmausstämme können gegen Primärinfektionen mit *N. brasiliensis* eine effektive Immunantwort generieren, wobei adulte Würmer binnen 9-10 Tagen eliminiert werden. Daneben entwickelt das Immunsystem auch einen protektiven Schutz gegen Sekundärinfektionen. Die Infektion mit *N. brasiliensis* ist eine der stärksten bekannten Stimulatoren für Th2-Immunantworten im Mausmodell und eignet sich deshalb hervorragend, um die Funktion der an diesem Typ von Immunantwort beteiligten Zelltypen zu studieren. Außerdem vermutet man heutzutage, dass sich die grundlegenden Immunantworten von Wurminfektionen und allergischen Reaktionen sehr stark ähneln. Insbesondere die Infektion mit *N. brasiliensis* induziert in der Lunge einen Phänotyp, welcher auch bei allergischem Asthma beobachtet werden kann. Daher können mit diesem Infektionsmodell grundlegende Mechanismen von Th2-Immunantworten studiert werden, welche potentiell auch für die Behandlung von Krankheiten von Bedeutung sind.

2.5.2 Weitere Modelle zum Studium von Th2-Immunantworten

In der Forschung haben sich auch verschieden andere murine Wurminfektionsmodelle zum Studium von Th2-Immunantworten etabliert: Primärinfektionen mit *Heligmosomoides polygyrus* verursachen eine chronische Infektion, welche nur durch Gabe von Helminth-spezifischen Medikamenten eliminiert werden kann. Experimentell werden dabei L3 Larven oral verabreicht, worauf sie binnen Stunden die Wand des Dünndarms durchbohren. Anschließend wandern die Larven in die Muscularis externa, wobei eine lokale Entzündungsreaktion mit einer hohen Infiltrationsrate an eosinophilen Granulozyten initiiert wird. Nach 8-tägiger Entwicklung wandern adulte Würmer zurück in das Darmlumen, paaren sich und können dort monatelang Eier produzieren. Der Vorteil dieses Infektionsmodells liegt vor allem im Studium eines Immunsystems, welches chronisch einer Helmintheninfektion ausgesetzt ist. Sekundärinfektionen lösen

eine Th2-Gedächtnisimmunantwort aus, welche zu einer raschen Eliminierung des Parasiten führt (Gause et al., 2003).

Dagegen induziert *Trichuris muris* eher eine gemischte Th1/Th2-Immunantwort. Der Typ der ausgelösten Immunantwort ist abhängig vom genetischen Hintergrund des verwendeten Mausstammes und entscheidet dabei, ob der Parasit eliminiert werden kann oder nicht. Die zugrundeliegenden Effektormechanismen sind bis heute allerdings noch weitgehend unbekannt. Oral verabreichte L1 Larven wandern vom Dünndarm in den Dickdarm, wo sie ihren Kopf in das Epithelium einbetten und ausreifen. Dabei wird aus den Epithelzellen ein Syncytium gebildet (Cliffe and Grencis, 2004).

Infektionen mit *Schistosoma mansoni* führen zunächst zu einer Th1/Th17-Immunantwort, welche sich gegen die adulten Parasiten richtet. Nachdem die Parasiten Eier produziert haben, kommt es zur Ausbildung von Granulomen in der Leber und die Immunantwort ändert sich in Richtung einer Th2-Immunantwort. Diese Th2-Immunantwort verhindert eine ansonsten pathologische Th1/Th17-Immunantwort (Stadecker et al., 2004). Daher kann in diesem Modell sehr gut die Balance zwischen verschiedenen Immunantworten studiert werden.

Neben Infektionen mit diversen Wurmmodellen existieren auch zwei weitere Methoden zur Auslösung von Th2-Immunantworten in der Maus: 1) Zum einen kann ein Modellantigen (in der Regel Hühnerovalbumin) zusammen mit dem Adjuvanz Aluminiumkaliumsulfat verabreicht werden. Danach kann durch eine weitere Gabe des Antigens eine Th2-Immunantwort induziert werden. 2) Alternativ kann auch Ziegen-Antiserum gegen Maus-IgD (GaMD) verabreicht werden. Ziegen-IgG bindet an membranständiges IgD auf B-Zellen in der Maus und aktiviert diese. Zudem wird es internalisiert, prozessiert und aktiviert nach Präsentation durch MHC-II-Moleküle T-Zellen, welche spezifisch für Ziegen-IgG sind. Eine große Zahl dieser B-Zellen aktiviert somit CD4⁺ T-Zellen und induziert die Differenzierung bevorzugt zu Th2-Effektorzellen. Ziegen-Antiserum gegen KLH (Hämocyanin der Nacktschnecke; „*keyhole limpet hemocyanin*“) kann als erneuter Stimulus verwendet werden, da dabei dieselben antigenen Determinanten wie in GaMD vorkommen, ohne dass direkt B-Zellen oder indirekt T-Zellen zu einer Primärantwort stimuliert werden. Da man bis heute aber nicht

genau verstanden hat, weshalb im Detail es bei diesen beiden Methoden überhaupt zur Induktion von Th2-Immunantworten kommt, sind die Helmintheninfektionsmodelle besser geeignet, um grundlegende Fragen zu Th2-Immunantworten unter physiologischen Bedingungen zu klären.

2.6 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten Zellen des angeborenen Immunsystems während einer Th2-Immunantwort funktionell charakterisiert werden. Dazu wurden Mäuse mit dem gastrointestinalen Nematoden *N. brasiliensis* infiziert und das Verhalten von eosinophilen- und basophilen Granulozyten während der Infektion näher untersucht. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf dem Vergleich der **Lebensdauer** dieser Zelltypen unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen, da es während der Infektion mit *N. brasiliensis* zu einer massiven Zunahme dieser Zellen kommt. Bis heute konnte nicht geklärt werden, ob diese Zunahme durch vermehrte Neubildung der Zellen im Knochenmark oder vielmehr durch ein verlängertes Überleben dieser Zellen in der Peripherie zustande kommt. Des Weiteren sollte die genaue **Lokalisierung** dieser Zellen in verschiedenen Organen untersucht werden, um eventuell Rückschlüsse auf ihre Beteiligung an der ausgelösten Immunantwort zu ziehen. Entscheidend für eine erfolgreiche Immunantwort gegen Parasiten sind letztendlich die Effektorfunktionen der daran beteiligten Zellen. Daher wurden auch die **Effektorfunktionen** dieser Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* näher untersucht.

Zielsetzung der Arbeit: eosinophile und basophile Granulozyten während einer *N. brasiliensis*-Infektion

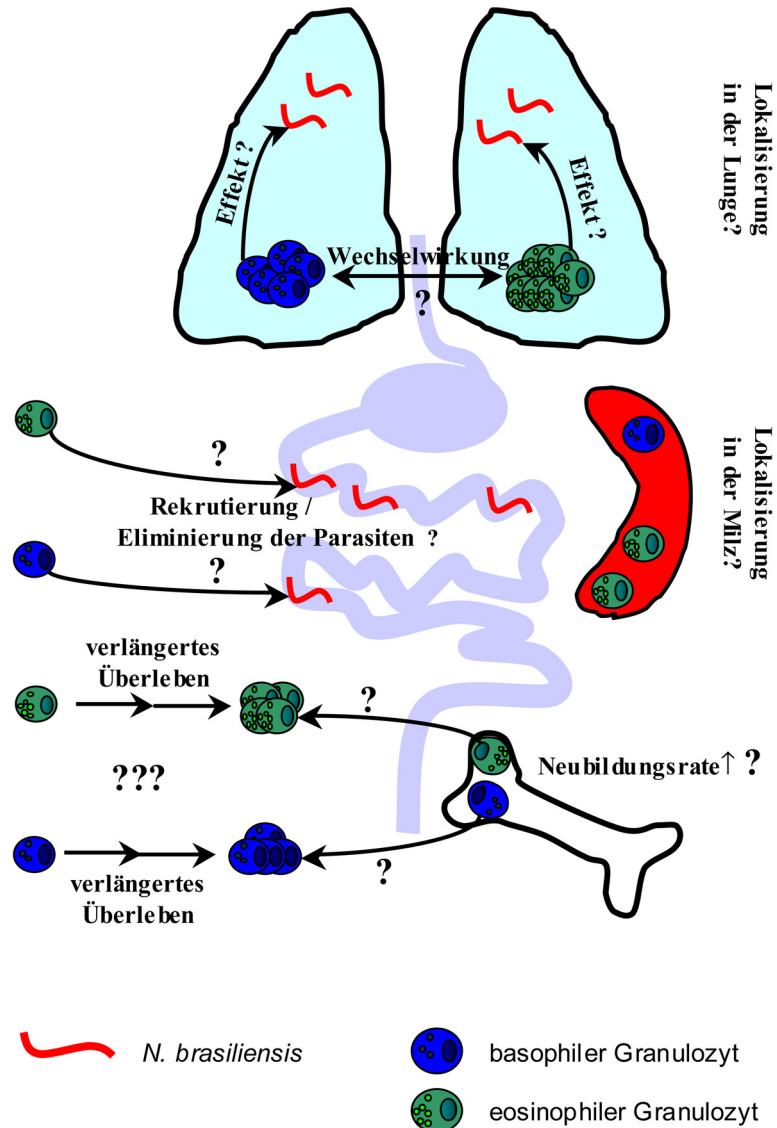


Abbildung 1. Übersicht über die Fragestellung. In dieser Arbeit soll die Bedeutung von eosinophilen und basophilen Granulozyten während einer Infektion mit dem gastrointestinalen Nematoden *N. brasiliensis* geklärt werden. Dazu sollten insbesondere die Mechanismen, die zur Akkumulation dieser Zellen führen, deren genaue Lokalisierung in den betroffenen Organen und potentielle Effektorfunktionen dieser Zellen während der Infektion aufgeklärt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Lösungen, Medien und Puffer wurden mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt. Wenn nicht anders vermerkt, wurden alle Chemikalien von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen. Die Herkunft speziell benötigter Reagenzien ist in der entsprechenden Methodenbeschreibung angegeben.

3.1.2 Geräte

Für diese Arbeit wurden folgende Geräte verwendet:

Brutschrank (Heraeus, Kendro Laboratory Products, Deutschland), Chemikalienwaage (Mettler PL1200, Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz), ELISA Reader und SoftmaxPro Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), Feinwaage (Mettler 32), Inversmikroskop (Modell SZ, OPTECH, München, Deutschland), Kryostat (Jung Frigocut 2800E (Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland), Magnetrührer, Mikroskope (Zeiss, Oberkochen, Deutschland und Ernst Leitz, Wetzlar, Deutschland), PCR-Maschine (Robocycler Gradient 96, Stratagene Agilent Technologies, Sedar Creek, TX, USA), pH-Meter (Inolab, Weilheim, Deutschland), Photometer (Ultraspec3000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland), Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), Sonifiziergerät (Cell Disruptor B15, Branson, Danbury, CT, USA), Sterilbank (Heraeus), Zytospin-Zentrifuge (Cytospin 2, Shandon Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Zentrifugen (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland und Sorvall RC-5B Superspeed, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), Waschgerät für 96Loch-Platten (SLT Labinstruments, Achterwehr, Deutschland).

3.1.3 Pufferlösungen und Zellkulturmedien

ACK-Puffer	8,29 g NH ₄ Cl 1 g KHCO ₃ 37,2 mg Na ₂ EDTA H ₂ O ad 1 l pH 7,2-7,4 mit 1 N HCl einstellen
PBS	9,55 g/l Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (Biochrom AG)
FACS-Puffer	Dulbecco's PBS (Panbiotech) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ 2% FKS (Invitrogen) 0,1% NaN ₃
FACS-Blutpuffer	Dulbecco's PBS (Panbiotech) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ 2% FKS (Invitrogen) 0,1% NaN ₃ 2000 U/l Heparin (Biochrom AG)
MACS-Puffer	Dulbecco's PBS (Panbiotech) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ 0,5% FKS (Invitrogen) 2 mM EDTA
RPMI-Medium	RPMI 1640 (PanBiotech) 10% FKS (v/v) (Invitrogen) 5 x 10 ⁻⁵ M mM β-Mercaptoethanol 2 mM L-Glutamin 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)
DMEM-Medium	DMEM (PanBiotech) 10% FKS (v/v) (Invitrogen, Carlsbad, CA)

	5 x 10 ⁻⁵ M mM β-Mercaptoethanol
	2 mM L-Glutamin
	100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)
50x TAE-Puffer	242 g Tris
	57,1 ml Essigsäure (100% (v/v))
	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
	H ₂ O bis auf 1 l auffüllen
Tyrode's-Puffer	130 mM NaCl
	5 mM KCl
	1,4 mM CaCl ₂
	1 mM MgCl ₂
	5,6 mM Glukose
	10 mM HEPES (pH 7,4)
	0,1% BSA

3.1.4 Mausstämme

Alle Mäuse und Ratten wurden im Tierstall des Instituts für Immunologie gemäß den Richtlinien des Instituts gehalten.

Folgende Maus-Inzuchtstämme wurden für die vorliegende Arbeit verwendet:

BALB/c

Dieser Mausstamm diente als Wildtyp-Kontrolle. Der MHC-Haplotyp ist H-2^d. Die Mäuse wurden ursprünglich von Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME) bezogen.

C57BL/6

Dieser Mausstamm diente ebenfalls als Wildtyp-Kontrolle. Der MHC-Haplotyp ist H-2^b. Die Mäuse wurden ursprünglich von Jackson Laboratories (Bar Harbour, ME) bezogen.

c-Kit^{W-sh}

Dieser Mausstamm auf C57BL/6-Hintergrund trägt eine natürlich vorkommende Mutation in einem noch nicht näher lokalisiertem regulatorischen Element des c-Kit Promotors (Tono et al., 1992). Daher fehlen diesen Mäusen Mastzellen. Die Mäuse wurden von D. Lee (Brigham & Women's Hospital, Boston, MA) zur Verfügung gestellt.

IL-4/13^{-/-} (Thy1.1)

Dieser Mausstamm ist auf BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzt. In ihm wurden die Gene für IL-4 und IL-13 in der Keimbahn deletiert (McKenzie et al., 1999). Thy1.1 und Thy1.2 sind kongene Marker, mit denen Zellen von genetisch ansonsten identischen Mäusen unterschieden werden können. Die Mäuse wurden von A. McKenzie (MRC, Cambridge, UK) zur Verfügung gestellt.

IL-4 Reporter-mäuse (4get-Mäuse)

In diesem auf BALB/c-Hintergrund zurückgekreuzten Mausstamm wurde das Gen für eGFP mit einer *internal ribosomal entry site* (IRES) 3' in die nicht-transkribierte Region des IL-4 Gens eingefügt, so dass bei der Transkription von IL-4 eine bicistronische mRNA entsteht (Mohrs et al., 2001). Diese führt zur Translation von eGFP unabhängig von der IL-4 Translation. eGFP verbleibt nach der Translation in der Zelle und kann daher als Marker für IL-4-produzierende Zellen verwendet werden. IL-4 hingegen wird in die Umgebung sekretiert. Die Mäuse wurden von R.M. Locksley (UC San Francisco, CA) zur Verfügung gestellt.

4get/rag^{-/-} (Thy1.2)

Dieser Stamm wurde durch Kreuzung von 4get-Mäusen mit Mäusen erhalten, in welchen das Rag2-Gen selektiv deletiert worden war (Shinkai et al., 1992). Rag2 ist essentiell für die Rekombination der Keimbahn-kodierten Gensegmente für T- und B-Zell-Rezeptoren, daher haben diese Mäuse weder B- noch T-Zellen. Er ist ebenfalls auf BALB/c-Hintergrund und trägt den Marker Thy1.2. Rag2^{-/-} auf BALB/c-Hintergrund wurden ursprünglich von Taconic farms (Germantown, NY) bezogen.

4get/ Δ dblGata

Dieser Stamm stammt aus einer Kreuzung von 4get-Mäusen mit Mäusen, welche eine Mutation in der hochaffinen Gata-1-Bindungsstelle proximal des *gata-1* Promotors besitzen (Yu et al., 2002). Dies führt zum selektiven Verlust der eosinophilen Granulozyten-Linie. Die Mäuse wurden von C. Gerard (Harvard Medical School, Boston, MA) zur Verfügung gestellt.

4get/IL-5tg

Diese Mäuse stammen aus einer Verpaarung von Mäusen des 4get-Mausstammes mit Mäusen aus einem Mausstamm, in welchem IL-5 unter Kontrolle des T-Zell-spezifischen CD3delta Promotors überexprimiert wird (Lee et al., 1997). IL-5 fördert die Entwicklung von eosinophilen Granulozyten, daher führt IL-5-Überexpression zu einer massiven systemischen Eosinophilie in diesem Mausstamm. Die Mäuse wurden uns von J. Lee (Mayo Clinic, Scottsdale, AZ) zur Verfügung gestellt.

R-DTA

In Mäusen dieses Stammes wurde eine Insertion der Diphtherietoxin alpha Untereinheit (DTA) im genomischen ROSA26 Locus direkt hinter einer loxP-flankierten Stopp-Kassette durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen (129/Sv-Hintergrund) eingefügt (Voehringer et al., 2008). Werden diese Mäuse mit Mäusen verpaart, in welche die Cre-Rekombinase eingefügt wurde, sterben alle Cre-exprimierenden Zellen. R-DTA-Mäuse wurden vier Generationen auf C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt.

CD11c-Cre

Diese Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund exprimieren die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des DC-spezifischen CD11c-Promotors (Caton et al., 2007) und wurden von Boris Reizis (Columbia University, New York) zur Verfügung gestellt. CD11c-Cre/R-DTA-Mäuse (Δ DC-Mäuse) wurden durch Verpaarung von R-DTA-Mäusen mit CD11c-Cre-Mäusen hergestellt, was zu einer konstitutiven Eliminierung von DCs führt. Δ DC-Mäuse wurden auf einem gemischten 129/Sv x C57BL/6-Hintergrund verwendet.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 RNA-Isolierung und semiquantitative Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

RNA von FACS-sortierten Zellen oder ganzem Lungengewebe wurde mit einem RNA Isolationskit (Fluka, Buchs, Schweiz) gemäß den Herstellerangaben extrahiert. Menge und Reinheit wurden mit einem Photometer vermessen und die RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. 2 μg der erhaltenen RNA wurden für die Erststrangsynthese mittels Superscript II Reverser Transkriptase (Invitrogen, San Diego, CA, USA) unter Verwendung von oligo(dT) Oligonukleotiden (Invitrogen) verwendet. Die PCR wurde mit 3-fach seriell verdünnter cDNA als Matrize und den im Anhang angegebenen Oligonukleotiden durchgeführt. Dabei wurde eine *Taq*-Polymerase (Genecraft, Ares Biosciences, Köln, Deutschland) verwendet. Folgende PCR-Bedingungen wurden gewählt: 3 min initiale Denaturierung bei 94°C , 30-38 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C , 30 sec Oligonukleotidhybridisierung bei $56-58^{\circ}\text{C}$ und 60 sec Amplifizierung bei 72°C , sowie 10 min abschließende Amplifizierung bei 72°C .

3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Es wurden 1 g Agarose (Roth) in 100 ml TAE-Puffer (1% Agarose w/v) gelöst und mit 0,005% Ethidiumbromidlösung (Roth) versetzt. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer überschichtet. Die PCR-Proben wurden mit 10% Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Längenstandard wurde die pBR328 Basenpaar-DNA-Leiter (Roth) mit aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer konstanten Spannung von 130 V. Nach der Elektrophorese wurden die Gele mit einem Geldokumentationssystem (Intas, Göttingen, Deutschland) fotografiert.

3.2.1.3 Herstellung von Interleukin 3-kodierenden Retroviren

Es wurden zunächst Milzzellen einer BALB/c-Maus mit 0,2 µg/ml anti-TCR (H57-597; Invitrogen Caltag) und 0,2 mg/ml anti-CD28 (37.51; eBioscience) monoklonaler Antikörper (mAk) für fünf Tage in der Gegenwart von 20 ng/ml IL-2 (ImmunoTools), 20 ng/ml IL-4 (R&DSystems) und 20 µg/ml anti-IFN γ mAk (XMG 1.2; laboreigene Aufreinigung aus Hybridomüberständen) stimuliert und aus dieser Th2-Kultur die RNA isoliert. Die vollständige Sequenz von Interleukin 3 (FL-IL-3) wurde von cDNA aus diesen Th2-Kulturen mit den im Anhang angegebenen Oligonukleotiden FL-IL-3 fwd und FL-IL-3 rev amplifiziert, welche auch eine EcoRI und eine XhoI Schnittstelle für Restriktionsemzyme enthielten. Danach wurde das erhaltene Produkt mit dem „TOPO TA Cloning Kit“ (Invitrogen) gemäß den Angaben des Herstellers in einen TOPO pCR2.1[®] Vektor (Invitrogen) kloniert und anschließend sequenziert (Eurofins MWG Operon, Martinsried, Deutschland). Nach der erfolgreichen Aufreinigung mittels eines Plasmidaufreinigungskits (Quiagen, Hilden, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben wurde das Plasmid mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) über Nacht verdaut. Hierauf wurde das erhaltene FL-IL3 Fragment in das bicistronische retrovirale IRES-GFP Plasmid pMXpie mittels des Quick Ligation Kits (Invitrogen) gemäß den Herstellerangaben subkloniert und zusammen mit dem Helferplasmid pCL Eco (Naviaux et al., 1996) in Phoenix E Verpackungszellen (www.stanford.edu/group/nolan) transfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach dem Protokoll des Herstellers. Der Zellüberstand mit den darin enthaltenen Retroviren wurde zwischen 48 h und 72 h nach Transfektion entnommen und direkt für die Transduktion polyklonaler T-Zellen verwendet.

3.2.1.4 Retrovirale Transduktion von T-Zellen

Polyklonale T-Zellen aus der Milz von BALB/c-Mäusen wurden für zwei Tage mit 0,2 µg/ml anti-TCR (H57-597; Invitrogen Caltag) und 0,2 mg/ml anti-CD28 (37.51; eBioscience) mAk in der Gegenwart von 20 ng/ml IL-2 stimuliert und anschließend mit den Retroviren durch Zentrifugation bei 2450 rpm und 37°C in der Gegenwart von 2 µg/ml Polybren (Hexa-dimethrinbromid; Sigma-Aldrich) transduziert. Nach zweitägiger

Kultivierung wurden die T-Zellen durchflusszytometrisch auf die eGFP-Expression untersucht.

3.2.2 Zell- und immunbiologische Methoden

3.2.2.1 *Nippostrongylus brasiliensis* Infektionen

Um den Lebenszyklus von *N. brasiliensis* aufrechtzuerhalten, wurden alle 2-3 Monate Sprague-Dawley Ratten mit 2500 Larven des 3. Entwicklungsstadiums (L3) infiziert. Dieser Zwischenschritt über die Infektion einer Ratte ist notwendig, da der natürliche Wirt von *N. brasiliensis* die Ratte ist und adulte *N. brasiliensis* Würmer in Mäusen keine entwicklungsfähigen Eier produzieren können. Die Ratten erhielten für die ersten 5 Tage antibiotikahaltiges Trinkwasser (2 g/l Neomycin Sulfat, 100 mg/l Polymyxin B Sulfat; Sigma-Aldrich). Zwischen Tag 6 und 10 wurde täglich der Rattenkot mit den darin enthaltenen Parasiteneiern gesammelt, in Wasser aufgeschlemmt und mit Aktivkohle (Roth) vermischt. Der entstandene Brei wurde in die Mitte von großen Petrischalen auf feuchtes Filterpapier aufgetragen und in einer leicht feuchten Kammer bei Raumtemperatur gelagert. Nach einer Woche konnten die sich bis dahin zum Stadium L3 entwickelten Larven mit auf 37°C-vorgewärmter 0,9%iger NaCl-Lösung am Petrischalenrand abgespült werden. Die L3 Larven von *N. brasiliensis* wurden mehrmals in 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen und schließlich subkutan (500 Organismen/Maus) am Ende des Schwanzes in Mäuse injiziert. Die Mäuse erhielten ebenfalls für die ersten 5 Tage oben beschriebenes antibiotikahaltiges Trinkwasser.

3.2.2.2 Herstellung von NEX_{L3} - und NES_{L3} - Extrakten

Zur Herstellung von Totalextrakten von L3 Larven (NEX_{L3}) wurden 40 000 L3 Larven in 1 ml 0,9%iger NaCl-Lösung für 3-5 min auf Eis sonifiziert. Die Lysate wurden für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und anschließend mit einem Filter (0,2 µm) steril filtriert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Für die Herstellung sekretierter Antigene von L3 Larven (NES_{L3}), wurden 25 000 L3 Larven mehrmals mit antibiotikahaltigem PBS (100 µg/ml Penicillin/Streptomycin) gewaschen und für 7 Tage

in 3 ml serumfreien Medium (HybridoMed DIF 1000, Biochrom AG) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die erhaltenen Überstände wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.2.2.3 Organentnahme und Herstellung von Einzellzellsuspensionen

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels zervikaler Dislokation getötet, äußerlich mit 70%igem Ethanol desinfiziert und auf einem Sezierbrett fixiert.

Milz, Lymphknoten und Thymus

Die Milz wurde mit einer feinen und desinfizierten Pinzette herausgelöst und in RPMI-Medium auf Eis gelagert. Mesenterische, inguinale und tracheale Lymphknoten wurden ebenfalls vorsichtig herausgelöst und von eventuell mit herausgelöstem Fett befreit und anschließend in RPMI-Medium auf Eis gelagert.

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Organe entweder in einer Petrischale mit etwas RPMI-Medium zwischen zwei Gazestückchen (Maschenweite 70 µm; Schubert und Weiss, München, Deutschland) mit einem Spritzenstempel zerrieben. Alternativ wurden Organe von ΔDC-Mäusen zuvor mit Liberase HI und DNase I (beide Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) für 20 min bei 37°C verdaut. Die Zellsuspension wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit RPMI-Medium aufgefüllt und die Zellen bei 1200 rpm und 4°C 5 min sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen je nach weiterer Verwendung im gewünschten Medium resuspendiert oder einer Erythrozytenlyse unterzogen.

Knochenmark

Tibia und Femur wurden mit einer feinen Schere und einer Pinzette vorsichtig herausgelöst, von Muskeln und Sehnen befreit und in RPMI- oder DMEM-Medium auf Eis gelagert. Nach Überführung in eine Petrischale mit etwas Medium wurden mit einer feinen Schere jeweils die Knochenenden abgeschnitten. Mittels einer 10 ml Spritze mit einer feinen Kanüle (Braun) wurde dann das Knochenmark herausgespült. Dieses wurde einmal mit der Kanüle wiederaufgezogen, um eine Einzelzellsuspension herzustellen, und

dann in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4°C und 1200 rpm wurde der Überstand abgesaugt und die Knochenmarkszellen in frischem Medium resuspendiert.

Lunge

Nach Präparierung des Brustkorbes wurde die Aorta durchtrennt. Danach wurde mittels Punktion in die rechte Herzkammer die Lunge mit 10 ml PBS ausgespült, um Blutleukozyten zu entfernen. Anschließend wurden die Lungenlappen herausgelöst und in RPMI-Medium auf Eis gelagert.

Für die Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Lunge mit etwas Medium in ein Zellsieb (BD, Maschenweite 70µm) überführt und mit einer feinen Schere in kleine Stückchen zerschnitten. Diese wurden mit einem Spritzenstempel durch das Zellsieb gedrückt, die Zellsuspension in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Zellen bei 1200 rpm und 4°C 5 min sedimentiert. Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt.

Spülung des Peritoneums

10 ml RPMI-Medium wurden mittels einer 10 ml Spritze und einer feinen Kanüle in das Peritoneum gespritzt. Dann wurde das Peritoneum vorsichtig massiert, um eventuell an Organen anhaftende Zellen abzulösen. Anschließend wurde mit derselben Spritze das Medium aus dem Peritoneum wieder aufgezogen, in ein Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Fötale Leber

Am Tag E16.5 der Emryonalentwicklung wurden die Föten entnommen, in eine 6-Lochplatte mit etwas PBS überführt und auf Eis gelagert. Unter einem Stereomikroskop wurden anschließend die fötalen Lebern mit zwei feinen Pinzetten herauspräpariert und zusammen in ein Reaktionsgefäß mit RPMI-Medium überführt. Danach wurde wie für die Milz beschrieben eine Einzelzellsuspension hergestellt.

Blutentnahme

Für die Blutabnahme wurde die Maus unter einer Infrarotlampe kurz erwärmt, um eine Vasodilatation zu erreichen. Durch einen Schnitt in die untere Schwanzvene wurden der Maus einige Tropfen Blut entnommen und direkt in ein Reaktionsgefäß mit 5 ml FACS-Blutpuffer überführt. Die Blutsuspension wurde auf Eis gelagert. Schließlich wurden die Reaktionsgefäße für fünf min bei 4°C und 1200 rpm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes bis auf ca. 100 µl wurde direkt die Antikörperfärbung für die durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Die Erythrozytenlyse erfolgte bei Blutproben erst nach der Antikörperfärbung.

Erythrozytenlyse

Um die Erythrozyten zu entfernen, wurden die sedimentierten Zellen kurz aufgelockert und mit 1 ml ACK-Puffer für 2 min bei gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension mit 10 ml RPMI-Medium oder 5 ml FACS-Puffer (nach Färbungen von Blutleukozyten) aufgefüllt und 5 min bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in RPMI-Medium oder FACS-Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert.

Bestimmung der Zellzahl

Dazu wurden zunächst die Einzelzellsuspensionen mit RPMI-Medium verdünnt. Anschließend wurden 20 µl der Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau (Fluka) vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer (Roth) pipettiert, welche zuvor mit einem Deckgläschen (Roth) geschlossen worden war. Dann wurden unter einem Mikroskop 16 Kleinquadrate ausgezählt. Tote Zellen wurden durch Blaufärbung ausgeschlossen.

Die Zellzahl pro ml ergab sich dann aus:

Gezählte Zellzahl x Kammerfaktor (10^4) x Verdünnungsfaktor (10).

Wird der erhaltene Wert mit dem totalen Zellsuspensionsvolumen multipliziert, so erhält man die gewünschte Totalzellzahl.

3.2.2.4 Zelllinien und Knochenmarkskulturen

Die nicht-adhärenente Zelllinie IC-2 (Lunderius et al., 2000), welche murinen basophilen Granulozyten stark ähnelt, wurde in RPMI-Medium gehalten, welches zusätzlich mit 1 ng/ml rekombinatem Maus IL-3 (ImmunoTools) versetzt worden war. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen verdünnt und erhielten frisches Medium.

Für Knochenmarkskulturen wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus Knochenmark von 4get- oder c-Kit^{W-sh}-Mäusen hergestellt. Die Knochenmarkszellen wurden dann in DMEM-Medium resuspendiert, gezählt und auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. 3 ml der erhaltenen Suspension wurden anschließend in 6-Lochplatten ausgesät und mit den angegebenen Konzentrationen an IL-3 oder SCF (ImmunoTools) versetzt. Alle zwei bis drei Tage wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig abgesaugt und durch frisches Medium mit den entsprechenden Zytokinen ersetzt. Für die Generierung von basophilen Granulozyten aus Knochenmark wurde routinemäßig DMEM-Medium mit 0,3 ng/ml IL-3 ohne Zusatz von SCF verwendet (siehe Abb. 6 B und C). Basophile Granulozyten aus Knochenmarkskulturen wurden nach 11-tägiger Kultur für Experimente verwendet.

3.2.2.5 Magnetische Zellseparation (MACS: *magnetic cell separation*)

Die magnetische Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) beruht auf der Separation von Zellen mit Antikörpern, welche an paramagnetische Partikel (Microbeads) gekoppelt sind. Die Separation erfolgt dann mittels einer Säule, welche in einem starken Magnetfeld plaziert wird.

Die Separation von Zellen aus Knochenmarkskulturen von 4get-Mäusen wurde gemäß den Herstellerangaben durchgeführt mit der Ausnahme, dass die erhaltene Zellsuspension zunächst mit biotinyliertem anti-c-Kit Antikörper (2B8; Invitrogen Caltag) inkubiert worden war. Anschließend wurden die Zellen mit anti-Biotin-Microbeads (Miltenyi Biotech) markiert. Der daraus erhaltene Säulendurchfluß erhielt im Allgemeinen weniger als 1% Mastzellen (IL-4/eGFP⁺, c-Kit⁺). Dies wurde routinemäßig im Durchflusszytometer kontrolliert.

3.2.2.6 Durchflusszytometrie (FACS: *fluorescence activated cell sorting*)

Die FACS-Messungen erfolgten mit einem FACSCalibur-Durchflusszytometer (BD, Biosciences, San Jose, CA). Für die Datenaufnahme wurde die CellQuestPro Software (BD) verwendet. Die Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software „FlowJo“ (Tree-star, Ashland, OR).

Färbung von Lymphozyten mit fluorochrommarkierten Antikörpern

50-100 μ l Zellsuspension wurde zunächst für 5 min bei RT mit anti-CD16/32 monoklonalem Antikörper (mAk) (2.4G2; laboreigene Aufreinigung von Hybridomüberständen) inkubiert, um unspezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren zu blockieren. Falls der Primärantikörper mit einem anti-Ratte Sekundärantikörper detektiert werden musste, wurde stattdessen mit normalem Mausserum geblockt. Anschließend wurden direkt 100 μ l 4°C-kalter FACS-Puffer mit entsprechend vorverdünnten Antikörperlösungen zugegeben, gemischt und für 20 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, und der Überstand abgesaugt. Im Falle der Detektion mit einem anti-Ratte Ak wurde nach Zugabe von 5 μ l Rattenserum durch Inkubation für 5 min bei RT alle unspezifischen Bindungsstellen abgesättigt. Falls notwendig, wurden anschließend 100 μ l vorverdünnte Sekundärantikörper- oder Streptavidinlösung zugegeben und ebenfalls für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert und bis zur Analyse auf Eis im Dunkeln aufbewahrt. Alle verwendeten Antikörper (Ak) für die Durchflusszytometrie sind im Anhang in Tabelle 2 angegeben.

Durchflusszytometrische Zellsortierung

Um hochaufgereinigte Zellpopulationen zu erhalten, wurden die Zellen zunächst wie unter 3.2.2.F beschrieben mit fluorochrommarkierten Antikörpern gefärbt und anschließend in PBS mit 2% (v/v) FKS resuspendiert. Die Zellsortierung erfolgte mit einem FACSAria Gerät (BD Biosciences, San José, CA), welches mit der FACSDiva

Software (BD) ausgestattet ist. Die erreichte Reinheit der Zielpopulation lag routinemäßig bei 95-99%.

3.2.2.7 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)-Färbung

Für Kurzzeitmarkierungen (15 h) wurden 1 mg BrdU in 100 µl PBS i.p. in die entsprechenden Mäuse gespritzt. Für Langzeitmarkierungen (36 h oder 84 h) wurde BrdU nach 0, 12 oder 24 h gespritzt. Einzelzellsuspensionen von gesamtem Lungengewebe, Knochenmark, Milz oder Blut für Oberflächen-gebundenes IgE oder Siglec-F gefärbt, mit anti-B220 (B-Zellmarker), -CD4 und -CD8 (T-Zellmarker) Ak gegengefärbt und anschließend zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 0,15 M NaCl resuspendiert, mit tropfenweise zugegebenem, -20°C kaltem Ethanol fixiert (Endkonzentration 70%) und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS wurden die Zellen über Nacht in PBS, 1% Paraformaldehyd (Roth) und 0,01% Tween-20 (Sigma-Aldrich) fixiert. Daraufhin wurden die Zellen in PBS gewaschen und in 0,15 M NaCl; 4,2 mM MgCl₂ (pH 5,0) resuspendiert. Dann wurde die genomische DNA durch Zugabe von 50 Kunitz-Einheiten DNase I (Sigma-Aldrich) fragmentiert und für 10 min bei 20°C, sowie anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen mit FITC-markiertem anti-BrdU Ak (3D4; BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) für 30 min bei 20°C gefärbt. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Basophile Granulozyten wurden als IgE⁺B220⁻CD4⁻CD8⁻ Zellen im Lymphozytenfenster identifiziert. Eosinophile Granulozyten wurden als Siglec-F⁺ Zellen mit hoher Granularität identifiziert. Mäuse, welche kein BrdU bekommen hatten, dienten hierbei als Kontrolle.

3.2.2.8 Analyse der Zellmorphologie

FACS-isolierte basophile Granulozyten (eGFP⁺c-Kit⁻) und Mastzellen (eGFP⁺c-Kit⁺) von Tag 11 Knochenmarkskulturen wurden mittels Zytospin-Zentrifugation auf einen Objektträger aufgetragen und mit einem Hemacolor-Färbekit (Merck, Darmstadt, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben angefärbt.

3.2.2.9 Immunfluoreszenzfärbungen von Geweben

Für Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten wurden die angegebenen Organe von Mäusen entnommen, welche 10 Tage zuvor mit *N. brasiliensis* infiziert worden waren. Diese wurden für 2 h in 4%-iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und anschließend für 15 h in 50 ml PBS bei 4°C gewaschen. Danach wurden die Organe mit Einbettmedium (Tissue-Tek, Jung) eingedeckt, langsam in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Alternativ wurden Organe auch ohne vorherige Fixierung für die Färbung mit anti-MBP Ak eingefroren.

Am Tag vor der Färbung wurden 5 µm dicke Schnitte am Kryostat angefertigt, welche über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet wurden. Bei nicht-Paraformaldehyd-fixierten Organen wurden die Schnitte am nächsten Tag mit -20°C kaltem Azeton für 10 min fixiert und anschließend für 2-3 h getrocknet. Währenddessen wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Vector Laboratories, Burlingame, CA) umrandet. Zwischen den einzelnen Inkubationen erfolgte jeweils für einige Minuten ein Waschschriff in einem PBS-Bad. Alle Schnitte wurden zunächst für 30 min mit aufgereinigtem anti-CD16/32 mAk (2.4G2; laboreigene Aufreinigung von Hybridomüberständen) in Blockpuffer mit 2% Maus- und 2% Rattenserum inkubiert, um nicht-spezifische Bindungen an Fc-Rezeptoren zu vermeiden. Anschließend wurde eventuell endogenes Biotin oder Streptavidin mit einem Streptavidin/Biotin-Blocking-Kit (Vector Laboratories) gemäß den Herstellerangaben blockiert. Alle Antikörper und Färbereagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, in Blockpuffer aus dem TSA-Kit (Perkin-Elmer, Boston, MA) verdünnt.

Um eGFP in der Milz von 4get-Mäusen zu detektieren, wurden die Schnitte mit polyklonalem Kaninchen anti-GFP Ak (Abcam, Cambridge, UK) für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 30 min mit einem biotinyliertem Esel anti-Kaninchen F(ab')₂-Sekundärfragment (Jackson ImmunoResearch Labs., Suffolk, UK) inkubiert. Dieses wurde mittels Streptavidin-HRP und Tyramid-FITC aus dem TSA-Fluorescein-System (Perkin Elmer) gemäß den Herstellerangaben detektiert. Dann wurden die Schnitte zusätzlich entweder mit PE-markiertem anti-Siglec-F (E50-2440; BD Pharmingen) Ak oder biotinyliertem anti-IgE (R35-118; BD Pharmingen) Ak für 1 h gefärbt, nachdem zuvor alle nicht besetzten Bindungsstellen nochmals mit dem Streptavidin/Biotin-Blocking-Kit blockiert worden waren. Biotinylierter anti-IgE mAk

wurde mit Cy3-markiertem Streptavidin (Jackson ImmunoResearch) detektiert. Schließlich wurden die Schnitte noch mit Alexa647-markiertem anti-B220 Ak (RA3-6B2, Invitrogen Caltag) gegengefärbt.

Um Mastzellen zu detektieren, wurden die Schnitte zunächst mit biotinyliertem anti-c-Kit mAk (2B8; Invitrogen Caltag) inkubiert. Dieser wurde mittels Streptavidin-HRP und Tyramid-Biotin aus dem TSA Biotin System (Perkin Elmer) gemäß den Herstellerangaben amplifiziert und anschließend durch Inkubation mit Cy3-markiertem Streptavidin visualisiert. Diese Schnitte wurden ebenfalls mit Alexa647-markiertem anti-B220 mAk gegengefärbt.

Um basophile Granulozyten in Lunge und Dünndarm von infizierten BALB/c- oder c-Kit^{W-sh}-Mäusen zu detektieren, wurden die Schnitte mit Alexa647-markiertem anti-B220 mAk und biotinyliertem anti-IgE mAk doppelgefärbt. Anschließend wurde ebenfalls das TSA Biotin System zur Signalamplifizierung verwendet und Cy3-markiertes Streptavidin zur Visualisierung eingesetzt.

Um eosinophile Granulozyten in der Lunge und im Dünndarm zu detektieren, wurden Azeton-fixierte Schnitte von infizierten BALB/c Mäusen mit aufgereinigtem anti-MBP Ak (Lee Labor, Mayo Klinik, Scottsdale, AZ) inkubiert. Dieser wurde mit einem Cy3-markierten Esel anti-Ratte Ak (Jackson ImmunoResearch) detektiert.

Bei einigen Färbungen wurde nach dem letzten Färbeschritt noch für 10 min mit 1 µg/ml DAPI (Sigma-Aldrich) in PBS gegengefärbt, um die DNA in den Zellkernen sichtbar zu machen.

Die Färbung von Langerhans-Zellen in der Haut (Ohren) wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (Larsen et al., 1990) mit der Ausnahme, dass biotinylierter anti-I-A/I-E (M5/114; eBioscience) mAk und Alexa-Fluor555-markiertes Streptavidin (SouthernBiotech) für die Detektion verwendet wurde.

Nach der Färbung wurden alle Schnitte mit Fluoromount G (SouthernBiotech) eingedeckt und bis zur Bildaufnahme im Dunkeln bei 4°C gelagert. Die Bilder wurden mit einem 10x UplanSApo Objektiv auf einem Olympus BX41 Mikroskop aufgenommen, welches mit einer F-View II Kamera ausgestattet ist. Dazu wurde die Software „cell^F“

(Olympus) verwendet. Die Originalvergrößerung war 160x für Milzschnitte und 80x für Lungen- und Dünndarmschnitte, sowie Langerhans-Zellen im Ohr.

3.2.2.10 Adoptiver Transfer und Depletion verschiedener Zellpopulationen

Für einen Zelltransfer wurde die Aufarbeitung der Organe und die nachfolgende Erythrozytenlyse unter sterilen Bedingungen vorgenommen. Danach wurde die entsprechende Zellsuspension zweimal in einem großen Volumen PBS gewaschen, um fötales Kälberserum zu entfernen. Die Zellen wurden in 300-1000 µl PBS resuspendiert, kurz vor Transfer mit einem 70 µm Zellsieb (BD) filtriert und auf Eis gelagert.

Vor dem Zelltransfer wurden die Mäuse kurz mit einer Infrarotlampe erwärmt, um eine Vasodilatation zu erreichen. Die Zellen wurden mit Hilfe einer sterilen 1 ml Injektionsspritze mit entsprechender Kanüle intravenös (i.v.) in die laterale Schwanzvene gespritzt. Bei allen Zelltransfers wurde darauf geachtet, dass Zellen nur in syngene, gleichgeschlechtliche Tiere transferiert wurden.

Transfer von basophilen Granulozyten aus Knochenmarkskulturen

2,5-4 x 10⁶ aufgereinigte basophile Granulozyten aus Knochenmarkskulturen von 4get-Mäusen wurden entweder in naive oder vier Tage zuvor mit *N. brasiliensis*-infizierte BALB/c-Mäuse transferiert. Die transferierten basophilen Granulozyten wurden im Blut als IgE⁺/B220⁻ IL-4/eGFP⁺ in einem Lymphozytenfenster identifiziert.

Transfer von eosinophilen Granulozyten

Es wurden 4get/IL-5tg-Mäuse als Quelle für eosinophile Granulozyten verwendet. In diesen Mäusen enthalten Einzelsuspensionen der Milz ungefähr 50% eosinophile Granulozyten während in einer Spülung des Peritoneums ungefähr 80% eosinophile Granulozyten zu finden sind. 5-10 x 10⁷ an totalen Zellen dieser Organe wurden entweder i.v. in die laterale Schwanzvene oder in das Peritoneum von naiven oder *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c-Mäusen gespritzt. Für einige Experimente wurden eosinophile Granulozyten vor dem Transfer für 2 h bei 37°C in RPMI-Medium mit 100 ng/ml Pertussistoxin (Sigma-Aldrich) vorbehandelt. Pertussistoxin hemmt die Wirkung G_i-

Protein gekoppelter Rezeptoren (GPCR), welche sehr häufig an der Signaltransduktion von Chemokinen beteiligt sind.

Depletion von basophilen Granulozyten in 4get/rag^{-/-}-Mäusen und Rekonstitution mit IL-4/IL-13^{-/-}-Milzzellen

7×10^7 Zellen aus der Milz und den mesenterischen Lymphknoten von kongenen IL-4/IL-13^{-/-}-Mäusen mit dem Marker Thy1.1 wurden acht Tage vor der Infektion mit *N. brasiliensis* i.v. in 4get/rag^{-/-}-Mäuse gespritzt. Diese 4get/rag^{-/-}-Mäuse tragen den Marker Thy1.2. Um die Funktion von basophilen Granulozyten während einer *N. brasiliensis*-Infektion untersuchen zu können, wurden sowohl rekonstituierte als auch nicht-rekonstituierte 4get/rag^{-/-}-Mäuse untersucht. Dazu wurden basophile Granulozyten durch zwei bis fünf Injektionen von 0,2-1 mg anti-Thy1.2 mAk (30H12; laboreigene Aufreinigung von Hybridomüberständen) depletiert. Die erste Injektion erfolgte dabei zwei Tage vor der *N. brasiliensis*-Infektion. Da die resultierenden Mäuse über kein funktionierendes humorales Immunsystem verfügen, wurden basophile Granulozyten durch eine zweimalige i.v. Gabe (an Tag 0 und Tag 4 der *N. brasiliensis*-Infektion) von 50 µl Serum von infizierten Wildtypmäusen sensitiviert.

Depletion von basophilen Granulozyten und CD4⁺ T-Zellen während der Gedächtnis-Immunantwort in c-Kit^{W-sh}-Mäusen

c-Kit^{W-sh}-Mäuse wurden mit *N. brasiliensis* infiziert und nach 4-5 Wochen erneut infiziert. Zwei Tage vor der zweiten Infektion wurden CD4⁺ T-Zellen durch eine Injektion von 0,4 mg anti-CD4 mAk (GK1.5; laboreigene Aufreinigung von Hybridomüberständen) depletiert. Basophile Granulozyten wurden durch eine i.v. Injektion von 30 µg anti-CD200R3 mAk (Ba103; Labor von H. Karasuyama, Japan) zwei Tage vor der zweiten Infektion depletiert. Alternativ wurden zweimal täglich bis zur Analyse 5 µg anti-FcεRI mAk (MAR-1; eBiosciences) i.v. gespritzt, wobei zwei Tage vor der zweiten Infektion begonnen wurde.

Depletion von Makrophagen

Zur Depletion von Makrophagen wurden 200 µl Clodronat-Liposomen (N. van Rooijen, Vrije Universität, Amsterdam, Niederlande) zwei Tage vor dem Transfer eosinophiler Granulozyten intraperitoneal in BALB/c-Mäuse gespritzt.

3.2.2.11 Stimulation basophiler Granulozyten und Bestimmung der Degranulation

Um die Degranulation basophiler Granulozyten zu bestimmen, wurde die Freisetzung von β -Hexosaminidase mit kleinen Einschränkungen wie bereits beschrieben gemessen (Metzger, 1992). β -Hexosaminidase ist intrazellulär in Granula lokalisiert, daher dient die Messung der Aktivität dieses Enzyms im Überstand von stimulierten Zellen als ein Maß für den Grad der Degranulation. Aus Knochenmark generierte basophile Granulozyten oder die basophil-ähnliche Zelllinie IC-2 wurden dazu entweder mit TNP-spezifischem Maus-IgE (Igelb4; H.-M. Jaeck, Universität von Erlangen, Deutschland) oder mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c- oder IL-4/IL-13^{-/-}-Mäusen für 1 h bei 20°C vorinkubiert. Dann wurden die Zellen mit Tyrode's-Puffer gewaschen und anschließend im selben Puffer mit oder ohne NES_{L3} oder NEX_{L3} für 1 h bei 37°C inkubiert, um anschließend im Überstand die β -Hexosaminidase-Aktivität zu bestimmen. Bevor RNA für eine RT-PCR Analyse isoliert wurde, wurden die Zellen für 6 h in Kultur belassen.

Zur Bestimmung von Zytokin-Konzentrationen wurden Überstände von knochenmarksgenerierten basophilen Granulozyten von c-Kit^{W-sh}-Mäusen mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c-Mäusen für 1 h bei 20°C vorinkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen über Nacht mit 1:10 Verdünnungen von NES_{L3} oder NEX_{L3} kultiviert und anschließend die Überstände entnommen. Diese wurden bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

3.2.2.12 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

IL-4- und IgE-Konzentrationen wurden durch Standard ELISA-Methoden bestimmt.

IL-4: Für die Beschichtung der Platte wurde ein aufgereinigter IL-4 mAk (11B11; laboreigene Aufreinigung von Hybridomüberständen) und zur Detektion ein Biotin-gekoppelter anti-IL-4 mAk (BVD6-24G2; BioLegend San Diego, CA) verwendet.

IgE: Die Platte wurde mit aufgereinigtem anti-IgE (R35-72; BD Pharmingen) beschichtet. Gebundenes IgE wurde mit einem biotinyliertem anti-IgE (R35-118; BD Pharmingen) detektiert.

Folgende Zytokine und Proteine wurden mittels kommerzieller Kits gemäß den Herstellerangaben bestimmt:

IL-5 (OPT EIA; BD Pharmingen)

IL-13 (PeproTech, Hamburg, Deutschland)

Histamin ELISA-Kit (Cayman, Tallinn, Estland)

MMCP-1 (Moredun Scientific, Midlothian, UK)

Zur Visualisierung wurde standardmäßig Streptavidin-gekoppelte alkalische Phosphatase (SouthernBiotech) und 4-Nitrophenylphosphat (Sigma-Aldrich) verwendet. Falls vom Hersteller vorgegeben, wurde auch der TMB Substrat-Reagenz-Kit (BD) gemäß den Herstellerangaben zur Detektion verwendet.

3.2.2.13 Statistiken

Die Berechnung der Statistik erfolgte entweder nach dem Mann-Whitney U-Test (GraphPad Prism software) oder gemäß dem Student's T-test (SigmaPlot 2000). Dabei wurden P-Werte kleiner als 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

4 ERGEBNISSE

4.1 *In vivo* Untersuchungen zur Homöostase und Wanderung eosinophiler Granulozyten.

4.1.1 Die Akkumulation eosinophiler Granulozyten nach einer *N. brasiliensis*-Infektion beruht auf einem verlängerten Überleben in peripheren Geweben.

Die Ansammlung eosinophiler Granulozyten (Eosinophilie) wird häufig bei allergischen Entzündungen oder Parasiteninfektion beobachtet. Die Infektion mit dem Hakenwurm *N. brasiliensis* ist hierfür ein eindrucksvolles Beispiel, da während der Akutphase der Infektion ein bis zu tausendfacher Anstieg an eosinophilen Granulozyten in der Lunge beobachtet werden kann. Außerdem tritt in diesem Infektionsmodell auch eine Eosinophilie im Blut, in der Milz und im Peritoneum auf (Abb. 2 A). Bis heute ist allerdings unklar, ob die Akkumulation eosinophiler Granulozyten auf einer verstärkten Generierung im Knochenmark oder auf einer verlängerten Lebensdauer reifer eosinophiler Granulozyten im Gewebe beruht, wobei bei beiden Möglichkeiten IL-5 eine entscheidende Rolle spielen könnte. Deshalb wurden die Inkorporationsraten von Bromodesoxyuridin (BrdU) von eosinophilen Granulozyten in mehreren Geweben durchflusszytometrisch untersucht. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das in die DNA neugebildeter Zellen eingebaut wird und mit einem Antikörper detektiert werden kann. Da eosinophile Granulozyten das Knochenmark als reife Zellen verlassen und sich in der Peripherie nicht mehr teilen, kann mit der BrdU-Färbung die *de novo* Bildung und damit der Umsatz eosinophiler Granulozyten verfolgt werden.

Eosinophile Granulozyten wurden mittels Siglec-F-Färbung in naiven und *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen identifiziert, welche zuvor für verschieden lange Zeiträume BrdU erhalten hatten (Abb. 2 B). Nicht-infizierte Mäuse hatten nach 15-stündiger BrdU-Gabe bereits 50% BrdU⁺ eosinophile Granulozyten im Knochenmark, was bereits auf einen relativ hohen Grundumsatz dieser Zellen hindeutet. In der Milz

konnten in diesem Zeitfenster nur ~10% der eosinophilen Granulozyten mit BrdU markiert werden. 36 h nach Start der BrdU-Gabe waren im Knochenmark nahezu alle und in der Milz die Mehrheit der eosinophilen Granulozyten BrdU⁺ (Abb. 2 C). Interessanterweise zeigten infizierte Mäuse nach 15-stündiger BrdU-Gabe dieselbe Frequenz an BrdU⁺ eosinophilen Granulozyten im Knochenmark und in der Milz, wogegen keine BrdU⁺ eosinophilen Granulozyten im Blut, in der Lunge und im Peritoneum gefunden wurden. Dies deutet darauf hin, dass mehr als 15 h benötigt werden, um eosinophile Granulozyten in diesen Organen durch neu gebildete Zellen zu ersetzen.

Nach 36-stündiger BrdU-Gabe hatte der Großteil eosinophiler Granulozyten im Knochenmark, im Blut und in der Milz BrdU eingebaut, wohingegen in der Lunge und im Peritoneum immer noch relativ wenig eosinophile Granulozyten BrdU⁺ waren. Erst 84 h nach Start der BrdU-Gabe waren 50% der eosinophilen Granulozyten in der Lunge und 75% im Peritoneum BrdU⁺ (Abb. 2 C). Dies beweist, dass es zumindest während einer *N. brasiliensis*-Infektion mehrere Tage dauert, bis alle eosinophile Granulozyten in der Lunge und im Peritoneum durch neu gebildete Zellen ersetzt worden sind.

In der Lunge kann zwischen aktivierten und nicht-aktivierten eosinophilen Granulozyten durch das Expressionsniveau von Siglec-F unterschieden werden (Voehringer et al., 2007). Nach Infektion gehört die Mehrheit der eosinophilen Granulozyten zur Siglec-F^{hi}-Population, welche jedoch nach 36-stündiger BrdU-Gabe nur einen geringen Anteil an BrdU⁺ Zellen aufwies, wohingegen über 50% der Siglec-F^{lo} Zellen in diesem Zeitraum BrdU inkorporiert hatten (Abb. 2 D). Daher repräsentiert diese Subpopulation neugebildete und neurekrutierte eosinophile Granulozyten. Siglec-F^{hi} eosinophile Granulozyten sind daher schon vor der BrdU-Gabe gebildet worden, und werden ohne weitere Zellteilungen aus dem Blut oder aus der Milz in die Lunge rekrutiert. Da es während der Infektion zu einer dramatischen Zunahme an eosinophilen Granulozyten in der Lunge kommt, aber nur wenige eosinophile Granulozyten BrdU inkorporieren, haben Zellen der Siglec-F^{hi} Population eine verlängerte Lebensdauer. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Parasiten-induzierte Eosinophilie eher auf einer verstärkten Überlebensrate und der Rekrutierung bereits existierender eosinophiler Granulozyten als auf einer verstärkten *de novo* Bildung im Knochenmark beruht.

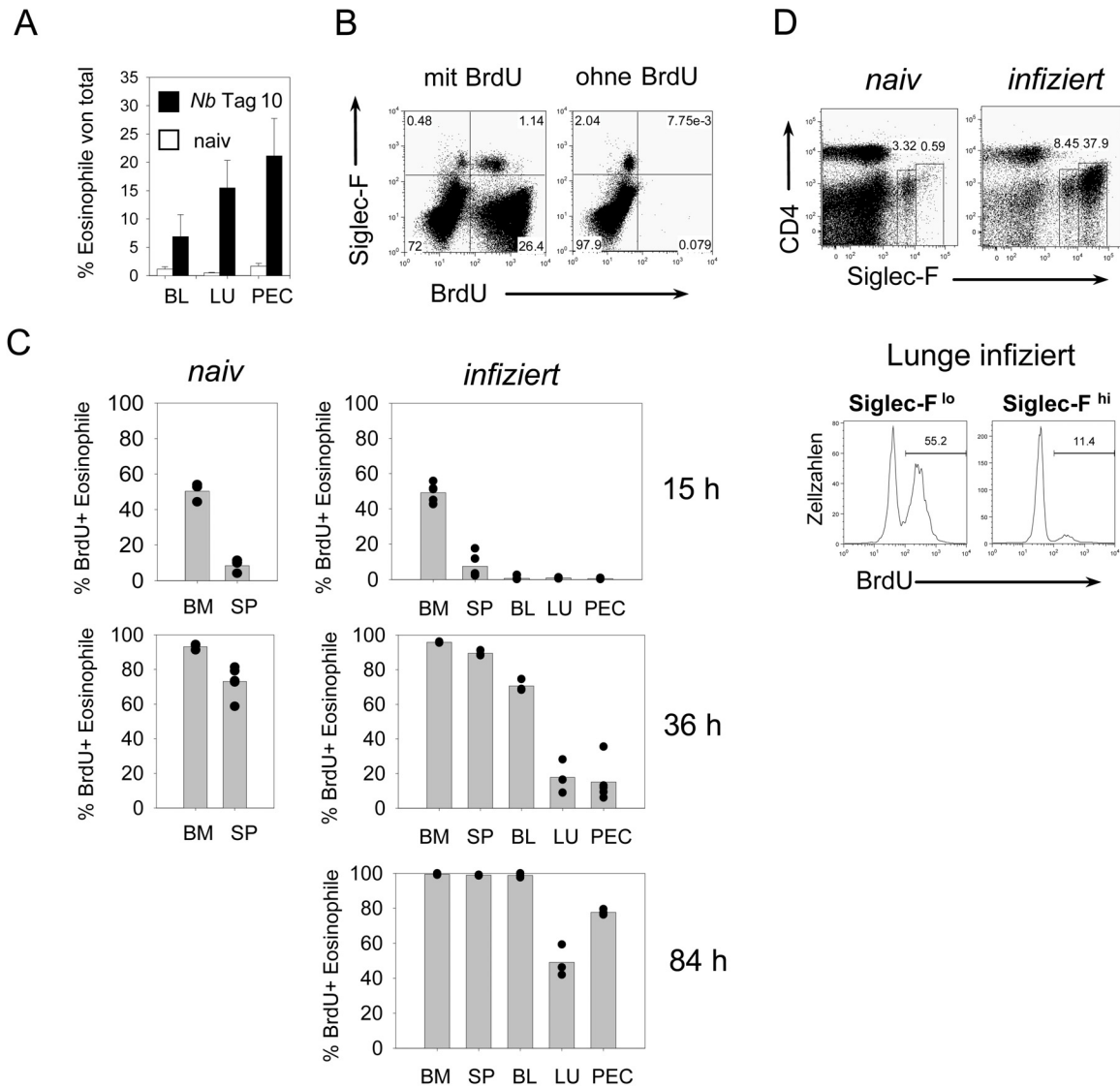


Abbildung 2. Analyse des Umsatzes eosinophiler Granulozyten. (A) Von Blut- (BL), Lungen- (LU) und Zellen aus einer Spülung des Peritoneums (PEC) von naiven (offene Balken) und *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c-Mäusen an Tag 10 (geschlossen Balken) wurde nach Färbung von Einzelsuspensionen für Siglec-F die Frequenz eosinophiler Granulozyten bestimmt. (B) Punktwolkendiagramm von Totalmilzzellen aus naiven Mäusen, welche entweder für die letzten 36h (links) BrdU oder nichts (rechts) erhalten hatten, wurden für Siglec-F und BrdU gefärbt. (C) Analyse der BrdU-Inkorporation eosinophiler Granulozyten im Knochenmark (BM), Milz (SP), Blut (BL), Lunge (LU) und Peritoneum (PEC) von naiven (links) oder *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen (rechts) nach 15-, 36- oder 84-stündiger BrdU-Gabe. (D) Einzelzellsuspensionen vom gesamten Lungengewebe wurden für CD4, Siglec-F und BrdU gefärbt. Die Punktwolkendiagramme zeigen die Frequenz von Siglec-F^{high} und Siglec-F^{low} eosinophilen Granulozyten in der Lunge von naiven (links) und *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen (rechts). Die Histogramme zeigen die Frequenz von BrdU⁺ Zellen von Siglec-F^{high} und Siglec-F^{low} eosinophilen Granulozyten in der Lunge von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und das Migrationsverhalten *in vivo* zu untersuchen, wurden eosinophile Granulozyten aus der Milz von 4get/IL-5tg-Mäusen i.v. in naive oder

N. brasiliensis-infizierte Mäuse transferiert. Eosinophile Granulozyten dieser Mäuse sind konstitutiv eGFP⁺ und können daher von endogenen eosinophilen Granulozyten unterschieden werden. Im Blut und in der Milz nahm der Anteil an transferierten eosinophilen Granulozyten rasch ab (Abb. 3 A). Eosinophile Granulozyten verschwanden auch sehr schnell aus der Lunge von naiven Mäusen, blieben jedoch in der Lunge von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen präsent, was mit einer höheren Überlebensrate aufgrund von IL-5-produzierenden Th2-Zellen erklärt werden könnte (Abb. 3 B). Überraschenderweise blieb der Anteil an transferierten eosinophilen Granulozyten im Peritoneum sowohl von naiven als auch von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen über drei Tage konstant. Dieser Effekt beruht nicht auf einer lokalen Akkumulation von transferierten Th2-Zellen, da nur wenige transferierte CD4⁺ Thy1.1⁺ T-Zellen in das Peritoneum migrierten (Abb. 3 C).

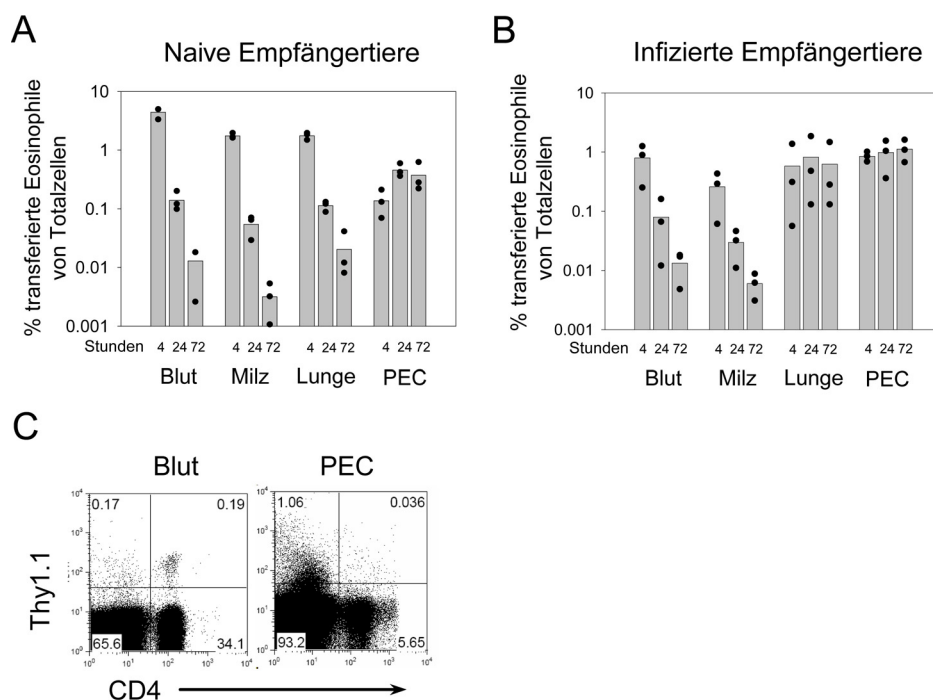


Abbildung 3. Adoptiver Transfer eosinophiler Granulozyten in naive und *N. brasiliensis*-infizierte Mäuse. 5 x 10⁷ eosinophile Granulozyten aus der Milz von 4get/IL-5tg-Mäusen wurden in die Schwanzvene von naiven (A) oder von 9 Tage zuvor mit *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c-Mäusen (B) injiziert. 4, 24 und 72 h nach Transfer wurden Einzelzellsuspensionen von Blut, Milz, Lunge und Peritoneum (PEC) für Siglec-F gefärbt und der Anteil transferierter eosinophiler Granulozyten (Siglec-F⁺/IL-4/eGFP⁺) von allen lebenden Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Es wurden drei Mäuse pro Zeitpunkt analysiert. Das Experiment ist mit dem gleichen Ergebnis wiederholt worden. (C) Bestimmung der Frequenz von Spender-T-Zellen (CD4⁺Thy1.1⁺) im Blut und im Peritoneum (PEC) von naiven Empfängertieren einen Tag nach Transfer von 10⁸ Totalmilzzellen von 4get/IL-5tg/Thy1.1-Mäusen.

Diese Transfer-Experimente zeigen, dass eosinophile Granulozyten unter bestimmten Bedingungen mehrere Tage *in vivo* überleben können und bestätigen die BrdU-Inkorporationsexperimente.

4.1.2 Das Peritoneum dient als Reservoir für reife eosinophile Granulozyten.

Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in periphere Gewebe wird vermutlich durch Gradienten entzündlicher Chemokine und Lipidmediatoren wie Eotaxin-1 und-2, LTB₄, PAF, Prostaglandin D₂ oder Komplementfaktoren (C₃ und C_{5a}) reguliert, welche alle mittels G_i Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) Signale ins Zellinnere übermitteln. GPCR können durch das Pertussistoxin (PTX) inhibiert werden. Um zu bestimmen, ob die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die verschiedenen Gewebe einen aktiven Prozess darstellt, welcher GPCR-abhängige Signalwege benötigt, wurden PTX-vorbehandelte eosinophile Granulozyten von 4get/IL-5tg-Mäusen in naive Mäuse transferiert. Überraschenderweise wanderten auf solche Art vorbehandelte Zellen in die Lunge, in die Milz und sogar in das Knochenmark ein, jedoch nicht in das Peritoneum (Abb. 4 A und B). Daher scheint für die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in das Peritoneum ein chemotaktischer Faktor notwendig zu sein, welcher GPCR-abhängig ist. CCR3 oder BLT1, zwei der wichtigsten Rezeptoren für die Chemotaxis muriner eosinophiler Granulozyten, scheinen jedoch nicht für dieses Migrationsverhalten verantwortlich zu sein (Daten nicht gezeigt).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass während einer Infektion mit *N. brasiliensis* alternativ aktivierte Makrophagen (AAM) die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die Lunge und das Peritoneum regulieren (Voehringer et al., 2007). Um zu testen, ob gewebständige Makrophagen im Peritoneum auch für die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen notwendig sind, wurden vor dem Transfer alle peritonealen Makrophagen durch Injektion Clodronat-haltiger Liposomen depletiert. Diese Vorgehensweise führte jedoch nur zu einer teilweisen Reduktion der Frequenz von endogenen als auch transferierten eosinophilen Granulozyten (Abb. 4 C). Da auch keine Unterschiede in der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in Rag2- und IL-4/IL-13-defizienten Rezipienten beobachtet wurden (Ohnmacht et al., 2007), scheinen

eosinophile Granulozyten in naiven Mäusen unabhängig von Zellen des adaptiven Immunsystems oder Makrophagen in das Peritoneum rekrutiert zu werden, während die Rekrutierung in das Peritoneum während einer *N. brasiliensis*-Infektion von AAM abhängig ist (Voehringer et al., 2007).

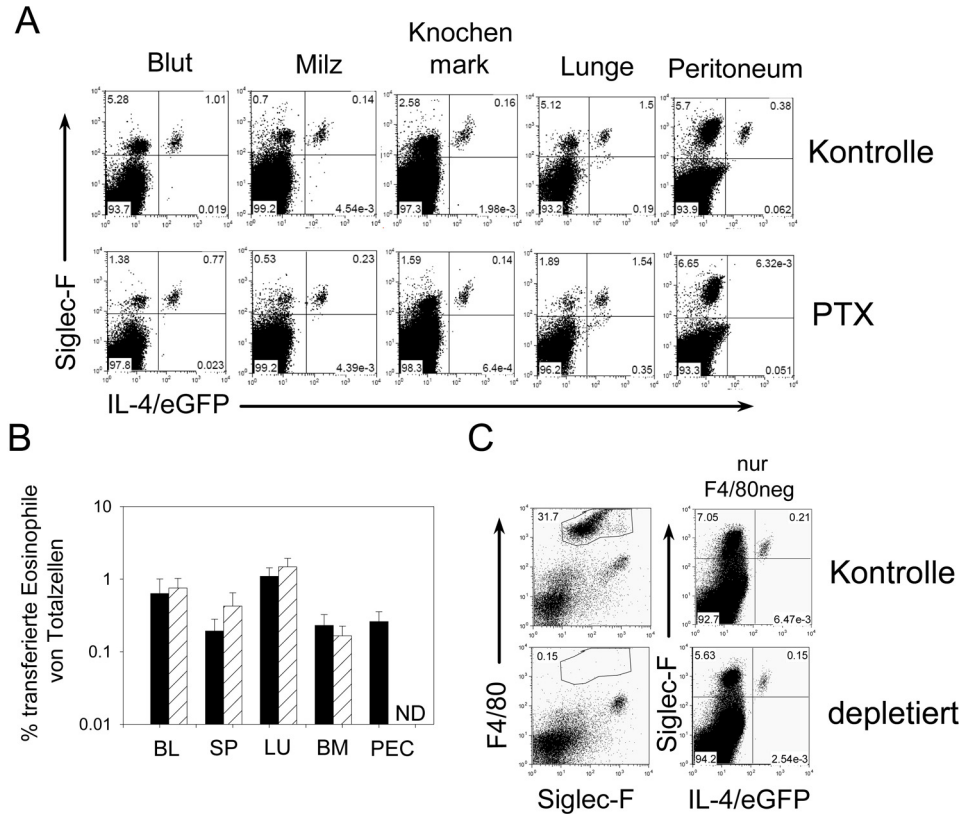


Abbildung 4. Die homöostatische Rekrutierung eosinophiler Granulozyten ist Pertussistoxin-sensitiv und unabhängig von Makrophagen. (A und B) 5×10^7 Pertussistoxin-behandelte (PTX) oder unbehandelte (Kontrolle) eosinophile Granulozyten aus der Milz von 4get/IL-5tg-Mäusen wurden in die Schwanzvene von naiven BALB/c-Mäusen gespritzt. 16 h später wurden die angegebenen Organe auf ihre Frequenz an transferierten eosinophilen Granulozyten (Siglec-F⁺/eGFP⁺) hin untersucht. Die Punktwolkendiagramme zeigen lebende, nicht-autofluoreszierende Zellen. (B) Das Diagramm zeigt die mittlere Frequenz von unbehandelten (gefüllte Balken) und PTX-vorbehandelten transferierten, eosinophilen Granulozyten (schraffierte Balken) im Blut (BL), in der Milz (SP), in der Lunge (LU), im Knochenmark (BM) und im Peritoneum (PEC). Das Ergebnis stammt von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt vier Mäusen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. ND = nicht detektierbar. (C) 5×10^7 eosinophile Granulozyten von 4get/IL-5tg-Mäusen wurden in unbehandelte BALB/c-Mäuse (Kontrolle) oder in Mäuse, in welchen zuvor durch die Gabe von Clodronat-Liposomen die peritonealen Makrophagen depletiert worden waren (depletiert), i.v. injiziert. Am nächsten Tag wurde die Frequenz von Makrophagen (F4/80⁺Siglec-F^{int}) (links) und transferierten eosinophilen Granulozyten (IL-4/eGFP⁺/Siglec-F⁺) (rechts) durchflusszytometrisch bestimmt. Die Punktwolkendiagramme zur Bestimmung eosinophiler Granulozyten (rechts) zeigen nur F4/80⁻-Zellen.

Um festzustellen, ob eosinophile Granulozyten das Peritoneum auch wieder verlassen und in den Blutkreislauf eintreten können, wurden peritoneale eosinophile Granulozyten von 4get/IL-5tg-Mäusen direkt in das Peritoneum von BALB/c-Mäusen transferiert. Tatsächlich konnte eine kleine Anzahl transferierter eosinophiler Granulozyten im Blut, in der Milz und in Lymphknoten wiedergefunden werden. Im mediastinalen Lymphknoten, welcher das Peritoneum ableitet, wurden dabei ~10mal mehr transferierte eosinophile Granulozyten entdeckt als im inguinalen Lymphknoten (Abb. 5 A). Eine Vorbehandlung mit PTX blockierte hierbei nicht den Austritt aus dem Peritoneum. Daher stellt wohl nur der Eintritt, nicht aber der Austritt eosinophiler Granulozyten aus dem Peritoneum einen aktiven Prozess dar, welcher durch GPCRs vermittelt wird.

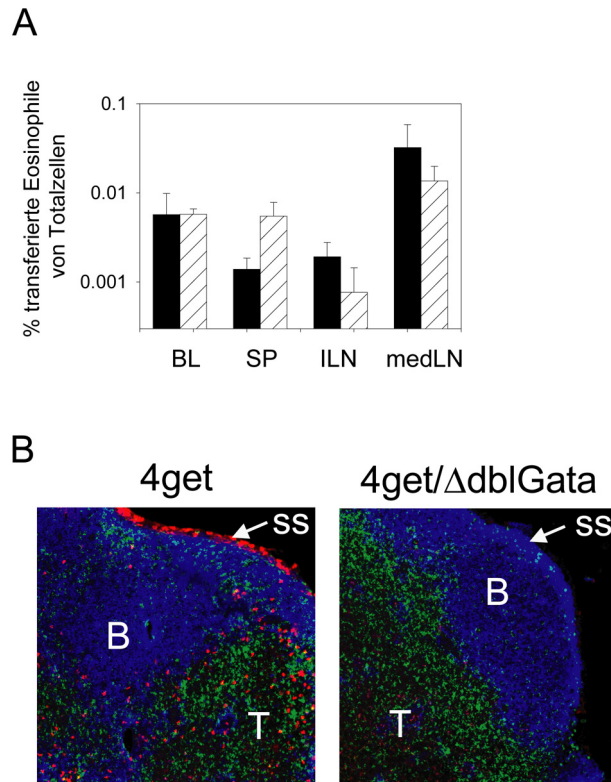


Abbildung 5. Austritt eosinophiler Granulozyten aus dem Peritoneum und Lokalisierung in Lymphknoten. (A) 5×10^7 unbehandelte (geschlossene Balken) oder mit Pertussistoxin-vorbehandelte eosinophile Granulozyten (schraffierte Balken) aus dem Peritoneum von 4get/IL-5tg-Mäusen wurden in das Peritoneum von BALB/c-Mäusen transferiert und auf die Frequenz an transferierten eosinophilen Granulozyten (Siglec-F⁺/IL-4/eGFP⁺) im Blut (BL), Milz (SP), inguinalen (ILN) und mediastinalen Lymphknoten (medLN) analysiert. Die Balken zeigen den Mittelwert + die Standardabweichung von vier verschiedenen Mäusen aus 3 unabhängigen Experimenten. (B) Gewebeschnitte des mediastinalen Lymphknotens von 4get-Mäusen (links) oder 4get/ Δ dblGata-Mäusen (rechts), welche 10 Tage zuvor mit *N. brasiliensis* infiziert worden waren. Eosinophile Granulozyten (rot), B-Zellen (blau) und T-Helferzellen (grün). Siehe Material und Methoden. T = T-Zellzone, B = B-Zellfollikel, ss = subkapsulärer Sinus.

GPCRs scheinen auch beim Eintritt in die Lymphknoten beteiligt zu sein, da sich PTX-vorbehandelte eosinophile Granulozyten in der Milz ansammelten und nur zu einem geringeren Anteil in die Lymphknoten rekrutiert wurden. Die detaillierte Lokalisierung eosinophiler Granulozyten erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbungen im mesenterischen Lymphknoten von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen. Eosinophile Granulozyten akkumulierten dabei bevorzugt im marginalen Sinus und in der T-Zellzone (Abb. 5 B). Dies lässt vermuten, dass eosinophile Granulozyten unter physiologischen Bedingungen in die Lymphknoten über afferente Lymphbahnen eintreten und dann in der T-Zellzone möglicherweise T-Zellabhängige Immunantworten modulieren können.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass die mit einer Aktivierung einhergehende Hochregulierung von Siglec-F von eosinophilen Granulozyten in der Lunge und im Peritoneum reversibel ist (Ohnmacht et al., 2007). Interessanterweise sind langlebige eosinophile Granulozyten aus dem Peritoneum schon teilweise degranuliert, da sie etwas weniger eosinophile Peroxidase (EPO) gespeichert hatten als Zellen aus der Milz (Ohnmacht et al., 2007). Daher dienen diese langlebigen eosinophilen Granulozyten mit ihrem geringeren EPO-Gehalt eventuell eher als Regulatoren von Immunantworten durch Interaktionen mit anderen Immunzellen statt als Effektorzellen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zur Wanderung und Homöostase von eosinophilen Granulozyten wurden im Journal of Immunology publiziert (Ohnmacht et al., 2007).

4.2 Untersuchungen zur Effektorfunktion und Homöostase basophiler Granulozyten.

4.2.1 Differenzierung und Entwicklung von basophilen Granulozyten.

Mastzellen und basophile Granulozyten sind die einzigen beiden Zelltypen in der Maus, welche den hochaffinen Rezeptor für IgE (FcεRI) exprimieren. Beide Zelltypen exprimieren IL-4 mRNA, so dass sie in 4get-Mäusen durch Expression von eGFP identifiziert werden können. Jedoch unterscheiden sie sich durch die Expression des Rezeptors für den Stammzellfaktor (SCF) c-Kit, welcher auf Mastzellen, jedoch nicht auf

reifen basophilen Granulozyten exprimiert wird. Zunächst sollten die Bedingungen für die Differenzierung basophiler Granulozyten aus adultem Knochenmark etabliert werden, um diese anschließend von den parallel ausdifferenzierten Mastzellen phänotypisch abzugrenzen. Knochenmarkszellen von 4get-Mäusen, welche in der Gegenwart von IL-3 und SCF kultiviert wurden, differenzierten zu basophilen Granulozyten (IL-4/eGFP⁺/c-Kit⁻) und Mastzellen (IL-4/eGFP⁺/c-Kit⁺) aus (Abb. 6 A). Eine histologische Untersuchung dieser beiden Zelltypen ergab, dass die IL-4/eGFP⁺/c-Kit⁺ Population einen runden Zellkern besitzt, während die IL-4/eGFP⁺/c-Kit⁻ Population einen segmentierten Zellkern aufweist. Diese Ergebnisse stimmen mit der bereits beschriebenen Kernmorphologie von Mastzellen und basophilen Granulozyten überein. Die besten Bedingungen zur Ausdifferenzierung basophiler Granulozyten waren die Zugabe von 0,3 ng/ml IL-3 in der Abwesenheit von SCF; daher wurden diese Bedingungen für alle weiteren Experimente zur *in vitro* Generierung von basophilen Granulozyten verwendet (Abb. 6 B und C).

Mastzellen können durch die Expression von verschiedenen Mastzell-assoziierten Serinproteasen (MMCPs) charakterisiert werden (Welle, 1997). Um zu untersuchen, ob auch basophile Granulozyten MMCPs exprimieren, wurden hochaufgereinigte Zellpopulationen aus Knochenmarkskulturen von basophilen Granulozyten und Mastzellen mittels semiquantitativer RT-PCR Analyse miteinander verglichen. MMCP-4, -6 und -7 wurden in beiden Zelltypen exprimiert, wogegen MMCP-1 und -5 nur in Mastzellen exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu wurde MMCP-8 exklusiv von basophilen Granulozyten exprimiert (Abb. 6 D). Ein charakteristischer Bestandteil von Granula in Mastzellen ist Histamin. Daher wurde auch der Histamingehalt von basophilen Granulozyten bestimmt: Mastzellen wiesen einen ungefähr sechsmal höheren Histamingehalt auf als basophile Granulozyten (Abb. 6 E). Eine durchflusszytometrische Analyse der beiden Zelltypen ergab, dass beide Zelltypen IL-3R α , Fc ϵ RI α , Fc γ RIIb/III (CD16/32), CD200R1, 2B4 und CCR2 exprimieren, wohingegen CD49b und Thy1.2 nur von basophilen Granulozyten exprimiert wurde (Abb. 6 F). Daher konnten basophile Granulozyten in 4get/rag^{-/-}-Mäusen mit einem anti-Thy1.2 mAk selektiv und effizient depletiert werden, ohne dass Mastzellen depletiert und/oder aktiviert wurden (siehe unten).

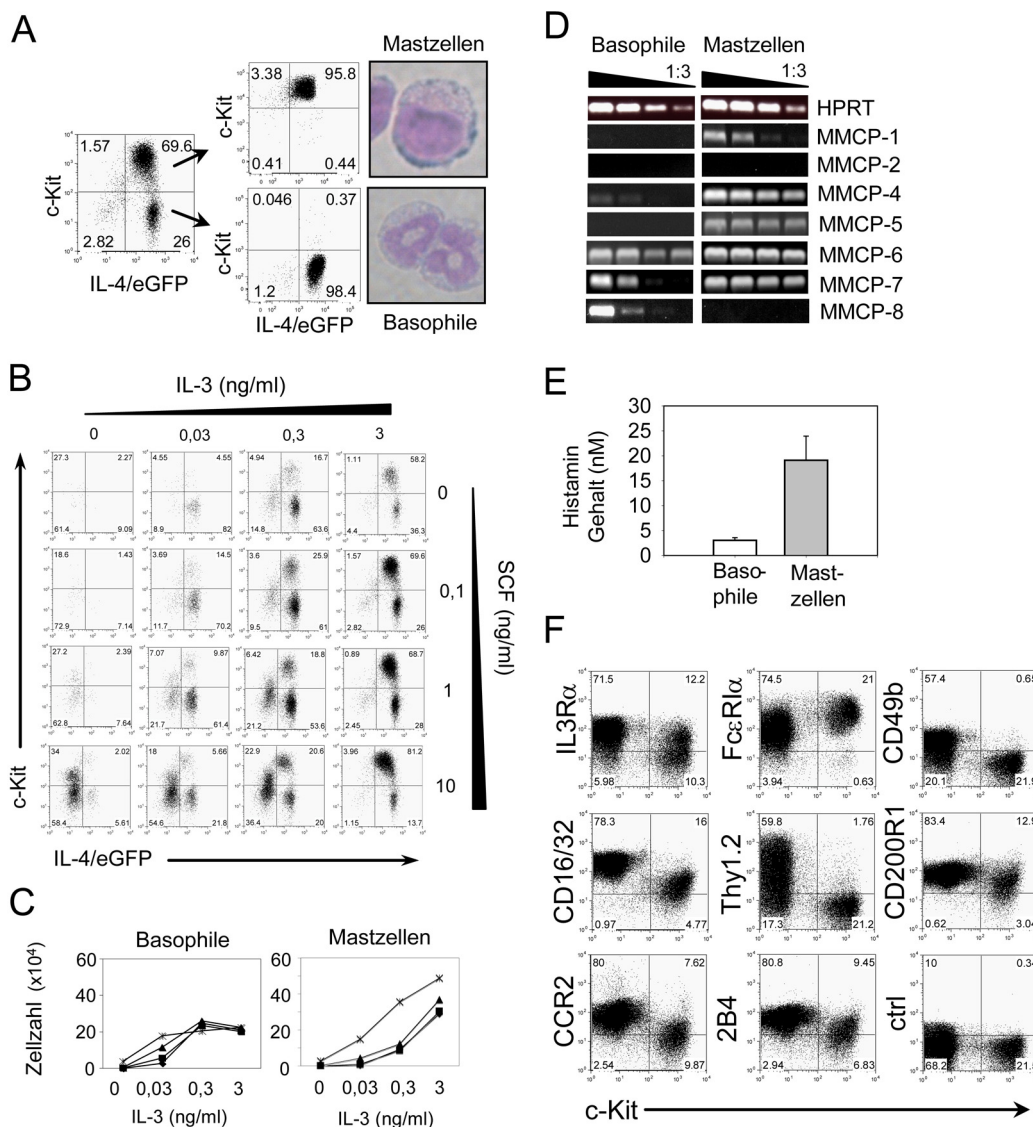


Abbildung 6. Charakterisierung von knochenmarksgenerierten basophilen Granulozyten und Mastzellen. (A) Reanalyse nach Aufreinigung und nukleare Morphologie von basophilen Granulozyten (IL-4/eGFP⁺c-Kit⁻) und Mastzellen (IL-4/eGFP⁺c-Kit⁺) nach 11-tägiger Kultur von Knochenmarkszellen von 4get-Mäusen in der Gegenwart von IL-3. (B) Titration von IL-3 und Stammzellfaktor (SCF), um die optimalen Bedingungen für die Generierung von basophilen Granulozyten *in vitro* zu bestimmen. Das Experiment ist mit gleichem Ergebnis wiederholt worden. (C) Absolute Zellzahlen von basophilen Granulozyten und Mastzellen nach 11-tägiger Kultur in Gegenwart der angegebenen IL-3-Konzentration und verschiedenen SCF-Konzentrationen (Raute = 0 ng/ml, Quadrat = 0,1 ng/ml, Dreieck = 1 ng/ml, Kreuz = 10 ng/ml). Das Experiment ist mit dem gleichen Ergebnis wiederholt worden. (D) Semiquantitative RT-PCR-Analyse von aufgereinigten, *in vitro*-generierten basophilen Granulozyten und Mastzellen, um den Expressionslevel verschiedener Mastzellproteasen (MMCP) zu bestimmen. Die PCR wurde mit 1:3 seriell verdünnter, komplementärer DNS durchgeführt. (E) Histamingehalt von sortierten basophilen Granulozyten (offener Balken) und Mastzellen (geschlossene Balken). Die Konzentration wurde in 100 μl Totalzelllysat von jeweils 1000 Zellen bestimmt. Die Balken zeigen den Mittelwert + die Standardabweichung von drei identischen Proben. (F) Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern von Mastzellen (c-Kit⁺ Zellen) und basophilen Granulozyten (c-Kit⁻ Zellen). Die Punktwolkendiagramme zeigen nur Autofluoreszenz⁻/IL-4/eGFP⁺ Zellen.

4.2.2 Basophile Granulozyten gehören zu den ersten IL-4-exprimierenden Zellen und überleben etwa 60 Stunden.

Die frühe Hämatopoese in der fötalen Leber führt zu vielen hämatopoetischen Zelllinien, einschließlich zur eosinophilen Granulozyten Zelllinie. Um zu bestimmen, ob sich Basophil-ähnliche Zellen auch in der fötalen Leber befinden, wurden Leberzellen von Tag 16,5 Föten mit Basophil-assoziierten Oberflächenmarkern gefärbt und mit dem Färbemuster von basophilen Granulozyten aus Knochenmark und Milz verglichen. Eine kleine Population von nicht-CD4⁺ T-Zellen, nicht-eosinophilen Granulozyten, welche jedoch IL-4/eGFP und IL3-R α exprimierten, konnte in der fötalen Leber identifiziert werden (Abb. 7 A). Obwohl diese Zellen noch nicht Fc ϵ RI α exprimierten und noch negativ für Oberflächen-gebundenes IgE waren, ähneln sie morphologisch basophilen Granulozyten von adulten Mäusen. Mastzellvorläuferzellen exprimieren zu diesem Zeitpunkt bereits c-Kit und sind IL-4/eGFP⁻, womit sie nicht mit der hier beschriebenen Population identisch sind. Außerdem exprimiert ein Teil dieser Basophil-ähnlichen Population in der fötalen Leber zwei Basophil-assoziierte Oberflächenmarker, CD49b und 2B4, welche von allen basophilen Granulozyten in der Milz und im Knochenmark exprimiert werden (Abb. 7 A). Daher gehören eosinophile und basophil-ähnliche Granulozyten aus der fötalen Leber zu den ersten IL-4-exprimierenden Zellen des sich entwickelnden Immunsystems.

Die Anzahl basophiler Granulozyten nimmt während einer Th2-Immunantwort stark zu (Abb. 7 B), was entweder durch eine erhöhte *de novo* Produktion im Knochenmark, einer verlängerten Lebensdauer oder einer Kombination beider Möglichkeiten verursacht werden kann. Um die Lebensdauer dieser Zellen zu bestimmen, wurden BrdU-Inkorporationsraten zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt (Abb. 7 C). In naiven Mäusen hatten nach 15 h ~44% der basophilen Granulozyten aus dem Knochenmark BrdU eingebaut, während in der Milz nur 9% BrdU⁺ waren. Diese Differenz kann durch die Verzögerung der *de novo* Bildung bis zum Austritt der Zellen aus dem Knochenmark erklärt werden. Nach 36-stündiger BrdU-Gabe waren im Knochenmark 78% und in der Milz 41% der basophilen Granulozyten BrdU⁺, daher wurde in beiden Organen innerhalb von 21 h ein Anstieg an BrdU⁺ Zellen von ca. 33% beobachtet (Abb. 7 D). Da die Zahl

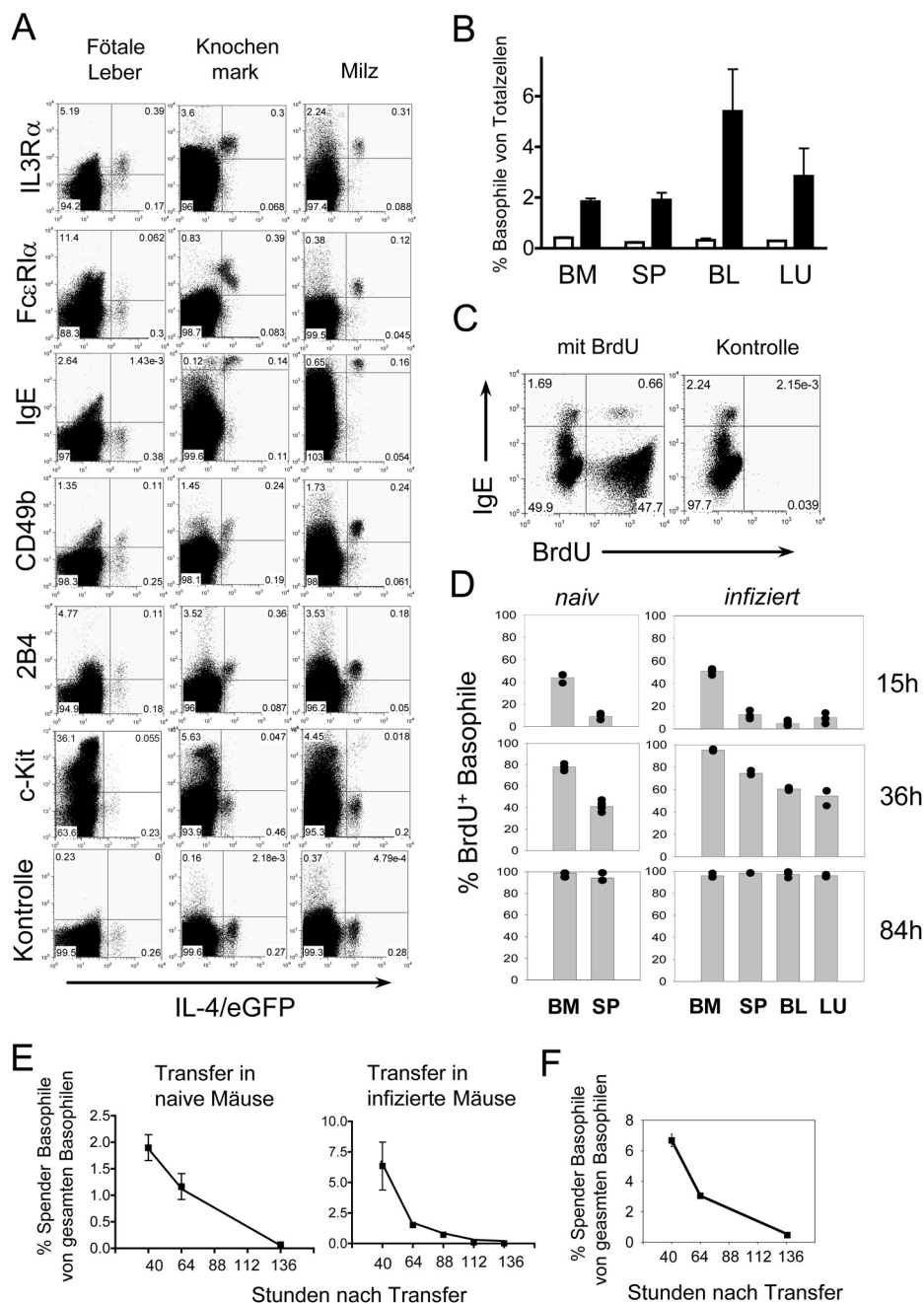


Abbildung 7. Entwicklung und Umsatz von basophilen Granulozyten. (A) Die Expression von Oberflächenmarkern auf sich entwickelnden basophilen Granulozyten. Die Punktwolkendiagramme von Tag E16.5 fötalen Leberproben von 4get-Mäusen zeigen nur nicht-eosinophile Granulozyten (Siglec-F⁺) und nicht-Erythroblasten (Ter119⁺), wohingegen bei den Knochenmarks- und Milzzellen nur CD4⁻ und Siglec-F⁻ Zellen in einem FSC^{lo}/SSC^{lo}-Fenster gezeigt und somit Mastzellen ausgeschlossen werden. Da Th2-Zellen, NKT-Zellen, Mastzellen, eosinophile – und basophile Granulozyten die einzigen IL-4/eGFP-exprimierenden Zelltypen in 4get-Mäusen sind, werden mit diesem Ausschlussverfahren nur basophile Granulozyten in der IL-4/eGFP⁺ Population angezeigt. Das Experiment ist mit einem vergleichbaren Ergebnis wiederholt worden. (B) Das Diagramm zeigt die Frequenz von basophilen Granulozyten im Knochenmark (BM), Milz (SP), Blut (BL) und Lunge (LU) vor (offene Balken) oder 9 Tage nach Infektion mit *N. brasiliensis* (geschlossene Balken). Der Mittelwert + Standardabweichung von mindestens 3 Mäusen wird angezeigt. (C) Die Identifizierung von inkorporiertem BrdU in basophilen

Granulozyten (IgE^{hi} Zellen) von BALB/c-Mäusen. (D) Die Diagramme zeigen die Inkorporation von BrdU in basophilen Granulozyten (IgE⁺B220⁻ Zellen) von naiven (links) oder *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c-Mäusen (rechts) zu den angegebenen Zeitpunkten nach BrdU-Gabe mit 3-5 Mäusen pro Gruppe. Die zusammengefassten Ergebnisse stammen von zwei unabhängigen Experimenten. (E) Die Kinetik des Verschwindens von transferierten basophilen Granulozyten von 4get-Mäusen in naiven (links) und *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c-Mäusen (rechts). Die Diagramme zeigen den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei individuellen Mäusen von zwei unabhängigen Experimenten. (F) Die Abnahme von transferierten basophilen Granulozyten in der Lunge von *N. brasiliensis*-infizierten BALB/c-Mäusen. Das Diagramm zeigt den Mittelwert \pm die Standardabweichung von drei individuellen Mäusen pro Zeitpunkt.

basophiler Granulozyten in naiven Mäusen konstant bleibt, wird die Population basophiler Granulozyten im Knochenmark und der Milz in weniger als 60 h ersetzt, was somit der Lebensdauer basophiler Granulozyten entspricht. In *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen konnte im Vergleich zu naiven Mäusen ein erhöhter Anteil an BrdU⁺ basophilen Granulozyten beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass die beobachtete Basophilie zumindest teilweise auf eine erhöhte *de novo* Produktion im Knochenmark zurückzuführen ist (Abb. 7 D). Da eosinophile Granulozyten in bestimmten Geweben ein verlängertes Überleben zeigten, wurde auch untersucht, wie lange *in vitro* differenzierte basophile Granulozyten in naiven, bzw. *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen überleben. Die transferierten Zellen verschwanden jedoch rasch aus dem peripheren Blut und häuften sich auch nicht in der Lunge von infizierten Mäusen an (Abb. 7 E und F). Daher beruht eine Basophilie im Gegensatz zur Eosinophilie während der *N. brasiliensis*-Infektion auf einer erhöhten *de novo* Produktion dieser Zellen im Knochenmark.

4.2.3 Lokalisierung von Zellen des angeborenen Immunsystems während einer *N. brasiliensis*-Infektion.

Es ist bereits bekannt, dass sich eosinophile Granulozyten bei allergischen Atemwegsentzündungen in perivaskulären und peribronchialen Regionen anhäufen, wohingegen die Lokalisierung basophiler Granulozyten in der Lunge noch unbekannt ist. Mastzellen sind normalerweise während einer akuten Entzündung der Lunge nicht vorhanden; ihre Zahl erhöht sich erst nach chronischer Gabe von Allergenen (Ikeda et al., 2003). Außerdem ist noch unbekannt, ob sich basophile Granulozyten ebenso wie eosinophile Granulozyten und Mastzellen im Dünndarm von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen identifizieren lassen und in welchen Regionen sich basophile Granulozyten in

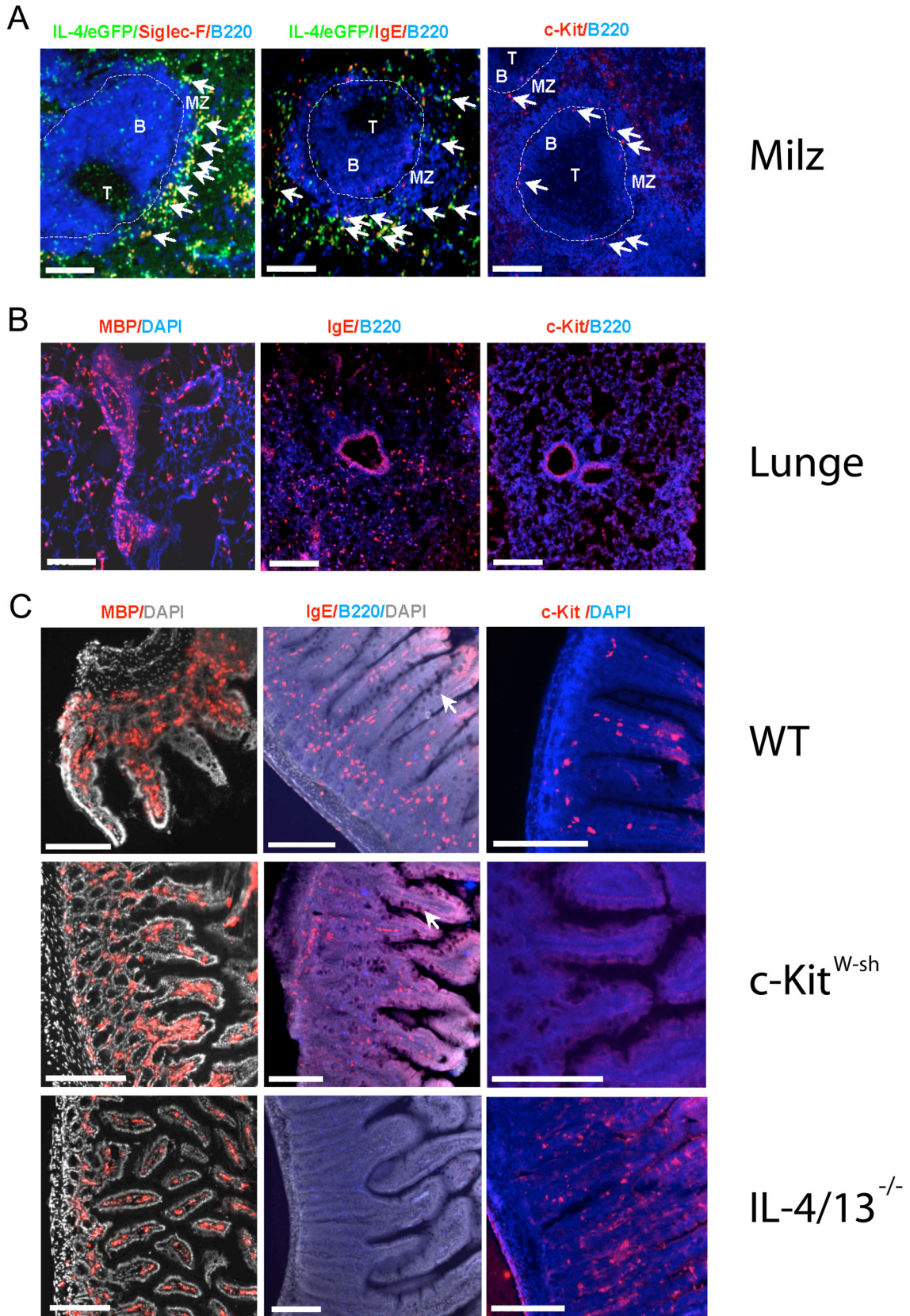


Abbildung 8. Die Lokalisierung von basophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie von Mastzellen in der Milz, in der Lunge und im Dünndarm nach einer *N. brasiliensis*-Infektion. (A) Die Pfeile zeigen die Lokalisierung von eosinophilen Granulozyten (linkes Bild; Siglec-F⁺IL-4/eGFP⁺B220⁻), basophilen Granulozyten/Mastzellen (mittleres Bild; IgE⁺IL-4/eGFP⁺B220⁻) und Mastzellen (rechtes Bild; c-Kit⁺B220⁻) in der Milz von 4get-Mäusen, die 10 Tage zuvor mit *N. brasiliensis* infiziert worden waren. T = T-Zellzone, B = B-Zellfollikel, MZ = Marginalzone. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Marginalsinus. (B) Lokalisierung von eosinophilen (linkes Bild; MBP⁺ Zellen) und basophilen Granulozyten (mittleres Bild; IgE⁺B220⁻ Zellen), sowie das Fehlen von Mastzellen (rechtes Bild; c-Kit⁺ Zellen) in der Lunge von infizierten 4get-Mäusen. (C) Lokalisierung von eosinophilen (linkes Bild; MBP⁺ Zellen), basophilen Granulozyten/Mastzellen (mittleres Bild; IgE⁺/B220⁻ Zellen) und Mastzellen (rechtes Bild; c-Kit⁺ Zellen) im Dünndarm von Wildtyp- (WT), Mastzell-defizienten c-Kit^{W-sh}- und IL-4/IL-13-defizienten Mäusen an Tag 10 nach Infektion mit *N. brasiliensis*. Die Pfeile zeigen hyperplasierende Becherzellen. Der Messbalken kennzeichnet 200 µm.

der Milz befinden. Daher sollte mittels Immunfluoreszenzmikroskopie die Lokalisierung dieser Zelltypen in der Milz, Lunge und im Dünndarm von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen bestimmt werden. Eosinophile – und basophile Granulozyten akkumulierten in der roten Pulpa ganz in Nähe der Marginalzone von Lymphfollikeln (weiße Pfeile), während Mastzellen im oder in der Nähe des Marginalsinus zu finden waren (Abb. 8 A). In der Lunge konzentrierten sich eosinophile Granulozyten in perivaskulären und peribronchialen Gebieten, während basophile Granulozyten gleichmäßig über das gesamte Lungenparenchym verteilt waren. Mastzellen konnten in der Lunge nicht detektiert werden (Abb. 8 B). Im Dünndarm konnte eine große Anzahl eosinophiler – und basophiler Granulozyten in Wildtyp- und Mastzell-defizienten c-Kit^{W-sh}-Mäuse innerhalb der Lamina propria identifiziert werden. Außerdem konnte eine Hyperplasie von Schleim-produzierenden Becherzellen in Wildtyp- und c-Kit^{W-sh}-Mäusen beobachtet werden (weiße Pfeile in Abb. 8 C). In IL-4/IL-13^{-/-}-Mäusen, welche die Würmer nicht oder nur sehr ineffizient eliminieren können, konnte keine Hyperplasie beobachtet werden (Abb. 8 C). Welcher Zelltyp das IL-4/IL-13 für die beobachtete Hyperplasie im Dünndarm sezerniert, ist bis heute noch nicht geklärt.

4.2.4 Effektorfunktion von basophilen Granulozyten.

Es ist bekannt, dass basophile Granulozyten durch die Kreuzvernetzung von Rezeptor-gebundenem IgE oder IgG1 auf der Zelloberfläche aktiviert werden können. Allerdings ist noch unklar, ob Pathogen-spezifisches IgE oder IgG1 auch entscheidend für die Aktivierung basophiler Granulozyten während einer Helminthen-Infektion ist. In der Tat konnten basophile Granulozyten *in vitro* durch sekretierte Antigene von L3 Larven

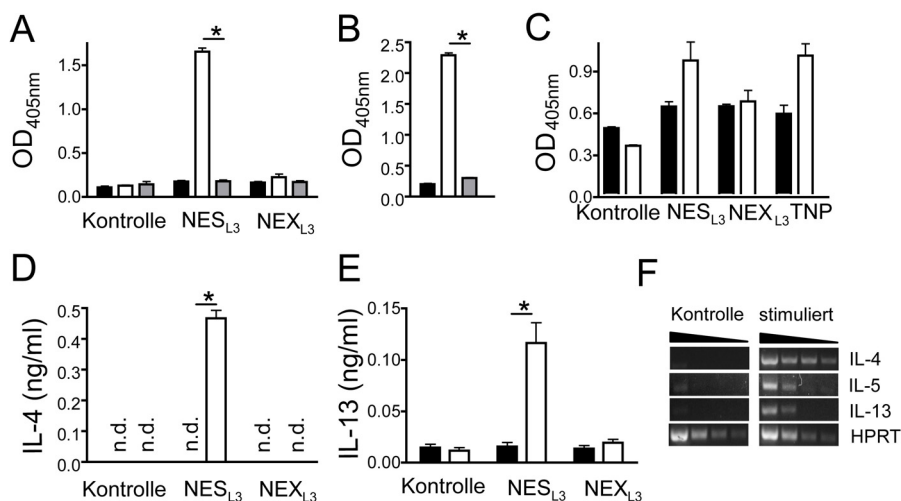


Abbildung 9. Die Aktivierung basophiler Granulozyten mittels sekretierter Substanzen von *N. brasiliensis*. (A, C) β -hexosaminidase-Freisetzung der basophil-ähnlichen murinen IC-2 Zelllinie (A) oder knochenmarksgenerierten basophilen Granulozyten (C) ohne (schwarze Balken) oder mit vorheriger Sensitivierung mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtypmäusen (weiße Balken). Die Kulturen wurden mit Antigenen aus einem totalen Larvenextrakt (NEX_{L3}) oder sekretierten Antigenen der Larven (NES_{L3}) behandelt. Diese wurden wie in Material und Methoden beschrieben hergestellt. „Kontrolle“ bezeichnet Proben, die sensitiviert, aber keinen Antigenen ausgesetzt worden waren. „TNP“ bezeichnet Proben, die mit anti-TNP IgE mAk (schwarze Balken) oder nicht (weiße Balken) sensitiviert und anschließend mit TNP-BSA als positive Kontrolle stimuliert worden waren. *, $P < 0,005$. (B) β -hexosaminidase-Freisetzung von IC-2 Zellen, die entweder mit Serum von *N. brasiliensis*-infiziertem Serum von Wildtypmäusen (weißer Balken) oder mit anti-TNP IgE mAk (grauer Balken) sensitiviert und mit NES_{L3} stimuliert worden waren. Der schwarze Balken zeigt die unstimulierte Kontrolle. (D,E) IL-4- und IL-13-Freisetzung von knochenmarksgenerierten basophilen Granulozyten nach Sensitivierung und Stimulierung wie unter (C) beschrieben. *, $P < 0,005$. Die Balken zeigen Mittelwert + die Standardabweichung von drei identischen Proben. Die Ergebnisse zeigen ein repräsentatives von insgesamt drei unabhängigen Experimenten. (F) Semiquantitative RT-PCR Analyse der IL-4, IL-5 und IL-13 Expression von knochenmarksgenerierten basophilen Granulozyten, welche entweder unbehandelt (Kontrolle) oder für 6 Stunden mit NES_{L3} (stimuliert) behandelt worden waren, nachdem die Zellen zuvor mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtypmäusen sensitiviert worden waren.

(NES_{L3}) aktiviert werden, wenn sie zuvor mit *N. brasiliensis*-spezifischem Serum sensitiviert worden waren (Abb. 9 A). Die Aktivierung war abhängig von Antigen-spezifischem IgE oder IgG1, da weder eine Sensitivierung mit Serum von IL-4/IL-13^{-/-}-Mäusen, welche nicht zum Klassenwechsel von IgE und IgG1 fähig sind, noch eine Sensitivierung mit anti-TNP spezifischem IgE zur Degranulation von basophilen Granulozyten oder Zellen der Basophil-ähnlichen Zelllinie IC-2 (Lunderius et al., 2000) nach Aktivierung mit NES_{L3} führte (Abb. 9 B und C). Totales Larvenextrakt (NEX_{L3}) hatte keine aktivierende Funktion, daher scheint die Immunantwort hauptsächlich gegen sekretierte Antigene von *N. brasiliensis* Larven gerichtet zu sein. Die Aktivierung führte in basophilen Granulozyten sowohl zur Expression von IL-4, IL-5 und IL-13 als auch zur

Degranulation und zur Sezernierung von IL-4 und IL-13 (Abb. 9 D, E und F). Basophile Granulozyten konnten auch IL-5 nach Antigen-spezifischer Aktivierung sezernieren. Dies lässt darauf schliessen, dass basophile Granulozyten auch die Mobilisierung und das Überleben eosinophiler Granulozyten beeinflussen können ((Ohnmacht and Voehringer, 2009) und siehe unten).

4.2.5 Basophile Granulozyten fördern die Eosinophilie und tragen zur Eliminierung von *N. brasiliensis* bei.

Um die Rolle von basophilen Granulozyten *in vivo* zu untersuchen, müssen diese selektiv und effizient depletiert werden. Frühere Studien benutzten dazu anti-FcεRIα- oder anti-CD200R3 mAk (Obata et al., 2007; Sokol et al., 2008). Jedoch werden diese beiden Moleküle auch von Mastzellen exprimiert, wodurch diese ebenfalls depletiert und/oder aktiviert werden könnten. Um diese Effekte zu vermeiden, wurden anti-Thy1.2 mAk zur Depletion basophiler Granulozyten benutzt, da dieser Marker weder auf eosinophilen Granulozyten noch auf Mastzellen exprimiert wird (Abb. 6 F und Daten nicht gezeigt). In normalen 4get-Mäusen konnten jedoch basophile Granulozyten nicht effizient depletiert werden, da höchstwahrscheinlich der Hauptteil des anti-Thy1.2 mAk von T-Zellen gebunden wurde. In 4get/rag^{-/-}-Mäusen jedoch konnten basophile Granulozyten durch eine einzige Injektion von 0,5 mg anti-Thy1.2 für 10 Tage depletiert werden, da T- und B-Zellen in diesen Mäusen fehlen (Abb. 10 A und B). Dabei wurde in diesem Zeitraum keine Depletion von eosinophilen Granulozyten beobachtet, was darauf hindeutet, dass der anti-Thy1.2 mAk keine potentiell gemeinsame Vorläuferpopulation von eosinophilen und basophilen Granulozyten depletiert (Abb. 10 C). Um basophile Granulozyten antigenspezifisch *in vivo* aktivieren zu können, wurden basophile Granulozyten in 4get/rag^{-/-}-Mäusen durch Injektion von Serum aus *N. brasiliensis*-infizierten Wildtyp-Mäusen sensitiviert (Abb. 10 D und E). Die Depletion von auf solche Weise passiv „bewaffneter“ basophilen Granulozyten ermöglicht die Untersuchung der Zellfunktion während der Effektorphase einer Th2-Immunantwort.

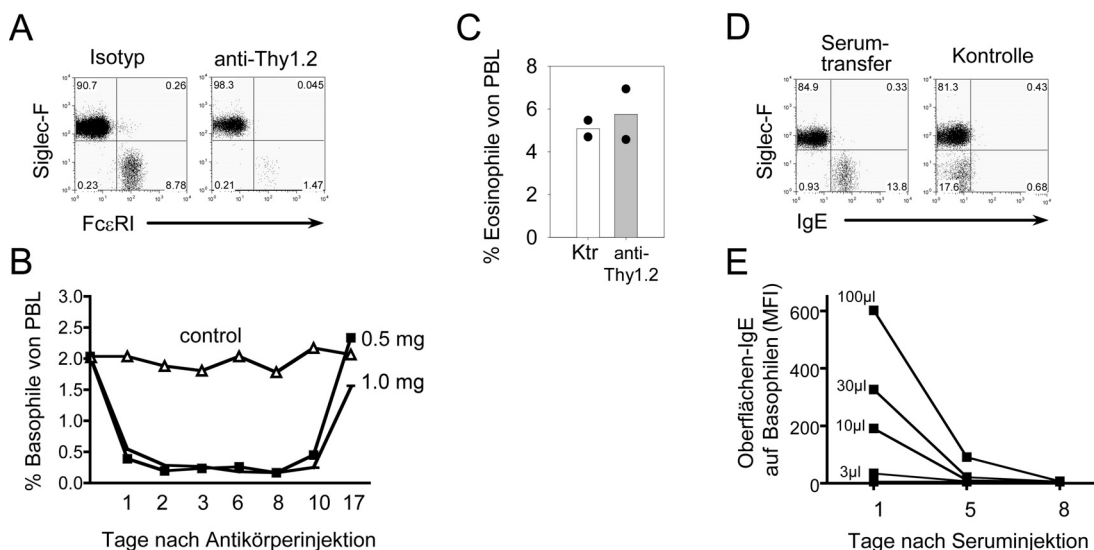


Abbildung 10. Die Depletion von basophilen Granulozyten durch eine anti-Thy1.2 Behandlung und deren Sensitivierung durch Serumtransfer. (A) Punktwerkendiagramm von Blutproben von $4get/rag^{-/-}$ -Mäusen vor (links) und nach (rechts) der anti-Thy1.2 Behandlung. Die Diagramme zeigen nur Autofluoreszenz⁻/IL-4/eGFP⁺ Zellen und repräsentieren eosinophile (Siglec-F⁻FcεRI⁻) und basophile (Siglec-F⁻FcεRI⁺) Granulozyten. (B) Kinetiken der Depletion von basophilen Granulozyten im Blut nach Gabe von 0,5 mg oder 1 mg anti-Thy1.2 mAk. Die Ergebnisse repräsentieren Durchschnittswerte von zwei Mäusen pro Zeitpunkt und Bedingung. (C) Die Frequenz eosinophiler Granulozyten im Blut von zwei einzelnen Mäusen nach der Depletion basophiler Granulozyten (anti-Thy1.2) oder Kontrollmäusen am Tag zwei nach der Antikörpergabe. (D) Punktwerkendiagramm von Blutproben von $4get/rag^{-/-}$ -Mäusen vor (Kontrolle) oder nach (Serumtransfer) dem Transfer von Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtypmäusen. Die Diagramme zeigen nur Autofluoreszenz⁻/IL-4/eGFP⁺ Zellen und repräsentieren eosinophile (Siglec-F⁻) und basophile (Siglec-F⁺) Granulozyten. (E) Kinetik der IgE-Abnahme. Die angezeigte Menge an Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtypmäusen wurde in $4get/rag^{-/-}$ -Mäuse transferiert und die durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) von auf der Zelloberfläche-gebundenem IgE von basophilen Granulozyten an Tag 1, 5 und 8 bestimmt.

Zunächst wurden $4get/rag^{-/-}$ -Mäuse mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten oder naiven Kontroll-Mäusen sensitiviert und entweder basophile Granulozyten depletiert oder nicht. Mäuse, welche mit Serum von *N. brasiliensis* sensitiviert worden waren, zeigten nach Infektion mit *N. brasiliensis* eine starke Zunahme an eosinophilen und basophilen Granulozyten im Vergleich zu Mäusen, welche nur ein Kontrollserum erhalten hatten. Die Gabe von anti-Thy1.2 mAk führte zur beinahe vollständigen Depletion von basophilen Granulozyten in der Lunge, der Milz und im Blut (Abb. 11 A). Interessanterweise hatten basophil-depletierte und sensitivierte Mäuse auch weniger eosinophile Granulozyten in der Lunge, der Milz und im Blut. Dagegen waren die Zellzahlen von Mastzellen und eosinophilen Granulozyten im Peritoneum, in dem sich im Allgemeinen keine basophilen Granulozyten befinden, zwischen den beiden Gruppen

vergleichbar (Abb. 11 B). Zusätzlich wurde mittels RT-PCR Analyse festgestellt, dass erhöhte Expressionsspiegel der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 an Tag 4 nach Infektion in 4get/rag^{-/-}-Mäusen von der Anwesenheit sensitivierter basophiler Granulozyten abhängig sind (Abb. 11 C).

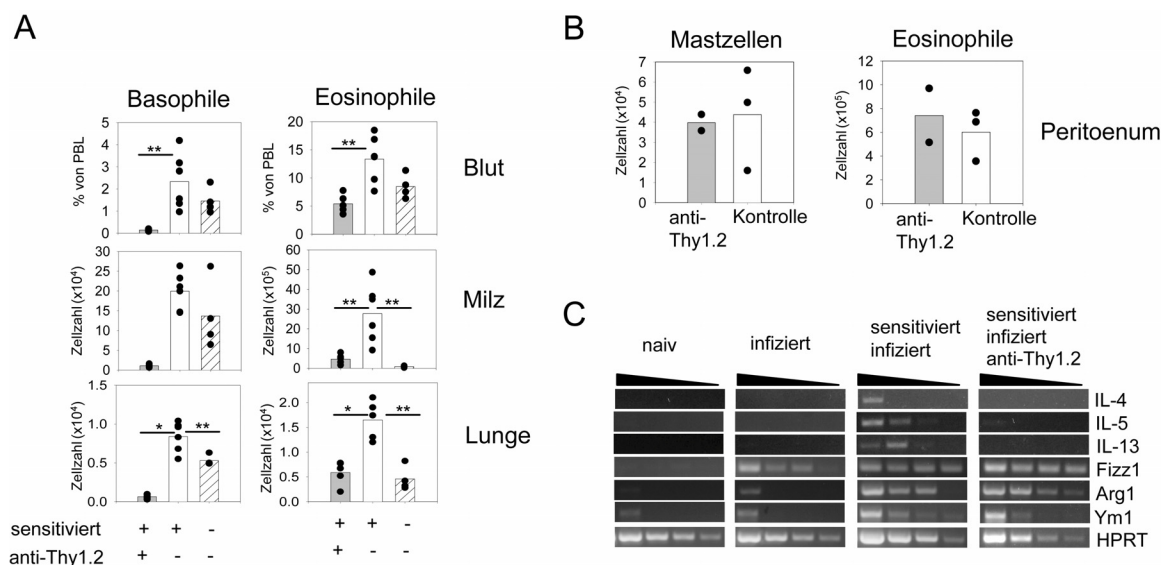


Abbildung 11. Die Depletion von basophilen Granulozyten während einer Infektion in sensitivierten 4get/rag^{-/-}-Mäusen. (A) Die Diagramme zeigen den Anteil und die absolute Anzahl an basophilen (links) und eosinophilen (rechts) Granulozyten im Blut, der Milz und der Lunge von anti-Thy1.2-behandelnten (weiße Balken) oder Kontroll- (offene Balken) 4get/rag^{-/-}-Mäusen, welche zuvor mit Serum von Wildtypmäusen sensitiviert und 10 Tage zuvor mit *N. brasiliensis* infiziert worden waren. Als Kontrolle erhielten Mäuse auch Serum von naiven Mäusen (schraffierte Balken). Die Diagramme zeigen die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 5-6 Mäusen. *, $P < 0,001$; **, $P < 0,05$ nach Mann-Whitney U-Test. (B) Das Diagramm zeigt die Anzahl an Mastzellen und eosinophilen Granulozyten im Peritoneum von sensitivierten und infizierten 4get/rag^{-/-}-Mäusen, welche mit anti-Thy1.2 behandelt wurden (geschlossene Balken) oder nicht (offene Balken). (C) Semiquantitative RT-PCR Analyse vom gesamten Lungengewebe von Th2-assoziierten Zytokinen und Markern von alternativ aktivierten Makrophagen. Folgende Bedingungen wurden verglichen: naiv = nicht-infizierte 4get/rag^{-/-}-Mäuse; infiziert = infizierte 4get/rag^{-/-}-Mäuse an Tag 4; sensitiviert und infiziert = 4get/rag^{-/-}-Mäuse, welche zusätzlich vor der Infektion mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtypmäusen sensitiviert worden waren; sensitiviert, infiziert und anti-Ty1.2 = sensitivierte und infizierte 4get/rag^{-/-}-Mäuse, welche zusätzlich durch eine anti-Thy1.2 Injektion von basophilen Granulozyten depletiert worden waren.

IL-4 und IL-13 sind essentiell für die Ausdifferenzierung von alternativ aktivierten Makrophagen (AAM), einem kürzlich identifizierten Zelltyp, welcher unter anderem an der Immunantwort gegen Helminthen beteiligt ist (Anthony et al., 2006; Zhao et al., 2008). Daher wurden die Expressionsspiegel von drei charakteristischen Markern für AAM (*Ym1*, *Fizz1* und *Arg 1*) in der Lunge mittels RT-PCR bestimmt. Erhöhte

Expressionslevel von AAM-Markern wurden in infizierten Rag-defizienten Mäusen im Vergleich zu naiven Kontroll-Mäusen gemessen. Eine vorherige Sensitivierung mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtyp-Mäusen erhöhte die Expression noch weiter. Die Depletion basophiler Granulozyten konnte diesen Effekt nicht unterbinden (Abb. 11 C). Da basophile und eosinophile Granulozyten die einzigen IL-4/eGFP-produzierenden Zellen in der Lunge von 4get/rag^{-/-}-Mäusen sind, müssen entweder die verbleibenden, nicht-depletierten basophilen Granulozyten oder aber eosinophile Granulozyten genügend IL-4/IL-13 für die Ausdifferenzierung von AAM produzieren.

Es wurde bereits früher gezeigt, dass die effiziente Rekrutierung eosinophiler und basophiler Granulozyten zu Orten der eigentlichen Immunantwort und die Wurmausscheidung auf CD4⁺ T-Zellen beruhen. Jedoch sind für diesen Effekt keine IL-4/IL-13-produzierende Th2-Zellen notwendig (Min et al., 2004; Voehringer et al., 2006). Um die Rolle von basophilen Granulozyten für die Eosinophilie und die Wurmausscheidung in Mäusen mit einem adaptiven Immunsystem ohne Th2-Zellen zu untersuchen, wurden 4get/rag^{-/-}-Mäuse mit Totalmilz- und Lymphknotenzellen von kongenen IL-4/IL-13-defizienten Thy1.1-Mäusen rekonstituiert. Mit diesem Ansatz können nun basophile Granulozyten depletiert werden, während T-Zellen, eosinophile Granulozyten und Mastzellen weder depletiert noch aktiviert werden. Wie erwartet, führte eine *N. brasiliensis*-Infektion auch in den rekonstituierten Mäusen zu einer massiven Eosinophilie und Basophilie in der Lunge und der Milz. Die Depletion basophiler Granulozyten verhinderte auch in diesen Mäusen eine Eosinophilie im selben Maß wie in nicht-rekonstituierten 4get/rag^{-/-}-Mäusen (Abb. 12 A). Interessanterweise wurde keine Eosinophilie beobachtet, wenn die Basophilie durch einen Transfer von T-Zellen, welche zuvor mit einem IL-3-kodierenden Retrovirus transfiziert worden waren, ausgelöst wurde (Abb. 12 B). Dies deutet darauf hin, dass nicht allein der Anstieg von basophilen Granulozyten zu einer Eosinophilie führt, sondern dass basophile Granulozyten auch aktiviert werden müssen, um eine Eosinophilie hervorzurufen, beispielsweise durch den Transfer von Serum von infizierten Mäusen und eine anschließende Infektion (Abb. 11 A und 12 A).

Die Ausscheidung von *N. brasiliensis* kann auch in der Abwesenheit von Mastzellen erfolgen (Crowle and Reed, 1981), beruht jedoch auf der Expression von IL-4/IL-13

eines nicht-Eosinophilen Zelltyps des angeborenen Immunsystems (Voehringer et al., 2006). Diese Befunde deuteten auf eine wichtige Rolle von basophilen Granulozyten bei der Wurmausscheidung hin. Daher wurde die Eliminierung der Parasiten in Basophil-depletierten $4get/rag^{-/-}$ -Mäusen untersucht, welche zuvor mit IL-4/IL-13-defizienten Leukozyten rekonstituiert worden waren. Basophil-depletierte Mäuse zeigten eine signifikant verminderte Eliminierung an Tag 10 nach Infektion, während die Wurmausscheidung in nicht-depletierten Mäusen sehr effizient war (Abb. 12 C). 2 von 9 anti-Thy1.2-behandelte Mäuse konnten die Würmer trotzdem eliminieren, was vermuten lässt, dass entweder die Depletion basophiler Granulozyten in diesen Mäusen nicht effizient genug war oder dass andere Zelltypen ausreichend für die Wurmausscheidung waren.

Dieser Teil der Ergebnisse zur Effektorfunktion und Homöostase von basophilen Granulozyten wurden kürzlich in der Fachzeitschrift Blood publiziert (Ohnmacht and Voehringer, 2009).

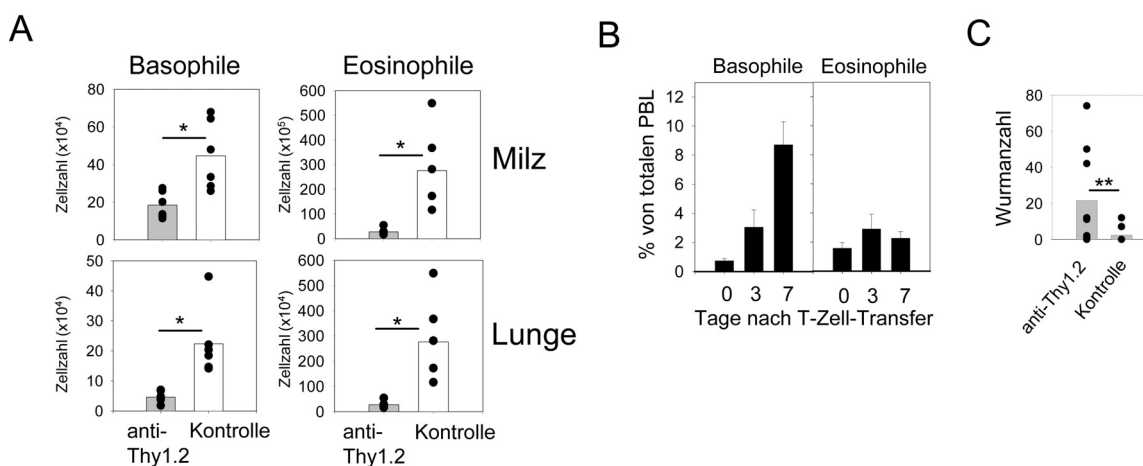


Abbildung 12. Reduzierte Eosinophilie und verminderter Eliminierung von *N. brasiliensis* in Basophil-depletierten Mäusen. (A) $4get/rag^{-/-}$ -Mäuse wurden mit 7×10^7 Leukozyten von IL-4/IL-13 $^{-/-}$ -Mäusen rekonstituiert, mit *N. brasiliensis* infiziert und mit Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtypmäusen sensitiviert. Zusätzlich wurden entweder basophile Granulozyten depletiert (geschlossene Balken) oder nicht (offene Balken). Die Anzahl an basophilen und eosinophilen Granulozyten in der Lunge und in der Milz wurde am Tag 10 nach der Infektion bestimmt. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 6 Mäusen pro Gruppe. *, $P < 0,01$ nach Mann-Whitney U-Test. (B) IL-3-induzierte Basophilie führt nicht zur Eosinophilie. Polyklonale T-Zellen wurden mit einem IL-3-kodierenden Retrovirus transfiziert und in normale $4get$ -Mäuse transferiert. Das Diagramm zeigt die Frequenz basophiler (links) und eosinophiler (rechts) Granulozyten von den gesamten peripheren Blutlymphozyten (PBL) zu den angegebenen Tagen nach Transfer der T-Zellen. (C) Das Diagramm zeigt die Anzahl adulter Würmer im Dünndarm an Tag 10 nach Infektion der in (A) beschriebenen Mäuse. Die Mäuse waren ebenfalls Basophil-depletiert (geschlossene Balken) oder nicht (offene Balken). Das Diagramm zeigt die zusammengefassten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt 8-9 Mäusen pro Gruppe. **, $P = 0,021$ nach Mann-Whitney U-Test.

4.2.6 Mastzellen und basophile Granulozyten in c-Kit^{W-sh}-Mäusen.

Mastzellen sind funktionell eng verwandt mit den zuvor untersuchten basophilen Granulozyten und könnten daher auch eine Rolle bei der raschen Eliminierung von Hakenwürmern spielen. Tatsächlich zeigten frühe Studien, dass Mastzellen die Eliminierung von *N. brasiliensis* beschleunigen können (Crowle and Reed, 1981). Diese Studien benutzten dazu vor allem den Mastzell-defizienten c-Kit^{W/W-v}-Mausstamm, welcher allerdings zusätzlich zum Fehlen von Mastzellen eine Reihe anderer Defekte wie Anämie, Sterilität, das Fehlen von γ/δ T-Zellen im Dünndarm, das Fehlen der interstitiellen Zellen von Cajal, verminderte Melanogenese, relativ wenige neutrophile Granulozyten, sowie eine anormale Schrittmacher-Aktivität im Dünndarm aufweist (Maeda et al., 1992). All diese Defekte könnten jedoch auch zu einer verzögerten Eliminierung der Parasiten beitragen und erschweren somit die Interpretation dieser frühen Experimente. Daher wird für die Untersuchung zur Funktion von Mastzellen während der Infektion mit Hakenwürmern ein physiologischeres Modell benötigt. Die meisten der oben beschriebenen Effekte im c-Kit^{W/W-v}-Mausstamm werden im c-Kit^{W-sh}-Mausstamm (Lyon and Glenister, 1982), einem anderen Mastzell-defizienten Mausstamm, nicht beobachtet. Zudem ist dieser Mausstamm auch auf C57BL/6 Hintergrund verfügbar und scheint somit ein gutes Modell zum Studium zur Funktion von Mastzellen *in vivo* darzustellen.

Daher wurde der Mastzell-defiziente c-Kit^{W-sh}-Mausstamm verwendet, um die Rolle von Mastzellen während einer primären und sekundären Infektion mit *N. brasiliensis* zu untersuchen. Obwohl adulte c-Kit^{W-sh}-Mäuse Mastzell-defizient sind, können Mastzellen 10 Tage nach Geburt in der Haut detektiert werden (Tono et al., 1992). Dies lässt vermuten, dass die „Sash“-Mutation vor dem c-Kit Promotor nicht grundsätzlich die Differenzierung von Mastzellen blockiert. Daher wurde untersucht, ob Mastzellen aus Knochenmarkszellen in Anwesenheit von IL-3 differenziert werden können. Das Zytokin IL-3 führt zur Entwicklung von Mastzell-Vorläuferzellen in der Abwesenheit von c-Kit Ligand (SCF). Knochenmarkszellen von Wildtyp-Mäusen differenzierten mit der Zeit zunehmend in c-Kit⁺FcεRI⁺ Mastzellen, wohingegen diese Population in Kulturen von c-Kit^{W-sh}-Mäusen komplett abwesend war (Abb. 13 A). Allerdings konnte in diesen Kulturen eine große Population an c-Kit⁻ FcεRI⁺ Zellen beobachtet werden, welche

potentielle Mastzellvorläuferzellen darstellen könnten. Die Entwicklung von basophilen Granulozyten ($c\text{-Kit}^- \text{Fc}\epsilon\text{RI}^+ \text{IL-3R}\alpha^+ \text{CD49b}^+ \text{CD200R1}^+ \text{CD200R3}^+$) hingegen wurde durch die „Sash“ Mutation nicht beeinträchtigt (Abb. 13 B).

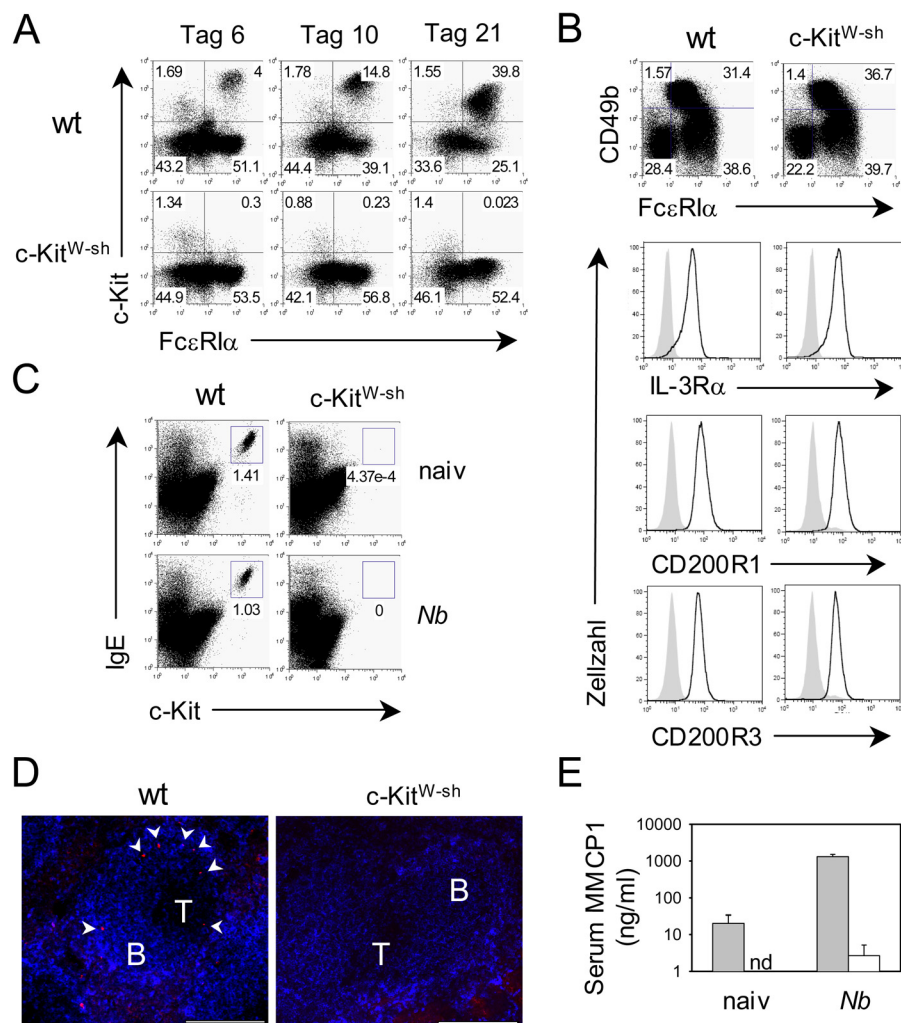


Abbildung 13. Mastzellen, aber nicht basophile Granulozyten fehlen in $c\text{-Kit}^{\text{W-sh}}$ -Mäusen. (A) Knochenmarkszellen von $c\text{-Kit}^{\text{W-sh}}$ - und Wildtyp (wt)-Mäusen wurden bis zu den angegebenen Zeitpunkten in der Gegenwart von IL-3 kultiviert. Mastzellen wurden durch die Expression von c-Kit und FcεRI identifiziert. (B) Knochenmarkskulturen von $c\text{-Kit}^{\text{W-sh}}$ -Mäusen wurden an Tag 10 für FcεRI und CD49b gefärbt, um den Phänotyp von $\text{Fc}\epsilon\text{RI}^+ / c\text{-Kit}^-$ Zellen zu bestimmen. Die Histogramme zeigen den Phänotyp von CD49b^+ -Zellen, welche zusätzlich für IL-3Rα, CD200R1 oder CD200R3 (offen) oder Isotyp-Kontrollen (geschlossen) gefärbt worden waren. Die Punktwolkendiagramme zeigen nur Autofluoreszenz⁻ Zellen. (C) Die Punktwolkendiagramme zeigen eine IgE- und c-Kit-Färbung von Zellen aus dem Peritoneum von naiven oder *N. brasiliensis*-infizierten $c\text{-Kit}^{\text{W-sh}}$ - und Wildtyp-Mäusen. (D) Gefrierschnitte von der Milz von *N. brasiliensis*-infizierten $c\text{-Kit}^{\text{W-sh}}$ - oder Wildtyp-Mäusen wurden für c-Kit (rot) und B220 (blau) gefärbt. Die Pfeilspitzen zeigen auf Mastzellen. T = T-Zellzone, B = B-Zellfollikel. Der Messbalken kennzeichnet 200 μm. (E) Das Diagramm zeigt den Spiegel von MMCP-1 im Serum von naiven oder *N. brasiliensis*-infizierten $c\text{-Kit}^{\text{W-sh}}$ - (offene Balken) oder Wildtyp-Mäusen (geschlossene Balken). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Es wurden mindestens drei Mäuse pro Bedingung verwendet. nd = nicht detektierbar.

Da die meisten Helminthen in Wildtyp-Mäusen eine starke Mastozytose hervorrufen, wurde auch untersucht, ob sich Mastzellen in c-Kit^{W-sh}-Mäusen nach Infektion mit *N. brasiliensis* entwickeln können. Eine Analyse der Milz, des Dünndarms und von Zellen aus einer Spülung des Peritoneums bestätigte das vollständige Fehlen von Mastzellen in *N. brasiliensis*-infizierten c-Kit^{W-sh}-Mäusen (Abb. 8 C, Abb. 13 C und D). Außerdem wurde die Konzentration von *mouse mast cell protease 1* (MMCP-1) im Serum bestimmt, da dieses Protein exklusiv von Mastzellen exprimiert wird und als Marker für die Aktivierung von Mastzellen verwendet werden kann (Abb. 6 D und (Huntley et al., 1990)). Wie erwartet führte eine Infektion von Wildtyp-Mäusen mit *N. brasiliensis* zu einem mehr als 60-fachen Anstieg von MMCP-1. Im Serum von naiven c-Kit^{W-sh}-Mäusen konnte jedoch kein MMCP-1 detektiert werden und auch die Infektion mit *N. brasiliensis* führte nur zu einem minimalen Anstieg über die Nachweisgrenze (Abb. 13 E). Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass sich keine Hinweise für die Anwesenheit von Mastzellen in Knochenmarkskulturen oder adulten, *N. brasiliensis*-infizierten c-Kit^{W-sh}-Mäusen finden lassen, während sich basophile Granulozyten normal entwickelten.

4.2.7 c-Kit^{W-sh}-Mäuse haben niedrigere IgE-Spiegel und zeigen eine verzögerte Eliminierung von *N. brasiliensis*.

Im Blut und in der Milz von c-Kit^{W-sh}-Mäusen wurde eine normale Frequenz an basophilen Granulozyten festgestellt (Abb. 14 A). Jedoch konnten diese im Gegensatz zu basophilen Granulozyten von gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen nicht für IgE auf der Zelloberfläche angefärbt werden; entweder, weil die IgE-Bildung, oder weil die Bindung von IgE an FcεRI auf basophilen Granulozyten in c-Kit^{W-sh}-Mäusen gestört ist. Um diese beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Wildtyp-Mäusen, welches eine hohe Konzentration an IgE enthält, transferiert. Dieser Serumtransfer war ausreichend, um IgE⁺ basophile Granulozyten im peripheren Blut nachzuweisen (Abb. 14 B). Daher sind reduzierte IgE-Spiegel, und nicht ein genereller Defekt von basophilen Granulozyten IgE zu binden, für den beobachteten Phänotyp verantwortlich. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Serum IgE-Spiegel auch direkt mittels eines ELISA gemessen. Die basalen IgE-Spiegel waren in naiven c-Kit^{W-sh}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen rund 40fach reduziert. Obwohl die IgE-Spiegel

in beiden Mausstämmen nach Infektion mit *N. brasiliensis* anstiegen, blieben diese in c-Kit^{W-sh}-Mäusen doch signifikant niedriger (Abb. 14 C). Daher spielen Mastzellen eine entscheidende Rolle sowohl bei der Regulierung des basalen- als auch des antigen-spezifischen Serum IgE-Spiegels.

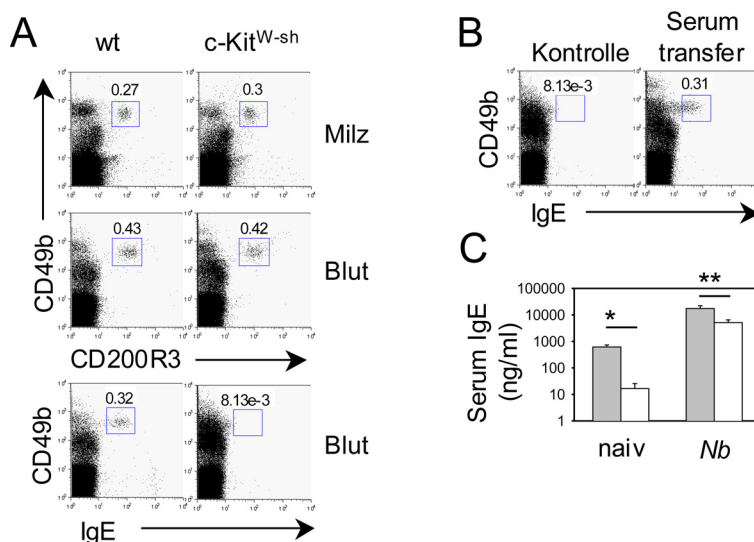


Abbildung 14. Die basalen IgE-Spiegel sind in c-Kit^{W-sh}-Mäusen drastisch reduziert. (A) Blut- oder Milzzellen von c-Kit^{W-sh}- oder Wildtyp-Mäusen wurden für CD49b und CD200R3 (obere Diagramme) gefärbt, um basophile Granulozyten (CD49b⁺CD200R3⁺) zu identifizieren. Alternativ wurde für CD49b und IgE (untere Diagramme) gefärbt, um an basophile Granulozyten gebundenes IgE (CD49b⁺IgE⁺) zu detektieren. (B) Blut von c-Kit^{W-sh}-Mäusen wurde entweder vor (links) oder 15 h nach dem Transfer von 80 µl Serum von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen (rechts) für CD49b und IgE gefärbt. (C) zeigt die Serum IgE-Spiegel von naiven oder 10 Tage zuvor mit *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen. Die offenen Balken stehen für c-Kit^{W-sh}-Mäuse und die geschlossenen Balken stehen für Wildtyp-Mäuse. Die Fehlerbalken zeigen die Standardfehler des Mittelwertes von zwei unabhängigen Experimenten mit n = 6-7 Mäusen pro Bedingung. *, P<0,001; **, P<0,05 gemäß Student's T-test.

Um eine direkte Rolle von Mastzellen auf den erfolgreichen Ausstoß von adulten Würmern zu untersuchen, wurde auch die Eliminierung von *N. brasiliensis* in diesen Mäusen analysiert. Dabei zeigte sich, dass c-Kit^{W-sh}-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen *N. brasiliensis* nur deutlich verzögert eliminieren konnten (Abb. 15), obwohl die Th2-Differenzierung in c-Kit^{W-sh}-Mäusen nicht beeinträchtigt war und diese sogar eine höhere Frequenz an eosinophilen und basophilen Granulozyten in der Milz aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Es wurde bereits gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen nur für die Eliminierung bei einer Primärinfektion, nicht jedoch bei einer Sekundärinfektion entscheidend sind (Grencis et al., 1985). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich auf der T-

Zell-abhängigen Bildung von *N. brasiliensis*-spezifischem IgE oder IgG1 während der Primärinfektion, welches dann zur Sensitivierung von basophilen Granulozyten und Mastzellen führt. Diese beiden Zelltypen können dann wiederum nach IgE- oder IgG1-vermittelten Aktivierung IL-4 und IL-13 sezernieren, welche wichtig für die Eliminierung der Parasiten sind.

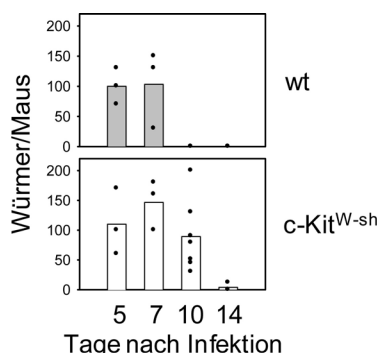


Abbildung 15. Mastzellen sind für die effiziente Eliminierung von *N. brasiliensis* während einer Primärinfektion erforderlich. c-Kit^{W-sh}- (unteres Diagramm) und gleichaltrige Wildtyp-Mäuse (oberes Diagramm) wurden mit *N. brasiliensis* infiziert und die adulten Würmer im Dünndarm wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion gezählt. Die Abbildung zeigt zusammengefasste Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten.

4.2.8 Basophile Granulozyten sind entscheidend an der Eliminierung von *N. brasiliensis* während einer Gedächtnisantwort beteiligt.

Um zu untersuchen, ob Mastzellen als Effektorzellen an einer Gedächtnisantwort beteiligt sind, wurden c-Kit^{W-sh}-Mäuse vier bis fünf Wochen nach der Erstinfektion erneut mit *N. brasiliensis* infiziert und die Eliminierung der Würmer an Tag 5 analysiert. Wildtyp-Mäuse haben zu diesem Zeitpunkt die Würmer bereits ausgeschieden. Zusätzlich wurden zwei Tage vor der Zweitinfektion entweder CD4⁺ T-Zellen, basophile Granulozyten oder auch beide Zelltypen depletiert, um deren Rolle während einer Gedächtnisantwort zu untersuchen (Abb. 16 A und B). Nicht-depletierte und CD4⁺ T-Zell-depletierte c-Kit^{W-sh}-Mäuse zeigten keinen Defekt bei der Eliminierung. Das heißt, weder T-Zellen noch Mastzellen scheinen für die Bekämpfung der Parasiten während einer Zweitinfektion benötigt zu werden (Abb. 16 C). Jedoch war die Eliminierung stark beeinträchtigt, wenn basophile Granulozyten zuvor entweder mit einem anti-FcεRI oder anti-CD200R3 mAk depletiert worden waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass basophile

Granulozyten bei einer Zweitinfektion entscheidend an der raschen Eliminierung beteiligt sind, während Mastzellen und CD4⁺ T-Zellen nur bei einer Primärinfektion für die erfolgreiche Bekämpfung der Parasiten benötigt werden.

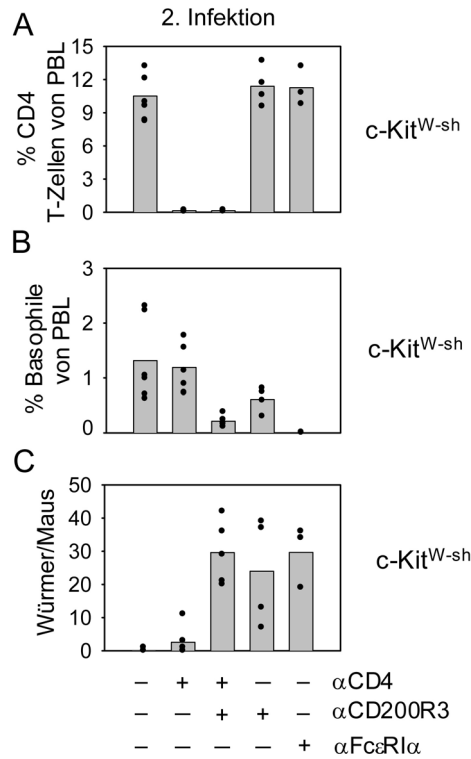


Abbildung 16. Weder Mastzellen noch CD4⁺ T-Zellen, sondern basophile Granulozyten sind entscheidend für die Wurmbeseitigung während einer Gedächtnisantwort. Mastzell-defiziente c-Kit^{W-sh}-Mäuse wurden mit *N. brasiliensis* infiziert und dann nach 4-5 Wochen erneut infiziert. Zwei Tage vor der zweiten Infektion wurden die Mäuse entweder unbehandelt belassen, die CD4⁺ T-Zellen mittels anti-CD4 mAk-Injektion und/oder die basophilen Granulozyten mittels anti-CD200R3 oder anti-FcεRIα mAk Injektion eliminiert. (A und B) Effizienz der Eliminierung von CD4⁺ T-Zellen (A) und basophilen Granulozyten (B) im Blut an Tag 5 der zweiten Infektion. (C) Das Diagramm zeigt die Anzahl adulter Würmer im Dünndarm an Tag 5 der zweiten Infektion. Das Diagramm zeigt die zusammengefassten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit insgesamt drei bis sieben Mäusen pro Gruppe.

4.3 Die Rolle von dendritischen Zellen für die Entwicklung einer Th2-Immunantwort.

Antigen-präsentierende Zellen, insbesondere DCs, spielen eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer Immunantwort, da sie bei entsprechenden Stimuli effizient naive T-Zellen aktivieren können. Um die Funktion von DCs *in vivo* zu untersuchen, wurden genetisch DC-defiziente Mäuse hergestellt. Dazu wurden Mäuse, welche die Cre-Rekombinase selektiv in DCs exprimieren (CD11c-Cre-Mäuse) (Caton et al., 2007), mit Mäusen verpaart, welche die alpha Untereinheit des Diphtherietoxins unter Kontrolle einer loxP-flankierten Stopp-Kassette im ubiquitär exprimierten Rosa26 Locus tragen (R-DTA-Mäuse) (Voehringer et al., 2008). Als Resultat wird das Diphtherietoxin direkt in DCs exprimiert, was zu ihrer konstitutiven Eliminierung führt.

In CD11c-Cre/R-DTA-Mäusen (Δ DC-Mäuse) fehlen mehr als 90% aller DCs in Thymus, Milz und Lymphknoten (Abb. 17 A). Die Eliminierung beinhaltete alle DC-Subpopulationen wie myeloide, lymphoide und plasmazytoide DCs, während die kürzlich beschriebene Interferon-produzierende Killer-DC Population (IKDC; CD11c^{lo} NK1.1⁺B220⁺) (Chan et al., 2006) nicht betroffen war (Abb. 17 B). Außerdem konnten nur wenige Langerhans-Zellen in der epidermalen Zellschicht von Ohren aus Δ DC-Mäusen gefunden werden (Abb. 17 C). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass CD11c-Cre/R-DTA-Mäuse nur noch sehr wenige DCs besitzen, während alle anderen Zelltypen von der Depletion nicht betroffen sind (Daten werden nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob DCs auch eine Rolle bei der Induktion einer effizienten Immunantwort gegen gastrointestinale Nematoden spielen, wurden Δ DC-Mäuse mit *N. brasiliensis* infiziert. *N. brasiliensis*-infizierte Δ DC-Mäuse zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine verminderte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die Lunge (Abb. 17 D). Außerdem hatten Δ DC-Mäuse an Tag 10 noch sehr viele adulte Würmer im Dünndarm, während Kontroll-Mäuse die Parasiten effizient eliminieren konnten (Abb. 17 E). Daher kommen DCs auch bei der Immunantwort gegen Parasiten eine entscheidende Funktion zu. Allerdings zeigen Δ DC-Mäuse auch massive Anzeichen von Autoimmunität; daher haben DCs neben der Antigenpräsentation zur Induktion von

primären Immunantworten auch eine entscheidende Funktion für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz unter homöostatischen Bedingungen ((Ohnmacht et al., 2009)).

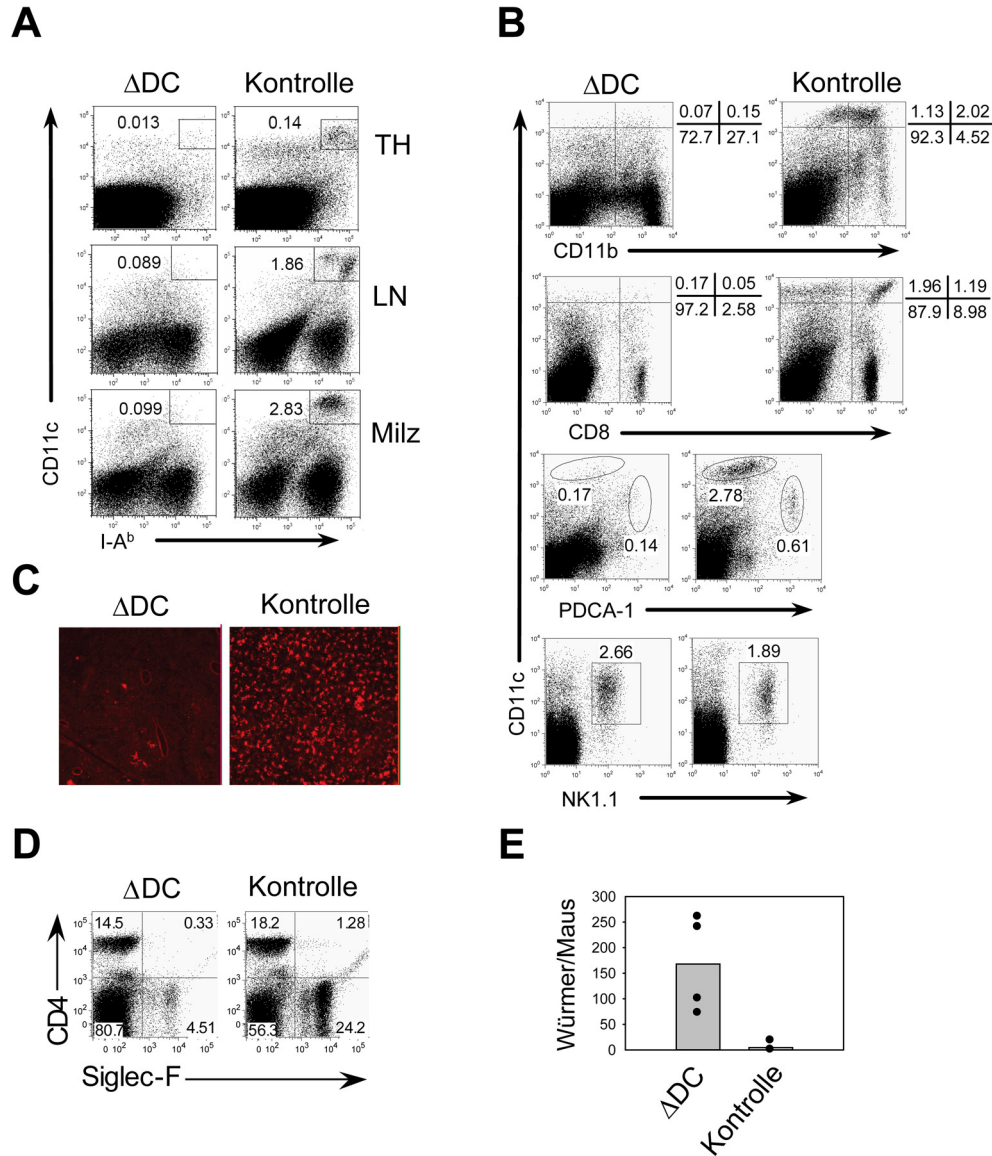


Abbildung 17. Dendritische Zellen (DC) sind essentiell für die Eliminierung von *N. brasiliensis*. (A-C) Effizienz der DC-Depletion in naiven Δ DC-Mäusen. (A) Einzelzellsuspensionen von Thymus (TH), mesenterischen Lymphknoten (LN) und Milz von Δ DC- und Kontroll-Mäusen wurden für CD11c und MHC-II (I-A^b) gefärbt. (B) Färbung für verschiedene DC-Subpopulationen in der Milz von Δ DC- und Kontroll-Mäusen. Die Punktwolkendiagramme zeigen nur Gr-1⁻-Zellen. Das CD11c/NK1.1-Diagramm zeigt nur B220⁺-Zellen. (C) Epidermale Zellschichten aus den Ohren von Δ DC- und Kontroll-Mäusen wurden für I-A^b gefärbt, um Langerhans-Zellen anzufärben. Die Originalvergrößerung war 80x. Alle Ergebnisse sind repräsentativ für 2-3 unabhängige Experimente. (D und E) zeigen Ergebnisse von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen am Tag 10 nach Infektion. (D) Das Punktwolkendiagramm zeigt die Frequenz von CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺Siglec-F⁻) und eosinophilen Granulozyten (CD4⁺Siglec-F⁺) in der

Ergebnisse

Lunge von Δ DC- und Kontroll-Mäusen. Die Diagramme sind repräsentativ für vier verschiedene Mäuse pro Gruppe. (E) zeigt die Anzahl adulter Würmer im Dünndarm von vier verschiedenen Mäusen pro Gruppe am Tag 10 nach einer Infektion mit *N. brasiliensis*. Das Ergebnis beruht auf zwei unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse sind vor kurzem zusammen mit weiteren Untersuchungen zur Bedeutung von DCs zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz im Journal of Experimental Medicine publiziert worden (Ohnmacht et al., 2009).

5 DISKUSSION

Infektionen mit Wurmparasiten führen zu einem starken Anstieg an Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Obwohl sehr wahrscheinlich nicht immer alle Effektorzellen für die Eliminierung eines bestimmten Parasiten notwendig sind, scheint sich solch eine Akkumulation als vorteilhaft für die Bekämpfung der meisten Wurminfektionen erwiesen zu haben. Bisher war allerdings noch nicht bekannt, wie lange eosinophile und basophile Granulozyten unter homöostatischen und inflammatorischen Bedingungen überhaupt überleben und wie es zu der erwähnten Akkumulation dieser Zellen nach einer Helmintheninfektion kommt.

Nach 15stündiger BrdU-Gabe waren bereits 50% der eosinophilen Granulozyten im Knochenmark mit BrdU markiert. Da sich eosinophile Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen nicht im Knochenmark ansammeln, müssen 50% der eosinophilen Granulozyten in diesem Zeitfenster das Knochenmark verlassen haben. In der Peripherie werden beinahe alle eosinophilen Granulozyten in der Milz binnen zwei Tagen durch neu differenzierte Zellen aus dem Knochenmark ersetzt. Daher werden eosinophile Granulozyten mit einer hohen Rate im Knochenmark gebildet, bis jedoch alle eosinophilen Granulozyten in der Peripherie ersetzt worden sind, vergehen bis zu zwei Tage. Überraschenderweise führte eine Infektion mit *N. brasiliensis* nicht zu einer erhöhten Neubildungsrate von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark, obwohl es dabei zu einer massiven Akkumulation eosinophiler Granulozyten in der Peripherie kommt. Zumindest die parasiten-induzierte Eosinophilie beruht daher eher auf einer erniedrigten Apoptoserate als auf einer erhöhten *de novo* Syntheserate eosinophiler Granulozyten im Knochenmark (Ohnmacht et al., 2007). Diese Ergebnisse werden auch durch die Tatsache gestützt, dass eine Infektion mit *Trichinella spiralis* nur zu einer dreifach erhöhten Anzahl an Vorläuferzellen von eosinophilen Granulozyten im Knochenmark führt, was nicht ausreicht, um die beobachtete massive Eosinophilie zu erklären (Iwasaki et al., 2005). Interessanterweise kann auch die Anzahl neutrophiler Granulozyten, welche eine vergleichbare Lebensdauer wie eosinophile Granulozyten

aufweisen, durch eine Senkung der spontanen Apoptoserate rasch gesteigert werden (Ward et al., 1999).

Im Gegensatz dazu können eosinophile Granulozyten im Peritoneum unter homöostatischen Bedingungen bis zu zwei Wochen überleben. *In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass hypoxische Bedingungen ebenfalls zu einem verlängerten Überleben eosinophiler Granulozyten führen (Gardai et al., 2003). Die Tatsache, dass auch im Peritoneum nur ein geringer Sauerstoffpartialdruck herrscht, könnte zum verlängerten Überleben eosinophiler Granulozyten beitragen (Sawyer et al., 1991). Im *N. brasiliensis*-Infektionsmodell konnte außerdem eine Korrelation zwischen der Expression von Siglec-F und der Lebensdauer eosinophiler Granulozyten beobachtet werden. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass die Kreuzvernetzung von Siglec-F auf eosinophilen Granulozyten eine erhöhte Apoptoserate zur Folge hat. Außerdem scheinen Siglec-F^{-/-}-Mäuse in einem Modell für allergische Entzündungen der Lunge eine leicht erhöhte Akkumulation eosinophiler Granulozyten aufzuweisen, welche eventuell auf einer verminderten Apoptoserate in diesen Mäusen beruht (Zhang et al., 2007). Die Autoren dieser Studie postulierten daher eine negative Rückkopplungsschleife für die Akkumulation eosinophiler Granulozyten durch inhibitorische Signale nach Aktivierung von Siglec-F, was sich allerdings nicht mit den hier vorgestellten Ergebnissen zur BrdU-Inkorporation in diesen Zellen in Lunge und Peritoneum deckt. Möglicherweise wird der Ligand für Siglec-F in den beiden Modellen unterschiedlich reguliert oder es kommt zu einem sekundären Effekt in Siglec-F^{-/-}-Mäusen durch CD4⁺ T-Zellen, welche nach Aktivierung ebenfalls Siglec-F exprimieren können (Zhang et al., 2007). Ob, bzw. wie das Expressionsniveau von Siglec-F die Induktion von Apoptose in eosinophilen Granulozyten beeinflussen kann, muß daher im Detail noch weiter untersucht werden. Eine Aufklärung der Apoptose-induzierenden Regulationsmechanismen hat in jedem Fall ein großes therapeutisches Potential für die Behandlung von Krankheiten wie z. B. allergischem Asthma.

Bereits früher konnte gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten während einer *N. brasiliensis*-Infektion durch alternativ aktivierte Makrophagen in das Peritoneum rekrutiert werden, obwohl *N. brasiliensis* selbst überhaupt nicht durch das Peritoneum migriert (Voehringer et al., 2007). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass

eosinophile Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen in das Peritoneum aktiv rekrutiert werden, wobei G_i-Protein gekoppelte Rezeptoren auf eosinophilen Granulozyten entscheidend beteiligt sind (Ohnmacht et al., 2007).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Peritoneum ein Reservoir für reife eosinophile Granulozyten darstellt, von wo aus sie wieder in andere Organe, und zwar insbesondere in den mediastinalen Lymphknoten, emigrieren können. In einem Modell für allergische Entzündungen der Atemwege konnte ebenfalls die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die T-Zell Zone des paratrachealen Lymphknotens beobachtet werden. Außerdem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten eine Antigen-präsentierende Funktion besitzen können (Shi et al., 2000). Auch in einem Wurminfektionsmodell konnte gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten, welche zuvor mit Antigenen von *Strongyloides* inkubiert worden waren, im selben Ausmaß wie DCs naive T-Zellen stimulieren (Padigel et al., 2006). Nach Infektion mit *N. brasiliensis* hielten sich eosinophile Granulozyten vor allem im subkapsulären Sinus und in der T-Zell Zone des mesenterischen Lymphknotens auf (Abb. 5 B). Dieser Befund deutet auf eine Interaktion von eosinophilen Granulozyten mit T-Zellen hin. Tatsächlich konnte in diversen murinen Modellen für Th2-Immunantworten gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten bevorzugt eine Differenzierung naiver T-Zellen zu Th2-Zellen induzieren (MacKenzie et al., 2001). Umgekehrt fördert allerdings auch die IL-5 Expression von Th2-Zellen die Mobilisierung eosinophiler Granulozyten (Akuthota et al., 2008). Noch nicht geklärt ist die Funktion eosinophiler Granulozyten während einer Infektion mit Parasiten. Es gibt zwar Hinweise, dass eosinophile Granulozyten im Peritoneum während einer Infektion mit Eiern von Schistosomen für die rasche Expression von Th2-Zytokinen verantwortlich sind (Sabin et al., 1996); bei Infektionen mit *N. brasiliensis* jedoch scheinen eosinophile Granulozyten für die Auslösung einer Th2-Immunantwort nicht essentiell zu sein (Voehringer et al., 2006).

Über die Funktion von basophilen Granulozyten während einer Th2-Immunantwort ist bisher noch relativ wenig bekannt. Dabei können diese Zellen trotz ihres geringen Anteils an allen Leukozyten die induzierte Immunantwort beeinflussen, und zwar insbesondere bei einer Gedächtnisantwort, nachdem basophile Granulozyten durch Antigen-

spezifisches IgE, welches während der Primärantwort gebildet worden war, sensitiviert worden sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits in der fötalen Leber von 4get-Mäusen Zellen existieren, welche basophilen Granulozyten sehr ähnlich sind. Diese Zellen exprimieren zwar noch kein FcεRI und haben auch noch kein IgE auf der Oberfläche gebunden. Allerdings exprimieren sie bereits das IL-4/eGFP-Transkript und gehören somit zu den ersten Zellen des sich entwickelnden Immunsystems, welche IL-4 synthetisieren können. Im Gegensatz zu unreifen eosinophilen Granulozyten konnten diese Zellen jedoch nicht die Basophilen-Zelllinie in subletal bestrahlten Mäusen etablieren ((Voehringer et al., 2007) und Daten nicht gezeigt). Eine potentielle Vorläuferpopulation von basophilen Granulozyten (BaP; Lin⁻CD34⁺FcεRIα^{hi}c-Kit⁻) konnte kürzlich im Knochenmark von adulten Mäusen identifiziert werden (Arinobu et al., 2005). Der Transkriptionsfaktor c/EBPα scheint dabei die Entwicklung von BaP zu regulieren, obwohl er für die terminale Differenzierung nicht essentiell ist. Nach der Infektion mit Helminthen nimmt die Anzahl von BaP stark zu (Arinobu et al., 2005). Diese Tatsache deckt sich mit den hier vorgestellten Ergebnissen, da eine Infektion mit *N. brasiliensis* zu einer erhöhten Anzahl BrdU⁺ basophiler Granulozyten im Vergleich zu nicht-infizierten Mäusen führte. Offensichtlich scheint die Akkumulation eosinophiler und basophiler Granulozyten während einer Helmintheninfektion unterschiedlich reguliert zu sein: Basophile Granulozyten akkumulieren in der Peripherie aufgrund einer erhöhten Bildungsrate im Knochenmark, wohingegen die Anzahl eosinophiler Granulozyten eher durch eine erniedrigte Apoptoserate stark ansteigt. Infektionen mit *N. brasiliensis* führen mit zweiwöchiger Verzögerung auch zu einem Anstieg der Mastzellzahlen im Dünndarm (Uber et al., 1980). Mastzellen verlassen das Knochenmark im Gegensatz zu basophilen Granulozyten bereits in einem unreifen Stadium und differenzieren erst in Bindegewebe und Mukosa zu verschiedenen Subpopulationen aus. Außerdem benötigt eine vollständige Differenzierung zu reifen Mastzellen zumindest *in vitro* bis zu vier Wochen, was die verzögerte Akkumulation dieser Zellen nach einer Infektion mit *N. brasiliensis* erklären könnte (Galli et al., 2008). Daher sind Mastzellen eher dazu geeignet, bei längerfristigen, bzw. chronischen Helmintheninfektionen als bei schnellen und akuten Infektionen wie mit *N. brasiliensis* eine entscheidende Funktion bei

der Eliminierung des Parasiten zu übernehmen, sofern für diesen Prozess Mastzell-abhängige Effektormechanismen überhaupt notwendig sind.

Basophile und eosinophile Granulozyten sind in der Milz nicht gleichmäßig in der roten Pulpa verteilt, sondern akkumulieren in der Nähe der Marginalzone. Mastzellen dagegen konnten bevorzugt in der Nähe des Marginalsinus der Milz identifiziert werden (Abb. 8 A). Da das Blut über den Marginalsinus in die Milz eintritt, sind Mastzellen ideal positioniert, um Pathogene aus dem Blutkreislauf zu erkennen. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass Carboxypeptidase A von Mastzellen für den Abbau von Schlangen- und Honigbienengift im Blutkreislauf essentiell ist, wofür für sie durch ihre Lokalisierung in der Nähe des Marginalsinus in der Milz perfekt geeignet sind (Metz et al., 2006). Eosinophile und insbesondere auch basophile Granulozyten fanden sich außerdem in der Lamina propria des Dünndarms von *N. brasiliensis*-infizierten Mäusen, wo sie durch lokale IL-4-Sekretion möglicherweise dazu beitragen, Becherzellen zu einer verstärkten Schleimproduktion anzuregen und Makrophagen alternativ zu aktivieren (siehe auch Abb. 18).

In dieser Arbeit konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden, dass basophile Granulozyten nach Antigen-spezifischem Stimulus IL-5 produzieren können und dass basophile Granulozyten unabhängig von Th2-Zellen und Mastzellen eine Eosinophilie hervorrufen können. Ähnliche Beobachtungen wurden in einem murinen Modell für eine IgE-abhängige allergische Entzündung gemacht, bei der basophile Granulozyten während der späten Phase der allergischen Reaktion die Akkumulation eosinophiler Granulozyten in der Haut regulieren (Mukai et al., 2005; Obata et al., 2007). Schon länger war auch vermutet worden, dass basophile Granulozyten eine Rolle bei der Abwehr von Wurmparasiten spielen könnten. Hier konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Reduzierung der Anzahl basophiler Granulozyten mittels Antikörpergabe eine effiziente Eliminierung der Parasiten in der Abwesenheit von Th2-Zellen und Mastzellen verhindert. Die durch die Depletion basophiler Granulozyten hervorgerufene Reduzierung der Eosinophilie ist hierfür allerdings höchstens nur teilweise verantwortlich, da bereits früher gezeigt werden konnte, dass eosinophile Granulozyten für eine effiziente Eliminierung während einer Primärinfektion nicht entscheidend sind

und nur bei einer Sekundärinfektion einen partiellen Schutz vermitteln (Voehringer et al., 2006). So konnte bisher nur *in vitro* gezeigt werden, dass eosinophile Granulozyten ein gewisses Potential für die Tötung von *N. brasiliensis* Larven besitzen (Shin et al., 2001). Neuere Studien legen sogar den Verdacht nahe, dass eosinophile Granulozyten bei bestimmten Infektionen das Überleben von Larven sogar fördern können, in dem sie die Auslösung einer Th1-Immunantwort blockieren (Fabre et al., 2009). Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass basophile Granulozyten trotz ihrer geringen Frequenz entscheidende Regulatoren für die Akkumulation eosinophiler Granulozyten während einer Th2-Immunantwort sind (Ohnmacht and Voehringer, 2009). Daher könnte ein besseres Verständnis des Verhaltens basophiler Granulozyten neue Behandlungsmethoden bei überschießenden, pathologischen Th2-Immunantworten ermöglichen. Insbesondere bei der Induktion allergischen Atemwegserkrankungen könnten basophilen Granulozyten eine wichtige Bedeutung zukommen (Koshino et al., 1993).

In dieser Arbeit wurde auch der kürzlich vorgestellte Mausstamm c-Kit^{W-sh} verwendet, um die Funktion von Mastzellen nach *N. brasiliensis*-Infektion *in vivo* zu untersuchen. Dabei konnten frühere Ergebnisse bestätigt werden, dass dieser Mausstamm komplett Mastzell-defizient ist (Grimbaldeston et al., 2005). Auch eine Infektion mit *N. brasiliensis* lieferte keine Hinweise auf die Entwicklung von Mastzellen, während die Entwicklung basophiler Granulozyten durch die „Sash“-Mutation nicht beeinträchtigt war. Interessanterweise scheinen die basalen und Antigen-induzierten IgE-Spiegel Mastzell-abhängig reguliert zu werden. Da Mastzellen IL-4 und IL-13 exprimieren, führt eine Kreuzvernetzung von an FcεRI-gebundenem IgE durch *N. brasiliensis*-Antigene möglicherweise zur Sekretion von IL-4 und IL-13, welche dann in einer positiven Rückkopplungsschleife zum Immunglobulinklassenwechsel in B-Zellen führen könnten. Die Abwesenheit von Mastzellen in c-Kit^{W-sh}-Mäusen führte zu einer verzögerten Eliminierung von *N. brasiliensis* nach einer Primärinfektion. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Studien, in denen bei Mastzell-defizienten c-Kit^{W/W-v}-Mäusen ebenfalls eine verzögerte Eliminierung von *N. brasiliensis* beobachtet wurde (Crowle and Reed, 1981). Auch ΔDC-Mäuse, in welchen nur noch sehr wenige dendritische Zellen präsent waren, konnten die Parasiten nicht eliminieren. Dendritische Zellen sind also wie

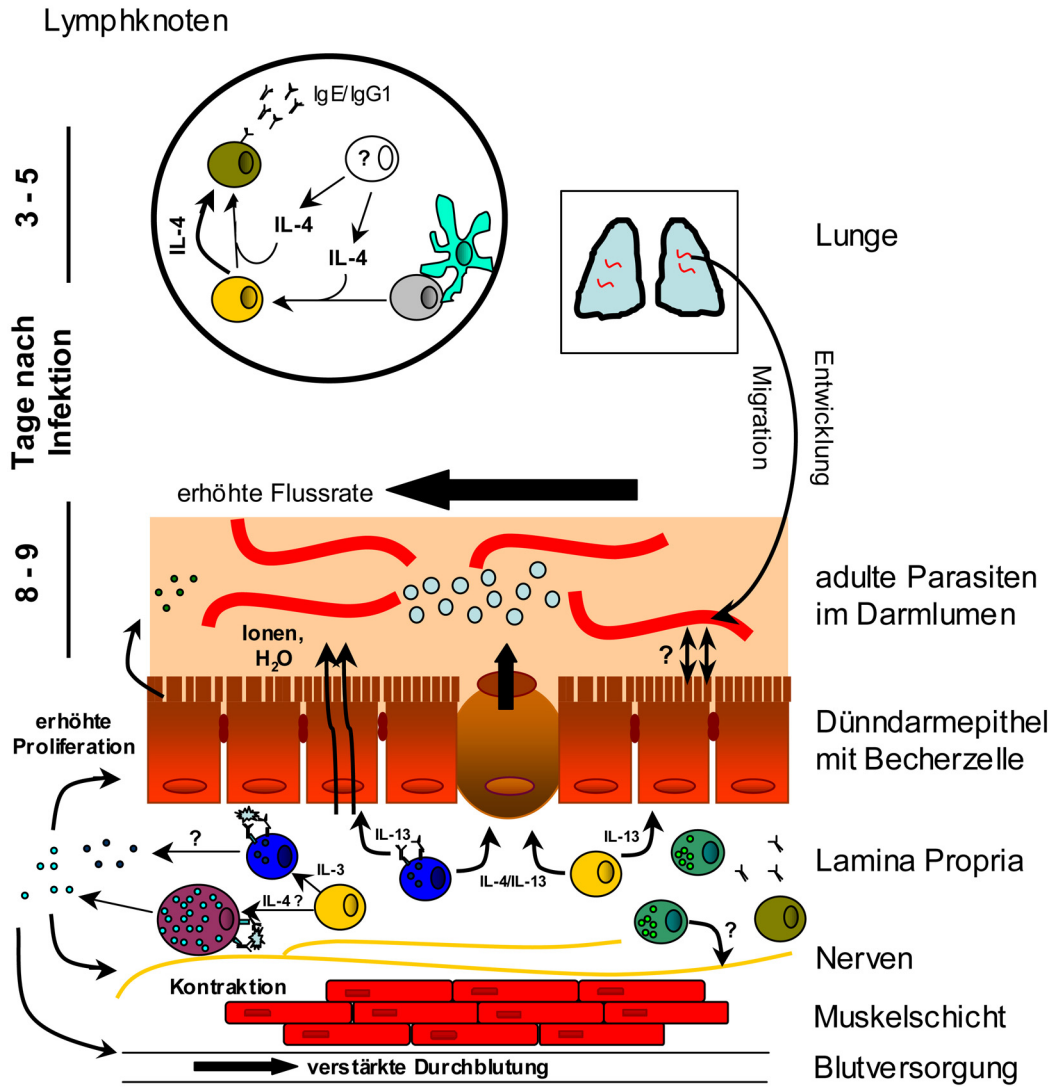
erwartet für die Auslösung einer Th2-Immunantwort wichtig; gleichzeitig konnte allerdings in Δ DC-Mäusen auch eine fatale Autoimmunität beobachtet werden (Ohnmacht et al., 2009). Daher sind dendritische Zellen ebenfalls essentiell für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz.

Im folgenden Abschnitt soll ein Modell vorgestellt werden, wie die Eliminierung von *N. brasiliensis* ablaufen könnte. Dabei soll die Frage geklärt werden, welche Faktoren für die Eliminierung eines Nematoden entscheidend sind.

Anscheinend wird durch die Infektion mit verschiedenen Parasiten immer eine ähnliche Immunantwort mit diversen Effektormechanismen ausgelöst, obwohl für die Eliminierung des jeweiligen Nematoden gar nicht alle Mechanismen notwendig wären. Auf zellulärer Ebene kommen sowohl DCs als auch $CD4^+$ T-Helferzellen während der Primärinfektion eine entscheidende Bedeutung zu, da in beinahe allen parasitären Infektionsmodellen die Verwendung von zytotoxischen Antikörpern gegen CD4 oder genetisch CD4 T-Zell-defizienten Mäusen eine erfolgreiche Primärantwort verhindert (Finkelman et al., 1997; Katona et al., 1988). Dendritische Zellen sind als Antigen-präsentierende Zellen für die Auslösung einer primären Th2-Immunantwort ebenfalls unersetzlich (Abb 17 E). Dabei kann auch die Art und Weise, wie DCs aktiviert werden, über das Differenzierungsprogramm der aktivierten $CD4^+$ T-Zellen entscheiden (Amsen et al., 2004; Liu et al., 2007). Klassischerweise ist für die Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu Th2-Zellen IL-4 wichtig, wobei allerdings noch unklar ist, von welchem Zelltyp das frühe IL-4 stammt. In einem Allergiemodell mit Proteasen konnte bereits gezeigt werden, dass basophile Granulozyten im Lymphknoten für die Differenzierung von Th2-Zellen wichtig sind (Sokol et al., 2008). In murinen Infektionsmodellen konnten bisher jedoch noch keine signifikante Population von basophilen Granulozyten in Lymphknoten identifiziert werden. Allerdings wurde auch in dem erwähnten Allergiemodell nur eine transiente Rekrutierung weniger basophiler Granulozyten in Lymphknoten festgestellt. Daher besteht die Möglichkeit, dass basophile Granulozyten zeitlich sehr begrenzt, auch während Helmintheninfektionen, in Lymphknoten rekrutiert werden, was jedoch experimentell erst untersucht werden muss. Bei der Betrachtung der Effektormechanismen, welche zu einer erfolgreichen Eliminierung adulter Würmer im Dünndarm führt, scheint vor allem bemerkenswert, dass

den beiden Zytokinen IL-4 und IL-13 eine zentrale Rolle zukommt. Diese beiden Zytokine induzieren die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Th2-Effektorzellen und lösen auch die alternative Aktivierung von Makrophagen aus, welche wiederum eine wichtige Funktion bei der Eliminierung von *N. brasiliensis* zu haben scheinen (Siracusa et al., 2008; Zhao et al., 2008). Außerdem wirken diese beide Zytokine auch auf nicht-hämatopoetischen Zellen und können in diesen eine Vielzahl an Parasiten-feindlichen Reaktionen hervorrufen (Finkelman et al., 1997). IL-4 und IL-13 induzieren zum Beispiel die Differenzierung, bzw. Aktivierung von Becher- und Muskelzellen im Dünndarm (Abb. 8 C und (Zhao et al., 2003)). Die Folge sind eine erhöhte Peristaltik des Dünndarms und eine verstärkte Schleimproduktion der Becherzellen. Schliesslich können diese Zytokine auch direkt auf epitheliale Zellschichten einwirken und die Ausschüttung diverser bioaktiver Moleküle als auch einen erhöhten Umsatz der Epithelzellen bewirken (Artis and Grecis, 2008; Finkelman et al., 2004). Insgesamt tragen alle diese Effektormechanismen dazu bei, möglichst lebensfeindliche Bedingungen für gastrointestinale Parasiten hervorzurufen (Anthony et al., 2007). Binden IL-4 und IL-13 an ihre Rezeptoren, so kommt es zur Aktivierung des Transskriptionsfaktors Stat6, welcher daraufhin in den Zellkern wandert und die Expression von Genen, die an einer Th2-Immunantwort beteiligt sind, veranlasst. Stat6^{-/-}-Mäuse können *N. brasiliensis* nicht eliminieren, was die Bedeutung IL-4/IL-13-abhängiger Signalwege für eine effiziente Immunantwort unterstreicht (Finkelman et al., 2004; Urban et al., 1998). Interessanterweise ist für die Eliminierung IL-4/IL-13 von Zellen des angeborenen Immunsystems nötig, wobei bisher unklar blieb, welcher Zelltyp bei diesem Prozess die entscheidende Rolle spielt (Voehringer et al., 2006). Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass IL-4/IL-13 von Mastzellen und basophilen Granulozyten zur Eliminierung von *N. brasiliensis* während einer Primärinfektion beitragen, während eine Sekundärinfektion hauptsächlich durch basophile Granulozyten kontrolliert wird (Abb. 18 und (Ohnmacht and Voehringer, 2009)).

Modell der primären Immunantwort nach Infektion mit *N. brasiliensis*



- | | | | |
|--|--|--|-------------------------|
| | Dendritische Zelle | | Mastzelle |
| | IgE/IgG1-produzierende Plasmazelle | | basophiler Granulozyt |
| | Differenzierte Th2-Zelle | | eosinophiler Granulozyt |
| | naive CD4 ⁺ T-Zelle | | IgE/IgG1 Antikörper |
| | Helminth-spezifisches Antigen (z.B. Proteasen; Chitin, etc.) | | Schleim |
| | | | <i>N. brasiliensis</i> |

Abbildung 18. Modell der Immunantwort gegen primäre Infektionen mit *N. brasiliensis*. Die Infektion mit *N. brasiliensis* führt zur DC-abhängigen Differenzierung von Th2-Zellen im Lymphknoten, welche die Differenzierung zu IgG1/IgE-seziernden Plasmazellen bewirken. Welcher Zelltyp das dafür benötigte IL-4 ausschüttet, ist noch nicht bekannt. Im Dünndarm kommt es zur Akkumulation und Aktivierung von basophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie von Mastzellen und Th2-Zellen. Die sekretierten Produkte dieser Zellen (insbesondere IL-4 und IL-13) bewirken eine erhöhte Proliferationsrate und Durchlässigkeit des Dünndarmepithels, sowie die Differenzierung und Aktivierung von Schleimproduzierenden Becherzellen. Außerdem können die Epithelzellen des Dünndarms eventuell auch direkt toxische Substanzen in das Darmlumen abgeben. Insgesamt werden damit lebensfeindliche Bedingungen für adulte Würmer im Darmlumen geschaffen. Möglicherweise tragen auch eine verstärkte Durchblutung sowie Kontraktionen der longitudinalen Muskelzellen, welche durch sezernierte Produkte der akkumulierten Granulozyten ausgelöst werden können, direkt oder indirekt zum erfolgreichen Wurmasstoß der Parasiten bei.

Für die Effektorfunktionen während einer Sekundärinfektion scheinen CD4⁺ T-Zellen zumindest im *N. brasiliensis*-Modell nicht erforderlich zu sein ((Katona et al., 1988) und Abb. 16 C), obwohl sie bei Sekundärinfektionen mit *H. polygyrus* und *T. spiralis* eine entscheidende Rolle spielen (Grencis et al., 1985; Urban et al., 1991). Auch Mastzellen sind für die rasche Eliminierung im *N. brasiliensis*-Infektionsmodell nicht erforderlich, da c-Kit^{W^{sh}}-Mäuse nach Sekundärinfektionen die Parasiten genauso effektiv eliminieren konnten wie Kontroll-Mäuse. Bei Sekundärinfektionen mit *N. brasiliensis* richtet sich die Immunantwort sehr wahrscheinlich bereits gegen L3/L4-Larvenstadien in der Lunge, da in Kontroll-Mäusen keine adulten Würmer im Dünndarm gefunden werden können. Im Gegensatz zu Mastzellen können basophile Granulozyten sehr rasch in der Lunge akkumulieren und sind entscheidend bei der effizienten Beseitigung der Larven beteiligt (Abb. 16 C). Möglicherweise fördern diese die rasche Rekrutierung eosinophiler Granulozyten oder AAM, welche dann nachgeschaltete Effektorfunktionen ausüben (Abb. 19).

Modell der protektiven Immunantwort bei Sekundärinfektionen mit *N. brasiliensis*

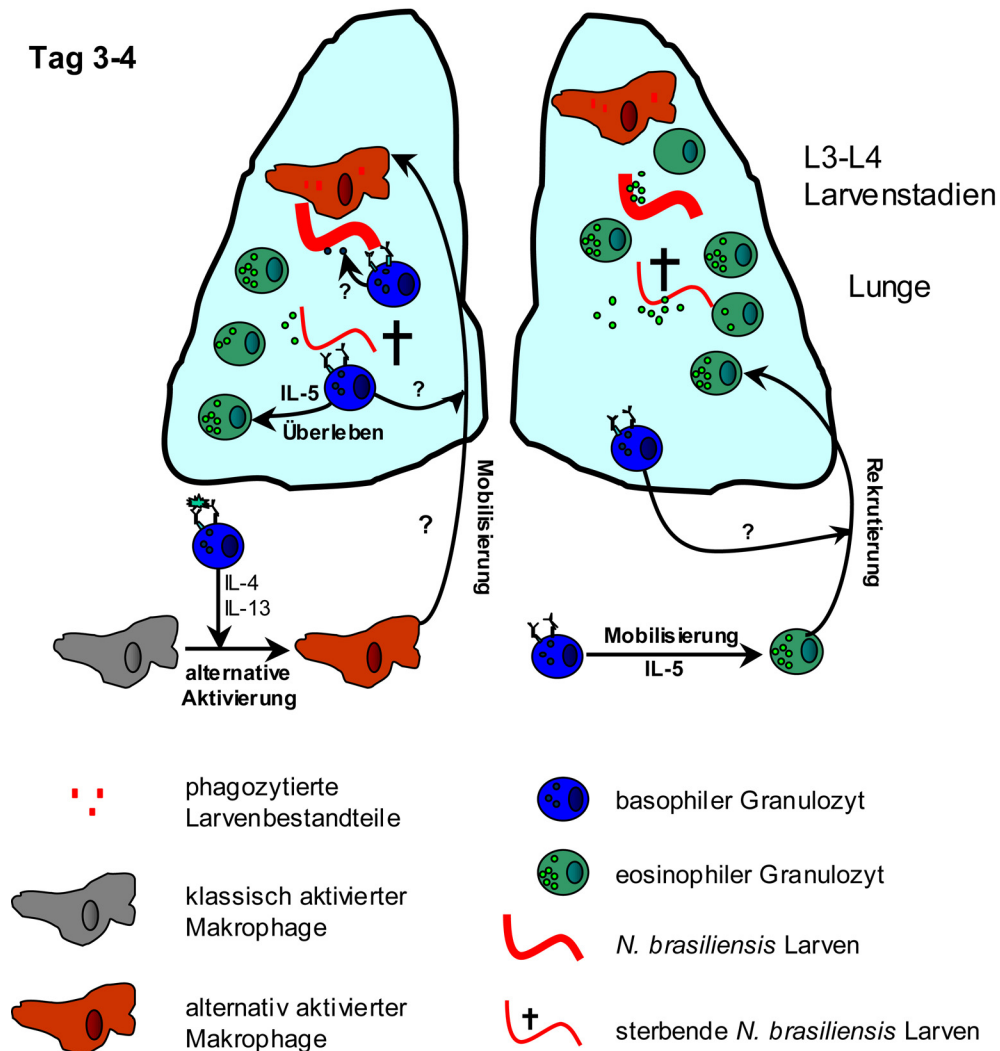


Abbildung 19. Protektive Immunantwort gegen sekundäre *N. brasiliensis*-Infektionen in der Lunge. Während einer sekundären Immunantwort gegen *N. brasiliensis* kommt es zu einer raschen Eliminierung der Parasitenlarven in der Lunge unabhängig von der Anwesenheit von Mastzellen oder Th2-Zellen., Stattdessen bewirkt die Aktivierung basophiler Granulozyten über Antigen-spezifisches IgG1/IgE die rasche Mobilisierung eosinophiler Granulozyten und die alternative Aktivierung von Makrophagen. Diese beiden Zelltypen sind für eine protektive Immunantwort essentiell.

Wieso scheinen basophile Granulozyten, welche nur eine Lebensspanne von rund 60 Stunden haben, für die Gedächtnisantwort entscheidend zu sein, während die längerlebigen CD4⁺ T-Zellen nur für die Eliminierung der Parasiten nach einer Primärinfektion essentiell sind?

Die Primärantwort führt zur Differenzierung von Th2-Zellen, welche *N. brasiliensis*-spezifische IgG1- und IgE-produzierende Plasmazellen induziert. Diese langlebigen Plasmazellen stellen eine konstante Quelle für Antikörper dar, so dass basophile Granulozyten ständig sensitiviert bleiben. Diese Annahme wird von der Beobachtung gestützt, dass sensitivierte basophile Granulozyten aus Personen mit einer vorangegangenen Filarieninfektion isoliert werden konnten, obwohl diese jahrelang kein Antigenkontakt mehr hatten (Mitre and Nutman, 2006). Tatsächlich konnten im Knochenmark langlebige IgG-produzierende Plasmazellen identifiziert werden, welche für einen geringen, aber konstanten Antikörperspiegel im Serum sorgten (Manz et al., 1997; Slifka et al., 1998). Außerdem kann der Transfer von Serum aus *N. brasiliensis*-infizierten Ratten zu einer protektiven Immunität naiver Ratten führen (Miller, 1980). Auch aufgereinigte IgE-Antikörper von *T. spiralis*-infizierten Ratten schützten naive Tiere vor einer erneuten Infektion (Ahmad et al., 1991).

Bis heute ist noch nicht bekannt, ob bzw. wo langlebige IgE-produzierende Plasmazellen im Immunsystem überhaupt vorkommen. Das Studium dieser Komponente des adaptiven Immunsystems sollte in Kombination mit der Verwendung von Mäusen, welche genetisch defizient für basophile Granulozyten sind, zu einem besseren Verständnis der Wechselwirkungen zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem während einer Th2-Immunantwort beitragen. Dies erscheint umso wichtiger, da basophile Granulozyten zunehmend auch eine Rolle bei diversen Krankheitsbildern wie der IgG-vermittelten systemischen Anaphylaxis oder Hypersensibilitätsreaktionen zugewiesen wird.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass effiziente Impfstrategien für den Schutz vor Hakenwurminfektionen auch auf die Erzeugung von langlebigen Plasmazellen zielen sollten. Außerdem sollten bei Krankheiten, bei denen nachweislich die Akkumulation eosinophiler Granulozyten zur Pathologie beiträgt, auch die Beteiligung basophiler Granulozyten als regulatorische Zellen berücksichtigt werden. Die Herstellung von genetisch Basophil-defizienten Mäusen könnte in Zukunft zur besseren Charakterisierung Basophil-assoziiierter Effektorfunktionen beitragen und möglicherweise zur Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze gegen Helmintheninfektionen und Allergien führen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AAM	alternativ aktivierte Makrophagen
Ak	Antikörper
APC	1. Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>) 2. Allophycozyanin
BaP	Vorläuferpopulation basophiler Granulozyten (<i>basophil precursor</i>)
BCR	B-Zell-Rezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BSA	bovines Serumalbumin
BrdU	Bromodesoxyuridin
CCR3	Chemokine Rezeptor 3
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTA	Diphtherietoxin alpha Untereinheit (<i>diphtheria toxin alpha subunit</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylene diamin tetra acetic acid</i>)
ECP	<i>eosinophil cationic protein</i>
EDN	<i>eosinophil-derived neuroprotein</i>
eGFP	verstärktes Grün-fluoreszierendes Protein (<i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EPO	<i>eosinophil peroxidase</i>
Fab	(antibody-) <i>fragment with specific antigen-binding</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
GaMD	Ziegen Serum gegen Maus-IgD (<i>goat anti-mouse IgD</i>)

Abkürzungsverzeichnis

GM-CSF	Wachstumsfaktor für Granulozyten/Makrophagen (<i>granulocyte-macrophage colony stimulating factor</i>)
GPCR	G _i protein gekoppelter Rezeptor (<i>G protein coupled receptor</i>)
h	Stunde (<i>hour</i>)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'(2-ethansulfonic acid)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transfrase I
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
int	intermediär
i.p.	intraperitoneal
IRES	interner ribosomaler Eintrittsort (<i>internal ribosomal entry site</i>)
i.v.	intravenös
KLH	Hämozynin der Nacktschnecke (<i>keyhole limpet cyanin</i>)
mAk	monoklonaler Antikörper
MBP	<i>major basic protein</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MMCP	Mastzellprotease der Maus (<i>mouse mast cell protease</i>)
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
NES _{L3}	sekretorisches Extrakt von L3 Larven von <i>N. brasiliensis</i>
NEX _{L3}	Totalextrakt von L3 Larven von <i>N. brasiliensis</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAF	plättchenaktivierender Faktor (<i>platelet activating factor</i>)
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin

Abkürzungsverzeichnis

PTX	Pertussistoxin
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindungen (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	1. Reverse Transkriptase 2. Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SCF	Stammzellfaktor (<i>stem cell factor</i>)
sec	Sekunde (second)
Stat6	<i>signal transducer and activator of transcription 6</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
tg	transgen
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>

7 Glossar

Hyperplasie	bezeichnet die Vergrößerung eines Organs oder Gewebes durch vermehrte Zellteilung.
Integument	bezeichnet die Hülle von Nematoden. Setzt sich zusammen aus Cuticula und Hypodermis.
Lamina propria	bezeichnet eine dünne Bindegewebsschicht, die sich direkt unterhalb des (Darm-)Epithels befindet.
Marginalzone	bezeichnet die Randzone von Lymphfollikeln der Milz, welche viele Lymphozyten und Makrophagen enthält.
Marginalsinus	bezeichnet ein Gefäßsystem, welches die Lymphfollikel umgibt und in welches die Lymphe aus der Milz abgeleitet wird.
Muscularis externa	bezeichnet eine Region in vielen Organen von Vertebraten, welche sich an die muköse Membran anschließt. Sie ist zusammen mit der longitudinalen Muskelschicht für die Darmperistaltik verantwortlich.
Parenchym	bezeichnet das durch die Funktionszellen eines Organes gebildete Gewebe.

Peritoneum	bezeichnet die Bauchhöhle, in der die inneren Organe liegen.
Subkapsulärer Sinus	bezeichnet eine Region direkt unterhalb der Kapsel eines Lymphknotens, in welche afferente Lymphbahnen münden und somit Lymphozyten in den Lymphknoten einwandern können.
Syncytium	bezeichnet eine durch Verschmelzung vieler Zellen nach Auflösung der Zellgrenzen entstandene, vielkernige Plasmamasse.

8 Anhang

Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bestellt und für die RT-PCR-Analysen eingesetzt:

hprt fwd 5'-GAGGGTAGGCTGGCCTATAGGCT-3',
hprt rev 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3';
mmcp1 fwd 5'-AGGTGCATTACAGGGAACAAA-3',
mmcp1 rev 5'-AGCTCACCAAGGCTGCAC-3';
mmcp2 fwd 5'-TTGTTACACCAAAGTTTCAG-3',
mmcp2 rev 5'-CCTGGAGTTGATAATCGTAATC-3';
mmcp4 fwd 5'-GACAGAATCCACACAGCAGAAG-3',
mmcp4 rev 5'-CCTCCAGAGTCTCCCTTGTATG-3';
mmcp5 fwd 5'-TCCAGTTCCAGATTTCCCTCA-3',
mmcp5 rev 5'-CTACATGGCCTATCTGGAAA-3';
mmcp6 fwd 5'-GTGTGCTGGAAATACCAGGAGAGAC-3',
mmcp6 rev 5'-GCAAGGGTTCCACCTGACCAGG-3';
mmcp7 fwd 5'-GAGGCATAGCAGAGAGCGGCGCCTG-3',
mmcp7 rev 5'-ATCCAGGATGACCTCCGTTCTCC-3';
mmcp8 fwd 5'-CAGTCAACGCTGAAGGAG-3',
mmcp8 rev 5'-TGGATGGAGTCGTTGTAG-3';
arg1 fwd 5'-GTATGACGTGAGAGACCACG-3',
arg1 rev 5'-CTCGCAAGCCAATGTACACG-3';
ym1 fwd 5'-TGGAATTGGTGCCCTACAA-3',
ym1 rev 5'-AACTTGCACTGTGTATATTG-3';
fizz1 fwd 5'-CCATAGAGAGATTATCGTGGAG-3',
fizz1 rev 5'-TGGTCCAGTCAACGAGTAAG-3';
fl-il3 fwd 5'-CTCGAGATTCAGACTTTAGGTGC-3',

fl-il3 rev 5'-GAATTCACCATGGTTCTTGCCAGC-3',
il4 fwd 5'-AGCTAGTTGTCATCCTGCC-3',
il4 rev 5'-TGGTGGCTCAGTACTACGAG-3',
il5 fwd 5'-AGGATGCTTCTGCACTTGAG-3',
il5 rev 5'-TCTGTACTCATCACACCAAG-3',
il13 fwd 5'-GCAGTCCTGGCTCTTGCTTG-3',
il13 rev 5'-TGCTTTGTGTAGCTGAGCAG-3'.

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Durchflusszytometrie

Die verwendeten Antikörper waren zur durchflusszytometrischen Detektion mit einem der folgenden Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert:

FITC (Fluoresceinisothiozyanat), PE (Phycoerythrin), APC (Allophycocyanin), PerCP (Peridin-Chlorophyll-Protein), Biotin (Biotin-gekoppelte Antikörper wurden mittels eines Streptavidin Konjugats nachgewiesen). PE und APC-konjugiertes Streptavidin (SA) wurde von der Firma SouthernBiotech bezogen; FITC-markiertes SA wurde von der Firma Invitrogen Caltag bezogen. APC-konjugierter Ziege anti-Ratte IgG Antikörper (Invitrogen Caltag) oder PE-markierte Ziege anti-Ratte F(ab')₂ (H+L) Fragmente wurden für die Detektion von unmarkierten Ratte-Antikörpern (-) verwendet.

Epitop (Anti-Maus-)	Zellspezifität	Konjugat	Klon	Bezugsquelle
2B4	NK-Zellen, T-Zellsubpopulationen	-	C9.1	BD Pharmingen
B220	B-Zellen	Alexa647	RA3-6B2	Invitrogen Caltag
CCR2	Monozyten, Basophile Granulozyten	-	MC-21	Von M. Mack, Universität von Regensburg, Deutschland
CD4	T-Zellsubpopulationen	PE-Alexa700 APC	RM4-5 RM4-5	Invitrogen Caltag eBioscience
CD8	T-Zellsubpopulationen	APC	5H10	Invitrogen Caltag
CD11c	Dendritische Zellen	PE	N418	eBioscience
CD16/32	Granulozyten, Makrophagen, Monozyten	-	2.4G2	Laboreigene Aufreinigung aus Hybridomüberstand

Anhang

CD49b	NK-Zellen, T-Zellsubpopulationen, Basophile Granulozyten	Biotin APC	DX-5 HM α 2	Invitrogen Caltag Invitrogen Caltag
CD200R1	Basophile Granulozyten, Mastzellen	-	OX-110	MorphoSys Serotec, Düsseldorf, Deutschland
CD200R3	Basophile Granulozyten, Mastzellen	-	Ba103	Von H. Karasuyama, Universität von Tokio, Japan
c-Kit	Mastzellen, Melanozyten	Biotin PE	2B8 2B8	Invitrogen Caltag Invitrogen Caltag
F4/80	Makrophagen	APC	BM8	eBioscience
Fc ϵ R1 α	Basophile Granulozyten, Mastzellen	- Biotin	MAR-I MAR-I	eBioscience eBioscience
I-A ^b	Dendritische Zellen, B-Zellen, Makrophagen	Biotin APC	M5/114.15.2 M5/114.15.2	eBioscience eBioscience
IgE	Basophile Granulozyten, Mastzellen, B-Zellen	Biotin	23G3	SouthernBiotech
IL-3R α	Basophile Granulozyten, Mastzellen	Biotin	5B11	eBioscience
NK1.1	NK-Zellsubpopulationen	APC	PK136	eBioscience
Siglec-F	Eosinophile Granulozyten	PE	E50-2440	BD Pharmingen
Ter-119	Erythroblasten	PE	Ter-119	eBioscience
Thy1.1	T-Zellen	PE	HIS 51	eBioscience
Thy1.2	T-Zellen	Biotin	5a8	Invitrogen Caltag

9 REFERENZEN

Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8, 639-646.

Ahmad, A., Wang, C.H., and Bell, R.G. (1991). A role for IgE in intestinal immunity. Expression of rapid expulsion of *Trichinella spiralis* in rats transfused with IgE and thoracic duct lymphocytes. *J Immunol* 146, 3563-3570.

Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193-197.

Akuthota, P., Wang, H.B., Spencer, L.A., and Weller, P.F. (2008). Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clin Exp Allergy* 38, 1254-1263.

Amsen, D., Blander, J.M., Lee, G.R., Tanigaki, K., Honjo, T., and Flavell, R.A. (2004). Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell* 117, 515-526.

Anthony, R.M., Rutitzky, L.I., Urban, J.F., Jr., Stadecker, M.J., and Gause, W.C. (2007). Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nat Rev Immunol* 7, 975-987.

Anthony, R.M., Urban, J.F., Jr., Alem, F., Hamed, H.A., Rozo, C.T., Boucher, J.L., Van Rooijen, N., and Gause, W.C. (2006). Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 12, 955-960.

Arinobu, Y., Iwasaki, H., Gurish, M.F., Mizuno, S., Shigematsu, H., Ozawa, H., Tenen, D.G., Austen, K.F., and Akashi, K. (2005). Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18105-18110.

Arock, M., Schneider, E., Boissan, M., Tricottet, V., and Dy, M. (2002). Differentiation of human basophils: an overview of recent advances and pending questions. *J Leukoc Biol* 71, 557-564.

Artis, D., and Grencis, R.K. (2008). The intestinal epithelium: sensors to effectors in nematode infection. *Mucosal Immunol* 1, 252-264.

Belkaid, Y., and Rouse, B.T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6, 353-360.

- Bischoff, S.C., Krieger, M., Brunner, T., and Dahinden, C.A. (1992). Monocyte chemotactic protein 1 is a potent activator of human basophils. *J Exp Med* *175*, 1271-1275.
- Caton, M.L., Smith-Raska, M.R., and Reizis, B. (2007). Notch-RBP-J signaling controls the homeostasis of CD8- dendritic cells in the spleen. *J Exp Med* *204*, 1653-1664.
- Chan, C.W., Crafton, E., Fan, H.N., Flook, J., Yoshimura, K., Skarica, M., Brockstedt, D., Dubensky, T.W., Stins, M.F., Lanier, L.L., *et al.* (2006). Interferon-producing killer dendritic cells provide a link between innate and adaptive immunity. *Nat Med* *12*, 207-213.
- Cliffe, L.J., and Grencis, R.K. (2004). The *Trichuris muris* system: a paradigm of resistance and susceptibility to intestinal nematode infection. *Adv Parasitol* *57*, 255-307.
- Crowle, P.K., and Reed, N.D. (1981). Rejection of the intestinal parasite *Nippostrongylus brasiliensis* by mast cell-deficient W/W^v anemic mice. *Infect Immun* *33*, 54-58.
- Dabbagh, K., Takeyama, K., Lee, H.M., Ueki, I.F., Lausier, J.A., and Nadel, J.A. (1999). IL-4 induces mucin gene expression and goblet cell metaplasia in vitro and in vivo. *J Immunol* *162*, 6233-6237.
- Dent, L.A., Strath, M., Mellor, A.L., and Sanderson, C.J. (1990). Eosinophilia in transgenic mice expressing interleukin 5. *J Exp Med* *172*, 1425-1431.
- Denzel, A., Maus, U.A., Rodriguez Gomez, M., Moll, C., Niedermeier, M., Winter, C., Maus, R., Hollingshead, S., Briles, D.E., Kunz-Schughart, L.A., *et al.* (2008). Basophils enhance immunological memory responses. *Nat Immunol* *9*, 733-742.
- Fabre, V., Beiting, D.P., Bliss, S.K., Gebreselassie, N.G., Gagliardo, L.F., Lee, N.A., Lee, J.J., and Appleton, J.A. (2009). Eosinophil deficiency compromises parasite survival in chronic nematode infection. *J Immunol* *182*, 1577-1583.
- Fearon, D.T., and Locksley, R.M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* *272*, 50-53.
- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* *7*, 862-874.
- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Goldhill, J., Sullivan, C.A., Morris, S.C., Madden, K.B., Gause, W.C., and Urban, J.F., Jr. (1997). Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev Immunol* *15*, 505-533.

- Finkelman, F.D., Shea-Donohue, T., Morris, S.C., Gildea, L., Strait, R., Madden, K.B., Schopf, L., and Urban, J.F., Jr. (2004). Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunol Rev* *201*, 139-155.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* *4*, 330-336.
- Galli, S.J., Grimaldeston, M., and Tsai, M. (2008). Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* *8*, 478-486.
- Galli, S.J., Nakae, S., and Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol* *6*, 135-142.
- Gardai, S.J., Hoontrakoon, R., Goddard, C.D., Day, B.J., Chang, L.Y., Henson, P.M., and Bratton, D.L. (2003). Oxidant-mediated mitochondrial injury in eosinophil apoptosis: enhancement by glucocorticoids and inhibition by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* *170*, 556-566.
- Gauchat, J.F., Henchoz, S., Mazzei, G., Aubry, J.P., Brunner, T., Blasey, H., Life, P., Talabot, D., Flores-Romo, L., Thompson, J., *et al.* (1993). Induction of human IgE synthesis in B cells by mast cells and basophils. *Nature* *365*, 340-343.
- Gause, W.C., Urban, J.F., Jr., and Stadecker, M.J. (2003). The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. *Trends Immunol* *24*, 269-277.
- Grencis, R.K., Riedlinger, J., and Wakelin, D. (1985). L3T4-positive T lymphoblasts are responsible for transfer of immunity to *Trichinella spiralis* in mice. *Immunology* *56*, 213-218.
- Grimaldeston, M.A., Chen, C.C., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Tam, S.Y., and Galli, S.J. (2005). Mast cell-deficient W-sash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* *167*, 835-848.
- Harigae, H., Takahashi, S., Suwabe, N., Ohtsu, H., Gu, L., Yang, Z., Tsai, F.Y., Kitamura, Y., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1998). Differential roles of GATA-1 and GATA-2 in growth and differentiation of mast cells. *Genes Cells* *3*, 39-50.
- Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* *6*, 1123-1132.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Brasseur, M., and McKnight, S.L. (1994). An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science* *265*, 1701-1706.

- Huntley, J.F., Gooden, C., Newlands, G.F., Mackellar, A., Lammas, D.A., Wakelin, D., Tuohy, M., Woodbury, R.G., and Miller, H.R. (1990). Distribution of intestinal mast cell proteinase in blood and tissues of normal and *Trichinella*-infected mice. *Parasite Immunol* *12*, 85-95.
- Ikedo, R.K., Miller, M., Nayar, J., Walker, L., Cho, J.Y., McElwain, K., McElwain, S., Raz, E., and Broide, D.H. (2003). Accumulation of peribronchial mast cells in a mouse model of ovalbumin allergen induced chronic airway inflammation: modulation by immunostimulatory DNA sequences. *J Immunol* *171*, 4860-4867.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* *126*, 1121-1133.
- Iwasaki, H., Mizuno, S., Mayfield, R., Shigematsu, H., Arinobu, Y., Seed, B., Gurish, M.F., Takatsu, K., and Akashi, K. (2005). Identification of eosinophil lineage-committed progenitors in the murine bone marrow. *J Exp Med* *201*, 1891-1897.
- Kapsenberg, M.L. (2003). Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol* *3*, 984-993.
- Katona, I.M., Urban, J.F., Jr., and Finkelman, F.D. (1988). The role of L3T4⁺ and Lyt-2⁺ T cells in the IgE response and immunity to *Nippostrongylus brasiliensis*. *J Immunol* *140*, 3206-3211.
- Kawakami, T., and Galli, S.J. (2002). Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE. *Nat Rev Immunol* *2*, 773-786.
- Khodoun, M.V., Orekhova, T., Potter, C., Morris, S., and Finkelman, F.D. (2004). Basophils initiate IL-4 production during a memory T-dependent response. *J Exp Med* *200*, 857-870.
- Kitamura, Y., Go, S., and Hatanaka, K. (1978). Decrease of mast cells in W/W^v mice and their increase by bone marrow transplantation. *Blood* *52*, 447-452.
- Kitamura, Y., Kanakura, Y., Fujita, J., and Nakano, T. (1987). Differentiation and transdifferentiation of mast cells; a unique member of the hematopoietic cell family. *Int J Cell Cloning* *5*, 108-121.
- Kojima, T., Obata, K., Mukai, K., Sato, S., Takai, T., Minegishi, Y., and Karasuyama, H. (2007). Mast cells and basophils are selectively activated in vitro and in vivo through CD200R3 in an IgE-independent manner. *J Immunol* *179*, 7093-7100.
- Kopf, M., Brombacher, F., Hodgkin, P.D., Ramsay, A.J., Milbourne, E.A., Dai, W.J., Ovington, K.S., Behm, C.A., Kohler, G., Young, I.G., *et al.* (1996). IL-5-

deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity* 4, 15-24.

Koshino, T., Teshima, S., Fukushima, N., Takaishi, T., Hirai, K., Miyamoto, Y., Arai, Y., Sano, Y., Ito, K., and Morita, Y. (1993). Identification of basophils by immunohistochemistry in the airways of post-mortem cases of fatal asthma. *Clin Exp Allergy* 23, 919-925.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201, 233-240.

Lantz, C.S., Boesiger, J., Song, C.H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R.C., Nawa, Y., Dranoff, G., and Galli, S.J. (1998). Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* 392, 90-93.

Larsen, C.P., Steinman, R.M., Witmer-Pack, M., Hankins, D.F., Morris, P.J., and Austyn, J.M. (1990). Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 172, 1483-1493.

Lee, J.J., Dimina, D., Macias, M.P., Ochkur, S.I., McGarry, M.P., O'Neill, K.R., Protheroe, C., Pero, R., Nguyen, T., Cormier, S.A., *et al.* (2004). Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science* 305, 1773-1776.

Lee, N.A., McGarry, M.P., Larson, K.A., Horton, M.A., Kristensen, A.B., and Lee, J.J. (1997). Expression of IL-5 in thymocytes/T cells leads to the development of a massive eosinophilia, extramedullary eosinophilopoiesis, and unique histopathologies. *J Immunol* 158, 1332-1344.

Liu, Y.J., Soumelis, V., Watanabe, N., Ito, T., Wang, Y.H., Malefyt Rde, W., Omori, M., Zhou, B., and Ziegler, S.F. (2007). TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu Rev Immunol* 25, 193-219.

Lunderius, C., Xiang, Z., Nilsson, G., and Hellman, L. (2000). Murine mast cell lines as indicators of early events in mast cell and basophil development. *Eur J Immunol* 30, 3396-3402.

Lyon, M.F., and Glenister, P.H. (1982). A new allele *sash* (*Wsh*) at the *W*-locus and a spontaneous recessive lethal in mice. *Genet Res* 39, 315-322.

MacKenzie, J.R., Mattes, J., Dent, L.A., and Foster, P.S. (2001). Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4(+) Th2 lymphocyte function. *J Immunol* 167, 3146-3155.

MacPherson, J.C., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., Klein, D.F., Lipscomb, M.F., Kavuru, M.S., Samoszuk, M.K., and Hazen, S.L. (2001). Eosinophils are a major

- source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol* *166*, 5763-5772.
- Maeda, H., Yamagata, A., Nishikawa, S., Yoshinaga, K., Kobayashi, S., and Nishi, K. (1992). Requirement of c-kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* *116*, 369-375.
- Maizels, R.M., and Yazdanbakhsh, M. (2003). Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nat Rev Immunol* *3*, 733-744.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* *441*, 231-234.
- Manz, R.A., Thiel, A., and Radbruch, A. (1997). Lifetime of plasma cells in the bone marrow. *Nature* *388*, 133-134.
- McKenzie, G.J., Fallon, P.G., Emson, C.L., Grenicis, R.K., and McKenzie, A.N. (1999). Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. *J Exp Med* *189*, 1565-1572.
- McNagny, K., and Graf, T. (2002). Making eosinophils through subtle shifts in transcription factor expression. *J Exp Med* *195*, F43-47.
- Metz, M., Piliponsky, A.M., Chen, C.C., Lammel, V., Abrink, M., Pejler, G., Tsai, M., and Galli, S.J. (2006). Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science* *313*, 526-530.
- Metzger, H. (1992). Transmembrane signaling: the joy of aggregation. *J Immunol* *149*, 1477-1487.
- Miller, H.R. (1980). Expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* from rats protected with serum. I. The efficacy of sera from singly and multiply infected donors related to time of administration and volume of serum injected. *Immunology* *40*, 325-334.
- Min, B. (2008). Basophils: what they 'can do' versus what they 'actually do'. *Nat Immunol* *9*, 1333-1339.
- Min, B., Prout, M., Hu-Li, J., Zhu, J., Jankovic, D., Morgan, E.S., Urban, J.F., Jr., Dvorak, A.M., Finkelman, F.D., LeGros, G., *et al.* (2004). Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite. *J Exp Med* *200*, 507-517.
- Mitre, E., and Nutman, T.B. (2006). IgE memory: persistence of antigen-specific IgE responses years after treatment of human filarial infections. *J Allergy Clin Immunol* *117*, 939-945.

- Mohrs, M., Shinkai, K., Mohrs, K., and Locksley, R.M. (2001). Analysis of type 2 immunity in vivo with a bicistronic IL-4 reporter. *Immunity* *15*, 303-311.
- Mori, Y., Iwasaki, H., Kohno, K., Yoshimoto, G., Kikushige, Y., Okeda, A., Uike, N., Niiro, H., Takenaka, K., Nagafuji, K., *et al.* (2009). Identification of the human eosinophil lineage-committed progenitor: revision of phenotypic definition of the human common myeloid progenitor. *J Exp Med* *206*, 183-193.
- Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* *7*, 145-173.
- Mukai, K., Matsuoka, K., Taya, C., Suzuki, H., Yokozeki, H., Nishioka, K., Hirokawa, K., Etori, M., Yamashita, M., Kubota, T., *et al.* (2005). Basophils play a critical role in the development of IgE-mediated chronic allergic inflammation independently of T cells and mast cells. *Immunity* *23*, 191-202.
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* *2*, 933-944.
- Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* *70*, 5701-5705.
- Obata, K., Mukai, K., Tsujimura, Y., Ishiwata, K., Kawano, Y., Minegishi, Y., Watanabe, N., and Karasuyama, H. (2007). Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. *Blood* *110*, 913-920.
- Ogilvie, B.M., and Jones, V.E. (1971). Parasitological review. *Nippostrongylus brasiliensis*: a review of immunity and host-parasite relationship in the rat. *Exp Parasitol* *29*, 138-177.
- Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S.B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., and Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med* *206*, 549-559.
- Ohnmacht, C., Pullner, A., van Rooijen, N., and Voehringer, D. (2007). Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. *J Immunol* *179*, 4766-4774.
- Ohnmacht, C., and Voehringer, D. (2009). Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood* *113*, 2816-2825.
- Ouyang, W., Ranganath, S.H., Weindel, K., Bhattacharya, D., Murphy, T.L., Sha, W.C., and Murphy, K.M. (1998). Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* *9*, 745-755.

- Padigel, U.M., Lee, J.J., Nolan, T.J., Schad, G.A., and Abraham, D. (2006). Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. *Infect Immun* **74**, 3232-3238.
- Rothenberg, M.E., and Hogan, S.P. (2006). The eosinophil. *Annu Rev Immunol* **24**, 147-174.
- Ryan, C.A., Huffaker, A., and Yamaguchi, Y. (2007). New insights into innate immunity in *Arabidopsis*. *Cell Microbiol* **9**, 1902-1908.
- Sabin, E.A., Kopf, M.A., and Pearce, E.J. (1996). *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Exp Med* **184**, 1871-1878.
- Sawyer, R.G., Spengler, M.D., Adams, R.B., and Pruett, T.L. (1991). The peritoneal environment during infection. The effect of monomicrobial and polymicrobial bacteria on pO₂ and pH. *Ann Surg* **213**, 253-260.
- Seder, R.A., Paul, W.E., Dvorak, A.M., Sharkis, S.J., Kagey-Sobotka, A., Niv, Y., Finkelman, F.D., Barbieri, S.A., Galli, S.J., and Plaut, M. (1991). Mouse splenic and bone marrow cell populations that express high-affinity Fc epsilon receptors and produce interleukin 4 are highly enriched in basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2835-2839.
- Shi, H.Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z., and Weller, P.F. (2000). Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *J Clin Invest* **105**, 945-953.
- Shin, E.H., Osada, Y., Sagara, H., Takatsu, K., and Kojima, S. (2001). Involvement of complement and fibronectin in eosinophil-mediated damage to *Nippostrongylus brasiliensis* larvae. *Parasite Immunol* **23**, 27-37.
- Shinkai, K., Mohrs, M., and Locksley, R.M. (2002). Helper T cells regulate type-2 innate immunity in vivo. *Nature* **420**, 825-829.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A.M., *et al.* (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* **68**, 855-867.
- Simon, H.U. (2001). Regulation of eosinophil and neutrophil apoptosis--similarities and differences. *Immunol Rev* **179**, 156-162.
- Siracusa, M.C., Reece, J.J., Urban, J.F., Jr., and Scott, A.L. (2008). Dynamics of lung macrophage activation in response to helminth infection. *J Leukoc Biol* **84**, 1422-1433.

Slifka, M.K., Antia, R., Whitmire, J.K., and Ahmed, R. (1998). Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 8, 363-372.

Sokol, C.L., Barton, G.M., Farr, A.G., and Medzhitov, R. (2008). A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses. *Nat Immunol* 9, 310-318.

Stadecker, M.J., Asahi, H., Finger, E., Hernandez, H.J., Rutitzky, L.I., and Sun, J. (2004). The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. *Immunol Rev* 201, 168-179.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

Tanigaki, K., Tsuji, M., Yamamoto, N., Han, H., Tsukada, J., Inoue, H., Kubo, M., and Honjo, T. (2004). Regulation of alphabeta/gammadelta T cell lineage commitment and peripheral T cell responses by Notch/RBP-J signaling. *Immunity* 20, 611-622.

Tono, T., Tsujimura, T., Koshimizu, U., Kasugai, T., Adachi, S., Isozaki, K., Nishikawa, S., Morimoto, M., Nishimune, Y., Nomura, S., *et al.* (1992). c-kit Gene was not transcribed in cultured mast cells of mast cell-deficient *Wsh/Wsh* mice that have a normal number of erythrocytes and a normal c-kit coding region. *Blood* 80, 1448-1453.

Tsujimura, Y., Obata, K., Mukai, K., Shindou, H., Yoshida, M., Nishikado, H., Kawano, Y., Minegishi, Y., Shimizu, T., and Karasuyama, H. (2008). Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity* 28, 581-589.

Turner, H., and Kinet, J.P. (1999). Signalling through the high-affinity IgE receptor Fc epsilonRI. *Nature* 402, B24-30.

Uber, C.L., Roth, R.L., and Levy, D.A. (1980). Expulsion of *Nippostrongylus brasiliensis* by mice deficient in mast cells. *Nature* 287, 226-228.

Urban, J.F., Jr., Katona, I.M., and Finkelman, F.D. (1991). *Heligmosomoides polygyrus*: CD4+ but not CD8+ T cells regulate the IgE response and protective immunity in mice. *Exp Parasitol* 73, 500-511.

Urban, J.F., Jr., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Madden, K.B., Morris, S.C., Collins, M., and Finkelman, F.D. (1998). IL-13, IL-4Ralpha, and Stat6 are required for the expulsion of the gastrointestinal nematode parasite *Nippostrongylus brasiliensis*. *Immunity* 8, 255-264.

- Valent, P., Besemer, J., Muhm, M., Majdic, O., Lechner, K., and Bettelheim, P. (1989a). Interleukin 3 activates human blood basophils via high-affinity binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 5542-5546.
- Valent, P., Schmidt, G., Besemer, J., Mayer, P., Zenke, G., Liehl, E., Hinterberger, W., Lechner, K., Maurer, D., and Bettelheim, P. (1989b). Interleukin-3 is a differentiation factor for human basophils. *Blood* *73*, 1763-1769.
- Venge, P., Bystrom, J., Carlson, M., Hakansson, L., Karawacjzyk, M., Peterson, C., Seveus, L., and Trulsson, A. (1999). Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy* *29*, 1172-1186.
- Voehringer, D., Liang, H.E., and Locksley, R.M. (2008). Homeostasis and effector function of lymphopenia-induced "memory-like" T cells in constitutively T cell-depleted mice. *J Immunol* *180*, 4742-4753.
- Voehringer, D., Reese, T.A., Huang, X., Shinkai, K., and Locksley, R.M. (2006). Type 2 immunity is controlled by IL-4/IL-13 expression in hematopoietic non-eosinophil cells of the innate immune system. *J Exp Med* *203*, 1435-1446.
- Voehringer, D., Shinkai, K., and Locksley, R.M. (2004). Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity* *20*, 267-277.
- Voehringer, D., van Rooijen, N., and Locksley, R.M. (2007). Eosinophils develop in distinct stages and are recruited to peripheral sites by alternatively activated macrophages. *J Leukoc Biol* *81*, 1434-1444.
- von Herrath, M.G., and Harrison, L.C. (2003). Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* *3*, 223-232.
- Ward, C., Dransfield, I., Chilvers, E.R., Haslett, C., and Rossi, A.G. (1999). Pharmacological manipulation of granulocyte apoptosis: potential therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* *20*, 503-509.
- Welle, M. (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* *61*, 233-245.
- Wills-Karp, M., Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T.Y., Karp, C.L., and Donaldson, D.D. (1998). Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science* *282*, 2258-2261.
- Yoshimoto, T., Tsutsui, H., Tominaga, K., Hoshino, K., Okamura, H., Akira, S., Paul, W.E., and Nakanishi, K. (1999). IL-18, although antiallergic when administered with IL-12, stimulates IL-4 and histamine release by basophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 13962-13966.

Yu, C., Cantor, A.B., Yang, H., Browne, C., Wells, R.A., Fujiwara, Y., and Orkin, S.H. (2002). Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *J Exp Med* *195*, 1387-1395.

Zhang, M., Angata, T., Cho, J.Y., Miller, M., Broide, D.H., and Varki, A. (2007). Defining the in vivo function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils. *Blood* *109*, 4280-4287.

Zhao, A., McDermott, J., Urban, J.F., Jr., Gause, W., Madden, K.B., Yeung, K.A., Morris, S.C., Finkelman, F.D., and Shea-Donohue, T. (2003). Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. *J Immunol* *171*, 948-954.

Zhao, A., Urban, J.F., Jr., Anthony, R.M., Sun, R., Stiltz, J., van Rooijen, N., Wynn, T.A., Gause, W.C., and Shea-Donohue, T. (2008). Th2 cytokine-induced alterations in intestinal smooth muscle function depend on alternatively activated macrophages. *Gastroenterology* *135*, 217-225 e211.

Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* *89*, 587-596.

Zheutlin, L.M., Ackerman, S.J., Gleich, G.J., and Thomas, L.L. (1984). Stimulation of basophil and rat mast cell histamine release by eosinophil granule-derived cationic proteins. *J Immunol* *133*, 2180-2185.

10 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Caspar Ohnmacht
Geboren am	10.05.1979
Geburtsort	VS-Schwenningen
Nationalität	deutsch
Familienstand	eheähnliche Gemeinschaft, 1 Kind
Wohnort	Sedanstraße 17, 81667 München

Beruflicher Werdegang

Herbst 1986 - Frühjahr 1990	Besuch der Modellgrundschule Hausen ob Rottweil
Herbst 1990 - Frühjahr 1999	Besuch des naturwissenschaftlichen Leibniz-Gymnasiums in Rottweil
Juni 1999	Allgemeinen Hochschulreife (Abschlussnote 1,4)
Juli 1999 – August 2000	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Rottweil
Oktober 2000 – Juni 2004	Studium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Juli 2004	erfolgreicher Abschluß mit Diplomprüfung Hauptfach: Molekulare Immunologie Nebenfächer: Biochemie, Zellbiologie, Physik (Abschlussnote 1,2)
September 2004 – Juli 2005	Diplomarbeit an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Abteilung Immunologie, Titel: „Untersuchungen zur zellulären Lokalisierung des Killer cell lectin-like receptors G1“ Betreuung durch Prof. Hans-Peter Pircher

Oktober 2005 – Februar 2009 Doktorarbeit im Institut für Immunologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Betreuung durch PD Dr. David Vöhringer

Auslandserfahrung

Oktober – Dezember 2002 Praxis-Auslandssemester an der Université Pierre et
Marie Curie, Paris, Frankreich, im Labor von Jean
Chambaz im Rahmen des europäischen
SOKRATES-Programms

Veröffentlichungen

Ohnmacht C., Voehringer D. (2009) Basophils protect against re-infection with hookworms independently of mast cells and CD4 T cells. Manuskript *im Druck*.

Ohnmacht C., Pullner A., King SB., Drexler I., Meier S., Brocker T., Voehringer D. (2009) Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J Exp Med.* 206 (3): 549-559.

Ohnmacht C., Voehringer D. (2009) Basophil effector function and homeostasis during helminth infection. *Blood* 113 (12): 2816-2825.

King SB., Knorn, A., Ohnmacht C., Voehringer D. (2008) Accumulation of effector CD4 T cells during type 2 immune responses is negatively regulated by Stat6. *J Immunol.* 180 (2): 754-763.

Ohnmacht C., Pullner A., van Rooijen, N., Voehringer D. (2007) Analysis of eosinophil turnover in vivo reveals their active recruitment to and prolonged survival in the peritoneal cavity. *J Immunol.* 179 (7): 4766-4774.

Kongressteilnahmen

9th German meeting on Th1/Th2 research, Marburg, Deutschland. Juni 2006.

3rd German Spring School on Immunology, Ettal, Deutschland. Februar 2007.

Infektionsimmunologie Kongress, Burg Rothenfels, Deutschland. März 2007. *Vortrag.*

World Immune regulation meeting (WIRM 2007), Davos, Schweiz. März 2008. *Poster.*

3rd ENII – MUGEN summer school of advanced immunology, Capo Caccia, Sardinien, Italien. Mai 2008. *Vortrag und Poster.*

Europeen congress of immunology, Berlin, Deutschland. September 2009. *Poster.*

Preise

Posterpreis beim World Immune regulation meeting (WIRM 2007) in Davos, Schweiz.

Fortbildungen

Fortbildung “Digitale Bildanalyse” der Olympus GmbH, Stuttgart, Deutschland.

Tutoraktivitäten

Betreuung von Studenten der Medizin im Kursteil Immunologie des Mecum-Konzepts der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

11 DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei PD Dr. David Voehringer für die ausgezeichnete Betreuung und die gewährten Einblicke in die immunologische Forschung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen aktuellen und früheren Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die freundliche und hilfsbereite Atmosphäre im Labor bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei folgenden Personen für die Bereitstellung folgender Antikörper und Reagenzien bedanken:

Anti-CCR2 Antikörper:	M. Mack, Universität von Regensburg, Deutschland.
Anti-CD200R3 Antikörper:	H.Karasuyama, Universität von Tokio, Japan.
Anti-MBP Antikörper:	J. Lee, Mayo Klinik, Scotsdale, AZ, USA.
Anti-TNP IgE Igelb4:	H.-M. Jaeck, Universität von Erlangen, Deutschland.
TNP-OVA:	S. Kaul, Paul-Ehrlich Institut, Langen, Deutschland.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Freundin Sisko Stenzel bedanken für die Geduld und das Verständnis für die manchmal langen und auch außergewöhnlichen Arbeitszeiten.