

Untersuchung der
***Strongyloides ratti* (Sandground, 1925) Infektion in der Maus**
(*Mus musculus*; Linnaeus, 1758):
Der Einfluss von regulatorischen T-Zellen (Treg)
und regulatorischen Rezeptoren

Dissertation

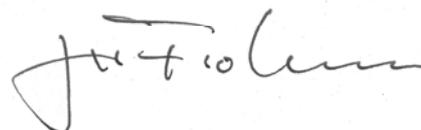
Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Birte Blankenhaus
aus Hamburg

Hamburg, 2012

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Priv.-Doz. Dr. M. BRELOER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Prof. Dr. I. BRUCHHAUS
Tag der Disputation: 25. November 2011

Hamburg, den 01. November 2011



Professor Dr. J. Fromm
Vorsitzender des Promotionsausschusses
Biologie

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Fleischer für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Minka Breloer für die Bereitstellung des interessanten Arbeitsthemas, die hervorragende, wissenschaftliche Betreuung und ihre ständige Diskussionsbereitschaft, die maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat.

Frau Professor Iris Bruchhaus möchte ich für ihre Bereitschaft diese Arbeit zu lesen und zu bewerten danken.

Frau Dr. Anja Kühl danke ich für ihre Hilfe auf dem Gebiet der Histologie und ihre unermüdliche Bereitschaft mir alle diesbezüglichen Fragen zu beantworten.

Ich danke der AG Helminthen Immunologie und der Abteilung für Immunologie für die Unterstützung, die Anregungen und Diskussionen zu meiner Arbeit und das angenehme Arbeitsklima. Besonders möchte ich mich bei Thomas Jacobs, Iris Gaworski, Marie-Luise Eschbach, Wiebke Hartmann und Christiane Steeg bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meiner Kollegin und Freundin Julia Kolbaum bedanken. Liebe Julia, ich danke dir für die schöne Zeit die wir zusammen haben, dafür dass die letzten drei Jahre ein außergewöhnliches Abenteuer waren und dafür dass du in allen Lebenslagen immer für mich da bist.

Abschließend möchte ich meinen Eltern dafür danken, dass sie mir mein Studium erst ermöglicht haben. Ohne ihre Liebe und Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Entstehung der adaptiven Immunantwort	1
1.1.1	T-Zell-Aktivierung und Kostimulation	1
1.1.2	Die Effektorphase der Immunantwort	3
1.2	Regulatorische T-Zellen (Treg)	5
1.3	<i>Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4</i> (CTLA-4, CD152)	9
1.4	Die <i>Strongyloides ratti</i>-Infektion als Modell für eine transiente Nematodeninfektion	11
1.4.1	Die Immunantwort gegen <i>S. ratti</i>	12
1.5	Regulatorische Mechanismen während Helmintheninfektionen	14
1.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	17
2	MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1	Material	18
2.1.1	Laborgeräte	18
2.1.2	Verbrauchsmaterial (Glas- und Plastikwaren).....	19
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.1.4	Enzyme	22
2.1.5	Oligonukleotidprimer	22
2.1.6	Antikörper	22
2.1.7	Peptide und Proteine	23
2.1.8	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	24
2.1.9	Tiere und Parasiten.....	26
2.1.10	Software	27
2.2	Zellbiologische Methoden	27
2.2.1	Wichtige Grundsätze der Zellkultur	27
2.2.2	Präparation muriner Milzzellen.....	27
2.2.3	Präparation muriner Lymphknotenzellen.....	27
2.2.4	Präparation muriner peripherer Blutzellen	28
2.2.5	Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität mit Trypanblau	28
2.2.6	<i>In vitro</i> Stimulation	28
2.2.7	Messung der Zellproliferation.....	29
2.2.8	Markierung von Zellen mit CFSE.....	29
2.2.9	Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung).....	30

2.3	Biochemische Methoden	31
2.3.1	ELISA zum Nachweis von Zytokinen (IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ) im Zellkulturüberstand	31
2.3.2	ELISA zum Nachweis von IL-9 im Zellkulturüberstand	32
2.3.3	ELISA zum Nachweis von <i>S. ratti</i> -spezifischem Ig im Serum	32
2.3.4	ELISA zum Nachweis von IgE im Serum.....	33
2.3.5	ELISA zum Nachweis von MMCP-I im Serum.....	33
2.4	Molekularbiologische Methoden	34
2.4.1	Gewinnung von DNA aus Stuhlproben.....	34
2.4.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR.....	34
2.5	Tierversuche und <i>S. ratti</i>-Stammerhaltung.....	36
2.5.1	Gewinnung von Serum.....	36
2.5.2	Präparation der <i>S. ratti</i> - iL3 und Stammerhaltung	37
2.5.3	Herstellung von <i>S. ratti</i> -Antigen	37
2.5.4	Infektion mit <i>S. ratti</i>	37
2.5.5	Nachweis der <i>S. ratti</i> -Infektion in Stuhlproben.....	37
2.5.6	Bestimmung der wandernden Larven in Kopf und Lunge	38
2.5.7	Bestimmung der adulten <i>S. ratti</i> im Darm	38
2.5.8	Blockade von CTLA-4.....	38
2.5.9	Depletion der Treg	38
2.5.10	<i>In vivo</i> Proliferation von TZRtg-Zellen.....	39
2.5.11	Histologie.....	39
2.6	Statistik.....	41
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Der Einfluss von CTLA-4 auf die <i>S. ratti</i>-Infektion	43
3.1.1	Induktion von CTLA-4 auf T-Zellen während der <i>S. ratti</i> -Infektion	43
3.1.2	Blockade von CTLA-4 während der <i>S. ratti</i> -Infektion.....	45
3.2	Der Einfluss von Treg auf die <i>S. ratti</i>-Infektion.....	51
3.2.1	Induktion von Treg während der <i>S. ratti</i> -Infektion	51
3.2.2	Depletion von Treg in der DEREK Maus	56
3.2.3	Untersuchung der Wurmlast in Treg-depletierten DEREK Mäusen	59
3.2.4	Untersuchung des Infektionsverlaufes in Treg-depletierten BALB/c DEREK	60
3.2.5	Untersuchung der adaptiven Immunantwort in Treg-depletierten BALB/c DEREK	63
3.2.6	Depletion der Treg zu einem späteren Zeitpunkt in der <i>S. ratti</i> -Infektion	69
3.2.7	Vergleich der <i>S. ratti</i> -Infektion in Treg-depletierten BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK	71

3.3	Untersuchung der regulatorischen Kapazität von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen	76
4	DISKUSSION	79
4.1	Induktion von CTLA-4 und Treg während der <i>S. rattii</i>-Infektion.....	79
4.2	Effekt der CTLA-4-Blockade und der Treg-Depletion.....	81
4.2.1	Die Blockade von CTLA-4 während der <i>S. rattii</i> -Infektion in BALB/c Mäusen.....	81
4.2.2	Die Depletion von Treg während der <i>S. rattii</i> -Infektion in BALB/c Mäusen	82
4.2.3	Die Kinetik der Treg-Depletion	85
4.2.4	Immunpathologie	86
4.3	Unterschiede zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen	88
4.3.1	Der Einfluss von CTLA-4 in BALB/c und C57BL/6 Mäusen	88
4.3.2	Der Einfluss von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen	89
4.4	Ausblick.....	93
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	98

Abkürzungsverzeichnis

AAMΦ	Alternativ aktivierter Makrophage
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APZ	<i>Antigen-presenting cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
BNI	Bernhard-Nocht-Institut
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>Cluster of differentiation</i>)
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>Cytotoxic T lymphocyte</i>)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>Dendritic cell</i>)
DEREG	<i>Depletion of regulatory T cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DT	Diphtherietoxin
DTR	Diphtherietoxin-Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunoabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GF	Gesichtsfeld
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GITR	<i>glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinsulfonat
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)

i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICOS	Induzierbarer Kostimulator (<i>Inducible Costimulator</i>)
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iL3	infektiöses drittes Larvenstadium von <i>Strongyloides ratti</i>
ingLK	inguinaler Lymphknoten
INOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
IPEX	<i>immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome</i>
L1	erstes Larvenstadium
mesLK	mesenterialer Lymphknoten
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MΦ	Makrophage
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	<i>Programmed Death-1</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺ -Ionen (<i>potentia hydrogenii</i>)
popLK	poplitealer Lymphknoten
<i>Priming</i>	erster Antigenkontakt und Induktion der Immunantwort
qPCR	quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur

SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>standard error of the mean</i>)
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
Teff	Effektor T-Zelle
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
Th	T-Helfer-Zelle
TMB	Tetramethylbenzidin
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf,

Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
R	Arginin
N	Asparagin
D	Asparaginsäure
C	Cystein
Q	Glutamin
E	Glutaminsäure
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
L	Leucin
K	Lysin
M	Methionin
F	Phenylalanin
P	Prolin
S	Serin
T	Threonin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
V	Valin

1 Einleitung

1.1 Die Entstehung der adaptiven Immunantwort

Das Immunsystem hat die Aufgabe den Organismus vor der Infektion durch Pathogene zu schützen. Mögliche Krankheitserreger wie Bakterien, Viren, Protozoen oder Helminthen werden zunächst durch Elemente des angeborenen Immunsystems abgewehrt, um die Etablierung einer Infektion zu verhindern. Kommt es dennoch zum Eindringen des Erregers in den Organismus und zu einer Infektion, werden mit Hilfe des angeborenen Immunsystems Zellen des adaptiven Immunsystems aktiviert. Durch das Zusammenwirken von angeborenem und adaptivem Immunsystem werden die Erreger beseitigt. Dabei induzieren die Zellen des adaptiven Immunsystems die Entstehung einer Gedächtnisantwort, die zum Schutz vor Folgeinfektionen mit dem gleichen Erreger führt.

Die zentralen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems sind T- und B-Lymphozyten. Die Aktivierung von T-Zellen und B-Zellen findet durch die Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (APZ) in sekundären lymphoiden Organen wie den Lymphknoten und der Milz statt. T-Zellen können durch die Oberflächenexpression sogenannter *cluster of differentiation-* (CD)-Moleküle in zwei Subpopulationen unterteilt werden: $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Bei $CD8^+$ T-Zellen handelt es sich um zytotoxische T-Zellen (CTL). $CD4^+$ T-Zellen werden dagegen als T-Helfer (Th)-Zellen bezeichnet und ihre Effektorfunktion besteht darin andere Zellen des Immunsystems zu aktivieren. Dazu gehören Makrophagen ($M\Phi$), dendritische Zellen (DCs), Granulozyten und CTL. Außerdem sind die Th-Zellen durch direkten Zellkontakt an der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen beteiligt [zusammengefasst in (Abbas, AK 2007)].

1.1.1 T-Zell-Aktivierung und Kostimulation

T-Zellen werden aktiviert, indem sie mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TZR) spezifisch Peptidantigene im Komplex mit dem MHC (*major histocompatibility complex*) auf der Oberfläche von APZs erkennen. Dieses erste Signal reicht jedoch für die Aktivierung von naiven T-Zellen nicht aus. Hierfür wird ein zweites kostimulatorisches Signal benötigt, welches ebenfalls durch die APZ vermittelt wird (Alegre, ML *et al.* 2001). Die

Abwesenheit eines solchen Signals führt zur Apoptose oder Anergie der T-Zelle (Abb. 1.1 A). Ein zentrales kostimulatorisches Molekül, welches an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist, ist CD28 (Abb. 1.1 B). CD28 ist ein 44 kDa großes Protein und ein Mitglied der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie. Es wird als Homodimer an der Oberfläche von T-Zellen exprimiert (Lesslauer, W *et al.* 1986). Die Bindung von CD28 an seine Liganden CD80 (June, CH *et al.* 1990; Linsley, PS *et al.* 1990) und CD86 (Freeman, GJ *et al.* 1993) führt zur T-Zell-Aktivierung, die durch Produktion von Interleukin (IL)-2 und Proliferation der Zellen gekennzeichnet ist (Freeman, GJ *et al.* 1993; Linsley, PS *et al.* 1991). CD80 und CD86 werden auf aktivierten APZs vermehrt exprimiert.

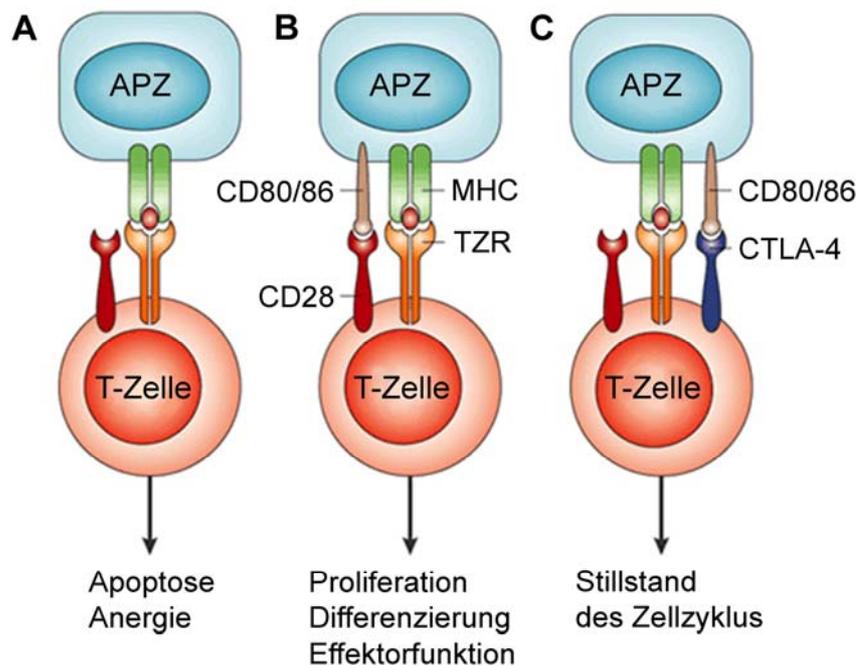


Abb. 1.1: Kostimulation durch CD28 und CTLA-4

Schematische Darstellung der Kostimulation während der Aktivierung naiver T-Zellen. (A) Die Antigenerkennung einer T-Zelle durch TZR-MHC Interaktion in Abwesenheit von Kostimulation durch CD28-CD80/CD86 führt zur Apoptose bzw. Anergie der Zelle. (B) Kommt es während der Antigenerkennung zur Kostimulation und somit zu einem zweiten aktivierenden Signal für die Zelle, beginnt sie mit der Produktion von IL-2, verstärkter Proliferation, Differenzierung und der Ausbildung von Effektorfunktionen. (C) Nach Aktivierung der Zellen kommt es zur Expression von CTLA-4 auf der Oberfläche der Zellen. CTLA-4 kompetiert mit CD28 um die Bindung zu CD80/CD86. Die Bindung von CTLA-4 an seine Liganden führt zur negativen Regulation der T-Zelle. Modifiziert nach (Alegre, ML *et al.* 2001)

Nachdem T-Zellen aktiviert wurden, benötigen sie negative Signale, die zur Limitierung und Beendigung der Immunantwort beitragen, um eine unkontrollierte Immunreaktion zu verhindern. Ein Rezeptor, der maßgeblich an der Kontrolle von Immunantworten beteiligt ist, ist CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*). Dieser gehört wie CD28 zur Ig-Superfamilie, wird erst nach Aktivierung von Effektor-T-Zellen (Teff) an deren Oberfläche exprimiert und führt zur negativen Regulation der Zelle (Abb. 1.1 C)(Walunas, TL *et al.* 1994).

Neben CD28 und CTLA-4 sind mittlerweile zahlreiche weitere kostimulatorische Moleküle bekannt. Dazu gehören ICOS (*inducible costimulator*), das aktivierende Signale vermittelt und BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) und PD-1 (*programmed death-1*), die negative Signale vermitteln. Diese Rezeptoren sind jedoch vorwiegend an der Feinregulation der Immunantwort beteiligt (Greenwald, RJ *et al.* 2005). Das Zusammenwirken aller positiven und negativen Signale, die eine Zelle während ihrer Aktivierung und Differenzierung erhält, entscheidet letztlich darüber, ob die naive T-Zelle zu einer Teff differenziert, oder ob sie anerg oder apoptotisch wird.

1.1.2 Die Effektorphase der Immunantwort

Die Aktivierung von CD4⁺ Th-Zellen führt abhängig von der Anwesenheit verschiedener Zytokine zur Differenzierung in unterschiedliche Th-Zell-Subpopulationen. Die verschiedenen Th-Zellen unterscheiden sich dabei in der Expression charakteristischer Transkriptionsfaktoren und Zytokine. Bereits seit den 1980er Jahren werden zwei zentrale Populationen von Th-Zellen, die Th1- und die Th2-Zelle, unterschieden (Mosmann, TR *et al.* 1986). Mittlerweile wurden allerdings weitere Th-Subpopulationen wie die Th17- und die Th9-Zellen beschrieben (Jager, A and Kuchroo, VK 2010).

Th1-Zellen sind darauf ausgelegt intrazelluläre Pathogene zu bekämpfen und entwickeln sich in Gegenwart von IL-12 und Interferon (IFN)- γ . Dies führt in der Th1-Zelle zur Induktion der Transkriptionsfaktoren T-bet, STAT1 und STAT4 und zur Sekretion von großen Mengen an IFN- γ . Dieses wirkt wiederum stimulierend auf M Φ und Neutrophile und steigert deren Fähigkeit phagozytierte Mikroorganismen abzutöten. B-Zellen werden durch IFN- γ zur Produktion von opsonisierenden und Komplement-bindenden IgG-Antikörpern angeregt (O'Garra, A and Robinson, D 2004).

Th2-Zellen sind an der Abwehr von extrazellulären Pathogenen beteiligt. Die Entstehung von Th2-Zellen wird durch die Zytokine IL-4, IL-25, IL-33 und TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*) induziert und führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT6, STAT5 und GATA3. Durch die Expression von GATA3 kommt es zur Synthese von typischen Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-5, IL-3, IL-9, IL-13 und IL-25 (Paul, WE and Zhu, J 2010). Sie haben vielfältige Wirkungen auf eine Reihe von Zelltypen. So kommt es durch IL-5 bzw. IL-3 und IL-9 zur Rekrutierung und Aktivierung von Eosinophilen und Mastzellen. Zudem induziert IL-4 den Antikörper-Klassenwechsel in B-Zellen und verstärkt so die Produktion von IgE und IgG1 (Zhu, J and Paul, WE 2008).

Th17-Zellen werden in Anwesenheit der Zytokine TGF- β (*transforming growth factor- β*) und IL-6 induziert und exprimieren den Transkriptionsfaktor ROR γ t. Sie sekretieren das Zytokin IL-17 und sind an der Entstehung von inflammatorischen Reaktionen und der Aktivierung von Neutrophilen beteiligt. Hierdurch können sie wahrscheinlich auch zur Schädigung von Gewebe während entzündlicher Erkrankungen beitragen (Abbas, AK 2007).

Die kürzlich beschriebenen Th9-Zellen entstehen in Gegenwart der Zytokine TGF- β und IL-4 und werden durch den Transkriptionsfaktor PU.1 charakterisiert. Sie sekretieren hauptsächlich IL-9, ein Zytokin das sowohl an der Pathologie von Autoimmunerkrankungen und Allergien beteiligt ist, als auch eine protektive Funktion bei Infektionen mit den Nematoden *Trichinella spiralis* und *Trichuris muris* hat (Goswami, R and Kaplan, MH 2011).

Th-Zell-Subpopulationen üben nicht nur Effektorfunktionen aus, sondern fördern durch die freigesetzten Zytokine die eigene Entstehung und supprimieren die Differenzierung anderer Th-Zell-Subpopulationen. So führt IFN- γ zur verstärkten Produktion von Th1-Zellen und supprimiert gleichzeitig die Entstehung von Th2-Zellen, während IL-4 vermehrt Th2-Zellen induziert und der Entstehung von Th1-Zellen entgegenwirkt (Abbas, AK *et al.* 1996). Beide Zytokine wirken der Entstehung von Th17-Zellen entgegen. Diese antagonistischen Mechanismen können zu einer Polarisierung der Immunantwort während einer Infektion führen (Abbas, AK 2007).

Helmintheninfektionen zeichnen sich typischerweise durch die Entstehung einer Th2-Immunantwort mit gleichzeitiger Suppression von Th1-Immunantworten aus

(Anthony, RM *et al.* 2007). Es kann jedoch auch zu einer gemischten Th1/Th2-Immunantwort kommen, wie sie bei Infektionen mit Filarien oder *Schistosoma mansoni* beobachtet wird (Gause, WC *et al.* 2003).

Die Regulation der Th-Zellen und die Terminierung der Immunantwort finden durch regulatorische Mechanismen statt, die gleichzeitig mit der Immunantwort induziert werden. Besonders zentral sind hierbei die regulatorischen T-Zellen (Treg) und der Rezeptor CTLA-4.

1.2 Regulatorische T-Zellen (Treg)

Treg sind essentiell für die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz und der Prävention von Autoimmunerkrankungen (Sakaguchi, S *et al.* 2008). Ein charakteristisches Merkmal für Treg in der Maus ist die Expression des Transkriptionsfaktors *forkhead box p3* (Foxp3), welcher für die Entstehung und Funktion von Treg essentiell ist (Hori, S *et al.* 2003). Die Abwesenheit von Foxp3 führt zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Die Scurfy-Maus hat eine natürliche Mutation im *Foxp3*-Gen auf dem X-Chromosom. Dies führt in hemizygoten Männchen etwa vier Wochen nach der Geburt durch starke Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen und einer Überproduktion an proinflammatorischen Zytokinen zur Lethalität (Brunkow, ME *et al.* 2001). Ein ähnliches Phänomen wird auch in Menschen mit dem IPEX-Syndrom (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) beobachtet. Die Dysfunktion von Foxp3 führt zum Verlust von funktionellen Treg und dadurch zu Autoimmunität (Ochs, HD *et al.* 2005). Zudem wurde durch genetische Manipulation von Mäusen, die es ermöglicht Treg *in vivo* zu depletieren, in zwei Modellen gezeigt, dass die induzierte Abwesenheit von Treg zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führt (Kim, J *et al.* 2009). Eines dieser Modelle ist die „*Depletion of regulatory T cell*“ (DEREG) Maus. Diese Maus verfügt über ein zusätzliches artifizielles Chromosom, welches unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors ein Fusionsprotein aus dem *enhanced green fluorescent protein* (GFP) und dem humanen Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) exprimiert. Dadurch sind die Treg anhand ihrer Fluoreszenz im Durchflusszytometer zu detektieren und können zudem durch Injektion von Diphtherietoxin (DT) depletiert werden. In diesem Modell führt die Depletion von Treg in neonatalen Mäusen zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen (Lahl, K *et al.* 2007).

Treg können im Thymus entstehen und werden dann als natürliche Treg bezeichnet. Es kann aber auch in der Peripherie in Anwesenheit von TGF- β zur Entstehung von Treg aus naiven T-Zellen kommen. Diese werden dann als induzierte Treg oder Th3-Zellen bezeichnet. Neben diesen beiden Foxp3⁺ Treg Populationen gibt es eine weitere Population von Zellen mit regulatorischer Kapazität, die TGF- β und IL-10 sekretieren, aber kein Foxp3 exprimieren. Sie entstehen bei Antigenstimulation in Anwesenheit von IL-10 und werden als Tr1-Zellen bezeichnet (Sakaguchi, S *et al.* 2008).

Neben Foxp3 ist auch die Expression des Zelloberflächenmoleküls CD25, der IL-2R α -Kette mit hoher Affinität für IL-2, charakteristisch für Treg. CD25 ist allerdings kein exklusiver Indikator für Treg, da es auch auf aktivierten T-Zellen induziert wird (Fontenot, JD and Rudensky, AY 2005). Dennoch sind die Expression von CD25 und die Fähigkeit IL-2 zu binden essentiell für die Entwicklung von Treg. IL-2- oder CD25-defiziente Mäuse leiden an starker Lymphoproliferation und erliegen Autoimmunerkrankungen (Malek, TR and Bayer, AL 2004). Menschen mit einer CD25-Defizienz entwickeln ähnlich wie bei einem Defekt im *Foxp3*-Gen ein IPEX-Syndrom (Caudy, AA *et al.* 2007).

Treg regulieren Immunantworten durch verschiedene Mechanismen, wie 1) Produktion von immunsuppressiven Zytokinen, 2) Zytolyse, 3) IL-2-Verbrauch, 4) Übertragung von cAMP und 5) CTLA-4 (Abb. 1.2) (Vignali, DA *et al.* 2008).

Treg sekretieren immunregulatorische Zytokine wie TGF- β , IL-10 und IL-35 (Abb. 1.2 A). TGF- β induziert in T-Zellen die Expression von Foxp3 und ist somit an der Entstehung von Treg beteiligt. Dadurch trägt es auch zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei, denn TGF- β -defiziente Mäuse haben eine verringerte Anzahl an Treg in der Peripherie und entwickeln starke Autoimmunerkrankungen. TGF- β inhibiert außerdem die Differenzierung von Teff, indem es die IL-2-Produktion von T-Zellen supprimiert und den Zellzyklus durch die Induktion von Zell-Zyklus-Regulatoren steuert. Zudem hat es regulatorischen Einfluss auf DCs und induziert die Synthese der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO), welche das umgebende Tryptophan abbaut. Tryptophan wird für die Proliferation von T-Zellen benötigt und so kommt es indirekt zur Inhibition der T-Zellen. Treg produziertes TGF- β führt außerdem zur Suppression von allergischen Immunantworten (Joetham, A *et al.* 2007) und verhindert die Entstehung von Kolitis im Model der entzündlichen Darmerkrankung (Li, MO *et al.*

2007). Zudem inhibiert TGF- β CTL, Makrophagen und andere Zellen des angeborenen Immunsystems [zusammengefasst in(Yoshimura, A *et al.* 2010)]

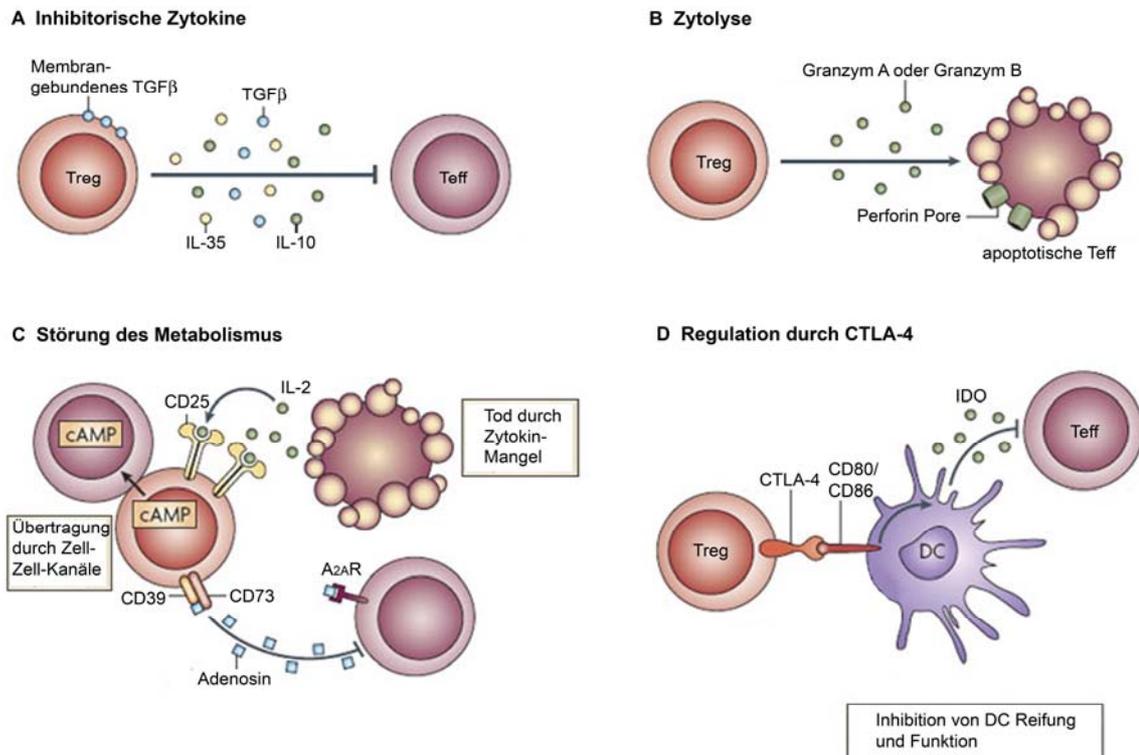


Abb. 1.2: Regulatorische Mechanismen von Treg

Die grundlegenden Mechanismen der Treg vermittelten Inhibition von Immunantworten (A) Zytokine wie IL-10, TGF- β und IL-35 wirken direkt oder indirekt und supprimieren Teff. (B) Granzym A, Granzym B und Perforin induzieren Apoptose in den Zielzellen. (C) Treg induzierte Störung des Metabolismus benachbarter Zellen. Treg entziehen mit Hilfe von CD25 den umliegenden Zellen IL-2. Treg übertragen direkt durch Zell-Zell-Kanäle cAMP. Suppression von Zellen durch die Synthese von Adenosin und damit einhergehender Adenosinrezeptor 2A Aktivierung. (D) Negative Regulation von DCs durch den Rezeptor CTLA-4. [Modifiziert nach (Vignali, DA *et al.* 2008)]

IL-10 übt seine immunsuppressive Funktion vorwiegend auf Makrophagen und DCs aus, indem es die antigenpräsentierenden Eigenschaften der Zellen limitiert. Es kommt zur Herabregulation der Oberflächenexpression von MHC-II, der Kostimulatoren CD80/CD86 und zur verringerten Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor- α und IL-12. IL-10 wirkt jedoch nicht ausschließlich supprimierend auf APZ, es hat zudem stimulatorische Wirkung auf B-Zellen, Granulozyten, Mastzellen, Keratinozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und CTL (Hedrich, CM and Bream, JH 2010). Während Helmintheninfektionen werden häufig erhöhte Konzentrationen von IL-10 gemessen und die helmintheninduzierte

Suppression von allergischen Atemwegsentzündungen wird durch IL-10 vermittelt (Hesse, M *et al.* 2004; Smits, HH *et al.* 2007; Wohlleben, G *et al.* 2004).

Das erst kürzlich entdeckte Zytokin IL-35 ist ein Mitglied der IL-12 Zytokinfamilie und ein Heterodimer, dessen Monomere, Ebi3 und p35, verstärkt von Treg gebildet werden. IL-35 führt zur Expansion und Induktion von Treg und ist essentiell für ihre maximale suppressive Kapazität. Zudem supprimiert IL-35 die T-Zell-Proliferation *in vitro* (Collison, LW *et al.* 2007). Seine genauen Funktionen *in vivo* und sein Potenzial stabile Treg für therapeutische Zwecke zu induzieren sind Gegenstand aktueller Forschungen (Collison, LW *et al.* 2010).

Treg können zudem Immunantworten durch Zytolyse anderer Zellen regulieren (Abb. 1.2 B). Humane Treg exprimieren Granzym A und Perforin wohingegen murine Treg in der Lage sind B-Zellen, NK-Zellen und CTL hauptsächlich Granzym B-abhängig zu töten und so deren Effektorfunktionen zu unterbinden (Cao, X *et al.* 2007; Grossman, WJ *et al.* 2004; Zhao, DM *et al.* 2006).

Ein weiterer Mechanismus, über welchen Treg suppressiv wirken können beinhaltet die Expression der hochaffinen IL-2R α -Kette (CD25) auf der Oberfläche (Abb. 1.2 C). Treg können dadurch IL-2, welches zur Proliferation und zum Überleben von T-Zellen benötigt wird, binden und so den Tod der T-Zellen durch IL-2-Mangel induzieren (de la Rosa, M *et al.* 2004).

Zudem können Treg über verschiedene Wege die intrazelluläre Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in Zellen erhöhen (Abb. 1.2 C). Intrazelluläres cAMP ist ein Antagonist von IL-2 und ein potenter Inhibitor der T-Zell-Proliferation (Johnson, KW *et al.* 1988). Treg produzieren über die Ektoenzyme CD39 und CD73 Adenosin, welches den Adenosinrezeptor 2A auf T-Zellen aktiviert (Deaglio, S *et al.* 2007). Dadurch kommt es wiederum zur Aktivierung der Adenylylzyklase, und zur Synthese von zytosolischem cAMP. Ein weiterer Mechanismus benötigt direkten Zellkontakt, denn Treg können über Zell-Zell-Kanäle cAMP in T-Zellen transferieren (Bopp, T *et al.* 2007).

Schließlich können Treg ihre Zielzellen auch durch direkten Kontakt über Oberflächenrezeptoren regulieren. Der wichtigste negative Regulator in diesem Zusammenhang ist CTLA-4 (Abb. 1.2 D).

1.3 *Cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 (CTLA-4, CD152)*

CTLA-4 besteht aus 223 Aminosäuren und bildet ein Homodimer von etwa 41-43 kDa. Als Mitglied der Ig-Superfamilie besitzt CTLA-4 eine extrazelluläre variable Ig-Domäne sowie einen aus 36 Aminosäuren bestehenden intrazellulären Teil (Baroja, ML *et al.* 2002; Harper, K *et al.* 1991).

Die Bedeutung von CTLA-4 für die Homöostase des Immunsystems zeigt sich am Phänotyp der CTLA-4-defizienten Maus. Sie entwickelt ähnlich wie Treg-defiziente Mäuse starke Lymphoproliferation, gekennzeichnet durch vergrößerte Lymphknoten und stark aktivierte Lymphozyten (Tivol, EA *et al.* 1995; Waterhouse, P *et al.* 1995). Nach drei bis vier Wochen versterben die Tiere aufgrund der Entzündungsreaktionen. Die Gabe von CTLA-4Ig kann die Entstehung der Pathologie unterbinden. Nach Absetzen von CTLA-4Ig kommt es jedoch erneut zur Aktivierung und Proliferation der Lymphozyten, was ein Hinweis darauf ist, dass CTLA-4 an der Aufrechterhaltung der Toleranz beteiligt ist (Tivol, EA *et al.* 1997).

In ruhenden Th-Zellen wird CTLA-4 intrazellulär in Vesikeln exprimiert und erst nach T-Zell-Aktivierung an die Oberfläche transportiert (Alegre, ML *et al.* 1996; Leung, HT *et al.* 1995; Linsley, PS *et al.* 1996; Walunas, TL *et al.* 1996). Treg exprimieren konstitutiv CTLA-4 (Takahashi, T *et al.* 2000), welches für deren Funktion und die Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz essentiell ist (Friedline, RH *et al.* 2009; Read, S *et al.* 2000). Die spezifische Defizienz von CTLA-4 in Treg führt in Mäusen zur spontanen Entwicklung von systemischer Lymphoproliferation und T-Zell-vermittelter Autoimmunität. Zudem verringert die CTLA-4 Defizienz die suppressive Kapazität der Treg (Wing, K *et al.* 2008). CTLA-4 kompetiert aufgrund seiner ähnlichen Struktur und demselben Bindungsmotiv (MYPPPY) mit CD28 um die Bindung an CD80/CD86 (Balzano, C *et al.* 1992). Die höhere Affinität und Avidität von CTLA-4 zu den Liganden führt zur Verdrängung von CD28 und somit zur Unterbrechung der CD28-vermittelten Signale (Abb. 1.1 C) (Linsley, PS *et al.* 1994). Aktuelle Studien zeigen, dass CTLA-4 zudem in der Lage ist CD80 und CD86 von APZ durch Trans-Endozytose zu entfernen und zu degradieren, wodurch ebenfalls die Kostimulation durch CD28 unterbunden wird (Qureshi, OS *et al.* 2011).

Neben der Inhibition von CD28-vermittelten kostimulatorischen Signalen kann CTLA-4 über seinen zytoplasmatischen Teil negative Signale in die T-Zelle weiterleiten. Die

intrazelluläre Domäne von CTLA-4 enthält ein YVKM Motiv, welches zur Rekrutierung der Src-Kinasen Fyn und Lck beiträgt. Die Phosphorylierung von Y165 führt zur Rekrutierung der *Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase* (SHP-2), was wiederum zur Dephosphorylierung der TZR- ζ -Kette führt (Chuang, E *et al.* 1999; Lee, KM *et al.* 1998).

CTLA-4 induziert zudem in der interagierenden APZ durch CD80/CD86 die Expression vonIDO. Dadurch kommt es zu verstärktem Tryptophanabbau, welches für die Proliferation von T-Zellen benötigt wird und dessen Abbau somit indirekt zur Inhibition der T-Zell-Proliferation beiträgt (Abb. 1.2 D) (Grohmann, U *et al.* 2002).

Ein weiterer Mechanismus besteht darin die Motilität von T-Zellen zu erhöhen. Dadurch verhindert CTLA-4 die Entstehung des TZR-induzierten Stop-Signals, welches für die Bildung stabiler Konjugate zwischen T-Zelle und APZ benötigt wird und hemmt so Aktivierung von T-Zellen (Schneider, H *et al.* 2006).

Aufgrund dieser verschiedenen suppressiven Funktionen ist CTLA-4 ein zentraler negativer Regulator von Immunantworten und hemmt die Proliferation und die IL-2 Produktion von T-Zellen (Walunas, TL *et al.* 1996; Walunas, TL *et al.* 1994). Zudem führen CTLA-4 vermittelte Signale zur Induktion von peripherer T-Zell-Toleranz und durch Inhibition des Zellzyklus kommt es zur Anergie von T-Zellen (Greenwald, RJ *et al.* 2001; Perez, VL *et al.* 1997).

CTLA-4 hat außerdem Einfluss auf die Th-Zell-Differenzierung. T-Zellen aus CTLA-4-defizienten Mäusen zeigen nach Aktivierung durch den TZR eine Th2-Polarisation, mit vermehrter IL-4 und IL-5 Sekretion (Bour-Jordan, H *et al.* 2003; Khattri, R *et al.* 1999; Oosterwegel, MA *et al.* 1999). Das Engagement von CTLA-4 hingegen supprimiert die Entstehung von Th2-Zellen und induziert Th1-Zellen (Ubaldi, V *et al.* 2003).

1.4 Die *Strongyloides ratti*-Infektion als Modell für eine transiente Nematodeninfektion

Die Nematoden der Gattung *Strongyloides* sind gastrointestinale Parasiten von Vertebraten. Die verschiedenen Arten infizieren Amphibien, Reptilien, Vögel und Säugetiere (Speare, R 1989). Menschen werden von *Strongyloides stercoralis*, aber zu einem geringen Anteil auch von *Strongyloides fulleborni* infiziert (Speare, R 1987; Viney, ME and Lok, JB 2007). *S. ratti* wurde erstmals 1925 von Sandground als gastrointestinaler Parasit von Wildratten beschrieben (Sandground, JH 1925) ist aber auch in der Lage Mäuse patent zu infizieren (Dawkins, HJ *et al.* 1980).

Der Lebenszyklus von *Strongyloides* spp. ist komplex und besteht aus freilebenden und parasitären Stadien (Abb. 1.3). Infektiöse dritte Larven (iL3) penetrieren die unverletzte Haut ihres Wirtes und wandern durch den Körper über Lunge und Kopf zum Rachen, wo sie das Gewebe verlassen. Die Larven werden vom Wirt verschluckt, wodurch sie ihren eigentlichen Lebensraum, den Dünndarm erreichen. Hier häuten sich die iL3 zweimal und entwickeln sich über ein viertes Larvenstadium zum adulten, parasitären Weibchen, welches eingebettet in der Mukosa des Dünndarms lebt. Durch mitotische Parthenogenese reifen in den Weibchen Eier, aus denen teilweise schon im Darm des Wirtes die ersten Larven (L1) schlüpfen und mit dem Fäzes ausgeschieden werden. Erreichen die Larven die freie Welt, haben sie dort, je nach Geschlecht, verschiedene Entwicklungsmöglichkeiten. Die Entscheidung über das Geschlecht wird bereits bei der Produktion der Eier im parasitären Weibchen getroffen. Die Festlegung des Geschlechts erfolgt bei *Strongyloides* über die Geschlechtschromosomen. Weibchen sind mit zwei X-Chromosomen ausgestattet (XX), Männchen hingegen entstehen bei Verlust eines X-Chromosoms während der mitotischen Parthenogenese und haben den Genotyp X0 (Harvey, SC and Viney, ME 2001). Letztere haben keine andere Möglichkeit als sich in adulte, freilebende Männchen zu entwickeln. Die weiblichen Larven hingegen können sich entweder auf direktem Weg zur iL3 entwickeln und so den Lebenszyklus durch Penetration eines Wirtes schließen oder sie werden auch, wie die männlichen Larven, zu adulten freilebenden Würmern, kopulieren mit den Männchen und pflanzen sich sexuell fort. Hierbei entstehen wiederum iL3, die nun den Lebenszyklus von neuem beginnen können (Streit, A 2008).

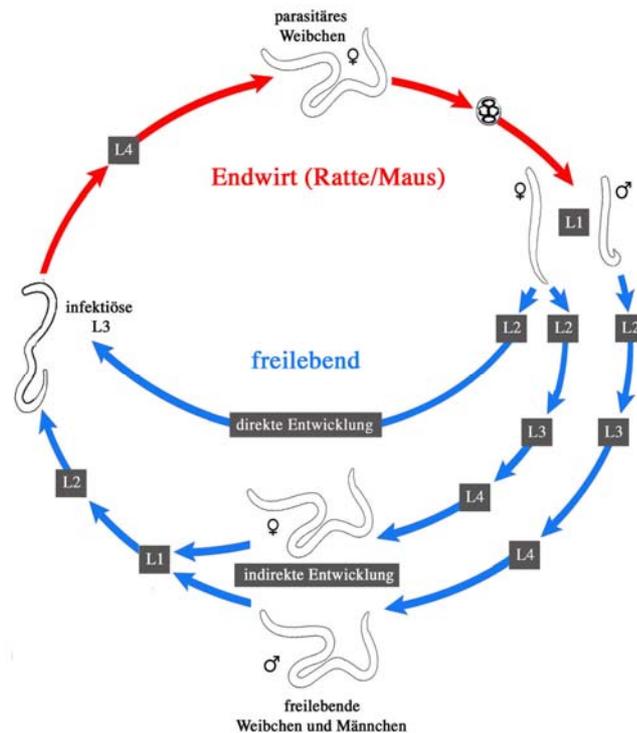


Abb. 1.3: Lebenszyklus von *S. ratti*

Die infektiöse dritte Larve (iL3) penetriert die Haut eines Wirtes und wandert über Lunge und Kopf zum Rachen, wo sie das Gewebe verlässt und verschluckt wird. Im Darm häutet sie sich über das vierte Larvenstadium zum adulten Weibchen, welches durch Parthenogenese Eier produziert. Diese Eier bzw. bereits geschlüpfte L1 verlassen den Wirt mit dem Stuhl. Außerhalb des Wirtes entwickeln sich die Larven entweder direkt zur iL3 oder es kommt zu einer indirekten Entwicklung, bei welcher sich zunächst freilebende Männchen und Weibchen entwickeln, die sich sexuell fortpflanzen. Die hieraus entstehenden iL3 penetrieren erneut die Haut eines Wirtes und schließen so den Lebenszyklus.

1.4.1 Die Immunantwort gegen *S. ratti*

Bei der *S. ratti*-Infektion handelt es sich um eine transiente Infektion, die in Mäusen und Ratten einen ähnlichen Verlauf hat. Dabei werden die Würmer zwischen Tag 20 und Tag 40 nach der Infektion abgestoßen (Dawkins, HJ and Grove, DI 1981; Dawkins, HJ *et al.* 1980; Eschbach, ML *et al.* 2010; Wertheim, G and Lengy, J 1965; Wilkes, CP *et al.* 2007). Die Immunantwort gegen *Strongyloides* ist eine typische Th2-Immunantwort, gekennzeichnet durch Eosinophilie, die Produktion von Th2-Zytokinen wie IL-3, IL-5 und IL-13, intestinale Mastozytose und die Produktion von Antikörpern wie IgE, IgG und IgM. Verschiedene *Strongyloides*-Infektionsmodelle in Nagetieren wurden verwendet, um den Mechanismus der Immunantwort zu untersuchen (Brigandi, RA *et al.* 1997; Dawkins, HJ *et al.* 1982; Machado, ER *et al.* 2007; Wilkes, CP *et al.* 2007).

Trotz Schwierigkeiten die humane *S. stercoralis*-Infektion in der Maus zu etablieren, konnte dieses Modell genutzt werden, um die Immunantwort gegen die wandernden Larven zu untersuchen (Dawkins, HJ and Grove, DI 1982). Hierfür wurden die iL3 in sog. Diffusionskammern unter die Haut der Tiere implantiert. Innerhalb von sechs Tagen kam es zur Abtötung der iL3, vermittelt durch eosinophile und neutrophile Granulozyten, sowie die Opsonisierung der Larven durch Komplement (Abraham, D *et al.* 1995; Brigandi, RA *et al.* 1996; Galioto, AM *et al.* 2006; Kerepesi, LA *et al.* 2006; Rotman, HL *et al.* 1996). Auch bei der Bekämpfung von *S. ratti*-iL3 spielen Granulozyten eine zentrale Rolle (Watanabe, K *et al.* 2000). Das Zytokin IL-5 ist dabei essentiell für die Immunantwort gegen *S. ratti*, *S. venezuelensis* und *S. stercoralis* (Herbert, DR *et al.* 2000; Korenaga, M *et al.* 1991; Ovington, KS *et al.* 1998; Watanabe, K *et al.* 2003) und führt zur Rekrutierung von Eosinophilen zum Ort der Infektion (Dawkins, HJ *et al.* 1982; El-Malky, M *et al.* 2003; Ovington, KS *et al.* 1998). Die induzierten Eosinophilen sind nicht nur an der Abtötung der Larven beteiligt, sondern initiieren außerdem die adaptive Immunantwort, indem sie als APZ für T-Zellen dienen (Padigel, UM *et al.* 2007; Padigel, UM *et al.* 2006).

Die adaptive Immunantwort gegen *Strongyloides* ist charakterisiert durch die Produktion der Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10 und gleichzeitiger Suppression von IFN- γ (Bleay, C *et al.* 2007; Eschbach, ML *et al.* 2010; Fernandes, A *et al.* 2008). Die Zytokine führen zur Aktivierung von Effektormechanismen, die für die Expulsion der Würmer verantwortlich sind. Besonders zentral sind hierbei Mastzellen, die durch IL-3 aktiviert werden (Austen, KF and Boyce, JA 2001). Mastzelldefiziente Mäuse zeigen verlängerte *S. venezuelensis*- und *S. ratti*-Infektionen (Fukao, T *et al.* 2002; Nawa, Y *et al.* 1985) und die Administration von IL-3, und die damit gesteigerte Mastzellzahl im Darm, führt zu einer verringerten Anzahl an *S. ratti*-Weibchen im Darm (Abe, T *et al.* 1993). In Übereinstimmung damit hält die *S. venezuelensis*-Infektion in IL-3-defizienten Mäusen länger an (Lantz, CS *et al.* 1998). Mastzellen setzen eine Reihe von Mediatoren frei und es wurde gezeigt, dass Glycosaminoglycane von Mastzellen die Einbettung adulter *S. venezuelensis*-Weibchen in die Mukosa verhindern können und so zur Abstoßung der Würmer beitragen (Maruyama, H *et al.* 2000).

Die Induktion der adaptiven Immunantwort führt auch zur Aktivierung von B-Zellen, die protektive Antikörper sekretieren. Die Zytokine IL-4 und IL-13 induzieren den Klassenwechsel von IgM zu IgG1 und IgE (Poulsen, LK and Hummelshoj, L 2007). IgE ist hauptsächlich an der Aktivierung von Mastzellen und Basophilen beteiligt (Lantz, CS *et al.* 1997), wohingegen die *Strongyloides*-spezifischen IgM und IgG1 Antikörper besonders an der Protektion gegenüber einer erneuten Infektion beteiligt sind (Brigandi, RA *et al.* 1996; Ligas, JA *et al.* 2003). In bereits immunisierten Mäusen findet die Abtötung von *S. stercoralis*-Larven in Diffusionskammern schon innerhalb von 6-12 Stunden (h) nach Implantation statt. Dieser Effekt wird durch Antikörper und Komplement vermittelt (Brigandi, RA *et al.* 1996; Herbert, DR *et al.* 2002; Kerepesi, LA *et al.* 2006), welche die Larven opsonisieren und so für Neutrophile markieren (Galioto, AM *et al.* 2006). Die Infektion mit *S. ratti* führt ebenfalls zur erhöhten Produktion von IgM und IgG1. Während der Reinfektion zeigen die Mäuse einen erhöhten Schutz gegenüber *S. ratti*, was anhand eines stark verringerten Ausstoßes von *S. ratti*-DNA mit dem Stuhl nachgewiesen wurde (Eschbach, ML *et al.* 2010).

1.5 Regulatorische Mechanismen während Helmintheninfektionen

Infektionen mit parasitären Würmern können zum Teil über Jahre andauern und dabei nur milde oder gar keine Symptome zeigen. Die lange Persistenz der Helminthen in ihrem Wirt wird häufig dadurch gewährleistet, dass regulatorische Mechanismen des Wirtsimmunsystems eine effektive Bekämpfung des Erregers behindern.

Die Immunmodulation durch Helminthen beeinflusst nicht nur die Immunantwort gegen den Wurm selbst, sondern auch gegen unbeteiligte Antigene. Dies kann die Symptome von Allergien und Autoimmunerkrankungen mildern (Helmsby, H 2009).

Eine vorliegende *S. venezuelensis*- oder *S. stercoralis*-Infektion führt zu einer Verminderung der Atemwegshyperreaktivität in einem Allergie-Modell (Negrao-Correa, D *et al.* 2003; Wang, CC *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu kann dies aber zu einer schlechteren Abwehr von Koinfektionen oder zu einer verminderten Effizienz von Impfungen führen. So wurde gezeigt, dass die Infektion mit *S. ratti* oder der Filarie *Litomosoides sigmodontis* die Effizienz von experimentellen Vakzinierungen verringert (Hartmann, W *et al.* 2011) (Kolbaum, J *et al.* in Vorbereitung).

Im Verlauf von Wurminfektionen kommt es häufig zur Induktion von Treg. In Patienten, die an Onchozercose leiden, findet man eine erhöhte Anzahl an IL-10- und TGF- β -sekretierenden Tr1-Zellen (Satoguina, J *et al.* 2002) und die Infektion mit *Brugia malayi* oder *S. mansoni* steigert die Anzahl an Foxp3⁺ Treg (Babu, S *et al.* 2006; Watanabe, K *et al.* 2007). In murinen Studien wurde ebenfalls eine Expansion von Treg im Verlauf von Helmintheninfektionen beobachtet. Die Infektion mit dem gastrointestinalen Nematoden *Heligmosomoides polygyrus* erhöht die Anzahl an Treg in den drainierenden Lymphknoten (Finney, CA *et al.* 2007) und die Infektionen mit Filarien wie *L. sigmodontis* und *B. malayi* führen zu gesteigerten Treg-Anzahlen (McSorley, HJ *et al.* 2008; Taylor, MD *et al.* 2007). In der *S. mansoni*-Infektion korreliert die Anzahl an Treg mit verringerter Immunpathologie in der Leber (Watanabe, K *et al.* 2009).

Die durch Helmintheninfektionen expandierten Treg können die Symptome von allergischen Atemwegsentzündungen in Mäusen reduzieren, wie am Modell von *H. polygyrus* und *L. sigmodontis* gezeigt wurde. Die Depletion von Treg während der *H. polygyrus*-Infektion konnte diesen Effekt wieder aufheben (Dittrich, AM *et al.* 2008; Wilson, MS *et al.* 2005). Eine vorliegende *H. polygyrus*-Infektion supprimiert außerdem die Immunantwort gegen eine Koinfektion mit einem nicht-lethalen *Plasmodium yoelii*-Stamm. Dadurch werden die Parasitämie und die Sterberate der Mäuse erhöht. Die Depletion der Treg führt zur Rekonstitution der Immunantwort gegen *P. yoelii* und zur Genesung der Mäuse (Tetsutani, K *et al.* 2009).

Die Depletion von Treg vor einer Infektion mit *L. sigmodontis* verstärkt die Th2-Immunantwort und führt zu einer verringerten Wurmlast an Tag 60 nach der Infektion (Taylor, MD *et al.* 2009). Die Treg-Depletion nach Etablierung der Infektion führt allerdings nur bei gleichzeitiger Blockade von CTLA-4 zu einer Reduktion der Wurmlast (Taylor, MD *et al.* 2007).

Auch der Rezeptor CTLA-4 wird während Wurminfektionen verstärkt exprimiert. So zeigen Patienten, die mit den Filarien *Loa loa*, *Wuchereria bancrofti* und *Onchocerca volvulus* infiziert sind eine erhöhte Expression von CTLA-4 auf CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Die experimentellen Infektionen von Mäusen mit *H. polygyrus*, *T. spiralis*, *L. sigmodontis*, *B. malayi* und *S. mansoni* führen zu einem Anstieg der CTLA-4 Expression, vorwiegend auf Teff (Finney, CA *et al.* 2007; Furze, RC *et al.* 2006;

McSorley, HJ *et al.* 2008; Taylor, MD *et al.* 2007; Walsh, CM *et al.* 2007). Die Blockade von CTLA-4 bewirkt eine Verstärkung der Th2-Immunantwort, und hat in der *T. spiralis*- und in der *Nippostrongylus brasiliensis*-Infektion eine Reduktion der Wurmlast zur Folge (Furze, RC *et al.* 2006; McCoy, K *et al.* 1997).

Neben der Expansion von Treg und der Steigerung der CTLA-4 Expression gibt es weitere Mechanismen, die zur Suppression der Immunantwort während Helmintheninfektionen beitragen. Dazu gehört die Induktion von immunsuppressiven regulatorischen B-Zellen (Breg), die sich durch ihre Produktion von IL-10 auszeichnen (Hussaarts, L *et al.* 2011). Breg aus *S. mansoni* oder *H. polygyrus* infizierten Mäusen können IL-10 abhängig allergische Atemwegsentzündungen unterdrücken (Amu, S *et al.* 2010; Smits, HH *et al.* 2007; Wilson, MS *et al.* 2010).

Eine weitere Zellpopulation mit immunsuppressiven Funktionen sind die alternativ aktivierten Makrophagen (AAM Φ). Sie werden durch IL-4 und IL-13 (Gordon, S and Martinez, FO 2010) während Helmintheninfektionen induziert (Anthony, RM *et al.* 2006; MacDonald, AS *et al.* 2003; Rodriguez-Sosa, M *et al.* 2002; Taylor, MD *et al.* 2006), zeigen aber keine Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) sondern exprimieren verstärkt das Enzym Arginase-1 (Hesse, M *et al.* 2001). Die genaue Funktion von AAM Φ scheint stark vom Infektionsmodell abzuhängen. So spielen AAM Φ eine wichtige Rolle bei der Expulsion von *H. polygyrus* und *N. brasiliensis* und sind somit wirkungsvolle Effektoren in der Abwehr von Helminthen. In Infektionen mit *L. sigmodontis*, *B. malayi* oder *S. mansoni* zeigen sie immunmodulatorische Funktionen, entweder über direkten Zellkontakt, die Sekretion von TGF- β und IL-10 oder die Depletion von L-Arginin (Jenkins, SJ and Allen, JE 2010). Zudem scheinen sie auch eine wichtige Rolle bei der Reparatur von Gewebe zu spielen. Migrierende Larven, aber auch persistierende Würmer führen zu Gewebeschädigungen ihres Wirtes, die durch AAM Φ effektiv behoben werden (Maizels, RM *et al.* 2004).

Des Weiteren sekretieren Helminthen Proteine, durch welche sie aktiv die immunregulatorischen Funktionen des Immunsystems beeinflussen können (Hewitson, JP *et al.* 2009). Die Filarie *B. malayi* sekretiert Zytokin-Homologe, wie das TGF- β -Homolog TGH-2 (Gomez-Escobar, N *et al.* 2000). Auch der gastrointestinale Nematode

H. polygyrus sekretiert ein TGF- β -Holomog, welches zur Induktion von Foxp3⁺ T-Zellen während der Infektion führt (Grainger, JR *et al.* 2010).

B. malayi sekretiert zudem ein Homolog des humanen MIF (*macrophage migration inhibitory factor*) (Pastrana, DV *et al.* 1998). MIF ist an der Induktion von AAM Φ beteiligt, wirkt synergistisch mit IL-4 und verstärkt die Expression des IL-4 Rezeptors an der Oberfläche von Makrophagen (Prieto-Lafuente, L *et al.* 2009).

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Bei der Entstehung einer Immunantwort kommt es gleichzeitig zur Induktion von regulatorischen Effektoren des Immunsystems. Diese werden für die rechtzeitige Beendigung der Immunantwort benötigt und verhindern zudem die Entstehung von Immunpathologie. Im Gegensatz dazu können sie aber auch mit der effektiven Bekämpfung von Pathogenen interferieren. Einige Erreger machen sich daher diese wirtseigenen regulatorischen Elemente zunutze, um durch deren Aktivierung die Immunantwort gegen sich selbst zu stören.

Zwei zentrale Elemente der Immunregulation sind der negative Kostimulator CTLA-4 und eine Subpopulation der T-Zellen, die Treg.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss von CTLA-4 und Treg auf die transiente *S. ratti*-Infektion untersucht werden. Hierbei sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Kommt es während der Infektion mit *S. ratti* zu einer Induktion von CTLA-4 und Treg?
- Interferieren CTLA-4 und/oder Treg mit der Entstehung der Immunantwort gegen *S. ratti* durch negative Regulation?
- Haben CTLA-4 und Treg in den beiden Mauslinien BALB/c und C57BL/6 während der *S. ratti*-Infektion die gleiche Funktion?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Herkunft
Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Ausgießstation (für Paraffin)	Vogel, Gießen
β -Szintillationszähler	PerkinElmer/Wallac, Freiburg
CO ₂ -Inkubator 37°C, Innova co-170	New Brunswick Scientific, Nijmegen, Niederlande
Inkubator 37°C, (FunctionLine)	Heraeus Instruments, Hanau
Inkubator 24°C	EMKO-Electronics, Bursa, Türkei
Elektronische Pipette	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Reader (MRX II)	Dynex Technologies, Berlin
FACSCalibur, Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebeentwässerungskarussel (Histokinette)	Enno Vieth GmbH, Wiesmoor
Kühl- und Gefrieranlage	Liebherr-Hausgeräte, Rostock
Lichtmikroskop	Hund GmbH, Wetzlar
Magnetrührer	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten	Thermo Electron LED, Langenselb
pH-Meter (WTW pH 537)	Labotec, Wiesbaden

Bezeichnung	Herkunft
Pipetten 1 µL, 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf, Hamburg; Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe „accu-jet pro“	Brandt, Wertheim
Sterilwerkbank „Lamin Air HB 2448“	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	GFL mbH, Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage (TKA Genpure)	TKA GmbH, Niederelbert
Zellerntegerät „Microcell Harvester“	Inotech, Reppischhof, Schweiz
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus-Sepatech, Hanau
Zentrifuge Multifuge (1 L-R)	Heraeus-Sepatech, Hanau
Zentrifuge (5415D)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (1-15 K)	Sigma, Osterode am Harz

2.1.2 Verbrauchsmaterial (Glas- und Plastikwaren)

Alle mit * gekennzeichneten Materialien wurden steril bezogen.

Bezeichnung	Hersteller
Chirurgische Einmal-Skalpelle*	Braun, Melsungen
EDTA-Röhrchen	Kabe Labortechnik, Nümbrecht- Elsenroth
ELISA 96-Loch Platten	Greiner bio-one, Frickenhausen
FACS Röhrchen (5 mL Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht

Bezeichnung	Hersteller
Objektträger, geschliffen	R. Langenbrinck, Teningen
Reaktionsgefäße (0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Nümbrecht
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Kanülen*	Braun, Melsungen
Neubauer-Zählkammer (0,1 x 0,0025 mm ²)	Brandt, Wertheim
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Wisconsin, USA
Petrischalen (100 x 200 mm)*	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Greiner bio-on, Frickenhausen; Sarstedt, Nümbrecht
Safelock-Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf, Hamburg
Schottflaschen	Schütt Labortechnik, Göttingen
Spritzen (1, 5 und 10 mL)*	Braun, Melsungen
Sterilfilter (Porengröße 0,22 / 0,45 µm)*	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten (5, 10 und 25 mL)*	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe "Cell Strainer" (70 µm)*	Becton Dickinson, Heidelberg
Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Reagenz	Hersteller/ Firma
Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Desoxyribonukleosidtriphosphat	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
QIAamp DNA Stool Kit	Qiagen, Hilden

Reagenz	Hersteller/ Firma
SYBR® Green I	Invitrogen, Darmstadt
Magnesiumchlorid (25mM)	Qiagen, Hilden
Reagenzien für biochemische Arbeiten	
Reagenz	Hersteller/ Firma
Rinderserumalbumin (BSA)	Serva Feinbiochemika, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin-HRP	DAKO, Glostrup, Dänemark
Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Reagenzien für zellbiologische Arbeiten	
Reagenz	Hersteller/ Firma
Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, Frankfurt
β-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Dulbecco's PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	PAN-Biotech, Frankfurt
Fc-Blocklösung	BNI Hamburg
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	PAA, Linz, Österreich
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinsulfonat (HEPES)	PAA, Linz, Österreich
³ H-Thymidin (1 mCi/mL)	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden

Reagenz	Hersteller/ Firma
Incidin Liquid	Ecolab, Düsseldorf
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Paraffin	Vogel, Gießen
Penicillin G-Streptomycin Lösung (100-fach)	Gibco/BRL GmbH, Eggenstein
RPMI 1640-Kulturmedium ohne L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
Szintillationsflüssigkeit für β -Counter	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen

2.1.4 Enzyme

Enzym	Hersteller/ Firma
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (HotStar)	Qiagen, Hilden

2.1.5 Oligonukleotidprimer

Primer	Sequenz
StroS2	5'-TTAGAGTCGTGTTGCTTGGA-3'
StroAS1	5'-GTGCAACTGGCTCTGTATGC-3'

2.1.6 Antikörper

Antikörper für ELISA und T-Zell-Stimulation

Antikörper	Hersteller/ Firma
ELISA Kits „DuoSet®“ (IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ)	R&D Systems, Wiesbaden
Hamster anti-CD3 (145-2C11)	BNI, Hamburg

Antikörper	Hersteller/ Firma
Hamster anti-CTLA-4 (4F10)	BNI, Hamburg
Hamster anti-Maus IL-9-biotinyliert (D9302C12) Detektions-AK	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Ratte anti-Maus IL-9 (D8402E8) <i>Capture</i> -AK	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Ratte anti-Maus IgG1-HRP	Invitrogen, Darmstadt
Ratte anti-Maus IgM-HRP	Zymed, Karlsruhe
MMCP-I ELISA Kit	Moredun Scientific, Penicuik, Schottland
Mouse-IgE-ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg

Antikörper für FACS-Analyse

Antikörper	Hersteller/ Firma
Hamster anti-CTLA-4-PE, (UC10-4B9)	eBioscience, Frankfurt
Hamster IgG Isotypkontrolle (eBio299Arm)	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-Maus/Ratte Foxp3-APC (FJK-16s)	eBioscience, Frankfurt
Ratte IgG2a κ Isotypkontrolle	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-Maus CD4-FITC (RM4-5)	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD4-PerCP (RM4-5)	BD Pharmingen, Heidelberg

2.1.7 Peptide und Proteine

Reagenz	Hersteller/ Firma
OVA-Peptid (OVA ₃₂₃₋₃₃₉), HPLC-gereinigt (ISQAVHAAHAENEAGR)	JPT Peptide Technologies, Berlin
Diphtherietoxin	Sigma, Deisenhofen

2.1.8 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Stammlösungen wurden mit deionisiertem Wasser (*Aqua dest.*) angesetzt. Für die Zellkultur wurden hitzeunempfindliche Lösungen vor Verwendung autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min) und hitzeempfindliche Lösungen steril filtriert (Porengröße 0,22 µm). FCS wurde zur Inaktivierung von Komplementfaktoren 30 min bei 56 °C erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Medium/ Puffer/ Stammlösung	Zusammensetzung
CFSE-Stammlösung	5 mM in DMSO
dNTP-Mix (PCR)	2 mM dATP/dCTP/dGTP/dTTP
ELISA-Beschichtungspuffer	Lösung A: 10 mM Na ₂ CO ₃ Lösung B: 20 mM NaHCO ₃ Lösungen mischen bis pH 9,6
ELISA-Blockpuffer	1x PBS mit 1 % BSA (w/v)
ELISA-Stopplösung	2 M H ₂ SO ₄
ELISA-Substratlösung	12 mL ELISA-Substratpuffer 200 µL ELISA-TMB-Lösung 1,2 µL 30 % H ₂ O ₂
ELISA-Substratpuffer	100 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 5,5
ELISA-TMB-Lösung	6 mg Tetramethylbenzidin (TMB) in 1 mL DMSO
ELISA-Waschpuffer	1x PBS mit 0,05 % (w/v) Tween 20
Erythrozytenlysepuffer	10 % 0,1 M Tris/HCL (pH 7,5) 90 % 0,16 M Ammoniumchlorid

Medium/ Puffer/ Stammlösung	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1x PBS mit 1 % FCS, 0,1 % Natriumazid
Formol (neutral und gefuppert) nach Lillie	100 mL 40 % Formol 900 mL <i>Aqua dest.</i> 4 g NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O 8,1 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
IgE-ELISA-Puffer	1x PBS mit 10 % FCS
IL-9-ELISA-Puffer	1x PBS mit 10 % FCS, 0,05 % (w/v) Tween 20
MMCP-I-Puffer	1x PBS mit 1 % BSA, 0,05 % (w/v) Tween 20
PBS (10x) für 1x PBS ergibt sich ein pH-Wert von 7,2	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 L dH ₂ O
PBS/Pen-Strep	1x PBS 1-fach PenicillinG-Streptomycin
RPMI-Vollmedium	500 mL RPMI 1640-Medium ohne Glutamin 50 mL FCS 10 mL 1 M HEPES 10 mL 200 mM L- Glutamin 2,5 mL 10 mg/mL Gentamycin 500 µL β-Mercaptoethanol
SYBR [®] Green-Lösung	1:1000 in DMSO
Trypanblau-Lösung	2 mg Trypanblau in 100 mL 1x PBS

2.1.9 Tiere und Parasiten

Mausstamm	Beschreibung	Herkunft
C57BL/6J	H-2 ^b	UKE, Hamburg
BALB/c	H-2 ^d	UKE, Hamburg
OT-II	H-2 ^b ; TZR-transgene Maus; TZR erkennt den Komplex aus I-A ^b und dem OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid	UKE, Hamburg
DO11.10	H-2 ^d ; TZR-transgene Maus; TZR erkennt den Komplex aus I-A ^d und dem OVA ₃₂₃₋₃₃₉ -Peptid	UKE, Hamburg
C57BL/6 DEREK	H-2 ^b , enthält ein ins Genom integriertes artifizielles Chromosom und exprimiert ein Fusionsprotein aus GFP und dem Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) unter Kontrolle des Foxp3-Promotors (Lahl, K <i>et al.</i> 2007)	Für die Zucht zur Verfügung gestellt von Tim Sparwasser, TwinCore Hannover; Zucht im BNI, Hamburg
BALB/c DEREK	H-2 ^d , Beschreibung siehe C57BL/6 DEREK	BNI, Hamburg

Tiere für Stammerhaltung

Tier	Herkunft
Wistar Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>)	Charles River, Sulzfeld

Parasiten

Parasit	Herkunft
<i>Strongyloides ratti</i>	Lebenszyklus zur Verfügung gestellt von Dr. Utzinger, Schweizerisches Tropen und Public Health-Institut, Basel, Schweiz

2.1.10 Software

Software	Hersteller
FACS-Software „Cell Quest Pro“ 3.0	Becton Dickinson, Heidelberg
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software, La Jolla, USA
RotorGene 6000 1.7	Corbett Life Science, Sydney, Australia

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Wichtige Grundsätze der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden in der sterilen Atmosphäre einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Dabei wurden sterilisierte Glaswaren und Lösungen sowie sterile Einmalplastikwaren verwendet. Materialien und Lösungen wurden vor Gebrauch autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min). Glasmaterial wurde für 3 h bei 180 °C sterilisiert. Die Zellen wurden, wenn nicht anders angegeben, in CO₂-Brutschränken bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Wasch- und Pelletierschritte erfolgten, wenn nicht anders angegeben, für 5 min bei 300 x g und 4 °C.

2.2.2 Präparation muriner Milzzellen

Die Milz einer Maus wurde steril präpariert und in einer Petrischale mit 10 mL RPMI-Vollmedium zwischen zwei Objektträgern zerrieben. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und zur Lyse der Erythrozyten in 10 mL Erythrozytenlysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur (RT) wurde die Lyse durch Zugabe von 20 mL RPMI-Vollmedium gestoppt. Die Milzzellen wurden dreimal in RPMI-Vollmedium gewaschen, in RPMI-Vollmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.3 Präparation muriner Lymphknotenzellen

Die Lymphknoten einer Maus wurden steril präpariert, in einer Petrischale mit 5 mL RPMI-Vollmedium zwischen zwei Objektträgern zerrieben und pelletiert. Die Zellen

wurden noch einmal mit RPMI-Vollmedium gewaschen, anschließend in RPMI-Vollmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.4 Präparation muriner peripherer Blutzellen

Durch Punktion der Schwanzvene wurden ca. 20 μL Blut entnommen und direkt in einem mit EDTA beschichteten Röhrchen gesammelt, um eine Agglutination zu verhindern. 3 mL Erythrozytenlysepuffer wurden in einem FACS-Röhrchen vorgelegt und das Blut darin resuspendiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Zellen pelletiert, dreimal in PBS gewaschen und in PBS aufgenommen.

2.2.5 Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität mit Trypanblau

Die Bestimmung der Zellzahl und der Zellvitalität wurde mittels Trypanblau durchgeführt. Der Farbstoff dringt durch die poröse Zellwand abgestorbener Zellen ein und färbt diese blau an. Lebende Zellen erscheinen hingegen unter dem Mikroskop farblos. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde einer Neubauer Zählkammer mit definiertem Kammervolumen (100 μm Tiefe, Kammerfaktor 10^4) verwendet. 20 μL der Zellsuspension wurden mit 80 μL Trypanblau gemischt, ein Teil der Lösung unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert und die Zellen pro Großquadrat ausgezählt. Die Zellzahl wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung bestimmt, wobei sich die Zellzahl/mL aus der Multiplikation von gezählten Zellen pro Großquadrat, dem Kammerfaktor und dem Verdünnungsfaktor ergibt.

2.2.6 *In vitro* Stimulation

Die Stimulationsexperimente wurden in Rundboden 96-Loch-Zellkulturplatten durchgeführt und jeder Ansatz in Dreifachwerten bestimmt. Milz- und mesenteriale Lymphknoten (mesLK)- Zellen von BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurden *in vitro* stimuliert. Dafür wurden zunächst 100 μL der Stimulanzen (anti-CD3 bzw. *S. ratti*-Lysat) in RPMI-Vollmedium in jedes Loch vorgelegt und anschließend 2×10^5 Zellen in 100 μL RPMI-Vollmedium dazu gegeben. Dabei wurde anti-CD3-AK in einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/mL}$ und *S. ratti*-Lysat in einer Endkonzentration von 20 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ für 72 h inkubiert. Als

Negativkontrolle diente die Inkubation der Zellen in RPMI-Vollmedium ohne Stimulanz.

2.2.7 Messung der Zellproliferation

Durch den Einbau von Tritium (^3H)-markiertem Thymidin in neusynthetisierte DNA kann die Proliferationsrate von Zellen bestimmt werden. Dabei ist die Einbaurrate von ^3H -Thymidin proportional zur Zellproliferation. Allerdings wird mit dieser Methode der Thymidineinbau aller Zellen eines Ansatzes gemessen, so dass keine Aussagen auf Einzelzellniveau möglich sind. Nach der *in vitro* Stimulation wurden 150 μL Kulturüberstand entnommen und durch 50 μL RPMI-Vollmedium mit 0,5 % ^3H -Thymidin (0,25 $\mu\text{Ci/mL}$) ersetzt. Die Messung der eingebauten Radioaktivität erfolgte nach 18 h Inkubation bei 37 °C, 5 % CO_2 mit Hilfe eines Zellerntegerätes. Hierbei wurden die Zellen aus der Vertiefung auf einen Glasfaserfilter aufgebracht und mit *Aqua dest.* lysiert. Die DNA bleibt im Filter hängen, während freies ^3H -Thymidin, das nicht in die DNA eingebaut wurde, durch waschen des Filters entfernt wird. Nach Trocknung des Filters wurde dieser mit 5 mL β -Szintillationsflüssigkeit getränkt, und in eine Folie eingeschweißt. Die Radioaktivität wurde mit Hilfe eines β -Szintillationszählers bestimmt und als Zerfälle pro Minute (*counts per minute*, cpm) angegeben.

2.2.8 Markierung von Zellen mit CFSE

Mit Hilfe der CFSE-Färbung ist es möglich die Proliferation der Zellen auf Einzelzellniveau zu bestimmen. Der Fluoreszenzfarbstoff CFSE bindet kovalent an Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine. Bei der Zellteilung wird CFSE gleichmäßig an die Tochterzellen weitergegeben, wodurch sich die Fluoreszenzintensität mit jeder Zellteilung halbiert. Dadurch kann nun indirekt, anhand der Fluoreszenzintensität auf die Anzahl der vollzogenen Zellteilungen zurück geschlossen werden. Da die Zellen die Fluoreszenz nur behalten, solange die Zellwand intakt ist, kann man zudem die Vitalität der Zellen bestimmen.

Für die CFSE-Markierung wurden Milzzellen aus DO11.10 oder OT-II Mäusen verwendet. Die Zellen wurden pelletiert, in 1x PBS resuspendiert und auf 7×10^7 Zellen/mL eingestellt. 9 mL PBS wurden bei RT in einem 50 mL Falcon-Röhrchen

vorgelegt. 1 mL der Zellsuspension sowie 200 μ L CFSE (50 μ M) wurden hinzugegeben, sofort 10 sec sorgfältig gemischt und bei 37 °C im Wasserbad für 7 min inkubiert. Zum Abstoppen der Färbung wurden 40 mL eiskaltes PBS/3 % FCS hinzugegeben und die Zellen anschließend pelletiert. Um überschüssiges CFSE zu entfernen wurden die Zellen zweimal mit 10 mL PBS/3 % FCS und einmal mit 10 mL PBS gewaschen. Schließlich wurden die Zellen in PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

2.2.9 Durchflusszytometrische Analyse (FACS-Färbung)

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörper (AK). Durch die Verwendung verschieden markierter AK ist es möglich mehrere Antigene auf oder in einer Zelle gleichzeitig nachzuweisen. Dabei wird die zu analysierende Zellsuspension im Durchflusszytometer in Einzelzellsuspension gebracht. Die vereinzelt Zellen werden in Tröpfchenform an einem Laserstrahl vorbeigeleitet und dabei die Streuung des Laserlichts mittels Photomultiplikatoren gemessen. Die Vorwärtsstreuung korreliert dabei mit der Größe und die seitliche Streuung mit der Granularität der Zellen. Die Fluoreszenzintensität ist dabei ein Maß für die Anzahl gebundener AK und gibt daher über die Expression des analysierten Moleküls Auskunft. In dieser Arbeit wurden die Fluorochrome Fluorescein-Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) verwendet. Zudem wurde intrazelluläres GFP in T-Zellen der DEREK Mäuse als Marker für Treg bestimmt. Die Datenaufnahme erfolgte mit einem FACS-Calibur Durchflusszytometer und die Auswertung wurde mithilfe des Software-Programms Cellquest durchgeführt.

Alle Färbungen wurden bei 4 °C durchgeführt und die Inkubation erfolgte im Dunkeln. Pro Färbung wurden 1×10^6 bis 4×10^6 Zellen eingesetzt.

Färbung von Oberflächenmolekülen:

Um die Fc-Rezeptoren der Zellen abzusättigen wurden diese zunächst mit 50 μ L Fc-Blocklösung für 15 min inkubiert. Anschließend wurden direkt die AK für die Oberflächenfärbung zugegeben. Dafür wurde anti-CD4-FITC bzw. anti-CD4-PerCP in

FC-Blocklösung verdünnt (1:200), 50 µL zu der Zellsuspension gegeben und 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mL FACS-Puffer gewaschen, pelletiert und für die Messung in FACS-Puffer aufgenommen.

Intrazelluläre Färbung von Foxp3 und CTLA-4:

Der Transkriptionsfaktor Foxp3 und der Rezeptor CTLA-4 wurden intrazellulär nachgewiesen. 2×10^6 Zellen wurden nach der Oberflächenfärbung von CD4 mit 400 µL Foxp3-Perm für mindestens 30 min permeabilisiert. Anschließend wurde einmal mit 800 µL Foxp3-Wasch-Lösung gewaschen. anti-Foxp3-AK (0,8 µL) und anti-CTLA-4-AK (1 µL) wurden direkt in den Rückfluss gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen zweimal mit 800 µL Foxp3-Wasch-Lösung gewaschen und für die Analyse in 200 µL FACS-Puffer aufgenommen.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 ELISA zum Nachweis von Zytokinen (IL-3, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- γ) im Zellkulturüberstand

Der Nachweis von Zytokinen im Zellkulturüberstand erfolgte mittels Sandwich-ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Dabei werden zwei hochspezifische Antikörper (AK) verwendet, die je an unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Antigens binden. Eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte wurde mit einem AK gewünschter Spezifität beschichtet. Hierfür wurden je 50 µL einer 1:180 Verdünnung des AK (DuoSet® ELISAKit; R&D Systems) in 1x PBS aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Ungebundener AK wurde durch viermaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt. Freie Oberflächenbindungsstellen wurden durch zweistündige Inkubation mit 100 µL ELISA-Blockpuffer bei RT blockiert. Der Blockpuffer wurde durch viermaliges Waschen mit ELISA-Waschpuffer entfernt, und die unverdünnten Zellüberstände (je 40 µL, Dreifachwerte) sowie der Zytokinstandard (Doppelwerte) aufgetragen. Die Bindung des Antigens an den immobilisierten AK erfolgte für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen wurde das gebundene Antigen mit einem biotinylierten Sekundärantikörper nachgewiesen. Hierfür wurden die Platten nach dem Waschen mit 50 µL einer 1:180 Verdünnung des jeweiligen Biotin-AK

(DuoSet® ELISA-Kit; R&D Systems) in PBS/0,1 % BSA für 2 h bei RT inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurden 50 µL Streptavidin-HRP-Konjugat (*horseradish peroxidase*, HRP) (1:200 in PBS/0,1 % BSA) zugefügt und für 20 min inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden je 100 µL ELISA-Substratlösung zugegeben und die Reaktion nach 15 min durch Zugabe von 25 µL ELISA-Stopplösung beendet. Die Detektion erfolgte unmittelbar im Anschluss photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm, und die Zytokinkonzentrationen wurden mit Hilfe einer Standardreihe berechnet.

2.3.2 ELISA zum Nachweis von IL-9 im Zellkulturüberstand

Der Nachweis von IL-9 erfolgte mittels eines Sandwich-ELISA, wurde jedoch nicht mit einem DuoKit durchgeführt. Für den Nachweis von IL-9 wurden 96-Loch Flachboden ELISA-Platten mit 2 µg/mL anti-IL-9-AK über Nacht bei 4 °C beschichtet. Die Platten wurden viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit IL-9-Blockpuffer für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurden je 50 µL des Zellüberstandes (Dreifachwerte) sowie der Zytokin-Standard (Doppelwerte, Verdünnung in IL-9 Blockpuffer) auf die Platten pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C. Danach wurden die Platten viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, je 50 µL des biotinylierten-Detektions-AK in IL-9-Blockpuffer zugegeben und eine Stunde bei RT inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden je 50 µL Strep-HRP in PBS/0,1 % BSA zugegeben und 20 min bei RT inkubiert und anschließend nochmals sechsmal gewaschen. Die Entwicklung erfolgte durch Zugabe von 100 µL Substratlösung. Nach 15 min wurde die Reaktion durch 25 µL ELISA-Stopplösung beendet und die Zytokinkonzentration photometrisch bei 450nm bestimmt.

2.3.3 ELISA zum Nachweis von *S. ratti*-spezifischem Ig im Serum

In dieser Arbeit wurden *S. ratti*-spezifische Ig im Serum von C57BL/6 Mäusen nachgewiesen. Hierfür wurden 50 µL *S. ratti*-Lysat (2,5 µg/mL) in PBS auf eine 96-Loch Flachboden ELISA-Platte aufgebracht und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Platten viermal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und 2 h bei RT mit 200 µL ELISA-Blockpuffer geblockt. Anschließend wurden 100 µL Serum

in Duplikaten (1:100) in PBS/0,1 % BSA in die erste Vertiefung einer Reihe aufgetragen und seriell, bis zu einer Verdünnung von 1:51200, verdünnt. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend fünfmal gewaschen und mit HRP-konjugiertem Ratte anti-Maus IgM oder IgG1 (1:1000) in PBS/0,1 % BSA für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 100 µL ELISA-Substratlösung pipettiert. Das Abstoppen der Reaktion nach 2 min und die Detektion erfolgten wie in 2.3.1 beschrieben. Der Ig-Titer ergab sich aus der Serum-Verdünnung, die bei OD₄₅₀ nm über dem doppelten Plattenhintergrund lag.

2.3.4 ELISA zum Nachweis von IgE im Serum

Die Bestimmung der Konzentration von unspezifischem IgE im Serum der Mäuse wurde mittels IgE-ELISA-Kit der Firma BD durchgeführt. 50 µL Anti-Maus-IgE (2 µg/mL) wurden in jede Vertiefung einer 96-Loch Flachboden ELISA-Platte gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte mit ELISA-Waschpuffer dreimal gewaschen, zum Blockieren der freien Bindungsstellen 100 µL IgE-ELISA-Puffer zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Die Serumproben wurden 1:100 in IgE-ELISA-Puffer verdünnt und je 50µL in Doppelwerten aufgetragen. Der Standard wurde seriell, beginnend mit 100 ng/mL, verdünnt. Nach Inkubation für 2 h bei RT wurde die Platte dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, 50 µL Anti-Maus-IgE-biotinyliert (2 µg/mL) mit Streptavidin-HRP-Konjugat (1:250) zugegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte siebenmal gewaschen und zur Entwicklung 100 µL Substratlösung zugegeben. Nach 15 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µL ELISA-Stop-Lösung beendet und die Platte photometrisch bei OD₄₅₀ vermessen. Die Bestimmung der IgE Konzentration in den Proben erfolgte mit Hilfe der Standardreihe.

2.3.5 ELISA zum Nachweis von MMCP-I im Serum

Der Nachweis von Maus-Mastzell-Protease-I im Serum der Mäuse erfolgte mit Hilfe des MMCP-I-ELISA-Kits der Firma Moredun Scientific. Je Vertiefung einer 96-Loch Flachboden ELISA-Platte wurden 50 µL des anti-MMCP-I-AK (2 µg/mL) auf die Platte aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen der Platte mit ELISA-Waschpuffer und wurden die verdünnten Serumproben (1:100) in MMCP-I-

Puffer und der Standard beginnend mit einer Konzentration von 8 ng/mL, aufgetragen. Nach 90 minütiger Inkubation bei RT wurde die Platte sechsmal gewaschen und 50 µL anti-MMCP-I-HRPO-AK (1:1200) in MMCP-I-Puffer zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei RT wurden die Platten erneut sechsmal gewaschen und zur Entwicklung 50 µL Substratpuffer zugegeben. Nach 10 min wurde die Reaktion durch 25 µL Stopp-Lösung beendet, und die Platten photometrisch bei OD₄₅₀ vermessen. Die Konzentration der MMCP-I wurde anhand der Standardkurve bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Gewinnung von DNA aus Stuhlproben

Die Isolation der DNA wurde mit Hilfe des QIAamp DNA Stool Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 200 mg Mausstuhl (siehe 2.5.5) für die Präparation eingesetzt und die isolierte DNA mit 200 µL Elutionspuffer eluiert.

2.4.2 Quantitative *real-time* PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qPCR) beruht auf der herkömmlichen PCR-Methode (Saiki, RK *et al.* 1988), bei welcher die thermostabilen Eigenschaften der DNA-Polymerasen aus Organismen wie z. B. *Thermophilus aquaticus* genutzt werden. Sie sind temperaturbeständig bis über 95 °C und können zudem DNA bei 72 °C optimal synthetisieren. Die Matrizen-DNA (Template) wird bei 95 °C denaturiert und die Temperatur dann zur Anlagerung komplementärer Oligonukleotide (Primer) an die Einzelstränge abgesenkt (Annealing). Bei 72 °C wird der komplementäre DNA-Strang von den Primern ausgehend in 5'→3' Richtung synthetisiert. In jedem Zyklus wird das zwischen den Oligonukleotiden liegende DNA-Fragment vervielfältigt, und die Konzentration steigt exponentiell an. Dadurch können geringe DNA-Mengen vervielfältigt werden. Die qPCR ermöglicht zudem die gleichzeitige Quantifizierung der amplifizierten Genfragmente. Die in dieser Arbeit verwendete qPCR basiert auf der Verwendung von SYBR[®] Green I (Invitrogen, Darmstadt), einem fluoreszierenden Farbstoff, der sich in die doppelsträngige DNA einlagert. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional zur Menge des PCR-Produktes zu und ermöglicht daher die Quantifizierung der Zielsequenz (Holzapfel, BaW, L 2007). Mit Hilfe von genspezifischen

Primern kann die relative Konzentration eines Gens in einer DNA-Probe bestimmt werden. Für die relative Bestimmung der Menge an Ziel-DNA ist die Bestimmung des Ct-Wertes (*cycle threshold*) essentiell. Er gibt den PCR-Zyklus an, in dem die Fluoreszenz erstmalig über den Fluoreszenz-Hintergrund ansteigt. Der Ct-Wert ist umgekehrt proportional zur eingesetzten Menge der Ziel-DNA, d.h. je niedriger der Ct desto höher ist die Menge an Ziel-DNA in der Probe. Jede PCR-Reaktion wurde als Duplikat angesetzt und in jedem qPCR Lauf wurden drei Negativkontrollen mit Ampuwa-Wasser anstelle des Templates durchgeführt. In dieser Arbeit wurde die qPCR zur relativen Quantifizierung von *S. rattii* Eiern und L1 im Stuhl der Mäuse verwendet und so der Infektionsverlauf analysiert. Hierfür wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Stuhlproben gesammelt (Abschnitt 2.5.5) und DNA isoliert (siehe 2.4.1). Die gewonnene DNA wurde in Ampuwa-Wasser 1:200 verdünnt und 2 µL für die PCR-Reaktion eingesetzt. Ein 180 bp Fragment des *S. rattii* 28S rRNA Gens wurde amplifiziert und ein Plasmid, das dieses Fragment enthielt, diente als Kalibrator. Alle qPCR-Reaktionen in dieser Arbeit wurden mit dem RotorGene 6000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) durchgeführt. Für eine Reaktion wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

PCR-Ansatz:	[µL]
Template-DNA (1:200) oder Kalibrator	2,0
10 x Reaktionspuffer	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	0,4
dNTP-Mix (2,0 mM)	0,2
Primer (<i>sense</i>)	0,3
Primer (<i>anti-sense</i>)	0,3
SYBR® Green I (1:1000)	0,1
<i>Taq</i> -Polymerase (LC)	0,05
BSA (1 µg/µL)	1,0
Ampuwa-Wasser	4,65
Gesamtvolumen	10

Folgendes Temperaturprogramm wurde für die qPCR verwendet:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Aktivierung der Polymerase	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	10 sec	} 40 Zyklen
Anlagerung der Primer	50 °C	15 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
finale Elongation	72 °C	5 min	

Nach jedem Lauf wurde eine Analyse der Schmelzkurven durchgeführt, in dem die Temperatur von 62 °C auf 95 °C erhöht wurde. Dies gibt Aufschluss über die Spezifität der qPCR-Reaktion in jedem einzelnen Reaktionsansatz. Um die Unterschiede der Ct Werte zwischen den Proben und dem Kalibrator in Kopien/ μ L umzurechnen wurde die *comparative quantification (efficiency corrected Ct method)* verwendet.

2.5 Tierversuche und *S. ratti*-Stammerhaltung

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt und von der Hamburger Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz genehmigt. Für alle Versuche wurden 8-10 Wochen alte Mäuse eingesetzt, die im Tierhaus des Bernhard-Nocht-Institut in individuell belüfteten Käfigen (IVCs) unter keimarmen Bedingungen gehalten wurden.

2.5.1 Gewinnung von Serum

Durch Punktion der Schwanzvene wurden den Mäusen etwa 50 μ L Blut entnommen. Dies wurde etwa 30 min bei RT zur Gerinnung stehen gelassen und anschließend 15 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.5.2 Präparation der *S. ratti*-iL3 und Stammerhaltung

Der *S. ratti*-Lebenszyklus wurde durch die fortlaufende Passagierung in Wistar Ratten aufrecht erhalten. Hierfür wurde der Stuhl von *S. ratti*-infizierten Ratten gesammelt, in 10 mL Leitungswasser eingeweicht und mit der etwa dreifachen Menge Aktivkohle gemischt. Diese Aktivkohlekultur wurde mit Parafilm abgedeckt und sechs Tage lang bei 25 °C im Brutschrank gelagert. Anschließend wurden iL3 mit Hilfe eines Baermann Apparates isoliert (Viney, ME and Lok, JB 2007) und dreimal in PBS/Pen-Strep gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden die iL3 zur Sedimentation für mindestens 30 min bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Vor einer Infektion wurden die Larven in 1x PBS aufgenommen und die Anzahl der iL3 mikroskopisch bestimmt. Für die Stammerhaltung wurden Wistar Ratten mit 2500 *S. ratti*-iL3 in 200 µL PBS subkutan in die Flanke infiziert.

2.5.3 Herstellung von *S. ratti*-Antigen

Zur Herstellung von *S. ratti*-Antigen (*S. ratti*-Lysat) wurden 1 mL aufgereinigte iL3 pelletiert und in 4 mL *Complete-Protease-Inhibitor-Cocktail* (nach Herstellerangaben in PBS/PenStrep verdünnt) resuspendiert. Die Suspension wurde in einem Glashomogenisator mit 15 Kolbenschüben homogenisiert. Das Homogenisat wurde 1 h bei 100.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand durch einen Filter (Porengröße 0,2 µM) sterilfiltriert. Das Lysat wurde mit Hilfe von Amicon 10 kDa Filtern auf eine Konzentration von 1 mg/µL eingestellt und bis zum Gebrauch bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Infektion mit *S. ratti*

Für die Infektion von Mäusen mit *S. ratti* wurden 1000-2000 iL3 in 30 µL 1x PBS subkutan in eine Hinterpfote injiziert. Für die Analyse der Expansion von Treg in den verschiedenen lymphatischen Organen wurden jeweils 1000 iL3 in jede Hinterpfote injiziert.

2.5.5 Nachweis der *S. ratti*-Infektion in Stuhlproben

Der Verlauf der Infektion wurde durch die Bestimmung von *Strongyloides*-DNA im Stuhl der Mäuse analysiert. Hierfür wurden zu den angegebenen Zeitpunkten für 24 h

auf Zellstoff gesetzt und der Stuhl gesammelt. Anschließend wurde die DNA wie in 2.4.1 beschrieben isoliert und für die qPCR (2.4.2) eingesetzt.

2.5.6 Bestimmung der wandernden Larven in Kopf und Lunge

Um die Anzahl an wandernden Larven zu bestimmen, wurden an Tag 2 nach der Infektion die Köpfe und Lungen der Mäuse präpariert. In einer Petrischale wurde der Kopf in 20 mL und die Lunge in einer 6-Loch-Platte in 5 mL PBS zerkleinert und für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Larven verlassen hierbei das Gewebe. Anschließend wurde die Lösung mit den Larven in 50 mL bzw. 15 mL Falconröhrchen überführt und einmal nachgespült. Die Larven wurden bei 4000 rpm für 10 min pelletiert und die Anzahl der Larven unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

2.5.7 Bestimmung der adulten *S. rattii* im Darm

Die Anzahl adulter Würmer im Dünndarm wurde zu den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Hierfür wurde der Dünndarm der Mäuse präpariert, gründlich mit PBS gespült und longitudinal aufgeschnitten. Die Därme wurden in 20 mL PBS für 3 h bei 37 °C in einer Petrischale inkubiert. Anschließend wurde der Darm entfernt und die Adulten in PBS in ein 50 mL Falcon überführt. Dabei wurde die Petrischale einmal gespült und anschließend die adulten *S. rattii* Weibchen bei 300 x g für 10 min ohne Bremse pelletiert. Das Pellet wurde in 2 mL PBS gelöst und die adulten Würmer in einer 6-Loch-Platte mikroskopisch ausgezählt.

2.5.8 Blockade von CTLA-4

Für die Blockade von CTLA-4 wurde der Antikörper 4F10 verwendet. Dieser Antikörper bindet an CTLA-4 und verhindert dessen Interaktion mit den Bindungspartnern CD80 und CD86 (Walunas, TL *et al.* 1994). 300 µg anti-CTLA-4 wurden 4 h vor der Infektion mit *S. rattii* intraperitoneal (i.p.) verabreicht.

2.5.9 Depletion der Treg

Die Depletion der Treg erfolgte in DEREK Mäusen. Diese Mäuse besitzen ein artifizielles Chromosom, auf welchen ein Fusionsprotein aus dem grün-fluoreszierenden

Protein (GFP) und dem humanen Diphtherietoxin-Rezeptor unter der Kontrolle des Foxp3-Promotors exprimiert wird. Dadurch fluoreszieren die Treg grün und können zudem durch Administration von DT depletiert werden. In allen Infektionsexperimenten wurden Treg durch Injektion von 0,5 µg DT in 200 µL PBS an drei aufeinander folgenden Tagen depletiert. Am zweiten Tag der Depletion wurden die Mäuse mit 2000 *S. rattii*-iL3 infiziert. In allen durchgeführten Experimenten wurde die Depletion und die Repopulation der Treg, soweit möglich, durch Blutanalysen an Tag 2 und 6 der Infektion überprüft.

2.5.10 *In vivo* Proliferation von TZRtg-Zellen

1×10^7 TZRtg CFSE-markierte Milzzellen (siehe 2.2.8) aus DO11.10 (BALB/c) oder OT-II (C57BL/6) Mäusen wurden intravenös (i.v.) transferiert. 24 h nach Transfer wurden die Zellen antigenspezifisch durch i.p. Injektion von 50 µg OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid stimuliert. 48 h nach Stimulation wurden die Milzzellen isoliert (siehe 2.2.2), gegen CD4 gefärbt (siehe 2.2.9) und die Proliferation durchflusszytometrisch analysiert.

2.5.11 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden die Därme der Mäuse präpariert und gründlich mit PBS gespült. Anschließend wurden diese aufgerollt und über Nacht in Formol-Puffer fixiert (siehe 2.1.3). Das Fixieren der Därme verhindert postmortale Veränderungen und soll den gegenwärtigen Zustand der Gewebe konservieren. Dabei ist die Fixierung mit Formol eine relativ milde Methode, bei welcher Formaldehyd mit den Aminogruppen der Proteine reagiert und zur Quervernetzung führt. Die Struktur der Proteine bleibt dabei jedoch weitestgehend intakt, so dass die Präparate für histochemische Analysen geeignet sind. Nach der Fixierung wurden die Därme in Einbettkassetten überführt, gründlich gewässert und anschließend das Gewebe entwässert. Hierfür wurden die Proben über Nacht in ein Gewebeentwässerungskarussell gegeben, in welcher die Proben jeweils eine Stunde bei 38 °C in verschiedenen alkoholhaltigen Lösungen inkubiert wurden, beginnend mit 70 %igem Ethanol, zweimal 96 %igem Ethanol und dreimal in absolutem Ethanol. Schließlich verblieben die Proben dreimal jeweils 2 h in Xylol und wurden dann in flüssiges Paraffin (65°C) überführt. Die Därme wurden nun mit Hilfe der Ausgießstation zu

Paraffinblöcken gegossen. Diese fixierten Gewebeproben wurden zur weiteren Analyse nach Berlin in die Immunpathologie der Charité zu Frau Dr. Anja Kühl geschickt.

Für die Einstufung des Entzündungsgrades wurde folgende Einteilung verwendet:

Grad	Intestinale Architektur	Entzündung
0	normal	Keine
1	leichtes abstumpfen der Zotten	Leicht
2	moderates abstumpfen der Zotten, leichte Hyperplasie der Krypten	Moderat
3	starkes Abstumpfen der Zotten, Hyperplasie der Krypten	Deutlich, mit Verdickung der Darmwand
4	Atrophie der Zotten, Hyperplasie der Krypten	Transmural, Mucinabbau, Ulzeration, Verdickung der Darmwand

Dabei ist der Entzündungsgrad der kumulative Wert vom Grad der intestinalen Architektur und der Entzündung und kann somit einen Wert von 0-8 annehmen.

Die Färbung der Gewebeschnitte erfolgte mit folgenden Antikörpern:

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ratte anti-Maus Foxp3	1:50	eBioscience, Frankfurt
Rabbit anti-human cKit	1:100	DAKO
Ratte-anti-Maus CD3	1:20	eBioscience, Frankfurt

Die Detektion wurde mit Hilfe des EnVision-Systems von DAKO durchgeführt. Dabei wurde entweder 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) oder 3,3'-diaminobenzidine (DAB) als Substrat verwendet, was zu einem roten bzw. braunen Präzipitat an der Stelle des Antigens führt.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism 4.0 durchgeführt. Für die vergleichende Analyse von zwei Versuchsgruppen wurde der ungepaarte, zweiseitige Student's *t* Test verwendet. Zur statistischen Analyse von mehr als einer Versuchsgruppe wurde der *one-way ANOVA* mit *Bonferroni's post test* verwendet.

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluss regulatorische Mechanismen des Immunsystems auf den Verlauf einer Nematodeninfektion haben. Als Modell wurde hierfür die experimentelle *S. ratti*-Infektion der Maus verwendet, und vergleichende Studien in den Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 vorgenommen.

Die Arbeit ist in drei Abschnitte gegliedert. Im ersten Teil wurde untersucht, welche Auswirkung die Blockade des regulatorischen Rezeptors CTLA-4 auf den Verlauf der *S. ratti*-Infektion hat. Für die Blockade wurde der blockierende Antikörper 4F10 verwendet. Anschließend wurden die Mäuse mit *S. ratti* infiziert und der Infektionsverlauf sowie die zelluläre und humorale Immunantwort untersucht.

Der zweite Abschnitt beschreibt die Rolle von Treg auf den Verlauf der *S. ratti*-Infektion. Die Mäuse wurden in Gegenwart und Abwesenheit von Treg mit *S. ratti* infiziert und der Infektionsverlauf verfolgt. Außerdem wurde die zelluläre und humorale Immunantwort beschrieben sowie histologische Untersuchungen in den Därmen der Mäuse vorgenommen.

Im dritten Teil wurde die regulatorische Kapazität von Treg in den Mausstämmen BALB/c und C57BL/6 verglichen. Hierfür wurden Ovalbumin (OVA)-spezifische T-Zellen in An- und Abwesenheit von Treg aktiviert und ihre Proliferation *in vivo* gemessen.

3.1 Der Einfluss von CTLA-4 auf die *S. ratti*-Infektion

3.1.1 Induktion von CTLA-4 auf T-Zellen während der *S. ratti*-Infektion

Verschiedene Publikationen haben gezeigt, dass die Expression von CTLA-4 auf T-Zellen während Infektionen mit Nematoden (Finney, CA *et al.* 2007; Furze, RC *et al.* 2006; Taylor, MD *et al.* 2005), Protozoen (Graefe, SE *et al.* 2004; Jacobs, T *et al.* 2002), Bakterien (Rowe, JH *et al.* 2009) und Viren (Ayukawa, H *et al.* 2004; Kaufmann, DE *et al.* 2007; Raziorrouh, B *et al.* 2011) ansteigt.

Zunächst sollte überprüft werden, ob es auch im Verlauf einer Infektion mit *S. ratti* zu einer verstärkten Induktion von CTLA-4 auf T-Zellen kommt. Hierfür wurden BALB/c und C57BL/6 Mäuse mit *S. ratti*-iL3 subkutan infiziert. An den Tagen 2, 7 und 14 nach der Infektion wurden mesLK und Milz isoliert. Die mesLK sind die drainierenden Lymphknoten des Dünndarms und geben Aufschluss über die Immunantwort am Aufenthaltsort der adulten Würmer. Die Milz, als ein in den Blutkreislauf eingeschaltetes lymphatisches Organ, spiegelt die systemischen Auswirkungen der Infektion wieder. Die isolierten Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten AK gegen das Molekül CD4 und intrazellulär gegen CTLA-4 und den Transkriptionsfaktor Foxp3 gefärbt. Foxp3 wird ausschließlich in Treg exprimiert (Hori, S *et al.* 2003) und erlaubt die Differenzierung von Teff und Treg. Die Expression der Proteine wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Abb. 3.1 A zeigt die Strategie der Auswertung, wobei zunächst die Analyse der Foxp3 Expression in CD4⁺T-Zellen und somit die Unterscheidung von Teff (CD4⁺Foxp3⁻) und Treg (CD4⁺Foxp3⁺) erfolgte. Die CTLA-4 Expression wurde anschließend in Teff und Treg getrennt quantifiziert. In beiden Mausstämmen stieg die Frequenz von CTLA-4⁺ Teff in den mesLK an (Abb. 3.1 B). Allerdings unterschieden sich die Kinetiken der Induktion erheblich. In C57BL/6 Mäusen wurde eine starke, aber transiente Induktion der CTLA-4⁺ Teff, von 2 % auf 8 % an Tag 7 nach der Infektion, beobachtet (Abb. 3.1 B, oben rechts). Im Gegensatz dazu kam es in BALB/c Mäusen zu einem kontinuierlichen, moderaten Anstieg der CTLA-4⁺ Teff, von 1,8 % auf 2,8 % an Tag 14 nach der Infektion (Abb. 3.1 B, oben links). 40 % der Treg exprimierten konstitutiv CTLA-4 (Takahashi, T *et al.* 2000). Eine weitere Induktion von CTLA-4 auf Treg wurde nur in C57BL/6 Mäusen gemessen.

Diese war ebenso wie in Teff nur transient an Tag 7 nach der Infektion zu beobachten (Abb. 3.1 B, unten rechts). BALB/c Mäuse zeigten keine Veränderungen in der CTLA-4 Expression der Treg im Verlauf der Infektion (Abb. 3.1 B, unten links). Die Untersuchung der Milzzellen ergab vergleichbare Ergebnisse für die Induktion von CTLA-4 auf Teff und Treg in beiden Mausstämmen (Daten nicht gezeigt).

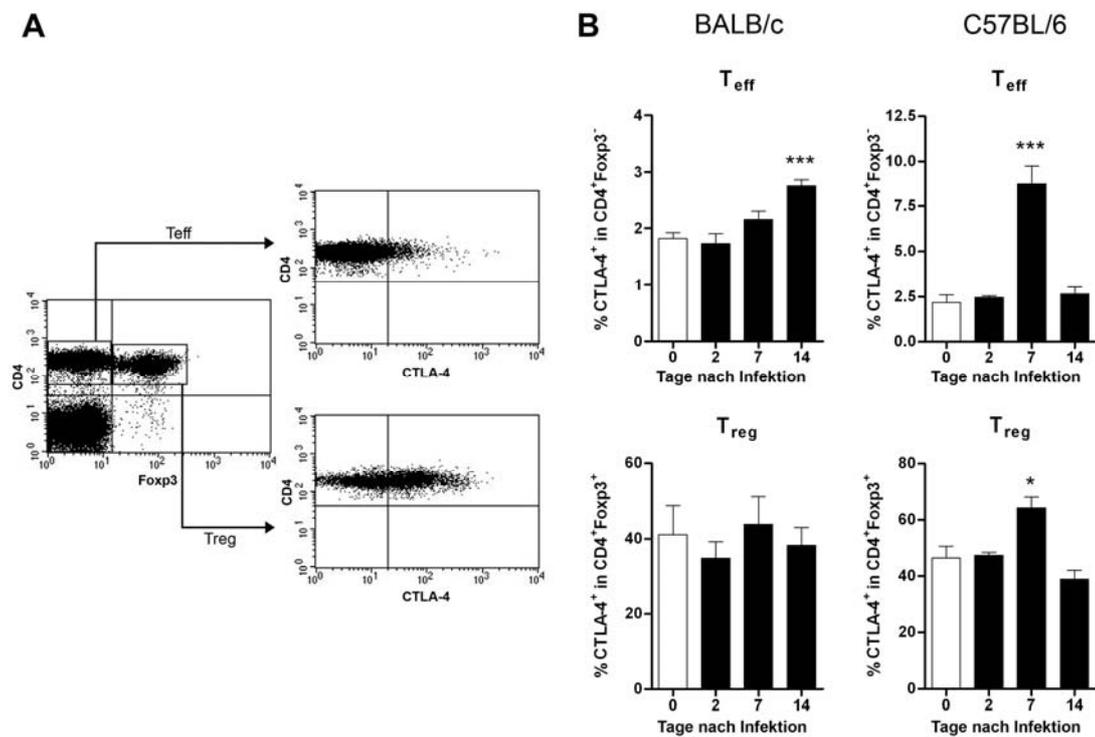


Abb. 3.1: Induktion von CTLA-4 auf T-Zellen während der *S. rattii*-Infektion

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 1000 *S. rattii*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die mesLK präpariert und die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression von CTLA-4 untersucht. (A) Gezeigt ist beispielhaft die verwendete Auswertungsstrategie. Zunächst wurde die CD4 und Foxp3 Expression der Zellen ausgewertet und anschließend die Expression von CTLA-4 in den Teff (Foxp3⁻) und den Treg (Foxp3⁺) bestimmt. (B) Dargestellt ist der prozentuale Anteil CTLA-4 exprimierender Teff (obere Zeile) und Treg (untere Zeile) in den untersuchten BALB/c (linke Spalte) bzw. C57BL/6 (rechte Spalte) Mäusen. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (BALB/c; n = 7) bzw. die Ergebnisse eines Experiments (C57BL/6; n = 4) Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (* p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CTLA-4 während der *S. ratti*-Infektion in BALB/c und C57BL/6 Mäusen vorwiegend auf Teff induziert wird. Um die Rolle der gesteigerten CTLA-4 Expression auf Teff zu verstehen, sollte der Infektionsverlauf in Abwesenheit und Gegenwart von CTLA-4 vermittelten Signalen verglichen werden.

3.1.2 Blockade von CTLA-4 während der *S. ratti*-Infektion

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Blockade von CTLA-4 mit Hilfe des blockierenden Antikörpers 4F10 auf den Verlauf der Infektion auswirkt. 4F10 bindet an CTLA-4 und verhindert so, dass der Rezeptor an seine natürlichen Liganden CD80 und CD86 binden kann. Die Induktion des durch CTLA-4 vermittelten negativen Signals bleibt aus und es kommt zu einer verstärkten Aktivierung der Zellen (Walunas, TL *et al.* 1994).

BALB/c und C57BL/6 Mäuse erhielten i.p. 300 µg anti-CTLA-4 oder 300 µg HamIgG (Kontrolle). Anschließend wurden die Tiere subkutan mit *S. ratti*-iL3 infiziert und der Infektionsverlauf, gemessen am Ausstoß von *S. ratti*-DNA mit dem Stuhl der Mäuse (Abb. 3.2 A), verfolgt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer *Strongyloides*-spezifischen qPCR, bei welcher die DNA der 28S RNA amplifiziert wurde. Es konnte kein signifikanter Unterschied im Ausstoß von *S. ratti*-DNA in anti-CTLA-4 behandelten und HamIgG behandelten Tieren festgestellt werden. Wie bereits beschrieben, zeigten BALB/c Mäuse generell einen geringeren Ausstoß an Larven als C57BL/6 Mäuse (Dawkins, HJ *et al.* 1980).

Auch die Analyse der wandernden Larven an Tag 2 nach der Infektion ergab keinen Einfluss der CTLA-4-Blockade auf deren Anzahl in Kopf und Lunge der Mäuse (Abb. 3.2 B).

Die Anzahl der Würmer im Darm war in anti-CTLA-4 behandelten BALB/c Mäusen an Tag 6 tendenziell und an Tag 7 signifikant verringert (Abb. 3.2 C, links). In den C57BL/6 Mäusen war die Anzahl an Würmern in anti-CTLA-4 behandelten Mäusen unverändert (Abb. 3.2 C, rechts).

Diese Resultate zeigen, dass die Blockade von CTLA-4 keinen Einfluss auf die *S. ratti*-Infektion in C57BL/6 Mäusen hat. Im Gegensatz dazu führt die Blockade von CTLA-4 in BALB/c Mäusen zu einer signifikant verringerten Wurmlast.

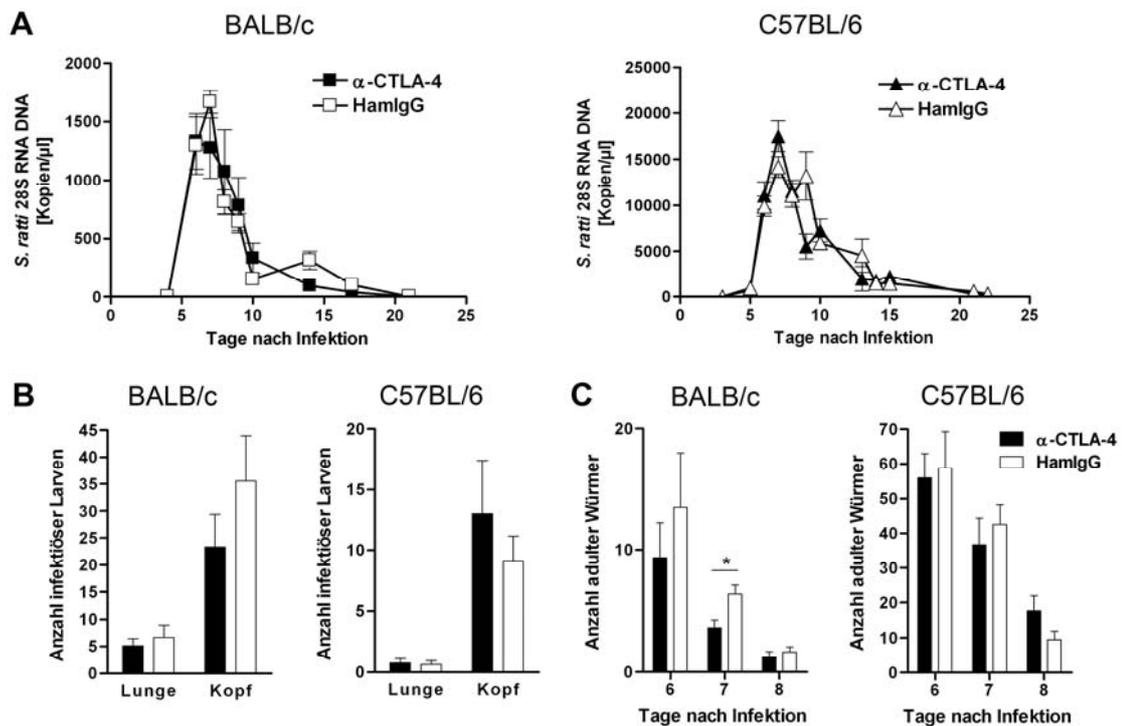


Abb. 3.2: Verlauf der *S. ratti*-Infektion während der Blockade von CTLA-4

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 300 µg anti-CTLA-4 (schwarz) bzw. HamIgG (weiß) behandelt und am selben Tag mit 1000 *S.ratti*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. (A) Gezeigt ist der Infektionsverlauf gemessen durch den Ausstoß von *S. ratti*-DNA mit dem Fäzes von BALB/c Mäusen (links; n = 8) und C57BL/6 Mäusen (rechts; n = 13). Für die Analyse wurde DNA extrahiert und die Menge von *S. ratti*-DNA mit Hilfe einer *Strongyloides*-spezifischen qPCR ermittelt. (B) Gezeigt ist die Anzahl an wandernden iL3 an Tag 2 nach der Infektion in Kopf und Lunge von BALB/c (links; n = 8) und C57BL/6 (rechts; n = 6) Mäusen. (C) Dargestellt ist die Anzahl von adulten Würmern im Dünndarm von BALB/c (links; n = 8) und C57BL/6 (rechts; n = 8) Mäusen zu den angegebenen Zeitpunkten. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (* $p \leq 0,05$).

Es stellte sich daher die Frage, ob diese verringerte Wurmlast das Resultat einer verbesserten Immunantwort in anti-CTLA-4 behandelten BALB/c Mäusen war. Während einer *S. ratti*-Infektion kommt es typischerweise zur Induktion einer Th2-Immunantwort, gekennzeichnet durch die Produktion der Zytokine IL-5, IL-13 und IL-3, mit gleichzeitiger Suppression des Th1-Zytokins IFN- γ (Eschbach, ML *et al.* 2010). Um die Zytokinsekretion zu untersuchen wurden Milz- und mesLK-Zellen von BALB/c und C57BL/6 Mäusen an Tag 7 der Infektion isoliert und *ex vivo* mit anti-CD3-AK oder *S. ratti*-Lysat stimuliert. Nach 72 h wurden die Überstände der Zellen abgenommen und die Zytokinkonzentration bestimmt.

Abbildung 3.3 zeigt die Zytokinproduktion von Milzzellen nach Stimulation mit *S. ratti*-Lysat (A, C) und anti-CD3-AK (B, D) aus Mäusen, die entweder mit anti-CTLA-4 (schwarz) oder HamIgG (weiß) behandelt wurden.

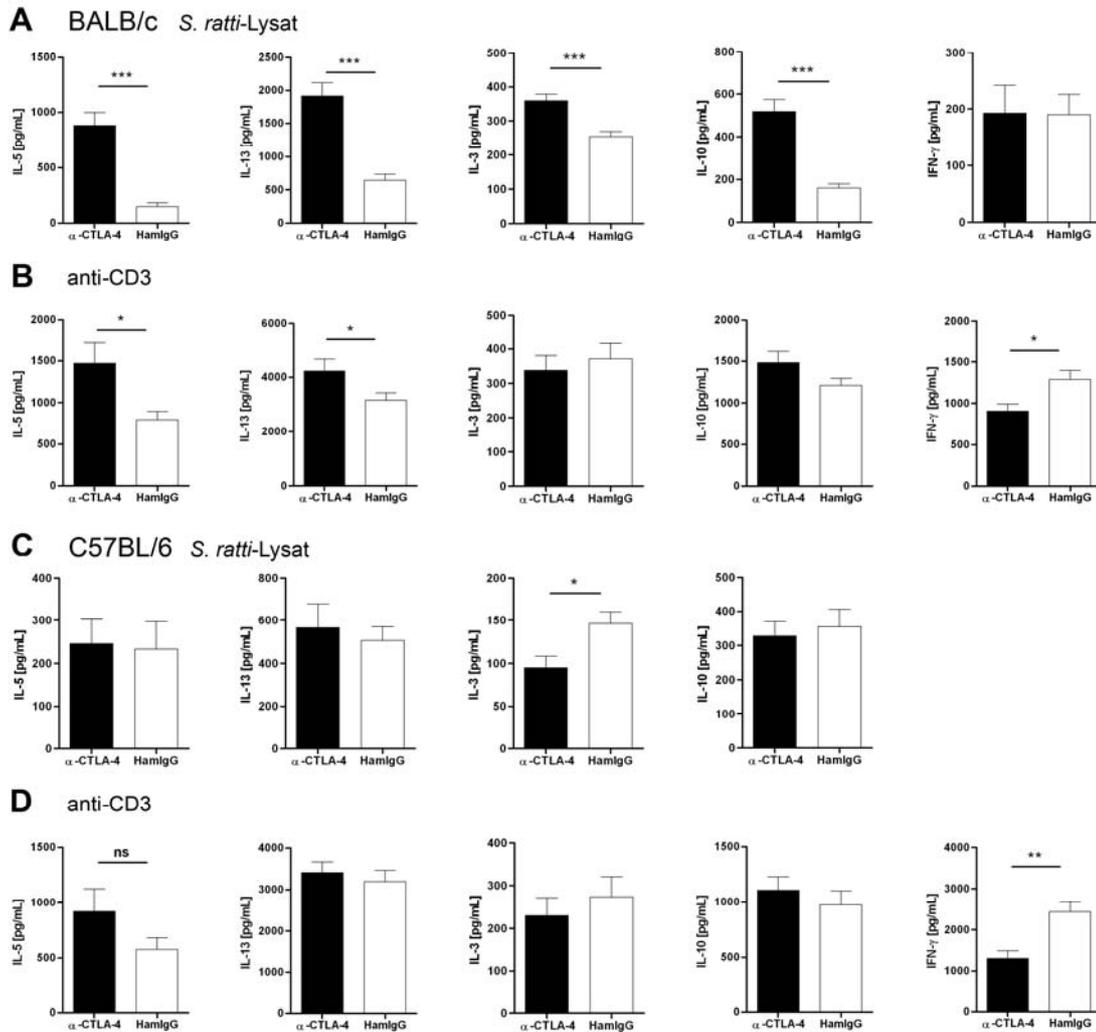


Abb. 3.3: Zelluläre Immunantwort während der *S. ratti*-Infektion nach Blockade von CTLA-4

BALB/c (A, B) und C57BL/6 (C, D) Mäuse wurden mit 300 μ g anti-CTLA-4 (schwarz) bzw. HamIgG (weiß) behandelt und mit 1000 *S. ratti*-iL3 infiziert. An Tag 7 nach der Infektion wurden die Milzzellen isoliert und mit 20 μ g/mL *S. ratti*-Lysat (A, C) bzw. 1 μ g/mL anti-CD3-AK (B, D) stimuliert. Nach 72 h wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinmenge mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind von links nach rechts die Zytokine IL-5, IL-13, IL-3, IL-10 und IFN- γ . Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus zwei (BALB/c, n = 8) bzw. drei (C57BL/6, n = 11) unabhängigen Experimenten als Mittelwerte \pm SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)

In den Milzzellkulturen von anti-CTLA-4 behandelten BALB/c Mäusen stieg die Zytokinproduktion nach der Stimulation mit *S. rattii*-Lysat (Abb. 3.3 A) deutlich an. Die Zytokine IL-5, IL-13, IL-3 und IL-10 wurden in signifikant erhöhten Mengen nachgewiesen.

Das proinflammatorische Zytokin IFN- γ wurde nach antigenspezifischer Stimulation nur in geringen Mengen nachgewiesen, wohingegen nach der Stimulation mit anti-CD3-AK sogar eine Suppression von IFN- γ in der anti-CTLA-4 behandelten Gruppe beobachtet wurde. Die gesteigerte Induktion von IL-5 und IL-13, nicht aber von IL-3 und IL-10, fand sich auch nach polyklonaler Stimulation in den Überständen von Milzzellen aus anti-CTLA-4 behandelten BALB/c Mäusen (Abb. 3.3 B). In den C57BL/6 Mäusen wurde weder nach Stimulation mit *S. rattii*-Lysat (C) noch nach Inkubation mit anti-CD3-AK (D) eine verstärkte Induktion der analysierten Zytokine durch Behandlung mit anti-CTLA-4 beobachtet. Vielmehr kam es zu einer Suppression von IL-3 nach antigenspezifischer Stimulation (Abb. 3.3 C)

Entsprechende Experimente mit mesLK-Zellen lieferten vergleichbare Resultate (Daten nicht gezeigt).

Die Blockade von CTLA-4 führte in BALB/c Mäusen, nicht aber in C57BL/6 Mäusen, zu einer verstärkten Aktivierung der antigenspezifischen zellulären Th2-Immunantwort. Diese verstärkte Th2-Immunantwort könnte für die erhöhte Resistenz, die ebenfalls nur in anti-CTLA-4 behandelten BALB/c Mäusen beobachtet wurde, verantwortlich sein. Die Untersuchung der Zytokine ergab, dass IL-3 in anti-CTLA-4 behandelten BALB/c Mäusen verstärkt exprimiert wurde, wohingegen es in anti-CTLA-4 behandelten C57BL/6 Mäusen sogar supprimiert wurde. IL-3 ist an der Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen beteiligt. Es ist bekannt, dass in der *Strongyloides*-Infektion die Mastzellen im Darm maßgeblich an der Abstoßung der adulten Würmer beteiligt sind (Abe, T *et al.* 1993; Khan, AI *et al.* 1993; Nawa, Y *et al.* 1985). Deswegen sollte überprüft werden, ob die Mastzellen durch die veränderte IL-3 Produktion nach Blockade von CTLA-4 beeinflusst werden. Sobald die Mastzellen degranulieren werden verschiedene Mediatoren, unter anderem die MMCP-I freigesetzt [zusammengefasst in (Pejler, G *et al.* 2010)]. Diese wurde daher als Maß für die Aktivierung der Mastzellen verwendet.

In Abb. 3.4 A ist die Menge an MMCP-I im Serum von BALB/c Mäusen an verschiedenen Tagen nach der Infektion in Anwesenheit von anti-CTLA-4 (schwarz) oder HamIgG (weiß) dargestellt. Weder bei BALB/c Mäusen noch bei C57BL/6 Mäusen zeigten sich Unterschiede in der Aktivierung der Mastzellen, gemessen an der Menge MMCP-I im Serum der Mäuse (Abb. 3.4 B).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die geringere Wurmlast in BALB/c Mäusen das Resultat der gesteigerten antigenspezifischen Th2-Immunantwort ist, und nicht von der Aktivierung der Mastzellen abhängt.

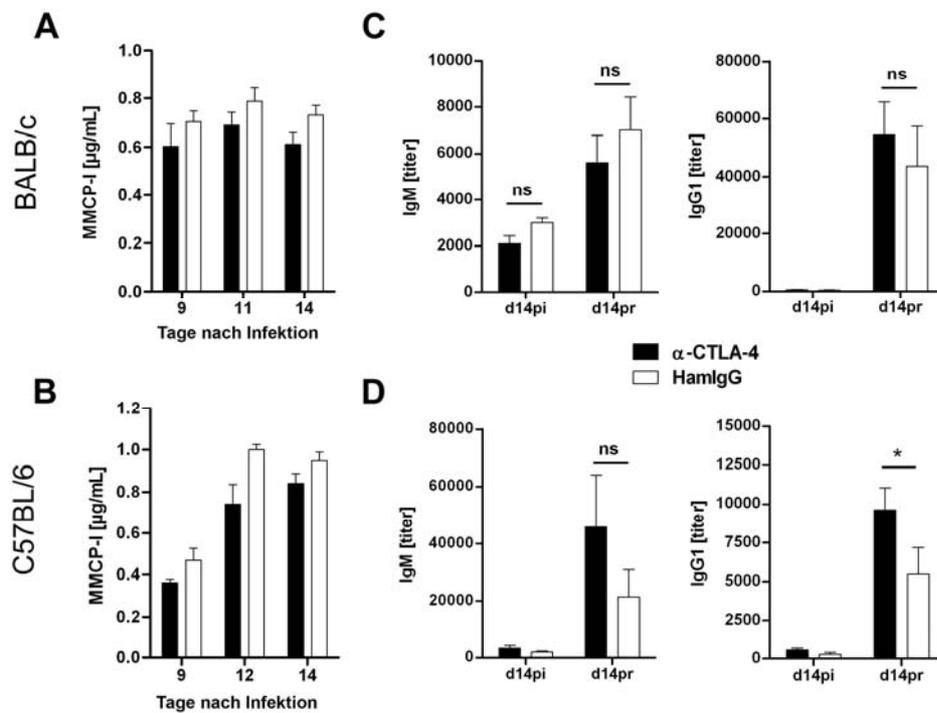


Abb. 3.4: Humorale Immunantwort und Mastzellaktivierung während der Blockade von CTLA-4

BALB/c und C57BL/6 Mäuse wurden mit 300 µg anti-CTLA-4 (schwarz) oder HamIgG (weiß) behandelt und anschließend mit 1000 *S. ratti*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. (A, B) Dargestellt ist die Menge an MMCP-I im Serum von anti-CTLA-4 behandelten und unbehandelten BALB/c (A) und C57BL/6 (B) Mäusen an verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion. (C, D) Gezeigt ist der *S. ratti*-spezifische Antikörpertiter für IgM (links) und IgG1 (rechts) im Serum von anti-CTLA-4 behandelten und unbehandelten BALB/c (C) und C57BL/6 (D) Mäusen an Tag 14 nach der Infektion und nach der Reinfektion. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (n = 6) als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne geben die Signifikanz der Resultate an (* p ≤ 0,05).

Nachdem gezeigt wurde, dass die zelluläre Immunantwort in BALB/c Mäusen durch die Blockade von CTLA-4 gesteigert wird, sollte im Folgenden überprüft werden, ob die Blockade auch zu einer verstärkten humoralen Immunantwort führt. Antikörper sind ebenfalls an der Klärung von *S. ratti*-Infektionen beteiligt (Dawkins, HJ and Grove, DI 1981; Ligas, JA *et al.* 2003; Murrell, KD 1981). Durch das vorliegende Th2-Milieu wird der Klassenwechsel der B-Zellen von IgM zu IgG1 induziert, dem neben IgE typischen Th2-assoziierten Antikörper.

Die Untersuchungen der antigenspezifischen Antikörpertiter für IgM und IgG1 in der Erstinfektion und nach der Reinfektion mit *S. ratti* zeigten keinen Einfluss von anti-CTLA-4 auf die humorale Immunantwort in BALB/c Mäusen (Abb. 3.4 C). In C57BL/6 Mäusen steigerte die anti-CTLA-4 Gabe tendenziell den *S. ratti*-spezifischen IgM Titer und signifikant den *S. ratti*-spezifischen IgG1 Titer nach der Reinfektion (Abb. 3.4 D). Dieses spiegelte sich jedoch nicht in einer verbesserten Abwehr der Würmer während der Reinfektion wieder (Daten nicht gezeigt). Antigen-spezifisches IgE wurde in keinem der Experimente nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass CTLA-4 während der *S. ratti*-Infektion vorwiegend auf Teff induziert wird. Die Blockade von CTLA-4 vermittelten Signalen hat keinen Einfluss auf die Anzahl der wandernden Larven oder den Ausstoß von Eiern und L1. Es zeigt sich jedoch selektiv eine Reduktion der parasitären Adulten im Darm von anti-CTLA-4 behandelten BALB/c, nicht aber C57BL/6 Mäusen. Dieser Effekt korreliert mit einer verstärkten zellulären Th2-Immunantwort in BALB/c Mäusen, die allerdings keinen Einfluss auf die Mastzellaktivierung oder die Antikörperproduktion hat. Die leicht gesteigerten Antikörpertiter in anti-CTLA-4 behandelten C57BL/6 Mäusen haben keine verbesserte Wurmbabwehr zur Folge.

CTLA-4 ist nur ein regulatorisches Element von vielen. Nachdem die Blockade von CTLA-4 nur geringe Auswirkungen auf die *S. ratti*-Infektion hatte, sollte im Folgenden untersucht werden, welche Auswirkung die Depletion einer ganzen regulatorischen Zellpopulation auf die *S. ratti*-Infektion haben würde.

3.2 Der Einfluss von Treg auf die *S. ratti*-Infektion

3.2.1 Induktion von Treg während der *S. ratti*-Infektion

Treg sind ein essentieller Bestandteil des Immunsystems und maßgeblich an der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz und an der Kontrolle von Immunantworten beteiligt (Sakaguchi, S *et al.* 2008). In einer Reihe von Infektionsmodellen wurde bereits gezeigt, dass Treg während der Immunantwort gegen Pathogene expandieren. Dabei ändert sich die Frequenz der Treg innerhalb der T-Zellen häufig nicht, sondern lediglich die Anzahl der Treg steigt, um das „Schritthalten“ mit der gleichzeitigen Expansion der Teff zu gewährleisten (D'Elia, R *et al.* 2009; McSorley, HJ *et al.* 2008; Rausch, S *et al.* 2008).

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es auch während der Immunantwort gegen *S. ratti* zu einer Expansion der Treg kommt. Für diese Untersuchung wurde das Modell der „*Depletion of regulatory T cells*“ (DEREG) Maus verwendet (Lahl, K *et al.* 2007). DEREG Mäuse verfügen im Genom über ein zusätzliches, artifizielles Chromosom auf welchem der Diphtherietoxin-Rezeptor (DTR) und das *enhanced green fluorescent protein* (GFP) unter der Kontrolle des Foxp3-Promoters exprimiert werden. Die grün fluoreszierenden Foxp3⁺ Treg lassen sich daher im Durchflusszytometer messen. Zusätzlich exprimieren diese den DTR auf der Oberfläche, was ihre Depletion durch Injektion von Diphtherietoxin ermöglicht.

BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG wurden mit *S. ratti*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert und die Anzahl der Treg an Tag 2, 7, 14 und 36 in verschiedenen lymphatischen Organen und dem Darm untersucht. Hierbei wurden, der Infektionsroute der iL3 folgend, der popliteale Lymphknoten (popLK), der inguinale Lymphknoten (ingLK) sowie die mesLK, als drainierende Lymphknoten des Darms, und die Milz untersucht. Die isolierten Zellen wurden mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gegen CD4 gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Abb. 3.5 zeigt die Expansion von CD4⁺ T-Zellen in den popLK und den ingLK während der *S. ratti*-Infektion in BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG.

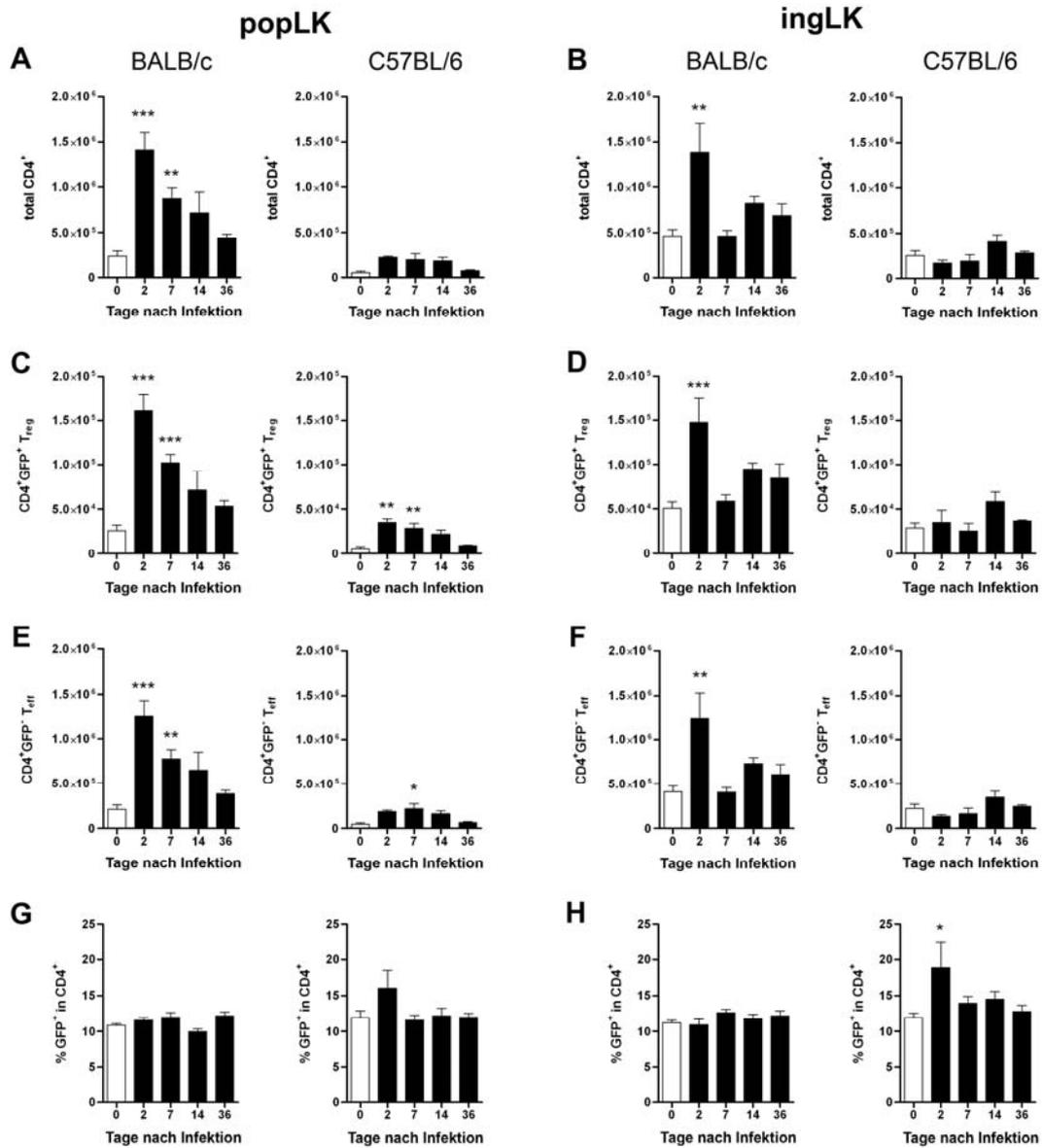


Abb. 3.5: Induktion von Treg während der *S. rattii*-Infektion in popLK und ingLK von BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG

BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG wurden mit 2000 *S. rattii*-iL3 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden die popLK- und ingLK-Zellen isoliert, mit anti-CD4-AK gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Treg wurden anhand der GFP Expression detektiert. Dargestellt ist die Anzahl der gesamten CD4⁺ T-Zellen (A, B), die Anzahl an CD4⁺GFP⁺ Treg (C, D), die Anzahl an CD4⁺GFP⁺ Teff (E, F) und der prozentuale Anteil der Treg in den CD4⁺ T-Zellen (G, H). Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (n = 7 für Tag 0 und 7; n = 4 für Tag 2, 14 und 36) Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. Die Sterne geben den signifikanten Unterschied der Ergebnisse des jeweiligen Analysetages im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe an (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Die Untersuchung der Zellzahlen in BALB/c Mäusen zeigte einen sprunghaften Anstieg der CD4⁺ T-Zellen in popLK und ingLK an Tag 2 nach der Infektion. Dieser Anstieg wurde sowohl in der Treg (C, D) als auch in der Teff (E, F) Population beobachtet. Deswegen blieb die Frequenz der Treg (G, H) in den CD4⁺ T-Zellen unverändert. Die Anzahl der Treg und Teff ging ab Tag 7 kontinuierlich zurück, und war an Tag 36 in nicht infizierten und infizierten Mäusen vergleichbar.

In den popLK der C57BL/6 Mäuse zeigte sich ebenfalls ein sprunghafter Anstieg der Zellzahlen (A, C, E). Allerdings fanden sich insgesamt in den popLK und ingLK der C57BL/6 Mäuse wesentlich weniger Zellen als in den Lymphknoten der BALB/c Mäuse. Im Gegensatz zu den popLK wurde in den ingLK der C57BL/6 (B, D, E) Mäuse kaum eine Induktion von Zellen beobachtet. Tatsächlich führte hier sogar ein Rückgang der Teff und eine Zunahme der Treg an Tag 2 nach der Infektion zu einem signifikanten Anstieg der Treg-Frequenz (H) in den ingLK. Dieser Anstieg in der Frequenz wurde tendenziell auch in den popLK der C57BL/6 Mäuse (G) an Tag 2 nach der Infektion beobachtet, was zeigt, dass Treg schneller als Teff expandierten.

Neben den popLK und den ingLK wurden auch die Zellzahlen in den mesLK und der Milz untersucht (Abb. 3.6). In mesLK und Milzen von BALB/c und C57BL/6 Mäusen wurde eine sehr ähnliche Kinetik bei der Induktion der Zellen beobachtet. In mesLK stiegen die Zellzahlen von Treg, (C) und Teff (E) ab Tag 7 nach der Infektion an, erreichten ihr Maximum an Tag 14 nach der Infektion und lagen bereits an Tag 36 wieder auf dem Niveau von nicht infizierten Mäusen.

Die Untersuchung der Milzen zeigte, dass die Anzahl der gesamten CD4⁺ T-Zellen (B) und die Anzahl der Teff (F) über den Verlauf der Infektion konstant bzw. an Tag 2 und 7 nach der Infektion leicht rückläufig waren. Im Gegensatz dazu stieg die Anzahl der Treg an diesen Tagen leicht an, was zu einer Erhöhung der Treg-Frequenzen innerhalb der T-Zell-Population führte.

Neben der Induktion von Treg in den lymphatischen Organen wurde die Induktion von Foxp3⁺ T-Zellen am Ort der Infektion, im Darm, untersucht (Abb. 3.7). Hierfür wurden Gewebeschnitte der Därme hergestellt und mit anti-CD3-AK (rot) und anti-Foxp3-AK (braun) angefärbt. Die histologische Untersuchung ergab, dass auch im Darm von BALB/c und C57BL/6 Mäusen Treg induziert wurden. In C57BL/6 Mäusen waren Anzahl und Frequenz der Treg an Tag 2 maximal, in BALB/c Mäusen erst an Tag 7.

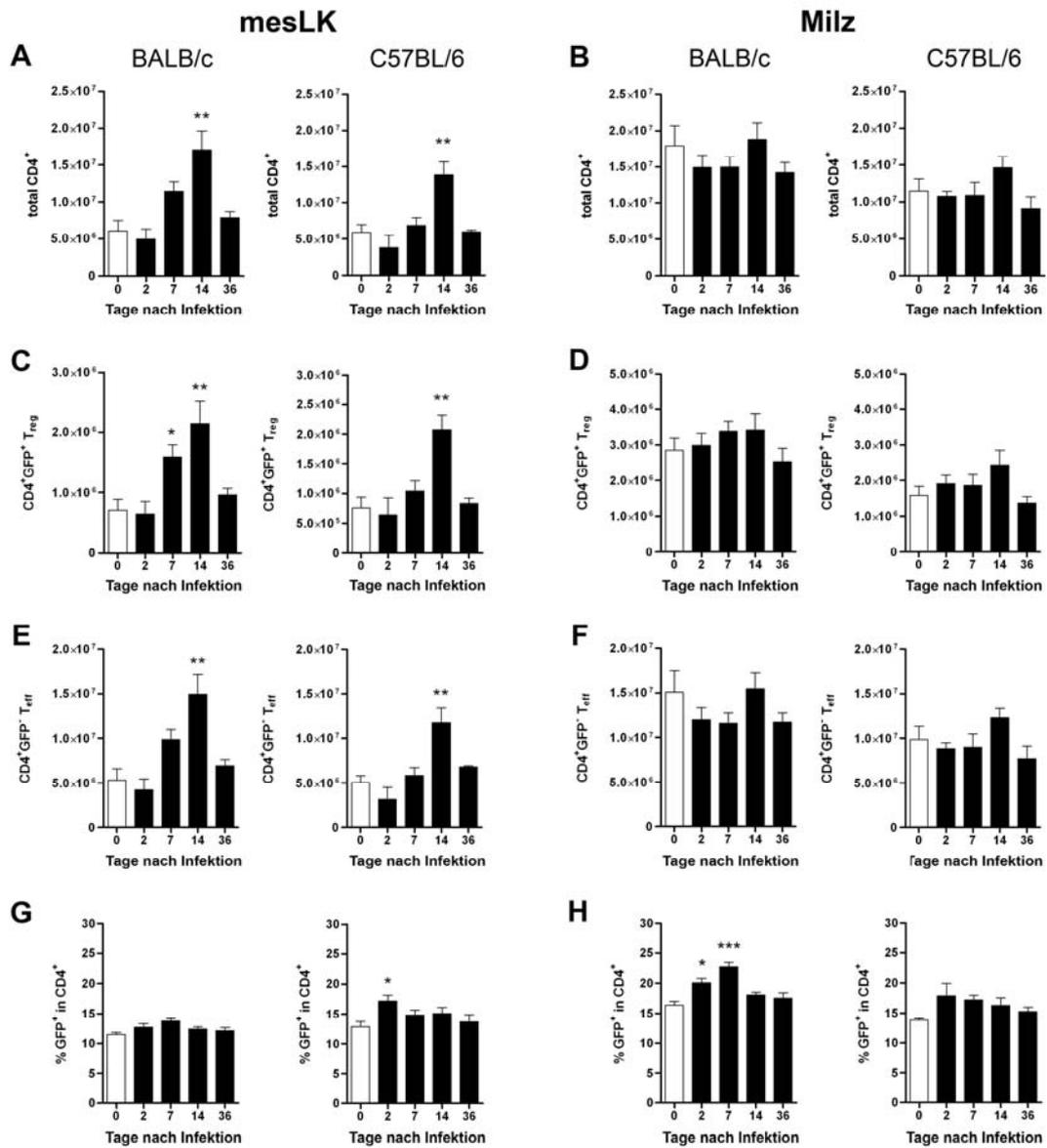


Abb. 3.6: Induktion von Treg während der *S. rattii*-Infektion in mesLK und Milz von BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG

BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG wurden mit 2000 *S. rattii*-iL3 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurden mesLK- und Milzzellen isoliert, mit anti-CD4-AK gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Treg wurden anhand der GFP Expression detektiert. Dargestellt ist die Anzahl CD4⁺ T-Zellen (A, B), CD4⁺GFP⁺ Treg (C, D), CD4⁺GFP⁺ Teff (E, F) und der prozentuale Anteil der Treg in den CD4⁺ T-Zellen (G, H). Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (n = 7 für Tag 0 und 7; n = 4 für Tag 2, 14 und 36) Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM. Die Sterne geben den signifikanten Unterschied der Ergebnisse des jeweiligen Analysetages im Vergleich zur nicht-infizierten Kontrollgruppe an (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass es während der Infektion mit *S. ratti* in den Mäusen zu einer Expansion von T-Zellen in den lymphatischen Organen und dem Darm kommt. Besonders ausgeprägt ist dieses in den popLK, den drainierenden Lymphknoten der Injektionsstelle der iL3, und den mesLK, den drainierenden Lymphknoten der Infektion im Darm.

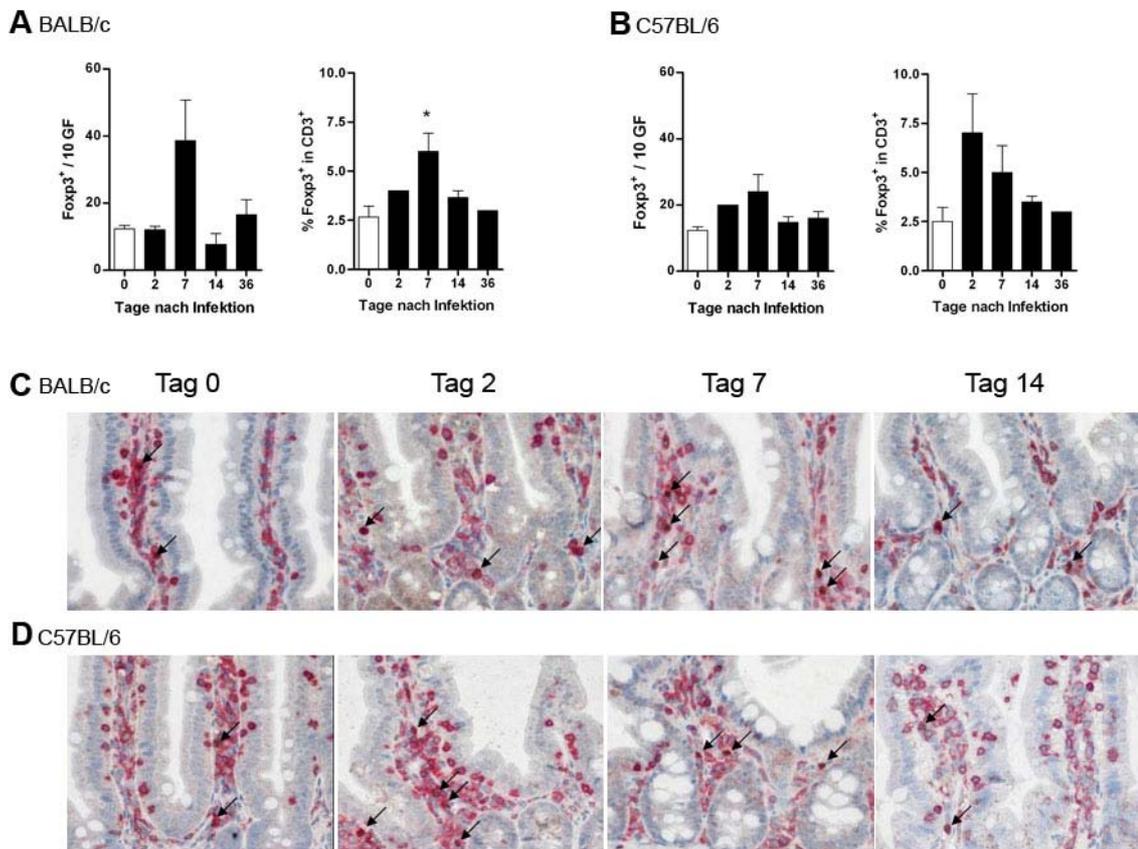


Abb. 3.7: Induktion von Treg während der *S. ratti*-Infektion im Darm von BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK

BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK wurden mit 2000 *S. ratti*-iL3 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Därme der Tiere präpariert und histologisch untersucht. (A) Dargestellt ist die Anzahl Foxp3⁺ T-Zellen in zehn Gesichtsfeldern (GF) (links) bzw. die Frequenz Foxp3⁺ T-Zellen in den CD3⁺ T-Zellen (rechts) in BALB/c Mäusen. In (B) ist die Anzahl Foxp3-positiver Zellen in 10 Gesichtsfeldern (links) bzw. die Frequenz Foxp3⁺ T-Zellen in den CD3⁺ Zellen (rechts) in C57BL/6 Mäusen dargestellt. Gezeigt sind exemplarische Bilder der histologischen Färbungen aus BALB/c (C) und C57BL/6 (D) zu den verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse des jeweiligen Analysetages im Vergleich zur nicht infizierten Kontrollgruppe an (* $p \leq 0,05$).

3.2.2 Depletion von Treg in der DEREГ Maus

Nachdem gezeigt wurde, dass es während der *S. ratt*i-Infektion zu einer Expansion von Treg kommt, sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die Depletion dieser Zellen auf den Infektionsverlauf hat. Für diese Experimente wurde ebenfalls das Modell der DEREГ Maus verwendet, welches die Depletion der Treg durch Injektion von DT ermöglicht.

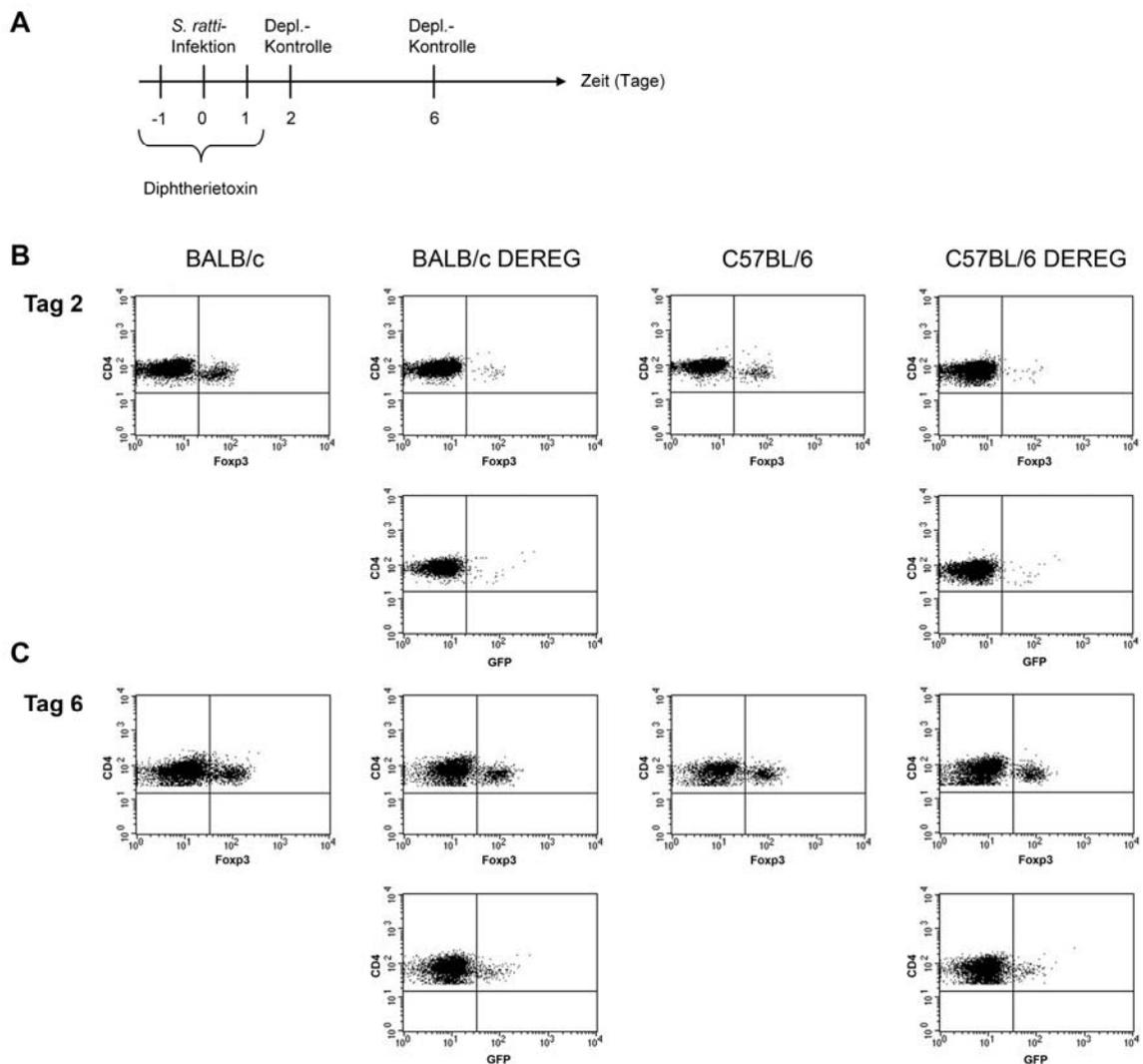


Abb. 3.8: Treg-Depletion im Blut von *S. ratt*i-infizierten BALB/c DEREГ und C57BL/6 DEREГ

(A) Gezeigt ist der Ablauf des Experiments. BALB/c, BALB/c DEREГ, C57BL/6 und C57BL/6 DEREГ erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen (Tag -1 bis Tag 1) 0,5 µg DT i.p. und wurden an Tag 0 mit 2000 *S. ratt*i-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. An Tag 2 und Tag 6 nach Infektion wurde die Frequenz der Treg im Blut der Mäuse durchflusszytometrisch bestimmt. In (B) und (C) ist exemplarisch die Auswertung der durchflusszytometrischen Daten für jeweils eine Maus pro Zeitpunkt dargestellt. Die Bilder zeigen die Foxp3 und GFP Expression für Tag 2 (B) und Tag 6 (C).

Zunächst sollte die Effizienz der Depletion nach Gabe von DT überprüft werden. In Abb. 3.8 A ist der Ablauf des Experiments dargestellt. BALB/c DEREg, C57BL/6 DEREg und nicht-transgene Wurfgeschwister (BALB/c und C57BL/6) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit DT behandelt. An Tag 0 wurden die Tiere mit *S. rattii*-iL3 infiziert und an Tag 2 bzw. Tag 6 nach der Infektion die Treg-Frequenzen in mesLK, Milz und Blut der Tiere bestimmt. Abb. 3.8. B und C zeigen exemplarisch die durchflusszytometrische Bestimmung der Treg-Frequenz an den beiden Analysetagen im Blut der Mäuse. Gezeigt ist die Auswertung der Foxp3 und GFP Expression. Diese Kontrolle zeigte, dass die Treg mit dem verwendeten Depletionsprotokoll nur transient bis einschließlich Tag 2 depletiert wurden (Abb. 3.8 B). An Tag 6 kam es bereits zu einer deutlichen Repopulation der Treg, was jedoch nur anhand der Foxp3 Expression und nicht anhand der GFP-Fluoreszenz nachweisbar war (Abb. 3.8 C). Diese transiente Depletion der Treg im DEREg Modell wurde bereits beschrieben (Rausch, S *et al.* 2009).

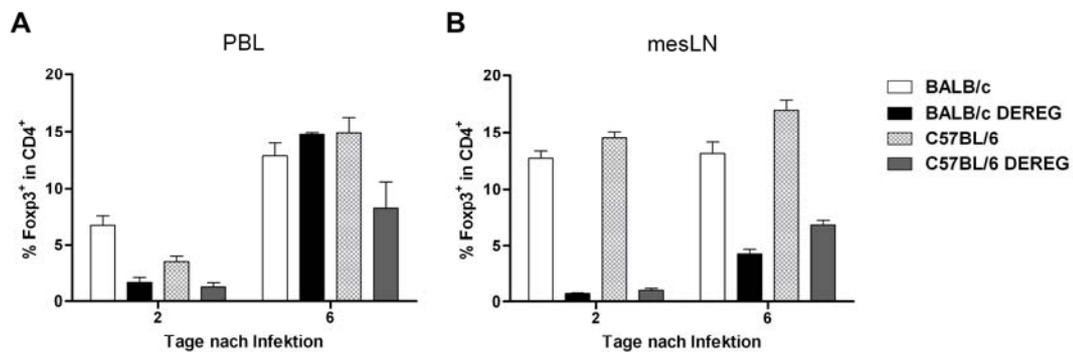


Abb. 3.9: Treg-Depletion in Blut und mesLK von *S. rattii*-infizierten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg

BALB/C DEREg, C57BL/6 DEREg und deren Wurfgeschwister wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 0,5 µg DT behandelt und mit 2000 *S. rattii*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. An Tag 2 und Tag 6 nach Infektion wurde den Mäusen Blut abgenommen (A), die mesLK isoliert (B) und die Zellen mit anti-CD4-AK gefärbt. Die Expression von Foxp3 wurde innerhalb der CD4⁺ T-Zell-Population untersucht. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Treg innerhalb der CD4⁺ T-Zellen (n = 4) als Mittelwert ± SEM.

Die zusammengefassten Ergebnisse der Treg-Depletion sind in Abb. 3.9 für das Blut (A) und für die mesLK (B) dargestellt. Lediglich die Repopulation der Treg in den mesLK fand etwas langsamer statt als im Blut, war jedoch in beiden untersuchten

Mausstämmen vergleichbar. Eine ähnliche Effizienz der Depletion wurde auch in der Milz erzielt (Daten nicht gezeigt). Ähnlich wie in den Milzen (Abb. 3.6 H) kam es auch im peripheren Blut von nicht depletierten Mäusen (Abb. 3.9 weiß und hellgrau) zu einer gesteigerten Treg-Frequenz, die in den mesLK nicht vorhanden war.

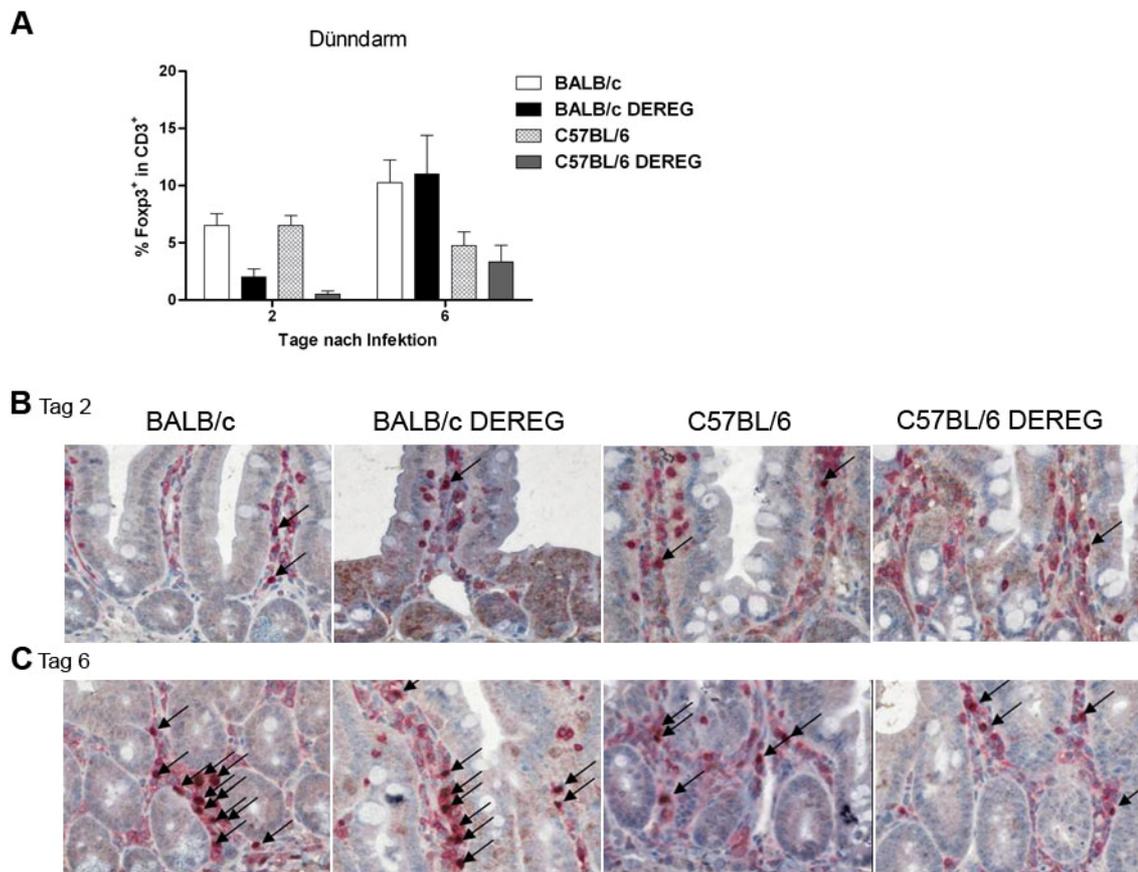


Abb. 3.10: Treg-Depletion im Darm von *S. ratti*-infizierten BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK
BALB/c, BALB/c DEREK, C57BL/6 und C57BL/6 DEREK wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit DT behandelt. An Tag 0 wurden die Tiere mit 2000 *S. ratti*-iL3 infiziert und an Tag 2 und Tag 6 nach Infektion, die Anzahl an Treg im Darm der Mäuse untersucht. (A) gezeigt ist der prozentuale Anteil der Treg in den CD3⁺ T-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. (B, C) Gezeigt sind exemplarische Bilder der histologischen Färbung von CD3⁺ T-Zellen (rot) und Fcpx3⁺ T-Zellen (braun), in BALB/c, BALB/c DEREK, C57BL/6 und C57BL/6 DEREK an Tag 2 (B) und Tag 6 (C) nach der Infektion.

Zusätzlich sollte die Depletion der Tregs durch histologische Färbungen im Darm der Tiere untersucht werden. Die Auswertung der Treg-Zahlen im Darm ist in Abb. 3.10 A dargestellt. Auch hier wurde eine deutliche Reduktion der Treg-Frequenz an Tag 2 nach der Infektion beobachtet und die Repopulation findet ähnlich wie in den anderen

untersuchten Organen statt. Abb. 3.10 zeigt exemplarische Bilder der histologischen Auswertung von BALB/c, BALB/c DEREg, C57BL/6 und C57BL/6 DEREg an Tag 2 (B) und Tag 6 (C) nach der Infektion.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in der DEREg Maus eine transiente Depletion der Treg möglich ist. In allen untersuchten Organen wurden an Tag 2 nach der Infektion (also einen Tag nach der letzten DT Injektion) sehr geringe Frequenzen der Treg nachgewiesen. In den untersuchten Mausstämmen, BALB/c und C57BL/6, waren die Depletion und die Repopulation der Treg vergleichbar.

3.2.3 Untersuchung der Wurmlast in Treg-depletierten DEREg Mäusen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Induktion von Treg in beiden untersuchten Mausstämmen und die Depletion im verwendeten DEREg Modell mit vergleichbarer Kinetik und Effizienz abläuft, sollte im Folgenden die Auswirkung der Treg-Depletion auf die *S. ratti*-Infektion untersucht werden. Hierfür wurden die Mäuse wie in Abb. 3.11 A dargestellt, zunächst mit DT behandelt und an Tag 0 mit *S. ratti*-iL3 infiziert. An Tag 7 nach der Infektion wurde die Wurmlast im Darm der Mäuse bestimmt (Abb. 3.11 B). Treg-depletierte BALB/c Mäuse hatten eine signifikant verringerte Wurmlast im Vergleich zu den nicht depletierten BALB/c Mäusen. Die gleichzeitig untersuchten C57BL/6 Mäuse zeigten in An- und Abwesenheit der Treg keinerlei Unterschiede in der Wurmlast (Abb. 3.11 B). Da die Induktion und Depletion von Treg in beiden Mausstämmen vergleichbar war, wurde dieses als Grund für die Abweichung zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen ausgeschlossen. Es stellte sich daher die Frage, wo der Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen in Bezug auf die Regulation durch Treg während der *S. ratti*-Infektion lag. Im Folgenden sollte daher zunächst der Infektionsverlauf und die Immunantwort in Treg-depletierten BALB/c Mäusen genauer untersucht werden.

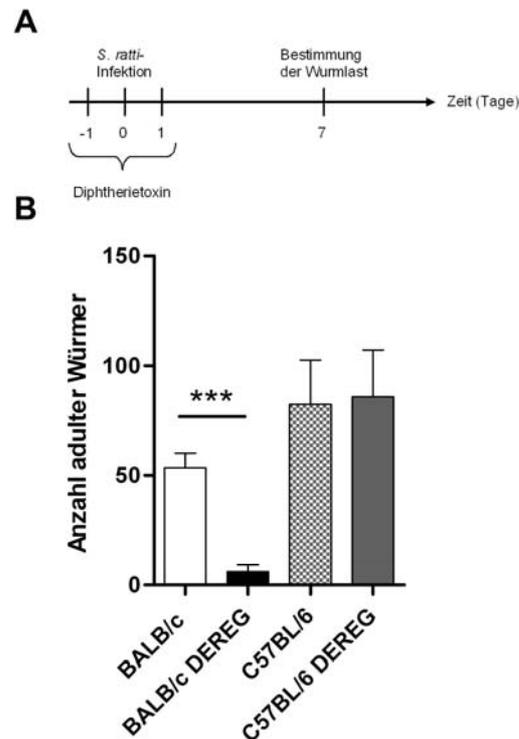


Abb. 3.11: Anzahl adulter Würmer in Treg-depletierten BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG

(A) Gezeigt ist der Versuchsablauf. An Tag -1 bis Tag 1 erhielten die Mäuse jeweils 0,5 µg DT i.p. und wurden an Tag 0 subkutan in die Hinterpfote mit 2000 *S. rattii*-iL3 infiziert. Sieben Tage nach der Infektion wurde die Wurmlast im Dünndarm der Mäuse bestimmt. In (B) ist die Anzahl der adulten Würmer im Darm der Mäuse dargestellt. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (n = 10) als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz des Ergebnisses an (***) ($p \leq 0,001$).

3.2.4 Untersuchung des Infektionsverlaufes in Treg-depletierten BALB/c DEREG

Da die Depletion der Treg in BALB/c DEREG zu einer signifikant verringerten Wurmlast führte, wurden in den folgenden Experimenten der Infektionsverlauf und die parasitologischen Parameter untersucht. Hierfür wurden ab Tag 6 nach der Infektion Stuhlproben von DT behandelten BALB/c DEREG und deren Wurfgeschwistern gesammelt und die DNA extrahiert.

Abb. 3.12 zeigt den Verlauf der Infektion anhand des Ausstoßes von *S. rattii*-DNA mit dem Stuhl der Mäuse. Hierfür wurde die in Abschnitt 3.1.2 beschriebene *Strongyloides*-spezifische qPCR verwendet. Die BALB/c DEREG Mäuse, denen zu Beginn der

Infektion die Tregs fehlten, wiesen während des gesamten Infektionsverlaufs einen geringeren Ausstoß an *S. ratti*-DNA im Stuhl auf als DT behandelte Wurfgeschwister. Um zu untersuchen, ob die Depletion der Tregs einen Einfluss auf die entstehende, schützende Gedächtnisantwort hat, wurden die Tiere, nachdem die Erstinfektion abgeklungen war, erneut mit *S. ratti* infiziert. Es wurde ebenfalls der Infektionsverlauf anhand der *S. ratti*-DNA im Stuhl verfolgt (Abb. 3.12 B). Dabei konnte kein störender Einfluss der Treg-Depletion auf die Entstehung der Gedächtnisantwort festgestellt werden. Vielmehr wurde sogar eine höhere Resistenz der Mäuse beobachtet, die zu Beginn der Erstinfektion keine Tregs besaßen.

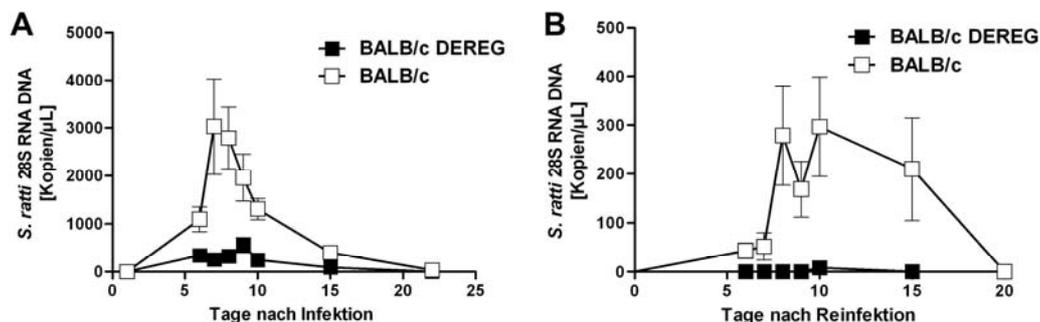


Abb. 3.12: Infektionsverlauf in Treg-depletierten BALB/c Mäusen

BALB/c Dereg und deren Wurfgeschwister erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 μ g DT i.p. und wurden mit 2000 *S. ratti*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurden Stuhlproben der Mäuse gesammelt, DNA extrahiert und mit Hilfe der *Strongyloides*-spezifischen qPCR analysiert. Dargestellt ist der Ausstoß von *S. ratti*-DNA im Stuhl der Mäuse nach der Erstinfektion (A) und nach der Reinfektion (B). Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten ($n = 8$) als Mittelwerte \pm SEM.

Diese Ergebnisse zeigen, dass Treg mit der schützenden Immunantwort in BALB/c Mäusen interferieren und die Treg-Depletion den Mäusen einen Vorteil bei der Wurmbabwehr verschafft. Daher sollte untersucht werden, ob Treg die frühe, angeborene Immunantwort begrenzen, oder einen Einfluss auf die Induktion der adaptiven Immunantwort ausüben.

Um die Auswirkung auf die angeborene Immunantwort zu untersuchen wurde die Anzahl der wandernden Larven in An- und Abwesenheit der Treg bestimmt. Die Abwehr der wandernden Larven erfolgt in einer Erstinfektion mit *Strongyloides*

hauptsächlich über Mechanismen des angeborenen Immunsystems. So werden neutrophile und eosinophile Granulozyten rekrutiert (Galioto, AM *et al.* 2006; Watanabe, K *et al.* 2000; Watanabe, K *et al.* 2003) und Faktoren des Komplementsystems aktiviert (Brigandi, RA *et al.* 1996; de Messias, IJ *et al.* 1994; Kerepesi, LA *et al.* 2006). Würden diese Mediatoren durch die Treg negativ reguliert sollte die Depletion der Treg diese negative Regulation aufheben und zu einer verringerten Larvenanzahl im Gewebe der Mäuse führen.

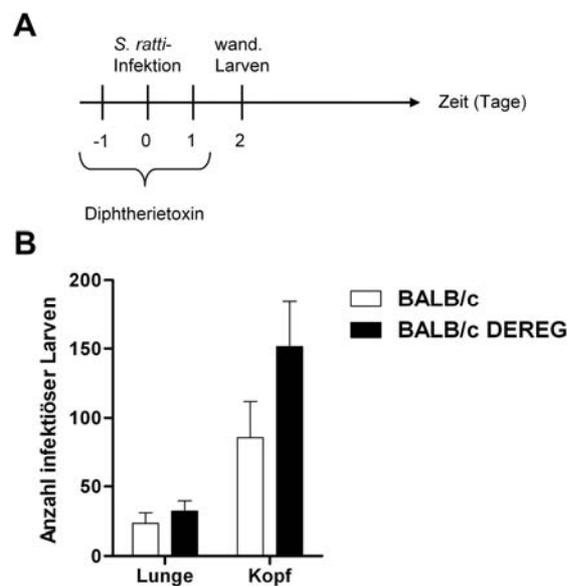


Abb. 3.13: Anzahl wandernder Larven in Kopf und Lunge von Treg-depletierten BALB/c DERE

(A) Gezeigt ist der Versuchsablauf. BALB/c DERE und deren Wurfgeschwister wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 0,5 µg DT i.p. behandelt. An Tag 0 wurden die Tiere mit 2000 *S. ratti*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. In (B) ist die Anzahl wandernder Larven in Lunge und Kopf an Tag 2 nach der Infektion dargestellt. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (n = 8) als Mittelwerte ± SEM.

BALB/c DERE und deren Wurfgeschwister wurden mit DT behandelt und mit *S. ratti*-iL3 subkutan infiziert (Abb. 3.13 A). An Tag 2 nach der Infektion wurde die Anzahl wandernder Larven in Kopf und Lunge der Mäuse bestimmt, wobei kein Unterschied zwischen depletierten und nicht-depletierten Tieren festgestellt wurde (Abb. 3.13 B).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die beobachtete verringerte Wurmlast nach der Depletion der Treg nicht auf eine verbesserte, angeborene Immunantwort gegen die wandernden Larven zurückzuführen ist. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob die Treg-Depletion einen Einfluss auf die adaptive Immunantwort hat.

3.2.5 Untersuchung der adaptiven Immunantwort in Treg-depletierten BALB/c DEREK

Die adaptive Immunantwort gegen *S. ratti* zeichnet sich durch die Induktion von Th2-Zellen und Antikörpern aus (Eschbach, ML *et al.* 2010). T-eff produzieren Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13, die typischerweise während Wurminfektionen nachgewiesen werden und eine wichtige Funktion bei der Bekämpfung der Würmer ausüben.

Um zu untersuchen, ob sich die Zytokinsekretion der T-Zellen in Abwesenheit von Treg verändert, wurden BALB/c DEREK und BALB/c Mäuse mit DT behandelt und mit *S. ratti* infiziert. An Tag 7 nach der Infektion wurden die mesLK- und Milzzellen der Tiere isoliert und antigenspezifisch mit *S. ratti*-Lysat sowie polyklonal mit anti-CD3-AK *in vitro* stimuliert. Nach 72 h wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinkonzentration bestimmt. Die Zellen wurden für weitere 18 h mit ³H-Thymidin inkubiert, um die Proliferation anhand des Einbaus des ³H-Thymidins in die DNA zu bestimmen.

In Abb. 3.14 ist die Zytokinproduktion von mesLK-Zellen nach Stimulation mit *S. ratti*-Lysat (A) und anti-CD3-AK (B) dargestellt. In den Treg-depletierten BALB/c DEREK wurde im Vergleich zu den nicht-depletierten Kontrollen, eine deutlich erhöhte Produktion der Zytokine IL-5, IL-13, IL-3 und IL-10, sowohl nach antigenspezifischer als auch nach polyklonaler Stimulation detektiert. Das proinflammatorische Zytokin IFN- γ wurde nach antigenspezifischer Stimulation nur in sehr geringen Mengen detektiert. Nach Stimulation mit anti-CD3-AK wurde jedoch auch hier eine signifikant erhöhte Konzentration in den Überständen der Zellen aus Treg-depletierten Tieren gemessen.

Die Analyse des Einbaus von ³H-Thymidin ergab, dass die Zellen der Treg-depletierten Mäuse tendenziell, wenn auch nicht signifikant, stärker proliferierten, als die, der nicht-depletierten Kontrolltiere (Abb. 3.14 C). Um sicher zu stellen, dass diese Aktivierung der Zellen spezifisch während der Infektion stattfand, wurde zusätzlich die Proliferation

von nicht infizierten Mäusen in An- und Abwesenheit der Treg untersucht. Hierbei konnte keine unspezifische Aktivierung festgestellt werden (Abb. 3.14 C).

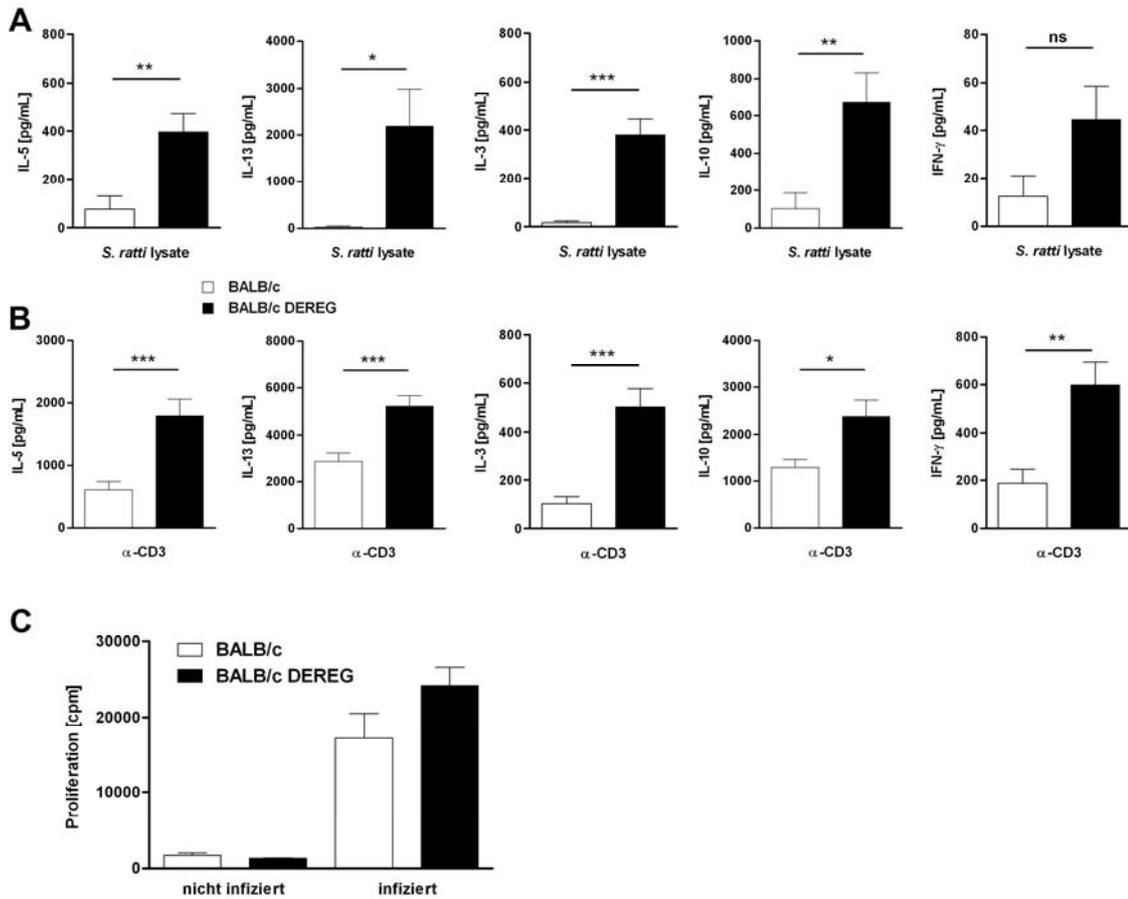


Abb. 3.14: Zelluläre Immunantwort während der *S. rattii*-Infektion in Treg-depletierten BALB/c DEREG

BALB/c DEREG und BALB/c Mäuse erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 μ g DT i.p. und wurden mit 2000 *S. rattii*-iL3 infiziert. An Tag 7 nach der Infektion wurden die mesLK isoliert und *in vitro* mit *S. rattii*-Lysat (A) und anti-CD3-AK (B) stimuliert. Nach 72 h wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration der Zytokine im Überstand bestimmt. Zur Analyse der Proliferation wurden die Zellen mit 3H-Thymidin für weitere 18 h inkubiert und anschließend dessen Einbau in die DNA analysiert (C). Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten ($n = 10$). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM. Die Sterne beschreiben die statistische Signifikanz der Ergebnisse (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Zusammenfassend kommt es nach der Depletion der Treg zu einer signifikant verstärkten Produktion aller untersuchten Zytokine, unabhängig davon, ob es sich um Th2- oder Th1-Zytokine handelt.

Nachdem die Treg-Depletion so deutliche Auswirkungen auf die zelluläre Immunantwort hatte, sollte untersucht werden, ob die Depletion auch einen Einfluss auf die Aktivierung von B-Zellen und somit die Produktion von Antikörpern hatte. B-Zellen benötigen die Hilfe von Th-Zellen, um aktiviert zu werden und ihrer Hauptfunktion der Antikörperproduktion nachzukommen. Während Wurminfektionen bewirken die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 den Klassenwechsel von IgM zu IgE und IgG1 in B-Zellen (Bancroft, AJ *et al.* 1998; Coffman, RL *et al.* 1986; Snapper, CM and Paul, WE 1987). Daher wurden die Titer dieser drei Antikörperisotypen analysiert. Hierfür wurden erneut BALB/c DEREГ und nicht-transgene Wurfgeschwister mit DT behandelt und mit *S. ratti* infiziert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurde das Serum gewonnen und der Antikörpertiter bestimmt.

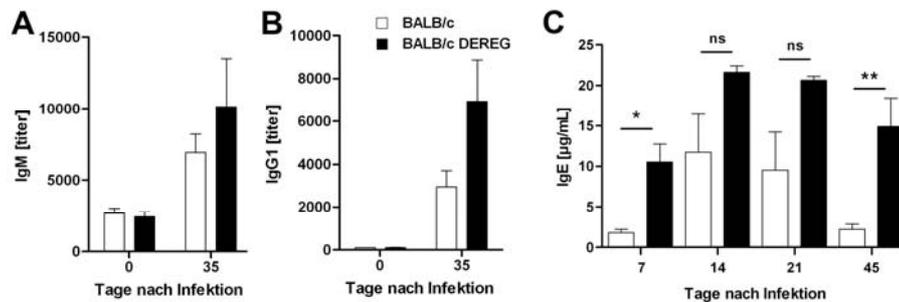


Abb. 3.15: Humorale Immunantwort während der *S. ratti*-Infektion in Treg-depletierten BALB/c DEREГ

BALB/c DEREГ und BALB/c Mäuse erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 µg DT i.p. und wurden mit 2000 *S. ratti*-iL3 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen Blut abgenommen und die *S. ratti*-spezifischen Antikörpertiter im Serum bestimmt. Dargestellt sind die Titer für IgM (A) und IgG1 (B) in nicht-infizierten Mäusen und an Tag 35 nach der Infektion. In (C) ist die Konzentration von IgE im Serum der Mäuse dargestellt. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei (A, B, n = 6) bzw. drei (C, n = 3-8) unabhängigen Experimenten als Mittelwert ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01).

Abb. 3.15 zeigt die Antikörpertiter für IgM (A) und IgG1 (B) in nicht infizierten Mäusen und an Tag 35 nach der Infektion. Die Titer beider Antikörperisotypen waren in Abwesenheit der Treg leicht erhöht. Die Analyse von unspezifischem IgE zeigte bereits an Tag 7 nach der Infektion einen sprunghaften Anstieg der IgE Konzentration im Serum von Treg-depletierten Tieren (Abb. 3.15 C). Diese blieb über den gesamten untersuchten Zeitraum erhöht und war auch an Tag 45 nach der Infektion, als die

Konzentration in den nicht-depletierten Wurfgeschwistern bereits wieder abnahm, noch signifikant verstärkt. *S. ratti*-spezifisches IgE konnte nicht detektiert werden.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Treg auch an der Regulation der humoralen Immunantwort beteiligt sind. Insbesondere blockieren sie im Fall der *S. ratti*-Infektion die schnelle Produktion von IgE. IgE wird benötigt, um Mastzellen zu aktivieren und die Expulsion der Würmer zu veranlassen. Die Kreuzvernetzung von IgE auf der Oberfläche von Mastzellen führt zur Degranulation und somit zur Freisetzung einer Reihe von Mediatoren, die das Abtöten und die Abstoßung der Würmer induzieren (Kawakami, T and Galli, SJ 2002).

Aktiviert Mastzellen sind an der Expulsion der adulten *S. ratti* aus dem Darm infizierter Mäuse maßgeblich beteiligt (Abe, T *et al.* 1993; Nawa, Y *et al.* 1985). Auf Grund dessen sollte überprüft werden, ob es während der Depletion von Treg auch zu einer verstärkten Aktivierung von Mastzellen, gemessen an der MMCP-I Konzentration im Serum der Mäuse, kommt. Hierfür wurden BALB/c DEREg und BALB/c Mäuse mit DT behandelt und mit *S. ratti*-iL3 infiziert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurde den Mäusen Blut abgenommen und die Menge an MMCP-I im Serum bestimmt.

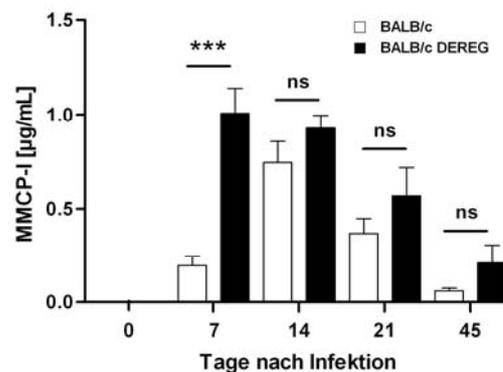


Abb. 3.16: MMCP-I im Serum von *S. ratti*-infizierten Treg-depletierten BALB/c Mäusen

BALB/c DEREg und BALB/c Mäuse erhielten an drei aufeinanderfolgenden Tagen 0,5 µg DT i.p und wurden mit 2000 *S. ratti*-iL3 infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen Blut abgenommen und die Konzentration der MMCP-I im Serum bestimmt. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (n = 8) als Mittelwert ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (***) p ≤ 0,001).

In den Treg-depletierten BALB/c DEREK Mäusen wurde eine starke und beschleunigte Mastzellaktivierung bereits an Tag 7 nach der Infektion beobachtet (Abb. 3.16). Nicht-depletierte Wurfgeschwister erreichten die höchste Serumkonzentration an MMCP-I erst an Tag 14 nach der Infektion. Auch an Tag 45 nach der Infektion war die MMCP-I Serumkonzentration immer noch tendenziell erhöht, was zeigt, dass die Mastzellaktivierung nach Treg-Depletion länger anhält.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Depletion von Treg, während der *S. ratti*-Infektion in BALB/c Mäusen einen starken Einfluss auf die Immunantwort hat. Die Produktion von Zytokinen wurde in Abwesenheit der Treg signifikant gesteigert. Besonders deutlich waren jedoch die stark erhöhte und beschleunigte Ausschüttung von IgE und MMCP-I. Dieses weist auf eine frühe Aktivierung der Mastzellen in Abwesenheit der Treg hin und könnte der Mechanismus sein, über den die verringerte Wurmlast in Treg-depletierten BALB/c DEREK Mäusen vermittelt wird.

Treg sind nicht nur für die Induktion von immunologischer Toleranz verantwortlich, sondern sie verhindern auch die Entstehung von Immunpathologien während Immunantworten. Für das Modell der DEREK Maus wurde bereits beschrieben, dass die Depletion von Treg in C57BL/6 Mäusen während der *H. polygyrus*-Infektion zu einer verstärkten Immunpathologie im Darm der Mäuse führt (Rausch, S *et al.* 2009). Deswegen sollte untersucht werden, ob es auch in der BALB/c Maus nach Depletion der Treg während der *S. ratti*-Infektion zu einer verstärkten Immunpathologie kommt. Hierfür wurden DT behandelte BALB/c DEREK und BALB/c Mäuse mit *S. ratti* infiziert. An Tag 7 nach der Infektion wurden die Därme präpariert und histologisch untersucht.

In Abb. 3.17 sind exemplarisch Bilder der analysierten Därme gezeigt. Die Bilder der oberen Reihe sind aus nicht infizierten Mäusen, in denen man deutlich die Zotten und Krypten der Mukosa erkennt. In der Submukosa ist keine Infiltration von Zellen zu beobachten. Im Gegensatz dazu sieht man in den unteren Bildern die Därme von *S. ratti*-infizierten Mäusen an Tag 7 nach der Infektion. Man erkennt die Einwanderung von Lymphozyten, was zu einer Verdickung der Submukosa führt. Infizierte Mäuse zeigten in An- und Abwesenheit von Treg jedoch keinen Unterschied im Grad der

Entzündung. Der in Abb. 3.17 B gezeigte Entzündungsgrad war in beiden Mausgruppen während der Infektion mit *S. ratti* vergleichbar.

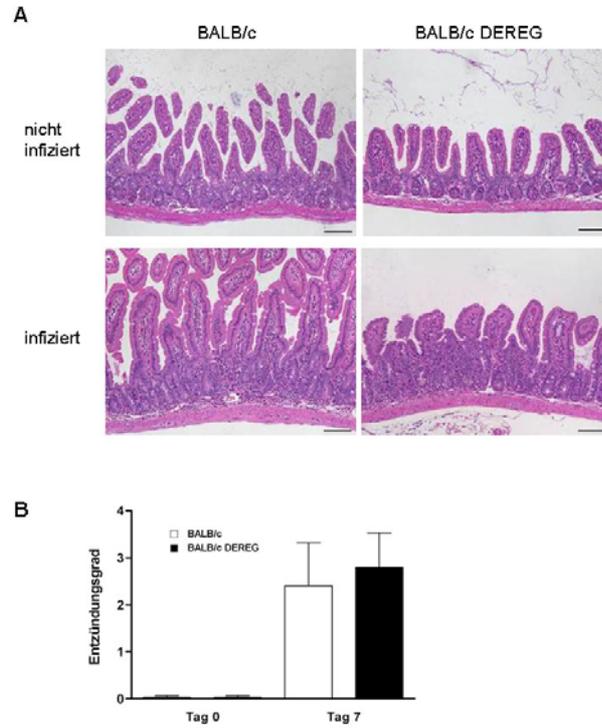


Abb. 3.17: Histologische Untersuchung der Därme von *S. ratti*-infizierten Treg-depletierten BALB/c DEREg

BALB/c DEREg und BALB/c Mäusen wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 0,5 µg DT i.p. behandelt und mit 2000 iL3-*S. ratti* infiziert. An Tag 7 nach der Infektion wurden die Därme der Tiere präpariert und Schnitte zur histologischen Untersuchung angefertigt. (A) Gezeigt sind Bilder von Därmen aus nicht-infizierten (oben) und infizierten (unten) BALB/c (links) und BALB/c DEREg (rechts) Mäusen, gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin. (B) Gezeigt ist der Grad der Darmentzündung, wobei 0 den Zustand eines nicht entzündeten Darms beschreibt und 4 für den stärksten Entzündungsgrad, mit Infiltration und Gewebszerstörung steht (siehe 2.5.11). Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten [n = 3 (nicht infiziert) und 5 (infiziert)]. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM.

Dieses Ergebnis zeigt, dass im Fall einer *S. ratti*-Infektion in BALB/c Mäusen der Infektionsverlauf durch die Depletion der Treg verbessert werden kann, ohne gleichzeitig eine verstärkte Entzündung des Darmes zu verursachen.

3.2.6 Depletion der Treg zu einem späteren Zeitpunkt in der *S. rattii*-Infektion

Wie bereits erwähnt, werden in der hier verwendeten DEREK Maus die Treg nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters von 2-3 Tagen depletiert. In den bisher dargestellten Experimenten wurden die Treg immer zu Beginn der Infektion depletiert. Die Untersuchung der Wurmlast und der Zytokinproduktion fand genau wie die Analyse der MMCP-I an Tag 7 nach der Infektion statt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Treg schon wieder vollständig repopuliert und konnten ihre Funktionen ausüben. Es stellte sich die Frage, ob die Treg einen direkten Einfluss auf die Immunantwort haben und ob die Depletion zu einem späteren Zeitpunkt, nämlich wenn die Immunantwort maximal war, ebenfalls eine verstärkte Wurmabwehr zur Folge hat.

Hierfür wurden BALB/c DEREK und BALB/c Mäuse mit DT behandelt und mit *S. rattii* infiziert (Abb. 3.18 A). Zusätzlich wurde eine Gruppe BALB/c DEREK und eine Gruppe BALB/c Mäuse ebenfalls an Tag 0 mit *S. rattii* infiziert, aber erst ab Tag 4 nach der Infektion mit DT behandelt (Abb. 3.18 A, späte Depletion). Dies führte dazu, dass die Treg ab Tag 5 bis Tag 7 nach der Infektion abwesend waren (Abb. 3.18 B), also zum Zeitpunkt maximaler Wurmlast und Zytokinproduktion. An Tag 7 nach der Infektion wurde die Wurmlast in den Därmen der Mäuse bestimmt. Wie bereits in Abb. 3.11 dargestellt wurde eine stark verringerte Wurmlast in den BALB/c Mäusen beobachtet die zu Beginn der Infektion keine Treg besaßen (Abb. 3.18 C). Die späte Depletion der Treg hatte keine Reduktion der Wurmlast zur Folge. Ein Anstieg der MMCP-I Konzentration und des IgE im Serum der Mäuse war nur in den früh-depletierten BALB/c DEREK zu beobachten. Die Konzentration von MMCP-I und IgE im Serum der spät-depletierten Mäuse war vergleichbar mit der Konzentration in nicht-depletierten BALB/c Mäusen (Abb. 3.18 D & E) und im Vergleich zu früh-depletierten BALB/c DEREK nicht erhöht.

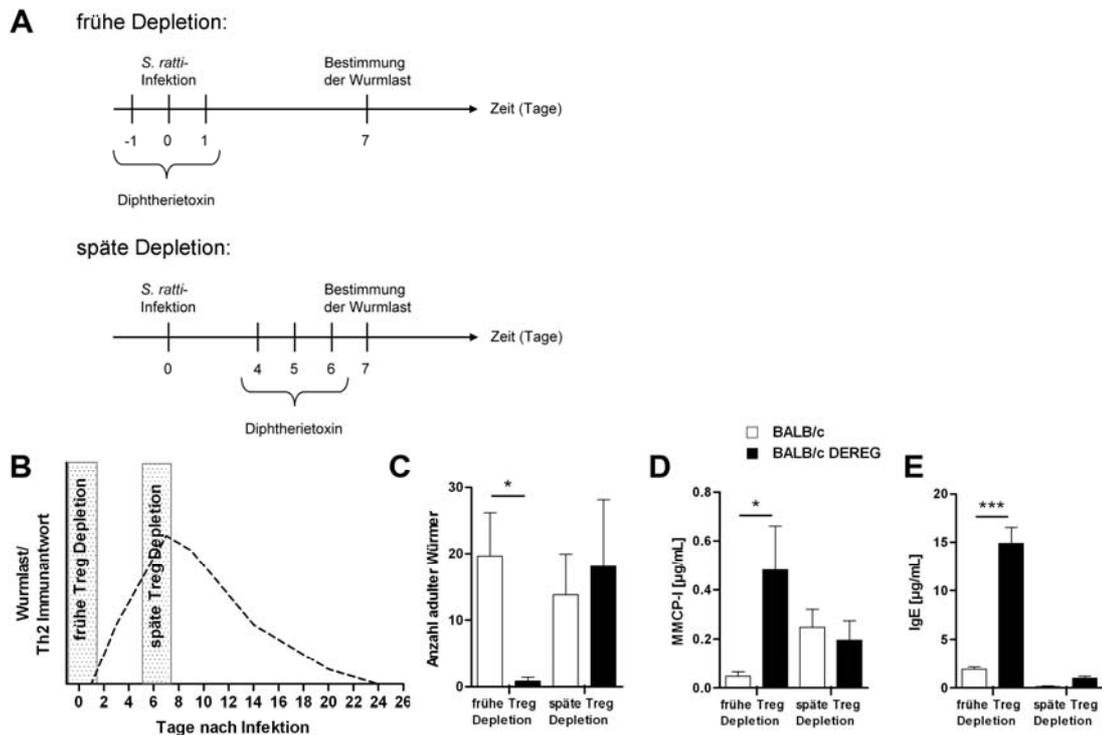


Abb. 3.18: Depletion der Treg zu einem späteren Zeitpunkt in der *S. rattii*-Infektion

(A) Gezeigt ist der Verlauf des Experiments. Für die „frühe Depletion“ wurden BALB/c Dereg und BALB/c von Tag -1 bis Tag 1 mit 0,5 µg DT i.p. behandelt und an Tag 0 mit 2000 *S. rattii*-iL3 infiziert. Die Gruppen für die „späte Depletion“ wurden ebenfalls an Tag 0 mit *S. rattii* infiziert, erhielten aber DT erst ab Tag 4 bis Tag 6 nach Infektion. An Tag 7 wurde die Wurmlast und die Konzentration an MMCP-I im Serum aller Mäuse bestimmt. In (B) ist die Abwesenheit der Treg schematisch während des Infektionsverlaufs dargestellt. Bei der „frühen Depletion“ fehlen die Treg in der *Priming*-Phase der Immunantwort, während sie bei der „späten Depletion“ erst in der Effektorphase der Immunantwort abwesend sind. (C) Gezeigt ist die Wurmlast im Darm der Mäuse an Tag 7 nach der Infektion (n = 5). In (D) ist die Konzentration an MMCP-I und in (E) die Konzentration von unspezifischem IgE im Serum der Mäuse an Tag 7 nach der Infektion abgebildet (n = 4). Gezeigt sind die repräsentativen Daten von zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Treg in der *S. rattii*-Infektion bereits regulatorische Funktionen während der Initiation der Immunantwort ausüben. Eine spätere Depletion in der Effektorphase hatte keinen schützenden Effekt mehr für die Tiere. Vielmehr scheint das Vorhandensein oder Fehlen der Treg zu Beginn der Immunantwort für den weiteren Verlauf der Infektion bestimmend zu sein. In Abwesenheit der Treg kommt es zu einer verstärkten Th2-Immunantwort und einer beschleunigten Mastzellaktivierung. Es ist wahrscheinlich, dass diese verbesserte zelluläre Immunantwort zusammen mit der Mastzellaktivierung zu einer effizienteren Abstoßung von *S. rattii* führt.

3.2.7 Vergleich der *S. ratti*-Infektion in Treg-depletierten BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass BALB/c Mäuse nach Treg-Depletion eine verstärkte Th2-Immunantwort ausbilden und es zu einer erhöhten Menge an IgE und MMCP-I im Serum der Tiere kommt. Es ist daher nahe liegend, dass in einem dieser Parameter der Unterschied zwischen Treg-depletierten BALB/c und C57BL/6 zu finden ist. Daher wurden zunächst die zelluläre Immunantwort, die IgE Konzentration und die Mastzellaktivierung in *S. ratti*-infizierten Treg-depletierten BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK direkt miteinander verglichen.

BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK und nicht-transgene Wurfgeschwister wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit DT behandelt und mit *S. ratti*-iL3 subkutan infiziert. An Tag 7 nach der Infektion wurden mesLK- und Milzzellen der Tiere isoliert und antigenspezifisch mit *S. ratti*-Lysat sowie polyklonal mit anti-CD3-AK stimuliert. Nach 72 h wurden die Überstände abgenommen und die Zytokinmenge bestimmt.

In Abb. 3.19 A ist die antigenspezifische Zytokinproduktion der Milzzellen von BALB/c (weiß), Treg-depletierten BALB/c DEREK (schwarz), C57BL/6 (hellgrau) und Treg-depletierten C57BL/6 DEREK (dunkelgrau) dargestellt. Als repräsentatives Zytokin für die Th2-Immunantwort wurde die Produktion von IL-13 bestimmt. Beide Mausstämme zeigten nach Treg-Depletion eine vermehrte Produktion von IL-13. Auch die Sekretion des proinflammatorischen Zytokins IFN- γ war in Abwesenheit der Treg gesteigert. Zusätzlich wurde ein weiteres Zytokin, IL-9, untersucht. Es ist bekannt, dass IL-9 an der Abwehr von Helminthen beteiligt ist (Behnke, JM *et al.* 1993; Faulkner, H *et al.* 1997; Faulkner, H *et al.* 1998). Dabei wirkt es auf Mastzellen und hilft diese zu rekrutieren und zu aktivieren (Eller, K *et al.* 2011; Lu, LF *et al.* 2006). Da in BALB/c Mäusen nach der Treg-Depletion bereits eine verstärkte Mastzellaktivierung über die Menge von MMCP-I im Serum nachgewiesen wurde, sollte überprüft werden, ob dieses Zytokin verstärkt gebildet wird.

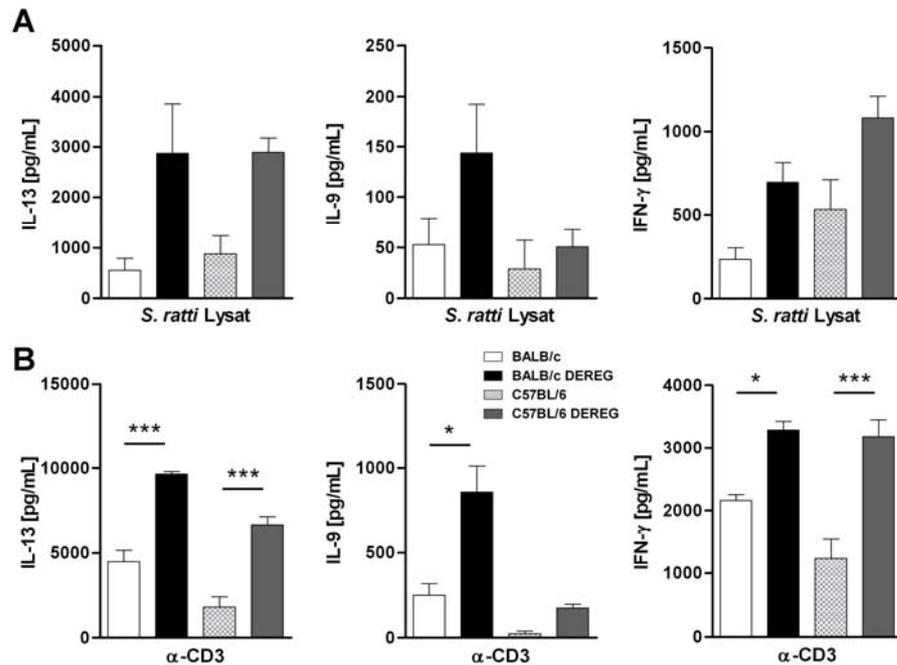


Abb. 3.19: Zytokinproduktion während der *S. ratti*-Infektion in Treg-depletierten BALB/c DERE und C57BL/6 DERE

BALB/c DERE, C57BL/6 DERE und deren nicht-transgene Wurfgeschwister wurden von Tag -1 bis Tag 1 mit 0,5 µg DT behandelt und an Tag 0 mit 2000 *S. ratti*-iL3 infiziert. An Tag 7 wurden die Milzzellen isoliert und mit *S. ratti*-Lysat (A) bzw. anti-CD3-AK (B) stimuliert. Nach 72 h wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration der Zytokine IL-13 (links), IL-9 (mitte) und IFN-γ (rechts) bestimmt. Dargestellt sind die repräsentativen Daten von zwei unabhängigen Experimenten (n = 4) als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne geben die Signifikanz der Resultate an (* p ≤ 0,05; *** p ≤ 0,001).

In der Tat kam es zu einer Induktion von IL-9 in Treg-depletierten BALB/c Mäusen, nicht aber in C57BL/6 Mäusen. Ähnliche Ergebnisse wurden auch nach der Stimulation mit anti-CD3-AK (Abb. 3.19 B) und nach der Stimulation von mesLK-Zellen mit anti-CD3-AK und *S. ratti*-Lysat beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Da bei der Untersuchung der Immunantwort der BALB/c Mäuse besonders der frühe Anstieg von IgE im Serum der Treg-depletierten Mäuse aufgefallen ist, sollte als nächstes die IgE Konzentration im Serum von BALB/c DERE und C57BL/6 DERE nach Treg-Depletion untersucht werden. Hierfür wurde DT behandelten BALB/c DERE, C57BL/6 DERE und nicht-transgenen Wurfgeschwistern im Verlauf der *S. ratti*-Infektion Blut abgenommen und die IgE Konzentration im Serum bestimmt. Interessanterweise wurde hierbei sowohl in Treg-depletierten BALB/c als auch in C57BL/6 ein früher Anstieg von IgE im Serum detektiert (Abb. 3.20).

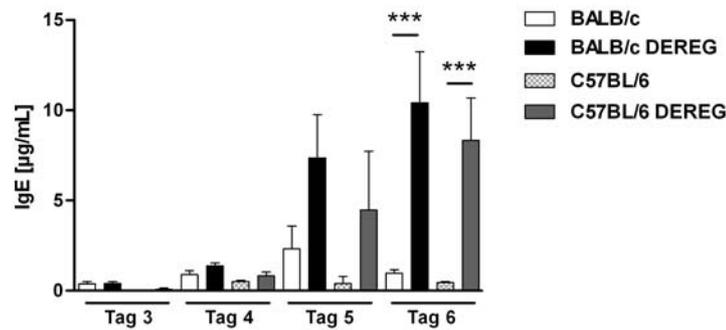


Abb. 3.20: IgE Konzentration im Serum von *S. ratti*-infizierten Treg-depletierten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg

BALB/c DEREg, C57BL/6 DEREg und nicht-transgene Wurfgeschwister wurden von Tag -1 bis Tag 1 mit 0,5 µg DT i.p. behandelt und an Tag 0 mit 2000 *S. ratti*-iL3 infiziert. An verschiedenen Tagen nach der Infektion wurde die IgE Konzentration im Serum der Tiere bestimmt (BALB/c = weiß, BALB/c DEREg = schwarz, C57BL/6 = hellgrau, C57BL/6 DEREg = dunkelgrau). Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (n = 6) als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (***) p ≤ 0,001).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die frühe IgE Sekretion von B-Zellen kein BALB/c spezifischer Mechanismus ist, sondern vielmehr ein Effekt, der nach der Treg-Depletion unabhängig vom Mausstamm auftritt. Es ist daher unwahrscheinlich, dass die Induktion von IgE für die beobachtete Reduktion der Wurmlast in Treg-depletierten BALB/c Mäusen verantwortlich ist.

Im nächsten Schritt sollte nun die Konzentration von MMCP-I im Serum der Tiere verglichen werden. Auch hier konnte während der Treg-Depletion in BALB/c Mäusen ein starker und beschleunigter Anstieg im Verlauf der *S. ratti*-Infektion beobachtet werden. Es wurden erneut Seren von Treg-depletierten *S. ratti*-infizierten BALB/c DEREg, C57BL/6 DEREg und nicht-depletierten Wurfgeschwistern gewonnen und die MMCP-I Konzentration bestimmt. Die Analyse der Seren zeigte, dass die erhöhte Freisetzung von MMCP-I selektiv in BALB/c Mäusen stattfand (Abb. 3.21). Die verstärkte Induktion konnte bereits an Tag 5 nach der Infektion nachgewiesen werden und war ab Tag 6 signifikant erhöht. Im Gegensatz dazu blieb die Serumkonzentration von MMCP-I in Treg-depletierten C57BL/6 Mäusen auf dem gleichen Level wie in den Kontroll-Gruppen.

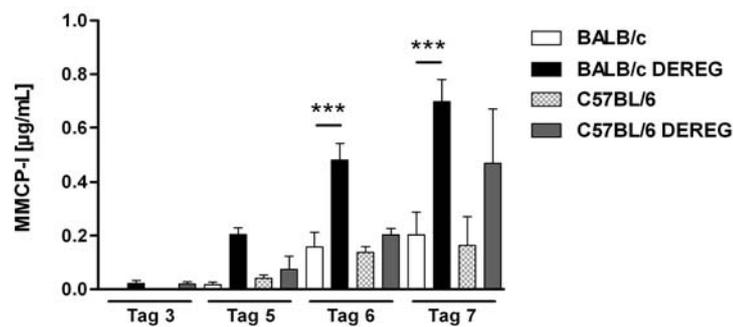


Abb. 3.21: MMCP-I Konzentration im Serum von *S. ratti*-infizierten Treg-depletierten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg

BALB/c DEREg, C57BL/6 DEREg und nicht-transgene Wurfgeschwister wurden von Tag -1 bis Tag 1 mit 0,5 µg DT behandelt und an Tag 0 mit 2000 *S. ratti*-iL3 infiziert. Dargestellt ist die Konzentration von MMCP-I im Serum von *S. ratti*-infizierten DT behandelten BALB/c (weiß), BALB/c DEREg (schwarz), C57BL/6 (hellgrau) und C57BL/6 DEREg (dunkelgrau) zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion. Dargestellt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten (n = 3 – 6) als Mittelwerte ± SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (***) p ≤ 0,001).

Abschließend betrachtet zeigen diese Daten, dass sich die Zytokinproduktion von Milzzellen aus Treg-depletierten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg während der *S. ratti*-Infektion nur in Bezug auf das Zytokin IL-9 unterscheidet. Zudem kommt es in Treg-depletierten BALB/c DEREg zu einer beschleunigten und verstärkten Produktion von MMCP-I, die in C57BL/6 DEREg nicht beobachtet wird.

Es ist bekannt, dass IL-9 an der Rekrutierung und Aktivierung von Mastzellen beteiligt ist (Eller, K *et al.* 2011; Lu, LF *et al.* 2006). Um zu überprüfen, ob es auch während der *S. ratti*-Infektion zu einer verstärkten Rekrutierung von Mastzellen kommt, sollte durch histologische Analyse der Därme von Treg-depletierten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg die Anzahl der Mastzellen bestimmt werden.

Hierfür wurden die Därme von *S. ratti*-infizierten, DT behandelten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg sowie deren Wurfgeschwistern an Tag 2 und an Tag 6 nach der Infektion präpariert und histologisch untersucht. Die Anfärbung der Mastzellen erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen den Oberflächenrezeptor c-Kit (rot). Dabei stellte sich heraus, dass es nach Treg-Depletion zu Beginn der Infektion zu einer erhöhten Anzahl an Mastzellen im Darm von BALB/c DEREg kommt (Abb. 3.22, schwarze Balken). Im Gegensatz dazu wurde in C57BL/6 Mäusen eine leichte

Reduktion der Anzahl an Mastzellen gefunden, unabhängig davon, ob zu Beginn der Infektion Treg vorhanden waren oder nicht (Abb. 3.22 hellgraue/dunkelgraue Balken). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mastzellen in BALB/c Mäusen vermehrt zur Infektionsstelle rekrutiert werden, und dass dieser Effekt in Abwesenheit von Treg verstärkt wird.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die verbesserte Wurmagwehr nach Treg-Depletion in BALB/c Mäusen auf die erhöhte Produktion von IL-9 und die verstärkte Mastzellaktivierung und -rekrutierung zurückzuführen ist.

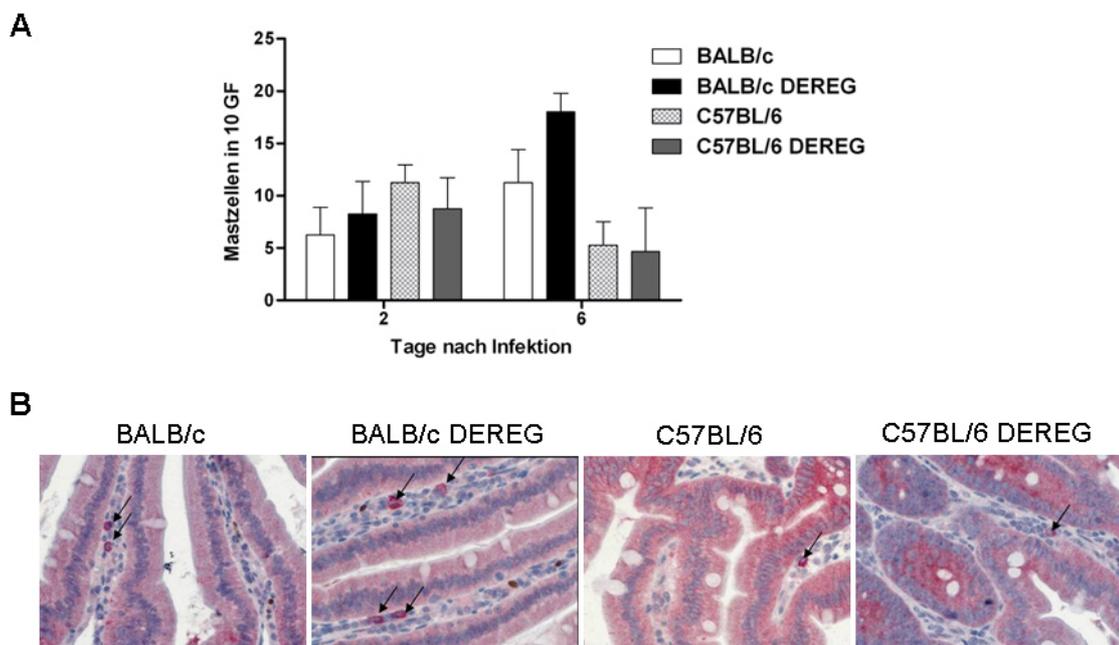


Abb. 3.22: Anzahl von Mastzellen im Darm von *S. ratti*-infizierten Treg-depletierten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg

BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg und deren nicht-transgene Wurfgeschwister wurden von Tag -1 bis Tag 1 mit 0,5 µg DT behandelt und an Tag 0 mit 2000 *S. ratti*-iL3 subkutan in die Hinterpfote infiziert. An Tag 2 und Tag 6 nach der Infektion wurden die Därme der Tiere präpariert und histologisch untersucht. (A) Gezeigt ist die Anzahl von Mastzellen im Darm von *S. ratti*-infizierten Treg-depletierten BALB/c DEREg und C57BL/6 DEREg. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n = 4). (B) zeigt Bilder der histologischen Auswertung an Tag 6 nach der Infektion. c-Kit (rot) wurde als Marker für Mastzellen verwendet.

3.3 Untersuchung der regulatorischen Kapazität von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen

Die bisher durchgeführten Experimente ergaben, dass die Depletion der Treg zu einer verstärkten zellulären Immunantwort, in Form einer gesteigerten Th2- und Th1-Zytokinproduktion, sowie zu einem frühen Anstieg von unspezifischem IgE im Serum von BALB/c und C57BL/6 Mäusen führt. Unterschiede in den Mausstämmen wurden bei der Produktion von IL-9 und MMCP-I ersichtlich, die beide in Treg-depletierten BALB/c, nicht aber C57BL/6 Mäusen, anstiegen. Eine verringerte Anzahl an Würmern im Darm wurde ebenfalls nur in Treg-depletierten BALB/c Mäusen beobachtet. Diese Resultate machen deutlich, dass Treg in den beiden Mausstämmen eine unterschiedliche Bedeutung haben. Deswegen wurde im letzten Abschnitt untersucht, ob dieser unterschiedliche Einfluss von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen auch unabhängig von einer vorliegenden *S. ratti*-Infektion nachweisbar ist.

Hierfür sollte die antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen in Abwesenheit von Treg in beiden Mausstämmen, ohne vorherige Wurminfektion, miteinander verglichen werden. Zu diesem Zweck wurden Ovalbumin (OVA)-spezifische TZR-transgene T-Zellen verwendet. T-Zellen von DO11.10 Mäusen (BALB/c Hintergrund) (Murphy, KM *et al.* 1990) und OT-II Mäusen (C57BL/6 Hintergrund) (Barnden, MJ *et al.* 1998) verfügen über einen transgenen TZR, der spezifisch das OVA₃₂₃₋₃₃₉-Peptid in Assoziation mit H-2^d (BALB/c) bzw. H-2^b (C57BL/6) erkennt. Durch Injektion dieses Peptides können die Zellen antigenspezifisch *in vivo* aktiviert werden.

Für die folgenden Experimente wurden DO11.10- bzw. OT-II-Zellen in Empfänger BALB/c DEREK bzw. C57BL/6 DEREK transferiert. Die Zellen wurden zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE markiert, welcher in den Zellen kovalent durch Reaktionen mit Aminogruppen an zytosolische und membranständige Proteine bindet. Da der Farbstoff mit jeder Zellteilung zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weiter gegeben wird, ist es möglich anhand der Fluoreszenzintensität die Anzahl der Zellteilungen zu bestimmen. Für das Experiment wurden die Mäuse zunächst mit DT behandelt, um Treg in BALB/c DEREK und C57BL/6 DEREK zu depletieren. In den gleichzeitig mit DT behandelten Wurfgeschwistern blieb die Treg-Frequenz konstant. Anschließend wurden die CFSE-markierten Zellen i.v. transferiert und nach 24 h durch i.p. Injektion von

OVA-Peptid stimuliert (Abb. 3.23 A). Nach 48 h wurde die Proliferation der DO11.10 bzw. OT-II T-Zellen in An- und Abwesenheit der Treg analysiert.

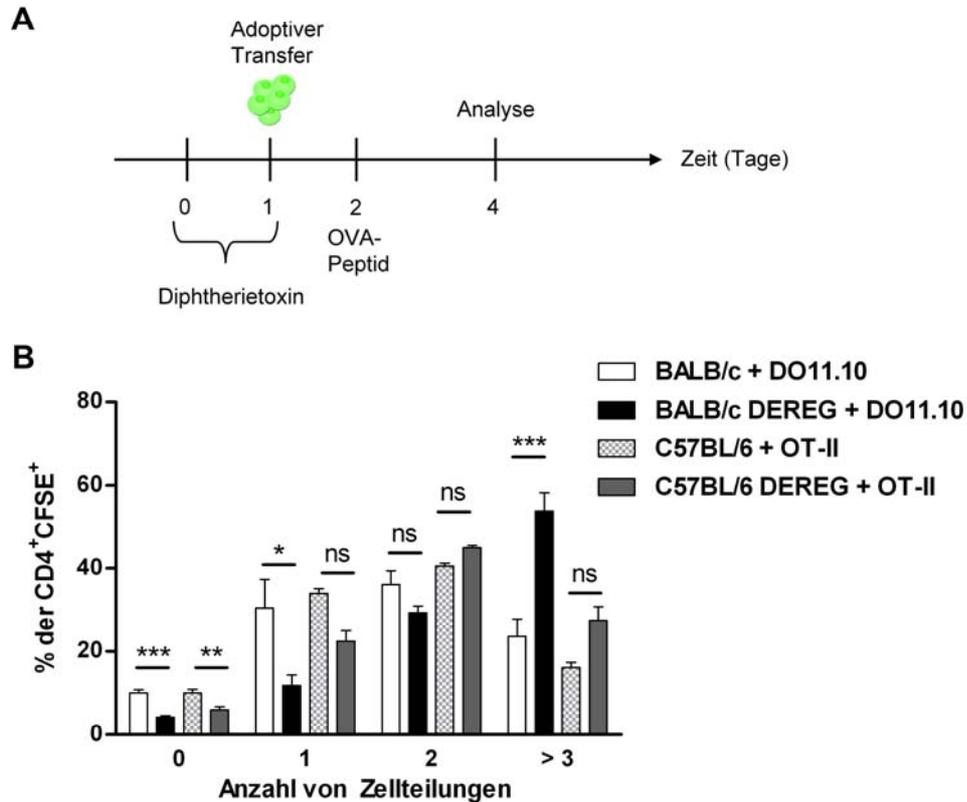


Abb. 3.23: Proliferation von DO11.10 und OT-II Zellen in Treg-depletierten BALB/c DEREK bzw. C57BL/6 DEREK

(A) Gezeigt ist der Versuchsaufbau. BALB/c DEREK, C57BL/6 DEREK und deren nicht-transgene Wurf-geschwister wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit 0,5 μ g DT i.p. behandelt. An Tag 1 wurden 1×10^7 CFSE-markierte DO11.10- bzw. OT-II-Zellen adoptiv in BALB/c DEREK bzw. C57BL/6 DEREK transferiert. Nach 24 h erhielten die Tiere OVA-Peptid zur Aktivierung der transferierten Zellen. Nach 48 h wurden die Zellen isoliert und ihre Proliferation analysiert. In (B) ist der prozentuale Anteil der CFSE-markierten T-Zellen bezogen auf die Anzahl der Zellteilungen dargestellt. Gezeigt sind die zusammengefassten Ergebnisse von zwei unabhängigen Experimenten als Mittelwerte \pm SEM. Die Sterne geben die statistische Signifikanz der Ergebnisse an (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

DO11.10 und OT-II T-Zellen in BALB/c bzw. C57BL/6 Mäusen proliferierten nach OVA-Stimulation etwa gleich stark (Abb. 3.23 B BALB/c = weiß und C57BL/6 = hellgrau). Die Mehrzahl der Zellen (ca. 40 %) hatte nach 48 h zwei Zellteilungen vollzogen, etwa 30 % der Zellen teilten sich nur einmal und ca. 20 % der Zellen teilten sich dreimal oder häufiger. Der Anteil der Zellen der keine Zellteilung vollzogen betrug in beiden Gruppen etwa 10 %.

Nach der Depletion der Treg verschob sich diese Verteilung. In beiden Mausstämmen proliferierten die Zellen in Abwesenheit der Treg stärker. Die Proliferation der DO11.10 T-Zellen (BALB/c DREG = schwarz) stieg im Vergleich zur Proliferation der OT-II T-Zellen (C57BL/6 DREG = dunkelgrau) stärker an. So hat die Mehrheit der DO11.10 T-Zellen (etwa 55 %) in Abwesenheit von Treg drei oder mehr Zellteilungen vollzogen. Der Anteil der OT-II T-Zellen, die sich dreimal oder häufiger teilten stieg in den Treg-depletierten C57BL/6 Mäusen nur geringfügig, auf etwa 30 %, an. Die Mehrheit der OT-II T-Zellen (45 %) vollzog immer noch zwei Zellteilungen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Treg in der BALB/c Maus im Vergleich zur C57BL/6 Maus tatsächlich eine dominierende Rolle bei der Regulation von Immunantworten haben.

4 Diskussion

Die Initiation von adaptiven Immunantworten wird üblicherweise von der Aktivierung eines entgegen regulierenden Netzwerkes begleitet. Dieses, aus regulatorischen Zellpopulationen, Rezeptoren und Zytokinen bestehende Netzwerk ist für die rechtzeitige Beendigung der Immunantwort verantwortlich und verhindert zudem die übermäßige Aktivierung des Immunsystems, und damit einhergehende Entstehung von Immunpathologien. Im Gegensatz dazu können diese Regelkreise aber auch mit der schützenden Immunantwort interferieren und so die effiziente Bekämpfung von Erregern behindern. Einige Pathogene führen zur Induktion dieser wirtseigenen Regelkreise, wodurch die gegen sie gerichtete Immunantwort gedämpft wird.

Ein zentrales Element des Immunsystems ist der negativ regulierende Rezeptor CTLA-4. CTLA-4 wird konstitutiv auf Treg und nach Aktivierung auch auf Teff exprimiert (Bour-Jordan, H *et al.* 2011). Zudem sind Treg maßgeblich an der Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz beteiligt und werden während Immunantworten induziert (Belkaid, Y and Rouse, BT 2005; Wing, K and Sakaguchi, S 2010).

4.1 Induktion von CTLA-4 und Treg während der *S. ratti*-Infektion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CTLA-4 und Treg auf den Verlauf einer *S. ratti*-Infektion beschrieben. Zunächst wurde gezeigt, dass sowohl die Expression von CTLA-4 auf T-Zellen, als auch die Anzahl von Treg während der *S. ratti*-Infektion in fast allen lymphatischen Organen anstieg.

Die Induktion von CTLA-4 fand hauptsächlich in Teff (CD4⁺Foxp3⁻) Zellen statt. Ähnliche Ergebnisse zeigen bereits Studien mit anderen gastrointestinalen Nematoden. Die *H. polygyrus*-Infektion von BALB/c Mäusen führt zur Induktion von CTLA-4 vorwiegend in der CD4⁺CD25⁻ T-Zell-Population (Finney, CA *et al.* 2007). Vergleichbare Ergebnisse werden in der Infektion mit *T. spiralis* in NIH Mäusen beobachtet (Furze, RC *et al.* 2006). Dies stimmt mit den Resultaten aus der vorliegenden Arbeit überein. Auch in der Infektion mit den Filarien *L. sigmodontis* und *B. malayi*, wurde die Induktion von CTLA-4 im Mausmodell beschrieben (McSorley,

HJ *et al.* 2008; Taylor, MD *et al.* 2007). Humane Studien belegen ebenfalls die vermehrte CTLA-4 Expression während Infektionen mit Filarien wie *W. bancrofti*, *L. loa* und *O. volvulus* (Steel, C and Nutman, TB 2003). Des Weiteren konnte auch während Infektionen mit Protozoen, wie *Plasmodium spec.* oder *Trypanosoma cruzi* sowohl im humanen als auch im murinen System eine Induktion von CTLA-4 beobachtet werden (Graefe, SE *et al.* 2004; Jacobs, T *et al.* 2002; Lepenies, B *et al.* 2007; Martins, GA *et al.* 2004).

Im Verlauf der *S. ratti*-Infektion kam es zu einer Expansion von Treg in den lymphatischen Organen der untersuchten Mäuse. Eine frühe Expansion fand bereits an Tag 2 nach der Infektion in den popLN und den ingLN statt. An Tag 7 war dann eine Expansion in den mesLK der Mäuse zu beobachten. Dieser Verlauf der Treg-Induktion korrelierte mit der Route der wandernden Larven durch das Gewebe bzw. der Anwesenheit des adulten Wurmes im Darm. Die Infektion erfolgte subkutan in die Hinterpfote der Tiere, so dass die wandernden Larven zunächst das von den popLN und den ingLN drainierte Gewebe passierten. Ab Tag 4 nach der Infektion befinden sich Würmer im Darm der Mäuse, die eine Immunantwort in den mesLK induzieren (Dawkins, HJ *et al.* 1981; Eschbach, ML *et al.* 2010). Auch im Dünndarm der Tiere kam es zu einer Induktion von Treg bereits ab Tag 2 nach der Infektion. Systemisch zeigte sich kein Anstieg der Anzahl an Treg in der Milz.

Während der *S. ratti*-Infektion kam es nicht nur zu einer Expansion von Treg, sondern auch zu einer gleichzeitigen Expansion der Teff. Diese führte dazu, dass sich die Frequenz der Treg in Bezug auf die CD4⁺ Zellen kaum veränderte. Nur an Tag 2 nach der Infektion wurde in C57BL/6 in den ingLK und den mesLK ein kurzer Anstieg der Treg-Frequenz beobachtet. In BALB/c Mäusen stieg die Frequenz der Treg, aufgrund einer Reduktion von Teff an Tag 2 und Tag 7 nach der Infektion, lediglich in der Milz an.

Diese simultane Expansion von Teff und Treg ist auch für andere Helmintheninfektionen, wie *H. polygyrus* (Rausch, S *et al.* 2008), *L. sigmodontis* (Taylor, MD *et al.* 2009) und *S. mansoni* (Taylor, JJ *et al.* 2006) beschrieben.

Der Einfluss von Treg beschränkt sich nicht nur auf Infektionen mit Helminthen. Eine Expansion wird auch in Infektionen mit *Plasmodium spec.* beobachtet (Scholzen, A *et*

al. 2010). Sie werden zudem während einer Reihe von Virus-Erkrankungen induziert (Zhou, Y 2008), wobei sie mit der Immunantwort der akuten Phase interferieren (Lund, JM *et al.* 2008; Zelinskyy, G *et al.* 2009) und an der Etablierung von chronischen Infektionen beteiligt sind (Cusick, MF *et al.* 2010; Zelinskyy, G *et al.* 2006).

4.2 Effekt der CTLA-4-Blockade und der Treg-Depletion

Nachdem die Induktion von CTLA-4 auf Teff und die Expansion der Treg während der *S. ratti*-Infektion beschrieben wurde, sollte die genaue Funktion von CTLA-4 und Treg im Infektionsverlauf untersucht werden. Hierfür wurde CTLA-4 während der Infektion blockiert und die Treg während der Infektion depletiert, um so ihren Einfluss auf die Immunantwort und die Wurmabwehr zu untersuchen. Interessanterweise zeigte die Abwesenheit beider Regulatoren ausschließlich einen Effekt auf die Wurmabwehr in BALB/c Mäusen. Dabei wurde jedoch ein unterschiedlich starker Einfluss von CTLA-4 und Treg festgestellt. Die Blockade von CTLA-4 führte nur zu einer geringen Reduktion der Adulten im Darm, wohingegen die Treg-Depletion zu einer deutlichen Reduktion der Adulten, von ca. 90%, führte.

Daher wird zunächst der Einfluss von CTLA-4 und Treg in BALB/c Mäusen besprochen. Anschließend wird der unterschiedliche Befund bei BALB/c und C57BL/6 Mäusen diskutiert.

4.2.1 Die Blockade von CTLA-4 während der *S. ratti*-Infektion in BALB/c Mäusen

Die Blockade von CTLA-4 in BALB/c Mäusen führte zu einer leichten Reduktion der Wurmlast. Gleichzeitig kam es zu einer verstärkten antigenspezifischen Produktion der Zytokine IL-5, IL-3, IL-13 und IL-10. Auch nach polyklonaler Stimulation wurde eine verstärkte Produktion von IL-5 und IL-13 sowie eine Suppression von IFN- γ beobachtet. Die Blockade von CTLA-4 hatte keinen Einfluss auf die Aktivierung der Mastzellen oder die Produktion von Antikörpern. Dies zeigt, dass die verringerte Wurmlast vermutlich auf die verstärkte zelluläre Th2-Immunantwort zurückzuführen ist. Die Blockade von CTLA-4 hat auch in anderen Helmintheninfektionen einen Einfluss auf die Immunantwort. Lymphozyten aus filarieninfizierten Patienten produzierten während der *in vitro* Stimulation und gleichzeitiger Blockade von CTLA-4

vermehrt Th2-Zytokine (Steel, C and Nutman, TB 2003). Die Blockade von CTLA-4 während Infektionen mit *L. sigmodontis* und *S. mansoni* führte zu erhöhten Antikörpertitern bzw. gesteigerter Produktion von Th2-Zytokinen, zeigte allerdings keinen Einfluss auf die Wurmlast (Taylor, MD *et al.* 2005; Walsh, CM *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu führte die Blockade von CTLA-4 in der *T. spiralis*-Infektion zu einer verringerten Anzahl an *T. spiralis*-Larven im Muskel (Furze, RC *et al.* 2006) und in der *N. brasiliensis*-Infektion zu einer geringeren Wurmlast im Darm (McCoy, K *et al.* 1997). In beiden Infektionen stand die verbesserte Abwehr der Würmer in Zusammenhang mit einer verbesserten Th2-Immunantwort. Die Ergebnisse dieser Studien passen zu dem in dieser Arbeit erhaltenen Befund, dass die CTLA-4-Blockade einen verstärkenden Einfluss auf die entstehende zelluläre Immunantwort haben kann, dies jedoch nicht zwingend zu einer Reduktion der Wurmlast führt.

CTLA-4 wird während der *S. ratti*-Infektion und anderer Helmintheninfektionen hauptsächlich auf Teff induziert (McSorley, HJ *et al.* 2008; Taylor, MD *et al.* 2007; Walsh, CM *et al.* 2007)). Dies könnte ein Grund für die selektive Auswirkung von anti-CTLA-4 auf die Th2-Immunantwort sein. Die Blockade würde dazu führen, dass die Teff nicht mehr negativ reguliert werden und somit verstärkt Zytokine produzieren.

Für CTLA-4 wurde außerdem eine Rolle bei der Induktion von Anergie in T-Zellen beschrieben (Schneider, H *et al.* 2008). Anergie T-Zellen reagieren überhaupt nicht mehr auf die Stimulation durch ihr Antigen und sind folglich inaktiv. Es ist also auch möglich, dass CTLA-4 während Infektionen Anergie in Th2-Zellen induziert und somit die Blockade von CTLA-4 zu einer erhöhten Anzahl an aktivierten Th2-Zellen führt.

In Übereinstimmung mit den Resultaten dieser Arbeit wurde gezeigt, dass CTLA-4 besonders die Induktion von Th2-Immunantworten negativ reguliert (Ubaldi, V *et al.* 2003) und es in Abwesenheit von CTLA-4 zu einer verstärkten Produktion von Th2-Zytokinen kommt (Oosterwegel, MA *et al.* 1999).

4.2.2 Die Depletion von Treg während der *S. ratti*-Infektion in BALB/c Mäusen

Die Depletion der Treg führte zu einer starken Reduktion der Würmer im Darm von BALB/c Mäusen und zu einem verringerten Ausstoß von Eiern und iL3 während der

gesamten Infektion. Die Anzahl an wandernden Larven in Kopf bzw. Lunge war in An- und Abwesenheit von Treg vergleichbar. Die wandernden Larven werden vor allem durch Komplement opsonisiert und von Granulozyten angegriffen (Galioto, AM *et al.* 2006; Kerepesi, LA *et al.* 2006). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der Würmer in Treg-depletierten Mäusen durch verstärkte Aktivierung dieser Effektoren des angeborenen Immunsystems erfolgte. Auch die Produktion der IgM und IgG-Antikörper, die an der Bekämpfung von wandernden Larven beteiligt sind (Brigandi, RA *et al.* 1996; Herbert, DR *et al.* 2002), war nicht gesteigert. Nach Depletion der Treg kam es zu einer verstärkten zellulären Immunantwort mit gesteigerter antigenspezifischer und polyklonaler Expression der Zytokine IL-5, IL-13, IL-3, IL-10, IFN- γ und IL-9. Außerdem wurde eine frühe Induktion von IgE beobachtet und die Aktivierung der Mastzellen war beschleunigt und verstärkt.

Mastzellen sind an der Abstoßung von *S. ratti* aus dem Darm der Mäuse maßgeblich beteiligt (Abe, T *et al.* 1993; Khan, AI *et al.* 1993; Nawa, Y *et al.* 1985). IL-3 ist zusammen mit dem Stammzell-stimulierenden Faktor an der Entwicklung und Aktivierung von Mastzellen beteiligt (Austen, KF and Boyce, JA 2001). IL-3 führt außerdem zur Induktion von Mastzellen während Helmintheninfektionen. Die IL-3-Defizienz bzw. die Injektion von anti-IL-3-AK verringert die Anzahl an Mastzellen im Darm (Madden, KB *et al.* 1991) und führt zu einer langsameren Abstoßung von *S. venezuelensis* (Lantz, CS *et al.* 1998). Die Aktivierung von Mastzellen kann im Serum der Mäuse anhand der MMCP-I Konzentration gemessen werden (Lantz, CS *et al.* 1998; Maruyama, H *et al.* 2000; Sasaki, Y *et al.* 2005). In der *S. ratti*-Infektion korreliert die MMCP-I Konzentration im Serum mit dem Infektionsverlauf und der Wurmlast (Eschbach, ML *et al.* 2010). Nach Treg-Depletion stieg die Konzentration von MMCP-I im Serum signifikant an. Normalisierte man die Menge an MMCP-I im Serum auf die Anzahl der Würmer im Darm, wurde eine 40-fach gesteigerte MMCP-I Konzentration pro Wurm gemessen.

Ein Zusammenhang zwischen Mastzellen und Treg wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen gezeigt. Treg können das Zytokin IL-9 sekretieren und dadurch Mastzellen rekrutieren und aktivieren (Eller, K *et al.* 2011; Lu, LF *et al.* 2006). IL-9 ist ein Zytokin, das während Th2-Immunantworten induziert wird (Gessner, A *et al.* 1993) und welches einen wichtigen Wachstums- und Differenzierungsfaktor für Mastzellen

darstellt (Goswami, R and Kaplan, MH 2011; Townsend, JM *et al.* 2000). In unserem Modell wurden die Treg depletiert und konnten daher nicht die Quelle des IL-9 sein. Die dennoch verstärkte Produktion von IL-9 in BALB/c Mäusen weist auf aktivierte Th-Zellen als Produzenten hin. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stieg die Anzahl von Mastzellen im Darm der Treg-depletierten BALB/c Mäuse an. Des Weiteren interagieren Mastzellen und Treg direkt miteinander über OX40-OX40L und supprimieren sich gegenseitig (Gri, G *et al.* 2008; Piconese, S *et al.* 2009).

Es ist daher wahrscheinlich, dass die verbesserte adaptive Immunantwort, insbesondere die verstärkte Produktion von IL-3 und IL-9, zusammen mit der Mastzellaktivierung für die effizientere Abstoßung der Würmer verantwortlich ist. Ob die beobachteten Effekte in unserem Modell auf eine direkte oder indirekte Interaktion von Treg und Mastzellen zurückzuführen sind, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die Induktion von IL-9 deutet jedoch auf eine indirekte Interaktion durch die verbesserte Th2-Immunantwort hin. Der protektive Effekt von IL-9 wurde bereits in Infektionsmodellen mit den Nematoden *T. muris* und *T. spiralis* beschrieben. IL-9-transgene Tiere zeigen eine verstärkte Mastzellaktivierung und -degranulation, sowie Resistenz gegenüber der *T. spiralis*-Infektion (Faulkner, H *et al.* 1997; Faulkner, H *et al.* 1998).

Treg, die während Helmintheninfektionen induziert werden sind nicht nur an der Suppression der Immunantwort gegen das entsprechende Pathogen beteiligt, sondern können auch Immunantworten gegen unbeteiligte Antigene unterdrücken. Die Depletion mit anti-CD25-AK oder der adoptive Transfer von Treg zeigt, dass Treg die OVA-spezifische Th2-Immunantwort im OVA-induzierten Asthma-Modell supprimieren (Dittrich, AM *et al.* 2008; Kitagaki, K *et al.* 2006; Pacifico, LG *et al.* 2009; Wilson, MS *et al.* 2005). Des Weiteren haben helmintheninduzierte Treg auch einen modulatorischen Einfluss auf Koinfektionen. So behindert *H. polygyrus* durch die Treg-Induktion die effektive Immunantwort gegen *P. yoelii* (Tetsutani, K *et al.* 2009). Ein weiterer Beleg für die Treg vermittelte Immunsuppression stammt aus einer humanen Studie mit dem human T-lymphotropen Virus 1 (HTLV-1) und *S. stercoralis* koinfizierten Patienten. Die erhöhte Frequenz von Treg ist hier für die gesteigerte Wurmlast und die Suppression des *Strongyloides*-spezifischen IL-5 verantwortlich (Montes, M *et al.* 2009).

Treg sind an einer Reihe von regulatorischen Prozessen des Immunsystems beteiligt. Sie supprimieren die zelluläre Immunantwort, kontrollieren aber auch direkt Zellpopulationen wie z.B. Mastzellen. Für diese regulatorischen Funktionen verfügen sie über eine Reihe verschiedener Mechanismen, wie die Induktion von Apoptose, die Injektion von cAMP und die Produktion von Zytokinen wie IL-10 und TGF- β (Vignali, DA *et al.* 2008) und den negativen Regulator CTLA-4. Dies erklärt, warum die Blockade von CTLA-4 nur eine geringe Reduktion der Wurmlast im Vergleich zur Treg-Depletion zur Folge hat. CTLA-4 stellt lediglich einen Mechanismus von vielen dar und seine Abwesenheit kann durch die anderen Mechanismen kompensiert werden. Im Gegensatz dazu führt das Fehlen der gesamten Treg-Population zum Verlust einer Reihe von regulatorischen Elementen.

4.2.3 Die Kinetik der Treg-Depletion

Die Behandlung der DEREK Mäuse mit DT vor der Infektion führte zur Abwesenheit der Treg in einem kurzen Zeitfenster zu Beginn der Infektion. Dennoch kam es zu einem verbesserten Schutz der BALB/c Mäuse im gesamten Infektionsverlauf und sogar während der Reinfektion. Die Abwesenheit von Treg stört in diesem Modell also nicht die Entstehung der Gedächtnisantwort. Im Gegensatz dazu führt die Abwesenheit von Treg während der *L. major*-Infektion zwar zu einer verbesserten Abwehr der Parasiten in der Erstinfektion, hat jedoch aufgrund der vollständigen Eliminierung der Parasiten einen Verlust der Gedächtnisantwort zur Folge (Belkaid, Y *et al.* 2002).

Die Depletion der Treg führte zu einer verringerten Wurmlast an Tag 7 nach der Infektion, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Treg bereits wieder repopulierten. Daher sollte die Depletion zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt werden, um den Einfluss der Treg auf die Effektorphase einer bereits etablierten Immunantwort zu untersuchen. Die Depletion der Treg zu Beginn der Infektion führte zu gesteigerter Mastzellaktivierung und erhöhten Konzentrationen an IgE im Serum. Die spätere Depletion in der Effektorphase der Immunantwort, hatte jedoch keinen Einfluss auf den Infektionsverlauf, die Mastzellaktivierung und die IgE Konzentration. Dies spricht für eine zentrale Rolle der Treg vermittelten Regulation vor allem während der Initiation der adaptiven Immunantwort. Damit übereinstimmend führt die Depletion der Treg mit einem anti-CD25-AK vor der *L. sigmodontis*-Infektion zu einer geringeren Wurmlast an

Tag 60 nach der Infektion, ohne allerdings eine Auswirkung auf die Etablierung der Infektion zu haben (Taylor, MD *et al.* 2009). Eine spätere Depletion von Treg durch anti-CD25-AK hatte keine Auswirkungen auf den Verlauf der Infektion. Lediglich die kombinierte Gabe von anti-CD25-AK mit anti-CTLA-4 oder anti-GITR führte zur Reduktion der Wurmlast (Taylor, MD *et al.* 2007; Taylor, MD *et al.* 2005).

Die Rolle von Treg während der *Priming*-Phase von Th2-Immunantworten wird auch in Modellen der allergischen Inflammation deutlich. So sind Treg maßgeblich an der Induktion von oraler Toleranz beteiligt, da in ihrer Abwesenheit keine Toleranz induziert wurde und es zu einer verstärkten Produktion von Th2-Zytokinen kam (van Wijk, F *et al.* 2007). Eine Studie im Modell der OVA-induzierten allergischen Atemwegs-Inflammation in C57BL/6 DREG Mäusen zeigte, übereinstimmend mit den Ergebnissen dieser Arbeit, dass die Abwesenheit von Treg während der Initiation der adaptiven Immunantwort zu einer deutlichen Verschlimmerung der allergischen Inflammation in der Lunge der Mäuse führte (Baru, AM *et al.* 2010).

4.2.4 Immunpathologie

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die während der *S. ratti*-Infektion expandierten Treg mit der induzierten Immunantwort interferieren. Die Depletion der Treg führt zu einer verbesserten Immunantwort nach welcher die Abstoßung von *S. ratti* stark beschleunigt wird. Da Treg auch an der Vermeidung von Immunpathologien beteiligt sind, stellte sich die Frage, ob das Fehlen der Treg und die damit verstärkte Immunantwort zu einer erhöhten Pathologie im Darm der Mäuse führt.

Die histologische Untersuchung der Därme von *S. ratti*-infizierten BALB/c Mäusen zeigte jedoch keine erhöhte Immunpathologie. Sowohl die Treg-depletierten, als auch die nicht-depletierten Mäuse zeigten eine moderate, fokale Entzündung im Darm, deren Grad sich zwischen den Gruppen nicht unterschied. Im Infektionsmodell von *S. ratti* scheinen Treg also ausschließlich mit der protektiven Immunantwort zu interferieren und nicht für die Vermeidung von Immunpathologie nötig zu sein.

Der Einfluss von Treg auf die Unterbindung von Immunpathologie wurde in anderen Systemen gezeigt. Untersuchungen der *H. polygyrus*-Infektion im Modell der C57BL/6 DREG Maus zeigen, dass die Depletion der Treg zu verstärkter Immunpathologie führt, die simultan induzierte verstärkte Immunantwort jedoch keine verbesserte

Wurmabwehr zur Folge hat (Rausch, S *et al.* 2009). Infektionen mit dem Trematoden *S. mansoni* zeigen eine verstärkte Leberpathologie in Abwesenheit von Treg (Layland, LE *et al.* 2007; Taylor, JJ *et al.* 2006), und das schwere Krankheitsbild der Hypersplenomegalie in *S. mansoni*-infizierten Mäusen wird auf das geringere Verhältnis von Treg zu Teff zurückgeführt (Watanabe, K *et al.* 2009). Des Weiteren verstärkt die Treg-Depletion während der Infektion mit dem gastrointestinalen Nematoden *Trichuris muris* die Pathologie im Darm ohne die Wurmlast zu verringern (D'Elia, R *et al.* 2009).

Bei den hier beschriebenen Infektionen handelt es sich um lang andauernde Infektionen. Das bedeutet, dass Antigene über einen längeren Zeitraum persistieren und somit die Aktivierung der Immunantwort länger anhält. Zusätzlich führte die Depletion der Treg nicht zu einer Reduktion der Parasitenlast in den lang anhaltenden Infektionsmodellen. Das heißt durch die Depletion der Treg fiel ein negativer Regulator weg, während die Antigenmenge gleich blieb und zu einer anhaltenden Aktivierung des Immunsystems führte. Die *S. ratti*-Infektion dagegen ist eine transiente Infektion. Die Depletion der Treg hatte eine deutliche Reduktion der Wurmlast zur Folge, was zur Reduktion der Antigenmenge führte. Dies könnte erklären, wieso es ohne Treg nicht zu einer verstärkten Immunpathologie kam. Die Depletion der Treg zeigt, dass auch die transiente *S. ratti*-Infektion ohne die Induktion von regulatorischen Mechanismen keine patente Infektion im Wirt etablieren kann. In Abwesenheit von Treg kommt es zu einer stark verringerten Wurmlast, von 0-5 Würmern an Tag 7 nach der Infektion. Dies zeigte, dass teilweise keine patente Infektion mehr etabliert wurde. Daher ist es denkbar, dass *S. ratti* aktiv zur Expansion der Treg beiträgt, um seinen Lebenszyklus zu vollenden und sein Überleben zu sichern.

Diese Immunevasion durch Induktion von regulatorischen Elementen durch exkretorisch-sekretorische (ES)-Produkte von Helminthen ist bereits in anderen Systemen beschrieben. So induzieren ES-Produkte von *H. polygyrus* Treg, die sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* suppressive Aktivität zeigen (Grainger, JR *et al.* 2010). Ein Inhibitor von Metalloproteasen aus dem Hakenwurm *Ancylostoma caninum* (Ac-TMP-1) induziert auf DCs die Expression von CD86 und die Sekretion von IL-10. Diese durch Ac-TMP-1 modulierten DCs führen zur Entstehung von IL-10-produzierenden CD4⁺ und CD8⁺Treg, die suppressive Eigenschaften haben (Cuellar, C

et al. 2009). Neben der hier beschriebenen Expansion von Treg haben die verschiedenen sekretierten ES-Produkte von Helminthen zudem eine Reihe von inhibitorischen Wirkungen auf Mediatoren des Immunsystems (Hewitson, JP *et al.* 2009).

4.3 Unterschiede zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen

Die Blockade von CTLA-4 bzw. Depletion von Treg führte nur in BALB/c Mäusen zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *S. ratti*. In C57BL/6 Mäusen hingegen wurde ein solcher Einfluss nicht beobachtet. Im Folgenden sollen mögliche Ursachen für diesen Unterschied diskutiert werden.

4.3.1 Der Einfluss von CTLA-4 in BALB/c und C57BL/6 Mäusen

CTLA-4 wurde in beiden Mausstämmen während der *S. ratti*-Infektion auf Teff induziert. Die Blockade von CTLA-4 hatte jedoch nur eine Auswirkung auf die BALB/c Maus, in welcher eine leichte Reduktion der Wurmlast sowie eine starke Induktion der Zytokine IL-5, IL-13, IL-3 und IL-10 beobachtet wurde. Interessanterweise zeigt eine Studie mit dem Nematoden *N. brasiliensis* in C57BL/6 Mäusen einen verstärkenden Effekt der CTLA-4-Blockade auf die Th2-Immunantwort und eine Reduktion der Wurmlast (McCoy, K *et al.* 1997). Lymphozyten aus *S. ratti*-infizierten C57BL/6 Mäusen zeigten keine verstärkte Zytokinproduktion nach CTLA-4-Blockade, sondern produzierten im Gegenteil sogar weniger des mastzellaktivierenden Zytokins IL-3. Möglicherweise sind wurmspeziespezifische Unterschiede für die divergierenden Resultate in *N. brasiliensis*- und *S. ratti*-infizierten C57BL/6 Mäusen verantwortlich. *N. brasiliensis* wird als der Prototyp einer Th2-induzierenden Wurminfektion beschrieben (Lawrence, RA *et al.* 1996) und über die Induktion von CTLA-4 während der *N. brasiliensis*-Infektion liegen keine Daten vor. Es ist daher denkbar, dass CTLA-4 während der *N. brasiliensis*-Infektion eine stärkere regulatorische Funktion übernimmt als in der *S. ratti*-Infektion.

Übereinstimmend mit den Resultaten dieser Arbeit zeigt die Blockade von CTLA-4 im Modell der OVA-induzierten allergischen Atemwegsentzündung lediglich einen Effekt in BALB/c Mäusen, und führt zu erhöhter Eosinophilie, IgE- und Zytokinproduktion (Hellings, PW *et al.* 2002).

CTLA-4 hat eine besondere regulatorische Funktion bei der Limitierung von Th2-Immunantworten und dessen Blockade kann diese Antworten verstärken (Bour-Jordan, H *et al.* 2003; Nasta, F *et al.* 2006; Oosterwegel, MA *et al.* 1999; Ubaldi, V *et al.* 2003). Es ist daher möglich, dass die Blockade von CTLA-4 mausstammspezifische Unterschiede zeigt und während der *S. ratti*-Infektion einen stärkeren Effekt auf die BALB/c Mäuse ausübt, welche genetisch bedingt eine stärkere Th2-Immunantwort ausbilden (Heinzel, FP *et al.* 1989; Yagi, J *et al.* 2006).

4.3.2 Der Einfluss von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen

Die Depletion von Treg führte nur in BALB/c Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an Würmern im Darm, jedoch nicht in C57BL/6 Mäusen. Die Kinetik der Induktion und die Effizienz der Depletion von Treg waren in beiden Mausstämmen vergleichbar. In beiden Mausstämmen kam es nach Treg-Depletion während der *S. ratti*-Infektion zur verstärkten Produktion der Zytokine IL-13 und IFN- γ nach Stimulation mit *S. ratti*-Antigen und anti-CD3-AK. Auch die Produktion von polyklonalem IgE war vergleichbar. Unterschiede zeigten sich in der Produktion des mastzellrekrutierenden Zytokins IL-9 und der Mastzellaktivierung bzw. Induktion im Darm. Lymphozyten aus C57BL/6 Mäusen produzierten nach Treg-Depletion nur geringe Mengen an IL-9, welches in Treg-depletierten BALB/c Mäusen stark erhöht war. Des Weiteren war in Treg-depletierten BALB/c Mäusen eine stärkere Aktivierung von Mastzellen zu beobachten, ebenfalls ein Effekt, der in C57BL/6 Mäusen nicht beobachtet werden konnte.

Der geringe Einfluss der Treg-Depletion in C57BL/6 Mäusen spricht dafür, dass Treg hier nicht so stark an der Immunregulation beteiligt sind wie in BALB/c Mäusen.

In beiden Mauslinien wurde eine gesteigerte Konzentration an polyklonalem IgE nach Treg-Depletion im Serum gemessen (Abb. 3.20). Hierbei schien es sich um eine unspezifische Folge von mangelnder Regulation zu handeln, die auch in anderen Modellen beobachtet wurde. Nach oraler Immunisierung mit β -Laktoglobulin in Abwesenheit von Treg kommt es ebenfalls zu erhöhten IgE Konzentrationen im Serum von Mäusen (Kanjrawi, R *et al.* 2011). Eine weitere Studie zeigt den unspezifischen Anstieg von IgE nach Immunisierung mit Erdnussextrakt. In diesem Modell werden die Treg während des erneuten Antigenkontaktes depletiert und sogar die Kontrollgruppe

ohne vorherigen Antigenkontakt bildete nach Treg-Depletion verstärkt IgE (van Wijk, F *et al.* 2007). Übereinstimmend mit dem frühen Anstieg an polyklonalem IgE im *S. rattii*-Modell sprechen diese Daten für eine frühe, unspezifische Aktivierung von B-Zellen welche vermutlich durch Treg kontrolliert wird. Weitere Studien belegen, dass Treg in Keimzentren einwandern können, und dort in direktem Zellkontakt den Klassenwechsel und die Antikörpersekretion von B-Zellen inhibieren (Lim, HW *et al.* 2004) (Lim, HW *et al.* 2005). Jüngste Untersuchungen zeigen, dass die Inaktivierung von Treg, durch Blockade von GITR, in einer Modellimmunisierung, zu einer verstärkten Keimzentrumsreaktion, mit erhöhten Antikörpertitern führt (Alexander, CM *et al.* 2011). Eine Regulation der B-Zellen durch Treg ist daher auch im Modell der *S. rattii*-Infektion denkbar und könnte für die erhöhte Konzentration an unspezifischem IgE im Serum beider Mausstämme, verantwortlich sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass die in BALB/c Mäusen beobachtete verstärkte Produktion von IL-9 und die damit einhergehende Mastzellaktivierung für die Reduktion der Wurmlast nach Treg-Depletion verantwortlich sind. Treg scheinen daher in BALB/c, nicht aber in C57BL/6 Mäusen, maßgeblich an der Regulation dieser Effektormechanismen beteiligt zu sein.

In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wurde bereits gezeigt, dass es in BALB/c und C57BL/6 Mäusen zu einer unterschiedlichen Suppression durch Treg kommt. Allerdings schienen bei diesen *in vitro* Experimenten Teff aus C57BL/6 Mäusen resistenter gegenüber der Regulation durch Treg zu sein und Teff aus BALB/c Mäusen stärker durch Treg supprimiert zu werden (Chen, X *et al.* 2005). Zudem wurde bei diesen Untersuchungen eine höhere Frequenz und Anzahl von Treg in BALB/c Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen gezeigt, was in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet wurde.

In der vorliegenden Arbeit führte die Depletion von Treg in beiden Mausstämmen zu einer gesteigerten Proliferation von TZRtg T-Zellen. Diese Steigerung in Abwesenheit von Treg war in BALB/c Mäusen ausgeprägter als in C57BL/6 Mäusen. Ob dies auf eine stärkere regulatorische Funktion der Treg, oder eine verbesserte Suppression der Teff durch Treg zurückzuführen war, wurde in diesem Versuchsaufbau nicht geklärt.

Interessanterweise gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass es zwischen BALB/c und C57BL/6 Mäusen unterschiedliche Ausprägungen in der Relevanz und der Funktion von Treg auch in anderen Infektionsmodellen gibt. In der *L. sigmodontis*-Infektion werden höhere Anzahlen an Treg in infizierten BALB/c Mäusen gefunden, als in C57BL/6 Mäusen. Zudem kam es in den BALB/c Mäusen trotz gleicher Treg-Frequenz zu einer geringeren Proliferation der Teff (Taylor, MD *et al.* 2009). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die stärkere regulatorische Kapazität von Treg in BALB/c Mäusen und könnte die unterschiedliche Suszeptibilität der beiden Mausstämme gegenüber *L. sigmodontis* erklären. In BALB/c Mäusen kommt es zu einer patenten Infektion mit der Produktion von Mikrofilarien, wohingegen in resistenten C57BL/6 Mäusen keine patente Infektion stattfindet und die Würmer zwischen Tag 50 und Tag 60 in der Pleurahöhle abgetötet werden (Marechal, P *et al.* 1996).

Während der Infektion mit *Plasmodium berghei* ANKA wurden geringere Anzahlen und Frequenzen an Treg in C57BL/6 Mäusen im Vergleich zu BALB/c Mäusen gefunden (Wu, JJ *et al.* 2010). In dieser Infektion sind die BALB/c Mäuse resistent gegenüber der pathologischen Form der Malaria, der zerebralen Malaria, wohingegen die C57BL/6 Mäuse suszeptibel sind. Die künstliche Erhöhung der Treg-Frequenz durch IL-2-AK-Komplexe führte in den C57BL/6 Mäusen zur Resistenz gegenüber der zerebralen Malaria (Haque, A *et al.* 2010).

Weitere Hinweise für einen unterschiedlich starken Einfluss von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen liefert eine Studie mit *Mycobacterium tuberculosis*. In BALB/c Mäusen war die Anzahl an Treg im Vergleich zu C57BL/6 Mäusen erhöht und die Infektion wurde schlechter bekämpft. C57BL/6 Mäuse wiesen hingegen ein größeres Verhältnis von Teff zu Treg auf und zeigten eine geringere immunsuppressive Kapazität der Treg als BALB/c Mäuse. Adoptiver Transfer von BALB/c Treg in BALB/c Mäuse unterdrückte die Immunantwort und erhöhte dadurch die Bakterienlast wohingegen die Depletion der Treg die Immunantwort verstärkte und zur Verringerung der Bakterienlast führte (Paula, MO *et al.* 2011).

Der unterschiedliche Einfluss von Treg auf verschiedene Infektionen in BALB/c und C57BL/6 könnte darauf hindeuten, dass der Einfluss der Treg durch den genetischen Hintergrund der Tiere bestimmt wird. Bei den hier verwendeten Mausstämmen handelt

es sich um Inzuchtlinien, die sich genetisch unterscheiden. Es wurde bereits gezeigt, dass die beiden Mauslinien unterschiedlich auf verschiedene Infektionen reagieren. So wurde in der Infektion mit *Leishmania major* erstmals entdeckt, dass die suszeptiblen BALB/c Mäuse mit der Produktion von IL-4, einem Th2-Zytokin reagieren, wohingegen die resistenten C57BL/6 Mäuse eine IFN- γ dominierte Th1-Immunantwort generieren (Heinzel, FP *et al.* 1989).

Die während Infektionen beobachtete Tendenz von BALB/c Mäusen zur Ausbildung einer Th2-Immunantwort wird durch die verstärkte IL-2 und IL-4-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 5* (STAT5) bedingt (Yagi, J *et al.* 2006).

Diese Studien zeigen, dass die Genetik eines Organismus eine wichtige Rolle für die Abwehr von Pathogenen spielen kann. Daher ist es denkbar, dass Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen generell unterschiedliche regulatorische Funktionen haben und dass die im Modell der *S. ratti*-Infektion beobachtete Regulation von Mastzellen in C57BL/6 Mäusen von einer anderen Zellpopulation übernommen wird.

Ein Kandidat für diese Aufgabe könnten die $\gamma\delta$ -T-Zellen sein. Es wurde gezeigt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen in C57BL/6 Mäusen während inflammatorischer Darmerkrankungen (IBD) (Kuhl, AA *et al.* 2007) oder TNBS-induzierter Kolitis (Hoffmann, JC *et al.* 2008) regulatorische Funktionen ausüben. Außerdem scheinen sie auch an der Verhinderung von Lebensmittelallergien beteiligt zu sein (Bol-Schoenmakers, M *et al.* 2011).

Ein weiterer Kandidat für die Übernahme von zentralen regulatorischen Funktionen in C57BL/6 Mäusen ist IL-10. Dieses Zytokin wird nicht nur von Treg sekretiert, sondern kann auch von Th-Zellen oder anderen Zellpopulationen wie APZ gebildet werden. In der Infektion mit *T. spiralis* wurde kürzlich gezeigt, dass IL-10 von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen an der Kontrolle der Immunpathologie beteiligt ist (Beiting, DP *et al.* 2007). Im selben Modell wurden *in vitro* IL-10-produzierende M Φ und DCs identifiziert, die an der Induktion einer regulatorischen Umgebung *in vivo* beteiligt sein könnten (D'Elia, R and Else, KJ 2009). IL-10 verhindert außerdem die Bekämpfung von Microfilarien in der *B. malayi*-Infektion in C57BL/6 Mäusen (Simons, JE *et al.* 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine divergente Funktion von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen. Dabei haben die Treg aus BALB/c Mäusen stärkere suppressive Funktionen und ihre Depletion während der *S. ratti*-Infektion führt zur Verstärkung der

Immunantwort, mit verringerter Wurmlast. Die Charakterisierung und Identifizierung eines negativen Regulators mit ähnlich starker Funktion in C57BL/6 Mäusen würde die Hypothese der differentiellen Regulation in BALB/c und C57BL/6 unterstützen und wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Blockade von CTLA-4 und die Depletion von Treg während einer *S. ratti*-Infektion eine Reduktion der Wurmlast in BALB/c Mäusen zur Folge hat. Durch die Blockade von CTLA-4 kam es zu einer verstärkten zellulären antigenspezifischen Th2-Immunantwort, die vermutlich für die Reduktion der Wurmlast in BALB/c Mäusen verantwortlich war. Sehr viel ausgeprägter war der Effekt nach Treg-Depletion. Hier zeigte sich eine starke Reduktion der Würmer im Darm, sowie eine beschleunigte und verstärkte Aktivierung und Rekrutierung von Mastzellen. Dies ging einher mit einer vermehrten Produktion der mastzellaktivierenden und -rekrutierenden Zytokine IL-3 und IL-9.

Dieses Ergebnis ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass die Treg während der *S. ratti*-Infektion über die Regulation der IL-9 Produktion an der Kontrolle von Mastzellen in BALB/c Mäusen beteiligt sind. Um diese Hypothese zu bestätigen könnte das, nach Treg-Depletion in der *S. ratti*-Infektion gesteigerte IL-9 durch einen anti-IL-9-AK neutralisiert werden. Dies sollte die Reduktion der Wurmlast aufheben, sofern IL-9 für die gesteigerte Mastzellaktivität verantwortlich ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Blockade von CTLA-4 und die Depletion von Treg in C57BL/6 Mäusen keinen Einfluss auf die Wurmlast hatten.

Es wäre besonders interessant diese Unterschiede zwischen BALB/c und C57BL/6 in anderen Infektionsmodellen zu untersuchen. Es wurde gezeigt, dass die Treg-Depletion in BALB/c Mäusen vor der Infektion mit *L. sigmodontis* eine Reduktion der Wurmlast an Tag 60 nach der Infektion zur Folge hatte (Taylor, MD *et al.* 2009). In dieser Studie wurde allerdings die Treg-Depletion in C57BL/6 Mäusen nicht untersucht. Zudem wurde für die Depletion ein anti-CD25-AK verwendet. Dieser Antikörper depletiert alle CD25⁺ Zellen (Treg und aktivierte T_H1) und hat keinen Einfluss auf CD4⁺Foxp3⁺CD25⁻ Treg. Aufgrund der Möglichkeit spezifisch alle Foxp3⁺ Zellen zu depletieren ist die

DEREG Maus für die Untersuchung der Treg-Funktion während Infektionen besser geeignet. Zurzeit wird in unserer Arbeitsgruppe die *L. sigmodontis*-Infektion in BALB/c DEREG und C57BL/6 DEREG in An- und Abwesenheit von Treg verglichen. Hierbei sollen die Ergebnisse der Treg-Depletion mittels anti-CD25-AK in BALB/c Mäusen reproduziert und ein simultaner Vergleich der beiden Mausstämmen durchgeführt werden.

Ein unterschiedlicher Einfluss der Treg-Depletion in BALB/c und C57BL/6 Mäusen auf den Verlauf der *L. sigmodontis*-Infektion, würde die Hypothese der divergenten Rolle von Treg in beiden Mausstämmen unterstützen.

Weiterführende Untersuchungen in anderen Infektionsmodellen wären daher interessant, um zu prüfen, ob der unterschiedliche Einfluss von Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen auch in Infektionen mit Protozoen, Viren oder Bakterien vorhanden ist.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass TZRtg T-Zellen in Abwesenheit der Treg in BALB/c Mäusen stärker proliferieren als in C57BL/6 Mäusen. Dies demonstriert einen unterschiedlichen Einfluss von Treg auch abseits der *S. ratti*-Infektion und wirft die Frage auf, ob Treg in BALB/c und C57BL/6 Mäusen unterschiedliche regulatorische Kapazität besitzen. Um dies näher zu analysieren sollten Treg von BALB/c und C57BL/6 Mäusen *in vitro* und *ex vivo* vergleichend auf die Synthese der Zytokine IL-10, TGF- β und IL-35 und die Expression des Aktivierungsmarkers CD103 (Huehn, J and Hamann, A 2005) und des regulatorischen Rezeptors CTLA-4 untersucht werden. Hierdurch könnte im gleichen experimentellen System ein Einblick in die Mechanismen der Treg-Funktion beider Mausstämmen erlangt werden.

Treg in C57BL/6 Mäusen scheinen einen geringeren Einfluss auf die Regulation von IL-9 und Mastzellen zu haben als Treg in BALB/c Mäusen. Es ist daher möglich, dass in der C57BL/6 Maus andere Elemente des Immunsystems diese Regulation übernehmen.

Ein potenzieller Kandidat hierfür ist das Zytokin IL-10. Auch wenn vergleichende Studien in BALB/c und C57BL/6 Mäusen fehlen, konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass IL-10-defiziente C57BL/6 Mäuse resistenter gegenüber einer

S. ratti-Infektion sind. Zudem wurde in *L. sigmodontis*-infizierten C57BL/6 Mäusen sowohl die verringerte Proliferation von TZRtg T-Zellen als auch die Resistenz gegenüber der durch *P. berghei* ANKA induzierten zerebralen Malaria zum Teil durch IL-10 vermittelt (Hartmann, W *et al.* 2011; Specht, S *et al.* 2010). Um zu klären, ob IL 10 während der *S. ratti*-Infektion einen unterschiedlichen Einfluss in den Mausstämmen hat, sind vergleichende Studien in IL-10-defizienten BALB/c und C57BL/6 Mäusen nötig. Zudem wäre die Identifizierung der IL-10 produzierenden Zellpopulation interessant. Mögliche Produzenten sind AAMΦ, Breg, Th2- oder Tr1-Zellen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es während der *S. ratti*-Infektion zu einer Induktion von Treg kommt. Es ist jedoch unklar wie genau *S. ratti* Treg induziert. Für die Nematoden *H. polygyrus* oder *A. caninum* wurden bereits ES-Produkte identifiziert, die zur Induktion von Treg führen (Cuellar, C *et al.* 2009; Grainger, JR *et al.* 2010). In unserer Arbeitsgruppe werden aktuell Studien mit rekombinant hergestellten ES-Produkten durchgeführt, um Moleküle zu identifizieren, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation von Treg inhibieren oder zur Induktion von Treg führen.

Weitere Untersuchungen der regulatorischen Elemente des Immunsystems sind nötig, um deren Aufgaben und Funktionen besser zu verstehen. Treg spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von chronischen Infektionen und der Immunmodulation. Ihren Einfluss auf die einzelnen Zellpopulationen des Immunsystems zu kennen, kann helfen die Entstehung chronischer Erkrankungen zu vermeiden. Die gezielte Unterbindung von einzelnen regulatorischen Elementen könnte zudem helfen Effektoren des Immunsystems zu reaktivieren und so chronische Infektionen zu bekämpfen.

5 Zusammenfassung

Etwa ein Drittel der Weltbevölkerung ist mit pathogenen Würmern infiziert. Diese multizellulären Parasiten können zum Teil über Jahre in ihrem Wirt persistieren, ohne durch das Immunsystem eliminiert zu werden. Um dies zu erreichen dämpfen sie die Immunantwort und verhindern so ihre Abstoßung, aber auch die Entstehung von Immunpathologie und damit die Schädigung ihres Wirtes. Würmer bewirken diese Immunsuppression indem sie diverse regulatorische Mechanismen des Wirtsimmunsystems aktivieren, die normalerweise einer Überaktivierung der Immunantwort entgegen wirken. Zwei zentrale Elemente dieses negativ-regulatorischen Netzwerkes sind der Rezeptor *cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4* (CTLA-4) und eine Subpopulation der T-Zellen, die regulatorischen T-Zellen (Treg). Mäuse mit einer genetisch bedingten Defizienz für CTLA-4 oder Treg entwickeln schwere Autoimmunerkrankungen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CTLA-4 und Treg auf den Verlauf der murinen *S. ratti*-Infektion vergleichend in BALB/c und C57BL/6 Mäusen untersucht. Während die Blockade von CTLA-4 oder die Depletion der Treg die Expulsion von parasitären *S. ratti*-Adulten in BALB/c Mäusen verbesserte, spielten diese regulatorischen Elemente keine dominante Rolle bei der *S. ratti*-Infektion von C57BL/6 Mäusen.

CTLA-4 wurde während der *S. ratti*-Infektion von BALB/c und C57BL/6 Mäusen hauptsächlich auf Effektor-T-Zellen (Teff) induziert. Die Blockade des Rezeptors führte spezifisch in BALB/c Mäusen zu einer verstärkten antigenspezifischen Th2-Immunantwort und einer leichten Reduktion der Wurmlast. Insbesondere die Produktion von IL-3, eines Aktivierungsfaktors für Mastzellen, wurde durch die CTLA-4-Blockade in BALB/c Mäusen gesteigert und in C57BL/6 Mäusen vermindert.

Die Kinetik der Induktion und die Effizienz der Depletion von Treg waren in C57BL/6 und BALB/c Mäusen vergleichbar. Die transiente Depletion von Treg zu Beginn der *S. ratti*-Infektion führte jedoch nur in BALB/c Mäusen zu einer deutlichen Reduktion der Wurmlast im Darm. Die verbesserte Wurmabwehr in Treg-depletierten BALB/c Mäusen war nicht das Resultat einer verbesserten Immunantwort gegen die wandernden Larven oder einer verbesserten antigenspezifischen humoralen Immunantwort. Die Treg-Depletion führte in beiden Mausstämmen zu einer verstärkten antigenspezifischen

und polyklonalen Produktion der Zytokine IL-13 und IFN- γ . Spezifisch in BALB/c, nicht aber in C57BL/6 Mäusen wurde in Abwesenheit der Treg eine gesteigerte Produktion des mastzellaktivierenden und -rekrutierenden Zytokins IL-9 sowie eine beschleunigte und verstärkte Mastzellaktivierung gemessen.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die während der *S. ratti*-Infektion in BALB/c Mäusen expandierenden Treg mit der Induktion einer effektiven Immunantwort interferieren, indem sie die Sekretion von IL-9 limitieren und die Aktivierung der Mastzellen behindern. Die Depletion der Treg führte daher zur Steigerung der IL-9 Produktion, aktivierte die Mastzellen und reduzierte die Wurmlast im Darm. Dabei hatte die verbesserte Immunantwort in BALB/c Mäusen keine verstärkte Pathologie im Darm zur Folge und interferierte nicht mit der Etablierung einer schützenden Immungedächtnisantwort.

Die Befunde dieser Arbeit zeigen deutlich, dass Treg und CTLA-4 vermittelte Regulation von Immunantworten im Modell der *S. ratti*-Infektion in BALB/c und C57BL/6 Mäusen unterschiedlich wichtig sind. Auch die Kontrolle der Proliferation von T-Zell-Rezeptor transgenen T-Zellen *in vivo* wurde in BALB/c Mäusen stärker durch Treg vermittelt als in C57BL/6 Mäusen. Damit wurde jenseits von Wurminfektionssystemen eine unterschiedlich dominante Rolle von Treg bei der Regulation von T-Zell-Antworten in BALB/c und C57BL/6 Mäusen demonstriert. Es ist sehr wahrscheinlich, dass an der Immunregulation in C57BL/6 Mäusen andere regulatorische Elemente stärker beteiligt sind, deren Identifizierung Gegenstand zukünftiger Forschung sein wird.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas, AK (2007). **Cellular and Molecular Immunology**.
- Abbas, AK, *et al.* (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." **Nature** 383(6603): 787-93.
- Abe, T, *et al.* (1993). "Intestinal protection against *Strongyloides ratti* and mastocytosis induced by administration of interleukin-3 in mice." **Immunology** 80(1): 116-21.
- Abraham, D, *et al.* (1995). "*Strongyloides stercoralis*: protective immunity to third-stage larvae in BALB/cByJ mice." **Exp Parasitol** 80(2): 297-307.
- Alegre, ML, *et al.* (2001). "T-cell regulation by CD28 and CTLA-4." **Nat Rev Immunol** 1(3): 220-8.
- Alegre, ML, *et al.* (1996). "Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells." **J Immunol** 157(11): 4762-70.
- Alexander, CM, *et al.* (2011). "T regulatory cells participate in the control of germinal centre reactions." **Immunology** 133(4): 452-68.
- Amu, S, *et al.* (2010). "Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model." **J Allergy Clin Immunol** 125(5): 1114-1124 e8.
- Anthony, RM, *et al.* (2007). "Protective immune mechanisms in helminth infection." **Nat Rev Immunol** 7(12): 975-87.
- Anthony, RM, *et al.* (2006). "Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites." **Nat Med** 12(8): 955-60.
- Austen, KF, *et al.* (2001). "Mast cell lineage development and phenotypic regulation." **Leuk Res** 25(7): 511-8.
- Ayukawa, H, *et al.* (2004). "Expression of CTLA-4 (CD152) in peripheral blood T cells of children with influenza virus infection including encephalopathy in comparison with respiratory syncytial virus infection." **Clin Exp Immunol** 137(1): 151-5.
- Babu, S, *et al.* (2006). "Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence." **J Immunol** 176(5): 3248-56.
- Balzano, C, *et al.* (1992). "CTLA-4 and CD28: similar proteins, neighbouring genes." **Int J Cancer Suppl** 7: 28-32.
- Bancroft, AJ, *et al.* (1998). "A critical role for IL-13 in resistance to intestinal nematode infection." **J Immunol** 160(7): 3453-61.
- Barnden, MJ, *et al.* (1998). "Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements." **Immunol Cell Biol** 76(1): 34-40.
- Baroja, ML, *et al.* (2002). "Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A." **J Immunol** 168(10): 5070-8.
- Baru, AM, *et al.* (2010). "Selective depletion of Foxp3+ Treg during sensitization phase aggravates experimental allergic airway inflammation." **Eur J Immunol** 40(8): 2259-66.
- Behnke, JM, *et al.* (1993). "Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*): downregulation of specific cytokine secretion (IL-9 and IL-10) correlates with poor mastocytosis and chronic survival of adult worms." **Parasite Immunol** 15(7): 415-21.
- Beiting, DP, *et al.* (2007). "Coordinated control of immunity to muscle stage *Trichinella spiralis* by IL-10, regulatory T cells, and TGF-beta." **J Immunol** 178(2): 1039-47.
- Belkaid, Y, *et al.* (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity." **Nature** 420(6915): 502-7.
- Belkaid, Y, *et al.* (2005). "Natural regulatory T cells in infectious disease." **Nat Immunol** 6(4): 353-60.
- Bleay, C, *et al.* (2007). "Density-dependent immune responses against the gastrointestinal nematode *Strongyloides ratti*." **Int J Parasitol** 37(13): 1501-9.
- Bol-Schoenmakers, M, *et al.* (2011). "Regulation by intestinal gammadelta T cells during establishment of food allergic sensitization in mice." **Allergy** 66(3): 331-40.
- Bopp, T, *et al.* (2007). "Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression." **J Exp Med** 204(6): 1303-10.

- Bour-Jordan, H, et al.** (2011). "Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/ B7 family." **Immunol Rev** 241(1): 180-205.
- Bour-Jordan, H, et al.** (2003). "CTLA-4 regulates the requirement for cytokine-induced signals in T(H)2 lineage commitment." **Nat Immunol** 4(2): 182-8.
- Brigandi, RA, et al.** (1997). "Chronicity in *Strongyloides stercoralis* infections: dichotomy of the protective immune response to infective and autoinfective larvae in a mouse model." **Am J Trop Med Hyg** 56(6): 640-6.
- Brigandi, RA, et al.** (1996). "*Strongyloides stercoralis*: role of antibody and complement in immunity to the third stage of larvae in BALB/cByJ mice." **Exp Parasitol** 82(3): 279-89.
- Brunkow, ME, et al.** (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." **Nat Genet** 27(1): 68-73.
- Cao, X, et al.** (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." **Immunity** 27(4): 635-46.
- Caudy, AA, et al.** (2007). "CD25 deficiency causes an immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked-like syndrome, and defective IL-10 expression from CD4 lymphocytes." **J Allergy Clin Immunol** 119(2): 482-7.
- Chen, X, et al.** (2005). "BALB/c mice have more CD4+CD25+ T regulatory cells and show greater susceptibility to suppression of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice." **J Leukoc Biol** 78(1): 114-21.
- Chuang, E, et al.** (1999). "Regulation of cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 by Src kinases." **J Immunol** 162(3): 1270-7.
- Coffman, RL, et al.** (1986). "B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells." **J Immunol** 136(12): 4538-41.
- Collison, LW, et al.** (2010). "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population." **Nat Immunol** 11(12): 1093-101.
- Collison, LW, et al.** (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." **Nature** 450(7169): 566-9.
- Cuellar, C, et al.** (2009). "The hookworm tissue inhibitor of metalloproteases (Ac-TMP-1) modifies dendritic cell function and induces generation of CD4 and CD8 suppressor T cells." **PLoS Negl Trop Dis** 3(5): e439.
- Cusick, MF, et al.** (2010). "Hepatitis C virus induces regulatory T cells by naturally occurring viral variants to suppress T cell responses." **Clin Dev Immunol** 2011: 806061.
- Dawkins, HJ, et al.** (1982). "Humoral and cell-mediated immune responses in murine strongyloidiasis." **Aust J Exp Biol Med Sci** 60(6): 717-29.
- Dawkins, HJ, et al.** (1981). "Kinetics of primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice." **Int J Parasitol** 11(1): 89-96.
- Dawkins, HJ, et al.** (1981). "Transfer by serum and cells of resistance to infection with *Strongyloides ratti* in mice." **Immunology** 43(2): 317-22.
- Dawkins, HJ, et al.** (1982). "Attempts to establish infections with *Strongyloides stercoralis* in mice and other laboratory animals." **J Helminthol** 56(1): 23-6.
- Dawkins, HJ, et al.** (1980). "*Strongyloides ratti*: susceptibility to infection and resistance to reinfection in inbred strains of mice as assessed by excretion of larvae." **Int J Parasitol** 10(2): 125-9.
- Dawkins, HJ, et al.** (1981). "Histopathological appearances in primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice." **Int J Parasitol** 11(1): 97-103.
- de la Rosa, M, et al.** (2004). "Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function." **Eur J Immunol** 34(9): 2480-8.
- de Messias, IJ, et al.** (1994). "Adherence of monocytes and polymorphonuclear cells to infective larvae of *Strongyloides stercoralis* after complement activation." **J Parasitol** 80(2): 267-74.
- Deaglio, S, et al.** (2007). "Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression." **J Exp Med** 204(6): 1257-65.
- D'Elia, R, et al.** (2009). "Regulatory T cells: a role in the control of helminth-driven intestinal pathology and worm survival." **J Immunol** 182(4): 2340-8.
- D'Elia, R, et al.** (2009). "In vitro antigen presenting cell-derived IL-10 and IL-6 correlate with *Trichuris muris* isolate-specific survival." **Parasite Immunol** 31(3): 123-31.
- Dittrich, AM, et al.** (2008). "Helminth infection with *Litomosoides sigmodontis* induces regulatory T cells and inhibits allergic sensitization, airway inflammation, and hyperreactivity in a murine asthma model." **J Immunol** 180(3): 1792-9.

- Eller, K, *et al.* (2011). "IL-9 production by regulatory T cells recruits mast cells that are essential for regulatory T cell-induced immune suppression." **J Immunol** 186(1): 83-91.
- El-Malky, M, *et al.* (2003). "Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice." **Parasitol Int** 52(1): 71-9.
- Eschbach, ML, *et al.* (2010). "Strongyloides ratti infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN-gamma production in mice." **Parasite Immunol** 32(5): 370-83.
- Faulkner, H, *et al.* (1997). "Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection." **Eur J Immunol** 27(10): 2536-40.
- Faulkner, H, *et al.* (1998). "Interleukin-9 enhances resistance to the intestinal nematode *Trichuris muris*." **Infect Immun** 66(8): 3832-40.
- Fernandes, A, *et al.* (2008). "Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice." **Parasite Immunol** 30(3): 139-49.
- Finney, CA, *et al.* (2007). "Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection." **Eur J Immunol** 37(7): 1874-86.
- Fontenot, JD, *et al.* (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead transcription factor Foxp3." **Nat Immunol** 6(4): 331-7.
- Freeman, GJ, *et al.* (1993). "Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production." **J Exp Med** 178(6): 2185-92.
- Freeman, GJ, *et al.* (1993). "Cloning of B7-2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates human T cell proliferation." **Science** 262(5135): 909-11.
- Friedline, RH, *et al.* (2009). "CD4+ regulatory T cells require CTLA-4 for the maintenance of systemic tolerance." **J Exp Med** 206(2): 421-34.
- Fukao, T, *et al.* (2002). "Selective loss of gastrointestinal mast cells and impaired immunity in PI3K-deficient mice." **Nat Immunol** 3(3): 295-304.
- Furze, RC, *et al.* (2006). "Differential roles of the co-stimulatory molecules GITR and CTLA-4 in the immune response to *Trichinella spiralis*." **Microbes Infect** 8(12-13): 2803-10.
- Galioto, AM, *et al.* (2006). "Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval strongyloides stercoralis in mice." **Infect Immun** 74(10): 5730-8.
- Gause, WC, *et al.* (2003). "The immune response to parasitic helminths: insights from murine models." **Trends Immunol** 24(5): 269-77.
- Gessner, A, *et al.* (1993). "Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice." **Immunobiology** 189(5): 419-35.
- Gomez-Escobar, N, *et al.* (2000). "Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*." **Infect Immun** 68(11): 6402-10.
- Gordon, S, *et al.* (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." **Immunity** 32(5): 593-604.
- Goswami, R, *et al.* (2011). "A brief history of IL-9." **J Immunol** 186(6): 3283-8.
- Graefe, SE, *et al.* (2004). "CTLA-4 regulates the murine immune response to *Trypanosoma cruzi* infection." **Parasite Immunol** 26(1): 19-28.
- Grainger, JR, *et al.* (2010). "Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF-beta pathway." **J Exp Med** 207(11): 2331-41.
- Greenwald, RJ, *et al.* (2001). "CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo." **Immunity** 14(2): 145-55.
- Greenwald, RJ, *et al.* (2005). "The B7 family revisited." **Annu Rev Immunol** 23: 515-48.
- Gri, G, *et al.* (2008). "CD4+CD25+ regulatory T cells suppress mast cell degranulation and allergic responses through OX40-OX40L interaction." **Immunity** 29(5): 771-81.
- Grohmann, U, *et al.* (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." **Nat Immunol** 3(11): 1097-101.
- Grossman, WJ, *et al.* (2004). "Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells." **Blood** 104(9): 2840-8.
- Haque, A, *et al.* (2010). "CD4+ natural regulatory T cells prevent experimental cerebral malaria via CTLA-4 when expanded in vivo." **PLoS Pathog** 6(12): e1001221.
- Harper, K, *et al.* (1991). "CTLA-4 and CD28 activated lymphocyte molecules are closely related in both mouse and human as to sequence, message expression, gene structure, and chromosomal location." **J Immunol** 147(3): 1037-44.

- Hartmann, W, *et al.* (2011). "Strongyloides ratti infection modulates B and T cell responses to third party antigens." **Exp Parasitol**.
- Hartmann, W, *et al.* (2011). "Pathogenic Nematodes Suppress Humoral Responses to Third-Party Antigens In Vivo by IL-10-Mediated Interference with Th Cell Function." **J Immunol**.
- Harvey, SC, *et al.* (2001). "Sex determination in the parasitic nematode Strongyloides ratti." **Genetics** 158(4): 1527-33.
- Hedrich, CM, *et al.* (2010). "Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease." **Immunol Res** 47(1-3): 185-206.
- Heinzel, FP, *et al.* (1989). "Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets." **J Exp Med** 169(1): 59-72.
- Hellings, PW, *et al.* (2002). "Blockade of CTLA-4 enhances allergic sensitization and eosinophilic airway inflammation in genetically predisposed mice." **Eur J Immunol** 32(2): 585-94.
- Helmby, H (2009). "Helminths and our immune system: friend or foe?" **Parasitol Int** 58(2): 121-7.
- Herbert, DR, *et al.* (2000). "Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval Strongyloides stercoralis in mice." **J Immunol** 165(8): 4544-51.
- Herbert, DR, *et al.* (2002). "The role of B cells in immunity against larval Strongyloides stercoralis in mice." **Parasite Immunol** 24(2): 95-101.
- Hesse, M, *et al.* (2001). "Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism." **J Immunol** 167(11): 6533-44.
- Hesse, M, *et al.* (2004). "The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells." **J Immunol** 172(5): 3157-66.
- Hewitson, JP, *et al.* (2009). "Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity." **Mol Biochem Parasitol** 167(1): 1-11.
- Hoffmann, JC, *et al.* (2008). "Gammadelta T lymphocytes: a new type of regulatory T cells suppressing murine 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS)-induced colitis." **Int J Colorectal Dis** 23(10): 909-20.
- Holzappel, BaW, L (2007). "Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete." **Biologie in unserer Zeit** 37(2): 120-126.
- Hori, S, *et al.* (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." **Science** 299(5609): 1057-61.
- Huehn, J, *et al.* (2005). "Homing to suppress: address codes for Treg migration." **Trends Immunol** 26(12): 632-6.
- Hussaarts, L, *et al.* (2011). "Regulatory B-cell induction by helminths: Implications for allergic disease." **J Allergy Clin Immunol**.
- Jacobs, T, *et al.* (2002). "Murine malaria is exacerbated by CTLA-4 blockade." **J Immunol** 169(5): 2323-9.
- Jager, A, *et al.* (2010). "Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation." **Scand J Immunol** 72(3): 173-84.
- Jenkins, SJ, *et al.* (2010). "Similarity and diversity in macrophage activation by nematodes, trematodes, and cestodes." **J Biomed Biotechnol** 2010: 262609.
- Joetham, A, *et al.* (2007). "Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta." **J Immunol** 178(3): 1433-42.
- Johnson, KW, *et al.* (1988). "cAMP antagonizes interleukin 2-promoted T-cell cycle progression at a discrete point in early G1." **Proc Natl Acad Sci U S A** 85(16): 6072-6.
- June, CH, *et al.* (1990). "Role of the CD28 receptor in T-cell activation." **Immunol Today** 11(6): 211-6.
- Kanjarawi, R, *et al.* (2011). "Regulatory T Cells Control Type I Food Allergy to Beta-Lactoglobulin in Mice." **Int Arch Allergy Immunol** 156(4): 387-396.
- Kaufmann, DE, *et al.* (2007). "Upregulation of CTLA-4 by HIV-specific CD4+ T cells correlates with disease progression and defines a reversible immune dysfunction." **Nat Immunol** 8(11): 1246-54.
- Kawakami, T, *et al.* (2002). "Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE." **Nat Rev Immunol** 2(10): 773-86.
- Kerepesi, LA, *et al.* (2006). "Complement component C3 is required for protective innate and adaptive immunity to larval strongyloides stercoralis in mice." **J Immunol** 176(7): 4315-22.
- Khan, AI, *et al.* (1993). "Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against Strongyloides venezuelensis." **Int J Parasitol** 23(5): 551-5.

- Khattari, R, et al.** (1999). "Lymphoproliferative disorder in CTLA-4 knockout mice is characterized by CD28-regulated activation of Th2 responses." **J Immunol** 162(10): 5784-91.
- Kim, J, et al.** (2009). "Cutting edge: depletion of Foxp3+ cells leads to induction of autoimmunity by specific ablation of regulatory T cells in genetically targeted mice." **J Immunol** 183(12): 7631-4.
- Kitagaki, K, et al.** (2006). "Intestinal helminths protect in a murine model of asthma." **J Immunol** 177(3): 1628-35.
- Korenaga, M, et al.** (1991). "The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice." **Immunology** 72(4): 502-7.
- Kuhl, AA, et al.** (2007). "Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models." **J Leukoc Biol** 81(1): 168-75.
- Lahl, K, et al.** (2007). "Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease." **J Exp Med** 204(1): 57-63.
- Lantz, CS, et al.** (1998). "Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites." **Nature** 392(6671): 90-3.
- Lantz, CS, et al.** (1997). "IgE regulates mouse basophil Fc epsilon RI expression in vivo." **J Immunol** 158(6): 2517-21.
- Lawrence, RA, et al.** (1996). "*Nippostrongylus brasiliensis*: cytokine responses and nematode expulsion in normal and IL-4-deficient mice." **Exp Parasitol** 84(1): 65-73.
- Layland, LE, et al.** (2007). "Immunopathology in schistosomiasis is controlled by antigen-specific regulatory T cells primed in the presence of TLR2." **Eur J Immunol** 37(8): 2174-84.
- Lee, KM, et al.** (1998). "Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4." **Science** 282(5397): 2263-6.
- Lepenius, B, et al.** (2007). "CTLA-4 blockade differentially influences the outcome of non-lethal and lethal *Plasmodium yoelii* infections." **Microbes Infect** 9(6): 687-94.
- Lesslauer, W, et al.** (1986). "T90/44 (9.3 antigen). A cell surface molecule with a function in human T cell activation." **Eur J Immunol** 16(10): 1289-96.
- Leung, HT, et al.** (1995). "Cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4, a high-avidity receptor for CD80 and CD86, contains an intracellular localization motif in its cytoplasmic tail." **J Biol Chem** 270(42): 25107-14.
- Li, MO, et al.** (2007). "T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation." **Immunity** 26(5): 579-91.
- Ligas, JA, et al.** (2003). "Specificity and mechanism of immunoglobulin M (IgM)- and IgG-dependent protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice." **Infect Immun** 71(12): 6835-43.
- Lim, HW, et al.** (2005). "Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells." **J Immunol** 175(7): 4180-3.
- Lim, HW, et al.** (2004). "Regulatory T cells can migrate to follicles upon T cell activation and suppress GC-Th cells and GC-Th cell-driven B cell responses." **J Clin Invest** 114(11): 1640-9.
- Linsley, PS, et al.** (1996). "Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement." **Immunity** 4(6): 535-43.
- Linsley, PS, et al.** (1991). "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation." **J Exp Med** 173(3): 721-30.
- Linsley, PS, et al.** (1990). "T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1." **Proc Natl Acad Sci U S A** 87(13): 5031-5.
- Linsley, PS, et al.** (1994). "Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors." **Immunity** 1(9): 793-801.
- Lu, LF, et al.** (2006). "Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance." **Nature** 442(7106): 997-1002.
- Lund, JM, et al.** (2008). "Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells." **Science** 320(5880): 1220-4.
- MacDonald, AS, et al.** (2003). "Cytokine-dependent inflammatory cell recruitment patterns in the peritoneal cavity of mice exposed to the parasitic nematode *Brugia malayi*." **Med Microbiol Immunol** 192(1): 33-40.
- Machado, ER, et al.** (2007). "Comparison of immune responses in mice infected with different strains of *Strongyloides venezuelensis*." **Parasite Immunol** 29(11): 549-57.
- Madden, KB, et al.** (1991). "Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis." **J Immunol** 147(4): 1387-91.
- Maizels, RM, et al.** (2004). "Helminth parasites--masters of regulation." **Immunol Rev** 201: 89-116.

- Malek, TR, *et al.* (2004). "Tolerance, not immunity, crucially depends on IL-2." **Nat Rev Immunol** 4(9): 665-74.
- Marechal, P, *et al.* (1996). "The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice." **Parasite** 3(1): 25-31.
- Martins, GA, *et al.* (2004). "CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*." **J Immunol** 172(8): 4893-901.
- Maruyama, H, *et al.* (2000). "A role of mast cell glycosaminoglycans for the immunological expulsion of intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis*." **J Immunol** 164(7): 3749-54.
- McCoy, K, *et al.* (1997). "Protective immunity to nematode infection is induced by CTLA-4 blockade." **J Exp Med** 186(2): 183-7.
- McSorley, HJ, *et al.* (2008). "Expansion of Foxp3+ regulatory T cells in mice infected with the filarial parasite *Brugia malayi*." **J Immunol** 181(9): 6456-66.
- Montes, M, *et al.* (2009). "Regulatory T cell expansion in HTLV-1 and strongyloidiasis co-infection is associated with reduced IL-5 responses to *Strongyloides stercoralis* antigen." **PLoS Negl Trop Dis** 3(6): e456.
- Mosmann, TR, *et al.* (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." **J Immunol** 136(7): 2348-57.
- Murphy, KM, *et al.* (1990). "Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo." **Science** 250(4988): 1720-3.
- Murrell, KD (1981). "Protective role of immunoglobulin G in immunity to *Strongyloides ratti*." **J Parasitol** 67(2): 167-73.
- Nasta, F, *et al.* (2006). "Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 inhibits GATA-3 but not T-bet mRNA expression during T helper cell differentiation." **Immunology** 117(3): 358-67.
- Nawa, Y, *et al.* (1985). "Defective protective capacity of W/W^v mice against *Strongyloides ratti* infection and its reconstitution with bone marrow cells." **Parasite Immunol** 7(4): 429-38.
- Negrao-Correa, D, *et al.* (2003). "Changes in pulmonary function and parasite burden in rats infected with *Strongyloides venezuelensis* concomitant with induction of allergic airway inflammation." **Infect Immun** 71(5): 2607-14.
- Ochs, HD, *et al.* (2005). "FOXP3 acts as a rheostat of the immune response." **Immunol Rev** 203: 156-64.
- O'Garra, A, *et al.* (2004). "Development and function of T helper 1 cells." **Adv Immunol** 83: 133-62.
- Oosterwegel, MA, *et al.* (1999). "The role of CTLA-4 in regulating Th2 differentiation." **J Immunol** 163(5): 2634-9.
- Ovington, KS, *et al.* (1998). "Regulation of primary *Strongyloides ratti* infections in mice: a role for interleukin-5." **Immunology** 95(3): 488-93.
- Pacifico, LG, *et al.* (2009). "Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10." **Infect Immun** 77(1): 98-107.
- Padigel, UM, *et al.* (2007). "Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice." **J Infect Dis** 196(12): 1844-51.
- Padigel, UM, *et al.* (2006). "Eosinophils can function as antigen-presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*." **Infect Immun** 74(6): 3232-8.
- Pastrana, DV, *et al.* (1998). "Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor." **Infect Immun** 66(12): 5955-63.
- Paul, WE, *et al.* (2010). "How are T(H)2-type immune responses initiated and amplified?" **Nat Rev Immunol** 10(4): 225-35.
- Paula, MO, *et al.* (2011). "Host genetic background affects regulatory T-cell activity that influences the magnitude of cellular immune response against *Mycobacterium tuberculosis*." **Immunol Cell Biol** 89(4): 526-34.
- Pejler, G, *et al.* (2010). "Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease." **Blood** 115(24): 4981-90.
- Perez, VL, *et al.* (1997). "Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement." **Immunity** 6(4): 411-7.
- Piconese, S, *et al.* (2009). "Mast cells counteract regulatory T-cell suppression through interleukin-6 and OX40/OX40L axis toward Th17-cell differentiation." **Blood** 114(13): 2639-48.
- Poulsen, LK, *et al.* (2007). "Triggers of IgE class switching and allergy development." **Ann Med** 39(6): 440-56.
- Prieto-Lafuente, L, *et al.* (2009). "MIF homologues from a filarial nematode parasite synergize with IL-4 to induce alternative activation of host macrophages." **J Leukoc Biol** 85(5): 844-54.

- Qureshi, OS, et al.** (2011). "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." **Science** 332(6029): 600-3.
- Rausch, S, et al.** (2008). "Functional analysis of effector and regulatory T cells in a parasitic nematode infection." **Infect Immun** 76(5): 1908-19.
- Rausch, S, et al.** (2009). "Establishment of nematode infection despite increased Th2 responses and immunopathology after selective depletion of Foxp3+ cells." **Eur J Immunol** 39(11): 3066-77.
- Raziorrouh, B, et al.** (2011). "Inhibitory Molecules that Regulate Expansion and Restoration of HCV-Specific CD4+ T Cells in Patients with Chronic Infection." **Gastroenterology**.
- Read, S, et al.** (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." **J Exp Med** 192(2): 295-302.
- Rodriguez-Sosa, M, et al.** (2002). "Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability." **Infect Immun** 70(7): 3656-64.
- Rotman, HL, et al.** (1996). "Strongyloides stercoralis: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice." **Exp Parasitol** 82(3): 267-78.
- Rowe, JH, et al.** (2009). "Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 blockade augments the T-cell response primed by attenuated *Listeria monocytogenes* resulting in more rapid clearance of virulent bacterial challenge." **Immunology** 128(1 Suppl): e471-8.
- Saiki, RK, et al.** (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." **Science** 239(4839): 487-91.
- Sakaguchi, S, et al.** (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." **Cell** 133(5): 775-87.
- Sandground, JH** (1925). "Speciation and specificity in the nematode genus *Strongyloides*." **Journal of Parasitology** 12: 59-81.
- Sasaki, Y, et al.** (2005). "IL-18 with IL-2 protects against *Strongyloides venezuelensis* infection by activating mucosal mast cell-dependent type 2 innate immunity." **J Exp Med** 202(5): 607-16.
- Satoguina, J, et al.** (2002). "Antigen-specific T regulatory-1 cells are associated with immunosuppression in a chronic helminth infection (onchocerciasis)." **Microbes Infect** 4(13): 1291-300.
- Schneider, H, et al.** (2006). "Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4." **Science** 313(5795): 1972-5.
- Schneider, H, et al.** (2008). "CTLA-4 activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-K) and protein kinase B (PKB/AKT) sustains T-cell anergy without cell death." **PLoS One** 3(12): e3842.
- Scholzen, A, et al.** (2010). "Heroes or villains? T regulatory cells in malaria infection." **Trends Parasitol** 26(1): 16-25.
- Simons, JE, et al.** (2010). "Absence of regulatory IL-10 enhances innate protection against filarial parasites by a neutrophil-independent mechanism." **Parasite Immunol** 32(7): 473-8.
- Smits, HH, et al.** (2007). "Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection." **J Allergy Clin Immunol** 120(4): 932-40.
- Snapper, CM, et al.** (1987). "B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide." **J Immunol** 139(1): 10-7.
- Speare, R** (1987). "Infection with *Strongyloides stercoralis*." **Med J Aust** 147(1): 46.
- Speare, R** (1989). **Strongyloidiasis: A major roundworm infection of man**. London, Taylor and Francis.
- Specht, S, et al.** (2010). "Filaria-induced IL-10 suppresses murine cerebral malaria." **Microbes Infect** 12(8-9): 635-42.
- Steel, C, et al.** (2003). "CTLA-4 in filarial infections: implications for a role in diminished T cell reactivity." **J Immunol** 170(4): 1930-8.
- Streit, A** (2008). "Reproduction in *Strongyloides* (Nematoda): a life between sex and parthenogenesis." **Parasitology** 135(3): 285-94.
- Takahashi, T, et al.** (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." **J Exp Med** 192(2): 303-10.
- Taylor, JJ, et al.** (2006). "Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population." **J Immunol** 176(10): 5839-47.
- Taylor, MD, et al.** (2007). "CTLA-4 and CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo." **J Immunol** 179(7): 4626-34.

- Taylor, MD, et al.** (2006). "F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection." *J Immunol* 176(11): 6918-27.
- Taylor, MD, et al.** (2005). "Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo." *J Immunol* 174(8): 4924-33.
- Taylor, MD, et al.** (2009). "Early recruitment of natural CD4(+)Foxp3(+) Treg cells by infective larvae determines the outcome of filarial infection." *Eur J Immunol* 39(1): 192-206.
- Tetsutani, K, et al.** (2009). "Concurrent infection with *Heligmosomoides polygyrus* suppresses anti-*Plasmodium yoelii* protection partially by induction of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg in mice." *Eur J Immunol* 39(10): 2822-30.
- Tivol, EA, et al.** (1995). "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." *Immunity* 3(5): 541-7.
- Tivol, EA, et al.** (1997). "CTLA4Ig prevents lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction in CTLA-4-deficient mice." *J Immunol* 158(11): 5091-4.
- Townsend, JM, et al.** (2000). "IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development." *Immunity* 13(4): 573-83.
- Ubaldi, V, et al.** (2003). "CTLA-4 engagement inhibits Th2 but not Th1 cell polarisation." *Clin Dev Immunol* 10(1): 13-7.
- van Wijk, F, et al.** (2007). "CD4+CD25+ T cells regulate the intensity of hypersensitivity responses to peanut, but are not decisive in the induction of oral sensitization." *Clin Exp Allergy* 37(4): 572-81.
- Vignali, DA, et al.** (2008). "How regulatory T cells work." *Nat Rev Immunol* 8(7): 523-32.
- Viney, ME, et al.** (2007). *Strongyloides* spp., <http://www.wormbook.org/>
- Walsh, CM, et al.** (2007). "Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice." *Parasite Immunol* 29(6): 293-308.
- Walunas, TL, et al.** (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." *J Exp Med* 183(6): 2541-50.
- Walunas, TL, et al.** (1994). "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity* 1(5): 405-13.
- Wang, CC, et al.** (2001). "Infection of mice with the helminth *Strongyloides stercoralis* suppresses pulmonary allergic responses to ovalbumin." *Clin Exp Allergy* 31(3): 495-503.
- Watanabe, K, et al.** (2009). "Relative imbalance between T regulatory cells and activated T cells in mice with differential morbidity in chronic *Schistosoma mansoni* infections." *Parasite Immunol* 31(8): 440-6.
- Watanabe, K, et al.** (2007). "T regulatory cell levels decrease in people infected with *Schistosoma mansoni* on effective treatment." *Am J Trop Med Hyg* 77(4): 676-82.
- Watanabe, K, et al.** (2000). "The crucial role of granulocytes in the early host defense against *Strongyloides ratti* infection in mice." *Parasitol Res* 86(3): 188-93.
- Watanabe, K, et al.** (2003). "*Strongyloides ratti*: the role of interleukin-5 in protection against tissue migrating larvae and intestinal adult worms." *J Helminthol* 77(4): 355-61.
- Waterhouse, P, et al.** (1995). "Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in *Ctla-4*." *Science* 270(5238): 985-8.
- Wertheim, G, et al.** (1965). "Growth and Development of *Strongyloides Ratti* Sandground, 1925, in the Albino Rat." *J Parasitol* 51: 636-9.
- Wilkes, CP, et al.** (2007). "The immune response during a *Strongyloides ratti* infection of rats." *Parasite Immunol* 29(7): 339-46.
- Wilson, MS, et al.** (2005). "Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells." *J Exp Med* 202(9): 1199-212.
- Wilson, MS, et al.** (2010). "Helminth-induced CD19+CD23hi B cells modulate experimental allergic and autoimmune inflammation." *Eur J Immunol* 40(6): 1682-96.
- Wing, K, et al.** (2008). "CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function." *Science* 322(5899): 271-5.
- Wing, K, et al.** (2010). "Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity." *Nat Immunol* 11(1): 7-13.
- Wohlleben, G, et al.** (2004). "Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation." *Int Immunol* 16(4): 585-96.
- Wu, JJ, et al.** (2010). "Natural regulatory T cells mediate the development of cerebral malaria by modifying the pro-inflammatory response." *Parasitol Int* 59(2): 232-41.

- Yagi, J, et al.** (2006). "Genetic background influences Th cell differentiation by controlling the capacity for IL-2-induced IL-4 production by naive CD4+ T cells." **Int Immunol** 18(12): 1681-90.
- Yoshimura, A, et al.** (2010). "Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta." **J Biochem** 147(6): 781-92.
- Zelinskyy, G, et al.** (2009). "Regulatory T cells suppress antiviral immune responses and increase viral loads during acute infection with a lymphotropic retrovirus." **PLoS Pathog** 5(8): e1000406.
- Zelinskyy, G, et al.** (2006). "Kinetics of CD8+ effector T cell responses and induced CD4+ regulatory T cell responses during Friend retrovirus infection." **Eur J Immunol** 36(10): 2658-70.
- Zhao, DM, et al.** (2006). "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes." **Blood** 107(10): 3925-32.
- Zhou, Y** (2008). "Regulatory T cells and viral infections." **Front Biosci** 13: 1152-70.
- Zhu, J, et al.** (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." **Blood** 112(5): 1557-69.