

Die Rolle von CD160 in der Immunantwort gegen Wurminfektionen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades an
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Lennart Heepmann

Hamburg, 2023

Diese Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe und unter Anleitung von Prof. Dr. Minka Breloer am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Minka Breloer
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Abteilung Helminthen-Immunologie
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Iris Bruchhaus
Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin
Abteilung Wirt-Parasit-Interaktion
Bernhard-Nocht-Straße 74, 20359 Hamburg

Tag der Disputation: 07.07.2023

Eidesstattliche Versicherung - Declaration on oath

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

I hereby declare, on oath, that I have written the present dissertation by my own and have not used other than the acknowledged resources and aids.

Hamburg, den 20.05.2023


Unterschrift

Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen Personen danken, die mich die Zeit der Promotion und des Studiums unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Minka Breloer bedanken. Die mich jederzeit bei jeglichen Fragen unterstützt hat und mir die Betreuung gegeben hat, die ich gebraucht habe. Danke, dass Ich mich bei Dir so weiterentwickeln konnte und mich so wohlfühlen konnte.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Iris Bruchhaus für das Erstellen des Gutachtens dieser Arbeit und immer eine Anlaufstelle der Doktoranden des Bernhard Nocht Instituts ist.

Ich möchte mich besonders bei Dr. Wiebke Hartmann bedanken, die praktisch und theoretisch immer für mich da war. Danke, dass Du mich in meiner Zeit begleitet hast, Du bist eine echte Freundin geworden.

Ein großer Dank geht an Dr. Lara Linnemann, auf die ich mich immer verlassen konnte. Danke, dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest.

Ich möchte mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Helminthen Immunologie für die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken.

Ich bedanke mich bei meinen lieben Mitdoktoranden für die tollen Momente. Besonderer Dank gilt Dr. Imke Liebold, die sich immer für mich Zeit genommen hat. Danke an Cari Lehmann, Stephanie Leyk, Clarissa Lanzloth, und den Joachim Herz Doktoranden für die unvergessliche Zeit.

Ich bedanke mich bei meinen Freunden und Familie für die Jahre lange Unterstützung, das Mitfiebern und des Zusammenhalts. Danke Oma und Danke Mama für Eure Unterstützung. Ich möchte mich besonders bei meinem Bruder Niclas Heepmann bedanken. Danke, dass Du immer für mich da bist.

In Gedenken an meinen Vater und meinem Opa, die das Beenden der Promotion nicht mehr miterleben können.

Abkürzungen

BTLA	B and T lymphocyte attenuator
C3b	Complement component 3b
CD	Cluster of differentiation
CD160-GPI	GPI-verankerte Membranform von CD160
CD160-TM	transmembrane Form von CD160
CRD	cysteinreichen Domänen
DNP-HSA	2,4-Dinitrophenyl hapten is conjugated to Human Serum Albumin
EETs	eosinophils extracellular traps
Foxp3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Vorwärtsstreuung
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HRP	Meerrettichperoxidase
HSV-gD	Herpes Simplex Virus 1 -Glykoprotein D
HVEM	Herpes Virus Entry Mediator
i.n.	<i>intra nasal</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgSF	Immunglobulin-Domänen-Superfamilie
IL	Interleukin
ILC	Angeborene lymphatische Zellen
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
L1	Larven des ersten Stadiums
L3	infektiöse Larven des dritten Stadiums
LIGHT	lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes with HSV-gD for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes
LT α	Lymphotoxin alpha
LTi	Lymphoid tissue inducer
LT β R	Lymphotoxin beta Receptor
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mLN	mesenteriale Lymphknoten

MPO	Myeloperoxidase
NETs	neutrophils extracellular traps
NK	Natürliche Killer
p.i.	Tage nach der Infektion
RAG	recombination activating gene
sCD160	lösliche Form von CD160
SSC	Seitwärtsstreuung
TH2	Typ-II-T-Helferzellen
TNF	Tumornekrose Faktor
TNFSF	TNF-Rezeptor-Superfamilie
Treg	regulatorischen T-Lymphozyten
PMA/I	Proteinkinase C Aktivator Phorbol-12-myristat-13-ace/Ionomycin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Lebenszyklus von <i>Strongyloides ratti</i>	3
Abbildung 2 Immunantwort gegen <i>S. ratti</i>	5
Abbildung 3 Das HVEM-Netzwerk.....	8
Abbildung 4 Genotypisierung von CD160 K.O. Mäusen.....	29
Abbildung 5 Genotypisierung von RAG K.O. und RAG K.O. x HVEM K.O. Mäusen.....	29
Abbildung 6 <i>S. ratti</i> Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von LIGHT und CD160.....	30
Abbildung 7 CD160 Expression auf LPL.....	33
Abbildung 8 Kinetik der <i>S. ratti</i> Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von CD160.....	35
Abbildung 9 Mastzellaktivierung während <i>S. ratti</i> Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von CD160.....	37
Abbildung 10 Mastzell-Expansion während einer <i>S. ratti</i> Infektion in RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen.....	38
Abbildung 11 Vergleich der Funktion von WT und CD160 K.O. Mastzellen <i>in vitro</i>	40
Abbildung 12 Durchflusszytometrische Analyse von LPL und Milzzellen während einer <i>S. ratti</i> Infektion in CD160-kompetenten und -defizienten RAG K.O. Mäusen.....	43
Abbildung 13 Funktionsvergleich von WT und CD160 K.O. ILC2.....	45
Abbildung 14 ILC2 Expansion und Funktion während einer <i>Alternaria alternata</i> induzierten Typ-2 Allergie in CD160-kompetenten und -defizienten RAG K.O. Mäusen: RAG K.O.....	47
Abbildung 15 Zelluläre Komposition und Zytokinkonzentration im während einer <i>Alternaria alternata</i> induzierten Typ-II Allergie in CD160-kompetenten und -defizienten RAG K.O. Mäusen.....	48
Abbildung 16 : Kinetik der <i>Strongyloides ratti</i> Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von HVEM.....	49
Abbildung 17 Durchflusszytometrische Analyse von T- und B-Zellen aus Darm und Milz während einer <i>S. ratti</i> Infektion in CD160-kompetenten und-defizienten Mäusen.....	51
Abbildung 18 Durchflusszytometrische Analyse von TH2-Zellen aus Darm und Milz während einer <i>S. ratti</i> Infektion in CD160-kompetenten und -defizienten Mäusen.....	52
Abbildung 19 Funktionstest von T-Zellen in WT und CD160 K.O. Mäusen während einer <i>S. ratti</i> Infektion.....	54
Abbildung 20 Antikörper Immunantwort in der <i>S. ratti</i> Infektion in WT und CD160 K.O. Mäusen.....	55
Abbildung 21 Wurmlasten und <i>S. ratti</i> DNA-Freisetzung in Erst- und Zweitinfektion in WT und CD160 K.O. Mäusen.....	56
Abbildung 22 : Durchflusszytometrische Analyse von angeborenen Immunzellen aus dem Darm und Milz während einer <i>S. ratti</i> Infektion in CD160 kompetenten und defizienten Mäusen.....	58

Abbildung 23 Mikrobiologische Zusammensetzung des Darms von WT- und CD160 K.O. Mäusen	59
Abbildung 24 Vergleich der Wurmlast und Wurmausstoß in WT und CD160 K.O.....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auflistung des verwendeten Laborequipments.....	10
Tabelle 2 Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials.....	11
Tabelle 3 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten	12
Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Kits	13
Tabelle 5 Antikörper für Zell-Stimulation und ELISA	13
Tabelle 6 Verwendete Antikörper	16
Tabelle 7 Verwendete Mausstämme	17
Tabelle 8 Verwendete Primer	17
Tabelle 9 Verwendete Software	17

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG	I
ABKÜRZUNGEN	II
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
ZUSAMMENFASSUNG	VIII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Immunantwort gegen Wurminfektionen	1
1.2. <i>Strongyloides ratti</i> als Model für Wurminfektionen	3
1.3. Immunregulation bei Wurminfektionen	5
1.4. Das HVEM-Netzwerk	6
2. FRAGESTELLUNG	9
3. MATERIAL UND METHODEN	10
3.1. Material	10
3.1.1. Laborequipment	10
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	11
3.1.3. Chemikalien	12
3.1.4. Kits	13
3.1.5. Antikörper	13
3.1.6. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	14
3.1.7. Antikörper für die Durchflusszytometrie	16
3.1.8. Verwendete Mausmodelle	17
3.1.9. Primer	17
3.1.10. Software	17
3.2. Methoden	18
3.2.1. Parasiten	18
3.2.2. Infektionen	18
3.2.3. Quantifizierung von L3 im Kopf und Lunge	18
3.2.4. Quantifizierung der adulten Tiere im Dünndarm	18
3.2.5. Entnahme von Mäusekot zur Quantifizierung der von <i>S. ratti</i> stammenden DNA	19
3.2.6. Mikrobiomanalyse von WT und CD160 K.O. Mäuse	19
3.2.7. Blutentnahme der Mäuse	20
3.2.8. <i>Alternaria alternata</i> at Allergiemodell	20
3.2.9. FACS	20
3.2.10. Zellisolationen	21
Milz- und Lymphknoten-Zellisolation	21
Isolation von Knochenmarkszellen	21
Isolation oder Aufreinigung von Lungenzellen	21
Isolation von Zellen aus dem Dünndarm	22
Bestimmung der Zellzahlen	22
3.2.11. <i>In-vitro</i> -Stimulation	23
3.2.11.1. T-Zellstimulation	23
3.2.11.2. Knochenmarks differenzierte ILC2	23
3.2.11.3. Funktionsanalyse von Knochenmarks Mastzellen	23
3.2.11.3. DNA-Isolierung aus einer Ohrbiopsie	24
3.2.12. DNA-Isolierung aus Kotproben	24
3.2.13. Quantifizierung von <i>S. ratti</i> -DNA	24
3.2.14. ELISA	26
3.2.14.1. Bestimmung der Maus-Mastzellprotease 1 im Blut von Mäusen	26
3.2.14.2. Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen und BAL	26

3.2.15. Quantifizierung von <i>S. rattii</i> -spezifischen Antikörpern im Blutplasma.....	27
3.2.16. Legendplex von der überständen der T-Zellstimulationen.....	27
3.2.17. Genotypisierung der CD160 K.O. und RAG K.O. CD160 K.O. Mäuse.....	27
3.2.18. Genotypisierung des RAG K.O. und RAG K.O. x HVEM K.O. Hintergrund.....	29
4. ERGEBNISSE	30
4.1. Die Rolle des HVEM-Netzwerks während der <i>Strongyloides rattii</i> Infektion.....	30
4.2. Charakterisierung der CD160 Expression auf intestinalen Lymphozyten.....	31
4.3. Die Rolle von CD160 bei der Kontrolle der <i>S. rattii</i> Infektion.....	34
4.4. Rolle von CD160 in der Aktivierung mukosaler Mastzellen während einer <i>S. rattii</i> Infektion.....	36
4.5. Vergleich von CD160-defizienten und -kompetenten Mastzellen	39
4.6. Analyse angeborener Immunzellen während einer <i>S. rattii</i> Infektion.....	41
4.7. Vergleich der Funktion von RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. ILC2 <i>in vitro</i>	44
4.8. Die Rolle von HVEM während der <i>S. rattii</i> Infektion in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems 49	
4.9. Analyse der adaptiven Immunzellen in WT und CD160 K.O.- Mäusen	50
4.10. Analyse der adaptiven Immunantwort in WT und CD160 K.O.- Mäusen	56
4.11. Analyse der angeborenen Immunzellen in WT und CD160 K.O. Mäusen.....	57
4.12. Mikrobiomanalyse von WT und CD160 K.O. Mäusen.....	59
4.13. Genaue Beschreibung des Verlaufs der <i>Strongyloides rattii</i> Infektion in Dick- und Dünndarm .	60
5. DISKUSSION.....	62
5.1. HVEM-Netzwerk und adaptive Immunität - Die Rolle von LIGHT.....	63
5.2. HVEM-Netzwerk und adaptive Immunität - Die Rolle von CD160	63
5.3. HVEM-Netz und angeborene Immunität-Die Rolle von CD160	65
5.4. Die Mastzellaktivierung	66
5.5. Rolle von CD160 auf Typ 2 ILCs.....	67
5.5.1. Expansion von ILC2s während der <i>S. rattii</i> Infektion.....	67
5.5.2. Funktion von CD160-kompetenten und CD160 defizienten ILC2s	67
5.6. Die Rolle von CD160 auf Typ 1 ILC und NK-Zellen	69
5.7. CD160 Signalisierung	71
5.8. Vergleich von CD160 in der angeborenen und adaptiven Immunität.....	73
6. AUSBLICK.....	75
6.1. Herstellung eines kausalen Zusammenhangs zwischen CD160 exprimierenden ILC2 und modulierter Anti- <i>S. rattii</i> Immunität	75
6.2. Unterscheidung zwischen Signalen, die in CD160-exprimierende Zellen gelangen, und mutmaßlichen Signalen, die von CD160 in MHC-I-exprimierende Zellen gelangen.....	76
6.3. Die Rolle von NK-Zellen während der <i>S. rattii</i> Infektion.....	76
6.4. Funktionsanalysen von angeborenen CD160-kompetenten und CD160-defizienten Immunzellen 77	
7. REFERENZEN	78

Zusammenfassung

Etwa ein Viertel der Menschheit ist mit parasitären Würmern infiziert. *Strongyloides ratti* (*S. ratti*) ist ein nagetierspezifischer parasitärer Fadenwurm, der gewebemigrierende und intestinale Lebensstadien aufweist. Mit *S. ratti* infizierte Mäuse stellen ein gutes Modell dar, um Immunreaktionen gegen Würmer zu untersuchen. Immunkompetente Mäuse beenden die Infektion durch eine Typ-II-Immunantwort innerhalb von 2-4 Wochen. Diese Beendigung der Infektion hängt von der adaptiven Immunität ab. RAG K.O. Mäuse, denen T- und B-Zellen fehlen, bleiben über ein Jahr lang infiziert. Dennoch reicht die angeborene Immunität in RAG K.O. Mäusen aus, um die Wurmlast im Darm von anfänglich ca. 80 Parasiten am Tag 6 p.i. auf 2-5 Parasiten pro Maus zu späteren Zeitpunkten zu reduzieren. In beiden Fällen sind mukosale Mastzellen die entscheidenden Effektorzellen, welche die Abstoßung von *S. ratti* aus dem Darm vermitteln. Alle Immunreaktionen sind streng reguliert, unter anderem durch Checkpoint-Moleküle, die für das Aktivieren und Bremsen von Effektor-Zellen verantwortlich sind. Ein solches Checkpoint-Molekül ist CD160, ein regulatorischer Rezeptor, der auf T-Zellen, aber auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie natürliche Killer (NK) NK-Zellen und ILC1 exprimiert wird. Zudem wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass ILC2 und ILC3 CD160 exprimieren. CD160 bindet an MHC-I und an HVEM und kann, abhängig vom Kontext, sowohl negativ als auch positiv regulieren.

Dieses Forschungsvorhaben untersuchte die Rolle von CD160 bei der Regulation der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen *S. ratti*. Dazu wurde der Infektionsverlauf in CD160-defizienten Mäusen mit immunkompetentem und immundefizientem genetischem Hintergrund verglichen. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von CD160 hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der wandernden Larven im Gewebe. Obwohl CD160 sowohl auf T-Zellen als auch auf Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert wird, spielte dieser regulatorische Rezeptor also keine Rolle bei der Bekämpfung der gewebemigrierenden Larven während der Infektion mit *S. ratti*.

Während immunkompetente CD160 K.O. Mäuse die Infektion ähnlich schnell wie Wildtyp Mäuse beendeten, zeigte sich am sechsten Tag der Infektion eine Verschiebung der adulten Parasiten vom Dünndarm in den Dickdarm. Dies ging mit einer leicht erhöhten Produktion von Typ-II-Zytokinen in CD160 K.O. Mäusen einher. Es konnten jedoch keine Unterschiede in der TH2-Polarisation, T-Zell-Expansion, Antikörperproduktion, Mastzellaktivierung, oder im intestinalen Mikrobiom zwischen WT und CD160 K.O. Mäusen festgestellt werden. Zudem etablierte sich eine schützende Gedächtnisantwort gegen eine zweite *S. ratti* Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von CD160 in vergleichbarer Weise. Somit scheint CD160 keine wesentliche Rolle bei der Regulation adaptiver Immunantworten gegen *S. ratti* zu spielen.

Die Untersuchung der angeborenen Immunantwort offenbarte eine bisher unbekannte und wesentliche Rolle von CD160-vermittelten Signalen bei der Wurmbabwehr durch ILC2 und bei der ILC2-gesteuerten Mastzellaktivierung. Beim Vergleich der Wurmlast in RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen zeigte sich in Abwesenheit von CD160 von Tag 6 bis Tag 97 p.i. eine unverändert hohe Anzahl von ca. 50 Parasiten pro Maus, während CD160-kompetente RAG K.O. Mäuse die Anzahl der Parasiten nach Tag 6 p.i. auf ca. 2-5 Würmer reduzieren konnten. Die Reduktion der Wurmlast in *S. ratti* infizierten RAG K.O. Mäusen ging mit einer intestinalen Mastozytose und Degranulation mukosaler Mastzellen einher, die in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen nicht zu messen war. Dies war nicht auf einen intrinsischen Defekt der CD160 K.O. Mastzellen zurückzuführen. Die frühe Aktivierung von Mastzellen während einer Infektion mit *S. ratti* ist abhängig von Zytokinen wie IL-13 und IL-9, die von ILC2 produziert werden können. Während der Infektion mit *S. ratti* expandierten ILC2 und die CD160 Expression auf den ILC2s stieg an. Im Gegensatz dazu expandierten ILC2 nicht in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen. CD160-defiziente ILC2 reagierten im Vergleich zu CD160-kompetenten ILC2 auf *in vitro* und *in vivo* Stimulation mit einer reduzierten Zytokinproduktion, insbesondere von IL-13 und IL-9.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass CD160-vermittelte Signale in intestinalen ILC2 eine essenzielle Rolle bei der Expansion und Zytokinproduktion im Kontext von Wurminfektionen spielen. Der Defekt in der ILC2-Expansion und Zytokinproduktion bei *S. ratti* infizierten RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen erklärt den Ausfall der Mastzellaktivierung und folglich die mangelnde Kontrolle der intestinalen Parasitenlast.

Interessanterweise konnte durch die Verwendung von RAG K.O. x HVEM K.O. Mäusen gezeigt werden, dass HVEM als funktioneller Ligand für das ILC2-stimulierende CD160 keine wesentliche Rolle zu spielen scheint. Es bleibt daher offen, ob CD160 durch den alternativen Liganden MHC-I engagiert wird, oder tonisch ohne Liganden-Engagement signalisiert.

In Anwesenheit des adaptiven Immunsystems war dieser bedeutsame Einfluss von CD160 auf die ILC2-Aktivierung nicht sichtbar, da das adaptive Immunsystem offenbar in der Lage war, die beeinträchtigten Funktionen von ILC2 zu kompensieren, bis die Infektion erfolgreich bekämpft wurde.

Summary

About a quarter of humanity is infected with parasitic worms. *Strongyloides ratti* (*S. ratti*) is a rodent-specific parasitic nematode that has tissue-migrating and intestinal life stages. Mice infected with *S. ratti* provide a good model to study immune responses against worms. Immunocompetent mice terminate infection by a type II immune response within 2-4 weeks. This termination of infection depends on adaptive immunity. RAG knockout mice lacking T and B cells (RAG K.O.) remain infected for over a year. Nevertheless, innate immunity in RAG K.O. mice is sufficient to reduce the worm burden in the intestine from initially about 80 parasites at day 6 p.i. to 2-5 parasites per mouse at later time points. In both cases, mucosal mast cells are the crucial effector cells mediating the rejection of *S. ratti* from the gut. All immune responses are tightly regulated, by i.e. checkpoint molecules that are responsible for activating and inhibiting effector cells. One such checkpoint molecule is CD160, a regulatory receptor expressed on T cells, but also on cells of the innate immune system such as NK cells and ILC1. In addition, this work showed for the first time that ILC2 and ILC3 also express CD160. CD160 binds to MHC-I and HVEM and can regulate both negatively and positively, depending on the context and site.

This research project investigated the role of CD160 in the regulation of the innate and adaptive immune response against *S. ratti*. To this end, the course of infection was compared in CD160-deficient mice with immunocompetent and immunodeficient genetic backgrounds. The presence or absence of CD160 had no effect on the number of migrating larvae in the tissue. Thus, although CD160 is expressed on both T cells and cells of the innate immune system, this regulatory receptor did not play a role in controlling tissue-migrating larvae during infection with *S. ratti*.

While immunocompetent CD160 K.O. mice terminated infection at a similar rate as WT mice, day 6 p.i. showed a shift of adult parasites from the small intestine to the colon. This was accompanied by a slightly increased production of type II cytokines in CD160 K.O. mice. However, no differences in TH2 polarisation, T-cell expansion, antibody production, mast cell activation or intestinal microbiome were detected between WT and CD160 K.O. mice. Moreover, a protective memory response against a second *S. ratti* infection was established in the presence and absence of CD160 in a comparable manner. Thus, CD160 does not appear to play an essential role in the regulation of adaptive immune responses against *S. ratti*.

Investigation of the innate immune response revealed a previously unknown and essential role of CD160-mediated signalling in worm defence by ILC2 and in ILC2-driven mast cell activation. When comparing worm burden in RAG K.O. and RAG K.O. x CD160 K.O. mice, the absence

of CD160 from day 6 to day 97 p.i. showed an unchanged high number of approx. 50 parasites per mouse, whereas CD160-competent RAG K.O. mice were able to reduce the number of parasites after day 6 p.i. to approx. 2-5 worms. The reduction in worm burden in *S. ratti* infected RAG K.O. mice was accompanied by intestinal mastocytosis and degranulation of mucosal mast cells, which was not measured in RAG K.O. x CD160 K.O. mice. This was not due to an intrinsic defect of CD160 K.O. mast cells. Early activation of mast cells during *S. ratti* infection is dependent on cytokines such as IL-13 and IL-9, which can be produced by ILC2. During infection with *S. ratti*, ILC2 expanded and CD160 expression on ILC2s increased. In contrast, ILC2 did not expand in RAG K.O. x CD160 K.O. mice. CD160-deficient ILC2s responded to *in vitro* and *in vivo* stimulation with reduced cytokine production, particularly of IL-13 and IL-9, compared to CD160-competent ILC2s.

In summary, the present data suggest that CD160-mediated signalling in intestinal ILC2s plays an essential role in expansion and cytokine production in the context of worm infections. The defect in ILC2 expansion and cytokine production in *S. ratti* infected RAG K.O. x CD160 K.O. mice explain the failure of mast cell activation and consequently the lack of control of intestinal parasite load.

Interestingly, by using RAG K.O. x HVEM K.O. mice, it was shown that HVEM does not appear to play an essential role as a functional ligand for the ILC2-stimulating CD160. It therefore remains an open question whether CD160 is engaged by the alternative ligand MHC-I, or signals tonically without ligand engagement.

In the presence of the adaptive immune system, this significant influence of CD160 on ILC2 activation was not apparent, as the adaptive immune system appeared to be able to compensate for the impaired functions of ILC2 until the infection was successfully cleared.

1. Einleitung

Der Nobelpreis für Wirtschaftswissenschaften 2019 wurde Esther Duflo zusammen mit Abhijit Banerjee und Michael Kremer für ihren experimentellen Ansatz zur Linderung der weltweiten Armut verliehen [1]. Duflo untersuchte die Wirksamkeit finanzieller Interventionen zur Verbesserung des Schulbesuchs, gemessen in zusätzlichen Bildungsjahren pro ausgegebene 100 Dollar. Sie fand heraus, dass die medikamentöse Entwurmung der Schüler und Schülerinnen im Vergleich zu einer Reihe anderer Interventionen – von Stipendien bis hin zur Verbesserung der Ernährung – mit Abstand am effektivsten war. Infektionen mit parasitären Würmern (Helminthen) betreffen immer noch ein Viertel der Weltbevölkerung und sind möglicherweise die am meisten vernachlässigte tropische und armutsbedingte Krankheit [2]. Obwohl Wurminfektionen nur selten tödlich verlaufen, verursachen sie eine langanhaltende Morbidität und manchmal schwere Pathologien. Sie beeinträchtigen das Leben der Menschen in vielerlei Hinsicht, wie die negativen Auswirkungen von Wurminfektionen auf den Schulbesuch zeigen. Nach wie vor gibt es keine Impfstoffe, die eine sterile Immunität erzeugen. Zwar gibt es wirksame Medikamente zur Entwurmung, jedoch ist diese Strategie aufgrund der häufigen Neuinfektionen und der Gefahr der Resistenzentwicklung in Wurm-Endemiegebieten nicht nachhaltig. Daher ist ein besseres Verständnis der schützenden Immunantwort gegen Würmer sowie der Gründe für ihr Versagen im Fall chronischer Wurminfektionen erforderlich.

1.1. Die Immunantwort gegen Wurminfektionen

Wurminfektionen lösen eine Typ-II-Immunreaktion aus, bei der sich spezialisierte Immunzellen entwickeln, die als Typ-II-T-Helferzellen (TH2) bezeichnet werden [3]. Diese Zellen produzieren Botenstoffe (Zytokine) wie Interleukin-4 (IL-4), IL-5, IL-9 und IL-13, die unter anderem die Reifung von B-Zellen zu Plasmazellen fördern, welche Antikörper vom Isotyp Immunglobulin G1 (IgG1) und IgE produzieren. Antikörper und Zytokine aktivieren außerdem andere Immunzellen wie eosinophile und basophile Granulozyten und mukosale Mastzellen [3]. Diese Zellen setzen Granula mit toxischen Substanzen frei, die den Wurm schädigen oder töten können und/oder durch erhöhte Darmperistaltik und Durchfall den Wurm aus dem Darm ausscheiden [3].

Angeborene lymphatische Zellen (ILC) sind die angeborenen „Spiegelbilder“ der T-Zellen, die zur Immunantwort beitragen, indem sie Effektorzytokine sekretieren und die Funktionen anderer angeborener und adaptiver Immunzellen regulieren [4]. ILCs gelten als gewebsresident [126,127] und werden in drei Hauptgruppen unterteilt: ILC1s, ILC2s und ILC3s. Zwei weitere Immunzelltypen, NK-Zellen und „Lymphoid tissue inducer“ (LTi)-Zellen, werden im Allgemeinen zur ILC-Familie gezählt, da sich ihre phänotypischen,

entwicklungsbedingten und funktionellen Eigenschaften erheblich mit denen der ILC1 bzw. ILC3 überschneiden [5].

ILC2 sind durch ihre Fähigkeit definiert, die Typ-II-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu produzieren [117,119,121,125]. Sie wurden erstmals in Mausmodellen für gastrointestinale Wurminfektionen entdeckt und gelten heute als vorherrschende, frühe Quelle von IL-13, die die Hyperplasie der Becherzellen, die Hyperkontraktilität der glatten Muskulatur, die Schleimproduktion und schließlich die Wurmausstoßung antreibt [119–122] und vor Gewebeschäden schützt [6]. Sie sind somit der Funktion von TH2-Zellen komplementär. IL-33 ist ein aus dem Gewebe stammendes nukleäres Alarm-Zytokin [7], das nachweislich Typ-II-Immunreaktionen bei Allergien und Wurminfektionen fördert [8,9]. Mehrere Studien haben die zentrale Funktion von IL-33 bei der Immunabwehr gegen Würmer bestätigt. Sie zeigten, dass Mäuse, denen entweder IL-33 oder der IL-33-Rezeptor ST2 fehlte, eine erhöhte Wurmlast bei *Strongyloides venezuelensis* [10], *Nippostrongylus brasiliensis* [11] und *Heligmosomoides polygyrus* [12] Infektion, eine erhöhte Larvenlast bei *Trichinella spiralis* [13] Infektion und eine erhöhte Mikrofilaremie bei *Litomosoides sigmodontis* [14] Infektion aufwiesen. Außerdem steht endogenes und rekombinantes IL-33 im festen Zusammenhang mit der Expansion von ILC2 bei einer *Strongyloides ratti* (*S. ratti*) Infektion [15].

Trotz der Wirksamkeit der Immunantwort gegen Würmer haben diese Parasiten Mechanismen entwickelt, um das Immunsystem zu umgehen und teilweise jahrelang in ihrem Wirt zu überleben [16]. Diese Immunevasions-Mechanismen ermöglichen es den Würmern, ihre Abstoßung zu vermeiden oder so lange zu verzögern, bis sie sich erfolgreich vermehren können. Der chronische intestinale parasitäre Fadenwurm *Heligmosomoides polygyrus* [17] antagonisiert die IL-33-Funktion durch die Sekretion von IL-33-Inhibitoren [18,19]. *Litomosoides sigmodontis* infizierte Mäuse bremsten das Immunsystem für „gewollte“ Antigene bei der Influenza-Impfung, durch die Expansion von IL-10 produzierenden Typ-I-regulatorischen T-Zellen [20]. Diese Modulation war sogar nach erfolgreicher Behandlung gegen den Wurm präsent.

Zwar gibt es verschiedene Mausmodelle, doch keines bildet den gesamten Infektionsverlauf beim Menschen vollständig ab. Insbesondere *Strongyloides stercoralis* (*S. stercoralis*), ein Erreger, der beim Menschen Autoinfektionen auslöst und zu chronischen oder lebenslangen Infektionen führen kann, entwickelt sich in Mäusen nicht über das dritte Larvenstadium (L3) hinaus.

1.2. *Strongyloides ratti* als Model für Wurminfektionen

Der parasitäre Nematode *S. stercoralis* verursacht eine *Strongyloidiasis*. Eine Studie aus 2017 schätzte mehr als 600 Millionen Infizierte weltweit [21] und die höchste Prävalenz wurde bei Kindern zwischen 12-14 Jahren festgestellt [22]. Diese Arbeit verwendet den parasitären Nematoden *S. ratti*, einen nahen Verwandten des humanpathogenen *S. stercoralis* [23]. Mit Hilfe von diesem Modellorganismus lassen sich die grundlegenden Mechanismen der Immunantwort und der Immunmodulation analysieren, die während einer Infektion mit parasitären Würmern auftreten. Obwohl *S. ratti* ein natürlicher Parasit von Wildratten ist, sind

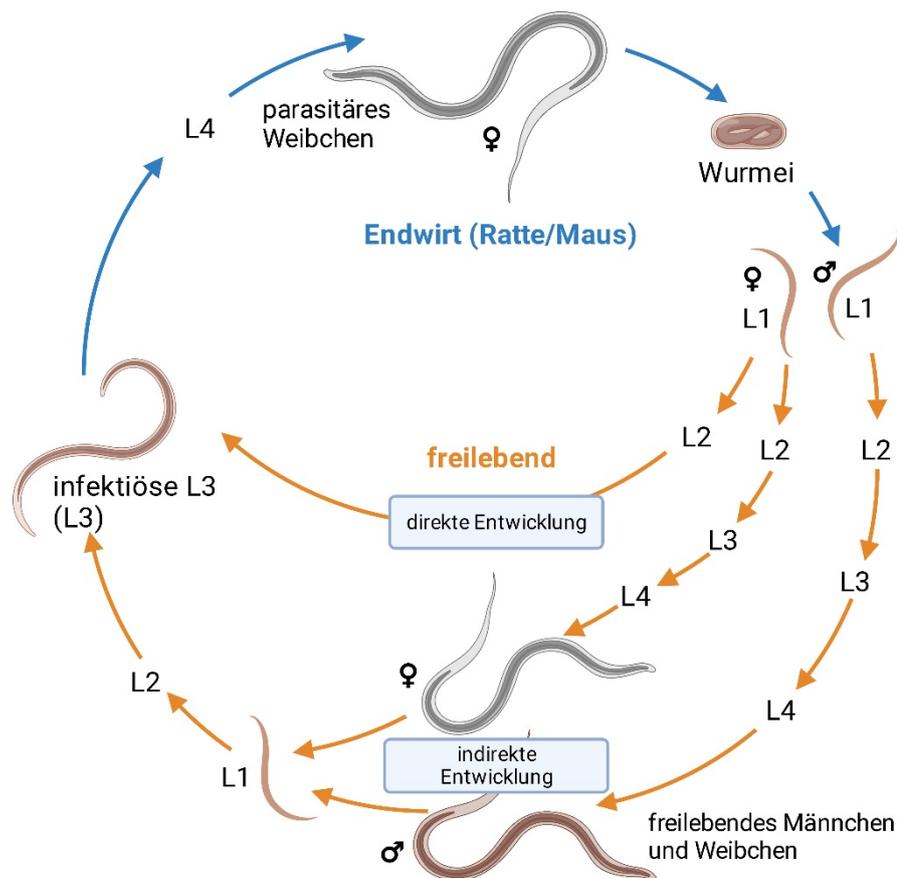


Abbildung 1 Lebenszyklus von *Strongyloides ratti*: L3 penetrieren die unverletzte Haut eines Nagetierwirtes und wandern durch das Gewebe in den Kopf. Dort werden sie verschluckt und gelangen in den Darm, wo sie sich über ein viertes Larvenstadium zu Adulten entwickelt. Diese vermehren sich durch Parthenogenese. Eier und bereits geschlüpfte L1 gelangen über den Kot in die freie Welt. Dort entwickeln sie sich entweder zu infektiösen L3 oder zu freilebende Weibchen und Männchen, die sich sexuell fortpflanzen und über freilebende L1 und L2 ebenfalls L3 produzieren.

Laborratten und die meisten Labormausstämme vollständig empfänglich für eine Infektion [24,25]. Die infektiösen dritten Larven von *S. ratti* (L3) leben frei in der Natur, in feuchter Erde, und dringen aktiv in die unverletzte Haut ihrer Wirte ein. Sie wandern innerhalb von zwei Tagen durch das Muskel- und Hautgewebe in die nasofrontale Region des Kopfes. Dort werden die L3 verschluckt und gelangen in den Dünndarm. Sie häuten sich über ein viertes Larvenstadium zu Adulten und nisten sich bis zum fünften Tag nach der Infektion (p.i.) in der

Dünndarmschleimhaut ein [26]. Die Adulten pflanzen sich durch Parthenogenese fort [27]. Die Eier und geschlüpfte Larven des ersten Stadiums (L1) werden ab dem 6. Tag p.i. mit dem Kot ausgeschieden und können sich entweder direkt zu infektiösen L3 entwickeln oder eine freilebende Generation hervorbringen, die sich sexuell fortpflanzt [27] (Abbildung 1). Immunkompetente Mäuse überwinden die Infektion innerhalb eines Monats und sind gegen nachfolgende Infektionen semiresistent [23]. Die Infektion mit *S. rattii* kann in drei verschiedene Phasen unterteilt werden: Gewebemigration (Tag 1-2), frühe intestinale Infektion (Tag 3-6) und späte intestinale Infektion (Woche 2-4). Jede Phase wird durch spezifische und unterschiedliche Immuneffektoren kontrolliert (Abbildung 1).

Die meisten L3 werden am Ort der Infektion in Haut- und Muskelgewebe attackiert und getötet [28] (Abbildung 2). Die L3 werden von Komplementfaktoren wie Complement component 3b (C3b) durch die Bildung extrazellulärer DNA-Netze von neutrophilen Granulozyten (neutrophils extracellular traps = NETs) opsoniert und eosinophilen Granulozyten (eosinophils extracellular traps = EETs) immobilisiert sowie schließlich unter anderem durch die Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) der neutrophilen Granulozyten oder Eosinophilenperoxidase (EPO) der eosinophilen Granulozyten abgetötet [28–31]. Etwa 10 % der infektiösen L3 überleben die Gewebemigration und nisten sich erfolgreich in der Darmschleimhaut ein. Die Kontrolle der frühen intestinalen Wurmlast wird durch basophile Granulozyten und Mastzellen unterstützt, wobei Mastzellen die zentralen Effektorzellen für die erfolgreiche Beendigung der Infektion sind [32–34]. In der Regel werden Mastzellen durch die Vernetzung von antigenspezifischem IgE auf hochaffine Fc ϵ -Rezeptoren mit einem polyvalenten Antigen aktiviert [35]. In der frühen Immunantwort können jedoch auch angeborene Mechanismen zur Mastzellaktivierung beitragen, da es 1 bis 2 Wochen dauert, bis antigenspezifische T- und B-Zell-Antworten entstehen. *S. rattii* Infektion wären dies beispielweise die Freisetzung von durch IL-3 [112–114], IL-9 [23]. Trotzdem kontrollieren immunkompetente Wildtyp Mäuse (WT) und T- und B-Zell-defizienten „recombination activating gene-knock out“ (RAG K.O.) Mäuse am Tag 6 p.i. eine *S. rattii* Infektion gleichermaßen effizient (29). In den ersten Tagen der Infektion wird die Immunität durch die Freisetzung des „Alarm“-Zytokins IL-33 während der Gewebemigration ausgelöst, was die anschließende Expansion angeborener ILC2 induziert, die eine schnelle Aktivierung von Mastzellen in Abhängigkeit von IL-9 fördern [15,36].

Diese angeborene Immunantwort ermöglicht die Kontrolle der Parasitenlast auf einem niedrigen Niveau. Sie reicht jedoch nicht aus, um *S. rattii* vollständig aus dem Darm zu eliminieren [32].

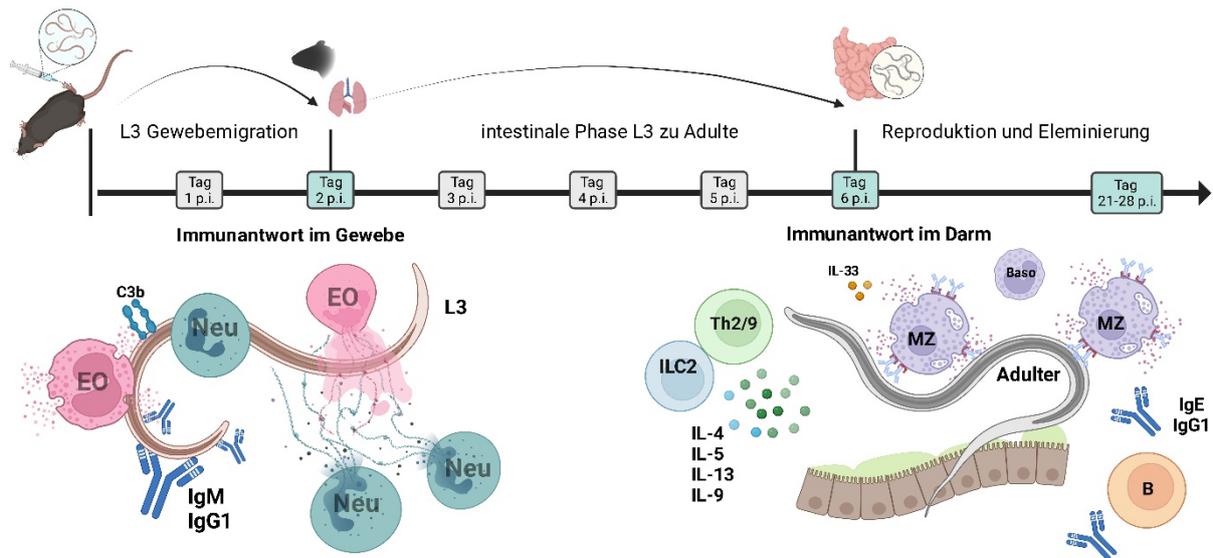


Abbildung 2 Immunantwort gegen *S. ratti*: Die Immunantwort gegen *S. ratti* wird im Gewebe und im Dünndarm differenziert betrachtet. Im Gewebe werden migrierende Larven durch Komplementfaktoren opsoniert. Neutrophile und Eosinophile bilden ETs und immobilisieren die Larven, welche schließlich unter anderem durch die Freisetzung von MPO und EPO abgetötet werden. Basophile und Mastzellen führen die Immunantwort gegen *S. ratti* im Darm. Die Mastzellaktivierung ist zu frühen Zeitpunkten IL-9 abhängig wird früh in der Infektion von IL-33 und später auch durch IgG1 bzw. IgE induziert. Typ-II-Zytokine werden hauptsächlich von ILC2 in der frühen und TH2-Zellen in der späten Immunantwort produziert. Mäuse beenden die Infektion innerhalb eines Monats mit Hilfe einer Antikörper-vermittelten Immunantwort.

Die endgültige Eliminierung von *S. ratti* aus dem Darm hängt jedoch stark von der adaptiven Immunität ab. T-Zellen, die Typ-II-Zytokine wie IL-9, IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren, und B-Zellen, die *S. ratti*-spezifische IgG1 und IgE produzieren, spielen dabei eine zentrale Rolle [23]. RAG K.O. Mäuse sind bis zu einem Jahr lang mit vitalen Würmern im Darm infiziert, die Eier und L1 ausscheiden, was in etwa der Lebensdauer adulter *S. ratti* Parasiten entspricht [32]. Aber auch Mastzellen sind für die Termination der Infektion essentiell. Mäuse ohne Mastzellen bleiben ein halbes Jahr lang auf niedrigem Niveau infiziert, auch wenn eine adaptive Immunantwort vorhanden ist [32]. Die Immunität gegen eine zweite Infektion wird hauptsächlich am Ort der Infektion und während der Gewebemigration durch eine Antikörper-vermittelte Eliminierung der L3 gewährleistet [23,28]. Trotz der Tatsache, dass der akute Verlauf von *S. ratti* Infektionen nicht die charakteristischen chronischen Infektionen durch *S. stercoralis* beim Menschen modellieren kann, ist *S. ratti* ein leistungsfähiges Werkzeug, um die verschiedenen Wege zur Immunität gegen *Strongyloides* genau zu analysieren und aufzuschlüsseln.

1.3. Immunregulation bei Wurminfektionen

Im Falle von Wurminfektionen balanciert das Immunsystem auf einem schmalen Grat zwischen der effektiven Ausbildung einer Immunantwort zur Eliminierung oder Kontrolle des Parasiten einerseits und der Vermeidung einer übermäßigen Entzündungsreaktion andererseits, die potenziell immunpathologische Folgen haben kann. [37]. Ein komplexes

Zusammenspiel aus negativ regulierenden Immunzellen und regulatorischen Rezeptoren bewirkt eine fein abgestimmte Regulation der Stärke der Immunantwort und sichert somit die Aufrechterhaltung der Homöostase. Bei der *S. rattii* Infektion eliminieren immunkompetente Mäuse die Wurminfektion innerhalb eines Monats. *S. rattii* schafft es jedoch in diese kurze Zeitspanne seinen Lebenszyklus zu vollenden und über 1-2 Wochen Eier und L1 auszuscheiden. Der Parasit unterdrückt dabei aktiv die gegen ihn gerichtete Immunantwort [38], um im Wirt zu überleben. Insbesondere wird der zentrale Abwehrmechanismus gegen adulte Würmer im Darm - nämlich die durch IL-9 angetriebene Aktivierung von Mastzellen - auf mehreren Ebenen gedämpft [23]. Dabei nutzen parasitäre Würmer wie *S. rattii* die bereits bestehenden negativen Regelkreise des Immunsystems aus.

So wurde gezeigt, dass die *S. rattii* Infektion die Expansion von Forkhead-Box-Protein 3 (Foxp3)⁺ regulatorischen T-Lymphozyten (Treg) in den drainierenden Lymphknoten induziert, welche die IL-9-Produktion und die nachfolgende IL-9-vermittelte Mastzellaktivierung antagonisieren [39]. Eine Depletion von Treg zu Beginn der Infektion führte zu einer gesteigerten Produktion von IL-9 und einer verstärkten Degranulation von Mastzellen, die von IL-9 abhängig war. Als Konsequenz daraus etablierten sich im Darm signifikant weniger adulte *S. rattii*. Die Quelle der potenziellen IL-9-Produzenten, die durch Treg gedämpft wurden, wurde jedoch noch nicht identifiziert [36].

Neben Treg fungiert ein komplexes Netzwerk inhibitorischer Rezeptoren der sogenannten „Checkpoint“ Moleküle als weiterer Regulationsmechanismus. Hier induzierte die *S. rattii* Infektion unter anderem eine gesteigerte Expression des Checkpoint-Moleküls „B and T lymphocyte attenuator“ (BTLA, CD272) auf „Cluster of differentiation 4“ (CD4)⁺ Effektor T-Zellen. In Abwesenheit dieses Regulationsmechanismus, in BTLA-defizienten Mäusen, kam es während der *S. rattii* Infektion zu einer signifikanten Steigerung der IL-9-Produktion und Mastzellaktivierung. Folglich wurde eine signifikante Reduktion der Anzahl an Würmern im Darm von BTLA K.O. Mäusen beobachtet [40].

1.4. Das HVEM-Netzwerk

BTLA ist ein Transmembranprotein und ein Rezeptor der Immunglobulin-Domänen-Superfamilie (IgSF). Bei Bindung an seinen Liganden, „Herpes Virus Entry Mediator“ (HVEM, CD270) [41], vermittelt BTLA über eine intrazelluläre „immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif“ (ITIM)-Domäne [42] inhibitorische Signale in die BTLA-exprimierende Zelle. HVEM wird auf einer Vielzahl von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert und gehört zur TNF-Rezeptor-Superfamilie (TNFSF). HVEM fungiert als Ligand für mehrere ko-inhibitorische und ko-stimulatorische Rezeptoren [43–46]. Das Engagement von HVEM vermittelt jedoch ebenfalls ko-stimulatorische Signale in die HVEM-exprimierende Zelle (Abbildung 3).

Somit kommt es durch über HVEM vermittelte Signale stets zu einer Integration von positiven und negativen Signalen [44]. Im Falle der *S. rattii* Infektion dominierten die von BTLA in die BTLA-positiven T-Zellen vermittelten negativen Signale, wie durch gesteigerte IL-9-Produktion, Mastzellaktivierung und reduzierte Wurmlasten in BTLA-defizienten und HVEM-defizienten Mäusen belegt wurde [40]. Wenn das Fehlen der Komponenten eines regulatorischen Netzwerks die Immunantwort verbessert, deutet das darauf hin, dass die Immunantwort in Gegenwart von HVEM/BTLA während der *S. rattii* Infektion negativ reguliert wird. Es ist jedoch zu beachten, dass das HVEM-Netzwerk unter anderen Bedingungen auch zu positiven Signalen führen kann.

HVEM wurde nach seiner Bindung an das Herpes Simplex Virus 1 -Glykoprotein D (HSV-gD) benannt und dient als Eintrittsrezeptor für das Virus in HVEM-positive Zellen. Außerdem bindet HVEM an zwei regulatorische Rezeptoren, die Mitglieder des TNFSF sind: Lymphotoxin alpha (LT α) und LIGHT (CD258), ein Akronym für „lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes with HSV-gD for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes“. Die Mitglieder der TNFSF spielen eine wesentliche Rolle bei verschiedenen immunologischen Prozessen wie der Aktivierung von T-Zellen, der Ko-Stimulation, der klonalen Expansion und der Differenzierung von T-Zellen zu Effektor-T-Zellen [47,48]. LIGHT ist ein Typ-II-Transmembranprotein mit 239 Aminosäuren und einer C-terminalen extrazellulären TNF-Homologie Domäne, die sich zu Homotrimeren zusammensetzt und mit HVEM [49] und Lymphotoxin beta Receptor (LT β R) [50,51] interagieren kann. Die Expression von LIGHT ist hauptsächlich auf aktivierte T-Zellen, NK-Zellen und unreife dendritische Zellen im Knochenmark beschränkt [49,52]. Während die Hauptfunktion von LIGHT/HVEM eine Ko-Stimulation für T-Zellen ist, scheint die LIGHT/LT β R-Interaktion von größerer Bedeutung für die Regulation der Kommunikation zwischen Stroma und Antigen-präsentierenden Zellen und T-Zellen zu sein [53]. Beide LIGHT-Rezeptoren, HVEM und LT β R, werden auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Stromazellen exprimiert, letzterer jedoch nicht auf lymphoiden Zellen [54,55]. Es gibt zwei Isoformen von LIGHT in der Maus, die durch alternatives Spleißen entstehen: eine Isoform ohne Transmembrandomäne, die sich im Zytosol befindet, und eine Isoform mit Transmembrandomäne, die an Aminosäure 84 proteolytisch verarbeitet werden kann, um eine lösliche extrazelluläre Form von LIGHT zu erzeugen [49,56].

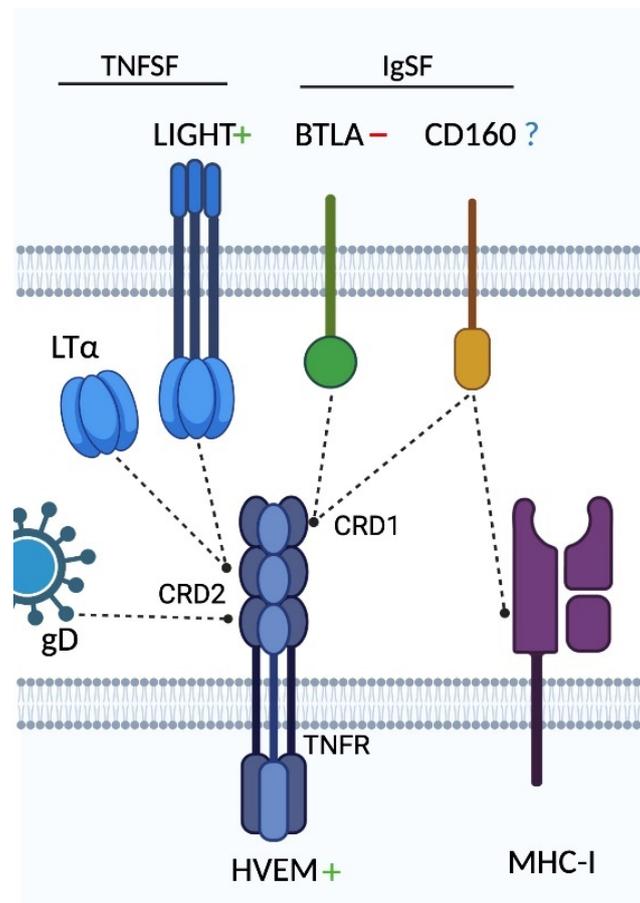


Abbildung 3 Das HVEM-Netzwerk: HVEM bindet an das Glykoprotein D vom Herpes Virus und bindet außerdem an zwei Mitglieder des TNFSF: LT α und LIGHT, die am CRD2 um eine Bindung kompetieren. Zusätzlich binden Mitglieder IgSF BTLA und CD160 an HVEM, die an CRD1 kompetieren. CD160 bindet außerdem an MHC-I. Bei Bindung sind positive Signale in LIGHT- und HVEM-exprimierende Zellen beschrieben. BTLA signalisiert negativ in die BTLA exprimierende Zelle. Für CD160 sind sowohl ko-stimulierende als auch ko-inhibierende Signale beschrieben.

Neben BTLA bindet HVEM auch an den ko-regulatorischen Rezeptor CD160, der ebenfalls zum IgSF gehört. CD160 ist auf verschiedenen Lymphozyten [46], Mastzellen [57] und Endothelzellen [58] exprimiert und bindet an das Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse (MHC-I)-Moleküle mit geringer [59–62] und an HVEM mit hoher Affinität [63]. Bezüglich der Funktion von CD160 liegen teilweise widersprüchliche Daten vor, die, abhängig vom CD160-exprimierenden Zelltyp sowohl auf eine ko-stimulatorische als auch auf eine ko-inhibitorische Funktion hinweisen [63,64]. Durch alternatives Spleißen entstehen vier CD160-Isoformen, die sich durch das Vorhandensein oder Fehlen eines Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankers, einer Immunglobulin (Ig)-Domäne sowie transmembraner und zytoplasmatischer Domänen unterscheiden [65]: eine transmembrane Form (CD160-TM), zwei verkürzte Formen (CD160- Δ Ig-GPI und CD160- Δ Ig-TM), eine GPI-verankerte Membranform (CD160-GPI) und eine lösliche Form (sCD160) [65,66].

HVEM ist ein Typ-I-Membranprotein mit einer Ektodomäne, die aus vier cysteinreichen Domänen (CRD1 bis CRD4) besteht [67]. BTLA [41] und CD160 [63] konkurrieren um die

Bindung an CRD1, während LIGHT und LT α [68,69] miteinander um die Bindung an CRD2 und CRD3 konkurrieren. Insbesondere im Darm wurden durch den HVEM-BTLA-LIGHT-Signalweg vermittelte ko-stimulatorische Signale mit der Kontrolle bakterieller Darminfektionen [70,71] und der Entwicklung von Kolitis [72,73] in Verbindung gebracht. Außerdem wurde HVEM als Risikogen für *Colitis ulcerosa* beim Menschen identifiziert [74].

Die Expression von HVEM und BTLA auf derselben Zelle führt zur Bildung eines *cis*-Komplexes, in dem BTLA die HVEM-Signalisierung von NF- κ B durch alle seine membrangebundenen Liganden (CD160, BTLA und LIGHT) *in trans* unterdrückt [75]. Die transmembrane LIGHT-Isoform ist der einzige Ligand, der an diesen BTLA-HVEM *cis*-Komplex binden kann. Dies führt zur Aktivierung der HVEM- und LIGHT-positiven Zelle [56]. Die lösliche Isoform von LIGHT verstärkt die BTLA-HVEM und CD160-HVEM Signalisierung durch Bildung von tertiären Komplexen [56].

Das HVEM-Netzwerk aus Ko-Stimulation und Ko-Inhibition ist ein klassisches Beispiel für Regelkreise, die schnelle Immunreaktionen und homöostatische Kontrolle ermöglichen.

2. Fragestellung

Bei einer Infektion wird das Immunsystem streng reguliert, um eine erfolgreiche Bekämpfung des Pathogens zu ermöglichen, ohne übermäßige Immunpathologien zu verursachen. Ein wichtiger Mechanismus der Immunregulation sind Checkpoint-Moleküle, die für das Aktivieren und Bremsen von Effektor-Zellen verantwortlich sind. HVEM und seine Liganden repräsentieren ein komplexes Netzwerk solcher Checkpoint-Moleküle, die nach Integration aller Signale sowohl stimulierend als auch inhibierend wirken können.

In dieser Arbeit soll das HVEM-Netzwerk im Kontext von intestinalen Wurminfektionen genauer untersucht werden und die folgenden Forschungsfragen bearbeitet werden:

1. Welchen Einfluss hat die LIGHT- und CD160-Defizienz auf die *Strongyloides ratti* Wurmlast?
2. Wie ist die CD160 Expression im Darm charakterisiert?
3. Wie wird die Immunantwort während der *S. ratti* Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von CD160 beeinflusst?
4. Welche sind die relevanten Liganden von CD160 in der *S. ratti* Infektion?

Um die Komplexität des Immunsystems besser zu entschlüsseln, sollte das angeborene und adaptive Immunsystem differenziert voneinander betrachtet werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborequipment

Tabelle 1 Auflistung des verwendeten Laborequipments

Gerät	Hersteller/Firma
Analysewaage	Sartorius AG, Göttingen
ChemiDoc Geldokumentationsanlage	Mitsubishi, Japan
CO ₂ -Inkubator (HERACELL150i)	ThermoFischerScientific, Wilmington, USA
Digitalwaage	Becton Dickinson, Heidelberg
Einkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg Gilson, Middleton, USA
Elektrophoresekammer (DNA-Gele)	BioRad, München
ELISA-Reader (MRX II)	Dynex Technologies, Berlin
Heizblock (Thermomixer, Comfort)	Eppendorf, Hamburg
Inversmikroskop (CK2)	Olympus Europa, Hamburg
Kühl-und Gefrieranlage	Liebherr-Hausgeräte, Rostock
Lichtmikroskop "Wilover"	Hund, Deutschland
Magnetrührer	KA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle	Panasonic, Japan
NanoDrop 2000C	ThermoScientific, Waltham, USA
PCR Maschine (peqstar 96x Universal Gradient)	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter (WTW pH 537)	Labotec, Wiesbaden
Pipettierhilfe „accu-jet pro“	Brandt, Wertheim
Real-time PCR Cyclus (RotorGene 6000)	Corbett Life Science, Sydney,
Schüttelinkubator (TH30/SM30)	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Sezierinstrumente	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Spannungsquelle (Gelelektrophorese)	Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen
Sterilwerkbank „Lamin Air HB 2448“	Heraeus Instruments, Hanau
Thermocycler (P x 2)	Thermo Scientific, Wilmington, USA

Vortexer	Heidolph Instruments, Schwabach
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Wasserdeionisierungsanlage	SG Clear, Barsbüttel
Zentrifuge (Eppendorf 5415D)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Multifuge 1 L-R)	Heraeus-Sepatech, Hanau

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2 Auflistung des verwendeten Verbrauchsmaterials

Alle mit * gekennzeichneten Waren wurden steril verwendet

Verbrauchsmaterial	Hersteller/Firma
Chirurgische Einmal-Skalpelle*	Braun, Melsungen
Deckgläschen	Engelbrecht, Edermünde
Durchflusszytometrie-Röhrchen (5ml Polystyren)	Sarstedt, Nümbrecht
Ethylendiamintetraacetat- (EDTA) Röhrchen	Kabe Labortechnik, Nümbrecht- Elsenroth
ELISA-Platten (Microlon, 96-Loch, Flachboden)	Greiner, Frickenhausen
ELISPOT-Filter-Platten (MultiScreen® HTS, 96-Loch)*	Millipore, Billerica, USA
Filterspitzen (Biosphere®, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)*	Sarstedt, Nümbrecht
Kanülen*	Braun, Melsungen
Knopfkanüle (gebogen, 1,0 x 40 mm)	UMI Germany, Mönchengladbach
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 20 µm)	Hecht-Assistent, Sondheim
Neubauer-Zählkammer (Tiefe 100 µm)	Brandt, Wertheim
Objektträger, Mattrand	Engelbrecht GmbH, Edermünde
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Inc., Wisconsin, USA
Petrischalen (100 x 200 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg Greiner bio-one, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Safelock-Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Glasflasche (50, 100, 200, 500, 1000 ml)	Schott AG, Mainz, Germany
Spritzen (1, 5 und 10 ml)*	Braun, Melsungen
Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm und 0,45 µm)*	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfiltriergefäße „Stericup“*	Millipore, Bedford, USA
Zellkulturplatten (96-Loch, Rundboden)*	Greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe „Cell Strainer“ (40,70 und 100 µm)*	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)*	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3. Chemikalien

Tabelle 3 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

Reagenz	Hersteller
Agarose	Biomol, Hamburg, Deutschland
Ampuwa (steriles pyrogenfreies Wasser)	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Collagenase VII	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphat	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
DNA-Ladepuffer (x6)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
DNA-Molekulargewichtsmarker (500 bp-Leiter plus)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNase I	Roche, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Gentamycin	Capricon, Ebsdorfergrund, Deutschland
Heparin	Rathiopharm, Ulm, Deutschland
L-Glutamin	Capricon, Ebsdorfergrund, Deutschland
Percoll	Sigma Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
Random-Hexamer-Primer	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Capricon, Ebsdorfergrund, Deutschland

RPMI 1640 ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
β-Mercapthoethanol	Invitrogen, Gibco, Auckland, Neuseeland
SYBR® Green I	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Tetramethylbenzidin (TMB)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

Nicht gelistete Chemikalien wurden von Carl Roth, Merck oder Sigma-Aldrich bezogen.

3.1.4. Kits

Tabelle 4 Auflistung der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
ELISA Kits (IL-9, MCPT-1)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
ELISA Kits „DuoSet®“(IL-13, IL-5)	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Intracellular Fixation/Permeabilisation Puffer Set Foxp3	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
LegendPlex Maus 12-Plex Th2 V3	Biolegend, Fell, Deutschland
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix with separated ROX vials	ThermoFisherScientific, Waltham, USA
RNAse A (DNAse frei)	Roche, Penzberg, Deutschland
RT-PCR Mastermix (Maxima™ SYBR Green qPCR)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase (Hotstar)	Qiagen, Hilden, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase (LC)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

3.1.5. Antikörper

Tabelle 5 Antikörper für Zell-Stimulation und ELISA

Antikörper	Hersteller
Ratte anti-Maus IgG1-HRP	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Ratte anti-Maus IgG2b-HRP (LO-MG2b)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte anti-Maus IgG3-HRP (LO-MG3)	Southern Biotech, Birmingham, USA
Ratte anti-Maus IgM-HRP	Zymed, Karlsruhe, Deutschland

Rekombinantes IL-7, IL-2	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Rekombinantes IL-33	Biolegend, Fell, Deutschland
Brefeldin A (1000X)	Biolegend, Fell, Deutschland
Monensin (1000X)	Biolegend, Fell, Deutschland

3.1.6. Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Es wurden sämtliche Puffer und Stammlösungen unter Verwendung von deionisiertem Wasser (Aqua dest.) hergestellt. Für die Zellkultur wurden Lösungen, die hitzeunempfindlich sind, autoklaviert (135 °C, 2 bar, 20 min) und hitzeempfindliche Lösungen wurden durch Sterilfiltration (Porengröße 0,22 µm) sterilisiert. Um Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde FCS bei 56 °C für 30 min erhitzt und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

1M KOH

56,1 g KOH

Ad 1 l H₂O

1M NaCl Lösung

58,44 g NaCl

Ad 1 l H₂O

Darmverdaupuffer

RPMI-Vollmedium

62.6 CDU/ml Collagenase VIII

dNTP-Mix (PCR)

2 mM dATP/dCTP/dGTP/dTT

ELISA-Blockpuffer

1x PBS mit 1 % BSA (w/v)

ELISA-Diluent

PBS

1% BSA

ELISA-Stopplösung

2 M H₂SO₄

Lungenverdaupuffer

HBSS-Ca-Mg

4% FCS

0,4 U/ml Dispase

1 mg/ml Collagenase VIII

100 mg/ml DNaseI

Lungenzell Waschpuffer

1 l PBS

1 % FCS

1 mM EDTA

Narkosemittel

9 ml PBS

1 ml Ketavet

250 µl Rompun

PBS (10x) pH 7.4

Pulver fertig (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

in dH₂O

PBS/Pen-Strep

1x PBS

5 ml Penicillin/Streptavidin (100x)

ELISA-Substratlösung

12 ml ELISA-Substratpuffer
200 µl ELISA-TMB-Lösung
1,2 µl 30 % H₂O₂

ELISA-Substratpuffer

100 mM NaH₂PO₄, pH 5,5

ELISA-TMB-Lösung

30 mg Tetramethylbenzidin (TMB)
in 5 ml DMSO

ELISA-Waschpuffer:

1x PBS mit 0,05 % (w/v) Tween 20

Erythrozytenlysepuffer (ACK-Lösung)

8.024 g NH₄Cl
0.1 g KHCO₃
37.2 mg Na₂EDTA

FACS-Puffer

1 % FCS
0,1 % Natriumazid in 1x PBS
pH 7.2 to 7.4
in 1000 ml ddH₂O

Gewebelysepuffer

100 mM Tris pH 8,5
5 mM EDTA 0,2 %
SDS 200 mM NaCl
in dH₂O

RPMI 1640 Vollmedium

500 ml RPMI 1640
50 ml FCS
5 ml Glutamine (200 mM)
2.5 ml

SYBR® Green-Lösung

1:1000 in DMSO

TBE- Puffer (x 10)

0,89 M Tris Base
0,89 M Borsäure
20 mM Na₂EDTA
In 1L H₂O
1-fach PenicillinG-Streptomycin
1 µlβ-Mercaptoethanol

Trypanblau-Lösung

2 mg Trypanblau
in 100 ml 1x PBS

3.1.7. Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tabelle 6 Auflistung der verwendeten Antikörper

Epitop	Fluorochrom	Klon	Hersteller
CD4	BUV395	GK1.5	BioLegend
CD8	PerCP/Cy5.5	53-6.7	BioLegend
CD45	AF700	13/2.3	Biolegend
CD90.2	PE/Cy7	30-H12	BioLegend
CD127	BV785	A7R34	BioLegend
CD11c	PE/Cy7	N418	BioLegend
CD11b	BV650	M1/70	BioLegend
CD160	PE	7H1	BioLegend
CD19	PE/Dazzle 594	6D5	BioLegend
FcεRII	BV510	MAR-1	BioLegend
c-KiT	BV421	ACK2	BioLegend
GATA-3	AF488	16E10A23	BioLegend
EOMES	PE-CF594	X4-83	BD Bioscience
RORγt	AF647	Q31-378	BioLegend
IL-5	BV421	TRFK5	BioLegend
IL-13	APC	W17010B	BioLegend
ST2	PE/Dazzle 594	DIH9	BioLegend
Lebend/Tod	Zombie Yellow	LOT: B345067	BioLegend
NK1.1	PerCP/Cy5.5	S17016D	BioLegend
Siglec F	PE	1RNM44N	BioLegend
HVEM	PE	HMHV-1B18	BioLegend
CD3	BV711	17A2	BioLegend

3.1.8. Verwendete Mausmodelle

Für alle Mausexperimente wurden weibliche Mäuse im Alter zwischen 8 und 12 Wochen verwendet.

Tabelle 7 Auflistung der verwendeten Mausstämme

Mausstamm	Herkunft
C57BL/6 (WT)	Zucht im BNITM, Hamburg
CD160 K.O. [76]	Zucht im BNITM, Hamburg
LIGHT K.O. [77]	Zucht im BNITM, Hamburg
RAG K.O.	Zucht im BNITM, Hamburg
RAG K.O. x CD160 K.O.	Zucht im BNITM, Hamburg
RAG K.O. x HVEM K.O. [78]	Zucht im BNITM, Hamburg

3.1.9. Primer

Tabelle 8 Auflistung der verwendeten Primer

Genotypisierungs Primer:	
CRISS_fw	5'-GCAGTGTCCTTACTGTCATAGA
CRISS_rev	5'-GCTGTTCTAAGTTGGTCTCAGG
S. rattii 28S RNA Primer:	
StroS2	5'-TTAGAGTCGTGTTGCTTGGAA
StroAS1	5'-GTGCAACTGGCTCTGTATGC

3.1.10. Software

Für die Grafiken wurde © 2023 BioRender genutzt

Tabelle 9 Auflistung der verwendeten Software

Programm	Herkunft
FlowJo X Tree Star	Ashland, USA
Office 2010 Microsoft	Redmond, USA
Prism 9 GraphPad	La Jolla, USA
qPCR Software Rotor Gene 6000 Series	San Francisco, USA
Legendplex Software	Biolegend, Fell, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Parasiten

Zur Untersuchung der Helmintheninfektion wurden die oben genannten Mausstämme mit *S. ratti* infiziert. Der Gesundheitszustand der Mäuse wurde täglich bis zur Tötung der Tiere überwacht. Der Lebenszyklus von *S. ratti* wird am BNITM in Wistar Ratten erhalten [21].

3.2.2. Infektionen

Kotproben von mit *S. ratti* infizierten Ratten wurden gesammelt und in wassergetränkter Aktivkohle in einem Glasbecher kultiviert. Die Aktivkohle wurde verwendet, um den natürlichen Lebensraum der Larven (Sediment) zu simulieren. Die Kultur wurde 7 Tage lang bei 25 °C kultiviert. Während dieses Zeitraums entwickelten sich die Eier und L1 von *S. ratti* zu L3. Die entwickelten L3 wurden mit einer Baermann-Apparatur (ein Sieb auf einem Trichter, der mit einem Gummischlauch verbunden ist, der am Ende mit einer hämostatischen Klemme verschlossen wird) aus den Aktivkohlekulturen isoliert. Nach zwei Stunden wurde der Baermann-Apparat abgestellt und die Larven eingesammelt. Die Larven wurden zweimal mit 1x PBS/Pen-Strep gewaschen. Auf jeden Waschschrift folgte eine Sedimentationsphase von mindestens 45 Min bei 4 °C. Gewaschene L3 wurden mikroskopisch gezählt, indem 10-mal jeweils 1 µl auf einen Objektträger pipettiert wurde. Die entsprechende Anzahl der erforderlichen Larven wurde anschließend aliquotiert oder in einem Eppendorfgefäß vorgelegt. Zwei Ratten wurden jede Woche subkutan mit 2500 L3 in 200 µl PBS Pen/Strep infiziert. Zur Infektion von Mäusen wurden 1000 iL3 in 30 µl PBS Pen/Strep subkutan in die Hinterfußballen injiziert.

3.2.3. Quantifizierung von L3 im Kopf und Lunge

Die Anzahl der lebensfähigen L3 wurde an Tag 2 im Kopf gezählt. Fell und Haut wurden vom Kopf entfernt. Der Kopf wurde in Quadranten geschnitten und in 6-Well-Platten gegeben. Das Gewebe wurden mit H₂O (Leitungswasser) bedeckt und 3 Stunden lang bei 37 °C inkubiert. Nach jeder Stunde wurden die Well-Platten leicht geschüttelt. Während dieser Inkubation wanderten lebensfähige L3 aus dem Gewebe aus. Nach 3 Stunden Inkubation wurden die Gewebestücke entnommen und die L3 mikroskopisch gezählt.

3.2.4. Quantifizierung der adulten Tiere im Dünndarm

Die Anzahl der lebensfähigen adulten Würmer wurde im Dünndarm an unterschiedlichen Tagen nach der Infektion gezählt. Die Dünndärme von Mäusen wurden präpariert und in Längsrichtung aufgeschnitten. Der Dünndarm wurde mit H₂O (Leitungswasser) gewaschen, um Dreck zu entfernen und um ihn in ein 50er Zentrifugenröhrchen zu geben. Der Dünndarm wurde mit H₂O bedeckt und 3 Stunden lang bei 37 °C vertikal inkubiert. Nach jeder Stunde

wurden die Röhrrchen kräftig geschüttelt, um den Mucus zu lösen. Nach 3 h wurde der Dünndarm entfernt und die Röhrrchen für 30 min aufrecht hingestellt, sodass Würmer absinken. Das Wasser wurde dann auf 5 ml mit einer Pipettierhilfe reduziert. Anschließend wurden die Proben auf zwei Wells einer 6 Well-Bodenplatte verteilt und adulte Würmer mikroskopisch gezählt.

3.2.5. Entnahme von Mäusekot zur Quantifizierung der von *S. ratti* stammenden DNA

Die von *S. ratti* stammende DNA wurde in Kotproben von infizierten Mäusen quantifiziert. Die Mäuse wurden 24 Stunden lang auf Zellulosepapier gesetzt und der Kot wurde für die weitere DNA-Isolierung in Röhrrchen gesammelt. Die Kotproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.2.6. Mikrobiomanalyse von WT und CD160 K.O. Mäuse

Für diese Analyse wurden Kotproben (von WT und CD160 K.O. Mäusen) vor und 6 Tage nach der Infektion entnommen und bis zum Versand ins Labor bei - 80 °C eingefroren. Die Proben wurden in zwei Chargen verschickt und in diesen Chargen verarbeitet.

Die DNA-Extraktion der Kotproben wurde mit dem QIAamp DNA fast stool mini kit automatisiert auf dem QIAcube (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde das Material in 0,70 mm Garnet Bead Röhrrchen (Dianova, Hamburg, Deutschland) überführt, die mit 1,1 ml InhibitEx Lysepuffer gefüllt waren. Die Homogenisierung erfolgte mit Beads unter Verwendung einer SpeedMill PLUS (Analytik Jena, Jena, Deutschland) für 45 s bei 50 Hz. Die Proben wurden dann 5 Min lang auf 95 °C erhitzt und anschließend gemäß dem Herstellerprotokoll weiterbehandelt. Die extrahierte DNA wurde bei - 20 °C gelagert. Während der Extraktion der Proben wurden Blank-Extraktionskontrollen durchgeführt.

Für die Sequenzierung wurden die variablen Regionen V1 und V2 des 16S rRNA-Gens innerhalb der DNA-Proben mit dem Primerpaar 27F-338R in einem Dual-Barcoding-Ansatz nach [79] amplifiziert. 3 µl Kot-DNA wurden schließlich für die Amplifikation verwendet. Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde eine Elektrophorese in Agarosegel durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit dem SequalPrep Normalization Plate Kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) normalisiert, zu gleichen Teilen gepoolt und auf dem Illumina MiSeq v3 2x300 bp (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) sequenziert. Negativkontrollen, Röhrrchen nur mit Reagenzien für die DNA-Extraktion und Wasser, sowie MOCK-Proben (ZymoBIOMICS Microbial Community Standard) wurden mit einbezogen. Die Demultiplexierung nach der Sequenzierung erfolgte auf der Grundlage von 0 Mismatches in den Barcode-Sequenzen. Die gesamte Laborarbeit wurde im Mikrobiom-Labor des IKMB an der Universität Kiel und in Kooperation mit Dr. Corinna Bang durchgeführt.

3.2.7. Blutentnahme der Mäuse

Das Blut der Mäuse wurde durch Punktion der Gesichtsvene (*Vena facialis*) mit einer Lanzette oder *post mortem* mit einer Spritze aus dem Herzen gewonnen und in EDTA-Blutröhrchen aufgefangen. Die Blutproben wurden 10 Min lang bei 10000 x g zentrifugiert, um das Plasma von zellulären Bestandteilen zu trennen. Das Plasma wurde in ein neues Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.8. *Alternaria alternata* at Allergiemodell

Mäuse wurden mit einem Narkosemittel bis zum Toleranzstadium betäubt und dann mit 50 µg *Alternaria alternata* Extrakt (von Dr. Henry McSorley, Universität Dundee, zur Verfügung gestellt) *intra nasal* (i.n.) behandelt. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse mittels CO₂ Überdosierung getötet und eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) durchgeführt. Dafür wurde eine Kanüle in die freiliegende Luftröhre eingeführt und die Lungen wurden mit 500 µl kaltes PBS gespült. Die BAL wurde in Durchflusszytometrierröhrchen gesammelt und bei 300 x g für 5 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde für Zytokinbestimmungen bei -20 °C gelagert. Die Zellen wurden direkt für durchflusszytometrische Analysen verwendet. Zusätzlich wurden die Lungen entnommen und durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.9. FACS

Das Durchflusszytometer ermöglicht die Analyse der Granularität und Größe der Zellen mit Hilfe von Seitwärtsstreuung (SSC) und Vorwärtsstreuung (FSC). Die Zellen werden in einer Einzelzelllösung getrennt, indem sie durch ein Kapillarröhrchen gepresst werden, bevor sie den Laser passieren. Neben der Untersuchung der Morphologie kann auch die Expression von extra- (Oberflächen-) und intrazellulären Proteinen/Molekülen analysiert werden. Dazu werden die Zellen mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern markiert. Um verschiedene Moleküle gleichzeitig zu untersuchen, werden Antikörper verwendet, die bei unterschiedlichen Wellenlängen angeregt werden. Für intrazellulärer Zytokinfärbung wurden die Zellen für 4 h mit 10 mg/ml Monensin und Brefeldin A bei 37 °C in Vollmedium kultiviert. $2 \cdot 10^6$ Zellen wurden mit einem Lebend/Tod Farbstoff 20 Min bei 4 °C inkubiert. Antikörper für die Oberflächenfärbung wurden in 50 µl pro Probe Fc-Block verdünnt, für 30 Min bei 4 °C in Durchflusszytometrie-Röhrchen inkubiert und dann mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Für die Analyse intrazellulärer Marker wurden die Zellen vor der Färbung fixiert und permeabilisiert. Zur Fixierung und zu Permeabilisierung wurden 200 µl Fixier/Permeabilisierungslösung (BD Bioscience) oder 500 µl Foxp3-Lösung (eBioscience™) in die Röhrchen gegeben und mindestens 20 Min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die intrazellulären Antikörper wurden in Permeabilisierungspuffer verdünnt, um die Membranpermeabilität zu gewährleisten. Die Zellen wurden mindestens zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, um erneut ungebundene Antikörper zu entfernen. Die

für die Färbung verwendeten Antikörper sind in Tabelle 6 aufgeführt. Die Proben wurden anschließend mit dem Cytec Aurora 5L gemessen. Alle Proben wurden mittels FlowJo X Tree Star analysiert.

3.2.10. Zellisolationen

Milz- und Lymphknoten-Zellisolation

Milzen oder mesenteriale Lymphknoten (mLN) wurden aus Mäusen entnommen und zwischen zwei Glas Objektträgern zerdrückt. Die Zellsuspensionen wurden 8 Min lang mit 300 x g bei 4 °C zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Für die Erythrozytenlyse wurde das Pellet in 5 ml ACK-Lysepuffer resuspendiert. Nach 1:30 Min wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml PBS gestoppt. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert (1200 rpm, 8 Min, 4 °C) und das Pellet in 10 ml PBS resuspendiert. Die Zellen wurden durch ein 70-µm-Zellsieb filtriert, um Gewebereste zu entfernen. Die gefilterten Zellen wurden zentrifugiert (1200 rpm, 8 Min, 4 °C) und in 5 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen bei 4 °C gelagert.

Isolation von Knochenmarkszellen

Um Knochenmarkszellen für die ILC2 Kultur zu gewinnen, wurden Femur und Tibia von Muskelfleisch befreit und an beiden Enden durchtrennt. Anschließend wurde das Knochenmark mit kaltem PBS mit einer Kanüle ausgespült und in 20ml kaltem PBS aufgefangen. Die erhaltene Zelllösung wurde bei 4 °C und 300 x g für 5 Min zentrifugiert und das Zellpräzipitat in 20 ml Erythrozytenlysepuffer aufgenommen, wo es bei Raumtemperatur für 3 Min inkubiert wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und vor dem letzten Zentrifugationsschritt durch ein Zellsieb (70 nm) filtriert, um sie in PBS zum Auszählen aufzunehmen.

Isolation oder Aufreinigung von Lungenzellen

Die Lunge wurde in kleine Stücke geschnitten und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 2 ml Lungenverdau Puffer gegeben. Dann 60 Min lang bei 37 °C und 180 U/Min geschüttelt (nach 30 Min mit einer 3 ml-Pasteurpipette oder einer 1000 µl-Pipette auf- und abpipettiert und weitere 30 Min geschüttelt). Anschließend wurde das restliche Gewebe mit Hilfe des Stempels einer 2 ml-Spritze durch ein 70 µm-Sieb gedrückt und das Sieb mit 15 ml PBS ausgespült. Zellen wurden dann bei 1500 rpm für 5 Min bei 4 °C pelletiert und in 5 ml 37 %igem Percoll resuspendiert und bei 2500 rpm (500 x g) 15 Min bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Das Fett an der Oberfläche wurde mit einer 10-ml-Pipette entfernt und das restliche Percoll mit einer neuen Pipette verworfen. Die Zellen wurden im Pellet in 3ml ACK-Lysepuffer resuspendiert und 2 Min inkubiert und mit 12ml Waschpuffer abgestoppt. Die Zellen wurden 2 mal bei 7 Min. bei 1200 rpm gewaschen und abschließend in 2ml PBS resuspendiert.

Isolation von Zellen aus dem Dünndarm

Der Dünndarm wurde den Mäusen entnommen und auf ein PBS getränktes Papiertuch gelegt. Das Fett wurde entfernt und der Darm längs aufgeschnitten. Der Darminhalt wurde in einer Petrischale mit kaltem PBS entfernt und der Mucus mit einer Pinzette rausgestrichen. Anschließend wurde der Darm in 1 cm kleine Stücke geschnitten und in 10 % HBSS-FCS bei 4 °C aufbewahrt. Die Darmstücke wurden dann in ein Teesieb gekippt und mit 25 ml 37°C warmen HBSS gespült. Dann wurden die Stücke 3 mal in 50er Zentrifugenröhrchen mit 15 ml HBSS-EDTA überführt, für 15 Min bei 37 °C geschüttelt und mit 25 ml HBSS über dem Teesieb gespült. Anschließend werden die Proben in 15 ml Darmverdaupuffer für 10 Min bei 37 °C geschüttelt, dann stark per Hand geschüttelt und weitere 5 min inkubiert. Der Verdau wird mit 35 ml eiskaltem RPMI-Vollmedium abgestoppt. Die Zellen wurden dann über einen 100 nm und dann 40 nm Zellsieb gegeben und anschließend zweimal für 10 Min bei 1200 rpm zentrifugiert und mit 10 ml PBS gewaschen. Zum Abschluss wurden die Zellen in 2 ml PBS aufgenommen und gezählt.

Bestimmung der Zellzahlen

Zur Bestimmung der Zellzahlen wurde ein Aliquot der Zellen 1:10 in Trypanblau verdünnt. Trypanblau wird als Vitalfärbemittel verwendet, das tote Zellen blau färbt. Für die Zellzählung wurde eine Neubauer-Kammer unter einem Lichtmikroskop verwendet. Die Zellen in einem Großquadrat wurden gezählt und die Zellzahl nachfolgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration der Zellen pro ml} = \text{gezählte Zellzahl} \times 10^3 \times 10 \times 10$$

10^3 beschreibt den Faktor für die Einheit von μl auf ml

10 beschreibt den Faktor der Neubauer-Kammer

10 beschreibt den Verdünnungsfaktor

3.2.11. *In-vitro*-Stimulation

3.2.11.1. T-Zellstimulation

Milz- und Lymphknotenzellen wurden pro Stimulanz Vierfachwerte in einer 96-Rundboden-Lochplatte angesetzt. Für die Stimulation wurden 100 µl 20 µg/ml *S. rattii* Lysat verdünnt in RPMI-Vollmedium pro Loch vorgelegt und 5 x 10⁵ Zellen in 100 µl RPMI-Vollmedium hinzugegeben. Zellen, die in 200 µl RPMI-Vollmedium kultiviert wurden, dienten als Negativkontrolle. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ für 3 Tage.

3.2.11.2. Knochenmarks differenzierte ILC2

5 x 10⁶ Knochenmarkszellen wurden in 100 µL RPMI-Vollmedium suspendiert. Zur Stimulierung wurden die Zellen mit 50 µl 1 ng/ml IL-33 in Kombination mit 50 µl Zytokin-Cocktail aus 10 ng/ml IL-2 und 10 ng/ml IL-7 oder mit RPMI-Vollmedium inkubiert. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Überstände bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert und die produzierten Zytokine mittels ELISA quantifiziert. Die ILC2 wurden durchflusszytometrisch quantifiziert und analysiert.

3.2.11.3. Funktionsanalyse von Knochenmarks Mastzellen

BMMC wurden in Kolben von 75 cm² mit 25 ml Vollmedium kultiviert, das 10 ng/ml rekombinanten murinen Stammzellularfaktor, 5 ng/ml rekombinantes murines IL-3 (beide R&D Systems, Minneapolis, USA) und in den ersten 2 Wochen 10 µg/ml Ciprofloxacin (Bayer, Deutschland) enthielt. 2 x 10⁶ Zellen pro Vertiefung wurden mit Dinitrophenyl (DNP)-spezifischem IgE (Klon SPE-7) 0,2 µg/ml (Sigma, Deutschland), oder mit naivem oder Immuns-erum (1:100 Verdünnung) in 12-Well-Platten über Nacht bei 37 °C sensibilisiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und 2 x 10⁵ Zellen pro Vertiefung wurden mit Proteinkinase C Aktivator Phorbol-12-myristat-13-ace/lonomycin (PMA/I) (100 ng/ml, Sigma) oder 2,4-Dinitrophenyl hapten is conjugated to Human Serum Albumin (DNP-HSA) (20 ng/ml, Sigma) oder *S. rattii* L3-Antigen-Lysat (100 µg/mL) in 96-Well-Platten mit rundem Boden für 20 Min bei 37 °C stimuliert. Das Immun-Serum für die Sensibilisierung war ein hochtitriges Serum, das von WT Mäusen stammte, die mit *S. rattii* infiziert und nach 30 Tagen erneut infiziert und am Tag 21 nach der zweiten Infektion getötet wurden. Die Zellen wurden mit Alexa Fluor 647-markiertem Anti-Maus-CD107a (LAMP1) (Klon 1D4B), FITC-markiertem Anti-Maus-CD117 (Klon 2B8) und PE-markiertem Anti-Maus-FcεRIα (Klon MAR-1, alle BioLegend, San Diego, USA) gefärbt. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert.

3.2.11.3. DNA-Isolierung aus einer Ohrbiopsie

Ohrbiopsien von Mäusen wurden mit 20 µl Gewebelysepuffer, der 100 µg/ml Proteinase K enthielt, 15 Min hier wieder ausgelang bei 75 °C inkubiert. Die Proben wurden zur Proteinase-K-Inaktivierung 10 Min lang bei 95 °C inkubiert. Die Proben wurden geschüttelt und 180 µl 10 mM Tris-Puffer wurden hinzugefügt. 2 µl dieser Lösung wurden für die weitere PCR-Genotypisierung verwendet.

3.2.12. DNA-Isolierung aus Kotproben

Die DNA-Isolierung aus dem Kot von *S. rattii* infizierten Mäusen wurde mit einer modifizierten KOH-Methode durchgeführt [80]. 200 mg Kot wurden in 1,4ml H₂O suspendiert, 100 µl 1 M KOH und 30 µl 1 M DTT zugegeben und durch Vortexen bis zur vollständigen Homogenisierung gut gemischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 65 °C wurden die Proben erneut geschüttelt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 x g wurden 400 µl Überstand jeder Probe in ein neues Reaktionsgefäß mit 10 µl 10 mg/ml Proteinase K überführt. Die Proben wurden geschüttelt und 15 Min bei 56 °C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem die Proben für 10 Min bei 4 °C gelagert wurden. 400 µl Isopropanol wurden hinzugefügt, um die DNA in den Proben zu fällen, und 30 Min lang bei -20 °C gelagert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13000 x g wurde der Überstand verworfen und die DNA mit 100 µl 80 %igem Ethanol gewaschen. Nach der Zentrifugation wurde das Ethanol verworfen und die DNA wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Die DNA wurde in 200 µl Millipore H₂O suspendiert. Die DNA-Konzentrationen wurden mit einem UV-Vis-Spektrophotometer (Nanodrop, Thermo Scientific) bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde auf 100 ng/µl eingestellt.

3.2.13. Quantifizierung von *S. rattii*-DNA

Die *S. rattii* 28S ribosomale RNA (rRNA) kodierende DNA wurde durch quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) mit einem Corbett RotorGene 6000 (Qiagen, Deutschland) quantifiziert. Die DNA-Amplifikation basiert auf dem PCR-Prinzip. Die qPCR ermöglicht die Quantifizierung spezifischer DNA-Produkte, die bei jedem Zyklus des PCR-Prozesses entstehen (Higuchi et al., 1993). Die Sequenzen der *Strongyloides*-spezifischen Primer sind in Tabelle 8 beschrieben. Als Kalibrator wurde ein Plasmid (TOPO TA cloning kit, Invitrogen) verwendet, das ein durch PCR hergestelltes 180 bp-Fragment des *S. rattii* 28S rRNA-Gens enthielt. SYBR® Green I, ein Doppelstrang-DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff, wurde zur Quantifizierung der DNA in den Proben verwendet. SYBR® Green I zeigt wenig Fluoreszenz, wenn es in Lösung ungebunden ist. Durch Einlagerung in erzeugte doppelsträngige DNA-Produkten wird die Fluoreszenz messbar. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zu den erzeugten DNA-Produkten eines jeden Zyklus und das Fluoreszenzsignal steigt über die Grundlinienfluoreszenz an. Ein Fluoreszenzsignal über diesem Schwellenwert kann als echtes Signal betrachtet werden und die Anzahl der PCR-Zyklen, die erforderlich sind, um diese Schwelle zu überschreiten, wird

als Zyklusschwellenwert (Ct-Wert) bezeichnet (Arya et al., 2005). Ein niedriger Ct-Wert zeigt an, dass die Amplifikation in früheren Zyklen erreicht wurde und dass das DNA-Ausgangsmaterial reichlich in der Probe vorhanden war. Die vergleichende Quantifizierung (effizienzkorrigierte Ct-Methode) wurde verwendet, um die Differenz der Ct-Werte zwischen den Testproben und der Kalibratorprobe in ein Kopienzahlverhältnis umzuwandeln. Die Proben wurden in Duplikaten gemessen und eine Negativkontrolle, ein Mastermix ohne Template-DNA, wurde mitgeführt. Zur Sicherstellung der Spezifität in jedem Reaktionsgefäß, wurde für jeden Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

	Temperatur	Zeit	PCR Reaktionsschritt
	95 °C	15 Min	Polymerase Aktivierung
	95 °C	10 Sek	Denaturation
35x	50 °C	15 Sek	Annealing
	74 °C	20 Sek	Elongation
	62 °C – 95 °C, in 1 °C Schritten		Schmelzkurve

PCR Reagenz	Volumen
10x PCR Puffer	1 µl
BSA (1 µg/µl)	1 µl
SYBR Green (1:1000)	0.1 µl
10 mM dNTPs	0.2 µl
StroS2	0.3 µl
StroAS1	0.3 µl
mgcl	0.4 µl
Taq-Polymerase	0.05 µl
H ₂ O	4.65 µl
Kalibrator oder DNA	2 µl

3.2.14. ELISA

3.2.14.1. Bestimmung der Maus-Mastzellprotease 1 im Blut von Mäusen

Die Quantifizierung von Maus-Mastzellprotease 1 (mMCPT-1) im Plasma wurde mit dem Mouse MCPT-1 (mMCPT-1) Uncoated ELISA Kit (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Österreich) durchgeführt. Die 96-Well-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit einem 1:250 in Beschichtungspuffer verdünnten Capture-Antikörper in 50 µl pro Well beschichtet. Die Platten wurden mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und 2 h lang mit 100 µl 1 x Assay-Diluent pro Vertiefung blockiert. Die Platten wurden mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 50 µl Plasma, 1:20 verdünnt in 1 x Assay-Verdünnungsmittel, pro Vertiefung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Platten wurden mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 50 µl Detektionsantikörper pro Vertiefung, 1:250 verdünnt in 1 x Assay-Verdünnungsmittel, 1 h lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und mit 50 µl Avidin-HRP-Antikörper pro Vertiefung, 1:250 verdünnt in 1 x PBS-1% BSA, 30 Min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden mit ELISA-Waschpuffer gewaschen, die Proben wurden mit 50 µl TMB-Substrat entwickelt und nach 10-15 Min mit 25 µl ELISA-Stopplösung gestoppt. Die Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen. Die OD wurde mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die mMCPT-1-Konzentrationen der Seren wurden anhand einer seriellen Verdünnung eines Standards mit bekannten Konzentrationen berechnet.

3.2.14.2. Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen und BAL

Zum Nachweis von Zytokinen (IL-5 und IL-13) aus Zellkulturüberständen wurden Sandwich-ELISAs nach dem Protokoll des Lieferanten (RnD) durchgeführt. Die ELISA-Platten wurden über Nacht bei Raumtemperatur in PBS mit einem für das entsprechende Zytokin spezifischen Antikörper beschichtet. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Platten 2 h lang bei Raumtemperatur mit 1 % PBSA blockiert. Die blockierten Platten wurden entweder in Blocking-Puffer bei -20 °C gelagert oder direkt mit den Proben und einer seriellen Verdünnung des Standards für mindestens 4 h oder über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde ein zweiter Antikörper gegen das spezifische Protein für 2 h zugegeben. Zum Nachweis wurde eine Meerrettichperoxidase (HRP) verwendet, die den Farbwechsel eines zugeführten Substrats katalysiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Ansäuern mit 2 M Schwefelsäure gestoppt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde die Platte dreimal gewaschen. Die Inkubation erfolgte stets bei Raumtemperatur und im Dunkeln.

3.2.15. Quantifizierung von *S. rattii*-spezifischen Antikörpern im Blutplasma

Die 96-Well-Platten wurden über Nacht bei 4 °C mit einem 50 µl/Well *S. rattii*-Lysat (2,5 µg/ml) in PBS beschichtet. Nach dreifachem Waschen mit ELISA-Waschpuffer wurden die Platten mit 100 µl/Well ELISA-Blockierungspuffer für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Nach erneutem Waschschrift wurden die Seren in Duplikaten auf die Platte aufgetragen, die zuvor für die Titer-Bestimmung seriell in Assay-Diluent verdünnt worden waren. Die Platten wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend 5-mal gewaschen. Dann wurden die Platten 1 h bei Raumtemperatur mit HRP-gekoppeltem anti-Maus IgM, IgG1, IgG2b inkubiert. Nach erneuter 5-fachen Waschung wurden die Platten mit 50 µl/Well ELISA-Substratlösung für 15 Min entwickelt und mit 25 µl/Well ELISA-Stopplösung abgestoppt. Die photometrische Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Ig-Titerbestimmung erfolgte durch Serum-Verdünnung, deren OD450 über dem doppelten Detektionshintergrund lag.

3.2.16. Legendplex von der überständen der T-Zellstimulationen

Der Bead-basierte Immunoassay LEGENDplex von BioLegend ermöglicht die simultane Analyse mehrerer Zytokine in einer einzigen Probe. Das Verfahren basiert auf dem Prinzip des Sandwich-ELISAs. Dabei werden fluoreszierende Beads eingesetzt, die sich in Größe und Fluoreszenzintensität unterscheiden und spezifische Antikörper tragen, um einen bestimmten Analyten zu erkennen. Gemäß den Angaben des Herstellers wurde ein muriner LEGENDplex mit den Zytokinen IL-2, 4, 5, 6, 9, 10, 13, 17A, 17F, 22, Interferon (IFN)- γ and Tumornekrose Faktor (TNF)- α in einem Volumen von 10 µL durchgeführt. BAL-Proben wurden unverdünnt verwendet wurden. Proben und Beads wurden über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden mit einem sekundären, biotinylierten Antikörper gebunden, der wiederum mit Streptavidin-Phycoerythrin (SA-PE) reagierte. Die Intensität des Fluoreszenzsignals im PE-Kanal korrelierte daher mit der Menge des gebundenen Analyten und wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen.

3.2.17. Genotypisierung der CD160 K.O. und RAG K.O. CD160 K.O. Mäuse

Die Genotypisierung von Mäusen wurde mittels Restriktionslängenfragment-Polymorphismus durchgeführt. Die Mäuse wurden mit einer Ohrstanze markiert und die Ohrgewebeprobe wurden für die Genotypisierung entnommen. Zum Lysieren des Gewebes wurden 100 µl Lysepuffer hinzugefügt und über Nacht bei 56 °C und 150 U/Min inkubiert. Anschließend wurden genomische DNA-Sequenzen, die aus der Zielregion bestehen, durch PCR unter Verwendung des Lysats als Matrize amplifiziert (siehe PCR-Mischung und Zyklen unten). Die erfolgreiche und spezifische Amplifikation wurde durch Agarosegel-Elektrophorese (1 % Agarose in TBE-Puffer) überprüft. Anschließend wurden die PCR-Produkte mit einem Enzym verdaut, das spezifisch für die Wildtyp-Sequenz ohne durch CRISPR/Cas9 eingeführte Indel-Mutationen ist. Dadurch wird die Wildtyp-DNA in zwei kleinere Fragmente verdaut, während

die modifizierte DNA in ihrer ursprünglichen Größe erhalten bleibt. Damit ist die Unterscheidung von Wildtyp, heterozygoten und homozygoten Mäusen durch Agarosegel Elektrophorese (2 % Agarose in TBE-Puffer) möglich (Abbildung 4).

PCR Reagenz	Volumen		
10x green Reaktionspuffer	5 µl		
dNTPs (2 mM)	5 µl		
CRISS_fw	0.5 µl		
CRISS_rev	0.5 µl		
Dream Taq	0.25 µl		
H ₂ O	37.75		
Lysat	1 µl		

	Temperatur	Zeit	PCR Reaktionsschritt
	95°C	5 Min	Denaturierung
	95°C	30 Sek	Denaturierung
35x	58°C	30 Sek	Annealing
	72°C	30 Sek	Elongation
	72°C	5 Min	Finale Elongation

Enzymatischer Verdau mit Bpu10I (Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland)

Verdaureagenz	Volumen		
Reaction buffer (10x)	1 µl		
Bpu10I	0.5 µl		
PCR Produkt	5 µl		

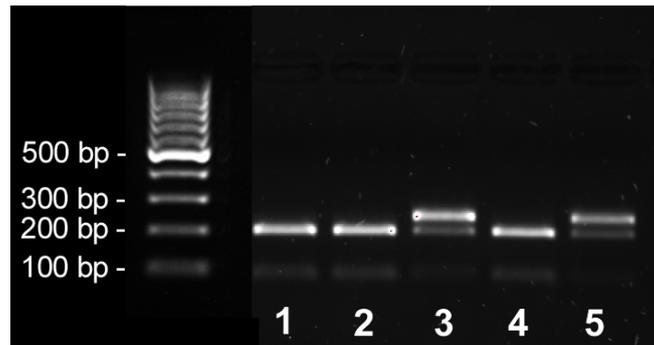


Abbildung 4 Genotypisierung von CD160 K.O. Mäusen:

Die PCR-Produkte wurden mit Bpu10I verdaut und die Größe erneut durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Die Größe der PCR-Produkte ist anhand der 500 Basenpaar (bp)-Leiter angegeben. Gezeigt sind repräsentative Auftrennungen der DNA der jeweiligen Mausgruppen. Die Reihen setzen sich wie folgt zusammen: 1: Kontrolle des enzymatischen Verdauens mit einer WT Maus Probe, 2: CD160 K.O. Maus, 3: WT Maus, 4: RAG K.O. x CD160 K.O. Maus, 5: RAG K.O. Maus.

3.2.18. Genotypisierung des RAG K.O. und RAG K.O. x HVEM K.O. Hintergrund

RAG-K.O. Mäuse haben kleine Lymphorgane und sind defizient für B- und T-Lymphozyten [81]. Somit wurde die Genotypisierung mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Lymphozyten aus Blutproben oder Milzzellen wurden nach B- und T-Zellen gefärbt (siehe unten). HVEM K.O. Mäuse exprimieren kein HVEM [78] und wurden ebenfalls durchflusszytometrisch genotypisiert. Als Marker wurde der T-Zellrezeptor CD3 für T-Zellen, und das „B-lymphocyte antigen“ CD19 für B-Zellen gefärbt (Abbildung 5 A). Der HVEM-Defizienz wurde mittels HVEM-Expression überprüft (Abbildung 5 B)

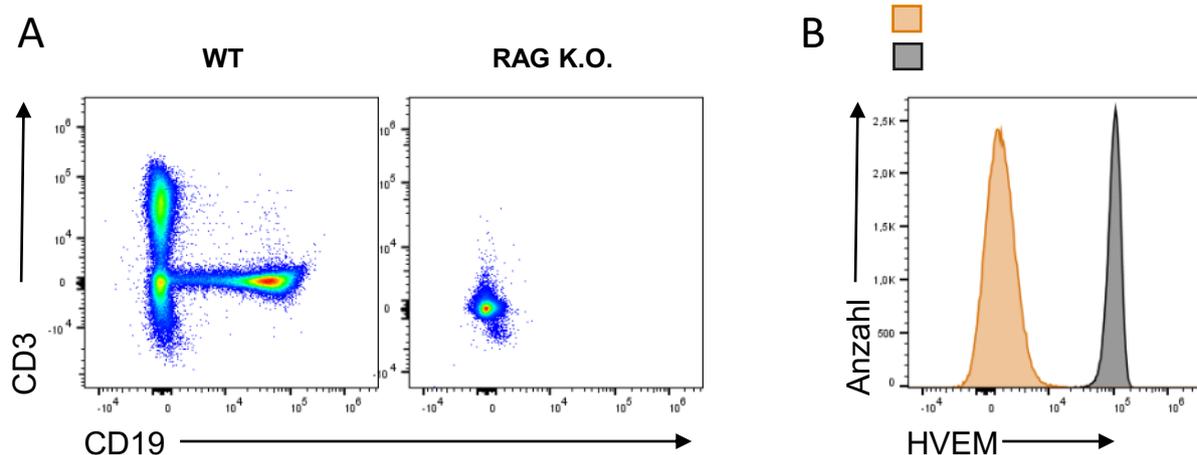


Abbildung 5 Genotypisierung von RAG K.O. und RAG K.O. x HVEM K.O. Mäusen:

Immunkompetente WT, RAG K.O. (Schwarz) und RAG K.O. x HVEM K.O. (Orange) Mäusen wurde Blut abgenommen und durchflusszytometrisch analysiert. Lebende Zellen wurden nach A: CD3 und CD19 und B: HVEM gefärbt.

4. Ergebnisse

4.1. Die Rolle des HVEM-Netzwerks während der *Strongyloides ratti* Infektion

Die Untersuchung der Rolle des HVEM-Netzwerks bei der Kontrolle einer Infektion mit *S. ratti* ist ein zentraler Forschungspunkt der AG Breloer. Mäuse, denen entweder der negativ-regulierende Rezeptor BTLA oder sein Ligand HVEM fehlten, zeigten an Tag 6 p.i. eine geringere Wurmlast und eine reziprok erhöhte IL-9-Produktion und Mastzellenaktivierung [40]. Dies deutet darauf hin, dass die Bindung von HVEM an BTLA die Immunantwort gegen *S. ratti* hemmt. Ferner scheinen die von BTLA vermittelten negativen Signale die von HVEM vermittelten positiven Signale zu dominieren, da sowohl die BTLA- als auch HVEM-Defizienz zu einer Verstärkung der Immunantwort gegen *S. ratti* führte [40]. In dieser Doktorarbeit wurde die Bedeutung der alternativen HVEM-Liganden LIGHT und CD160 untersucht, um das regulatorische HVEM-Netzwerk in der *S. ratti* Infektion weiterführend aufzuklären. Deswegen wurde zunächst die Parasitenlast im Verlauf der *S. ratti* Infektion in Mäusen, denen LIGHT oder CD160 fehlen, untersucht (Abbildung 6). LIGHT K.O. [77] und CD160 K.O. [76] Mäuse hatten an Tag 2 p.i. ähnliche Larvenlasten im Kopf wie WT Mäuse (Abbildung 6 A). Auch an Tag 6 p.i. konnten sowohl in LIGHT K.O. als auch in WT Mäusen vergleichbare Wurmlasten (i.e. etwa 130 adulte *S. ratti*, im Dünndarm) beobachtet werden (Abbildung 6 B). Im Gegensatz dazu, führte die CD160-Defizienz in Mäusen zu einer signifikanten Verringerung der Anzahl von adulten *S. ratti* im Dünndarm, von 130 auf etwa 70 Würmer im Mittelwert (Abbildung 6 B).

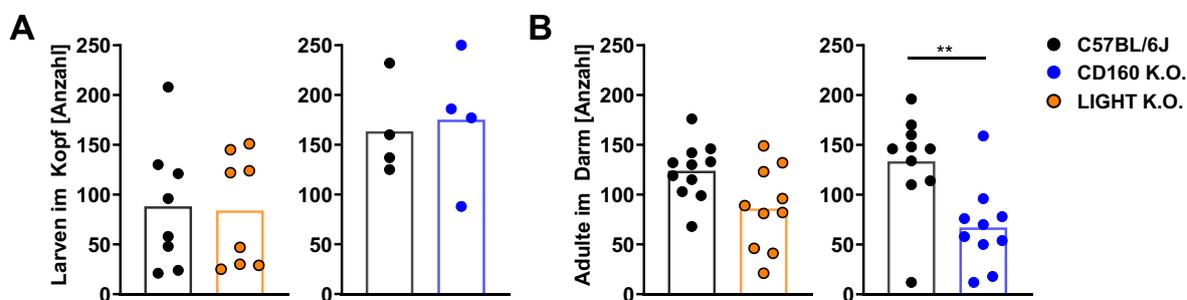


Abbildung 6 *S. ratti* Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von LIGHT und CD160: 8-10 Wochen alte C57BL/6J-Wildtyp Mäuse (schwarze Symbole), LIGHT K.O. [65] (orangene Kreise), oder CD160 K.O. [64] (blaue Kreise) Mäuse wurden s.c. mit 1000 *S. ratti* L3 infiziert. (A) Larvenlasten im Kopf wurden an Tag 2 p.i. und (B) Wurmlasten im Dünndarm wurden an Tag 6 p.i. gezählt. Jedes Symbol repräsentiert eine einzelne Maus, die Balken zeigen den Mittelwert, Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Mittelwerts (** $p \leq 0.01$, Students t-test). Gezeigt sind zwei Experimente $n \geq 2$ pro Experiment und Gruppe.

Es konnte somit keine signifikante Auswirkung von LIGHT auf die Kontrolle der wandernden Larven oder der adulten Würmer im Darm beobachtet werden. CD160 scheint ebenfalls keinen Einfluss auf die Immunabwehr gegen *S. ratti* Larven im Gewebe zu haben, jedoch eine Rolle bei der Kontrolle von adulten *S. ratti* Parasiten im Darm zu spielen. Um diese Rolle von CD160

im Darm genauer zu verstehen, wurden nachfolgend die CD160-exprimierenden Zellen im Darm identifiziert.

4.2. Charakterisierung der CD160 Expression auf intestinalen Lymphozyten

Basierend auf publizierten Studien exprimieren neben ILC1 [82], CD4⁺ T-Zellen [63] und $\gamma\delta$ T-Zellen [83] vor allem zytotoxische Zellen wie NK-Zellen [62,83,84], CD8⁺ T-Zellen [84] und NKT-Zellen [62] CD160. Zusätzlich wurde in WT und RAG K.O. Mäusen eine Population von CD160-exprimierenden intestinalen-intraepithelialen Lymphozyten (iIEL) beschrieben, die mit ILC1- und/oder NK-Zellen identisch sein könnten [85]. Dies schließt jedoch andere Zelltypen wie ILC2 und ILC3 nicht aus, deren CD160 Expression noch nicht untersucht wurde. Obwohl die Isolierung lebensfähiger Darmzellen aus Mäusen mit intestinalen Wurminfektionen eine große Herausforderung darstellt, konnte gemäß den Referenzen [86,87] ein Protokoll etabliert werden, durch das mehr als 90 % lebensfähige „intestinal lamina propria lymphocytes“ (LPL) präpariert werden konnten. Es wurde eine Färbestrategie für die verschiedenen Lymphozytenpopulationen des Darms entwickelt, indem anhand von Oberflächenmarkern B-Zellen als CD19⁺ und T-Zellen als CD3⁺ identifiziert wurden. Des Weiteren wurden mit CD4 und CD8 zwischen CD4⁺ T-Helferzellen (TH) und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen unterschieden. Die übrigen, CD4⁻ und CD8⁻ T-Zellen wurden als NKT- oder $\gamma\delta$ T-Zellen klassifiziert (Abbildung 7 A). Zusätzlich wurden die Zellen des angeborenen Immunsystems differenziert, indem verschiedene ILC-Subtypen anhand ihrer spezifischen Transkriptionsfaktoren identifiziert wurden. Innerhalb der CD90.2⁺, aber CD3⁻ und CD19⁻ Zellen, wurden NK-Zellen als EOMES⁺, ILC2 als GATA-3⁺, ILC3 als ROR γ t⁺ Zellen definiert. ILC1 wurden als die verbleibenden (CD90.2⁺, aber CD3⁻, CD19⁻, ROR γ t⁻, GATA-3⁻, EOMES⁻) Zellen mit variabler Expression von „killer cell lectin-like receptor subfamily B member 1C protein“ (NK.1.1, CD161b) identifiziert (Abbildung 7 C). Auf den jeweiligen Zellpopulationen wurde CD160 gefärbt. Um die Spezifität der CD160 Färbung zu validieren, wurden LPL aus CD160 K.O. Mäusen als Kontrolle nach demselben Schema gefärbt (Abbildung 7 B&D).

Die in der Literatur beschriebene Expression von CD160 auf CD4⁺ T-Zellen, CD8⁺ T-Zellen [83] NK-Zellen [62,83,84] und ILC1 [82], wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. In LPL aus WT Mäusen exprimierten CD160 etwa 10 % der CD4⁺-, fast die Hälfte der CD8⁺- und ein Drittel der NKT-Zellen. Die B-Zellen exprimierten erwartungsgemäß kein CD160 (Abbildung 7 B). Des Weiteren exprimierten mehr als die Hälfte der NK-Zellen und etwa 20 % der ILC1 CD160 (Abbildung 7 D). Es ist hervorzuheben, dass alle CD160⁺ ILC1 ebenfalls NK.1.1. exprimierten. Zusätzlich wurde eine CD160 Oberflächenexpression erstmals auf ILC2 und ILC3 gemessen: Etwa 40 % der ILC2 und knapp 20 % der ILC3 exprimierten CD160. Die Spezifität dieser Färbung wurde überprüft indem in CD160 K.O. Mäusen präparierten LPL erwartungsgemäß keine CD160-Expression gemessen wurde (Abbildung 7 D).

Zusammengefasst exprimierten sowohl intestinale Zellen des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems CD160. Zusätzlich zu der bereits bekannten Expression von CD160 durch T-Zellen und NK-Zellen wurde hier gezeigt, dass auch ILC2 und ILC3 im Dünndarm CD160 exprimieren. Vor allem CD4⁺ T-Zellen und ILC2 spielen während einer TH2 Antwort bei Wurminfektionen im Allgemeinen [3] und auch spezifisch bei *S. rattii* Infektionen [15,23] eine wichtige Rolle. Daher sind diese Zellen für folgende Analysen bedeutungsvoll.

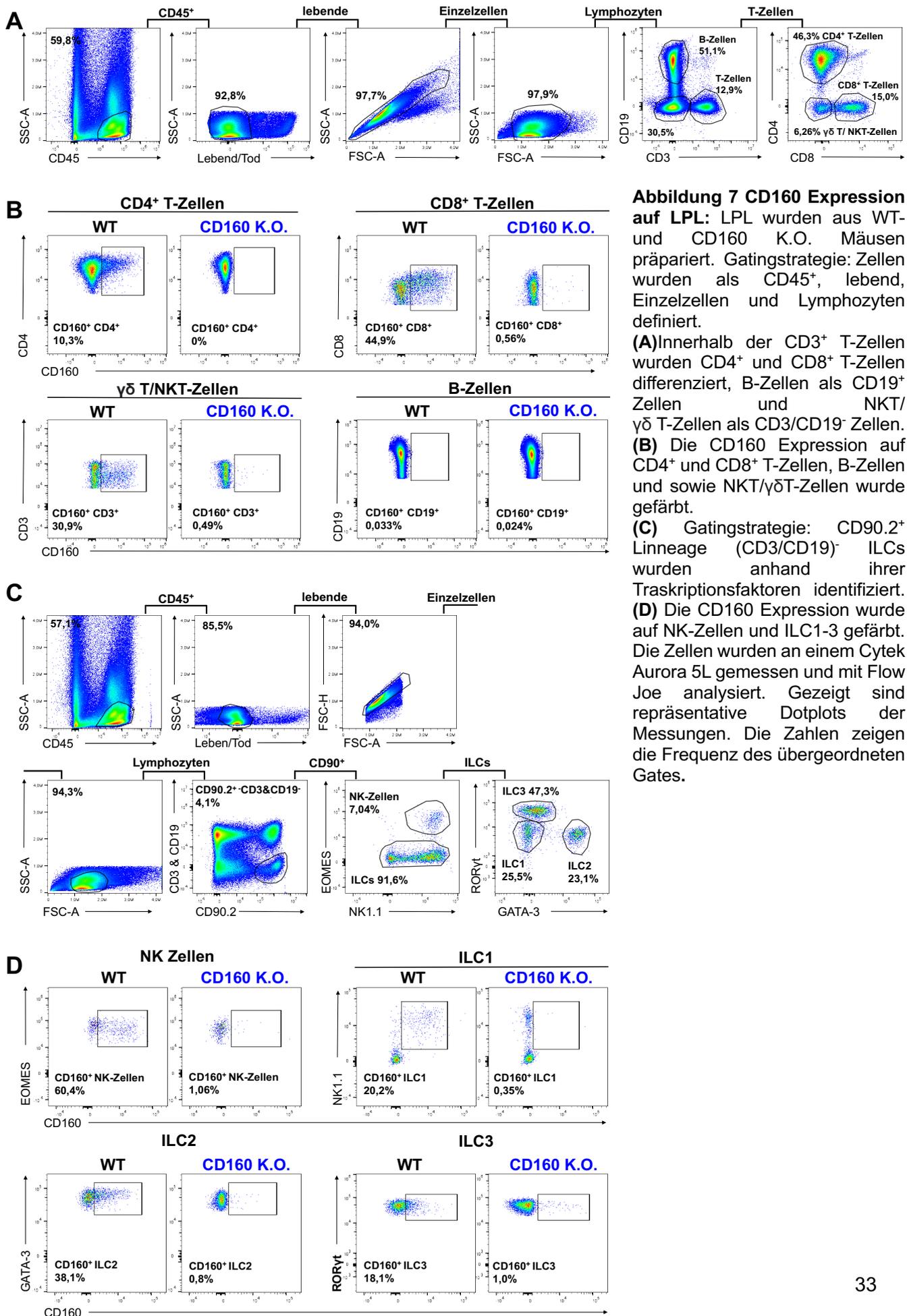


Abbildung 7 CD160 Expression auf LPL: LPL wurden aus WT- und CD160 K.O. Mäusen präpariert. Gatingstrategie: Zellen wurden als CD45⁺, lebend, Einzelzellen und Lymphozyten definiert.

(A) Innerhalb der CD3⁺ T-Zellen wurden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen differenziert, B-Zellen als CD19⁺ Zellen und NKT/ $\gamma\delta$ T-Zellen als CD3/CD19⁻ Zellen.

(B) Die CD160 Expression auf CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, B-Zellen und sowie NKT/ $\gamma\delta$ T-Zellen wurde gefärbt.

(C) Gatingstrategie: CD90.2⁺ Lineage (CD3/CD19)⁻ ILCs wurden anhand ihrer Transkriptionsfaktoren identifiziert.

(D) Die CD160 Expression wurde auf NK-Zellen und ILC1-3 gefärbt. Die Zellen wurden an einem Cytek Aurora 5L gemessen und mit Flow Joe analysiert. Gezeigt sind repräsentative Dotplots der Messungen. Die Zahlen zeigen die Frequenz des übergeordneten Gates.

4.3. Die Rolle von CD160 bei der Kontrolle der *S. ratti* Infektion

Um den Einfluss von CD160 auf die Kinetik der *S. ratti* Infektion zu untersuchen, wurden WT und CD160 K.O. Mäuse mit *S. ratti* infiziert und die Wurmlast zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion bestimmt (Abbildung 8 A und B). Da in WT Mäusen sowohl Zellen des adaptiven Immunsystems wie T- und NKT-Zellen als auch Zellen des angeborenen Immunsystems CD160 exprimieren, wurden CD160 K.O. Mäuse mit dem RAG K.O.-Hintergrund gekreuzt und ebenfalls untersucht (Abbildung 8 C und D). Die Abwesenheit von T- und B-Zellen bei RAG K.O. Mäusen ermöglicht die selektive Untersuchung des Einflusses von CD160⁺ Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NK-Zellen und ILC1-3, auf den Verlauf der *S. ratti* Infektion.

Zum Höhepunkt der Parasitenlast im Gewebe am Tag 2 p.i. konnten keine signifikanten Unterschiede der Larvenlast im Kopf der Mäuse in Gegenwart oder Abwesenheit von CD160 festgestellt werden (Abbildung 8 A und B: Gewebe). WT- und CD160 K.O. Mäuse hatten im Mittel 180 Larven im Kopf, während RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse im Mittel 70 Würmer aufwiesen. Darüber hinaus wanderten L3 mit vergleichbarer Kinetik aus den Geweben aus und konnten am Tag 4 p.i. nicht mehr nachgewiesen werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die ersten Larven bereits im Dünndarm der Mäuse sichtbar, ohne dass ein Unterschied in der Anzahl erkennbar war (Abbildung 8 C & D).

An Tag 6 p.i. hatten CD160 K.O. Mäuse wie auch in Abschnitt 3.1 beschrieben, signifikant weniger Adulte im Dünndarm als WT Mäuse (Abbildung 8 C: Dünndarm). Die Wurmlast wurde zu Tag 8 p.i. auf 5 Adulte bei WT und 2 Adulte bei CD160 K.O. Mäusen gleichermaßen reduziert (Abbildung 8 D: Dünndarm) und an Tag 10 p.i. waren in immunkompetenten Mäusen in Gegenwart oder Abwesenheit von CD160 keine Würmer mehr nachweisbar.

Obwohl die RAG K.O. Mäuse die Infektion mit *S. ratti* nie vollständig eliminieren konnten, reduzierten sie die anfänglich hohe Anzahl an Parasiten im Darm von etwa 80 adulten Würmern am Tag 6 p.i. auf 1-5 adulte Würmer am Tag 8-10 p.i. Überraschenderweise reduzierten die RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse diese Anzahl nicht weiter, obwohl sie am Tag 6 p.i. weniger Adulte aufwiesen als RAG K.O. Mäuse. Bis zur abschließenden Analyse am Tag 97 p.i. wurden in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen stets etwa 50 Adulte beobachtet, was der Anzahl der Würmer am Tag 6 der Infektion entspricht. Folglich waren die RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse nicht in der Lage die Wurmlast nach Tag 6 weiter zu reduzieren.

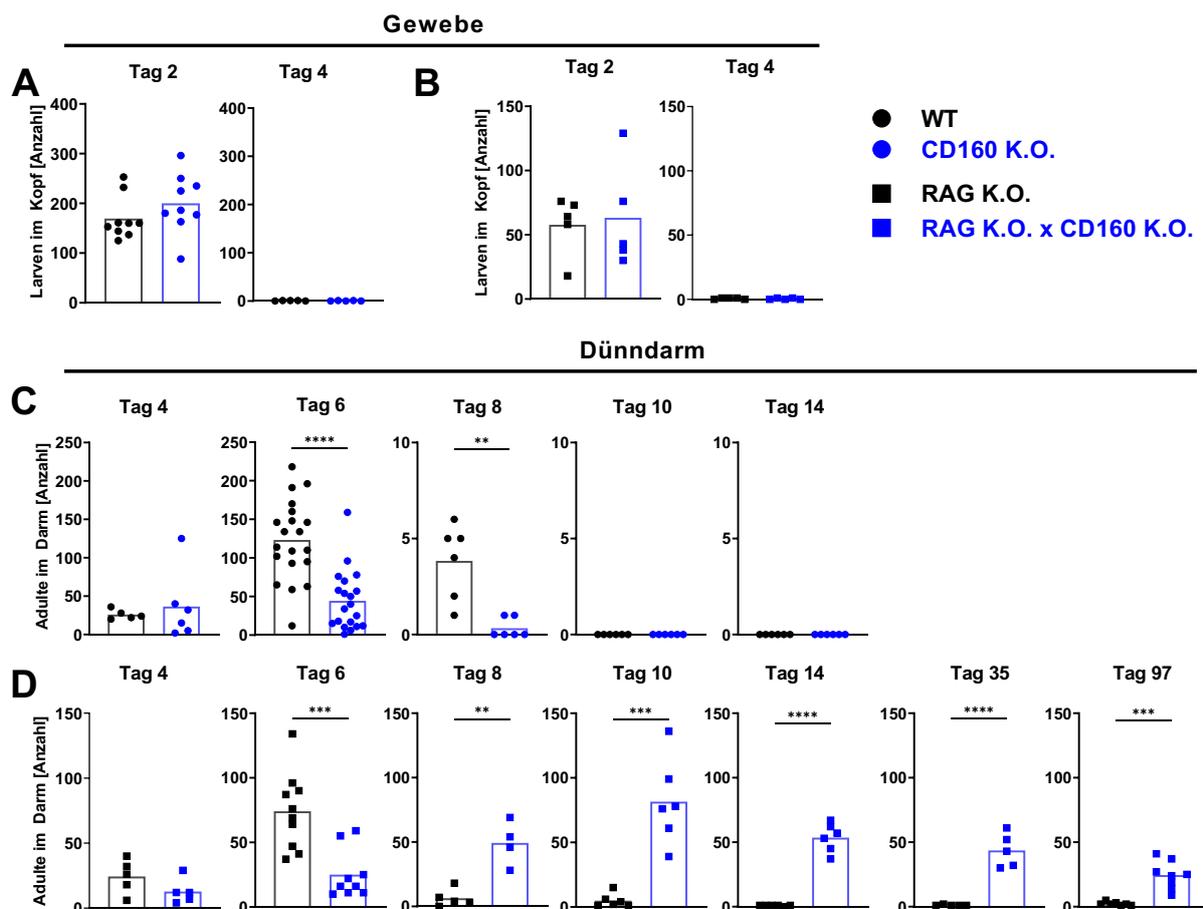


Abbildung 8 Kinetik der *S. ratti* Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von CD160: (A & C) WT (schwarze Kreise) und CD160 K.O. (blaue Kreise) oder (B & D) RAG K.O. (schwarze Quadrate) und RAG K.O. x CD160 K.O. (blaue Quadrate) Mäuse wurden s.c. mit 1000 *S. ratti* L3 infiziert. (A & B) Die Wurmlast in Gewebe und (C & D) Dünndarm wurde an den jeweiligen Zeitpunkten bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, Balken zeigen den Mittelwert. Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Mittelwerts. (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$; Students t-test) Gezeigt sind zwei Experimente mit $n \geq 3$ pro Zeitpunkt, Gruppe und Experiment.

Zusammenfassend konnte kein Beitrag von CD160 zur Kontrolle der wandernden Larven im Gewebe nachgewiesen werden, weder in immunkompetenten noch in immundefizienten Mäusen. Allerdings hatte die CD160-Defizienz einen Einfluss auf die Wurmlast im Darm. Sowohl CD160-defiziente immunkompetente als auch CD160-defiziente immundefiziente Mäuse hatten an Tag 6 der Infektion eine reduzierte Wurmlast, i.e. schienen einen immunologischen Vorteil zu haben. Während immunkompetente Mäuse die *S. ratti* Infektion dann in Gegenwart und Abwesenheit von CD160 mit ähnlicher Kinetik beenden konnten, zeigte sich bei immundefizienten Mäusen eine wichtige Rolle für CD160 bei der späteren Kontrolle der Wurmlast durch das angeborene Immunsystem. CD160-defiziente RAG K.O. Mäuse schienen einen deutlichen Nachteil bei der Klärung der Infektion zu haben. Daher sollen im Folgenden zunächst die Unterschiede in der angeborenen Immunantwort in Abwesenheit und Gegenwart von CD160 untersucht werden, die die erhöhte Wurmlast in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen verursachen könnten. Im zweiten Teil der Arbeit werden die Unterschiede der adaptiven Immunantwort in WT und CD160 K.O. Mäusen analysiert.

4.4. Rolle von CD160 in der Aktivierung mukosaler Mastzellen während einer *S. rattii* Infektion

Die Immunantwort gegen *S. rattii* wird durch eine IL-33 und IL-9 abhängige Mastzellantwort getrieben [15,36]. Die Maus-Mastzellprotease-1 (mMCPT-1) ist eines von vielen Enzymen in den Granula mukosaler Mastzellen, welches bei der Degranulation freigesetzt wird [88]. Die Quantifizierung von mMCPT-1 im Blutplasma von Mäusen dient als Indikator für Mastzell-Degranulation und -Aktivierung. Erhöhte mMCPT-1 Konzentrationen sind zwischen dem 3. und 4. Tag der Infektion mit *S. rattii* nachweisbar, erreichen ihren Höhepunkt zwischen Tag 7 und 14 p.i. und fallen dann nach einem Monat auf das Ausgangsniveau zurück [89]. Um die Rolle von CD160 bei der Kontrolle von *S. rattii* Infektionen genauer zu verstehen, wurde die Mastzellaktivierung in CD160-kompetenten und -defizienten WT (Abbildung 9 A) und RAG K.O. (Abbildung 9 B) Mäusen untersucht. Dafür wurden die Mäuse mit *S. rattii* infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten Blutplasma gewonnen und mMCPT-1 im Blutplasma quantifiziert. Immunkompetente WT und CD160 K.O. Mäuse zeigten an Tag 4 p.i. erstmals nachweisbar mMCPT-1 im Blutplasma mit Konzentrationen von etwa 50 ng/ml. Am Höhepunkt der Infektion, an Tag 6 p.i., erhöhte sich die Konzentration in beiden Genotypen auf etwa 1 µg/ml mMCPT-1. Erst an Tag 14 p.i. hatten CD160 K.O. Mäuse signifikant höhere mMCPT-1 Konzentrationen im Blutplasma im Vergleich zu WT Mäusen. RAG K.O. Mäuse wurden ab Tag 6 p.i. eine hohe Konzentration von etwa 1,2 µg/ml mMCPT-1 im Blutplasma gemessen, während in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse kein signifikanter Anstieg von mMCPT-1 nachweisbar war. An den späten Untersuchungszeitpunkten, Tag 35 und 90 p.i., war in beiden Gruppen kein mMCPT-1 detektierbar. In einer Masterarbeit wurden parallel zu diesen Analysen die Transkription von mMCPT-1 mRNA in Darmgewebe infizierter Mäuse quantifiziert [90]. Die Ergebnisse beschrieben in Übereinstimmung mit dieser Arbeit, dass RAG K.O. Mäuse die mMCPT-1 Transkription im Darm bereits ab Tag 4 p.i. bis Tag 14 p.i. hochregulierten, während es in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse zu keinem Anstieg der mMCPT-1 Expression kam. Zusammenfassend zeigte sich kein Unterschied der Mastzellaktivierung vor Tag 6, welcher die geringere Wurmlast an Tag 6 p.i. in CD160 K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen im Vergleich zu ihren CD160-kompetenten Kontrollen erklären könnte. Es zeigt sich jedoch ein Ausfall der Mastzellaktivierung in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen im Vergleich zu RAG K.O. Mäusen.

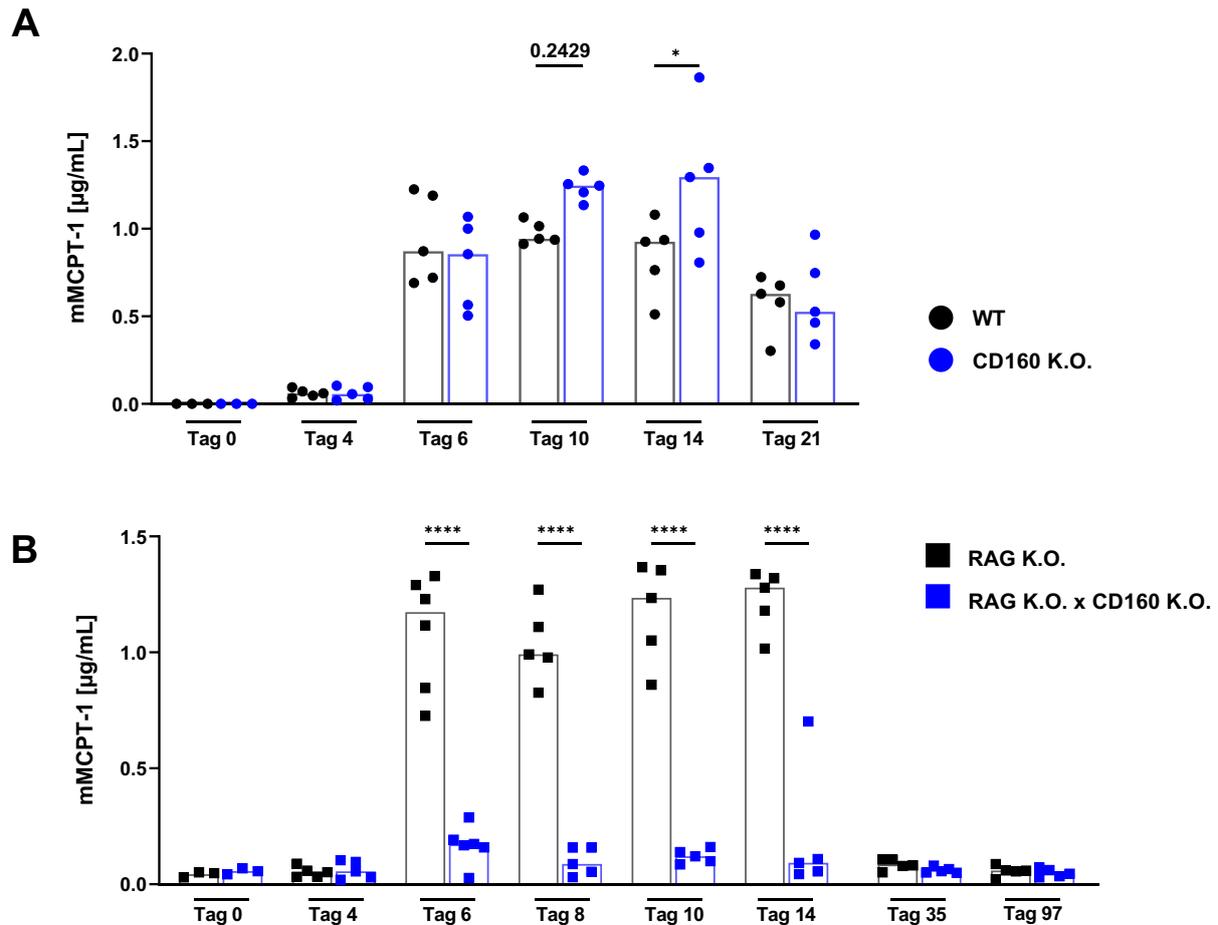


Abbildung 9 Mastzellaktivierung während *S. ratti* Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von CD160: CD160-kompetente (schwarze Symbole) und CD160-defiziente (blaue Symbole) Mäuse mit (A) WT (Kreise) oder (B) RAG K.O. (Quadrate) Hintergrund wurden s.c. mit 1000 *S. ratti* L3 infiziert. An den angegebenen Tagen wurde mMCPT-1 im Plasma der Mäuse mittels ELISA quantifiziert. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT/RAG K.O. und CD160 K.O./ RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen (* $p \leq 0.1$; **** $p \leq 0.0001$ Students t-test). Gezeigt sind zwei Experimente mit $n \geq 2$ pro Experiment, Gruppe und Zeitpunkt.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass CD160 an der Regulation der Mastzellaktivierung durch das angeborene Immunsystem während der *S. ratti* Infektion beteiligt sein könnte. Folgend wurden mukosale Mastzellen aus dem Darm infizierter, immundefizienter Mäuse mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und ihre CD160 Expression untersucht (Abbildung 10). Mastzellen wurden als CD90.2⁻ c-KIT⁺ Fc ϵ RI⁺ Zellen identifiziert (Abbildung 10 A). Obwohl die CD160 Expression auch von Mastzellen beschrieben wurde [57], exprimierten in dieser Doktorarbeit mukosale Mastzellen im Darm kein CD160 auf der Oberfläche (Abbildung 10 B). RAG K.O. Mäuse hatten jedoch an Tag 6. p.i. eine erhöhte Anzahl an Mastzellen im Darm (Mastozytose), während die Frequenz der Mastzellen in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen auf dem Niveau gesunder Mäuse blieb (Abbildung 10 C).

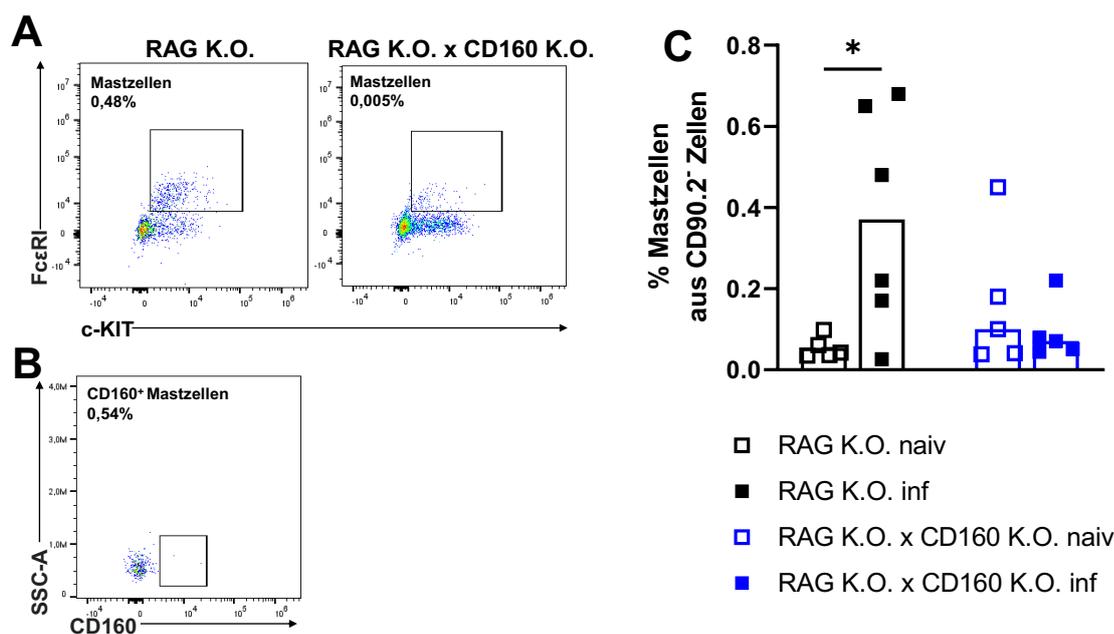
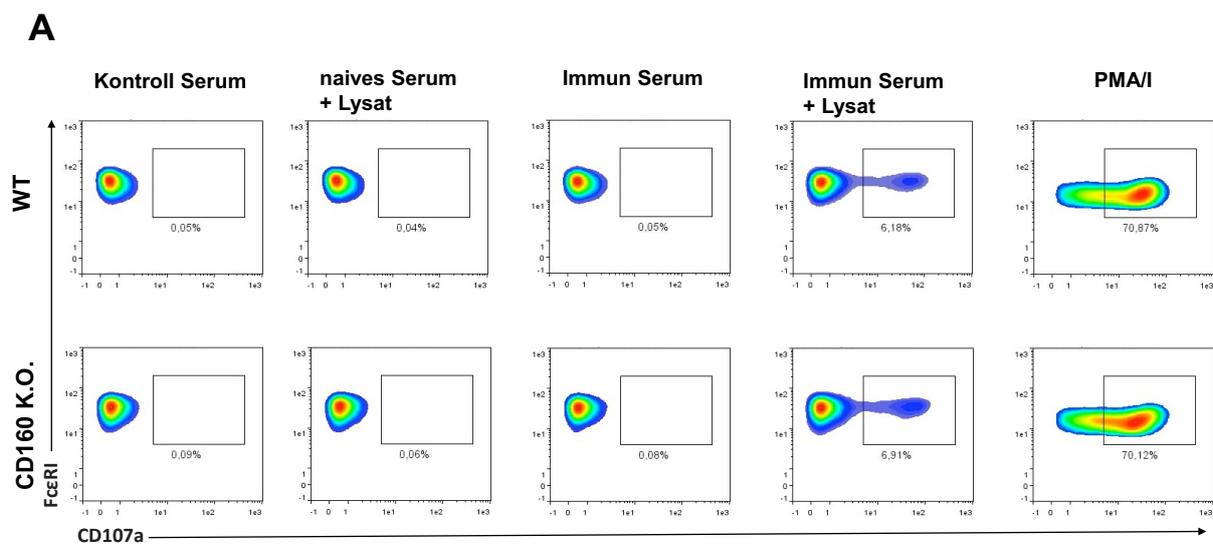


Abbildung 10 Mastzell-Expansion während einer *S. rattii* Infektion in RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen: RAG K.O. (schwarze Quadrate) und RAG K.O. x CD160 K.O. (blaue Quadrate) Mäuse wurden mit s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert (geschlossene Symbole) oder naiv gelassen (offene Symbole). LPL wurden am Tag 6 p.i. isoliert und Mastzellen als lineage⁻ CD90.2⁻ c-KIT⁺ FcεRI⁺ gefärbt. Zusätzlich wurde CD160 gefärbt und die Zellen am Cytek Aurora 5L gemessen. Repräsentative Dotplots zeigen (A) die Frequenz von Mastzellen in den LPL von Tag 6 infizierten RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen und (B) die Frequenz von CD160-exprimierenden Mastzellen. Die Zahlen zeigen die Frequenz der Zellen innerhalb der CD90.2⁻ Leukozyten. (C) Der Graph zeigt die statistische Auswertung der Mastzellfrequenz in den LPL. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen (* $p < 0.1$; **** $p < 0.0001$ Students t-test). Gezeigt sind Daten aus zwei Experimenten mit $n \geq 3$ pro Gruppe und Experiment.

Zusammenfassend wurde in CD160-defiziente RAG K.O. Mäuse eine ausbleibende Mastozytose und eine fehlende Degranulation mukosaler Mastzellen während der *S. rattii* Infektion festgestellt. Da Mastzellen zentrale Effektorzellen in der Immunantwort gegen *S. rattii* sind [32], könnte dies eine der Ursachen für die fehlende Reduktion der Wurmlast in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen im Vergleich zu RAG K.O. Mäusen nach Tag 6 der *S. rattii* Infektion sein.

4.5. Vergleich von CD160-defizienten und -kompetenten Mastzellen

Obwohl Mastzellen *in vivo* kein nachweisbares CD160 exprimierten, kann das Reifen in einer „knock out“ Maus den Phänotyp von Immunzellen unspezifisch beeinflussen. Um einen intrinsischen Mastzelldefekt auszuschließen, wurde die Funktion von WT und CD160 K.O. Mastzellen *in vitro* verglichen. Dafür wurden Mastzellen aus dem Knochenmark (BMMC) von WT und CD160 K.O. Mäusen durch Inkubation mit entsprechenden Wachstumsfaktoren über 4 Wochen generiert. Die Mastzellen wurden stimuliert und die Translokation von CD107a von den Granula auf die Plasmamembran, wurde als Indikator für Mastzelldegranulation mittels Durchflusszytometrie gemessen (Abbildung 11 A). Der Prozentsatz der degranulierten Mastzellen als Reaktion auf eine unspezifische, maximale Stimulation durch PMA/I oder eine FcεRI-vermittelte Aktivierung durch DNP-spezifisches IgE, das durch polyvalentes DNP vernetzt wurde, war in WT- und CD160 K.O. BMMC vergleichbar (Abbildung 11 B). Auch die Aktivierung von BMMC durch Inkubation mit *S. rattii*-spezifischem Immun-Serum und Antigenextrakt aus *S. rattii* L3 (Lysat) verursachte eine effiziente und spezifische Degranulation im gleichen Ausmaß in WT- und CD160 K.O.- BMMC.



B

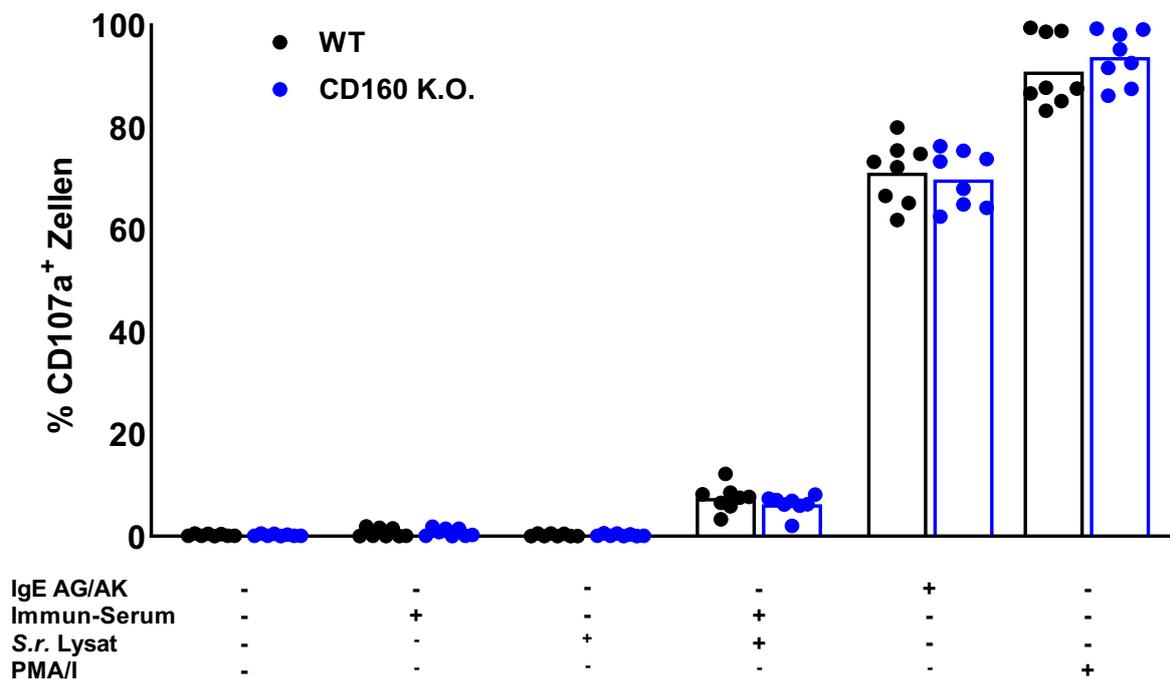
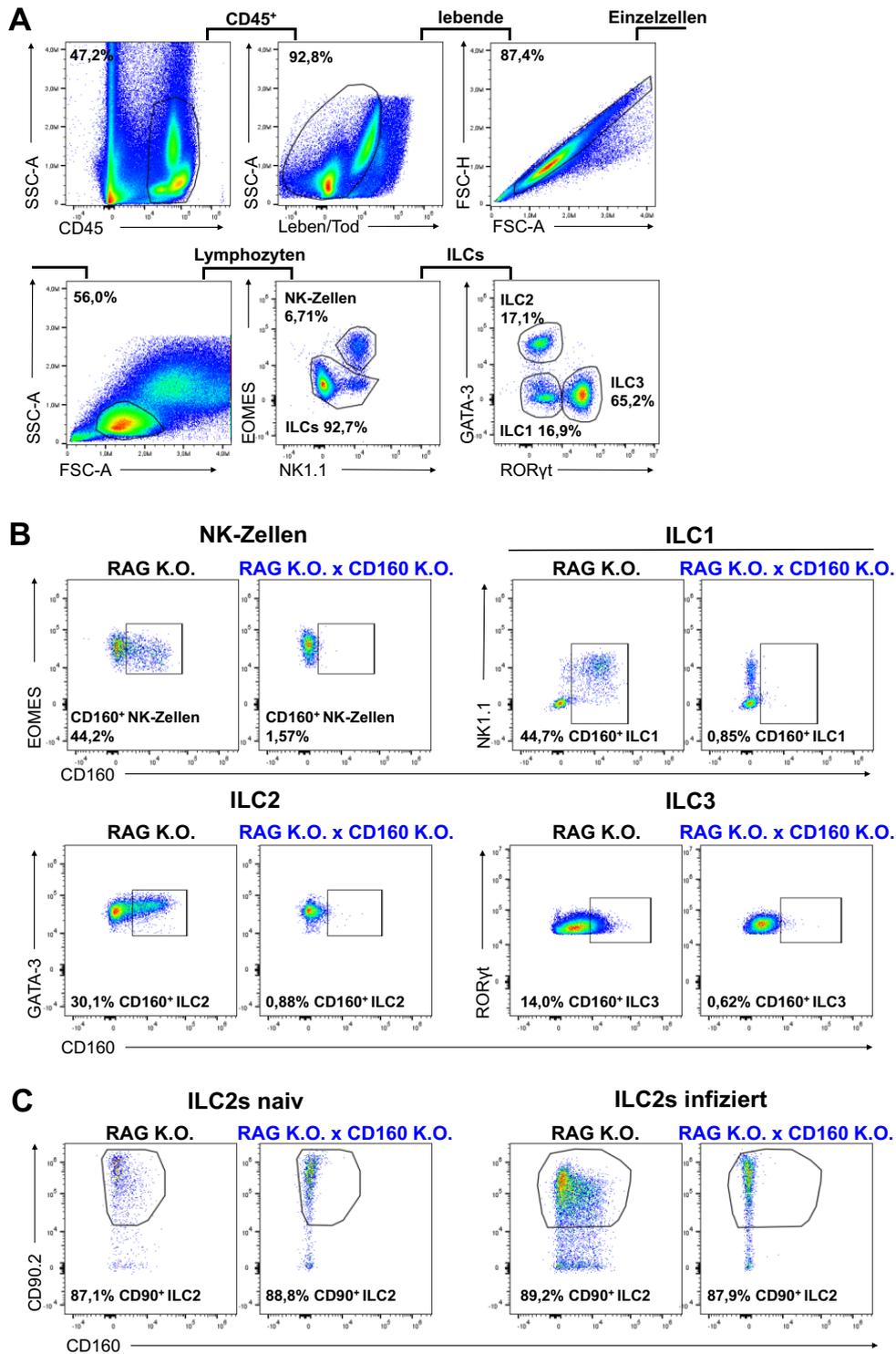


Abbildung 11 Vergleich der Funktion von WT und CD160 K.O. Mastzellen *in vitro*: WT (schwarze Kreise und CD160 K.O. (blaue Kreise) BMMC wurden entweder mit 0.2 $\mu\text{g/ml}$ DNP-spezifischen IgE oder 1:100 verdünnten *S. rattii*-spezifischen Immun Serum über Nacht stimuliert oder unbehandelt gelassen. Nach 24 h wurden die BMMC mit PBS gewaschen und jeweils 2×10^5 entweder mit DNP-HSA oder 100 $\mu\text{g/ml}$ *S. rattii* L3 Lysat für 20 min bei 37°C kultiviert. Negativkontroll BMMCs wurden unstimuliert gelassen und positive Kontroll-BMMC wurden mit 100 ng/ml PMA/I stimuliert. Die BMMC wurden auf die Expression von Fc ϵ RI α , CD107a und c-KIT (CD117) gefärbt und an einem BD Calibur Flow Cytometer analysiert. (A) Repräsentative Dotplots zeigen c-KIT/CD107a Expression auf BMMCs nach angezeigter Stimulation. Die Zahlen zeigen die Frequenzen von CD107a⁺ BMMC innerhalb der BMMC-Kultur (B) Der Graph zeigt die statistische Auswertung, jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT and CD160 K.O. BMMC (** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ Students t-test). Gezeigt sind Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n=4$ pro Experiment und Gruppe.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die verringerte Expansion und Aktivierung von Mastzellen in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen während der Infektion mit *S. rattii* (Abbildung 10 B) nicht auf einen generellen, intrinsischen Defekt ihrer Funktion zurück zu führen ist. Vielmehr scheinen die Mechanismen des angeborenen Immunsystems die während der *S. rattii* Infektion *in vivo* zur Aktivierung der Mastzellen führen, in Abwesenheit von CD160 gestört zu sein.

4.6. Analyse angeborener Immunzellen während einer *S. rattii* Infektion

Die Aktivierung von Mastzellen durch das angeborene Immunsystem wird unter anderem durch die Zytokine IL-3 [91], IL-9 [36] und IL-13 [92] ausgelöst. Eine wichtige Quelle von IL-13 und IL-9 sind ILC2, welche durch IL-33 expandiert und aktiviert werden. Bisherige Arbeiten zeigten, dass die IL-9 und IL-33 getriebene Mastzellaktivierung während einer *S. rattii* Infektion mit der Induktion von ILC2s einher ging [15]. ILC2, aber auch NK-Zellen können nach Stimulation IL-13 sekretieren, welches zur Aktivierung von Mastzellen führen kann [93,94]. In dieser Doktorarbeit exprimieren sowohl intestinale ILC2 als auch NK-Zellen CD160 (Abbildung 7). Um die Rolle von CD160⁺ NK-Zellen und ILC2 während der Wurminfektion zu untersuchen, wurden RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse mit *S. rattii* infiziert. LPL und Milzzellen wurden am Tag 6 p.i. isoliert und die Frequenz unterschiedlicher Immunzellen und ihre CD160 Expression mit denen der naiven Mäuse verglichen (Abbildung 12). In RAG K.O. Mäusen verdoppelte sich die Frequenz der ILC2 im Darm, während ILC1 und ILC3 auf dem Niveau gesunder Mäuse blieben (Abbildung 12 D). Auch NK-Zellen expandierten im Darm von RAG K.O. Mäusen während der Infektion, diese Expansion erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. In *S. rattii* infizierten RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen expandierten weder NK-Zellen noch ILC2s. In der Milz konnten keine Unterschiede zwischen allen 4 Gruppen beobachtet werden (Abbildung 12 D). Die Frequenz CD160-exprimierender NK-Zellen, ILC1 und ILC3, war im Darm *S. rattii* infizierter und naiver RAG K.O. Mäuse gleich (Abbildung 12 D). Die erhöhte Frequenz CD160-exprimierender ILC2 im Darm, spricht für eine wichtige Rolle geweberesidenten, am Infektionsort lokalisierter ILC2, bei der Abwehr von *S. rattii*. Geweberesidente „natürliche (n) ILC2“ wurden als Lin⁻ CD90^{hi} KLRG1^{int} und „inflammatorische (i) ILC2“ als Lin⁻ CD90^{low} KLRG1^{hi} beschrieben [95]. Demnach wurde die CD90.2 Expression der GATA3⁺ ILC2 in RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen analysiert, um die ILC2 Populationen genauer zu charakterisieren (Abbildung 12 C). Die ILC2 aller 4 Gruppen waren aufgrund ihrer hohen CD90.2 Expression zu 90% eher mit nILC2 zu vergleichen. Die Analyse von CD90.2⁺ CD160⁺ nILC2 bzw. CD90.2⁻ CD160⁺ iILC2 zeigte, dass die Expression von CD160 nicht spezifisch für eine bestimmte ILC2-Untergruppe war (Abbildung 12 C).



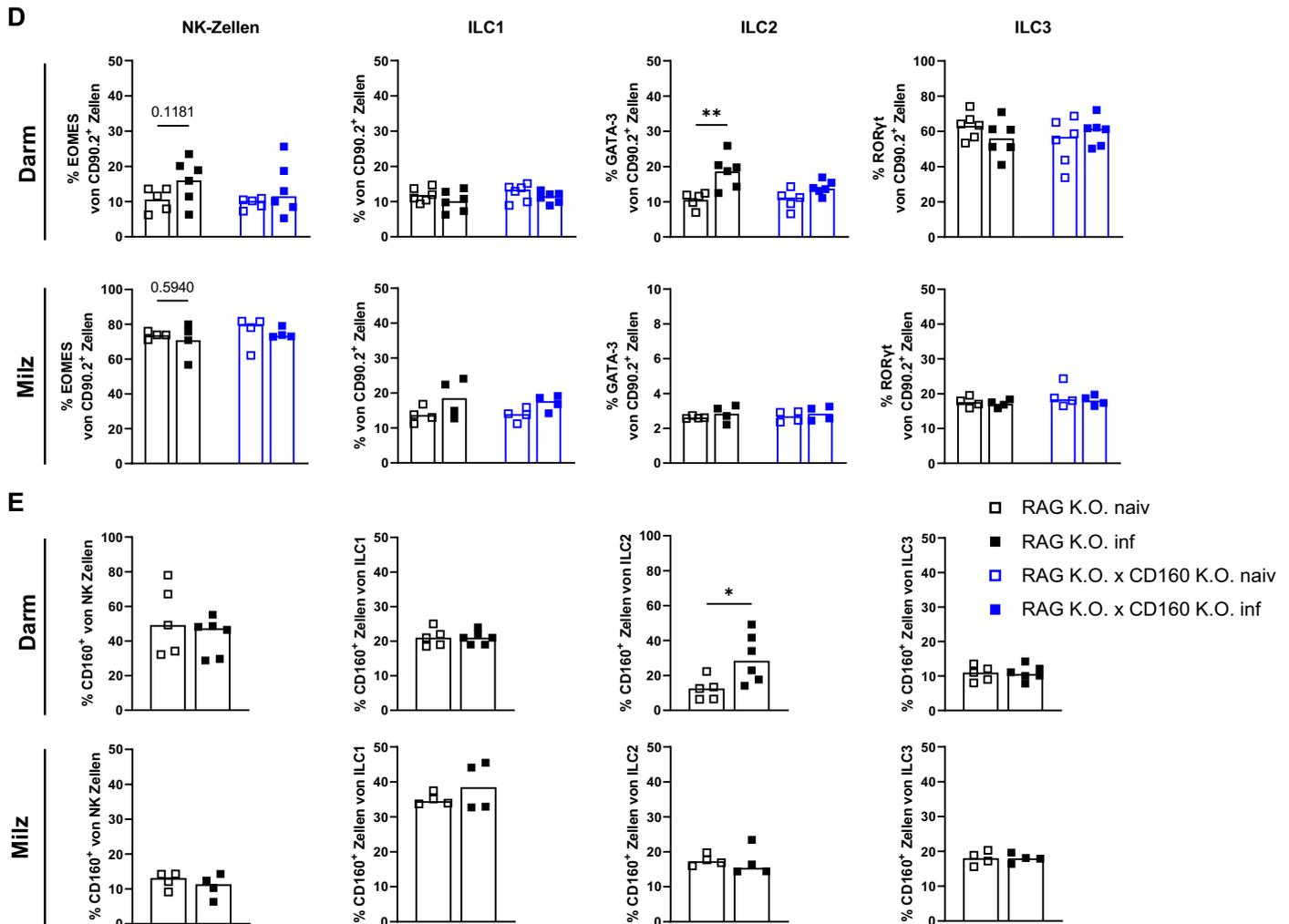


Abbildung 12 Durchflusszytometrische Analyse von LPL und Milzzellen während einer *S. rattii* Infektion in CD160-kompetenten und -defizienten RAG K.O. Mäusen: RAG K.O. (schwarze Quadrate) und RAG K.O. x CD160 K.O. (blaue Quadrate) Mäuse wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert und an Tag 6 der Infektion geopfert (geschlossenen Symbole) oder naiv gelassen (offene Symbole). LPL und Milzzellen wurden aus RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen präpariert und ILCs anhand ihrer Transkriptionsfaktoren identifiziert (A). Die CD160 Expression wurde auf NK-Zellen und ILC1-3 gefärbt (B) und geweberesidente GATA⁺ ILC2 als CD90.2⁺ identifiziert (C). Die Frequenz (D) und die CD160 exprimierenden NK-Zellen und ILC1-3 wurde in den LPL und Milzzellen bestimmt. Gezeigt sind repräsentative Dotplots der Messungen. Die Zahlen zeigen die Frequenz des übergeordneten Gates. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven und *S. rattii* infizierten Mäusen (* $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.001$ Students t-test). Gezeigt sind kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n \geq 3$ pro Experiment und Gruppe.

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass sich ILC1 und ILC3 Populationen in Frequenz und CD160 Expression während der *S. rattii* Infektion nicht veränderten. NK-Zellen und ILC2 expandierten an Tag 6 der *S. rattii* Infektion. Diese Expansion war in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen beeinträchtigt. Zusätzlich erhöhte sich die Frequenz CD160 positiver ILC2 während der *S. rattii* Infektion im Darm. Um zu prüfen, ob neben der Expansion auch die Funktion von CD160-defizienten ILC2 gestört ist, sollte im Folgenden die Zytokinproduktion von CD160-kompetenten und -defizienten ILC2 verglichen werden. Die Zytokinproduktion von

intestinalen ILC2 *in vivo* während der *S. rattii* Infektion, konnte nicht analysiert werden. Die hochsensiblen Darmzellen starben während der Stimulation, bevor ausreichend Zytokine produziert wurden, um sie im Überstand zu messen oder intrazellulär zu färben. So war es in dieser Doktorarbeit nicht möglich ein Zeitfenster der Stimulation zu finden, dass bereits messbare intrazelluläre Zytokinproduktion in ILC2 induzierte, aber noch die Isolation lebender Zellen für die Analyse erlaubte. Als alternative Vorgehensweise wurde die Zytokinproduktion von CD160-kompetenten und CD160-defizienten Knochenmarks ILC2 *in vitro* (siehe Abschnitt 6.7) sowie die Expansion und Funktionalität von CD160-kompetenten und CD160-defizienten Lungen ILC2 in einem Allergiemodell *in vivo* untersucht (siehe Abschnitt 6.8).

4.7. Vergleich der Funktion von RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. ILC2 *in vitro*

ILC2 wurden aus Knochenmark von RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen durch Inkubation mit IL-2 und IL-7 über 5 Tage differenziert und *in vitro* mit steigenden Konzentrationen von IL-33 stimuliert. IL-33 führt *in vivo* und *in vitro* zur Expansion von ILC2 und induziert die Produktion von Typ-II-Zytokinen durch die ILC2 [95]. Als potentielle CD160 Liganden standen in der Knochenmarkszellkultur MHC-I, welches auf allen Knochenmarkszellen sowie auf den ILC2 [96] selber exprimiert wird, und HVEM, welches weit verbreitet auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, zur Verfügung [45]. CD45⁺ Knochenmarkszellen aus RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen wurden zusätzlich zur Kontrolle auf ihre HVEM-Expression hin analysiert. Hier wurden RAG K.O. x HVEM K.O. Mäuse als Spezifitätskontrolle der Färbung genutzt. Es zeigte sich, dass alle CD45⁺ Zellen im Knochenmark HVEM exprimierten, während dies erwartungsgemäß in HVEM K.O. Knochenmarkszellen nicht der Fall war (Abbildung 13 B).

Die Menge von sekretiertem IL-9, IL-5 und IL-13 wurde im Überstand der Kulturen mittels ELISA quantifiziert. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte keine Unterschiede in der ILC2 Anzahl in den Kulturen beider Gruppen (Abbildung 13 A). Die Stimulation mit 10 pg/ml IL-33 führte zu keiner Produktion von Zytokinen. Sowohl 100 und 1000 pg/ml IL-33 induzierten die Produktion von IL-13, IL-5 und IL-9 (Abbildung 13 C-E). Dabei war bereits bei 100 ng/ml IL-33 eine Sättigung des IL-33 Rezeptors IL-1RL1 (ST2) erreicht. Verglichen mit CD160-kompetenten ILC2 produzierten CD160-defiziente ILC2 signifikant weniger IL-13, wobei die Produktion auch durch die Verzehnfachung des IL-33 Stimulus nicht gesteigert wurde (Abbildung 13 C). Auch die Produktion von IL-5 und IL-9 nach Stimulation mit 1000 ng/ml IL-33 war in CD160-defizienten ILC2 im Vergleich zu WT ILC2 signifikant reduziert. Bei der Stimulation mit 100 ng/ml IL-33 zeigten CD160-defiziente ILC2 nur einen statistisch nicht signifikanten Trend zu geringerer IL-9 und IL-5 Produktion (Abbildung 13 D & E).

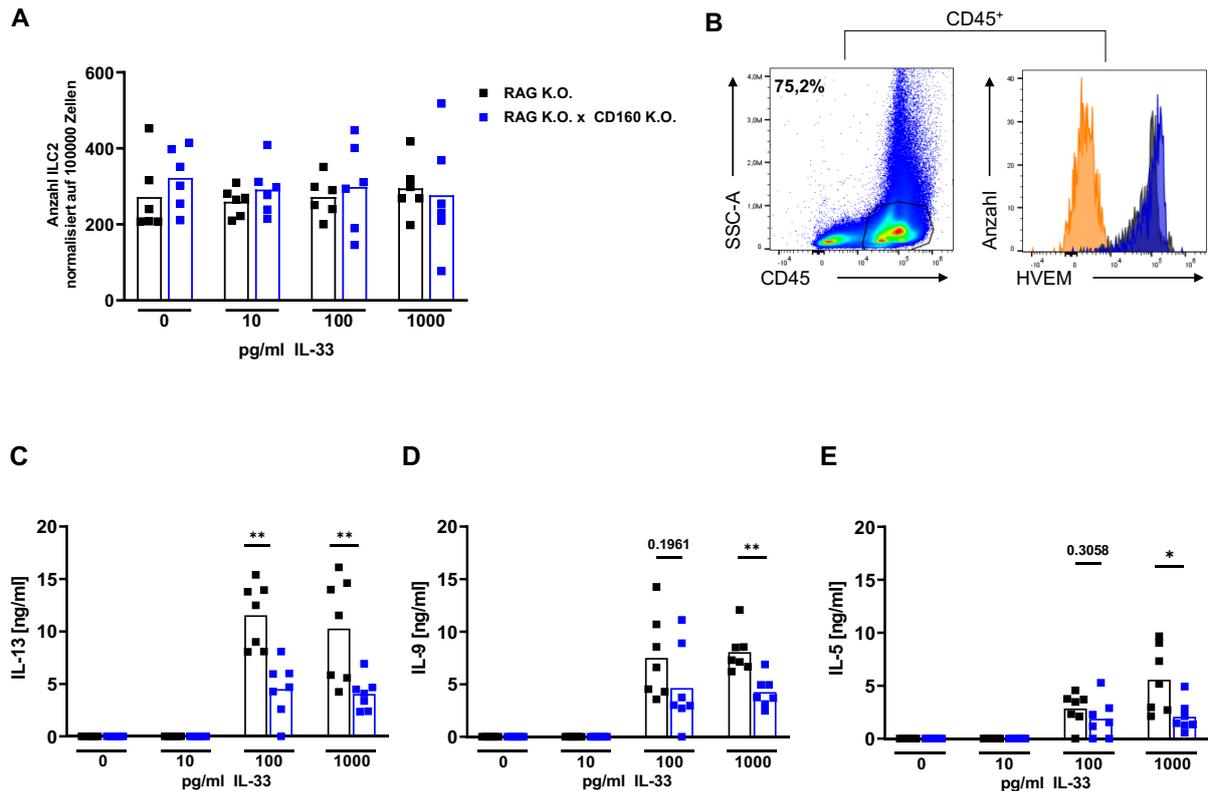


Abbildung 13 Funktionsvergleich von WT und CD160 K.O. ILC2: Knochenmarkszellen wurden aus RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen präpariert. 5×10^5 Zellen wurden in Gegenwart von IL-7 (10 ng/ml) und IL-2 (10 ng/ml) über 5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ zu ILC2 differenziert. Die Zellen wurden entweder unstimuliert gelassen oder mit angezeigten Konzentrationen von IL-33 stimuliert. Die Reinheit der ILC2 Kultur wurde nach 5 Tagen mittels Durchflusszytometrie gemessen. (A) Die Färb- und Gatingstrategie wurden wie in Abbildung 7 C durchgeführt. (B) Als Kontrolle der HVEM Expression wurden Knochenmarkszellen aus RAG K.O. (grau), RAG K.O. x CD160 K.O. (Blau) und RAG K.O. x HVEM K.O. (Orange) isoliert und CD45⁺ Zellen nach HVEM gefärbt. (C) IL-13, (D) IL-9 und (E) IL-5 im Kulturüberstand wurden mittels ELISA in Triplikaten quantifiziert. Jedes Symbol repräsentiert die Knochenmarkskultur einer Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT und CD160 K.O. ILC2 Kulturen (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ Students t-test). Gezeigt sind kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n \geq 3$ pro Gruppe und Experiment.

Um die Funktion von WT und CD160 K.O. ILC2 auch *in vivo* vergleichen zu können, wurde eine Aktivierung der ILC2 mit Hilfe eines Allergiemodells durchgeführt (Abbildung 14). Die *intra nasale* Verabreichung eines Lysates des Pilzes *Alternaria alternata* löst eine schnelle und fulminante Typ-II-Immunantwort in der Lunge aus [97,98]. Diese ist getrieben von einer ILC2 Aktivierung und Expansion, welche eine Eosinophilie auslöst. Die ILC2 Expansion und Eosinophilie wiederum entstehen abhängig von IL-33-vermittelten Signalen und unabhängig von der Beteiligung des adaptiven Immunsystems [97,98]. RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse wurden *intra nasal* mit *Alternaria* behandelt und nach 24 h geopfert. Zur Analyse der ILC2 Funktion wurden Lungenzellen in der Durchflusszytometrie auf Frequenz und intrazelluläre Zytokinproduktion analysiert (Abbildung 14 A). Da die intrazelluläre Zytokinfärbung nicht gleichzeitig mit einer intranukleären Färbung der Transkriptionsfaktoren funktioniert, wurde zusätzlich zu der in Abbildung 7 beschriebenen Färbestrategie, die

intrazellulären Zytokine mit einer anderen Strategie gefärbt (Abbildung 14 A). Hierbei wurden ILC2 über ihre Oberflächenmarker als NK1.1⁻ CD127⁺ ST2⁺ Zellen identifiziert. Außerdem wurde die Konzentration von Zytokinen in der Bronchealveolar Lavage (BAL) und Eosinophile (Siglec F⁺ CD11c⁻) und alveolare Makrophagen (AM) (Siglec F⁺ CD11c⁺) quantifiziert (Abbildung 13).

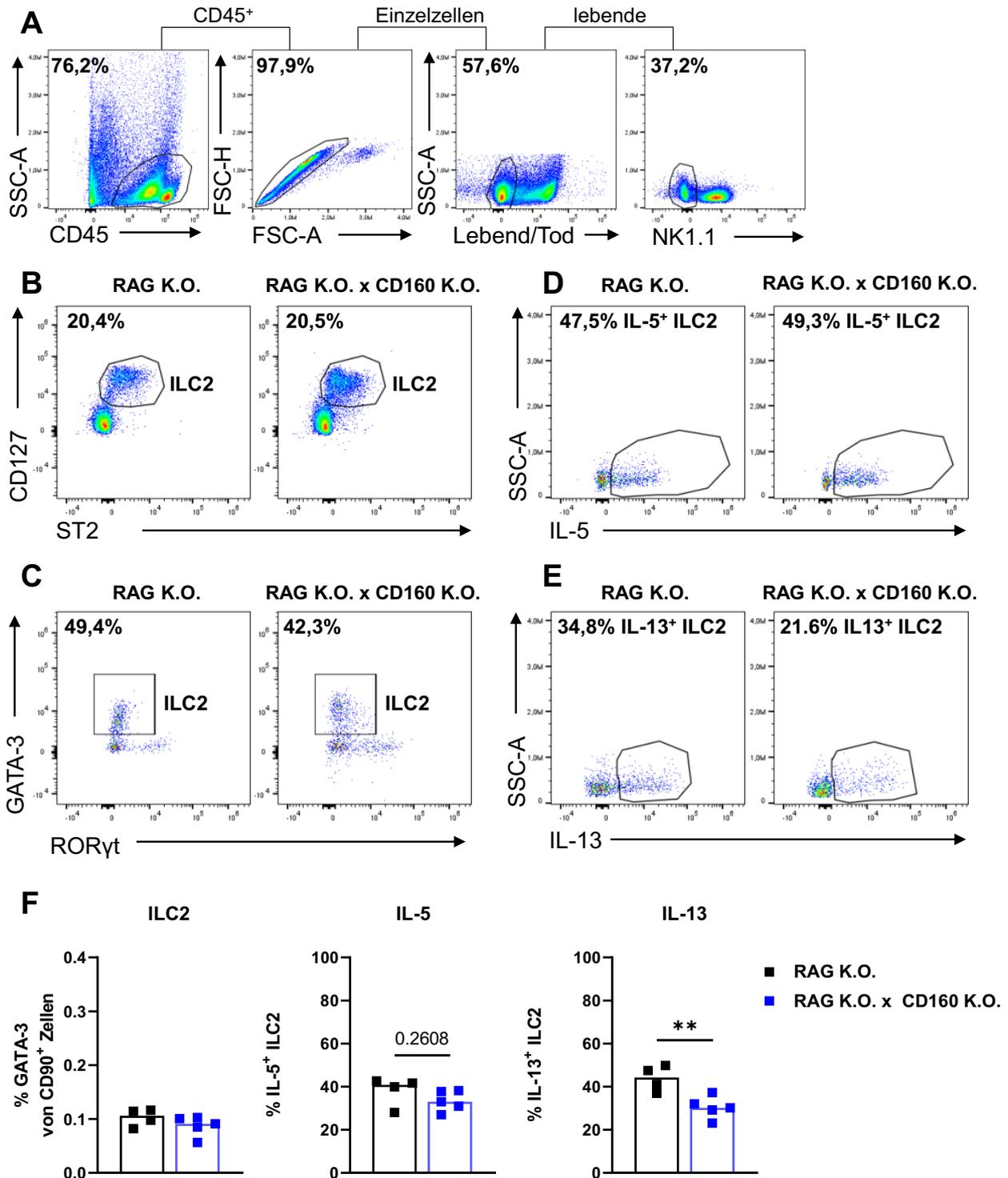


Abbildung 14 ILC2 Expansion und Funktion während einer *Alternaria alternata* induzierten Typ-2 Allergie in CD160-kompetenten und -defizienten RAG K.O. Mäusen: RAG K.O. (schwarze Quadrate) und RAG K.O. x CD160 K.O. (blaue Quadrate) Mäuse wurden i.n. mit 50 µg *Alternaria alternata* Extrakt behandelt und nach 24 h geopfert und Lungenzellen präpariert. (A) Die ILC2 wurden mit zwei Färbestrategien identifiziert: einmal als CD45⁺, lebende, NK1.1⁻, ST2⁺ CD127⁺ (B) und einmal nach Abbildung 12 A anhand der intranukleären GATA-3 Expression (C). Außerdem wurden IL-5 (D) und IL-13 (E) intrazellulär nach 4 h PMA/I Stimulation gefärbt. (A-C) Gezeigt sind repräsentative Dotplots der Messungen. Die Zahlen zeigen die Frequenz des übergeordneten Gates. F: Graphen zeigen die statistische Analyse der Frequenz der angezeigten Zellen. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen (*p ≤ 0.01; **p ≤ 0.001 Students t-test). Gezeigt sind Daten aus einem Experiment mit n ≥ 3 Gruppe.

Das *Alternaria* Allergiemodel induzierte in RAG K.O. oder RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen eine vergleichbare Expansion von ILC2 in der Lunge (Abbildung 14 F) und eosinophilen Granulozyten im BAL (Abbildung 15 A). Passend dazu produzierte auch eine vergleichbare Frequenz der CD160-kompetenten und CD160-defizienten ILC2 das Zytokin IL-5 (Abbildung 14 F). Im Gegensatz dazu wurden alveolare Makrophagen (AM) in RAG K.O. Mäusen induziert, während die CD160-Defizienz mit der AM Expansion interferierte (Abbildung 15 A). Außerdem war die intrazelluläre IL-13 Produktion in ILC2 von CD160-defizienten Mäusen reduziert (Abbildung 14 F). Zusätzlich zur intrazellulären Zytokinproduktion durch ILC2 wurde die Konzentration von IL-13, IL-5 und IL-9 im BAL gemessen (Abbildung 15 B). Hier zeigte sich in Übereinstimmung mit der intrazellulären Zytokinproduktion durch ILC2 in der Lunge (Abbildung 14 F) eine statistisch signifikante Reduktion der gesamt IL-13 Konzentration im BAL von *Alternaria alternata* behandelter RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse. Demgegenüber wiesen IL-5 und IL-9 einen nicht signifikanten Trend zu reduzierten Konzentrationen in Abwesenheit von CD160 auf (Abbildung 15 B).

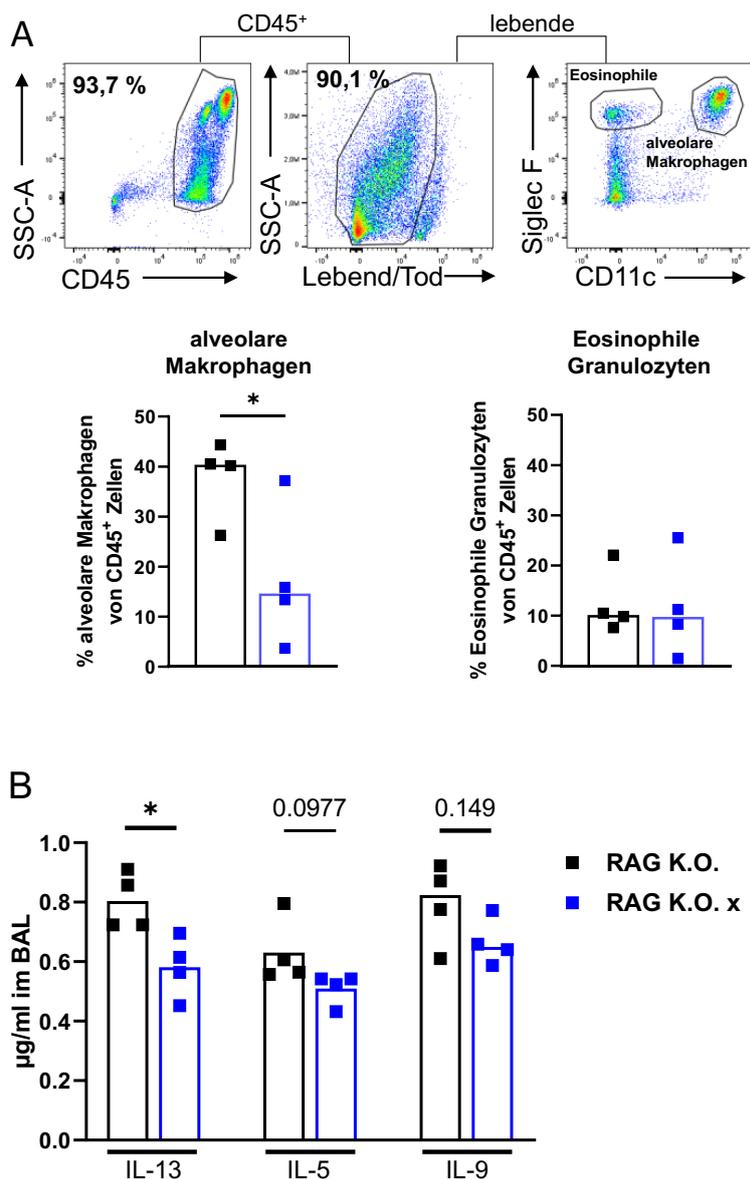


Abbildung 15 Zelluläre Komposition und Zytokinkonzentration im während einer *Alternaria alternata* induzierten Typ-II Allergie in CD160-kompetenten und -defizienten RAG K.O. Mäusen: RAG K.O. (schwarze Quadrate) und RAG K.O. x CD160 K.O. (blaue Quadrate) Mäuse wurden i.n. mit 50 µg *Alternaria* Extrakt behandelt und nach 24h geopfert. Die Lunge wurde mit 500 µl PBS gespült (A) Eosinophile Granulozyten wurden als CD45⁺ lebende Siglec F⁺ CD11c⁺ und alveolare Makrophagen als SiglecF⁺ CD11c⁺ identifiziert. (B) Konzentrationen der angezeigten Zytokine im unverdünnten BAL. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen (* $p \leq 0.01$; Students t-test). Gezeigt sind Daten aus einem Experiment mit $n \geq 3$ Gruppe.

Zusammengefasst waren CD160-defiziente ILC2 deutlich in ihrer IL-13 Produktion nach Stimulation durch IL-33 *in vitro* und *in vivo* in einem IL-33-getriebenen Allergiemodel beeinträchtigt. Weitere Produkte von ILC2 sind IL-5 und IL-9. Hier führte die CD160-Defizienz zu einer signifikanten, wenn auch weniger ausgeprägten Reduktion *in vitro*, während *in vivo* keine deutliche Reduktion von IL-9, IL-5 oder der IL-5-induzierten Eosinophilie gemessen wurde.

4.8. Die Rolle von HVEM während der *S. rattii* Infektion in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems

CD160 bindet an HVEM und mit geringerer Affinität auch an MHC-I [99]. Sowohl die CD160-Bindung über MHC-I [62,100] als auch über HVEM [101,102] aktivierten CD160⁺ NK-Zellen. Um die Bedeutung der MHC- oder HVEM-vermittelten Signalübertragung an CD160⁺ Immunzellen des angeborenen Immunsystems wie ILC2, während der *S. rattii* Infektion *in vivo* zu unterscheiden, wurden HVEM K.O. Mäuse auf den RAG K.O.-Hintergrund gekreuzt. RAG K.O. Mäuse und RAG K.O. x HVEM K.O. Mäuse wurden mit *S. rattii* infiziert und die Wurmlast im Darm zu späten Zeitpunkten der Infektion verglichen (Abbildung 16 A). RAG K.O. und RAG K.O. x HVEM K.O. Mäuse zeigten eine vergleichbare Wurmlast an Tag 6 p.i. Zu späteren Zeitpunkten konnten beide Genotypen die Wurmlast auf 1-3 Würmer reduzieren, waren jedoch bis zu 100 Tage p.i. nicht in der Lage die Infektion zu eliminieren. Auch die mMCP-1 Konzentration im Blutplasma der Mäuse, war in beiden Gruppen über den gesamten Versuchszeitraum vergleichbar (Abbildung 16 B).

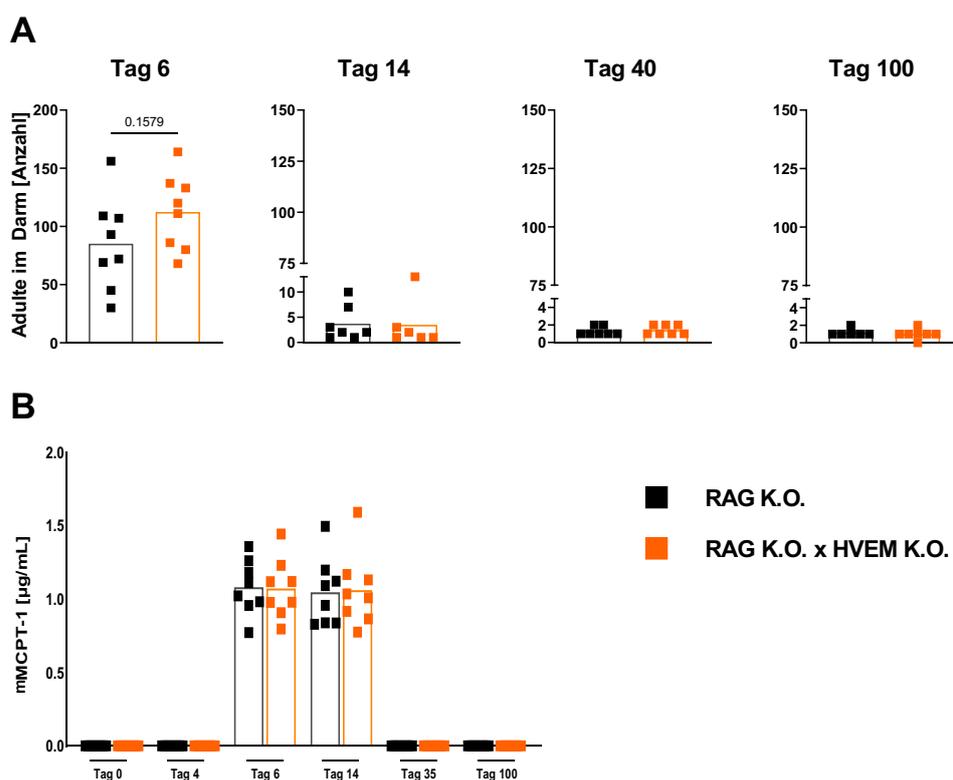


Abbildung 16 : Kinetik der *Strongyloides rattii* Infektion in Gegenwart und Abwesenheit von HVEM: RAG K.O. Mäuse (schwarze Quadrate) und RAG K.O. x HVEM K.O. (orangene Quadrate) wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert. (A) Die Wurmlast im Dünndarm wurde an den angegebenen Zeitpunkten bestimmt. (B) mMCP-1 wurde im Blutplasma der Mäuse quantifiziert. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, Balken zeigen den Mittelwert. Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede des Mittelwerts (* $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$; Students t-test) Gezeigt sind zwei Experimente mit $n \geq 3$ pro Experiment und Gruppe.

Zusammengefasst hatte die Gegenwart oder Abwesenheit von HVEM keinen Einfluss auf die Kontrolle der *S. rattii* Wurmlast durch das angeborene Immunsystem. Die Abwesenheit von CD160 in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen führte dazu, dass die Wurmlast nach Tag 6 p.i. nicht weiter reduziert wurde, i.e. für etwa 100 Tage bei 50 Würmern pro Maus lag (Abbildung 8). Währenddessen führte die Abwesenheit des CD160 Liganden HVEM zu keinem Defekt. CD160-defizienten RAG K.O. Mäuse zeigten eine reduzierte Mastzellaktivierung, während HVEM defiziente RAG K.O. Mäusen eine Mastzellaktivierung auf dem Niveau der RAG K.O. Mäuse induzierten. Das deutet darauf hin, dass HVEM keine wesentliche Rolle bei der Auslösung von CD160-vermittelten Signalen in Zellen des angeborenen Immunsystems wie ILC2 hat.

In immunkompetenten Mäusen war die Abwesenheit sowohl von CD160 als auch von dem CD160 und BTLA-liganden HVEM von Vorteil, i.e. führte zu einer transienten Reduktion der Wurmlast (Siehe Abschnitt 1.4) [40] Im Folgenden soll nun die CD160 abhängige adaptive Immunantwort gegen *S. rattii* untersucht werden.

4.9. Analyse der adaptiven Immunzellen in WT und CD160 K.O. Mäusen

Immunkompetente HVEM K.O. [40] und CD160 K.O. Mäuse (Abbildung 6 & 8) hatten im Vergleich zu WT Mäusen an Tag 6 der *S. rattii* Infektion eine reduzierte Wurmlast, was zunächst auf eine verbesserte Immunantwort hindeuten konnte. CD160 ist auf CD4⁺ T-Zellen im Darm exprimiert (Abbildung 7) und es wurde analog zu BTLA auch eine CD160 vermittelte Inhibition der Aktivität von CD4⁺ T-Zellen beschrieben [63]. Die adaptive anti-*S. rattii* Immunantwort wird von CD4⁺ T-Zellen getrieben und die finale Expulsion der Würmer ist Antikörper-vermittelt und abhängig von T- und B-Zellen [32]. Um zunächst die Expansion von T-Zellen und B-Zellen in WT und CD160 K.O. Mäusen zu vergleichen, wurden diese mit *S. rattii* infiziert und Lymphozyten aus dem Darm und der Milz isoliert. Dabei wurden die Mäuse am Höhepunkt der Infektion, Tag 6 p.i., geopfert und mit naiven Mäusen verglichen (Abbildung 17 A). Es wurde keine Expansion von CD4⁺, $\gamma\delta$ /NKT- oder B-Zellen an Tag 6 p.i. in WT oder CD160 K.O. Mäusen beobachtet. In der Milz, jedoch nicht im Darm, expandierten CD8⁺ T-Zellen in Tag 6 infizierten WT und CD160 K.O. Mäusen gleichermaßen. Außerdem wurde die Frequenz von CD160⁺ T-Zellen untersucht (Abbildung 17 B). Die Frequenz CD160⁺ CD4⁺ CD8⁺ und $\gamma\delta$ /NK T-Zellen im Darm blieb während der Infektion unverändert auf dem Niveau naiver Mäuse (Abbildung 17 C). Interessanterweise konnte keine CD160 Expression auf T-Zellen in der Milz gemessen werden, weder bei naiven noch bei *S. rattii* infizierten Mäusen. Dies ist nicht auf ein technisches Problem bei der Färbung oder Isolation der Milzzellen zurückzuführen, da in demselben Experiment die T- und B-Zell Subpopulationen erfolgreich sowie CD160 auf LPL erfolgreich gefärbt wurden.

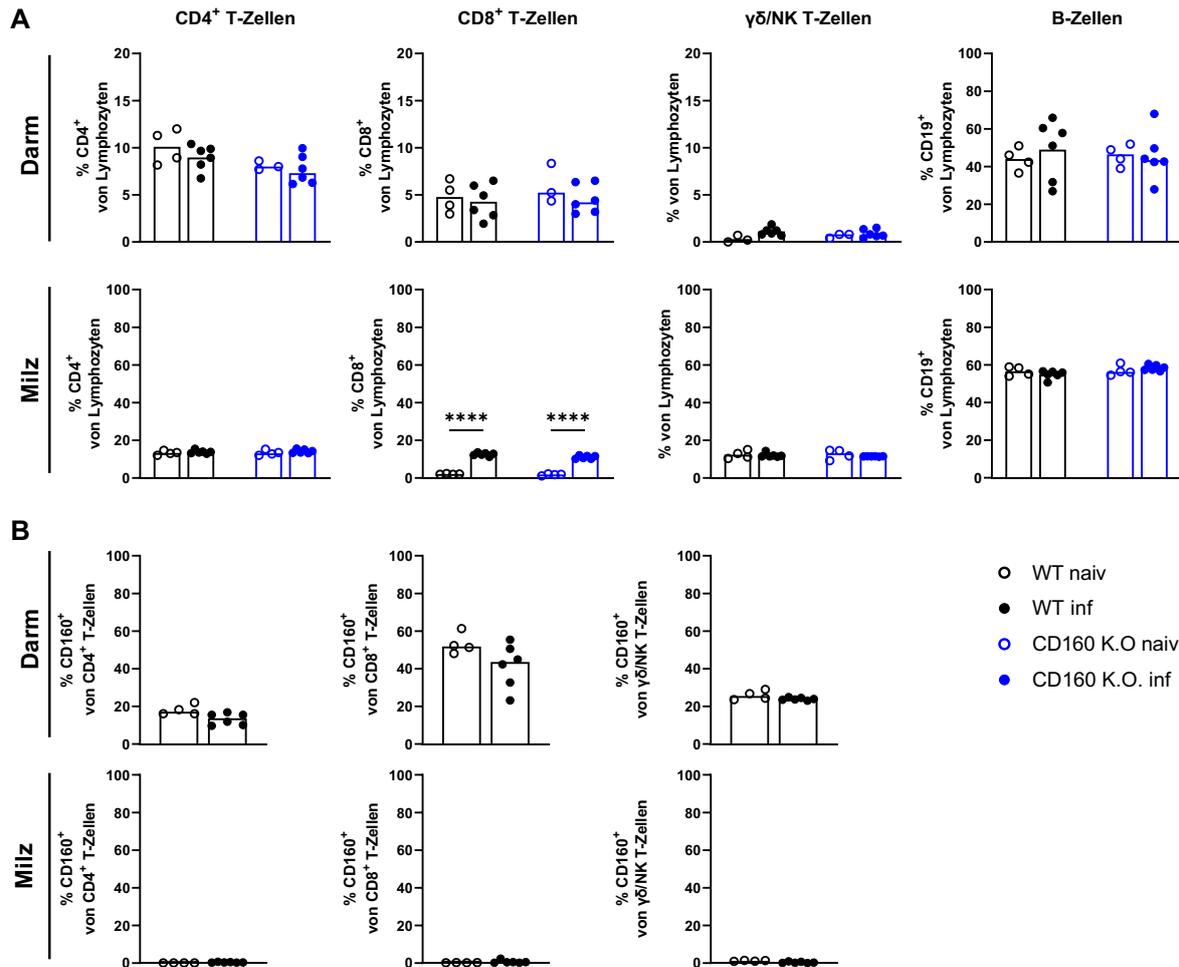


Abbildung 17 Durchflusszytometrische Analyse von T- und B-Zellen aus Darm und Milz während einer *S. rattii* Infektion in CD160-kompetenten und-defizienten Mäusen: WT (schwarze Kreise) und CD160 K.O. (blaue Kreise) Mäuse wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert (geschlossenen Symbole), oder naiv gelassen (offene Symbole) und an Tag 6 der Infektion getötet. LPL und Milzzellen wurden aus WT und CD160 K.O. Mäusen präpariert. (Gatingstrategie: Siehe Abbildung 7) (A) Es wurde die Frequenz der T-Zellen in den LPL und Milzzellen bestimmt. (B) Außerdem wurde die Frequenz CD160 positiver T-Zellen bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven und *S. rattii* infizierten Mäusen (**** $p \leq 0.0001$ Students t-test). Gezeigt sind kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n \geq 3$ pro Experiment und Gruppe.

Um die Expansion spezifisch der CD4⁺ TH2-Zellen in WT und CD160 K.O. Mäusen zu vergleichen, wurden TH2-Zellen als GATA-3⁺ Zellen [103] innerhalb der CD4⁺ T-Zellen identifiziert (Abbildung 18 A). Des Weiteren wurde die Expression von CD160 auf diesen TH2-Zellen untersucht. Hier wurden erneut CD4⁺ T-Zellen Zellen aus CD160 K.O. Mäusen als Spezifitätskontrolle für die CD160 Färbung benutzt. In Übereinstimmungen mit den in Abbildung 7 B und 17 B gezeigten Daten exprimieren CD4⁺ T-Zellen teilweise CD160 (Abbildung 18 A). Interessanterweise waren jedoch die GATA-3⁺ TH2-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen CD160-negativ. Die Frequenz der TH2-Zellen innerhalb der gesamten CD4⁺ T-Zellen stieg während der *S. rattii* Infektion im Darm in beiden Genotypen gleichermaßen an.

Die Frequenz der TH2-Zellen in der Milz blieb in der *S. rattii* Infektion unverändert (Abbildung 18 B).

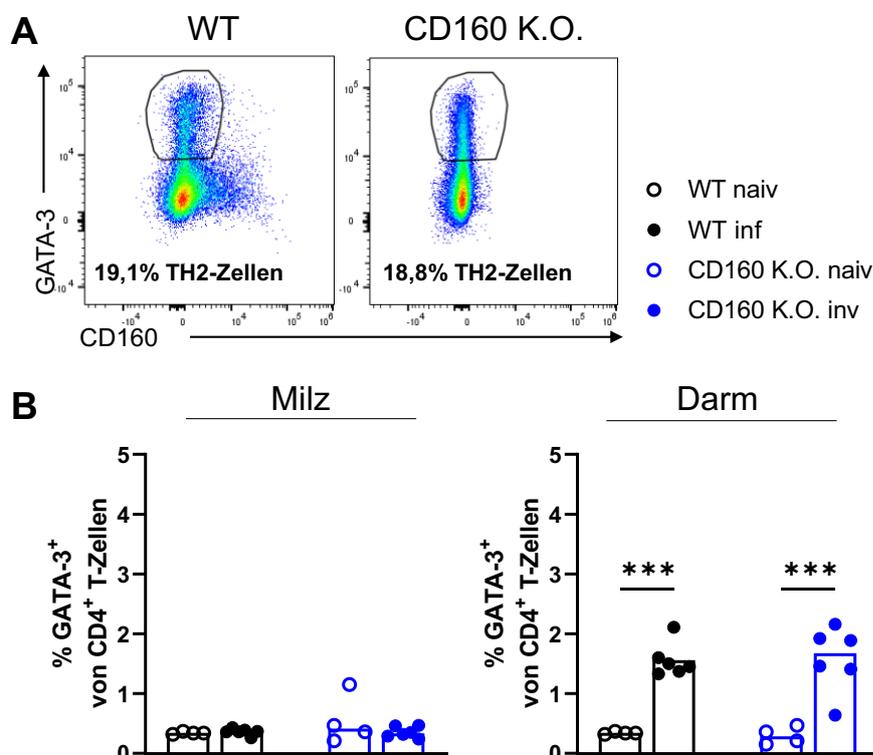


Abbildung 18 Durchflusszytometrische Analyse von TH2-Zellen aus Darm und Milz während einer *S. rattii* Infektion in CD160-kompetenten und -defizienten Mäusen: WT (schwarze Kreise) und CD160 K.O. (blaue Kreise) Mäuse wurden naiv gelassen (offene Symbole) oder s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert und an Tag 6 der Infektion getötet (geschlossenen Symbole). LPL und Milzzellen wurden aus WT und CD160 K.O. Mäusen präpariert und CD45⁺ CD3⁺ T-Zellen identifiziert. (Gatingstrategie: siehe Abbildung 7) (A) TH2-Zellen wurden zusätzlich als CD4⁺ GATA-3⁺ T-Zellen identifiziert und (B) die Frequenz innerhalb der CD4⁺ T-Zellen bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven und *S. rattii* infizierten Mäusen (** $p \leq 0.001$ Students t-test). Gezeigt sind kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n \geq 3$ pro Experiment und Gruppe.

Zusammengefasst ergab diese durchflusszytometrische Analyse keine Hinweise auf eine veränderte zelluläre Komposition in Milz und Darm *S. rattii* infizierter WT und CD160 K.O. Mäuse. Die für die *S. rattii* Immunabwehr wichtigen TH2-Zellen exprimierten weder in naiven Mäusen noch in der Infektion CD160 und expandierten in CD160 K.O. Mäusen genauso gut wie in WT Mäusen.

Im weiteren Verlauf wurde die Funktion von T-Zellen untersucht. Dafür wurden Lymphozyten aus mesenterialen Lymphknoten (mLN) und Milzen von naiven und Tag 6 *S. rattii* infizierten CD160-kompetenten und CD160-defizienten Mäusen isoliert und mit *S. rattii* Lysat für 3 Tage stimuliert oder unstimuliert gelassen (Abbildung 19). Es sollte berücksichtigt werden, dass unstimulierte Lymphozytenkulturen von *S. rattii* infizierten Mäusen bereits TH2-polarisiert und aktiviert sein können. Zur Überprüfung der Spezifität der Zytokinproduktion im Zusammenhang mit der *S. rattii* Infektion sind die Lymphozytenkulturen von naiven Mäusen ausschlaggebend.

Diese Kulturen zeigten weder eine spontane noch durch das *S. rattii*-Lysat induzierte Zytokinproduktion, wie in Abbildung 9 dargestellt. Für IL-4, IL-5, IL-9 und IL-10 zeigte sich ein ähnliches Bild. Milzzellen aus infizierten Mäusen produzierten nur geringe Mengen dieser Zytokine, während Zellen aus dem mLN spontan IL-4, IL-5, IL-9 und IL-10 produzierten. Die Produktion von IL-5, IL-9 und IL-10 wurde durch die Abwesenheit von CD160 verstärkt. Die Zugabe von *S. rattii* Lysat verstärkte die *S. rattii*-spezifische Zytokinproduktion sowohl durch Milzzellen als auch durch mLN-Zellen. Auch hier induzierte das *S. rattii* Lysat in CD160-defizienten Zellen eine stärkere Zytokinproduktion als in CD160-kompetenten Zellen. IL-13 wurde sowohl von Milzzellen als auch von mLN-Zellen aus infizierten Mäusen in großen Mengen produziert. CD160-defiziente Lymphozyten zeigten einen Trend einer verstärkten Zytokinproduktion im Vergleich zu WT Mäusen, dieser war jedoch nicht statistisch signifikant. Durch Zugabe von *S. rattii* Lysat verstärkte sich die Zytokinproduktion, sodass kein Unterschied in WT und CD160 K.O. Kulturen mehr nachweisbar war. IL-22 konnte lediglich bei Stimulation mit *S. rattii* Lysat detektiert werden. Die CD160-Defizienz hatte jedoch keinen Effekt auf die Zytokinproduktion.

Zusammenfassend zeigte sich eine leichte Steigerung der Produktion von Typ-II-Zytokinen sowohl von CD160-defizienten Milzzellen als auch von CD160-defizienten mLN-Zellen. Dieses Ergebnis könnte auf eine verbesserte TH2-Antwort in CD160 K.O. Mäusen während der *S. rattii* Infektion *in vivo* hindeuten.

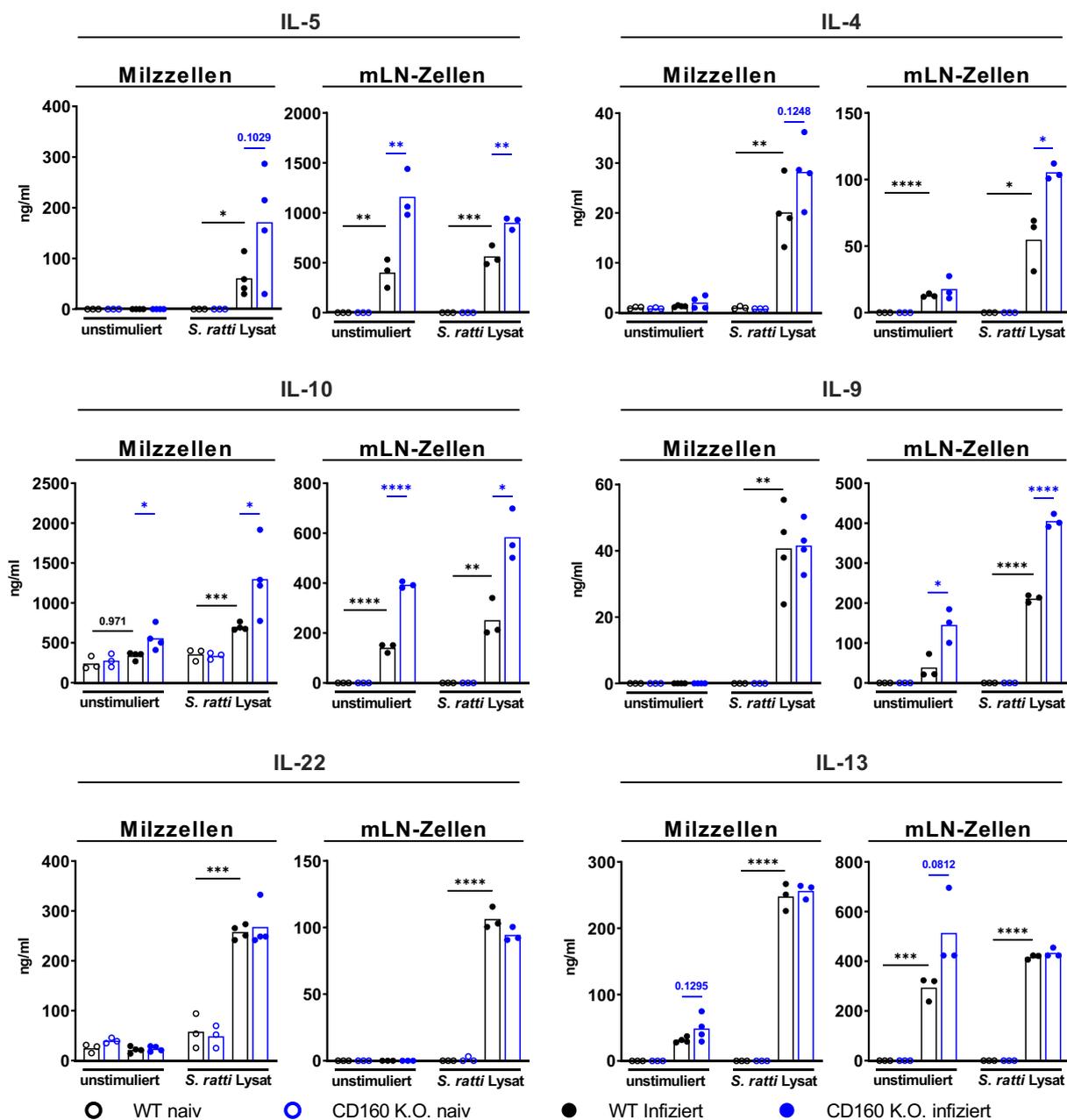


Abbildung 19 Funktionstest von T-Zellen in WT und CD160 K.O. Mäusen während einer *S. rattii* Infektion: WT (schwarze Kreise) und CD160 K.O. (blaue Kreise) Mäuse wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert (geschlossenen Symbole), oder naiv gelassen (offene Symbole) und an Tag 6 der Infektion geopfert. mLN und Milzzellen wurden aus WT und CD160 K.O. Mäusen präpariert und in Quadruplikaten zu 5×10^5 Zellen pro Well in 96 Well Rundbodenplatten ausgesät. Diese wurden entweder unstimuliert gelassen, oder mit $20 \mu\text{g/ml}$ *S. rattii* Lysat für 3 Tage bei 37°C und 5% CO_2 stimuliert. Zytokinkonzentrationen in den Überständen der Kulturen wurden mit einem zytometrischen bead-basierten Immunoassay bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Mischprobe aus technischen Quadruplikaten der Lymphozytenkulturen einer individuellen Maus. Die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven und *S. rattii* infizierten (blaue Sterne) und WT und CD160 K.O. Mäusen (schwarze Sterne) ($*p \leq 0.05$; $**p \leq 0.01$; $***p \leq 0.001$; $****p \leq 0.0001$ Students t-test). Gezeigt sind kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n \geq 3$ pro Experiment und Gruppe.

Im Folgenden sollte nun der Einfluss von CD160 auf die Antikörperantwort untersucht werden. Dazu wurden WT und CD160 K.O. Mäuse mit *S. rattii* infiziert und die *S. rattii*-spezifischen

Antikörper an verschiedenen Zeitpunkten im Blutplasma der Mäuse mittels ELISA quantifiziert. Der IgM-Titer im Serum infizierter Mäuse stieg bereits an Tag 7 p.i. an und blieb bis zum Ende der Analyse an Tag 21 p.i. auf hohem Niveau (Abbildung 20 A). *S. rattii*-spezifisches IgG1 (Abbildung 20 B) wurde ebenfalls ab Tag 7 p.i. produziert und erreichte den Höhepunkt an Tag 14 p.i. IgG2b konnte bereits ab Tag 4 p.i. beobachtet werden und erreichte an Tag 21 p.i. seinen Höhepunkt. Hier zeigten WT Mäuse einen Trend zur besseren Antikörperproduktion. IgG3 konnte nicht detektiert werden (Abbildung 20 D). Passend wurde eine Induktion von *S. rattii* spezifischem IgG3 erst ab Tag 50 p.i. beschrieben ein Zeitpunkt, der in dieser Arbeit nicht mehr analysiert wurde. Bei der Kinetik der Antikörperproduktion von *S. rattii* infizierten WT und CD160 K.O. Mäusen konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden.

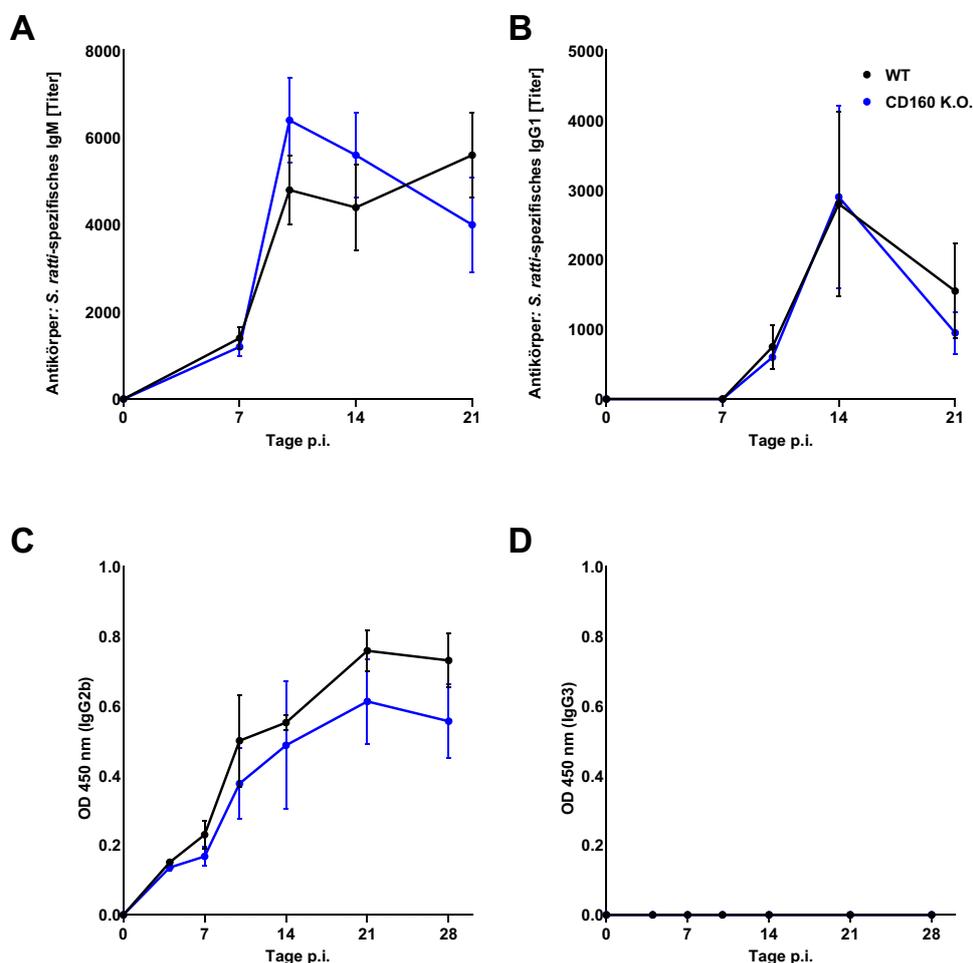


Abbildung 20 Antikörper Immunantwort in der *S. rattii* Infektion in WT und CD160 K.O. Mäusen: WT (schwarze Kreise) und CD160 K.O. (blaue Kreise) Mäuse wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert. An den angegebenen Tagen wurde der Titer im Blutplasma von *S. rattii* antigen-spezifischem (A) IgM, (B) IgG1 und die optische Dichte von (C) IgG2b und (D) IgG3 nach einer 1:100 Verdünnung des Blutplasmas durch ELISA quantifiziert. Der Graph zeigt den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n \geq 3$ pro Experiment und Gruppe, die Fehlerbalken zeigen SEM.

4.10. Analyse der adaptiven Immunantwort in WT und CD160 K.O. Mäusen

Immunkompetente Mäuse beenden eine *S. rattii* Infektion innerhalb eines Monats und sind gegenüber einer zweiten Infektion teilweise resistent. Das Zusammenspiel von *S. rattii*-spezifischen Antikörpern und T-Zellen führt zu einer sehr effizienten Elimination der wandernden Larven im Gewebe. In der Folge ist die Wurmlast im Darm „immuner“ Mäuse drastisch reduziert und teilweise nicht mehr nachweisbar [24]. Um die Qualität der adaptiven Immunantwort in Abwesenheit von CD160 zu untersuchen, wurde diese Semi-Resistenz bei einer Re-Infektion getestet. Dafür wurden WT und CD160 K.O. Mäuse mit *S. rattii* L3 infiziert und 30 Tage später zusammen mit einer naiven „nicht immunen“ Kontrollgruppe erneut infiziert (Abbildung 21 A). Die Infektion mit derselben Charge an infektiösen L3 führte bei den vormals naiven Mäusen zu einer mittleren Wurmlast von 80 (WT) oder 20 (CD160 K.O.) Würmern im Darm, während die „immunen“ Mäuse in der zweiten Infektion an Tag 6 keine Würmer im Darm aufwiesen. Dabei waren WT und CD160 Mäuse in gleichem Maße geschützt (Abb. 18 A). Die Freisetzung von *S. rattii*-Eiern und L1 im Kot wurde ebenfalls an Tag 6 und Tag 30 der Infektion sowie an Tag 6 der Re-Infektion „immuner“ Mäuse überprüft. Dafür wurde die Anzahl von Kopien des für das *S. rattii*-spezifische 28s-RNA-kodierende Gen in Kotproben der infizierten Mäuse mittels quantitativer PCR bestimmt [23] (Abbildung 21 B). Nach einer Freisetzung von *S. rattii* DNA im Kot an Tag 6 der Erstinfektion waren alle Mäuse erwartungsgemäß an Tag 30 der Infektion frei von intestinalen *S. rattii* Parasiten und somit war auch keine *S. rattii* DNA im Kot nachweisbar (18 B). Eine zweite Infektion führte in Übereinstimmung mit der drastisch reduzierten bzw. nicht mehr nachweisbaren Wurmlast in „immunen“ Mäusen (Abbildung 21 A) ebenfalls zu keiner nachweisbaren Freisetzung von *S. rattii* DNA (Abbildung 21 B).

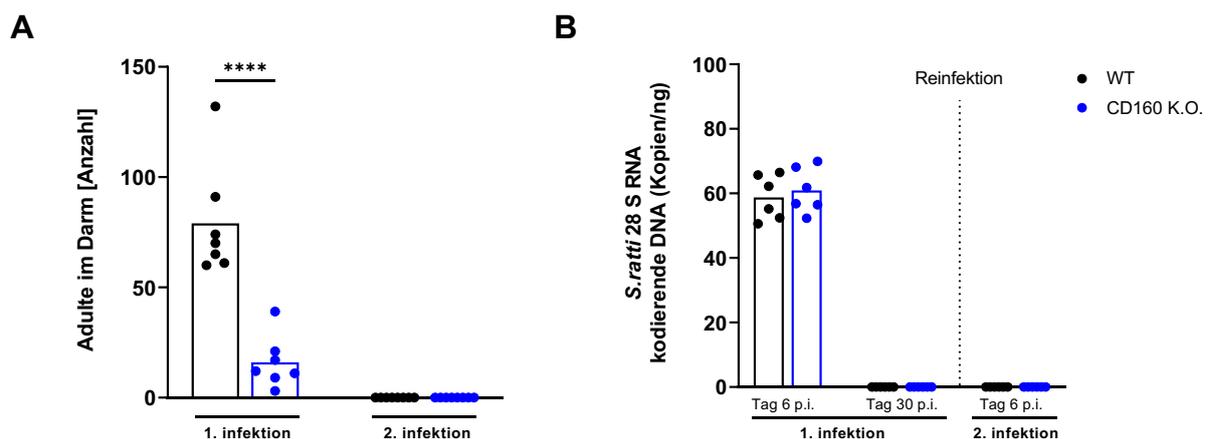


Abbildung 21 Wurmlasten und *S. rattii* DNA-Freisetzung in Erst- und Zweitinfektion in WT und CD160 K.O. Mäusen: WT (schwarze Kreise) und CD160 K.O. Mäuse (blaue Kreise) wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert oder naiv gelassen. 4 Wochen später wurden naive Mäuse beider Gruppen (1. Infektion) und die bereits infizierten, „immunen“ Mäuse (2. Infektion) erneut mit 1000 L3 s.c. infiziert. (A) Adulte im Dünndarm wurden an Tag 6 p.i. der 1. und 2. Infektion gezählt. (B) Der Ausstoß von *S. rattii* 28S RNA-kodierender DNA an den angezeigten Tagen nach der Infektion wurde mit qPCR bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen

statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT and CD160 K.O. Mäusen (****p < 0.0001 Students t-test). Gezeigt sind kombinierte Daten aus zwei Experimenten mit n ≥3 pro Gruppe und Experiment.

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass eine wirksame und schützende Immunität gegen *S. rattii* Infektionen in Abwesenheit von CD160 initiiert und aufrechterhalten wurde.

Des Weiteren wurde innerhalb einer ersten Infektion reproduzierbar gezeigt, dass *S. rattii* infizierte CD160 K.O. Mäuse an Tag 6 p.i. weniger adulte Würmer im Darm tragen als WT Mäuse (Abbildungen 6 B, 8 C, 21 A). Interessanterweise korrelierte die reduzierte Wurmlast an Tag 6 der *S. rattii* Infektion (Abbildung 21 A) nicht mit einer reduzierten Ausscheidung von *S. rattii* DNA mit dem Kot an demselben Tag (Abbildung 21 B). Sie war in WT und CD160 K.O. Mäusen am Tag 6 der Infektion gleich. Diesen widersprüchlichen Resultaten wird in Punkt 4.13 weiter nachgegangen.

Obwohl CD160 K.O. Mäuse die *S. rattii* Infektion besser kontrollieren als WT Mäuse, konnte keine veränderte TH2-Zell Expansion (Abbildung 18) oder Antikörperantwort (Abbildung 20) beobachtet werden. Die leicht gesteigerte TH2 Zytokinproduktion in CD160 K.O. Lymphozytenkulturen (Abbildung 19) korrelierte jedoch nicht mit einer verbesserten Mastzelldegranulation (Abbildung 9). Des Weiteren waren WT und CD160 K.O. Mäuse gleichermaßen gut vor einer zweiten Infektion mit *S. rattii* geschützt.

4.11. Analyse der angeborenen Immunzellen in WT und CD160 K.O. Mäusen

In RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen war die Expansion von CD160-positiven ILC2 im Darm beeinträchtigt, was mit einer beeinträchtigten Aktivierung und Expansion von Mastzellen einherging (Abbildung 9 B & 10 C). Immunkompetente CD160 K.O. Mäuse konnten dagegen eine Mastzelldegranulation induzieren, die mit der von WT Mäusen vergleichbar war (Abbildung 9 A). Um zu untersuchen, ob diese gesteigerte Mastzellaktivität mit einer Induktion angeborener Immunzellen zusammenhängt, wurden WT und CD160 K.O. Mäuse mit *S. rattii* infiziert und LPL und Milzzellen an Tag 6 p.i. mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Frequenz von NK-Zellen war während der Infektion im Darm von WT- und CD160- K.O. Mäusen unverändert und in der Milz in beiden Genotypen gleichermaßen erhöht (Abbildung 22 A). Interessanterweise exprimierten bis zu 80 % der NK-Zellen aus WT Mäusen CD160 im Darm, während nur 10 % der NK-Zellen in der Milz CD160 exprimierten (Abbildung 22 B). Die Frequenz CD160 positiver NK-Zellen halbierte sich während der Infektion im Darm. NK-Zellen in der Milz exprimierten sowohl in gesunden als auch infizierten WT Mäusen nur zu 5-10 % CD160, was auch bereits in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen zu sehen war (Abbildung 12). ILC1 und ILC3 waren in allen 4 Gruppen vergleichbar und zeigten keine veränderte CD160 Expression während der Infektion. Anders als in RAG K.O. Mäusen zeigten ILC2 ebenfalls keine Expansion während der Infektion sowohl in CD160-kompetenten als auch CD160-

defizienten WT Mäusen. Die Frequenz CD160 positiver ILC2 war während der Infektion im Darm und in der Milz signifikant erhöht.

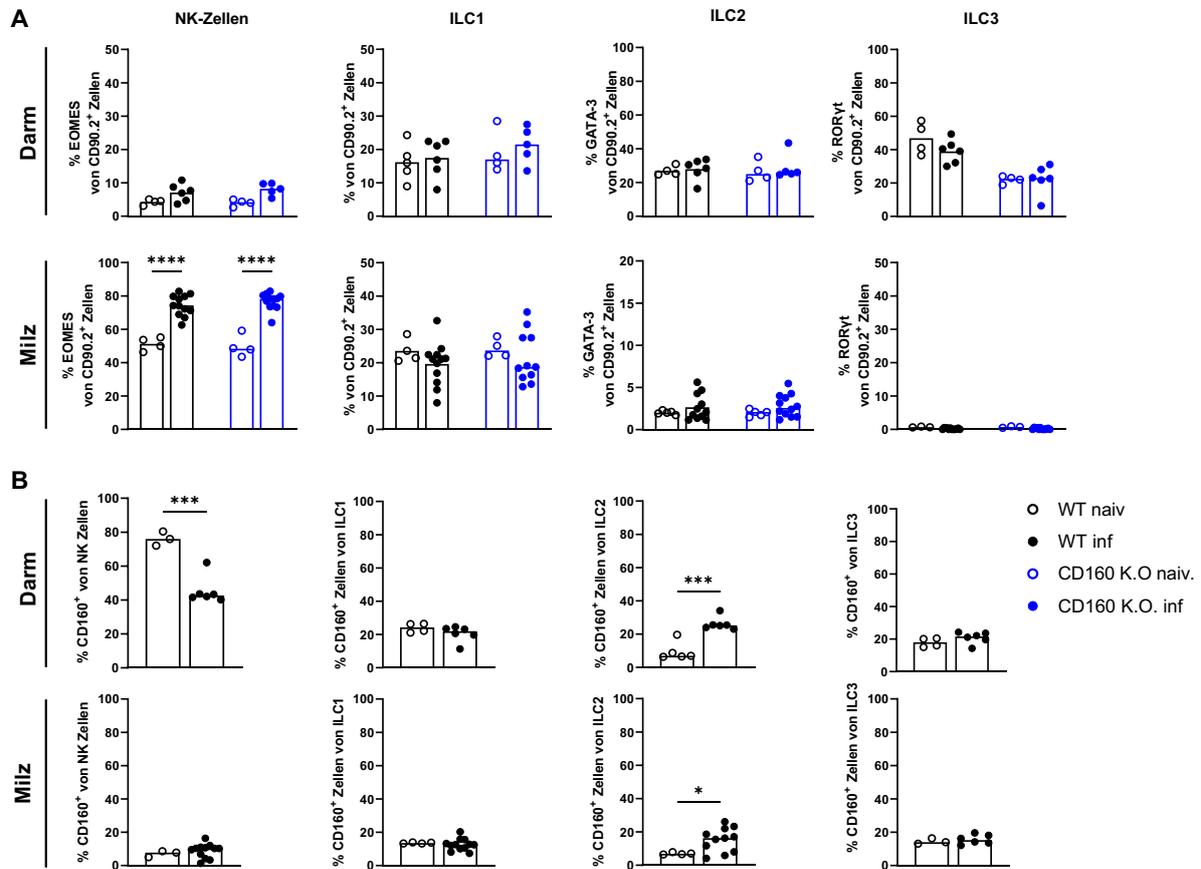


Abbildung 22 : Durchflusszytometrische Analyse von angeborenen Immunzellen aus dem Darm und Milz während einer *S. rattii* Infektion in CD160 kompetenten und defizienten Mäusen: WT (schwarze Kreise) und CD160 K.O. (blaue Kreise) Mäuse wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3 infiziert und an Tag 6 der Infektion geopfert (geschlossenen Symbole) oder naiv gelassen (offene Symbole). LPL und Milzzellen wurden aus WT und CD160 K.O. Mäusen präpariert. Gatingstrategie: ILCs wurden anhand ihrer Transkriptionsfaktoren identifiziert (siehe Abbildung 12 A). (A) Es wurde die Frequenz von NK-Zellen und ILC1-3 in den LPL und Milzzellen bestimmt. (B) Außerdem wurde die CD160 Expression auf den NK-Zellen und ILC1-3 bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert und die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen naiven und *S. rattii* infizierten Mäusen (* $p \leq 0.01$; ** $p \leq 0.001$ Students t-test). Gezeigt sind kombinierte Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit $n \geq 3$ pro Experiment und Gruppe.

Die durchflusszytometrische Analyse der ILC-Populationen zeigte zusammenfassend keine Veränderungen in immunkompetenten CD160 K.O. Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen während der *S. rattii* Infektion. Auch die Infektion führte zu keiner Expansion bestimmter ILC-Populationen. Lediglich NK-Zellen expandierten in der Milz *S. rattii* infizierter Mäuse und waren größtenteils negativ für CD160. Diese Expansion war in WT und CD160 K.O. Mäusen vergleichbar.

Die bessere Kontrolle von *S. rattii* Parasiten im Darm von CD160 K.O. Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen kann also weder durch Veränderungen in der adaptiven Immunantwort noch durch

eine Verbesserung der angeborenen Immunantwort erklärt werden. Es stellte sich somit die Frage, ob sich die WT und CD160 K.O. Mäuse im intestinalen Mikrobiom unterscheiden, was ebenfalls zu einer verbesserten Kontrolle der *S. ratti* Infektion führen könnte.

4.12. Mikrobiomanalyse von WT und CD160 K.O. Mäusen

Eine unterschiedliche Expression von Immunrezeptoren kann auch zu Veränderungen der intestinalen Mikrobiota führen, die indirekt die Anfälligkeit für Wurminfektionen beeinflussen können [104,105]. Es wurden frische Kotproben von WT- und CD160 K.O.- Wurfgeschwistern gesammelt und die DNA extrahiert. Mittels von unserer Kollaborationspartnerin Professor Corinna Bang (Christian-Albrechts-Universität zu Kiel) durchgeführten Next-Generation-Sequenzierung der bakteriellen 16S rRNA-Gene wurde das intestinale Mikrobiom von CD160 K.O. und WT Mäusen verglichen. Dabei konnte kein unterschiedliches mikrobielles Profil, weder in naiven Mäusen noch am Tag 6 der *S. ratti* Infektion beobachtet werden (Abbildung 23). Auch die *S. ratti* Infektion als solche verursachte keine signifikanten Veränderungen im mikrobiellen Profil. Abbildung 23 A zeigt den Shannon Diversity Index, ein Indikator für Artenreichtum und Vielfalt. Er misst sowohl die Anzahl der Arten als auch die Ungleichheit zwischen den Artenhäufigkeiten. WT und CD160 K.O. Mäuse zeigten naiv und *S. ratti* infiziert, vergleichbare Werte. Abbildung 23 B zeigt die Hauptkomponentenanalyse, die Unterschiede zwischen mikrobiellen Gemeinschaften aus verschiedenen Umgebungen zusammenfasst und die Vergleichbarkeit der Proben anzeigt. Die einzelnen Proben häufen sich mittig zusammen, ohne spezielle Gruppen zu bilden. Demnach ähneln sich alle Proben in Bezug auf das intestinale Mikrobiom.

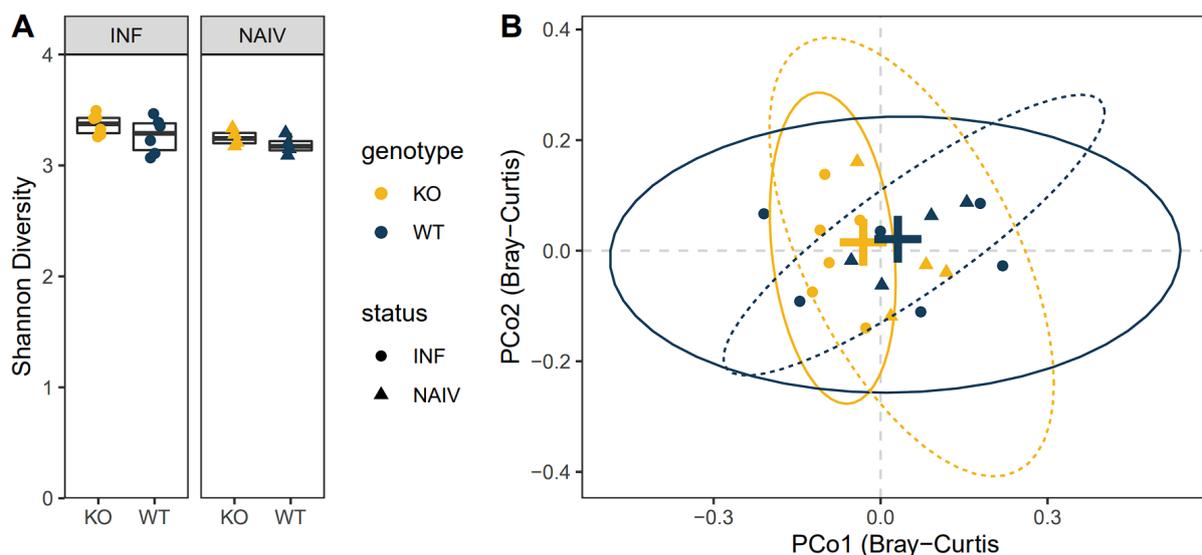


Abbildung 23 Mikrobiologische Zusammensetzung des Darms von WT- und CD160 K.O. Mäusen: Kotproben wurden von WT- (blau) oder CD160 K.O.- Mäusen (gelb) entweder vor der Infektion mit 1000 *S. ratti* L3 (Dreiecke) oder am Tag 6 der Infektion (Kreise) genommen. Die mikrobielle Zusammensetzung der Kotproben wurde mittels NGS der 16s-RNA analysiert. (A) Die Alpha-Diversität wird als Shannon-Diversität gemessen, (B) die mikrobielle Zusammensetzung ist nach der mikrobiellen

Bray-Curtis-Dissimilarität geordnet. Die Analyse der paarweisen Unterschiede wurde mit (Adonis/PerMANOVA) durchgeführt (n = 5 pro Genotyp und Zeitpunkt). Durchgezogene Linien zeigen infizierte Tiere an, gepunktete Linien zeigen naive Tiere. Die Kreuze zeigen den Schwerpunkt von K.O.- (gelb) und WT-Tieren (blau) an. Die Ordination ist eine uneingeschränkte Hauptkoordinatenanalyse, die mit `vegan:capscale` durchgeführt wurde, `dist = "bray"`, `metaMDS = F`.

Insgesamt lässt sich die geringere Wurmlast, die bei *S. ratti* infizierten CD160 K.O. Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen beobachtet wurde, nicht durch Unterschiede im intestinalen Mikrobiom erklären.

4.13. Beschreibung des Verlaufs der *S. ratti* Infektion in Dick- und Dünndarm

CD160 scheint die Abstoßung von *S. ratti* an Tag 6 p.i. zu antagonisieren. Während der Kinetik der *S. ratti* Infektion in WT und CD160 K.O. Mäusen (Abbildungen 6 B & 8 C) hatten CD160-defiziente Mäuse geringere Wurmlasten an Tag 6 p.i. Es konnte jedoch keine verbesserte Immunantwort oder ein Verändertes Mikrobiom in CD160 K.O. Mäusen beobachtet werden, dass die Reduktion der Wurmlast erklären würde. Auch spiegelte sich die reduziert Wurmlast in CD160 K.O. Mäusen nicht in einer reduzierten Freisetzung von *S. ratti* DNA im Kot der Mäuse wider (Abbildung 21 B). Um diesen widersprüchlichen Ergebnissen nachzugehen, wurden in einer Masterarbeit die Freisetzung von *S. ratti*-Eiern und L1 in allen vier Gruppen engmaschig gemessen [90]. Hierbei wurde ebenfalls die Anzahl der Kopien des für das *S. ratti*-spezifische 28s-RNA-kodierende Gen in Kotproben von infizierten Mäusen mittels quantitativer PCR bestimmt [106]. Die gesteigerte Wurmlast bei RAG K.O. x CD160-K.O. Mäusen im Vergleich zu RAG K.O. Mäusen an Tag 8 bis Tag 100 der Infektion (Abbildung 8 D) korrelierte mit einer erhöhten Freisetzung von *S. ratti*-DNA. Somit wurde durch eine zweite Methode gezeigt, dass in immundefizienten Mäusen CD160 entscheidend zur Kontrolle der Wurmlast nach Tag 6 beiträgt. Überraschenderweise setzten sowohl CD160 K.O. Mäuse als auch RAG-KO x CD160-KO Mäuse zwischen Tag 5 und Tag 21 gleiche Mengen an *S. ratti*-DNA im Vergleich zu CD160-kompetenten Mäusen frei, obwohl weniger adulte Würmer im Dünndarm gezählt wurden (Abbildung 8 C & D). Dies entspricht den in Abbildung 21 B gezeigten Resultaten für Tag 6 der Infektion.

S. ratti parasitiert im Dünndarm [107]. Veränderungen in der Immunantwort können jedoch zu einer Verschiebung der Lokalisation der Würmer ins Kolon führen [108]. Daher wurde die Wurmlast in WT Mäusen und CD160 K.O. Mäusen ebenfalls im Kolon bestimmt (Abbildung 24 A). In CD160 K.O. Mäusen war wie bereits in Abbildungen 6 und 8 gezeigt, die Wurmlast im Vergleich zu WT Mäusen im Dünndarm reproduzierbar reduziert. Tatsächlich war die Wurmlast im Kolon von CD160 K.O. Mäusen signifikant erhöht. Wenn man die Anzahl an Würmern in beiden Darmabschnitten zusammenfasst, ist die Reduktion der gesamten Wurmlast in CD160 K.O. Mäusen nicht mehr signifikant. Zusätzlich wurde der Ausstoß an Larven durch Quantifizierung der *S. ratti* spezifischen 28s RNA im Kot der Mäuse an Tag 5-7 p.i. auch in

dieser Arbeit gemessen. Die *S. rattii* DNA-Freisetzung war in Übereinstimmung mit der im Rahmen der Masterarbeit angefertigten genauen Kinetik [90] zu an allen gemessenen Zeitpunkten in WT und CD160 K.O. Mäusen vergleichbar (Abbildung 24 B).

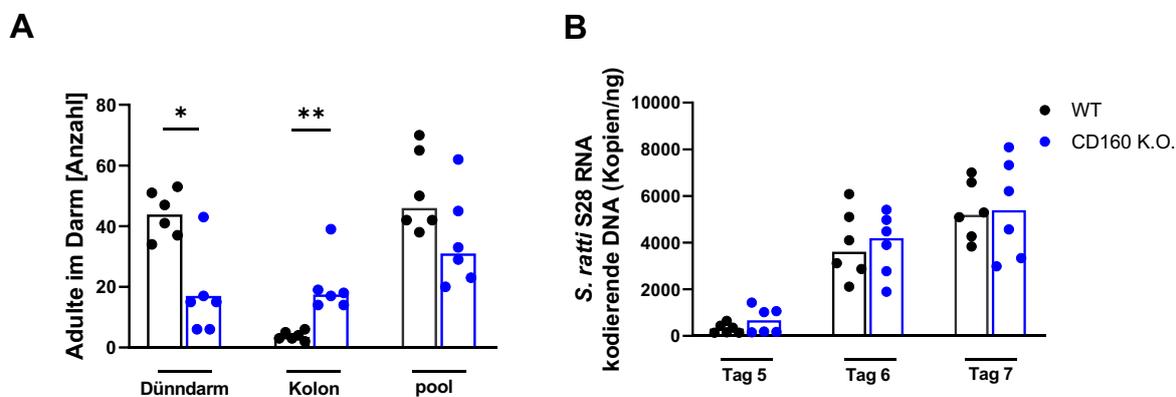


Abbildung 24 Vergleich der Wurmlast und Wurmausstoß in WT und CD160 K.O.: WT (Schwarz) CD160 K.O. (Blau) wurden s.c. mit 1000 *S. rattii* L3i infiziert. (A) Die Wurmlast im Dünndarm und Dickdarm an Tag 6 p.i. bestimmt. (B) Der Ausstoß von *S. rattii* 28S RNA-coding DNA an den angezeigten Tagen nach der Infektion wurde bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert eine Maus, die Balken zeigen den Mittelwert, die Sterne zeigen statistisch signifikante Unterschiede und Zahlen den p-Wert zwischen WT and CD160 K.O. Mäuse (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$; Students t-test). Gezeigt sind zwei Experimente ≥ 3 .

Zusammenfassend zeigt die zusätzliche Analyse der Wurmlast im Kolon, dass in CD160 K.O. Mäusen keine Reduktion der Wurmlast, sondern eine Verschiebung der adulten Würmer in den Kolon stattfindet. Dies erklärt die vergleichbare Freisetzung von *S. rattii* DNA i.e. von Eiern und L1 mit dem Kot in WT- und CD160 K.O.- Mäusen. Diese Verschiebung ist nicht mit einer drastischen Veränderung der adaptiven T- und B-Zell-Immunantwort gegen *S. rattii* verbunden. Es zeigte sich jedoch eine leicht gesteigerte Typ-II-Zytokinproduktion durch CD160 K.O. Lymphozyten *in vitro*, welche die Verschiebung von *S. rattii* Parasiten in den Kolon erklären könnte.

Im Gegensatz dazu zeigte die isolierte Betrachtung der angeborenen Immunantwort in CD160-defizienten Mäusen einen deutlichen Defekt der ILC2-Expansion und -Funktion, der mit einer fehlenden Aktivierung mukosaler Mastzellen einherging und zu einer drastisch erhöhten Wurmlast über einen Beobachtungszeitraum von fast 100 Tagen im Vergleich zu CD160-kompetenten Mäusen führte.

5. Diskussion

Bei jeglichen Infektionen steht das Immunsystem vor der Herausforderung, die Infektion zu bekämpfen, ohne großen Schaden im Körper anzurichten [37]. Im Laufe der Evolution hat das Immunsystem Mechanismen entwickelt, um die Homöostase aufrechtzuerhalten, einschließlich der Entstehung von negativen Regelkreisen und metabolischen Wegen, welche Immunantworten dämpfen können. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht darin, Checkpoint-Moleküle auf Immunzellen zu exprimieren, welche die Stimulation oder Hemmung von Zellen beeinflussen können. Das HVEM-Netzwerk besteht aus den Checkpoint-Molekülen LIGHT, BTLA und CD160. Bisherige Forschungsergebnisse zum HVEM-Netzwerk bei Wurminfektionen legen nahe, dass das Checkpoint-Molekül BTLA verstärkt auf CD4⁺ Effektor T-Zellen exprimiert wird und negative Signale vermittelt [40]. In BTLA-defizienten Mäusen, bei denen dieser Regulationsmechanismus fehlt, wurde während der *S. ratti* Infektion eine signifikante Steigerung der IL-9-Produktion und Mastzellaktivierung beobachtet. Als Folge davon wurde eine deutliche Reduktion der Wurmlast im Darm von BTLA K.O. Mäusen festgestellt.

Diese Doktorarbeit untersuchte die beiden weiteren Liganden von HVEM, LIGHT und CD160. Während in LIGHT defizienten Mäusen keine veränderte Wurmlast im Vergleich zur WT Kontrolle aufwies (Abbildung 6 B), führte die CD160 Defizienz in immunkompetenten Mäusen zu einer Verschiebung der adulten Würmer in den Kolon (Abbildung 24 A). In Abwesenheit des adaptiven Immunsystems hatte die CD160-Defizienz folgenschwerere Konsequenzen. Immundefiziente RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse konnten die Wurmlast ab Tag 6.p.i. nicht weiter reduzieren. Dies ging mit einer verringerten Mastzellaktivität und einer reduzierten Expansion von Mastzellen, ILC2 und NK-Zellen im Dünndarm einher. Bei Funktionsanalysen produzierten CD160-defiziente ILC2 weniger IL-13 und teilweise auch IL-9 *in vitro* und *in vivo* im Vergleich zu CD160-kompetenten ILC2.

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden wie folgt diskutiert:

- 5.1. HVEM-Netzwerk und adaptive Immunität - Die Rolle von LIGHT
- 5.2. HVEM-Netzwerk und adaptive Immunität - Die Rolle von CD160
- 5.3. HVEM-Netz und angeborene Immunität-Die Rolle von CD160
- 5.4. Signaltransduktion von CD160
- 5.5. Vergleich von CD160 in der angeborenen und adaptiven Immunität
- 5.6. Zukünftige Fragestellungen und Analysen

5.1. HVEM-Netzwerk und adaptive Immunität - Die Rolle von LIGHT

Das Checkpoint-Molekül LIGHT wird als transmembran und lösliche Isoform exprimiert [49,56] und hat unterschiedliche Mechanismen, das HVEM-Netzwerk zu beeinflussen. Die transmembrane Isoform von LIGHT vermittelt ko-stimulatorische Signale *in trans* und unterbindet die BTLA-HVEM-Bindung, während die lösliche Isoform die BTLA-vermittelten Signale verstärkt [56]. Liu et al. vermuten eine sterische Interferenz aufgrund kürzerer GPI-Anker von BTLA und auch von CD160. Diese seien „zu kurz“, um HVEM gleichzeitig mit LIGHT zu binden [71]. Transmembranes LIGHT dient somit als Gegenregulator des BTLA-Checkpoints [109], insbesondere bei der T-Zellaktivierung. LIGHT-defiziente T-Zellen zeigten eine verringerte Zytotoxizität *in vivo* [52]. LIGHT-HVEM-Signalisierung ist für die Abwehr von *Y. enterocolitica* erforderlich [71] und scheint eher bei proinflammatorischen Antworten von CD8⁺ T-Zellen eine Rolle zu spielen [110].

Die Defizienz von LIGHT hatte jedoch keine Auswirkungen auf die Kontrolle der wandernden Larven (Abbildung 6 A) oder der adulten Würmer (Abbildung 6 B) im Dünndarm *S. rattii* infizierter Mäuse. Die von BTLA vermittelten inhibitorischen Signale schienen nicht von LIGHT abhängig zu sein, wobei auch andere Regulationsmechanismen die LIGHT-Defizienz kompensieren könnten. Es wurden ausschließlich Analysen der Wurmlast an den Höhepunkten der Gewebewanderung und der intestinalen Phase, der *S. rattii* Infektion durchgeführt. Die beschriebene Relevanz von LIGHT auf T-Zellen [45,68,71] könnte zu einer Modulation der T-Zellaktivierung, oder T-Zell abhängigen Antikörperantworten und folgend der Semi-Resistenz gegen die *S. rattii* Infektion führen. Mögliche Defizite in der Induktion einer Semi-Resistenz würden sich nicht auf die Parasitenlast am Tag 2 oder 6 auswirken und sind in dieser Arbeit in LIGHT K.O. Mäusen nicht untersucht worden.

5.2. HVEM-Netzwerk und adaptive Immunität - Die Rolle von CD160

Die initiale Untersuchung von CD160-kompetenten und CD160-defizienten Mäusen ergab eine niedrigere Wurmlast in Abwesenheit von CD160 im Dünndarm. Überraschenderweise war der Ausstoß von *S. rattii* L1 mit dem Kot, gemessen als *S. rattii* DNA, in WT und CD160 K.O. Mäusen gleich und reflektierte nicht die Unterschiede der Wurmlast im Dünndarm. Dieser Widerspruch wurde mit einer genaueren Lokalisierung der *S. rattii* Adulten aufgeklärt. Obwohl *S. rattii* im Allgemeinen im Dünndarm parasitiert [107], waren Adulte im Kolon von CD160-defizienten Mäusen nachweisbar (Abbildung 24 A). Diese Delokalisation kann die reduzierte Wurmlast im Dünndarm an Tag 6 p.i. in CD160-defizienten Mäusen erklären. Wenn man die Wurmlasten von Dünndarm und Kolon zusammenfasst, sind die Unterschiede in der Wurmlast an Tag 6 p.i. nicht mehr signifikant und erklärt die vergleichbare DNA-Freisetzung im Kot infizierter Mäuse. Eine Verschiebung der Lokalisation der Würmer ins Kolon, kann unter anderem durch Veränderungen in der Immunantwort erklärt werden [108].

Um den Einfluss von CD160 auf das adaptive Immunsystem zu verstehen, wurden CD160 exprimierende adaptive Immunzellen identifiziert. Die Expression von CD160 ist gewebespezifisch [111]. Wie kürzlich publiziert [112], konnte auch in dieser Arbeit keine CD160 Expression auf T-Zellen in der Milz beobachtet werden (Abbildung 17 B). Demgegenüber und in Übereinstimmung mit publizierten Daten [62,63] exprimierten im Darm *S. rattii* infizierter Mäuse auch CD4⁺-, CD8⁺- und NKT- oder $\gamma\delta$ T-Zellen CD160 (Abbildung 7 B & 17 B). Ein Einfluss von CD160 auf die T-Zellaktivierung wäre also prinzipiell denkbar, da CD160 auf T-Zellen exprimiert ist.

CD160 wurde sowohl als Inhibitor als auch als Stimulator auf CD4⁺ T-Zellen beschrieben. CD160-defiziente CD4⁺ T-Zellen könnten demnach, analog zu den BTLA-defizienten CD4⁺ T-Zellen [63] aktiver sein, da ihnen negativ-regulierende Signale fehlen, was zu einer besseren Immunantwort gegen *S. rattii* führen könnte. Obwohl 20% der T-Zellen im Darm *S. rattii* infizierter Mäuse CD160 exprimierten (Abbildung 17 B), exprimierten - die für Wurminfektionen wichtigen - GATA-3⁺ TH2-Zellen kein CD160 (Abbildung 18 A) und expandieren in WT und CD160 K.O. gleichermaßen an Tag 6 p.i. (Abbildung 18 B).

Damit einhergehend konnten in dieser Doktorarbeit keine Anzeichen einer deutlich verbesserten CD4⁺ T-Zell Antwort in CD160-defizienten Mäusen festgestellt werden. Es zeigte sich lediglich eine moderate Verbesserung der adaptiven Immunantwort in CD160 K.O. Mäusen durch:

- i) Eine signifikant höhere Mastzellaktivierung ab Tag 10 p.i. (Abbildung 9 A), die jedoch nicht eine in dem Kolon verschobene Wurmlast Tag 6 p.i. erklärt.
- ii) Eine gesteigerte Produktion von IgG2b Antikörpern, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte und
- iii) eine signifikante Steigerung der von mLN-Zellen produzierten Typ-II-Zytokine bei einer *ex vivo* Restimulation aus Tag 6 p.i. *S. rattii* infizierten Mäusen.

Diese leichten Verbesserungen der Immunantwort der CD160-defizienten Mäuse gegen *S. rattii*, könnten Hinweise auf die Ursache der Delokalisation der adulten *S. rattii* geben und sprechen für eine negativ regulierende Rolle auf T-Zellen.

Passend dazu wurden CD160⁺ CD4⁺ T-Zellen Bindung mit HVEM-transfizierten NIH-3T3 Zellen inhibiert [63].

Dagegen spricht jedoch, dass das Engagieren der CD160-GPI-Isoform, die von der CD4⁺ Jurkat-T-Zelllinie überexprimiert wird, zu einer positiven Ko-Stimulation führte [113]. Außerdem verstärkte eine CD160-Stimulation die CD3-induzierte Aktivierung und Proliferation sowohl von CD160⁺ T-Zellen aus peripherem Blut [114] als auch von CD4⁺ CD160⁺ T-Zellen, die aus entzündlichen Hautläsionen isoliert wurden [115].

CD160 war auf 50% der CD8⁺ T-Zellen im Darm exprimiert und blieb während der *S. rattii* Infektion unverändert (Abbildung 17 B). Dies passt zu der Annahme, dass CD160 auf CD8⁺ T-Zellen hauptsächlich eine Rolle bei der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene hat. Dabei wurden ebenfalls ko-stimulatorische und ko-inhibitorische Signale in CD8⁺ T-Zellen beschrieben: Während der Infektion mit dem „Human Immunodeficiency Virus“ (HIV) im Menschen oder dem „*lymphocytic choriomeningitis virus*“ in der Maus [116], sowie *Listeria monocytogenes* [76], vermittelt CD160 ko-stimulatorische Signale. Im Gegensatz dazu wurde eine ko-inhibitorische Rolle von CD160 auf CD8⁺ T-Zellen während einer Malariainfektion gezeigt. Diese resultierte in einer verstärkten Immunpathologie bei *Plasmodium berghei* infizierten CD160 K.O. Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen [76].

Dennoch stieg während der *S. rattii* Infektion überraschenderweise die Frequenz CD8⁺ T-Zellen in der Milz, aber nicht im Darm an (Abbildung 17 A). Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass Würmer und endozytierte Wurm-Antigene in erster Linie CD4⁺ T-Zell-Antworten auslösen, die auf den Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II (MHC-II) beschränkt sind. Es wurde jedoch gezeigt, dass CD8⁺ T-Zellen bei extrazellulären Infektionskrankheiten auch durch Präsentation von endozytierten Antigenen aktiviert werden können [117]. Antigen präsentierende Zellen können exogene Antigene durch Phagozytose aufnehmen und sie CD8⁺ T-Zellen im Kontext von MHC-I-Molekülen präsentieren (Kreuzpräsentation) [118–120]. So expandierten CD8⁺ T-Zellen bei einer humanen Wurminfektion mit *Echinococcus multilocularis* im Blut [121]. Eine Infektion mit *Heligmosomoides polygurus* führte ab Tag 7 p.i. zu einer systemischen IL-4 abhängigen Expansion von „virtual memory CD8 T-Zellen“ (CD8 T_{VM}) im dränierenden, nicht-dränierenden mLN und in der Milz [122]. Der Großteil von CD8⁺ Gedächtniszellen exprimiert CD160 [123]. In dieser Arbeit wurden die CD8⁺ T-Zellen nicht weiter charakterisiert und könnten identisch mit den beschriebenen CD8 T_{VM} sein. Die Funktion dieser Zellen bei der Kontrolle von Wurminfektionen ist noch nicht bekannt.

Zusammengefasst zeigte CD160 bei der Regulation der adaptiven Immunität gegen *S. rattii* eine weniger dominante Rolle, als BTLA.

5.3. HVEM-Netz und angeborene Immunität-Die Rolle von CD160

In dieser Arbeit wurde das angeborene Immunsystem mit Hilfe von RAG K.O. Mäusen selektiv betrachtet. RAG K.O. Mäuse können die Infektion nicht klären und scheiden bis zu 300 Tage lang *S. rattii*-DNA auf einem niedrigen Niveau im Kot aus [32]. Passend zu den publizierten Daten [32] waren RAG K.O. Mäuse bis zu 98 Tage p.i. mit einer geringen Anzahl von 2 bis 5 Würmern infiziert. CD160-defizienten RAG K.O. Mäusen hatten einen Nachteil in der Expulsion der Würmer und hatten bis zu Tag 98 p.i. eine konstant hohe Wurmlast von etwa 50 Würmern (Abbildung 8 D). Im Folgenden sollen die möglichen Ursachen dieses drastischen Phänotyps diskutiert werden.

5.4. Die Mastzellaktivierung

Mukosale Mastzellen sind für die Beendigung einer Infektion mit *S. rattii* unerlässlich [32] und werden während einer *S. rattii* Infektion durch IL-3 [124–126], IL-9 [36] und *S. rattii* spezifisches IgG und IgE [127] aktiviert. Die CD160-Defizienz führte zu einem Ausfall der Mastozytose (Abbildung 10 A) und Mastzell-Degranulation (Abbildung 9 B). Dies könnte eine Ursache für die fehlende Reduktion der Wurmlast ab Tag 6 p.i. in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen sein (Abbildung 8). Die beschriebene CD160 Expression auf Mastzellen [57] konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Abbildung 10 B). Mögliche Unterschiede für diese Diskrepanz könnten die verschiedenen Ursprünge der Mastzellen sein. In dieser Arbeit wurden die Mastzellen, die als c-KIT⁺FcεRI⁺ Leukozyten definiert wurden, aus Darm assoziierten Lymphozyten von *S. rattii* infizierten Mäusen isoliert. Die Autoren identifizierten Mastzellen als CD117⁺ und kultivierte Hautzellen und Knochenmarkszellen 4 Wochen lang mit IL-3 und Stammzellfaktor (c-KIT-receptor), um Mastzellkulturen zu generieren. Zusätzlich wurde CD160 in dieser Arbeit auf der Zelloberfläche gefärbt, während Ortonne et al. intrazellulär färbten. Die Autoren blockierten dabei den Golgi-Apparat mit Monensin für 4 h, um CD160 zu akkumulieren und zu detektieren, was für die lösliche CD160 Isoform spricht. Die Autoren konnten nur die Transkripte der GPI-verankerten CD160 Isoform in Mastzellen zeigen. Es könnte also die GPI-verankerte Isoform in Mastzellen durch die Phospholipase D (PLD) [66] abgespalten werden, um lösliches CD160 zu bilden. Zur Unterstützung dieser Hypothese ist bereits bekannt, dass menschliche Mastzellen PLDs exprimieren, darunter solche, die an der spezifischen Spaltung von GPI-Strukturen beteiligt sind [128]. Die fehlende Mastozytose und Mastzell-Degranulation während der *S. rattii* Infektion in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen, könnte daher von löslichem CD160 abhängen, das von Mastzellen sezerniert wird. Dagegen spricht jedoch, dass die Mastzellen während der *S. rattii* Infektion in immunkompetenten CD160 K.O. Mäusen aktiviert wurden (Abbildung 9 A).

Abschließend war die mangelnde Mastzelldegranulation in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen nicht auf einen intrinsischen Defekt der Mastzellen zurück zu führen, da BMMC aus CD160 K.O. *in vitro* gleichermaßen aktiviert werden konnten. Die Stimulation mit PMA/I oder einem Modelantigen, oder *S. rattii*-spezifischer Stimulation mit *S. rattii*-spezifischer Antikörper+S. *rattii*-Antigen führte in CD160 K.O. und WT Mäusen zu einer vergleichbaren Hochregulation von CD107a (Abbildung 11). CD107a ist ebenfalls bekannt als „lysosomal-associated membrane protein-1“ (LAMP-1) und kann mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Es wird beim degranulieren in die Membran exponiert und gilt als Maß für Zytotoxizität [129].

Die CD160-Defizienz kann jedoch auch einen Effekt auf eine vorgeschaltete Zelle zur Mastzellaktivierung haben. Mastzellen können aber auch von den Zytokinen IL-9 [36] und IL-

13 [92] aktiviert werden, welches im angeborenen Immunsystem hauptsächlich von ILC2s produziert wird [130,131].

5.5. Rolle von CD160 auf Typ 2 ILCs

5.5.1. Expansion von ILC2s während der *S. rattii* Infektion

Die Relevanz von ILC2 während Wurminfektionen wurde anhand von ILC2-defizienten Mäusen ($Ror^{off/sgII7r^{Cre}}$) und induzierbarer Depletion von ILC2 (ICOS-T) nachgewiesen. So zeigten beide ILC-defizienten Mausmodelle eine erhöhte Wurmlast bei einer *N. brasiliensis* Infektion und eine einhergehende reduzierte TH2-Polarisierung, die sich durch eine reduzierte IL-5 und IL-13 Produktion von $CD4^+$ T-Zellen äußerte [132].

ILC2 exprimieren größere Mengen des Transkriptionsfaktors GATA-3 als die anderen ILC-Untergruppen und das Fehlen von GATA-3 hemmt die Entwicklung und Funktion der ILC2 [5]. Obwohl der IL-33 Rezeptor ST2 ein klassischer Marker für geweberesidente ILC2 bei Mäusen ist, exprimieren einige geweberesidente ILC2 kein ST2, da die ST2-Expression durch das Ursprungsgewebe und der Umgebung beeinflusst werden kann [133]. $GATA3^+$ ILC2 expandierten im Darm von Rag K.O. Mäusen während der *S. rattii* Infektion, wobei in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen die $GATA3^+$ ILC2 auf dem Niveau naiver Mäuse waren (Abbildung 12 D). Diese Expansion ging mit einer Steigerung der Frequenz von $CD160^+$ ILC2 in Milz und Darm einher.

ILC2s in CD160-kompetenten oder CD160-defizienten immunkompetenten Mäusen expandierten nicht während der *S. rattii* Infektion (Abbildung 22 A). Dennoch erhöhte sich die Frequenz $CD160^+$ ILC2s während der *S. rattii* Infektion ebenfalls in der Milz und im Darm (Abbildung 22 B). Dies unterstreicht die wichtige Rolle von CD160 auf ILC2, das stimulatorische Signale in $CD160^+$ ILC2s geben könnte, die in CD160-defizienten Mäusen ausbleiben.

5.5.2. Funktion von CD160-kompetenten und CD160 defizienten ILC2s

ILC2 produzieren IL-9 während einer Infektion mit *N. brasiliensis* [134]. IL-9 induziert Mastozytose, Eosinophilie, Mastzellinfiltration und Schleimproduktion indirekt über IL-4, IL-5 und IL-13 [133]. Darüber hinaus ist der autokrine IL-9 Signalweg auf ILC2s wichtig für die Expansion von dem „epidermalen Wachstumsfakt“-Rezeptor (EGFR)-Liganden Amphiregulin in der Lunge [134,135]. Da das von ILC2 abgeleitete Amphiregulin eine wichtige Rolle bei der epithelialen Regeneration und der Gewebereparatur bei Wurminfektionen spielt, beeinträchtigt der Verlust des IL-9-Signalwegs die Reparatur des Lungengewebes nach einer Infektion mit *N. brasiliensis* und verzögert letztlich die Beseitigung des Wurms [134].

Während der *S. rattii* Infektion aktiviert IL-9 mukosale Mastzellen und führt zur frühen Eliminierung einer *S. rattii* Infektion, die durch IL-33 verstärkt wird [15]. Die Alarm-Zytokine IL-25 und IL-33, die bei Gewebeschädigungen durch Wurminfektionen freigesetzt werden, spielen bei der Expansion von ILC2s im Darm, bei einer Infektion mit den *N. brasiliensis* oder *Heligmosomoides polygyrus bakeri* eine entscheidende Rolle [136–138]. Es ist jedoch wichtig zu beachten, dass IL-25 und IL-33 auf unterschiedliche Weise und auf verschiedene ILC2-Untergruppen wirken. Während IL-25 die geweberesidente Lin⁻ CD90^{hi} KLRG1^{int} "natürlichen" ILC2 (nILC2) vermehren kann, wurde kürzlich auch gezeigt, dass es eine migratorische Lin⁻CD90^{low} KLRG1^{hi} "inflammatorische" ILC2 (iILC2) vermehrt, die im Zusammenhang mit einer *Candida albicans* Infektion IL-17 produzieren kann [95]. IL-33 aktiviert nachweislich Typ-II-Zytokin-produzierende nILCs, kann aber auch Leukotriene und freie Fettsäuren synergistisch nutzen, um die ILC2-Funktion bei Typ-II-Entzündungen der Atemwege zu verbessern [139].

GATA3⁺ ILC2s entsprachen aufgrund der hohen CD90.2 Expression eher nILC2 (Abbildung 12 C). Diese zeichnen sich durch eine verstärkte IL-13 Produktion aus [95]. Eine reduzierte IL-13 und/oder IL-9 Produktion von ILC2s könnte die ausbleibende Mastzellantwort in CD160-defizienten RAG K.O. Mäusen erklären.

Die Funktion der isolierten ILC2 *ex vivo* zu analysieren, war wegen der reduzierten Zellvitalität aufgrund des aufwendigen Isolierprotokolls der LPL nicht möglich. Jedoch konnten Knochenmarks-ILC2 *in vitro* funktionell analysiert werden. Die Stimulation mit rekombinanten IL-33, führte zu einer reduzierten Produktion von IL-5, IL-9 und IL-13. Dies könnte entweder aufgrund mangelnder stimulatorischer Signale von CD160, oder einem intrinsischen Defekt der ILC2 in CD160-defizienten Mäusen liegen. Um dieses Phänomen weiter auf den Grund zu gehen, wurde ein IL-33 abhängiges Allergiemodell (*Alternaria alternata*) eingesetzt. Das *Alternaria alternata* Allergiemodell führt zur Einwanderung und Aktivierung von ILC2 in der Lunge und induziert eine ausgeprägten Eosinophile [18].

Eine *Alternaria alternata* induzierte Aktivierung von Lungen ILC2 in RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen, führte ebenfalls zu einer geringeren Produktion von IL-13 in CD160-defizienten Mäusen. Diese war sowohl intrazellulär als auch im BAL behandelte Mäuse zu sehen war (Abbildung 14 und 15). IL-9 ist intrazellulär nur schwer messbar [131], weshalb IL-9 Reporter Mäuse genutzt werden müssen, die im Zuge dieser Arbeit nicht auf CD160-defizienten Hintergrund zur Verfügung standen. Die im BAL gemessene IL-9 Menge war in Abwesenheit von CD160 als trend reduziert. Diese reduzierte Produktion der ILC2 Schlüsselzytokine IL-13 und IL-9 *in vitro* und *in vivo*, könnten die verringerte Mastzellaktivität und Mastozytose in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen erklären. Dies deutet darauf hin, dass CD160 ein aktivierender Rezeptor auf ILC2 sein könnte. Es wurden bereits Checkpoint-

Moleküle auf ILC2 beschrieben. Beispielsweise regulierte PD-1 programmed cell death protein-1 (PD-1) [140], cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4), T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains (TIGIT) [141,142] und CD200R [143] die ILC2 Funktion in der Lunge von Mäusen und im peripheren Blut von Menschen negativ. Dementsprechend wäre es denkbar, dass CD160 positive regulatorische Signale in ILC2 vermittelt.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass der CD160 K.O. in ILC2 zu einem unspezifischen Defekt führt, der keine physiologische Rolle von CD160 in ILC2 Regulation im Wildtyp reflektiert.

5.6. Die Rolle von CD160 auf Typ 1 ILC und NK-Zellen

NK-Zellen spielen normalerweise eine Rolle bei der Typ-1-Immunantwort gegen Viren, intrazelluläre Bakterien und Tumoren. Es gibt auch Hinweise auf eine Beteiligung von NK-Zellen bei der Abwehr von Würmern. Sie fördern die Immunität gegen den Fadenwurm *Litomosoides sigmodontis* [144] und den Fuchsbandwurm *Echinococcus multilocularis* [145] bei Mäusen. Zusätzlich tragen IL-13-produzierende NK-Zellen zur Resistenz gegen den Darmwurm *Trichuris muris* bei [146] und fördern die Aktivierung von Becherzellen und die Schleimproduktion im Darm bei Mäusen, die mit Trichinen (*Trichinella spiralis*) infiziert sind [147]. Es wurde kürzlich berichtet, dass sowohl humane tumorinfiltrierende NK-Zellen als auch murine NK-Zellen IL-9 produzieren (42, 43), was ein Schlüsselzytokin in der Immunität gegen *S. ratti* ist [36].

Neben ILC2 sind die wichtigen CD160-positiven Zellpopulationen des angeborenen Immunsystems im Dünndarm ILC1 und NK-Zellen. Die Oberflächenexpression von CD160 wurde als Erstes auf NK-Zellen beschrieben [84] und NK-Zellen exprimieren exklusiv, die transmembrane Isoform von CD160, während andere Zellpopulationen GPI-verankertes CD160 exprimieren [65]. In dieser Arbeit wurden CD160⁺ NK-Zellen und ILC1 im Darm identifiziert und anhand der Expression des Transkriptionsfaktors EOMES differenziert. Fuchs et al. beschrieben CD160 als Marker für intestinale intraepitheliale ILC1, da sie eine deutliche Population von CD160⁺ NK1.1⁺ Zellen innerhalb der intraepithelialen ILC1 von RAG K.O. Mäusen identifizierten, die in anderen Organen wie der Milz fehlten [82]. In Übereinstimmung mit dieser Arbeit konnte diese NK.1.1⁺ EOMES⁻ CD160⁺ Population in den LPL von RAG K.O. Mäusen beobachtet werden (Abbildung 7). Tatsächlich exprimierten 100% der NK1.1⁺ ILC1 CD160 und könnten identisch mit der Population sein, die Fuchs et al. beschrieben. Die gleiche NK1.1⁺ EOMES⁻ Population wurde ebenfalls in der Leber von WT und RAG K.O. Mäusen beobachtet, jedoch exprimierten nur etwa 50% CD160 [148].

Die Charakterisierung von ILC1 und NK-Zellen ist oft problematisch, da diese ähnliche phänotypische Markierungen aufweisen wie die Expression von CD49b (DX5) oder NK1.1 [5]. Es muss auf die Differenzierung mittels Transkriptionsfaktoren wie EOMES für NK-Zellen und „T-box expressed in T cells“ (T-bet) für ILC1 zurückgegriffen werden [149]. Beispielsweise sind die von Fuchs et al. beschriebene CD160⁺ NK.1.1⁺ Darmpopulation EOMES⁻ und somit keine NK-Zellen, sondern entsprechen nach dem aktuellen Verständnis [149] eher ILC1. Insgesamt ist es jedoch aufgrund der Ähnlichkeit dieser beiden Zelltypen schwierig, die Expression von CD160 auf NK-Zellen und ILC1 bisher publizierter Daten zu beurteilen und mit den hier erhobenen Daten zu vergleichen.

Fuchs et al. beschrieben ebenfalls, dass maximal 5% der NK-Zellen in der Milz von RAG K.O. Mäusen, CD160 exprimieren [82], während in dieser Arbeit eine höhere CD160 Expression von etwa 10% (Abbildung 12 E) beobachtet wurde. Dies könnte an unterschiedlichen Färbestrategien liegen, da Fuchs et al. NK-Zellen als NKp46⁺ NK1.1⁺ identifizierten, während in dieser Arbeit der spezifische NK-Zelltranskriptionsfaktor EOMES (NK1.1⁺ EOMES⁺) berücksichtigt wurde. Im Darm dagegen exprimierten bis zu 80% der NK-Zellen CD160. Während der *S. rattii* Infektion verringerte sich die Frequenz der CD160⁺ NK-Zellen, während sich die Frequenz der gesamten NK-Zellen in den LPL und in der Milz erhöhte (Abbildung 22 B). Die Frequenz von NK-Zellen erhöhte sich in der Milz *S. rattii* infizierter immunkompetenter Mäuse (Abbildung 22 A) unabhängig der CD160-Defizienz. Im Darm konnte ebenfalls eine solche Induktion beobachtet werden, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 22 A). Dies könnten Hinweise auf einer Induktion CD160⁻ NK-Zellen in den Darm aufgrund der verursachten Gewebeschädigung sein. Kürzlich wurde beschrieben, dass die IFN- γ -abhängige Rekrutierung von NK-Zellen, die Gewebeschäden während einer Infektion mit *Heligmosomoides polygyrus bakeri* im Darm begrenzt [71], was auf ihre Rolle in der Immunregulation hinweist. Interessanterweise konnte diese Induktion von NK-Zellen im Dünndarm und Milz immundefizienter RAG K.O. Mäuse nicht beobachtet werden (Abbildung 12 B). Auch die CD160 Expression auf NK-Zellen im Dünndarm war während der *S. rattii* Infektion unverändert (Abbildung 12 E). Dies könnte daran liegen, dass die NK-Zell Rekrutierung teilweise abhängig von T-Zellen ist, die Zytokine wie IFN- γ produzieren können [150]. T-Zell- defiziente RAG K.O. Mäusen könnten somit einen Defekt in der NK-Zellrekrutierung während der *S. rattii* Infektion haben. Obwohl 100% der ILC1 CD160 exprimieren, blieb die Frequenz in CD160- kompetenten und CD160 defizienten, WT oder RAG K.O. Mäusen während der *S. rattii* Infektion unverändert (Abbildung 12 D & 22 A). Zusätzlich war die CD160 Expression auf ILC1 an Tag 6 p.i. in WT oder RAG K.O. Mäusen auf dem Niveau gesunder Mäuse (Abbildung 12 E). Zusammenfassend deuten die ähnlichen Frequenzen von NK-Zellen und ILC1 in CD160-kompetenten und CD160-defizienten Mäusen während der Infektion mit *S. rattii* darauf hin, dass die CD160-Defizienz von geringer

Bedeutung ist. Dennoch hat CD160 eine relevante Rolle auf die Funktionalität von NK-Zellen und ILC1, die sich in der Frequenz nicht widerspiegeln würden.

NK-Zellen und ILC1 unterscheiden sich funktionell, da NK-Zellen spezielle zytotoxische Zellen sind, die Perforin stark exprimieren, während ILC1 eine geringe Perforin-Expression aufweisen [5]. Dabei spielt CD160 eine wichtige Rolle bei der Induktion der Zytotoxizität und Degranulation von humanen CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen [151]. CD160 K.O. Mäuse zeigten einen NK-Zell Defekt in der Tumorkontrolle und in der NK-Zell-abhängigen IFN- γ Produktion *in vivo* [102]. Außerdem fördert CD160 die NK-Zellfunktionen durch Hochregulieren des Glukosestoffwechsels und korreliert negativ mit dem Fortschreiten der HIV-Erkrankung [152]. CD160 auf NK-Zellen gilt also als ko-stimulierender Rezeptor.

Analog zu den in dieser Doktorarbeit durchgeführten vergleichenden Funktionsanalyse von RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. ILC2 *in vitro*, wurde die Funktion von RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. NK-Zellen und NK1.1⁺ ILC1 aus der Milz, in einer Masterarbeit verglichen [153]. Hierbei wurde eine *in vitro*-Aktivierung von aus der Milz präparierter NK-Zellen und ILC1 durchgeführt. In Übereinstimmung mit der von Tu et al. [102] berichteten unveränderten Zytotoxizität in WT und CD160 K.O. Mäusen wurde eine unveränderte Exposition von CD107a in CD160⁺ und CD160⁻ NK-Zellen festgestellt [153].

ILC1 reagierten auf die Stimulation mit IL-12 und IL-15, mit einer erhöhten INF- γ Produktion [82]. Die Masterarbeit betrachtete ebenfalls die NK1.1⁺ EOMES⁻ ILC1-Untergruppe und verglich CD160⁺ mit CD160⁻ Zellen. CD160⁻ NK1.1⁺ ILC1 exponierten nach Aktivierung mit PMA/I oder einem Zytokincocktail (IL-2, IL-15, IL-18) mehr CD107a und zeigten mehr intrazelluläre INF- γ Produktion als CD160⁺ NK1.1⁺ ILC1 aus derselben Milzzellkultur [153] und hatten somit einen aktivierteren Phänotyp. Diese Resultate gehen mit einer negativ regulierenden Funktion von CD160 auf NK1.1⁺ ILC1 einher. Passend produzierten CD160⁺ Leber ILC1 weniger Granzym A nach PMA/I Stimulation, als CD160⁻ ILC1 [148].

Eine CD160-abhängige Funktionsanalyse von NK-Zellen und ILC1 aus LPL, würde die Rolle von CD160 während der *S. rattii* Infektion besser aufklären.

5.7. CD160 Signalisierung

Die in dieser Arbeit generierten Daten passen zu der Hypothese, dass CD160 während einer Wurminfektion als positiver Regulator von ILC2 funktioniert, was in Abwesenheit von CD160 zu einer reduzierten Zytokinproduktion, mangelnden Expansion und Aktivierung von Mastzellen und schlechteren Wurmkontrolle führt. Gegensätzlich wurde während einer Masterarbeit eine negativ regulierende Funktion von CD160 auf ILC1 beschrieben, da CD160⁻ ILC1 mehr CD107a und mehr intrazelluläre INF- γ Produktion nach *in vitro* Stimulation

exprimierten. Es stellt sich die Frage, wie diese unterschiedliche Signalisierung durch dasselbe Checkpoint-Molekül zustande kommt.

CD160 wird in NK-Zellen auch als TM Protein exprimiert, auf anderen Zellen jedoch als nur GPI-verankerte Isoform [65]. Die Expression von transmembranen CD160 in NK-Zellen reguliert den Glukosestoffwechsel durch die Aktivierung des AKT/mTOR/s6k-Signalweges [152]. Und die Signalisierung vom TM-CD160 wurde als ko-stimulatorisch beschrieben [65,102].

Der Signalweg der GPI-verankerten Isoform von CD160 ist weitgehend unerforscht. CD160-GPI enthält keine „immunoreceptor tyrosine-based motifs „ (ITAMs) und es ist noch nicht klar, wie Signaltransduktion vermittelt wird [151]. Le Bouteiller et al. schlugen vor, dass CD160 mit Adaptorproteinen assoziiert sein könnte, die ITAMs in Lipid Rafts enthalten, um einen nachgeschalteten Signalweg zu initiieren [151]. Rabot et al. wiesen jedoch nach, dass CD160 nicht in der Lage ist, sich mit den Signaladaptoren DAP10 oder DAP12 zu assoziieren [64]. Darüber hinaus ist die Funktion der beiden verkürzten Isoformen, CD160- Δ Ig-GPI und CD160- Δ Ig-TM [65], noch nicht beschrieben. Diese wurden bisher nur auf der Transkriptionsebene nachgewiesen [65]. Daher weiß man noch nicht, ob CD160- Δ Ig-GPI und CD160- Δ Ig-TM auf der Zelloberfläche exprimiert werden [65]. Die widersprüchlichen Forschungsergebnisse zur Signaltransduktion der GPI-verankerten CD160-Isoform spiegeln die unterschiedlichen und widersprüchlichen Funktionen auf verschiedenen Zelltypen wider und erfordern weitere Aufklärung. Die intrazelluläre IL-5 Produktion von CD160-kompetenten und CD160-defizienten ILC2 *in vivo* war bei einem *Alternaria alternata* Allergiemodell vergleichbar, während CD160-defiziente Mäuse weniger IL-9 und IL-13 produzierten (Abbildung 14 F). Passend konnte eine CD160-unabhängige Eosinophilie gezeigt werden (Abbildung 14 F). Dies könnte für einen CD160-abhängigen Signalweg für die IL-9 und IL-13, aber nicht der IL-5 Produktion sprechen. Gegen einen intrinsischen Defekt der CD160-Defizienten ILC2 könnte die intakte IL-5 Produktion sprechen.

Lösliches CD160 reguliert die Funktionen der adaptiven Immunität, moduliert die Funktionen der T-Helferzellen und hemmt die Zytotoxizität von CD8⁺ T-Zellen, indem es die Interaktion von CD160 mit HVEM oder MHC-I verhindert [57,66]. CD160⁻ Zellen könnten CD160 intrazellulär exprimieren [57] oder durch PLD -vermittelten Verdau von der Membran abwerfen [66]. Somit könnte eine initial CD160⁺ Zelle nach Stimulation CD160 von der Oberfläche durch PLD-vermittelten Verdau des GPI-Ankers abgeworfen hatte und so in der Durchflusszytometrischen Färbung CD160⁻ erscheint. In dieser Arbeit konnte lösliches CD160 im Plasma infizierter Mäuse nicht detektiert werden, da keine spezifischen Werkzeuge zur Verfügung standen. Ein angeblich für murines CD160-spezifischer ELISA reagierte mit Serum von CD160 K.O. Mäusen.

Die bekannten putative Liganden von CD160, welche Signaltransduktion auslösen könnten, sind MHC-I [59–62] und HVEM [63]. Für beide Liganden wurde die Induktion von positiven Signalen in die CD160⁺ Zellen beschrieben.

HVEM-vermitteltes [101,154], aber auch MHC-I (HLA-C)-vermitteltes [100] CD160-Engagement erhöhte z.B. die Zytokinproduktion und Zytotoxizität von humanen NK-Zellen *in vitro*. Bei der CD160-Signalisierung sind also die Isoform, Zellsorte und Ligand von entscheidender Bedeutung. In dieser Arbeit wurde die Frage nach dem biologisch relevanten Liganden von CD160 während der angeborenen Immunantwort auf eine Wurminfektion adressiert, indem ein Ligand, HVEM, „aus dem Spiel“ genommen wurde. RAG K.O. x HVEM K.O. Mäuse haben einen ähnlichen Infektionsverlauf wie RAG K.O. Mäuse und konnten die Wurmlast auf 2-5 Würmer reduzieren (Abbildung 16 A) und eine Mastzellantwort induzieren (Abbildung 16 B). Dies zeigt, dass HVEM vermitteltes CD160-Engagement nicht essentiell für die Funktion von CD160-positiven Zellen des angeborenen Immunsystems wie ILC2 ist. Eine alternative Hypothese, wäre somit, dass MHC-I der relevante CD160 Ligand ist, denn MHC-I bleibt ein funktioneller Ligand für CD160 in RAG K.O. x HVEM K.O. Mäusen vorhanden. Des Weiteren ist es möglich, dass CD160 Liganden-unabhängig signalisiert.

Die HVEM Defizienz in immunkompetenten Mäusen hatte eine bessere Kontrolle der Wurmlast zur Folge, was jedoch eher auf die Unterbrechung des inhibitorischen BTLA-Signalwegs zurückzuführen ist [40]. Da BTLA hauptsächlich auf T-Zellen exprimiert ist und T-Zell Antworten reguliert, scheint das fehlende Engagement von BTLA durch HVEM in immundefizienten HVEM K.O. RAG K.O. Mäusen keine Folgen für die Immunantwort und der Wurmlast zu haben.

Generell scheint im Darm die HVEM-LIGHT-Interaktion weniger kritisch und von geringerer Bedeutung zu sein. Eine LIGHT-Defizienz führte zu einer Verschlimmerung einer Dextransulfat Natriumsalz induzierten Kolitis, die jedoch nicht abhängig von HVEM, sondern von dem anderen Liganden LT β R ist.

5.8. Vergleich von CD160 in der angeborenen und adaptiven Immunität

In dieser Arbeit wurde unterschiedliche Rollen von CD160 bei der Immunantwort gegen *S. ratti* identifiziert. Während der CD160-Defizienz wurde eine leichte Verbesserung in der Produktion von Typ-II-Zytokinen bei stimulierten Lymphozyten beobachtet, begleitet von einer Verschiebung der Wurmlast in den Kolon immunkompetenter Mäuse. Zusätzlich zeigte sich eine zeitnahe Eliminierung der adulten Würmer im Darm, die mit der von WT Mäusen vergleichbar war. Im Gegensatz dazu führte die CD160-Defizienz bei immundefizienten Mäusen zu einem Ausbleiben der Mastzellantwort gegen *S. ratti*, was wiederum zu einer fehlenden Kontrolle der Wurmlast führte. Dies könnte auf eine eingeschränkte Expansion und

Zytokinproduktion von ILC2 zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung für die Eliminierung der *S. ratti* Infektion in immunkompetenten Mäusen mit CD160-Defizienz liegt in der intakten Mastzellfunktion. Dies könnte auf eine T-Zell-vermittelte Aktivierung der Mastzellen über IgE und IgG1-Kreuzvernetzung zurückzuführen sein. Es ist zusätzlich möglich, dass T-Zellen die eingeschränkte Zytokinproduktion der ILC2 kompensieren und Mastzell-aktivierende Zytokine wie IL-9 oder IL-13 produzieren. Diese Vermutung wird durch die ausbleibende Expansion von ILC2 in immunkompetenten Mäusen während der *S. ratti* Infektion unterstützt. So könnten die für die Mastzellaktivierung notwendigen Zytokine in dem Fall ebenfalls von T-Zellen stammen. Die erhöhte Frequenz von CD160 während der Infektion könnte dennoch für eine ILC2 Aktivierung sprechen, die aufgrund kompensierender Effekte nicht so stark sein „muss“, wie in RAG K.O. Mäusen. Ebenfalls spricht die normale Produktion von *S. ratti*-spezifischem IgG1 in den immunkompetenten CD160 K.O. Mäusen für eine unbeeinträchtigte T-Zellaktivität (Abbildung 20 B). Diese wurde zusätzlich durch eine *S. ratti*-spezifische Produktion von IL-9 und IL-13 in Lymphozytenkulturen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten in Abwesenheit von CD160 bestätigt (Abbildung 19). Des Weiteren sind die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse auf einem C57BL/6 Hintergrund, auf dem kürzlich mehrere Regulationsebenen bei einer *S. ratti* Infektion gezeigt wurden, die für eine Kompensation sorgen könnte [155].

Die reduzierte Wurmlast an Tag 6 p.i. in CD160 K.O. Mäusen war auf eine Verschiebung der Lokalisation der adulten Würmer zurückzuführen. Diese Verschiebung wurde in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen im Rahmen dieser Arbeit aufgrund von Zeitmangel nicht überprüft. Die von Scherer et al. durchgeführte Analyse der Freisetzung von *S. ratti*-DNA zeigte am Tag 6 p.i. vergleichbare DNA-Mengen im Kot von RAG K.O. Mäusen und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen [90]. Dies lässt vermuten, dass auch in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen die reduzierte Wurmlast am 6. Tag p.i. mit einer Verschiebung der Lokalisation der Würmer einhergeht. Diese würde sich jedoch nicht mit einer verbesserten Typ-II-Zytokinproduktion von T-Zellen erklären lassen, da RAG K.O. Mäuse T-Zell-Defizient sind. Eine T-Zellen und Mastzellen unabhängige Ursache könnten basophile Granulozyten sein. Diese spielen in der frühen Immunantwort gegen *S. ratti* eine Rolle. Basophil-Defiziente Mäuse hatten eine erhöhte Wurmlast an Tag 6 p.i., die mit einer erhöhten Freisetzung von *S. ratti*-DNA einherging [33]. Dennoch können Basophilen-defiziente Mäuse die Infektion innerhalb von 4 Wochen eliminieren, dabei hatte die Defizienz keinen Einfluss auf die *S. ratti* spezifischen Produktion von Zytokinen und Antikörpern sowie die Aktivierung von Mastzellen [33].

Zusammengefasst sind WT und RAG K.O. Mäuse gute Werkzeuge, um die Rolle von CD160 in der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen *S. ratti* differenziert zu untersuchen. So konnte die Relevanz CD160-kompetenter ILC2s auf die Wurmabwehr nur in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems gesehen werden. Diese Beobachtungen legen nahe, dass

CD160 während der *S. ratti* Infektion eine ko-stimulatorische Rolle auf ILC2s spielt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das komplexe Netzwerk ko-stimulatorischer und ko-inhibitorischer Checkpoint-Moleküle weiter aufzuklären.

6. Ausblick

In dieser Arbeit wurde eine regulatorische Funktion von CD160 während der *S. ratti* Infektion untersucht. Hierbei könnten inhibitorische Funktionen auf T-Zellen, oder stimulatorische Funktionen auf ILC2 vermutet werden.

Besonders gravierende Konsequenzen hatte die CD160-Defizienz in Abwesenheit des adaptiven Immunsystems. Bei immundefizienten RAG K.O. CD160 K.O. Mäusen konnte die Wurmlast ab Tag 6 p.i. nicht weiter reduziert werden. Dies ging mit einer verringerten Mastzellaktivität und einer reduzierten Expansion von Mastzellen, ILC2 und NK-Zellen im Dünndarm einher. In Funktionsanalysen produzierten CD160-defiziente ILC2 im Vergleich zu CD160-kompetenten ILC2 weniger IL-13 und teilweise auch weniger IL-9, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

6.1. Herstellung eines kausalen Zusammenhangs zwischen CD160 exprimierenden ILC2 und modulierter Anti-*S. ratti* Immunität

Um die Relevanz CD160⁺ ILC2 *in vivo* zu bestätigen, wäre ein adoptiver Transfer von ILC2 aufschlussreich. Unter Verwendung von RAG K.O. und RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen als Spender, könnten entweder Knochenmarks ILC2, oder ILC2 aus Milz, Lunge, Peritoneum, oder Darm isoliert werden. Dabei wären ILC2 aus dem Darm erstrebenswert, um Gewebe spezifische Einflüsse einer Darminfektion zu berücksichtigen. Um die Frequenz der ILC2 künstlich zu erhöhen, könnten Spendermäuse mit rekombinanten IL-33-behandelt werden. Es sollten ILC2 aus RAG K.O. x CD160 K.O. als Kontrolle genommen werden, anstatt sortierte CD160⁺ ILC2, da diese möglicherweise lösliches oder intrazelluläres CD160 exprimieren, oder CD160 hochregulieren. Der adoptive Transfer könnte an Tag 14 p.i. erfolgen, um zu prüfen, ob die Wurmlast, die ab Tag 8-10 bei RAG K.O. x CD160 K.O. im Vergleich zu RAG K.O. erhöht ist, in der darauffolgenden Woche (Tag 21 p.i.) verringert wird. Die Effizienz des Transfers sollte mittels Durchflusszytometrie von Blut- und Lamina propria-assoziierten Zellen kontrolliert werden. Zusätzlich zur Wurmlastbestimmung, können Blutproben im Verlauf des Transfers entnommen werden, um mMCP-1 Konzentrationen im Plasma zu bestimmen. Die Hypothese wäre, dass eine CD160⁺ ILC2 induzierte Mastzellaktivierung für die Reduzierung der Wurmlast sorgen würde.

6.2. Unterscheidung zwischen Signalen, die in CD160-exprimierende Zellen gelangen, und mutmaßlichen Signalen, die von CD160 in MHC-I-exprimierende Zellen gelangen

In dieser Arbeit wurde kein Einfluss von HVEM auf die angeborene Immunantwort gegen *S. ratti* beobachtet. RAG K.O. x HVEM K.O. Mäuse zeigten vergleichbare Wurmlasten wie RAG K.O. Mäuse. Die für die *S. ratti* Infektion relevante Signalisierung könnte demnach von einer MHC-I exprimierende Zelle in einer CD160 exprimierenden Zelle kommen, oder von einer CD160 exprimierenden Zelle in eine MHC-I exprimierende Zelle. Es könnten B- und T-Zell defiziente MHC-I K.O. Mäuse genutzt werden. Diese sollten hypothetisch ebenfalls die *S. ratti* Wurmlast zu späteren Zeitpunkten nicht kontrollieren können. Um zwischen den Möglichkeiten der Signalisierung zu unterscheiden, könnte MHC-I in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäusen durch *intra venöser* Verabreichung von löslichem CD160, wie beschrieben [70], aktiviert werden. Alternativ könnte CD160 in B- und T-Zell defizienten MHC-I K.O. Mäusen zu späteren Zeitpunkten der Infektion durch *intra venöser* Verabreichung eines MHC-I-Ig-Fusionsproteins aktiviert werden. Es kann ein Effekt von HVEM jedoch nicht ausgeschlossen werden, so hatten HVEM-defiziente Mäuse einen Vorteil während der *S. ratti* Infektion [40]. Hier schienen zwar BTLA vermittelte Signale zu dominieren, jedoch kann CD160 aufgrund der geteilten Bindungsstelle an HVEM ebenfalls eine Rolle spielen. Um die Frage zu beantworten, könnten ebenfalls HVEM-Ig-Fusionsproteine in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse zu einem späteren Zeitpunkt der *S. ratti* Infektion verabreicht werden, um die erhöhte Wurmlast zu reduzieren. Diese Versuche könnten ebenfalls die Möglichkeit eines intrinsischen Defektes der CD160-defizienten ILC2 minimieren.

6.3. Die Rolle von NK-Zellen während der *S. ratti* Infektion

Diese Arbeit hat sich auf die Rolle von CD160 auf ILC2 fokussiert, dennoch ist CD160 aufgrund der hohen Expression auch auf NK-Zellen und ILC1 relevant. NK-Zellen expandierten in der Milz während der Infektion unabhängig der CD160-Defizienz (Abbildung 22 B). Daher könnten NK-Zellen eine Rolle während der *S. ratti* Infektion spielen. Dafür könnte man NK-Zellen *in vivo* mit anti-Asialo-Immunsereum und anti-NK1.1-Antikörpern depletieren [94,144]. Ein Anstieg der Wurmlast würde auf einen Beitrag der NK-Zellen zur schützenden Immunantwort hinweisen. Zusätzlich könnte der Darm histologisch untersucht werden, um den Grad der Entzündung zu bestimmen, um die beschriebene Rolle von NK-Zellen bei der Gewebeheilung während Wurminfektionen zu untersuchen [94]. Dabei gilt zu beachten, dass mit der Verwendung der genannten Antikörper ebenfalls ILC1 depletiert werden könnten, da diese ähnlichen Marker exprimieren wie NK-Zellen [149]. Eine spezifische Zell-Defizienz könnten mit „knock out“ Mäusen der für die Zellentwicklung wichtigen Transkriptionsfaktoren T-bet für ILC1 ($Tbx21^{tm1Glm/J}$) und EOMES für NK-Zellen ($Eomes^{tm1.1Bflu/J}$) erreicht werden. Es sollte

Durchflusszytometrisch die Depletion von NK-Zellen und ILC1 überprüft werden. CD160 könnte ebenfalls eine Rolle bei der NK-Zellfunktion während der *S. rattii* Infektion haben. So könnten NK-Zellen aus RAG K.O. Mäusen in RAG K.O. x CD160 K.O. Mäuse zu späteren Zeitpunkten der *S. rattii* Infektion transferiert werden. Hier könnten die CD160 kompetenten NK-Zellen die erhöhte Wurmlast der CD160-defizienten Rag K.O. Mäuse reduzieren. Dafür spricht eine trendhafte Expansion von NK-Zellen im Darm von RAG K.O. Mäusen, die in RAG K.O. x CD160 K.O. nicht ausgeprägt war.

6.4. Funktionsanalysen von angeborenen CD160-kompetenten und CD160-defizienten Immunzellen

Mit Hilfe von gut kontrollierten *in vitro* Kulturen von sortierten Immunzellen, können ebenfalls CD160 abhängige Funktionsanalysen durchgeführt werden. Dafür sollten CD160-Ig, HVEM-Ig und MHC-I-Ig-Fusionsproteine genutzt werden, um unterschiedliche Bindungskombinationen bei den unterschiedlichen Zelltypen zu ermöglichen. Es könnten ebenfalls blockierende Antikörper genutzt werden, um Bindungen zu unterbrechen, dafür muss jedoch sichergestellt werden, dass die zu untersuchenden Liganden auf Zellen, die den Kulturen hinzugegeben werden die jeweiligen Liganden exprimieren. Hierbei muss streng kontrolliert werden, ob die Antikörper agonistisch oder antagonistisch wirken. Der monoklonale Antikörper CL1-R2 könnte beispielsweise genutzt werden. Dieser hat in unterschiedlichen Mausmodellen bereits antagonistische Rollen gezeigt [156]. Für die Funktionsanalysen der unterschiedlichen Immunzellen, sollten unterschiedliche Stimuli wie IL-33 oder IL-25 für ILC2, oder IL-12, IL-15 und IL-18 für ILC1/NK-Zellen berücksichtigt werden. Als Readout bieten sich Zytokinmessungen in Kulturüberständen oder intrazelluläre durchflusszytometrische Analysen von Zytokinen an. Um *S. rattii* spezifische Immunantworten zu untersuchen, bieten sich Mastzellaktivierende Zytokine wie IL-9 und IL-13 an, die sowohl von ILC2, als auch wie in Abschnitt 5.6 beschrieben, von NK-Zellen produziert werden können. Als Quelle der Zellen sind Darm assoziierte Lymphozyten zu empfehlen, um gewebespezifische Charakteristiken der Zellen zu berücksichtigen.

"Die Wissenschaft ist wie ein endloser Ozean, der darauf wartet, von uns erforscht zu werden. Je mehr wir entdecken, desto mehr erkennen wir, wie viel wir noch nicht wissen."

- Albert Einstein

7. Referenzen

1. Esther Duflo – Facts – 2019 Nobel Prize Outreach. <https://www.nobelprize.org/prizes/economic-sciences/2019/duflo/facts/>.
2. King, C.H. (2019). Helminthiasis Epidemiology and Control: Scoring Successes and Meeting the Remaining Challenges. *Adv. Parasitol.* *103*, 11–30. 10.1016/bs.apar.2018.08.001.
3. Allen, J.E., and Maizels, R.M. (2011). Diversity and dialogue in immunity to helminths. *Nat. Rev. Immunol.* 10.1038/nri2992.
4. Bando, J.K., and Colonna, M. (2016). Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* *17*, 783–789. 10.1038/ni.3484.
5. Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J.P., Eberl, G., Koyasu, S., Locksley, R.M., McKenzie, A.N.J., Mebius, R.E., *et al.* (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* *174*, 1054–1066. 10.1016/j.cell.2018.07.017.
6. Panda, S.K., and Colonna, M. (2019). Innate Lymphoid Cells in Mucosal Immunity. *Front. Immunol.* *10*, 861. 10.3389/fimmu.2019.00861.
7. Cayrol, C., and Girard, J.-P. (2018). Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol. Rev.* *281*, 154–168. 10.1111/imr.12619.
8. Molofsky, A.B., Savage, A.K., and Locksley, R.M. (2015). Interleukin-33 in Tissue Homeostasis, Injury, and Inflammation. *Immunity* *42*, 1005–1019. 10.1016/j.immuni.2015.06.006.
9. Liew, F.Y., Girard, J.-P., and Turnquist, H.R. (2016). Interleukin-33 in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 676–689. 10.1038/nri.2016.95.
10. Yasuda, K., Muto, T., Kawagoe, T., Matsumoto, M., Sasaki, Y., Matsushita, K., Taki, Y., Futatsugi-Yumikura, S., Tsutsui, H., Ishii, K.J., *et al.* (2012). Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 3451–3456. 10.1073/pnas.1201042109.
11. Humphreys, N.E., Xu, D., Hepworth, M.R., Liew, F.Y., and Grencis, R.K. (2008). IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 2443–2449. 10.4049/jimmunol.180.4.2443.
12. Coakley, G., McCaskill, J.L., Borger, J.G., Simbari, F., Robertson, E., Millar, M., Harcus, Y., McSorley, H.J., Maizels, R.M., and Buck, A.H. (2017). Extracellular Vesicles from a Helminth Parasite Suppress Macrophage Activation and Constitute an Effective Vaccine for Protective Immunity. *Cell Rep.* *19*, 1545–1557. 10.1016/j.celrep.2017.05.001.
13. Scalfone, L.K., Nel, H.J., Gagliardo, L.F., Cameron, J.L., Al-Shokri, S., Leifer, C.A., Fallon, P.G., and Appleton, J.A. (2013). Participation of MyD88 and interleukin-33 as innate drivers of Th2 immunity to *Trichinella spiralis*. *Infect. Immun.* *81*, 1354–1363. 10.1128/IAI.01307-12.
14. Ajendra, J., Specht, S., Neumann, A.-L., Gondorf, F., Schmidt, D., Gentil, K., Hoffmann, W.H., Taylor, M.J., Hoerauf, A., and Hübner, M.P. (2014). ST2 Deficiency Does Not Impair Type 2 Immune Responses during Chronic Filarial Infection but Leads to an Increased Microfilaremia Due to an Impaired Splenic Microfilarial Clearance. *PLoS ONE* *9*, e93072. 10.1371/journal.pone.0093072.
15. Meiners, J., Reitz, M., Rüdiger, N., Turner, J.-E., Heepmann, L., Rudolf, L., Hartmann, W., McSorley, H.J., McSorley, H.J., and Breloer, M. (2020). IL-33 facilitates rapid expulsion of the parasitic nematode *Strongyloides ratti* from the intestine via ILC2- and IL-9-driven mast cell activation. *PLOS Pathog.* 10.1371/journal.ppat.1009121.

16. Maizels, R.M., Balic, A., Gomez-Escobar, N., Nair, M.G., Taylor, M.D., and Allen, J.E. (2004). Helminth parasites – masters of regulation. *Immunol. Rev.* 10.1111/j.0105-2896.2004.00191.x.
17. Robinson, M., Wahid, F., Behnke, J.M., and Gilbert, F.S. (1989). Immunological relationships during primary infection with *Heligmosomoides polygyrus* (*Nematospiroides dubius*): dose-dependent expulsion of adult worms. *Parasitology* 98 (Pt 1), 115–124. 10.1017/s0031182000059758.
18. McSorley, H.J., Blair, N.F., Smith, K.A., McKenzie, A.N.J., and Maizels, R.M. (2014). Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. *Mucosal Immunol.* 7, 1068–1078. 10.1038/mi.2013.123.
19. Osbourn, M., Soares, D.C., Vacca, F., Cohen, E.S., Scott, I.C., Gregory, W.F., Smyth, D.J., Toivakka, M., Kemter, A.M., le Bihan, T., *et al.* (2017). HpARI Protein Secreted by a Helminth Parasite Suppresses Interleukin-33. *Immunity* 47, 739-751.e5. 10.1016/j.immuni.2017.09.015.
20. Hartmann, W., Brunn, M.-L., Stetter, N., Gagliani, N., Muscate, F., Stanelle-Bertram, S., Gabriel, G., and Breloer, M. (2019). Helminth Infections Suppress the Efficacy of Vaccination against Seasonal Influenza. *Cell Rep.* 29, 2243-2256.e4. 10.1016/j.celrep.2019.10.051.
21. Buonfrate, D., Bisanzio, D., Giorli, G., Odermatt, P., Fürst, T., Greenaway, C., French, M., Reithinger, R., Gobbi, F., Montresor, A., *et al.* (2020). The Global Prevalence of *Strongyloides stercoralis* Infection. *Pathog. Basel Switz.* 9, 468. 10.3390/pathogens9060468.
22. Jember, T.H., Amor, A., Nibret, E., Munshea, A., Flores-Chavez, M., Ta-Tang, T.-H., Saugar, J.M., Benito, A., and Anegagrie, M. (2022). Prevalence of *Strongyloides stercoralis* infection and associated clinical symptoms among schoolchildren living in different altitudes of Amhara National Regional State, northwest Ethiopia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, e0010299. 10.1371/journal.pntd.0010299.
23. Breloer, M., and Abraham, D. (2017). *Strongyloides* infection in rodents: immune response and immune regulation. *Parasitology*. 10.1017/s0031182016000111.
24. Dawkins, H.J., Grove, D.I., Dunsmore, J.D., and Mitchell, G.F. (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, 125–129. 10.1016/0020-7519(80)90023-5.
25. Viney, M. (2017). *Strongyloides*. *Parasitology* 144, 259–262. 10.1017/S0031182016001773.
26. Dawkins, H.J.S., and Grove, D.I. (1981). Kinetics of primary and secondary infections with *Strongyloides ratti* in mice. *Int. J. Parasitol.* 10.1016/0020-7519(81)90031-x.
27. Viney, M.E. (2015). The biology of *Strongyloides* spp. *WormBook*, 1–17. 10.1895/wormbook.1.141.2.
28. Ehrens, A., Rüdiger, N., Heepmann, L., Linnemann, L., Hartmann, W., Hübner, M.P., and Breloer, M. (2021). Eosinophils and Neutrophils Eliminate Migrating *Strongyloides ratti* Larvae at the Site of Infection in the Context of Extracellular DNA Trap Formation. *Front. Immunol.* 10.3389/fimmu.2021.715766.
29. O’Connell, A.E., Hess, J.A., Santiago, G.A., Nolan, T.J., Lok, J.B., Lee, J.J., and Abraham, D. (2011). Major Basic Protein from Eosinophils and Myeloperoxidase from Neutrophils Are Required for Protective Immunity to *Strongyloides stercoralis* in Mice. *Infect. Immun.* 79, 2770–2778. 10.1128/IAI.00931-10.
30. Bonne-Année, S., Kerepesi, L.A., Hess, J.A., Wesolowski, J., Paumet, F., Lok, J.B., Nolan, T.J., and Abraham, D. (2014). Extracellular traps are associated with human and mouse neutrophil and macrophage mediated killing of larval *Strongyloides stercoralis*. *Microbes Infect.* 16, 502–511. 10.1016/j.micinf.2014.02.012.

31. Kerepesi, L.A., Hess, J.A., Nolan, T.J., Schad, G.A., and Abraham, D. (2006). Complement component C3 is required for protective innate and adaptive immunity to larval strongyloides stercoralis in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4315–4322. 10.4049/jimmunol.176.7.4315.
32. Reitz, M., Brunn, M.-L., Rodewald, H.-R., Feyerabend, T.B., Roers, A., Dudeck, A., Voehringer, D., Voehringer, D., Jönsson, F., Jönsson, F., *et al.* (2017). Mucosal mast cells are indispensable for the timely termination of *Strongyloides ratti* infection. *Mucosal Immunol.* 10.1038/mi.2016.56.
33. Reitz, M., Brunn, M.-L., Voehringer, D., Voehringer, D., and Breloer, M. (2018). Basophils are dispensable for the establishment of protective adaptive immunity against primary and challenge infection with the intestinal helminth parasite *Strongyloides ratti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10.1371/journal.pntd.0006992.
34. Mukai, K., Karasuyama, H., Kabashima, K., Kubo, M., and Galli, S.J. (2017). Differences in the Importance of Mast Cells, Basophils, IgE, and IgG versus That of CD4⁺ T Cells and ILC2 Cells in Primary and Secondary Immunity to *Strongyloides venezuelensis*. *Infect. Immun.* 85, e00053-17. 10.1128/IAI.00053-17.
35. Theoharides, T.C., and Kalogeromitros, D. (2006). The critical role of mast cells in allergy and inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1088, 78–99. 10.1196/annals.1366.025.
36. Reitz, M., Hartmann, W., Rüdiger, N., Orinska, Z., Brunn, M.-L., and Breloer, M. (2018). Interleukin-9 promotes early mast cell-mediated expulsion of *Strongyloides ratti* but is dispensable for generation of protective memory. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-018-26907-2.
37. Gazzinelli-Guimaraes, P.H., and Nutman, T.B. (2018). Helminth parasites and immune regulation. *F1000Research* 7, F1000 Faculty Rev-1685. 10.12688/f1000research.15596.1.
38. Maizels, R.M., and McSorley, H.J. (2016). Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138, 666–675. 10.1016/j.jaci.2016.07.007.
39. Blankenhaus, B., Blankenhaus, B., Klemm, U., Eschbach, M.-L., Gold, R., Sparwasser, T., Huehn, J., Kühl, A.A., Loddenkemper, C., Jacobs, T., *et al.* (2011). *Strongyloides ratti* Infection Induces Expansion of Foxp3⁺ Regulatory T Cells That Interfere with Immune Response and Parasite Clearance in BALB/c Mice. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.1001920.
40. Breloer, M., Hartmann, W., Blankenhaus, B., Blankenhaus, B., Eschbach, M.-L., Pfeffer, K., Jacobs, T., Jacobs, T., and Jacobs, T. (2015). Cutting Edge: The BTLA–HVEM Regulatory Pathway Interferes with Protective Immunity to Intestinal Helminth Infection. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.1402510.
41. Sedy, J.R., Gavrieli, M., Potter, K.G., Hurchla, M.A., Lindsley, R.C., Hildner, K., Scheu, S., Pfeffer, K., Ware, C.F., Murphy, T.L., *et al.* (2005). B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* 6, 90–98. 10.1038/ni1144.
42. Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J.R., Yang, J., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S.K., Hurchla, M.A., Zimmerman, N., Sim, J., *et al.* (2003). BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat. Immunol.* 10.1038/ni944.
43. Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2010). Slow Down and Survive: Enigmatic Immunoregulation by BTLA and HVEM. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 389–411. 10.1146/annurev-immunol-030409-101202.
44. Steinberg, M.W., Cheung, T.C., and Ware, C.F. (2011). The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation: HVEM networks in disease. *Immunol. Rev.* 244, 169–187. 10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x.
45. Rodriguez-Barbosa, J.I., Schneider, P., Weigert, A., Lee, K.-M., Kim, T.-J., Perez-Simon, J.-A., and del Rio, M.-L. (2019). HVEM, a cosignaling molecular switch, and its interactions with BTLA, CD160 and LIGHT. *Cell. Mol. Immunol.* 16, 679–682. 10.1038/s41423-019-0241-1.

46. Cai, G., and Freeman, G.J. (2009). The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. *Immunol. Rev.* 10.1111/j.1600-065x.2009.00783.x.
47. Croft, M. (2009). The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 271–285. 10.1038/nri2526.
48. Šedý, J.R., Bekiaris, V., Bekiaris, and Ware, C.F. (2015). Tumor necrosis factor superfamily in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 10.1101/cshperspect.a016279.
49. Mauri, D.N., Ebner, R., Montgomery, R.I., Kochel, K.D., Cheung, T.C., Yu, G.L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R.J., Cohen, G.H., *et al.* (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8, 21–30. 10.1016/s1074-7613(00)80455-0.
50. Rooney, I.A., Butrovich, K.D., Glass, A.A., Borboroglu, S., Benedict, C.A., Whitbeck, J.C., Cohen, G.H., Eisenberg, R.J., and Ware, C.F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J. Biol. Chem.* 275, 14307–14315. 10.1074/jbc.275.19.14307.
51. Zhai, Y., Guo, R., Hsu, T.L., Yu, G.L., Ni, J., Kwon, B.S., Jiang, G.W., Lu, J., Tan, J., Ugustus, M., *et al.* (1998). LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin beta receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J. Clin. Invest.* 102, 1142–1151. 10.1172/JCI3492.
52. del Rio, M.-L., Fernandez-Renedo, C., Scheu, S., Pfeffer, K., Shintani, Y., Kronenberg, M., Chaloin, O., Schneider, P., and Rodriguez-Barbosa, J.-I. (2014). Therapeutic blockade of LIGHT interaction with herpesvirus entry mediator and lymphotoxin β receptor attenuates in vivo cytotoxic allogeneic responses. *Transplantation* 98, 1165–1174. 10.1097/TP.0000000000000417.
53. Croft, M., Duan, W., Choi, H., Eun, S.-Y., Madireddi, S., and Mehta, A. (2012). TNF superfamily in inflammatory disease: translating basic insights. *Trends Immunol.* 33, 144–152. 10.1016/j.it.2011.10.004.
54. Force, W.R., Walter, B.N., Hession, C., Tizard, R., Kozak, C.A., Browning, J.L., and Ware, C.F. (1995). Mouse lymphotoxin-beta receptor. Molecular genetics, ligand binding, and expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 155, 5280–5288.
55. Morel, Y., Schiano de Colella, J.M., Harrop, J., Deen, K.C., Holmes, S.D., Wattam, T.A., Khandekar, S.S., Truneh, A., Sweet, R.W., Gastaut, J.A., *et al.* (2000). Reciprocal expression of the TNF family receptor herpes virus entry mediator and its ligand LIGHT on activated T cells: LIGHT down-regulates its own receptor. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 165, 4397–4404. 10.4049/jimmunol.165.8.4397.
56. Cheung, T.C., Steinberg, M.W., Osborne, L.M., Macauley, M.G., Fukuyama, S., Sanjo, H., D'Souza, C., Norris, P.S., Pfeffer, K., Murphy, K.M., *et al.* (2009). Unconventional ligand activation of herpesvirus entry mediator signals cell survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6244–6249. 10.1073/pnas.0902115106.
57. Ortonne, N., Ortonne, N., Ram-Wolff, C., Giustiniani, J., Marie-Cardine, A., Bagot, M., Bagot, M., Mecheri, S., Mécheri, S., and Bensussan, A. (2011). Human and mouse mast cells express and secrete the GPI-anchored isoform of CD160. *J. Invest. Dermatol.* 10.1038/jid.2010.412.
58. Henry, A., Boulagnon-Rombi, C., Menguy, T., Giustiniani, J., Garbar, C., Mascaux, C., Labrousse, M., Milas, C., Barbe, C., Bensussan, A., *et al.* (2018). CD160 Expression in Retinal Vessels Is Associated With Retinal Neovascular Diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 59, 2679–2686. 10.1167/iovs.18-24021.
59. Agrawal, S.G., Agrawal, S.G., Marquet, J., Freeman, G.J., Tawab, A., Bouteiller, P.L., Roth, P., Bolton, W.E., Ogg, G.S., Boumsell, L., *et al.* (1999). Cutting edge: MHC class I triggering by a novel cell surface ligand costimulates proliferation of activated human T cells. *J. Immunol.* null.

60. Barakonyi, A., Barakonyi, A., Rabot, M., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Polgar, B., Polgar, B., Schiavon, V., Bensussan, A., and Bouteiller, P.L. (2004). Cutting edge: Engagement of CD160 by its HLA-C physiological ligand triggers a unique cytokine profile secretion in the cytotoxic peripheral blood NK cell subset. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.173.9.5349.
61. Bouteiller, P.L., Barakonyi, A., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Hilgert, I., *et al.* (2002). Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10.1073/pnas.012681099.
62. Maeda, M., Carpenito, C., Russell, R.C., Dasanji, J., Veinotte, L.L., Ohta, H., Ohta, H., Yamamura, T., Tan, R., and Takei, F. (2005). Murine CD160, Ig-Like Receptor on NK Cells and NKT Cells, Recognizes Classical and Nonclassical MHC Class I and Regulates NK Cell Activation. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.175.7.4426.
63. Cai, G., Anumanthan, A., Brown, J.A., Greenfield, E.A., Zhu, B., and Freeman, G.J. (2008). CD160 inhibits activation of human CD4+ T cells through interaction with herpesvirus entry mediator. *Nat. Immunol.* 10.1038/ni1554.
64. Rabot, M., El Costa, H., Polgar, B., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Barakonyi, A., Valitutti, S., Bensussan, A., and Le Bouteiller, P. (2007). CD160-activating NK cell effector functions depend on the phosphatidylinositol 3-kinase recruitment. *Int. Immunol.* 19, 401–409. 10.1093/intimm/dxm005.
65. Giustiniani, J., Bensussan, A., and Marie-Cardine, A. (2009). Identification and Characterization of a Transmembrane Isoform of CD160 (CD160-TM), a Unique Activating Receptor Selectively Expressed upon Human NK Cell Activation. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.182.1.63.
66. Giustiniani, J., Marie-Cardine, A., and Bensussan, A. (2007). A soluble form of the MHC class I-specific CD160 receptor is released from human activated NK lymphocytes and inhibits cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.178.3.1293.
67. Bodmer, J.-L., Schneider, P., and Tschopp, J. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem. Sci.* 27, 19–26. 10.1016/s0968-0004(01)01995-8.
68. Ware, C.F. (2008). Targeting lymphocyte activation through the lymphotoxin and LIGHT pathways. *Immunol. Rev.* 223, 186–201. 10.1111/j.1600-065X.2008.00629.x.
69. del Rio, M.L., Lucas, C.L., Buhler, L., Rayat, G., and Rodriguez-Barbosa, J.I. (2010). HVEM/LIGHT/BTLA/CD160 cosignaling pathways as targets for immune regulation. *J. Leukoc. Biol.* 87, 223–235. 10.1189/jlb.0809590.
70. Shui, J.-W., Larange, A., Kim, G., Vela, J.L., Zahner, S., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2012). HVEM signalling at mucosal barriers provides host defence against pathogenic bacteria. *Nature.* 10.1038/nature11242.
71. Liu, W., Chou, T.-F., Garrett-Thomson, S.C., Seo, G.-Y., Fedorov, E.V., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Wang, Q., Kim, K., Garforth, S.J., *et al.* (2021). HVEM structures and mutants reveal distinct functions of binding to LIGHT and BTLA/CD160. *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.2021112.
72. Schaer, C., Hiltbrunner, S., Ernst, B., Mueller, C., Kurrer, M., Kopf, M., and Harris, N.L. (2011). HVEM Signalling Promotes Colitis. *PLoS ONE* 6, e18495. 10.1371/journal.pone.0018495.
73. Steinberg, M.W., Turovskaya, O., Shaikh, R.B., Kim, G., McCole, D.F., Pfeffer, K., Murphy, K.M., Ware, C.F., and Kronenberg, M. (2008). A crucial role for HVEM and BTLA in preventing intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 205, 1463–1476. 10.1084/jem.20071160.
74. Anderson, C.A., Boucher, G., Lees, C.W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K.D., Lee, J.C., Goyette, P., Imielinski, M., Latiano, A., *et al.* (2011). Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat. Genet.* 43, 246–252. 10.1038/ng.764.

75. Cheung, T.C., Osborne, L.M., Steinberg, M.W., Macauley, M.G., Fukuyama, S., Sanjo, H., D'Souza, C., Norris, P.S., Pfeffer, K., Murphy, K.M., *et al.* (2009). T cell intrinsic heterodimeric complexes between HVEM and BTLA determine receptivity to the surrounding microenvironment. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 7286–7296. 10.4049/jimmunol.0902490.
76. Muscate, F., Stetter, N., Schramm, C., Wiesch, J.S. zur, Bosurgi, L., Bosurgi, L., Bosurgi, L., Jacobs, T., Jacobs, T., and Jacobs, T. (2018). HVEM and CD160: Regulators of Immunopathology During Malaria Blood-Stage. *Front. Immunol.* 10.3389/fimmu.2018.02611.
77. Scheu, S., Alferink, J., Pötzel, T., Barchet, W., Kalinke, U., and Pfeffer, K. (2002). Targeted Disruption of LIGHT Causes Defects in Costimulatory T Cell Activation and Reveals Cooperation with Lymphotoxin β in Mesenteric Lymph Node Genesis. *J. Exp. Med.* *195*, 1613–1624. 10.1084/jem.20020215.
78. Wang, Y., Subudhi, S.K., Anders, R.A., Lo, J., Sun, Y., Blink, S., Wang, Y., Wang, J., Liu, X., Mink, K., *et al.* (2005). The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses. *J. Clin. Invest.* *115*, 711–717. 10.1172/JCI200522982.
79. Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Owens, S.M., Betley, J., Fraser, L., Bauer, M., *et al.* (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* *6*, 1621–1624. 10.1038/ismej.2012.8.
80. Katzwinkel-Wladarsch, S., Loscher, T., and Rinder, H. (1994). Direct amplification and differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* DNA from stool specimens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* *51*, 115–118. 10.4269/ajtmh.1994.51.115.
81. Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869–877. 10.1016/0092-8674(92)90030-g.
82. Fuchs, A., Vermi, W., Lee, J.S., Lonardi, S., Gilfillan, S., Newberry, R.D., Cella, M., and Colonna, M. (2013). Intraepithelial Type 1 Innate Lymphoid Cells Are a Unique Subset of IL-12- and IL-15-Responsive IFN- γ -Producing Cells. *Immunity.* 10.1016/j.immuni.2013.02.010.
83. Maiza, H., Leca, G., Indra-Gusti Mansur, Indra-Gusti Mansur, Mansur, I.G., Schiavon, V., Schiavon, Boumsell, L., and Bensussan, A. (1993). A novel 80-kD cell surface structure identifies human circulating lymphocytes with natural killer activity. *J. Exp. Med.* *178*, 1121–1126. 10.1084/jem.178.3.1121.
84. Anumanthan, A., Bensussan, A., Boumsell, L., Christ, A.D., Blumberg, R.S., Voss, S.D., Patel, A.T., Robertson, M.J., Nadler, L.M., and Freeman, G.J. (1998). Cloning of BY55, a novel Ig superfamily member expressed on NK cells, CTL, and intestinal intraepithelial lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 2780–2790.
85. Shui, J.-W., Larange, A., Kim, G., Vela, J.L., Zahner, S., Cheroutre, H., and Kronenberg, M. (2012). HVEM signalling at mucosal barriers provides host defence against pathogenic bacteria. *Nature* *488*, 222–225. 10.1038/nature11242.
86. Webster, H.C., Andrusaite, A.T., Shergold, A.L., Milling, S.W.F., and Perona-Wright, G. (2020). Isolation and functional characterisation of lamina propria leukocytes from helminth-infected, murine small intestine. *J. Immunol. Methods* *477*, 112702. 10.1016/j.jim.2019.112702.
87. Ferrer-Font, L., Mehta, P., Harnos, P., Schmidt, A.J., Chappell, S., Price, K.M., Hermans, I.F., Ronchese, F., le Gros, G., and Mayer, J.U. (2020). High-dimensional analysis of intestinal immune cells during helminth infection. *eLife* *9*, e51678. 10.7554/eLife.51678.
88. Reynolds, D.S., Stevens, R.L., Lane, W.S., Carr, M.H., Austen, K.F., and Serafin, W.E. (1990). Different mouse mast cell populations express various combinations of at least six distinct mast cell serine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 3230–3234. 10.1073/pnas.87.8.3230.

89. Blankenhaus, B., Blankenhaus, B., Reitz, M., Brenz, Y., Eschbach, M.L., Hartmann, W., Haben, I., Gold, R., Sparwasser, T., Huehn, J., *et al.* (2014). Foxp3⁺ regulatory T cells delay expulsion of intestinal nematodes by suppression of IL-9-driven mast cell activation in BALB/c but not in C57BL/6 mice. *PLOS Pathog.* 10.1371/journal.ppat.1003913.
90. Scherer, L.M. (2022). Untersuchung der Rolle von CD160 bei der Immunantwort auf den Helminthen *Strongyloides ratti* im Mausmodell.
91. Khan, A.I., Horii, Y., Tiuria, R., Sato, Y., and Nawa, Y. (1993). Mucosal mast cells and the expulsive mechanisms of mice against *Strongyloides venezuelensis*. *Int. J. Parasitol.* 23, 551–555. 10.1016/0020-7519(93)90159-v.
92. McLeod, J.J.A., Baker, B., and Ryan, J.J. (2015). Mast cell production and response to IL-4 and IL-13. *Cytokine* 75, 57–61. 10.1016/j.cyto.2015.05.019.
93. Halim, T.Y.F., Krauss, R.H., Sun, A.C., and Takei, F. (2012). Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. *Immunity* 36, 451–463. 10.1016/j.immuni.2011.12.020.
94. Gentile, M.E., Li, Y., Robertson, A., Shah, K., Fontes, G., Kaufmann, E., Polese, B., Khan, N., Parisien, M., Munter, H.M., *et al.* (2020). NK cell recruitment limits tissue damage during an enteric helminth infection. *Mucosal Immunol.* 13, 357–370. 10.1038/s41385-019-0231-8.
95. Huang, Y., Guo, L., Qiu, J., Chen, X., Hu-Li, J., Siebenlist, U., Williamson, P.R., Urban, J.F., and Paul, W.E. (2015). IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential “inflammatory” type 2 innate lymphoid cells. *Nat. Immunol.* 16, 161–169. 10.1038/ni.3078.
96. Hewitt, E.W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110, 163–169. 10.1046/j.1365-2567.2003.01738.x.
97. Bartemes, K.R., Iijima, K., Kobayashi, T., Kephart, G.M., McKenzie, A.N., and Kita, H. (2012). IL-33-responsive lineage- CD25⁺ CD44(hi) lymphoid cells mediate innate type 2 immunity and allergic inflammation in the lungs. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 1503–1513. 10.4049/jimmunol.1102832.
98. Kouzaki, H., Iijima, K., Kobayashi, T., O’Grady, S.M., and Kita, H. (2011). The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 186, 4375–4387. 10.4049/jimmunol.1003020.
99. Liu, W., Garrett, S.C., Fedorov, E.V., Ramagopal, U.A., Garforth, S.J., Bonanno, J.B., and Almo, S.C. (2019). Structural Basis of CD160:HVEM Recognition. *Structure* 27, 1286-1295.e4. 10.1016/j.str.2019.05.010.
100. Le Bouteiller, P., Barakonyi, A., Giustiniani, J., Lenfant, F., Marie-Cardine, A., Aguerre-Girr, M., Rabot, M., Hilgert, I., Mami-Chouaib, F., Tabiasco, J., *et al.* (2002). Engagement of CD160 receptor by HLA-C is a triggering mechanism used by circulating natural killer (NK) cells to mediate cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 16963–16968. 10.1073/pnas.012681099.
101. Šedý, J.R., Bjordahl, R.L., Bekiaris, V., Macauley, M.G., Ware, B.C., Norris, P.S., Lurain, N.S., Benedict, C.A., and Ware, C.F. (2013). CD160 Activation by Herpesvirus Entry Mediator Augments Inflammatory Cytokine Production and Cytolytic Function by NK Cells. *J. Immunol.* 191, 828–836. 10.4049/jimmunol.1300894.
102. Tu, T., Brown, N.K., Kim, T.J., Kim, T.J., Kim, T.J., Wroblewska, J., Yang, X., Guo, X., Lee, S.H., Kumar, V., *et al.* (2015). CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production. *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20131601.
103. Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The Transcription Factor GATA-3 Is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 89, 587–596. 10.1016/S0092-8674(00)80240-8.

104. Viney, M. (2006). The biology and genomics of *Strongyloides*. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*. 10.1007/s00430-006-0013-2.
105. Brosschot, T.P., and Reynolds, L.A. (2018). The impact of a helminth-modified microbiome on host immunity. *Mucosal Immunol.* 11, 1039–1046. 10.1038/s41385-018-0008-5.
106. Eschbach, M.-L., Klemm, U., Kolbaum, J., Kolbaum, J., Blankenhaus, B., Blankenhaus, B., Brattig, N.W., and Breloer, M. (2010). *Strongyloides ratti* infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN- γ production in mice. *Parasite Immunol.* 10.1111/j.1365-3024.2010.01199.x.
107. Dawkins, H.J., and Grove, D.I. (1982). Attempts to establish infections with *Strongyloides stercoralis* in mice and other laboratory animals. *J. Helminthol.* 56, 23–26. 10.1017/s0022149x00034957.
108. Wilkes, C.P., Thompson, F.J., Gardner, M.P., Paterson, S., and Viney, M.E. (2004). The effect of the host immune response on the parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Parasitology* 128, 661–669. 10.1017/s0031182004005062.
109. Ward-Kavanagh, L.K., Lin, W.W., Šedý, J.R., and Ware, C.F. (2016). The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity* 44, 1005–1019. 10.1016/j.immuni.2016.04.019.
110. Flynn, R., Hutchinson, T., Murphy, K.M., Ware, C.F., Croft, M., and Salek-Ardakani, S. (2013). CD8 T Cell Memory to a Viral Pathogen Requires Trans Cosignaling between HVEM and BTLA. *PLoS ONE* 8, e77991. 10.1371/journal.pone.0077991.
111. National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2023 Apr 12]. Mouse ENCODE transcriptome data (2023). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/54215>.
112. Del Rio, M.-L., Nguyen, T.H., Tesson, L., Heslan, J.-M., Gutierrez-Adan, A., Fernandez-Gonzalez, R., Gutierrez-Arroyo, J., Buhler, L., Pérez-Simón, J.-A., Anegón, I., *et al.* (2022). The impact of CD160 deficiency on alloreactive CD8 T cell responses and allograft rejection. *Transl. Res.* 239, 103–123. 10.1016/j.trsl.2021.08.006.
113. El-Far, M., Pellerin, C., Pilote, L., Fortin, J.-F., Lessard, I.A.D., Peretz, Y., Wardrop, E., Salois, P., Bethell, R.C., Cordingley, M.G., *et al.* (2014). CD160 isoforms and regulation of CD4 and CD8 T-cell responses. *J. Transl. Med.* 12, 217. 10.1186/s12967-014-0217-y.
114. Nikolova, M., Marie-Cardine, A., Boumsell, L., and Bensussan, A. (2002). BY55/CD160 acts as a co-receptor in TCR signal transduction of a human circulating cytotoxic effector T lymphocyte subset lacking CD28 expression. *Int. Immunol.* 10.1093/intimm/14.5.445.
115. Abecassis, S., Giustiniani, J., Meyer, N., Schiavon, V., Ortonne, N., Campillo, J.A., Bagot, M., and Bensussan, A. (2007). Identification of a novel CD160+ CD4+ T-lymphocyte subset in the skin: a possible role for CD160 in skin inflammation. *J. Invest. Dermatol.* 127, 1161–1166. 10.1038/sj.jid.5700680.
116. Zhang, L., Zhang, A., Xu, J., Qiu, C., Zhu, L., Qiu, C., Fu, W., Wang, Y., Ye, L., Fu, Y., *et al.* (2020). CD160 Plays a Protective Role During Chronic Infection by Enhancing Both Functionalities and Proliferative Capacity of CD8+ T Cells. *Front. Immunol.* 11, 2188. 10.3389/fimmu.2020.02188.
117. den Haan, J.M., and Bevan, M.J. (2001). Antigen presentation to CD8+ T cells: cross-priming in infectious diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 437–441. 10.1016/s0952-7915(00)00238-7.
118. Grant, E.P., and Rock, K.L. (1992). MHC class I-restricted presentation of exogenous antigen by thymic antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 148, 13–18.
119. Rock, K.L., Gamble, S., and Rothstein, L. (1990). Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918–921. 10.1126/science.2392683.

120. Rock, K.L., Rothstein, L., Gamble, S., and Fleischacker, C. (1993). Characterization of antigen-presenting cells that present exogenous antigens in association with class I MHC molecules. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *150*, 438–446.
121. Manfras, B.J., Reuter, S., Wendland, T., and Kern, P. (2002). Increased Activation and Oligoclonality of Peripheral CD8⁺ T Cells in the Chronic Human Helminth Infection Alveolar Echinococcosis. *Infect. Immun.* *70*, 1168–1174. 10.1128/IAI.70.3.1168-1174.2002.
122. Lin, J.S., Mohrs, K., Szaba, F.M., Kummer, L.W., Leadbetter, E.A., and Mohrs, M. (2019). Virtual memory CD8 T cells expanded by helminth infection confer broad protection against bacterial infection. *Mucosal Immunol.* *12*, 258–264. 10.1038/s41385-018-0100-x.
123. Tsujimura, K., Obata, Y., Matsudaira, Y., Nishida, K., Nishida, K., Nishida, K., Akatsuka, Y., Ito, Y., Ito, Y., Demachi-Okamura, A., *et al.* (2006). Characterization of murine CD160⁺ CD8⁺ T lymphocytes. *Immunol. Lett.* 10.1016/j.imlet.2006.04.006.
124. Abe, T., Sugaya, H., Ishida, K., Khan, W.I., Tasdemir, I., and Yoshimura, K. (1993). Intestinal protection against *Strongyloides ratti* and mastocytosis induced by administration of interleukin-3 in mice. *Immunology* *80*, 116–121.
125. Abe, T., and Nawa, Y. (1988). Worm expulsion and mucosal mast cell response induced by repetitive IL-3 administration in *Strongyloides ratti*-infected nude mice. *Immunology* *63*, 181–185.
126. Lantz, C.S., Boesiger, J., Song, C.H., Mach, N., Kobayashi, T., Mulligan, R.C., Nawa, Y., Dranoff, G., and Galli, S.J. (1998). Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature* *392*, 90–93. 10.1038/32190.
127. Matsumoto, M., Sasaki, Y., Yasuda, K., Takai, T., Muramatsu, M., Yoshimoto, T., and Nakanishi, K. (2013). IgG and IgE collaboratively accelerate expulsion of *Strongyloides venezuelensis* in a primary infection. *Infect. Immun.* *81*, 2518–2527. 10.1128/IAI.00285-13.
128. Metz, C.N., Thomas, P., and Davitz, M.A. (1992). Immunolocalization of a glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D in mast cells found in normal tissue and neurofibromatosis lesions. *Am. J. Pathol.* *140*, 1275–1281.
129. Alter, G., Malenfant, J.M., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* *294*, 15–22. 10.1016/j.jim.2004.08.008.
130. Moro, K., Yamada, T., Tanabe, M., Takeuchi, T., Ikawa, T., Kawamoto, H., Furusawa, J.-I., Ohtani, M., Fujii, H., and Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* *463*, 540–544. 10.1038/nature08636.
131. Wilhelm, C., Hirota, K., Stieglitz, B., Van Snick, J., Tolaini, M., Lahl, K., Sparwasser, T., Helmbj, H., and Stockinger, B. (2011). An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. *Nat. Immunol.* *12*, 1071–1077. 10.1038/ni.2133.
132. Oliphant, C.J., Hwang, Y.Y., Walker, J.A., Salimi, M., Wong, S.H., Brewer, J.M., Englezakis, A., Barlow, J.L., Hams, E., Scanlon, S.T., *et al.* (2014). MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* *41*, 283–295. 10.1016/j.immuni.2014.06.016.
133. Temann, U.-A., Ray, P., and Flavell, R.A. (2002). Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. *J. Clin. Invest.* *109*, 29–39. 10.1172/JCI13696.
134. Turner, J.-E., Morrison, P.J., Wilhelm, C., Wilson, M., Ahlfors, H., Renauld, J.-C., Panzer, U., Helmbj, H., and Stockinger, B. (2013). IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J. Exp. Med.* *210*, 2951–2965. 10.1084/jem.20130071.

135. Mohapatra, A., Van Dyken, S.J., Schneider, C., Nussbaum, J.C., Liang, H.-E., and Locksley, R.M. (2016). Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. *Mucosal Immunol.* 9, 275–286. 10.1038/mi.2015.59.
136. Neill, D.R., Wong, S.H., Bellosi, A., Flynn, R.J., Daly, M., Langford, T.K.A., Bucks, C., Kane, C.M., Fallon, P.G., Pannell, R., *et al.* (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367–1370. 10.1038/nature08900.
137. Fallon, P.G., Ballantyne, S.J., Mangan, N.E., Barlow, J.L., Dasvarma, A., Hewett, D.R., McIlgorm, A., Jolin, H.E., and McKenzie, A.N.J. (2006). Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. *J. Exp. Med.* 203, 1105–1116. 10.1084/jem.20051615.
138. Gerbe, F., Sidot, E., Smyth, D.J., Ohmoto, M., Matsumoto, I., Dardalhon, V., Cesses, P., Garnier, L., Pouzolles, M., Brulin, B., *et al.* (2016). Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. *Nature* 529, 226–230. 10.1038/nature16527.
139. Yamaguchi, M., Samuchiwal, S.K., Quehenberger, O., Boyce, J.A., and Balestrieri, B. (2018). Macrophages regulate lung ILC2 activation via Pla2g5-dependent mechanisms. *Mucosal Immunol.* 11, 615–626. 10.1038/mi.2017.99.
140. Helou, D.G., Shafiei-Jahani, P., Lo, R., Howard, E., Hurrell, B.P., Galle-Treger, L., Painter, J.D., Lewis, G., Soroosh, P., Sharpe, A.H., *et al.* (2020). PD-1 pathway regulates ILC2 metabolism and PD-1 agonist treatment ameliorates airway hyperreactivity. *Nat. Commun.* 11, 3998. 10.1038/s41467-020-17813-1.
141. Miyamoto, C., Kojo, S., Yamashita, M., Moro, K., Lacaud, G., Shiroguchi, K., Taniuchi, I., and Ebihara, T. (2019). Runx/Cbfb complexes protect group 2 innate lymphoid cells from exhausted-like hyporesponsiveness during allergic airway inflammation. *Nat. Commun.* 10, 447. 10.1038/s41467-019-08365-0.
142. Seehus, C.R., Kadavallore, A., Torre, B. de la, Yeckes, A.R., Wang, Y., Tang, J., and Kaye, J. (2017). Alternative activation generates IL-10 producing type 2 innate lymphoid cells. *Nat. Commun.* 8, 1900. 10.1038/s41467-017-02023-z.
143. Shafiei-Jahani, P., Helou, D.G., Hurrell, B.P., Howard, E., Quach, C., Painter, J.D., Galle-Treger, L., Li, M., Loh, Y.-H.E., and Akbari, O. (2021). CD200-CD200R immune checkpoint engagement regulates ILC2 effector function and ameliorates lung inflammation in asthma. *Nat. Commun.* 12, 2526. 10.1038/s41467-021-22832-7.
144. Korten, S., Volkmann, L., Saefel, M., Fischer, K., Taniguchi, M., Fleischer, B., and Hoerauf, A. (2002). Expansion of NK cells with reduction of their inhibitory Ly-49A, Ly-49C, and Ly-49G2 receptor-expressing subsets in a murine helminth infection: contribution to parasite control. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 168, 5199–5206. 10.4049/jimmunol.168.10.5199.
145. Abulizi, A., Shao, Y., Aji, T., Li, Z., Zhang, C., Aini, A., Wang, H., Tuxun, T., Li, L., Zhang, N., *et al.* (2019). *Echinococcus multilocularis* inoculation induces NK cell functional decrease through high expression of NKG2A in C57BL/6 mice. *BMC Infect. Dis.* 19, 792. 10.1186/s12879-019-4417-1.
146. Hepworth, M.R., and Grencis, R.K. (2009). Disruption of Th2 immunity results in a gender-specific expansion of IL-13 producing accessory NK cells during helminth infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 3906–3914. 10.4049/jimmunol.0900577.
147. McDermott, J.R., Humphreys, N.E., Forman, S.P., Donaldson, D.D., and Grencis, R.K. (2005). Intraepithelial NK cell-derived IL-13 induces intestinal pathology associated with nematode infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 175, 3207–3213. 10.4049/jimmunol.175.5.3207.
148. Di Censo, C., Marotel, M., Mattioli, I., Müller, L., Scarno, G., Pietropaolo, G., Peruzzi, G., Mattia Laffranchi, M., Mazej, J., *et al.* (2021). Granzyme A and CD160 expression delineates ILC1 with graded functions in the mouse liver. *Eur. J. Immunol.* 10.1002/eji.202149209.

-
149. Zhang, Y., and Huang, B. (2017). The Development and Diversity of ILCs, NK Cells and Their Relevance in Health and Diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1024, 225–244. 10.1007/978-981-10-5987-2_11.
150. Ran, G.H., Lin, Y.Q., Tian, L., Zhang, T., Yan, D.M., Yu, J.H., and Deng, Y.C. (2022). Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. *Signal Transduct. Target. Ther.* 7, 205. 10.1038/s41392-022-01058-z.
151. Bouteiller, P.L., Tabiasco, J., Polgar, B., Polgar, B., Kozma, N., Giustiniani, J., Siewiera, J., Berrebi, A., Aguerre-Girr, M., Bensussan, A., *et al.* (2011). CD160: a unique activating NK cell receptor. *Immunol. Lett.* 10.1016/j.imlet.2011.02.003.
152. Sun, Z., Li, Y., Zhang, Z., Fu, Y., Han, X., Hu, Q., Ding, H., Shang, H., and Jiang, Y. (2022). CD160 Promotes NK Cell Functions by Upregulating Glucose Metabolism and Negatively Correlates With HIV Disease Progression. *Front. Immunol.* 13, 854432. 10.3389/fimmu.2022.854432.
153. Fischer, S. (2022). Role of CD160 in regulating innate immune cells during helminth infection with *Strongyloides ratti*.
154. Meng, Q., Zaidi, A.K., Sedy, J.R., Sedy, J.R., Bensussan, A., and Popkin, D.L. (2019). Soluble Fc-Disabled Herpes Virus Entry Mediator Augments Activation and Cytotoxicity of NK Cells by Promoting Cross-Talk between NK Cells and Monocytes. *J. Immunol.* 10.4049/jimmunol.1801449.
155. Hartmann, W., Blankenhaus, B., Brunn, M.-L., Meiners, J., and Breloer, M. (2021). Elucidating different pattern of immunoregulation in BALB/c and C57BL/6 mice and their F1 progeny. *Sci. Rep.* 10.1038/s41598-020-79477-7.
156. Menguy, T., Briaux, A., Jeunesse, E., Giustiniani, J., Calcei, A., Guyon, T., Mizrahi, J., Haegel, H., Duong, V., Soler, V., *et al.* (2018). Anti-CD160, Alone or in Combination With Bevacizumab, Is a Potent Inhibitor of Ocular Neovascularization in Rabbit and Monkey Models. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 59, 2687. 10.1167/iovs.18-24024.