

**Einfluss von Granzym A und B auf die
Immunabwehr gegen die Filarie
Litomosoides sigmodontis (Chandler, 1931)
in der Maus
(*Mus musculus*; Linnaeus, 1758)**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von

Wiebke Hartmann

beim Department für Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

Hamburg, 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. B. FLEISCHER
Weitere Gutachterin der Dissertation:
Frau Priv.-Doz. Dr. S. LÜTHJE
Tag der Disputation: 07. November 2008

Hamburg, den 22. Oktober 2008




Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Für meinen Vater

Ich danke Herrn **Prof. Dr. Bernhard Fleischer** für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Immunologie und die kompetente Betreuung meiner Arbeit.

Bei Frau PD **Dr. Sabine Lüthje** bedanke ich mich für die Bereitschaft diese Arbeit als Gutachterin zu lesen und zu bewerten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau **Dr. Simone Korten** für die unermüdliche Bereitschaft, mir mit konstruktiven Anregungen und Diskussionen zur Seite zu stehen.

Bei Herrn **Prof. Marcus Simon** bedanke ich mich für die fachliche Unterstützung und die Bereitstellung der Gzm KO Mäuse.

Zu besonderem Dank bin ich Frau **Dr. Anke Osterloh** für viele wertvolle Tipps verpflichtet. Bei allen Mitgliedern der Abteilung Immunologie, insbesondere bei Herrn **Dr. Thomas Bickert**, Frau **Vera Steisslinger**, Frau **Christiane Zepig** und Frau **Marlis Badusche** möchte ich mich für das gute Arbeitsklima und die nette Unterstützung bedanken.

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die angeborene Immunantwort	1
1.1.2	Die adaptive Immunantwort	1
1.2	Granzyme	3
1.2.1	Induktion von Apoptose durch Gzm A	4
1.2.2	Induktion von Apoptose durch Gzm B	6
1.2.3	Alternative Aufgaben von Gzm A und B	9
1.2.4	Rolle von Gzm A und B in der Abwehr von Infektionen	10
1.3	Filariosen am Beispiel der Onchozerkose	11
1.3.1.1	Die Nagerfilarie <i>Litomosoides sigmodontis</i> (Chandler 1931) im Tiermodell	12
1.3.1.2	Immunantwort gegen <i>L. sigmodontis</i> in der BALB/c Maus	14
1.3.1.3	Immunantwort gegen <i>L. sigmodontis</i> in der C57BL/6 Maus	15
1.4	Zielsetzung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Materialien	18
2.1.1	Laborgeräte und Hilfsmittel	18
2.1.2	Chemikalien	19
2.1.3	Antikörper, Detektions- und Stimulationsreagenzien	19
2.1.4	Material für molekularbiologische und biochemische Arbeiten	21
2.1.4.1	Reagenzien	21
2.1.4.2	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	21
2.1.5	Material für zellbiologische Arbeiten	23
2.1.5.1	Reagenzien	23
2.1.5.2	Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen	24
2.2	Methoden	26
2.2.1	Molekularbiologische und biochemische Methoden	26
2.2.1.1	Isolierung von RNA	26
2.2.1.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	26

2.2.1.3	Genexpressionsanalyse	27
2.2.1.4	Proteinbestimmung	27
2.2.1.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	28
2.2.1.6	Coomassie Blau-Färbung	28
2.2.1.7	Silberfärbung	28
2.2.1.8	Western Blot	29
2.2.2	Versuchstiere, Zucht und Haltung	30
2.2.2.1	Mausstämme	30
2.2.2.2	Baumwollratten (<i>Sigmodon hispidus</i>)	31
2.2.2.3	Milben (<i>Ornithonyssus bacoti</i>).....	31
2.2.2.4	Infektion mit <i>Litomosoides sigmodontis</i>	32
2.2.2.5	Gewinnung von Plasma	32
2.2.2.6	Bestimmung der Wurmlast in der Pleurahöhle	32
2.2.2.7	Bestimmung der Wurmlänge	33
2.2.2.8	Immunisierungen mit OVA.....	33
2.2.3	Zellbiologische Methoden	33
2.2.3.1	Allgemeine Bedingungen der Zellkultur.....	33
2.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	33
2.2.3.3	Präparation von Pleuraexudatzellen (PleC, <i>pleural exudate cells</i>)	34
2.2.3.4	Präparation von murinen Milzzellen.....	34
2.2.3.5	Präparation von murinen Peritonealexudatzellen	34
2.2.3.6	Herstellung von LsAg	34
2.2.3.7	<i>In vitro</i> Stimulation von Milzzellen und PleC	35
2.2.3.8	Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA	35
2.2.3.9	Detektion von Immunglobulinen mittels ELISA	36
2.2.3.10	Messung der Zellproliferation.....	37
2.2.3.11	Durchflusszytometrische Analysen.....	37
2.2.3.11.1	Färbung von Oberflächenmolekülen	38
2.2.3.11.2	Färbung von intrazellulären Proteinen	38
2.2.3.11.3	Markierung von Zellen mit CFSE.....	39
2.2.3.11.4	Bestimmung des Anteils toter und apoptotischer Zellen.....	39
2.2.4	Statistik.....	40

3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung und Funktionalität von Zellen.....	41
3.1.1	Expression von Gzm A und B in Zellpopulationen der Milz.....	41
3.1.2	Analyse der Immunantwort von naiven und OVA-immunisierten Gzm AxB KO und WT Mäusen.....	44
3.1.2.1	Analyse der Zytokinantwort.....	44
3.1.2.2	Analyse der Proliferation.....	48
3.1.2.3	Induktion von AICD in naiven Milzzellen ist unabhängig von Gzm A und B.....	50
3.1.2.4	Gzm A und B hat keinen Einfluss auf die Expression von CD69.....	52
3.1.2.5	Analyse der OVA-spezifischen humoralen Immunantwort.....	53
3.1.3	Analyse der Entwicklung und Wanderung von Leukozyten.....	54
3.1.3.1	Durchflusszytometrische Analyse der Zellkomposition der Milz.....	54
3.1.3.2	Thioglykolat-induzierte Wanderung in die Peritonealhöhle.....	55
3.1.4	Zusammenfassung Teil 3.1.....	57
3.2	Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung und Immunantwort gegen <i>L. sigmodontis</i>.....	58
3.2.1	Induktion von Gzm A und B während der Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	58
3.2.2	Gzm A und B sind nicht in <i>L. sigmodontis</i> Larven und –Extrakt nachweisbar.....	61
3.2.3	Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung von <i>L. sigmodontis in vivo</i>	62
3.2.3.1	Entwicklung von <i>L. sigmodontis</i> in Gzm AxB KO und WT Mäusen.....	62
3.2.3.2	Entwicklung von <i>L. sigmodontis</i> in Gzm A KO, Gzm B KO und WT Mäusen.....	64
3.2.4	Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Immunantwort gegen <i>L. sigmodontis</i>	66
3.2.4.1	Charakterisierung der Zellpopulationen während der Infektion.....	66
3.2.4.2	Zytokinantwort in der frühen und mittleren Phase der Infektion.....	69
3.2.4.3	Hypoproliferation von PleC.....	74
3.2.4.4	Zelltod induziert durch Stimulation der PleC.....	75
3.2.4.5	Induktion von AICD in CD4 ⁺ T-Zellen durch polyklonale Restimulation.....	77
3.2.4.6	Aktivierung von B-Zellen durch LsAg.....	78
3.2.4.7	LsAg-spezifische Immunglobulinantwort in Gzm AxB KO und WT Mäusen.....	80
3.2.5	Genexpressionsanalyse in der frühen Phase der Infektion.....	81
3.2.6	Zusammenfassung Teil 3.2.....	83

4 DISKUSSION.....	84
4.1 Induktion von Granzymen während der Infektion mit <i>L. sigmodontis</i>	84
4.2 Gzm A und B beeinflussen die Entwicklung von <i>L. sigmodontis in vivo</i>	86
4.2.1 Welche Rolle spielt die infektiöse Dosis bei der Immunantwort?	87
4.2.2 Divergente Rolle von Gzm A und B	88
4.3 Funktionelle Relevanz der Gzm A und B Defizienz	90
4.3.1 Einfluss auf die Zytokinantwort.....	90
4.3.2 Einfluss auf die humorale Immunantwort.....	93
4.3.3 Einfluss auf die Wanderung und Reifung von Leukozyten.....	94
4.3.4 Einfluss auf die Induktion von Zelltod und AICD	96
4.4 Ausblick.....	102
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	104
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	106
7 ANHANG	118
7.1 Expression von Gzm A und B in BALB/c und C57BL/6 Mäusen	118
7.2 AAMØ- und CAMØ-spezifische Marker an Tag 7 p.i.....	119
7.3 DualChip® Mouse Inflammation: Untersuchte Gene in alphabetischer Reihenfolge.....	120

7-AAD	7-Amino-actinomycin D
AAMØ	alternativ aktivierte Makrophagen
ACAD	autonomer Zelltod aktivierter T-Zellen (<i>activated T cell autonomous death</i>)
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod (<i>activation-induced cell death</i>)
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
B.	<i>Brugia</i>
BAK	<i>Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer</i>
BAX	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
B-CLL	<i>B-chronic lymphocytic leukemia cells</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BZR	B-Zellrezeptor
CAD	caspaseaktivierte DNase
CAMØ	klassisch aktivierte Makrophagen (<i>classically activated macrophages</i>)
CCR	CC Chemokin-Rezeptor
CD	Nomenklatur für Oberflächenantigene (<i>cluster of differentiation</i>)
Con A	Concanavalin A
CFSE	Carboxy-Fluoreszein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
cpm	Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELISA	Enzym gekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
Fc	Antigenfragment, das aus dem Verdau mit Papain hervorgeht (<i>fragment crystallisable</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
Fos	<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>
Foxp3	<i>forkhead/winged helix transcription factor 3</i>
Gzm	Granzym

HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICAD	Inhibitor von CAD
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
i.p.	intraperitoneal
kDa	kilo Dalton
KO	<i>knock out</i>
L.	<i>Litomosoides</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LsAg	<i>Litomosoides sigmodontis</i> Antigenextrakt
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minuten
MMP	Matrix Metallo Proteinase
MP	Milchpulver
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
O.	<i>Onchocerca</i>
OVA	Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit
PAMP	pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular pattern</i>)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Konzentration an H ₃ O ⁺ -Ionen (potentia hydrogenii)
PI-9	Proteaseinhibitor-9
PleC	Pleuraexudatzellen (<i>pleural exudate cells</i>)
PRR	Rezeptor für pathogenassoziierte molekulare Muster (<i>pattern recognition receptor</i>)
PS	Phosphatidylserin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polycacrylamid-Gelelektrophorese

SEM	Standardfehler (<i>standard error of mean</i>)
SPI	Serinproteaseinhibitor
STAT	<i>Signal Transducer and Transcription Factor</i>
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TIMP-1	Gewebe Inhibitor der Metalloproteinase 1 (<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>)
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
W.	<i>Wuchereria</i>
Wsp	Oberflächenprotein von Wolbachien (<i>Wolbachia surface protein</i>)
WT	Wildtyp

DREIBUCHSTABEN-BEZEICHNUNG DER AMINOSÄUREN

Ala	Alanin
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
Cys	Cystein
Glu	Glutaminsäure
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Leu	Leucin
Lys	Lysin
Met	Methionin
Phe	Phenylalanin
Pro	Prolin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin

1 EINLEITUNG

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem hat sich zum Schutz vor Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten, aber auch vor Tumorzellen und körperfremden Molekülen entwickelt. Dieser Schutz wird vor allem durch das Zusammenspiel der angeborenen, sowie der erworbenen (adaptiven) Immunantwort gewährleistet.

1.1.1 Die angeborene Immunantwort

Die Spezifität der angeborenen Immunabwehr basiert auf der Erkennung konservierter Strukturen, sogenannter pathogenassoziierter molekularer Strukturen (PAMP, *pathogen associated molecular pattern*). Rezeptoren für die Erkennung von PAMPs auf Pathogenen heißen *pattern recognition receptors* (PRR) (Huang et al., 2008). Zu den zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DC). Diese Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche PRRs und besitzen die Fähigkeit Pathogene zu erkennen und über Phagozytose aufzunehmen. Verschiedene Lymphozyten wie die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und NKT-Zellen gelten als Mediatoren zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Sie sind potente Zytokinproduzenten und induzieren darüber eine Immunantwort des adaptiven Immunsystems (Papamichail et al., 2004). Aber auch lösliche Faktoren wie z. B. Komplementfaktoren, Pentraxine (Mantovani et al., 2008), Zytokine und reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen vermitteln die unspezifische Immunantwort.

1.1.2 Die adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunantwort wird von antigenspezifischen B- und T-Lymphozyten und den von ihnen freigesetzten Effektormolekülen vermittelt. Charakteristisch für diese Zellen ist die Expression von Rezeptoren mit einer einzigartigen Spezifität. Strukturen, die eine solche Immunantwort auslösen, werden als Antigene bezeichnet. Man unterscheidet hierbei die humorale und zelluläre Immunantwort. Beiden ist die Erkennung des Antigens über einen spezifischen Oberflächenrezeptor sowie die klonale Expansion und die

Ausbildung einer Gedächtnisantwort bei erneuter Infektion gemeinsam (Burnet, 1959). B-Lymphozyten vermitteln über die Sekretion von Immunglobulinen die humorale Immunantwort. Die Bindung von Immunglobulinen an Pathogene kann deren Infektiosität neutralisieren und diese gleichzeitig für die Eliminierung durch weitere Effektormechanismen wie das Komplementsystem oder phagozytierende Zellen markieren (Cambier, Pleiman & Clark, 1994). Die zelluläre Immunität wird von T-Zellen vermittelt. Hierbei unterscheidet man zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen (*cytotoxic T lymphocytes*, CTL), $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H -Zellen) und regulatorische T-Zellen (Treg). Für die Erkennung von Antigenen tragen B-Zellen den B-Zellrezeptor (BZR) und T-Zellen den T-Zellrezeptor (TZR) auf ihrer Oberfläche. Der BZR besteht aus membranständigen Immunglobulinen. Die Bindung des BZR an ein Antigen in Anwesenheit von T_H -Zellen führt zur Differenzierung der B-Zelle zu einer immunglobulinsezernierenden Plasmazelle. Der BZR erkennt dabei eine Vielzahl verschiedener Moleküle: Kohlenhydrate, Lipide, Hormone, Nukleinsäuren und Proteine (Abdul K. Abbas, 2007). Im Gegensatz dazu erkennt der TZR lediglich Peptide, die als Komplex mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) von einer antigenpräsentierenden Zelle (APZ) wie z. B. Makrophagen oder DCs präsentiert werden. Der TZR ist in den meisten T-Lymphozyten ein Heterodimer, bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Darüber hinaus existiert eine kleine Population an T-Lymphozyten, deren TZR aus einer γ - und einer δ -Kette aufgebaut ist. Der TZR ist auf der Oberfläche von T-Zellen eng mit dem CD3-Komplex und den Korezeptoren CD4 oder CD8 assoziiert (Griesser & Mak, 1994). $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterscheiden sich in ihrer MHC-Spezifität. CD4 interagiert mit MHC-Klasse II- (Cammarota et al., 1992) und CD8 mit MHC-Klasse I-Molekülen (Gao et al., 1997). MHC-I-Moleküle, die von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, präsentieren Peptide, die durch proteolytischen Abbau von beispielsweise viralen Proteinen aus dem Zytosol entstanden sind. MHC-II-Moleküle werden dagegen fast ausschließlich von APZ exprimiert und präsentieren Peptide von extrazellulären Partikeln, die durch Phagozytose aufgenommen wurden. Anhand der Zytokinantwort wird bei $CD4^+$ T-Zellen zwischen T_H1 - und T_H2 -Zellen differenziert. Zu den Zytokinen, die primär von T_H1 -Zellen synthetisiert werden, zählen Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-2 (IL-2) (Mosmann & Coffman, 1989). Diese pro-inflammatorischen Zytokine induzieren durch Aktivierung von Makrophagen, Neutrophilen oder NK-Zellen eine ausgeprägte Entzündungsreaktion. Im

Gegensatz dazu produzieren T_H2-Zellen anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13 und dienen damit vornehmlich der Aktivierung von B-Zellen (Abbas & Janeway, 2000). Neben den T_H1- und T_H2-Zellen unterscheidet man mittlerweile auch Treg und T_H17-Zellen (Afzali et al., 2007). T_H17-Zellen zeichnen sich vor allem durch die Produktion von IL-17 und IL-23 aus (Zelante et al., 2007). Für Treg ist die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und *transforming growth factor-β* (TGF-β) charakteristisch (Ito et al., 2008; McKee & Pearce, 2004). Neuere Daten belegen zudem die Immunsuppression mittels Induktion von Zelltod nach Sekretion von Granzym B (Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004b). Die Hauptaufgabe der CTL liegt nicht in der Zytokinproduktion, sondern im Abtöten infizierter Zellen. Als Effektormechanismus dient zum einen die Interaktion von Oberflächenrezeptoren (Fas-FasLigand) und zum anderen die Sekretion von lytischen Enzymen wie Granzymen und Perforin. Als Folge kommt es zur Induktion eines Zelltodprogrammes (Apoptose) in den Zielzellen.

1.2 Granzyme

Der Name „Granzym“ basiert auf der ursprünglichen Annahme, dass es sich hierbei um Enzyme handelt, die in Granula von CTL und NK-Zellen gespeichert werden (Chowdhury & Lieberman, 2007). Die Familie der Granzyme umfasst eine Gruppe homologer Serinproteasen. Granzyme werden von drei verschiedenen Genclustern kodiert (Cullen & Martin, 2008). Granzym (Gzm) A und B wurden zuerst entdeckt und sind folglich am besten charakterisiert. Alle anderen Granzyme werden als verwaiste Granzyme („*orphan granzymes*“) bezeichnet (Grossman et al., 2003). Tabelle 1.1 zeigt eine Übersicht aller bisher identifizierten Granzyme im humanen und murinen System sowie deren Expressionslokus (Chowdhury & Lieberman, 2007; Cullen & Martin, 2008). Granzyme werden, gebunden an Serglycin und Perforin, gespeichert (Grujic et al., 2005). Der saure pH-Wert in den Granula hemmt zusätzlich die Gzm-Aktivität innerhalb der Zelle. Die Aktivierung von CTL oder NK-Zellen induziert die Verschmelzung der lytischen Granula mit der Plasmamembran und es kommt zur Freisetzung des Granzym-Perforin-Serglycin-Komplexes (Bossi & Griffiths, 2005). Für die Bindung an die Zielzelle wurden ein rezeptorabhängiger und ein rezeptorunabhängiger Mechanismus identifiziert (Kurschus et al., 2005; Trapani et al., 2003; Veugelers et al., 2006). Rezeptor für Gzm B ist der Mannose-6 Phosphat Rezeptor (Kurschus et al., 2005; Trapani et al., 2003; Veugelers et

al., 2006), welcher nur eine untergeordnete Rolle spielt (Bird et al., 2005). Viel wichtiger scheint die Bindung des positiv geladenen Granzymns an negativ geladene Moleküle wie z. B. Heparansulfat. Dabei dissoziiert Gzm von Serglycin, um an den negativeren Bindungspartner an der Oberfläche der Zielzelle zu binden (Raja et al., 2005). Die Aufnahme der Granzyme wird von der Anwesenheit von Perforin beeinflusst. Dies geschieht jedoch nicht - wie ursprünglich angenommen - durch Poren, die Perforin in der Zielzellmembran bildet. Die Poren sind zu klein, um eine Aufnahme von Granzymen zu gewährleisten (Pipkin & Lieberman, 2007). Vielmehr gibt es Hinweise dafür, dass die Perforinporen durch Einstrom von Calciumionen ein Reparaturprogramm in der Zielzelle aktivieren (Chowdhury & Lieberman, 2007; Palm-Apergi et al., 2008; Pipkin & Lieberman, 2007). Unter Bildung von „Riesenendosomen“ werden Gzm A und B zusammen mit Perforin aufgenommen und innerhalb von Minuten in das Zytoplasma der Zielzelle entlassen (Chowdhury & Lieberman, 2007).

Gzm	Spezifität	Spezies	Chromosom
A	Arg/Lys	Mensch/Maus	5/13
B	Asp	Mensch/Maus	14/14
C	Asn/Ser	Maus	14
D	Phe/Leu	Maus	14
E	Phe/Leu	Maus	14
F	Phe/Leu	Maus	14
G	Phe/Leu	Maus	14
H	Phe/Leu	Mensch	14
K	Arg/Lys	Mensch/Maus	5/13
L	n. b.	Maus	14
M	Met/Leu	Mensch/Maus	19/10
N	n. b.	Maus	14

Tabelle 1.1: Übersicht aller bisher identifizierten humanen und murinen Granzyme. Die Tabelle zeigt die bisher identifizierten Granzyme A bis N sowie deren Aminosäurespezifität und deren Genexpressionslokus (n. b. = nicht bekannt).

1.2.1 Induktion von Apoptose durch Gzm A

Hauptaufgabe von Granzymen ist die Induktion von Apoptose in virusinfizierten Zellen und Tumorzellen. Abb. 1.1 zeigt in vereinfachter Form die Induktion des Zelltodes durch Gzm A und B. Die Trypsase Gzm A induziert caspaseunabhängig Apoptose. Entgegen der

früheren Annahmen, dass Gzm A einen langsamen Zelltod induziert, tritt bereits wenige Minuten nach der Behandlung von Zellen mit Gzm A und Perforin ein Verlust der Membranintegrität auf. Gleichzeitig kommt es als Indikator für die mitochondriale Dysfunktion vermehrt zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Martinvalet et al., 2008). Die Exposition von Phosphatidylserin und die Schädigung der DNA treten dagegen erst nach ein bis zwei Stunden auf. Gzm A verursacht Einzelstrangbrüche in der DNA und unterscheidet sich damit von den Doppelstrangbrüchen, die durch Gzm B generiert werden (Beresford et al., 1999; Chowdhury et al., 2006). Des Weiteren kommt es nicht zur Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran oder zur Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) (Martinvalet, Zhu & Lieberman, 2005).

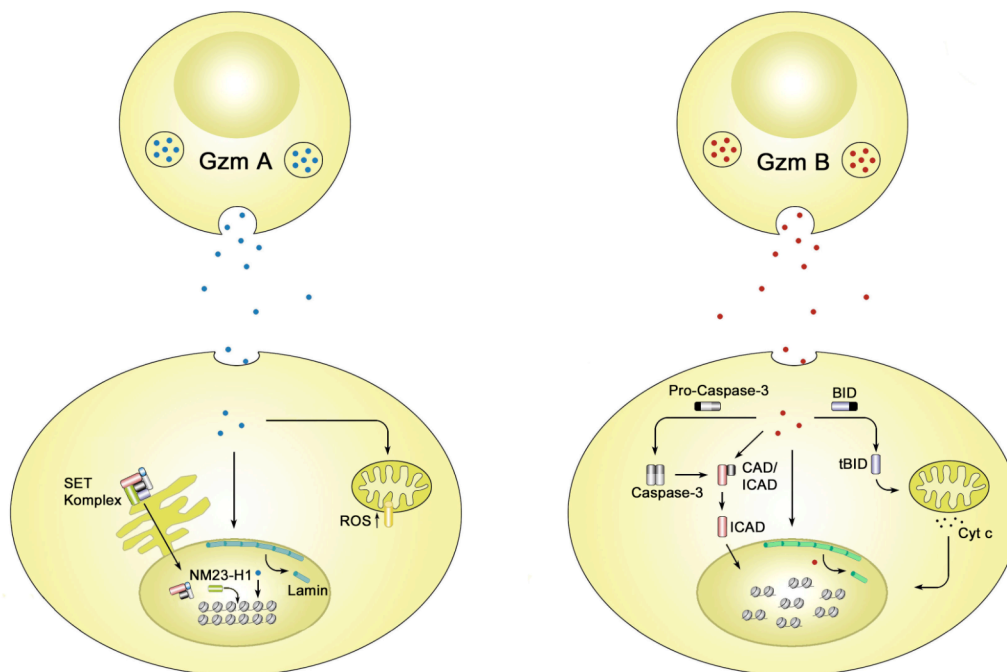


Abb. 1.1: Induktion von Apoptose durch Gzm A und B. Gzm A und B werden nach Freilassung aus den Granula von CTL und NK-Zellen über elektrostatische Wechselwirkungen von der Zielzelle aufgenommen. Gzm A induziert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien. Als Folge wird der ER-assoziierte SET Komplex in den Zellkern transloziert. Es kommt zur Abspaltung von NM23-H1 und zur Induktion von Einzelstrangbrüchen in der DNA. Gzm B kann nach Aufnahme in die Zielzelle caspaseabhängig und caspaseunabhängig Apoptose induzieren. Durch Aktivierung von Caspase-3 wandert die DNase CAD in den Zellkern und induziert dort Doppelstrangbrüche in der DNA. Zusätzlich kann Gzm B durch Freisetzung von Cyt c aus den Mitochondrien die Bildung des Apoptosoms fördern. Gzm A und B werden zudem auch selbst in den Zellkern transloziert und führen durch Spaltung der laminhaltigen Kernmembran zum Absterben der Zelle.

Über die Generierung von Superoxiden löst Gzm A eine oxidative Stressreaktion aus. Als Folge wird der mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) assoziierte SET Komplex in den Zellkern transloziert (Beresford et al., 2001; Martinvalet et al., 2005). Der SET Komplex setzt sich aus drei Nukleasen (*base excision repair Endonuclease Ape1*, Endonuklease NM23-H1 und Exonuklease TREX1), dem chromatinmodifizierenden Protein SET, dem pp23 und dem DNA-bindenden Protein HMGB2 zusammen. Eine wichtige Aufgabe des 270 bis 420 kDa großen SET Komplexes ist die Reparatur von DNA bei oxidativem Stress (Fan et al., 2003). Nach Translokation des SET Komplexes in den Zellkern aktiviert Gzm A durch Proteolyse die DNase NM23-H1 und inaktiviert gleichzeitig deren Inhibitor SET. Als Folge kann NM23-H1 Einzelstrangbrüche induzieren. Die 3'-5' Exonuklease TREX1 verhindert die Reparatur der entstandenen Einzelstrangbereiche, indem sie Basen vom freien 3' Ende entfernt (Chowdhury et al., 2006). Gleichzeitig wird die Struktur der DNA durch den Verdau des Linker-Histons H1 und der Schwänze der Core-Histone durch Gzm A aufgelöst (Zhang et al., 2001b). Dies erhöht die Zugänglichkeit der DNA für weitere Nukleasen. Als weiteres Substrat von Gzm A wurden in der Kernmembran lokalisierten Lamine identifiziert (Zhang et al., 2001a), welche gleichzeitig Substrate für Caspasen und Gzm B darstellen.

1.2.2 Induktion von Apoptose durch Gzm B

Nachdem Gzm B in das Zytoplasma entlassen wurde, kann es caspaseabhängig und caspaseunabhängig in der Zielzelle Apoptose auslösen (siehe Abb. 1.1). Gzm B ist wie ein Großteil der Caspasen eine Aspartase und schneidet Substrate daher bevorzugt nach Asparaginsäureresten. Somit ist es nicht verwunderlich, dass Gzm B die Caspase-3, -7, -8, und -10 direkt aktivieren kann (Darmon, Nicholson & Bleackley, 1995; Medema et al., 1997). Die Induktion von Apoptose in Zielzellen ist jedoch prinzipiell in Abwesenheit von Caspasen möglich. Die Verwendung von Caspase-Inhibitoren führt lediglich zu einem verzögerten Eintreten des Zelltodes (Sarin et al., 1997; Thomas et al., 2001; Trapani et al., 1998). Hauptcharakteristika des caspaseunabhängigen Zelltodes sind der Verlust des mitochondrialen Membranpotenzials sowie die Freisetzung von Cyt c und weiteren proapoptotischen Molekülen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass sich humanes und murines Gzm B in ihrer Substratspezifität unterscheiden (Cullen et al., 2007). Humanes Gzm B schneidet im Gegensatz zu murinem

Gzm B das zytosolische Protein BID (*BH3-interacting domain death agonist*). Die Prozessierung von BID durch Gzm B initiiert die Translokation von tBID (*truncated BID*) in das Mitochondrium. Hier führt es zur Oligomerisierung von BAX (*Bcl-2 Associated X Protein*) und/oder BAK (*Bcl-2 Homologous Antagonist/Killer*) (Gillick & Crompton, 2008; Upton et al., 2008). Unter Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran wird die Freisetzung von pro-apoptotischen Molekülen wie Cyt c und Endonuklease G in das Zytoplasma der Zelle induziert (Arnoult et al., 2003; Du et al., 2000; Kluck et al., 1997). Cyt c bildet gemeinsam mit Procaspase-9 und APAF-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) einen Komplex, der als Apoptosom bekannt ist. Daraus resultiert die Aktivierung der Caspase-9, welche die Aktivierung der Caspase-3 verstärkt (Bao & Shi, 2007). Über die Aktivierung der Caspase-8 kann Gzm B ebenfalls die Spaltung von BID induzieren. Darüber hinaus existiert eine caspasen- und BID-unabhängige Schädigung des mitochondrialen Transmembranpotenzials, welche gleichzeitig nicht mit einer Freisetzung von Cyt c assoziiert ist. Die Arbeitsgruppe von T.J. Ley konnte zeigen, dass es in Fibroblasten von BID und BAX/BAK defizienten Mäusen unabhängig von Caspasen, BID und BAX/BAK zu einem Verlust des Mitochondrienmembranpotenzials kommt (Thomas et al., 2001). Diese Daten verdeutlichen die Komplexität der Induktion von Apoptose durch Gzm B. Darüber hinaus kann Gzm B direkt Apoptose in Zielzellen auslösen. Humanes Gzm B schneidet nach Freisetzung ins Zytoplasma den Inhibitor der caspaseaktivierten DNase (ICAD), welcher gleichzeitig ein Substrat der Caspase-3 darstellt. Das dabei freigesetzte Enzym CAD wandert in den Zellkern, um dort die Degradierung der DNA einzuleiten. Die hierbei entstehenden 180 bis 200 Basenpaare großen DNA-Fragmente sind ein Hauptmerkmal des Gzm B-induzierten Zelltodes.

Neben ICAD wurden weitere Substrate von Caspasen identifiziert, die ebenfalls von Gzm B geschnitten werden (Andrade et al., 1998; Froelich et al., 1996; Thornberry et al., 1997; Zhang et al., 2001a):

- Poly (ADPribose) Polymerase
- DNA-abhängige Proteinkinase
- *Nuclear mitotic apparatus protein*
- Lamin B
- α -Tubulin

Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Gzm B in den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD, *activation-induced cell death*) von T_H2-Zellen involviert ist. AICD dient zusammen

mit dem autonomen Zelltod aktivierter T-Zellen (ACAD, *activated T cell autonomous death*) der Herunterregulation aktivierter T-Zellen im Verlauf einer Entzündung oder Infektion (Brenner, Krammer & Arnold, 2008). Abb. 1.2 gibt einen Überblick über AICD in T_H1 - und T_H2 -Zellen. Beim AICD löst die Restimulation des TZR ein Programm in bereits aktivierten Zellen aus, das zum Absterben der Zellen führt. Als zentrale Moleküle wurden Todesrezeptoren wie CD95 (Fas), TNF-Rezeptor 1 und der Rezeptor für den TNF-verwandten apoptoseinduzierenden Liganden identifiziert (Dhein et al., 1995; Janssen et al., 2005; Martinez-Lorenzo et al., 1998; Sytwu, Liblau & McDevitt, 1996).

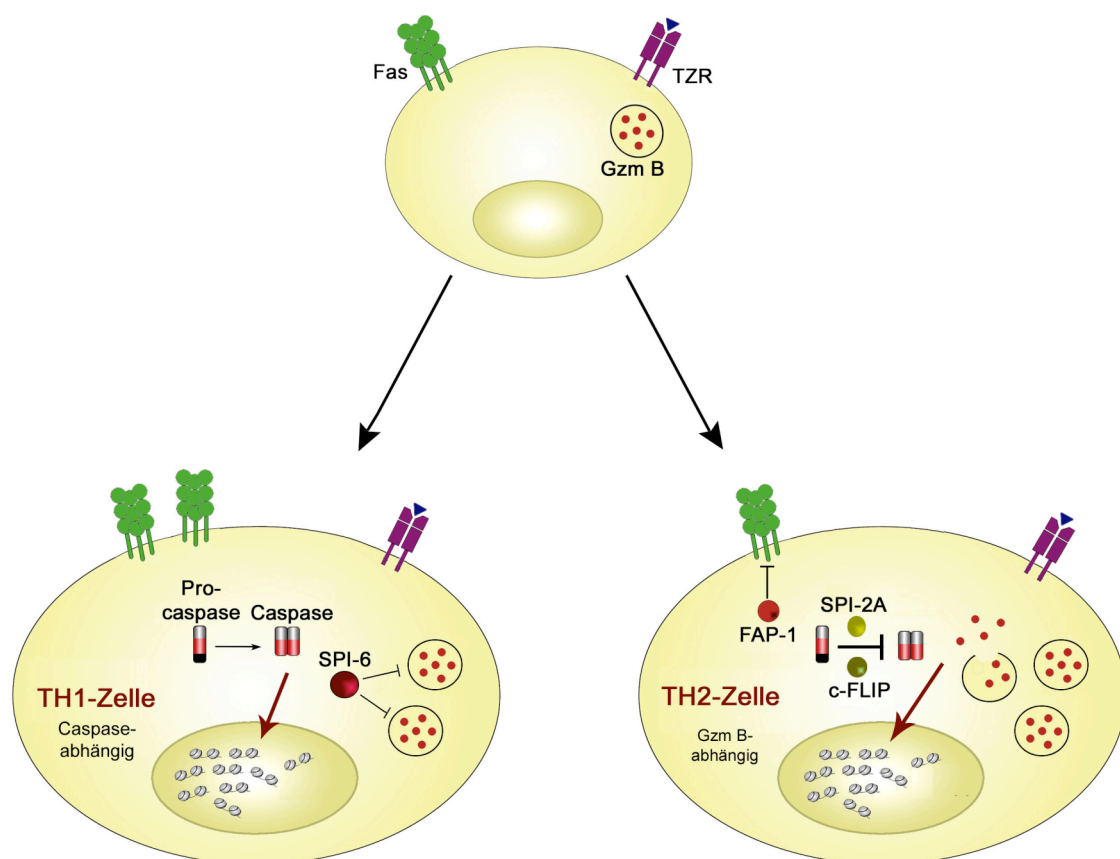


Abb. 1.2: AICD in T_H1 - und T_H2 -Zellen. Nach Antigenstimulation differenzieren sich T_H0 -Zellen in T_H1 - oder T_H2 -Zellen. Um die Homöostase aufrecht zu erhalten, stirbt ein Teil der T_H -Zellen bei anhaltender Restimulation mit dem spezifischen Antigen. Dieser als AICD bezeichnete Vorgang ist in T_H1 - und T_H2 -Zellen unterschiedlich reguliert. Der Zelltod von T_H1 -Zellen ist abhängig von der Aktivierung von Caspasen und dem Rezeptor Fas. Ligation von Fas induziert die Spaltung von Pro-Caspasen zu Caspasen. Gleichzeitig exprimieren T_H1 -Zellen den Gzm B-Inhibitor SPI-6. Im Gegensatz dazu findet man in T_H2 -Zellen verschiedene Inhibitoren für die Fas-Signaltransduktion wie z. B. FAP-1, SPI-2A und c-FLIP. Der AICD in T_H2 -Zellen wird durch Gzm B vermittelt. Beide Signalwege führen letztendlich zur Degradierung der DNA und zum Absterben der Zelle.

T_H2-Zellen sind weniger suszeptibel für AICD als T_H1-Zellen. Als Ursache dafür wurde die erhöhte Expression vom zellulären FLICE-Inhibitor Protein (c-FLIP) in T_H2-Zellen angesehen. C-FLIP inhibiert die Aktivierung der Caspasen-8, ausgelöst durch die Aktivierung von Fas (Krueger et al., 2001). Des Weiteren weisen T_H2-Zellen im Vergleich zu T_H1-Zellen eine niedrigere Expression des FasL auf (Oberge et al., 1997; Ramsdell et al., 1994; Zhang et al., 2003), was jedoch kontrovers diskutiert wird (Varadhachary et al., 1997; Watanabe et al., 1997). Zudem wurde gezeigt, dass T_H2-Zellen im Vergleich zu T_H1-Zellen eine erhöhte Expression des Caspase 3- und 9-Inhibitor SPI-2A aufweisen (Devadas et al., 2006). Gleichzeitig hemmt die Expression der Fas-assoziierten Phosphatase (FAP-1) in T_H2-Zellen die Signaltransduktion des Fas-Rezeptors (Zhang et al., 1997). Im Gegensatz dazu induziert die Restimulierung des TZR die Expression vom Serinproteaseinhibitor (SPI)-6 in murinen T_H1-Zellen. SPI-6 gilt als homolog zum humanen Proteaseinhibitor (PI)-9 (Bots et al., 2006; Sun et al., 1997) und hemmt die Induktion von Apoptose durch Gzm B (Bird et al., 1998). Die Defizienz von Gzm B ist in Mäusen mit einer verminderten Sterblichkeit von T_H2-Zellen durch AICD verbunden. Gleichzeitig zeigen die Mäuse eine stärker ausgeprägte T_H2-Zytokinantwort sowie eine erhöhte Suszeptibilität für allergeninduziertes Asthma (Devadas et al., 2006).

1.2.3 Alternative Aufgaben von Gzm A und B

Innerhalb der letzten Jahre wurden zusätzliche Zelltypen identifiziert, welche Gzm A und/oder B exprimieren. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten unter Verwendung Gzm defizienter Mäuse zeigen, dass humane und murine Gzm B⁺ Treg Zelltod in Effektorzellen induzieren können (Cao et al., 2007; Gondek et al., 2005; Grossman et al., 2004a; Grossman et al., 2004b). Dadurch kommt es in Anwesenheit von CD4⁺CD25⁺ Treg zu einer verminderten Proliferation von CD4⁺CD25⁻ Effektorzellen. Darüber hinaus können humane T_H17-Zellen über die Expression von Gzm B in Neuronen Apoptose auslösen (Kebir et al., 2007). Zudem exprimieren humane *B-chronic lymphocytic leukemia cells* (B-CLL) nach Stimulation mit CpG Oligodeoxynukleotiden und IL-21 Gzm B und töten darüber autologe B-CLL ab (Jahrsdorfer et al., 2006).

Neuere Studien belegen, dass die Expression von Granzymen in verschiedenen Geweben mit einer nicht-zytolytischen Funktion einhergeht und perforinunabhängig ist. Immunhistochemische Studien haben die Expression von Gzm B im humanen

Reproduktionssystem gezeigt: Neben Spermatozyten und Trophoblasten der Plazenta sind Granulosazellen im Ovar positiv für Gzm B (Hirst et al., 2001; Sasson et al., 2003). Die Funktion von Gzm B in diesen Zellen ist dabei noch unklar. Vieles deutet daraufhin, dass Gzm A und B eine extrazelluläre Rolle besitzen (Buzza & Bird, 2006). Extrazelluläres humanes Gzm A fördert beispielsweise die pro-inflammatorische Zytokinantwort durch Monozyten, Fibroblasten und Epithelzellen (Sower et al., 1996a; Sower et al., 1996b). Zudem beeinflusst es über die Expression von IL-8 die Migration von Neutrophilen (Sower et al., 1996a; Sower et al., 1996b; Yoshikawa et al., 2008). Verschiedene Forschungsgruppen konnten zudem zeigen, dass Gzm A und B extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin, Vitronectin, Kollagen Typ IV und Laminin degradieren (Buzza et al., 2005; Choy et al., 2004; Simon et al., 1991; Simon et al., 1988). Infolgedessen fördern Gzm A und B die Wanderung von Lymphozyten *in vitro*. Die Degradierung extrazellulärer Matrixproteine führt darüber hinaus zu einer Ablösung glatter Muskelzellen, Endothelzellen, Epithelzellen und Chondrozyten (Buzza et al., 2005; Choy et al., 2004; Froelich et al., 1993; Hirayasu et al., 2008; Yoshikawa et al., 2008).

Verschiedene Erkrankungen wie Arthritis, Arteriosklerose und chronisch allergisches Asthma sind mit einer Erhöhung von Gzm A und/oder B assoziiert (Bratke et al., 2004; Choy et al., 2003; Spaeny-Dekking et al., 1998) und deuten somit ebenfalls auf eine extrazelluläre Rolle beider Granzyme hin. Dabei wurde mit Makrophagen ein zusätzlicher Zelltyp identifiziert, der Gzm B exprimiert (Kim et al., 2007). Die Expression von Gzm B durch Makrophagen wurde in der Wistar Ratte bestätigt (Baba et al., 2008). Jüngere Studien zeigen zudem die Expression von Gzm A und/oder B in DCs (Rissoan et al., 2002), Neutrophilen (Hochegger et al., 2007; Wagner, Stegmaier & Hansch, 2008), Basophilen (Tschopp et al., 2006) und Mastzellen (Pardo et al., 2007). Welche Funktion die Proteasen in den verschiedenen Zelltypen haben ist weitestgehend unklar.

1.2.4 Rolle von Gzm A und B in der Abwehr von Infektionen

Während der Infektion mit dem Dengue-Fieber-Virus (Bade et al., 2005), dem Epstein-Barr-Virus (Spaeny-Dekking et al., 1998) oder dem humanem Immundefizienzvirus-1 (Spaeny-Dekking et al., 1998) wurde eine Erhöhung von Gzm A und/oder B im Plasma der Patienten nachgewiesen. Dass Granzyme bei der Abwehr von Viruserkrankungen ein wichtiger Effektormechanismus sind, belegen Daten im Mausmodell. Mullbacher und

Kollegen konnten bereits 1999 zeigen, dass Gzm B defiziente Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp (WT) Mäusen suszeptibel für das natürliche Poxvirus Ectromelia sind (Mullbacher et al., 1999). Gzm AxB *knock out* (KO) Mäuse weisen im Vergleich zu C57BL/6 WT Mäusen darüber hinaus erhöhte Titer des murinen Cytomegalievirus in Speicheldrüse, Milz, Leber und Lunge auf (Riera et al., 2000; van Dommelen et al., 2006). Die erhöhte Virenlast deutet auf eine in Abwesenheit von Gzm A und B verminderte Abwehr gegen das Cytomegalievirus hin.

Infektionen mit Parasiten wie *Plasmodium falciparum* (Hermsen et al., 2003) oder Bakterien wie *Neisseria meningitidis* (van Woensel et al., 2005) oder *Burkholderia pseudomallei* (Lauw et al., 2000) führen ebenfalls zu einer Erhöhung von Gzm A und B im Plasma der Patienten. Passend dazu können Gzm AxB KO im Gegensatz zu WT Mäusen die Infektion mit dem *Trypanosoma cruzi* Stamm Tulahuen nicht kontrollieren (Muller et al., 2003). Für den Hakenwurm *Nippostrongylus brasiliensis* konnte in der Ratte eine erhöhte Expression von Gzm B im Darm gezeigt werden (Fujiwara et al., 2004). Die Gzm B-Expression geht einher mit einer Atrophie der Villi an Tag 10 nach Infektion.

Die Expression von Gzm A und B ist somit relevant für die Abwehr gegen verschiedene intrazelluläre Parasiten.

1.3 Filariosen am Beispiel der Onchozerkose

Unter Filariosen werden infektiöse Erkrankungen zusammengefasst, die durch Filarien verursacht werden. Weltweit sind mehr als 150 Millionen Menschen mit Filarien infiziert. Zu den wichtigsten humanpathogenen Filarien gehören *Wuchereria bancrofti*, *Brugia (B.) malayi*, *Onchocerca (O.) volvulus* und *Loa loa* (Taylor, 2002). Die Sterblichkeitsrate ist verglichen mit anderen tropischen Erkrankungen vergleichsweise gering. Dennoch verursachen Filarien Erkrankungen von großer klinischer und wirtschaftlicher Bedeutung und beeinträchtigen die Lebensqualität der Betroffenen (WHO Bericht 2002).

Die Übertragung der Filarien ist an blutsaugende Vektoren gebunden, die als Zwischenwirt fungieren. Die Übertragung von Mikrofilarien (MF) von *O. volvulus*, bekannt als Erreger der Flussblindheit, erfolgt über die Kriebelmücke (Gattung *Simulium*) (Garms, 1975). Bei der Blutmahlzeit aufgenommene MF häuten sich zweimal und entwickeln sich zum infektiösen Larvenstadium (L3). Bei einer weiteren Blutmahlzeit wird die L3 auf den Menschen übertragen. Die sich im Endwirt entwickelnden adulten Würmer können

chronische Erkrankungen verursachen und über Jahrzehnte im Wirt persistieren. Aus klinischer Sicht lassen sich anhand der Immunantwort gegen *O. volvulus* drei Gruppen einteilen (Ottesen, 1995):

1. Putativ immun: Individuen, die in Endemiegebieten wohnen, und trotz Exposition keine Anzeichen der Infektion aufweisen.
2. Generalisierte Form: Menschen, die eine geringe bis hohe subkutane MF-Dichte aufweisen, aber nur eine sehr milde Symptomatik zeigen.
3. Hyperreaktive Form: Individuen mit einer sehr geringen MF-Dichte und einer starken inflammatorischen Immunreaktion. Dadurch kommt es zu einem ausgeprägten Krankheitsbild (Dermatitis oder Erblindung).

Als pathogenes Agens wurden unter anderem MF identifiziert. Infizierte Personen können mehr als $1,2 \times 10^7$ MF beherbergen (Schulz-Key, 1990), wobei davon täglich zwischen 5×10^4 und 7×10^4 absterben (Duke, 1993; Schulz-Key & Karam, 1986). Dabei kommt es zur Freisetzung von Wolbachien (Hise et al., 2007). Diese zur Gruppe der Rickettsien gehörenden obligat intrazellulären Bakterien induzieren über toll-ähnliche Rezeptoren (*toll like receptor*) TLR2 und eventuell TLR4 eine Immunantwort im Wirt (Brattig et al., 2004; Hise et al., 2007).

1.3.1.1 Die Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis* (Chandler 1931) im Tiermodell

Infektionen der BALB/c Maus mit *Litomosoides (L.) sigmodontis* stellen das einzige Mausmodell für Filarieninfektionen dar, in dem der gesamte Lebenszyklus des Wurmes durchlaufen wird (Petit et al., 1992). Die Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*) ist das natürliche Reservoir von *L. sigmodontis*. Als Vektor für die Übertragung von infektiösen *L. sigmodontis* Larven fungiert die Milbe *Ornithonyssus bacoti* (Siddiqui & Kershaw, 1976). Den Infektionszyklus im Überblick zeigt die Abb. 1.3. Bei einer Blutmahlzeit an infizierten Ratten nimmt die Milbe MF auf. Diese durchdringen die Darmwand und wandern in die Thoraxmuskulatur ein. Innerhalb von 12 bis 14 Tagen kommt es über das Stadium der zweiten Larve (L2) zur Reifung infektiöser Larven. Die L3 wandern in den Kopf der Milbe und können bei der nächsten Blutmahlzeit über die Mundwerkzeuge in den Endwirt gelangen. Die L3 wandert innerhalb von zwei bis vier Tagen über die Lymph- und Blutgefäße an ihren Zielort (Marechal et al., 1996). In der Pleurahöhle kommt es acht bis zehn Tage nach der Infektion (p.i., *post infectionem*) zur Häutung der L3. Durch eine

weitere Häutung zwischen Tag 26 und 28 p.i. entwickeln sich junge adulte Würmer. Die weiblichen Würmer entlassen zwischen Tag 50 und Tag 80 p.i. MF in die Pleurahöhle, die im Blut nachweisbar sind.

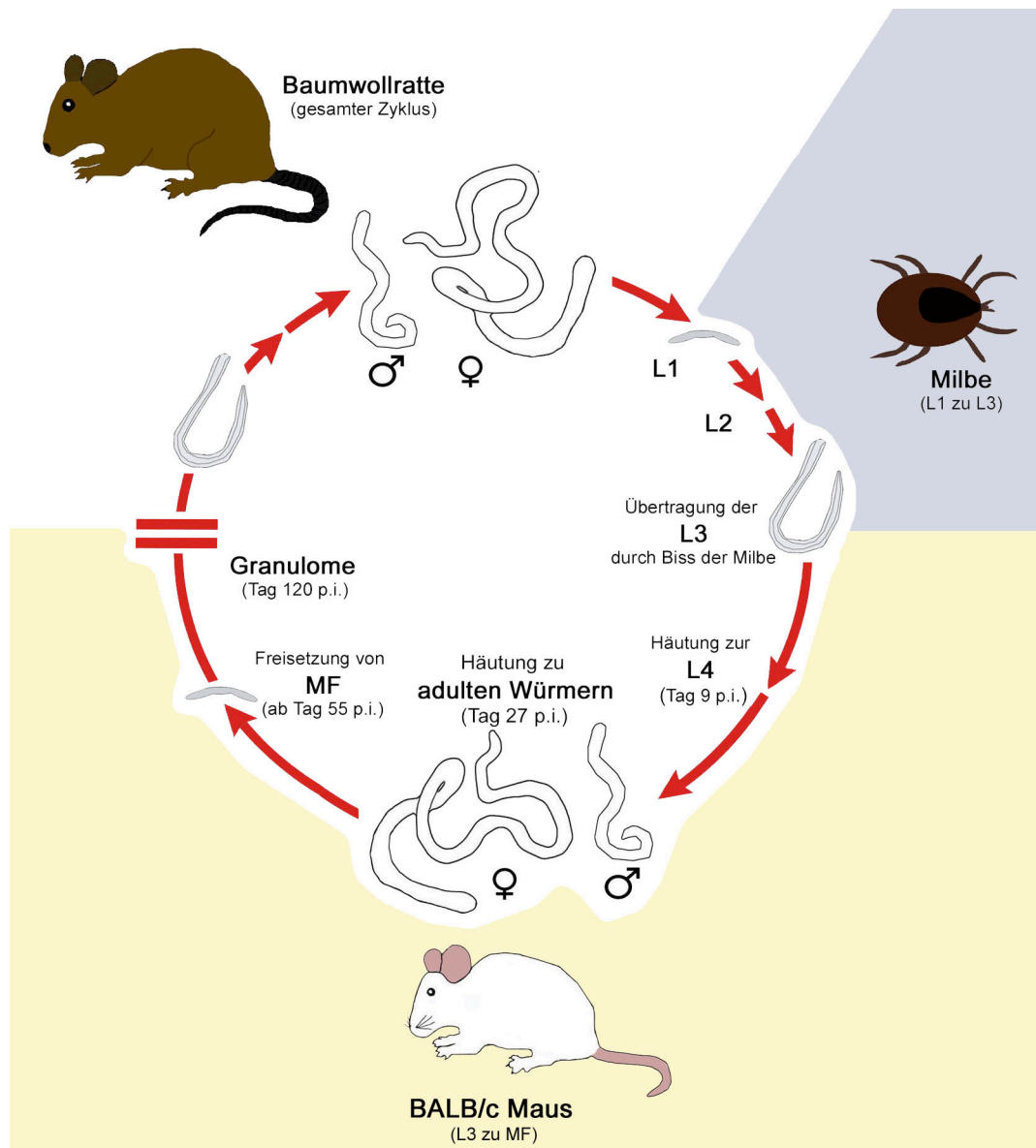


Abb. 1.3: Zyklus der Nagerfilarie *Litomosoides sigmodontis*. Der natürliche Wirt von *L. sigmodontis* ist die Baumwollratte. Eine Übertragung der L3 auf die Maus ist an die Milbe als Vektor gebunden. Milben nehmen bei einer Blutmahlzeit auf der Baumwollratte L1 auf. In der Milbe entwickeln sich innerhalb von 14 Tagen L1 zu L3. Durch einen Biss der Milbe werden L3 auf die BALB/c Maus übertragen. Diese erreichen über die Lymphgefäße die Pleurahöhle, und häuten sich an Tag 9 p.i.. Die sich daraus entwickelnden L4 häuten sich an Tag 27 p.i. erneut, und es entstehen adulte weibliche und männliche Würmer. Die weiblichen Würmer entlassen ab Tag 55 p.i. MF. Die Infektion in der BALB/c Maus endet nach ca. 120 Tagen durch Bildung von Granulomen.

Nach 120 Tagen kommt es durch Bildung von Granulomen, einer Umkapselung der Würmer mit inflammatorischen Zellen, zur Beendigung der Infektion in der BALB/c Maus. Im Gegensatz zur suszeptiblen BALB/c Maus kommt es in der resistenten C57BL/6 Maus nicht zur Entwicklung adulter Würmer (Babayan et al., 2003). Die Infektion wird vom Immunsystem des Wirtes 35 bis 40 Tage nach Beginn der Infektion durch Granulombildung beendet.

1.3.1.2 Immunantwort gegen *L. sigmodontis* in der BALB/c Maus

Untersuchungen in der BALB/c Maus haben gezeigt, dass CD4⁺ T-Zellen essenziell für die Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* sind. Die Depletion von CD4⁺ T-Zellen führt an Tag 28 p.i. zu einer erhöhten Wurmlast sowie zu einer erhöhten und verlängerten Mikrofilariämie (Al-Qaoud et al., 1997). Im Gegensatz dazu haben CD8⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die Entwicklung der Würmer (Korten et al., 2002). NK-Zellen sind dagegen wichtig bei der Abwehr gegen *L. sigmodontis*. Die Depletion von NK-Zellen führt im Vergleich zu unbehandelten BALB/c Mäusen zu einer Erhöhung der Wurmlast (Korten et al., 2002). Neben NK-Zellen wird B1-Zellen eine wichtige Funktion bei der Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* zugeschrieben (Al-Qaoud, Fleischer & Hoerauf, 1998). Hauptfunktion der B1-Zellen ist die Produktion sogenannter natürlicher IgM-Antikörper (Baumgarth, Tung & Herzenberg, 2005). Die Lokalisation der B1-Zellen in Körperhöhlen wie Peritoneum und Pleurahöhle legt eine Rolle bei der Abwehr gegen *L. sigmodontis* nahe. Für BALB/c Mäuse wurde unter Verwendung von Xid.BALB/c Mäusen demonstriert, dass IgM an Phosphorylcholin an der Oberfläche von L3 bindet (Al-Qaoud et al., 1998). Gleichzeitig tragen B1-Zellen durch die Synthese von IL-10 zur Abwehr gegen die Würmer bei (Al-Qaoud et al., 1998). In der BALB/c Maus wurde ebenfalls gezeigt, dass die Anzahl der Treg im Verlauf der Infektion ansteigt (Taylor et al., 2007; Taylor et al., 2005). CD4⁺CD25⁺ Zellen scheinen die Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* zu hemmen, da die Applikation von anti-CD25 und anti-GITR oder anti-CTLA-4 zu einer verbesserten Abwehr gegen den Wurm führt (Taylor et al., 2007; Taylor et al., 2005). Daneben wurde ein weiterer Zelltyp identifiziert, der zu einer Hemmung der Immunabwehr führt: Alternativ aktivierte Makrophagen (AAMØ) (Taylor et al., 2006). AAMØ unterscheiden sich in Bezug auf Oberflächenmarker und Zytokinrepertoire von klassisch aktivierten Makrophagen (CAMØ) und entstehen in Anwesenheit von den T_H2-Zytokinen IL-4 und IL-13. Während der Infektion mit *L. sigmodontis* kommt es zur Rekrutierung einer F4/80⁺ Fizz⁺ Ym1⁺

Population in die Pleurahöhle. Diese AAMØ inhibieren die antigenspezifische T-Zell-Proliferation kontaktabhängig (Taylor et al., 2006).

Die Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* basiert darüber hinaus auf T_H1- und T_H2-vermittelten Mechanismen. Das Fehlen von IL-4 oder IL-5 führt zu einer signifikant erhöhten und verlängerten Mikrofilariämie in den Mäusen (Volkman et al., 2001). Insbesondere IL-5 spielt in der späten Phase der Immunabwehr eine Rolle. Durch die Aktivierung von Granulozyten trägt das Zytokin zur Abkapselung adulter Würmer bei (Martin et al., 2000a; Saefte et al., 2003; Volkman et al., 2003). Mäuse, die sowohl für IL-5 als auch für IFN- γ defizient sind, haben im Vergleich zu BALB/c Mäusen und Einzel-KO Mäusen eine signifikant erhöhte Wurmlast (Saefte et al., 2003). IFN- γ kommt dabei bei der Granulombildung eine wichtige Rolle zu. IFN- γ KO Mäuse weisen ein Drittel weniger Granulome auf und haben im Vergleich zu WT Mäusen eine verminderte Anzahl an Granulozyten in der Pleurahöhle (Saefte et al., 2001).

1.3.1.3 Immunantwort gegen *L. sigmodontis* in der C57BL/6 Maus

Aus einer Vergleichsstudie geht hervor, dass C57BL/6 Mäuse MF, die intrapleural oder intravenös verabreicht wurden, innerhalb von sechs Tagen beseitigen können (Pfaff et al., 2000). In der BALB/c Maus sind MF hingegen noch 40 Tage nach Infektion im Blut nachweisbar. Die Immunantwort nach Infektion von C57BL/6 und BALB/c Mäusen mit 40 infektiösen L3 wurde in einer Studie von 2003 verglichen (Babayana et al., 2003). Die verminderte Entwicklung von L4 in C57BL/6 Mäusen geht mit einer verstärkten Synthese von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen sowie Eotaxin zwischen Tag 10 und Tag 30 p.i. einher (Babayana et al., 2003). Gleichzeitig kommt es zu verstärktem Einwandern von Immunzellen in die Pleurahöhle von C57BL/6 Mäusen.

Versuche mit MHC II-defizienten Mäusen, die eine verringerte Anzahl an CD4⁺ T-Zellen besitzen, zeigen, dass nach der intravenösen Injektion von MF eine erhöhte und verlängerte Mikrofilariämie auftritt, die mehr als 140 Tage anhält. WT C57BL/6 Mäuse weisen dagegen schon nach zwei Tagen keine MF mehr im Blut auf (Hoffmann et al., 2001). Studien mit IL-4 defizienten Mäusen verdeutlichten, dass IL-4 ein wichtiges Zytokin bei der Abwehr gegen *L. sigmodontis* ist. IL-4 KO Mäuse zeichneten sich im Vergleich zu C57BL/6 WT Mäusen durch vollständige Entwicklung der *L. sigmodontis* Larven zu adulten Würmern inklusive der Freisetzung von MF aus (Le Goff et al., 2002; Specht et al.,

2004). IL-4 ist folglich bei der Ausbildung einer schützenden T_H2-Antwort in der resistenten Maus essenziell. Interessanterweise wirkt IL-10 antagonistisch zu IL-4. Das gleichzeitige Fehlen von IL-4 und IL-10 führt zu einem Infektionsverlauf, der dem in der C57BL/6 Maus ähnelt. Das T_H2-Zytokin IL-5 scheint dagegen keinen direkten Einfluss auf das Überleben von *L. sigmodontis* zu haben (Le Goff et al., 2000). Im Gegensatz zur suszeptiblen BALB/c Maus spielt die Ausbildung einer Immunglobulinantwort in der C57BL/6 Maus nur einer untergeordnete Rolle (Le Goff et al., 2002; Specht et al., 2004): Die Defizienz von B-Zellen in μ MT Mäusen führt nicht zu einer Veränderung der Wurmlast in den Mäusen (Le Goff et al., 2002).

1.4 Zielsetzung

Die Immunantwort gegen die Nagerfilarie *L. sigmodontis* wird durch Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort beeinflusst. Eine wichtige Gemeinsamkeit dieser Zellen ist die Expression von Gzm A und/oder B. Bisher gibt es jedoch keine Studien, die den Einfluss von Granzymen auf den Verlauf einer Würmerinfektion untersuchen. Dennoch weisen aktuelle Daten auf viele alternative Funktionen von Gzm A und B hin. Neben der Induktion von Apoptose in virusinfizierten Zellen und Tumorzellen, könnten insbesondere die extrazellulären Aufgaben beider Granzyme in dem hier verwendeten Filarienmodell relevant sein. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, welche Auswirkung die Defizienz von Gzm A und B auf die Immunantwort gegen die verschiedenen Stadien von *L. sigmodontis* hat. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- Kommt es im Verlauf der Infektion zu einer Hochregulation von Gzm A und B?
- Welchen Einfluss hat die Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung und Funktionalität von Lymphozyten?
- Welchen Einfluss hat die Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung des Wurmes *in vivo*?
- Können zusätzliche Funktionen für Gzm A und B postuliert werden?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte und Hilfsmittel

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Thermo Electron Corporation, Langenselbold
Digitalkamera (Nikon E4500)	Nikon, Düsseldorf
Digitalwaage	Kern und Söhne, Albstadt
Deckgläschen	Kern und Söhne, Albstadt
ELISA 96-Loch Platten	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
ELISA Reader MRX	Dynatech Laboratories, Guernsey, England
Eppendorffzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
FACSCalibur Flow Cytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Filmkassette (18 x 24 cm)	Siemens, München
Gelkammern	BioRAD, München
Homogenisator	Roth, Karlsruhe
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg
Mikrohämatokrit-Kapillaren	Brand GmbH, Wertheim
Mikroskop (Olympus CK2)	Olympus, Hamburg
Mikroskop (Carl Zeiss)	Carl Zeiss, Jena
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Brandt, Wertheim
Objektträger	Engelbrecht GmbH, Edermünde
pH-Meter (WTW pH 526)	Labotec, Wiesbaden
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe „pipetus-akku“	Hirschmann, Eberstadt
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reinluft-Werkband „Microflow“	Gelaire Flow Laboratories, Kirkham, England
Spritzen (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	Braun, Melsungen

Vortexer	Janke&Kunkel IKA-Labortechnik, Heitersheim
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellerntegerät Microcell Harvester	Scatron Instruments, Lier, Norwegen
Zellkulturplatten	Greiner, Frickenhausen
Zellsiebe (Cell Strainer 70 μ m)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellsiebe (Cell Tricks, 30 μ m)	Partec, Münster
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.1.3 Antikörper, Detektions- und Stimulationsreagenzien

Zellstimulation

Anti-Ig, κ leichte Kette (187.1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-CD3 (145C11)	Hybridomüberstand, BNI
Concanavalin A (Con A)	Sigma, Deisenhofen
IL-4	PeptoTech, Hamburg
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
Lipopolysaccharid (LPS; <i>E. coli</i> 055:B5)	Sigma, Deisenhofen
Ovalbumin (OVA), Grad IV	Sigma, Deisenhofen
Phorbolmyristat (PMA)	Sigma, Deisenhofen

Kits

Duo Set IL-2 ELISA Kit	R&D Systems Wiesbaden
Duo Set IL-4 ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Duo Set IL-10 ELISA Kit	R&D Systems Wiesbaden
Duo Set IFN- γ ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden

Fluorochrom-konjugierte Primärantikörper

Spezifität und Konjugation	Klon	Verdünnung	Hersteller
Hamster anti-Maus $\alpha\beta$ TZR Biotin	H57-957	1:100	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-Maus B220 APC	RA3-6B2	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD11b FITC	M1/70.15	1:200	Caltag, Hamburg
Ratte anti-Maus CD19 FITC/APC	1D3	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD25 FITC	7D4	1:50	BD Pharmingen, Heidelberg
Hamster anti-Maus CD3 FITC/APC	500A2	1:200	Caltag, Hamburg
Ratte anti-Maus CD4 FITC/APC	RM4-5	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD49b PE/APC	DX5	1:50	eBioscience, Frankfurt
Hamster anti-Maus CD69 PE	H1.2F3	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8 PerCP Cy5.5	53-6.7	1:250	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus CD8 APC	53-6.7	1:100	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-Maus F4/80 Biotin	BM8	1:200	BMA Biomedicals
Ratte anti-Maus Foxp3 PE / APC	FJK-16s	1,5 μ l	eBioscience, Frankfurt
Ratte anti-Maus Gr-1 PE	RB6-8C5	1:400	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus anti-Maus Gzm A	3G8.5	4 μ l	Santa Cruz, Heidelberg
Maus anti-human Gzm B	GB-12	1:200	Caltag, Hamburg
Ratte anti-Maus IFN- γ PE	XMG1.2	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus IL-5 APC	TRFK5	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte anti-Maus IL-2 APC	C15.6	1:200	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus anti-Maus NK1.1 APC	PK136	1:100	BD Pharmingen, Heidelberg

Isotypkontrollen

Maus IgG1 PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG1 APC	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2a APC	BD Pharmingen, Heidelberg
Ratte IgG2a PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus IgG2b PE	Santa Cruz, Heidelberg
Ratte IgG2b APC	BD Pharmingen, Heidelberg

Sekundärantikörper, unkonjugierte Immunglobuline und Detektionsreagenzien

Spezifität	Verdünnung	Hersteller
Ziege anti-Maus IgE HRP	1:400	Zymed, Karlsruhe
Ratte anti-Maus IgG1 HRP	1:1000	Zymed, Karlsruhe
Ratte anti-Maus IgG2b HRP	1:1000	Zymed, Karlsruhe
Ziege anti-Maus IgG2c HRP	1:5000	Southern Biotech
Ziege anti-Maus IgG3 HRP	1:2000	Serotec, Düsseldorf
Ratte anti-Maus IgM HRP	1:1000	Zymed, Karlsruhe
Ziege anti-Maus IgG HRP	1:5000	Jackson Immuno Research, Suffolk, UK

2.1.4 Material für molekularbiologische und biochemische Arbeiten**2.1.4.1 Reagenzien**

<i>Advanced Protein Assay Reagent</i>	Cytoskeleton Inc., Denver, USA
Acrylamid-Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets</i>	Roche, Grenzach-Wyhlen
ECL (<i>enhanced chemiluminescence</i>) <i>Western Blotting Detection Reagents</i>	Amersham, Buckinghamshire, UK
Hyperfilm	Amersham, Buckinghamshire, UK
Milchpulver	Nestlé, Frankfurt
Hybond-ECL-Nitrocellulose-Membran	Amersham, Buckinghamshire, UK
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	BioRAD, München
Triton X 100	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen
Whatman Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.4.2 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung	10 % APS
--------------------------------	----------

Coomassie: Entfärber	300 ml 95 % Ethanol 100 ml Eisessig 600 ml Aqua dest.
Coomassie: Färbelösung	2 g Coomassie Brilliant Blau R250 500 ml 95 % Methanol 100 ml Eisessig 400 ml Aqua dest.
Lysepuffer	150 mM NaCl 20 mM Tris 1 % Triton X 100 1 Tablette <i>Complete Protease Inhibitor</i> ad 50 ml Aqua dest
SDS-PAGE: Ladepuffer (5x)	50 mM Tris 2 % SDS 5 % Glycerin 10 % 1M DTT wenig Bromphenolblau
SDS-PAGE: Laufpuffer (10x)	250 mM Tris 2,5 M Glycin 1 % SDS
SDS-PAGE: Trenngel (12,5 %)	2,5 ml 4x Trenngelpuffer 4 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid 3,5 ml Aqua dest. 100 μ l 10 % APS 12,5 μ l Temed
SDS-PAGE: Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris 0,4 % SDS
Silberfärbung: Entwickler	15 g Na_2CO_3 250 ml Aqua dest. 12,5 μ l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 125 μ l 37 % Formaldehyd
Silberfärbung: Fixierlösung	100 ml Methanol 24 ml Eisessig 76 ml A. dest.

Silberfärbung: Imprägnierlösung	300 mg AgNO ₃ 150 ml Aqua dest. 112 µl 37 % Formaldehyd
Silberfärbung: Sensibilisierer	300 µl Na ₂ S ₂ O ₃ 200 ml Aqua dest.
Silberfärbung: Waschpuffer	50 % Ethanol
Western Blot: Anodepuffer 1	300 mM Tris pH 10,4 20 % Methanol
Western Blot: Anodepuffer 2	25 mM Tris pH 10,4 20 % Methanol
Western Blot: Blockpuffer	4 % Magermilchpulver in PBS/0,1% Tween 20
Western Blot: Kathodenpuffer	25 mM Tris pH 9,4 20 % Ethanol 40 mM ε-Aminocaprinsäure
Western Blot: Ponceau	0,5 % Ponceau 1 % Essigsäure in Aqua dest.
Western Blot: TBST	10 mM Tris pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20

2.1.5 Material für zellbiologische Arbeiten

2.1.5.1 Reagenzien

Alumhydroxid (Alum)	Sigma, Deisenhofen
Annexin V Apoptose Detektions Kit I	BD Pharmingen, Heidelberg
Carboxy-Fluoreszein-Diacetat- Succinimidyl-Ester (CFSE)	Sigma, Deisenhofen
Cell Viability Solution (7-AAD)	BD Pharmingen, Heidelberg
Cohn-II (humane IgG-Fraktion)	Sigma, Deisenhofen

Cytofix/Cytopermlösung	BD Pharmingen, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
<i>Foxp3 staining Kit</i>	eBioscience, San Diego, USA
<i>Freund's adjuvant (complete, incomplete)</i>	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	PAA, Linz, Österreich
[³ H]-Thymidin	Amersham Buckinghamshire, UK
Heparin	Braun, Melsungen
Ketavet (100 mg/ml)	Pharmacia GmbH, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS; E.coli 055:B5)	Sigma, Deisenhofen
Monensin	BD Pharmingen, Heidelberg
Rompun (2 %)	Bayer AG, Leverkusen
RPMI 1640 Medium (ohne L-Glutamin)	PAA, Linz, Österreich
Szintillationsflüssigkeit	Roth, Karlsruhe
3,3',5,5' Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma, Deisenhofen
Thioglykolat	Sigma, Deisenhofen
Triton X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

2.1.5.2 Kulturmedien, Puffer und Stammlösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser angesetzt. Für die Zellkultur wurden die Medien und Lösungen vor Gebrauch steril filtriert oder autoklaviert. Komplementfaktoren im FCS wurden durch Erhitzung auf 56 °C für 30 Minuten inaktiviert und das FCS bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

ACK-Lysepuffer	8,024 g NH ₄ Cl (0,15 M) 0,1 g KHCO ₃ (1 mM) 37,2 mg Na ₂ EDTA (0,1 mM) ad 1 l Aqua dest. pH 7,2 bis 7,4
Anästhetikum	0,25 ml Rompun 1 ml Ketavet 9 ml PBS 200 bis 300 µl wurden pro Maus i.p. injiziert

Durchflusszytometrie

FACS Puffer	2 % FCS in PBS
FACS Fix	2 % Paraformaldehyd in PBS

Enzym linked immunosorbent assay (ELISA)

Bicarbonatpuffer	0,1 M NaHCO ₃ ad 1 l Aqua dest. pH 9,6
Blockpuffer (Zytokine)	1 % BSA in PBS
Blockpuffer (Antikörper)	5 % BSA in PBS
Diluent	1 % BSA in PBS
Substrat	6 mg 3,3',5,5' TMB in 1 ml DMSO gelöst
Substratpuffer	0,1 M KH ₂ PO ₄
Stopplösung	1 M H ₂ SO ₄
Waschpuffer	0,05 % Tween 20 in PBS

PBS (phosphate buffered saline)

20x	160 g NaCl 23,2 g Na ₂ HPO ₄ 4 g KH ₂ PO ₄ 4 g KCl ad 1 l Aqua dest.
-----	--

Zellmedium

500 ml RPMI 1640
50 ml FCS
5 ml L-Glutamin (200 mM)
2,5 ml Gentamycin (10 mg/ml)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

2.2.1.1 Isolierung von RNA

Gesamt-RNA wurde mithilfe des NucleoSpin® RNA II Kits von Macherey-Nagel isoliert. Hierzu wurden 1×10^6 Pleuraexudatzellen (PleC) in ein Eppendorfgefäß überführt und durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 5000 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 350 μ l RA1-Puffer homogenisiert und anschließend bis zur Präparation bei -20 °C gelagert.

Unmittelbar nach dem Auftauen wurden 3,5 μ l β -Mercaptoethanol zum Zellysate gegeben, das anschließend auf eine NucleoSpin® Filter Unit aufgetragen und für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert wurde. Anschließend wurden 350 μ l 70 % Ethanol zu dem Durchlauf gegeben und beides durch sofortiges Auf- und Abpipettieren gut gemischt. Der Ansatz wurde auf eine NucleoSpin® RNA II Säule gegeben und zentrifugiert (30 sec, 11.000 rpm). Nach Verwerfen des Durchlaufes kam die Säule in ein 2 ml Reaktionsgefäß. Für die Entsalzung der Membranoberfläche wurden 350 μ l MDB-Puffer auf die Säule gegeben und zentrifugiert (1 min, 11.000 rpm). Für die DNase-Lösung wurden pro Ansatz 90 μ l Reaktionspuffer mit 10 μ l DNase vorsichtig vermischt. Davon wurden 95 μ l direkt in die Membranmitte pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 μ l RA2-Puffer wurde die Säule erneut zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit RA3-Puffer. Beim letzten Waschschrte wurde die Säule nach Auftragen von 250 μ l RA3-Puffer für 2 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die RNA mit 40 μ l RNase-freiem Wasser eluiert und die Säule für 1 min bei 11.000 rpm zentrifugiert. Eine Erhöhung der Ausbeute konnte durch erneutes Auftragen der RNA auf die Säule erzielt werden.

2.2.1.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration und Reinheit einer RNA-Lösung wurde photometrisch in Quarzküvetten bestimmt. Dabei lässt sich die Konzentration der RNA nach folgender Formel berechnen:

$$[\text{RNA}] = \text{OD}_{260} \times 40 \text{ mg/ml} \times \text{Verdünnung}$$

Der Formel liegt zugrunde, dass RNA-Lösung, die in einer Konzentration von 40 mg/ml vorliegt, bei einer Wellenlänge von 260 nm eine optische Dichte (OD) von eins besitzt. Bei der Bestimmung der Reinheit der Nukleinsäurelösung macht man sich zunutze, dass Nukleinsäuren und Proteine unterschiedliche Absorptionsmaxima haben.

2.2.1.3 Genexpressionsanalyse

Um die inflammatorische Immunantwort von PleC (Tag 7 p.i.) von Gzm AxB KO, Gzm A KO und WT Mäusen zu vergleichen, wurde eine Genexpressionsanalyse mithilfe des *DualChip® Mouse Inflammation Chips* von Eppendorf durchgeführt. Der Chip umfasst 233 Gene (davon 10 *housekeeping* Gene), die bei inflammatorischen Prozessen wie Infektionen oder allergischen Reaktionen involviert sind (siehe Anhang). Die Durchführung der Genexpressionsanalyse wurde vom Microarray Service Center Eppendorf vorgenommen.

Bei dem hier verwendeten Microarray wurde die RNA zuerst in cDNA umgeschrieben, wobei biotinylierte Nucleotide verwendet wurden. Dies ermöglicht den Nachweis der hybridisierten Sequenzen mit den Sonden auf dem Array mittels Gold-Silber-Markierung. Die hybridisierte, biotinylierte cDNA wird in einem ersten Schritt von einer Streptavidin-Gold-Konjugat gebunden. In einem zweiten Schritt kam es nach Zugabe einer Silberlösung zur Präzipitation von Silber auf den hybridisierten Sonden. Die Normalisierung der Proben erfolgte wie beschrieben anhand verschiedener externer Kontrollen (Dos Santos et al., 2007).

2.2.1.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit *Advanced Protein Assay Reagent* (APAR) durchgeführt. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration von *Litomosoides sigmodontis* Antigenextrakt (LsAg) wurden verschiedene Verdünnungen mit 1 x APAR hergestellt. In einer 96-Loch Mikrotiterplatte wurden 300 µl der Proteinlösung pipettiert und die Intensität der Blaufärbung im Photometer bei einer Extinktion von 570 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{570\text{nm}} \times 37,5 \times \text{Verdünnung}$$

2.2.1.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mithilfe der SDS-PAGE lassen sich Proteine anhand ihrer Größe bei der Wanderung in einem elektrischen Feld auftrennen. Voraussetzung für die Auftrennung von Proteinen ist die Denaturierung der Proteinstruktur bei gleichzeitiger Überlagerung der Ladung durch das anionische Detergenz SDS. So wandern alle Proteine aufgrund ihrer negativen Ladung in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird dabei ausschließlich vom Molekulargewicht der Proteine beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde *LsAg* durch diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt. Das System basiert darauf, dass sich Sammel- und Trenngel in ihrem Gehalt an Acrylamid und ihrem pH-Wert unterscheiden. Dadurch kommt es im Sammelgel zu einer Fokussierung der Proteine. Die Proben wurden mit 5x Beladungspuffer versetzt, 5 min bei 95 °C denaturiert und bei einer Spannung von 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.1.6 Coomassie Blau-Färbung

Das hier verwendete Coomassie Brilliant Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der an die basischen Seitenketten von Aminosäuren bindet. Dadurch können die aufgetrennten Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel direkt mit der blauen Farblösung sichtbar gemacht werden. Hierfür wird das Gel für 1 h in die Coomassielösung gelegt. Die Lösung enthält Essigsäure, die gleichzeitig eine Fixierung der Proteine im Gel bewirkt. Eine Entfärbung der Gele erfolgte bei Raumtemperatur in Coomassie-Entfärber.

2.2.1.7 Silberfärbung

Eine sensitivere Methode als die Coomassie-Färbung ist die Silberfärbung, welche auf der Komplexierung von Silberionen mit Carboxyl- und Sulfhydrylgruppen aufgetrennter Proteine basiert.

Die Gele wurden dabei zunächst für 1 h fixiert und dann zweimal 20 min in Waschpuffer gewaschen. Es folgte 1 min Inkubation im Sensibilisierungspuffer. Nach Spülen in Aqua dest. wurden die Gele für 20 min in Silbernitratlösung imprägniert und anschließend erneut in Aqua dest. gespült. Die Gele wurden dann für 1 bis maximal 10 min in Entwicklerlösung inkubiert. Die Färbung der Proteinbanden wurde bei Erreichen der gewünschten Bandenintensität durch kurzes Spülen in Aqua dest. und durch Überführung in Fixierlösung abgestoppt. Die Gele wurden dann zwischen Cellophanfolien getrocknet.

2.2.1.8 Western Blot

Beim Western Blot werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine von einem SDS-Polyacrylamidgel in einem elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und immobilisiert. Die gesuchten Proteine können anschließend mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit diente der Western Blot der Identifizierung von Gzm B in Zell-Lysaten bzw. LsAg. Hierzu wurde das Semi-Dry-Verfahren genutzt. Dabei wurden auf die Kathodenplatte der Blot-Kammer drei in Kathodenpuffer äquilibrierte Filterpapiere gelegt. Auf diese wurden das Gel sowie die Nitrocellulosemembran gegeben. Abschließend kamen zwei in Anodenpuffer 1 und 2 äquilibrierte Filterpapiere auf die Nitrocellulosemembran und die Kammer wurde mit der Anodenplatte verschlossen. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei einer Stromdichte von 1 mA/cm^2 Gel. Um den Transfer der aufgetrennten Proteine zu überprüfen, wurde die Membran für 1 min in 0,5 % Ponceaulösung gelegt und anschließen mit Aqua dest. entfärbt. Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran anschließend für 1 h in 4 % Milchpulver (MP) in TBST gelegt. Für die Detektion von Gzm B wurde der Ziege anti-Maus Gzm B Antikörper 1:2000 in 2 % MP in TBST verdünnt und für 1 h bei Raumtemperatur mit dem Blot auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran gründlich mit TBST (dreimal 10 min) gewaschen. Die Bindung des anti-Gzm B Antikörpers wurde mithilfe eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (anti-Ziege) nachgewiesen, der 1:2000 verdünnt für 1 h auf die Membran gegeben wurde. Abschließend wurde der Blot viermal gewaschen und dann die spezifischen Proteinbanden mithilfe des ECL-Reagenz nachgewiesen. Die beiden Detektionslösungen des Kits wurden hierfür in einem Verhältnis 1:1 vermischt und der Blot für 10 min in der ECL-Lösung inkubiert. Anschließend ließ man die Flüssigkeit vorsichtig abtropfen. Die Membran wurde auf einen Röntgenfilm gelegt, der nach einer Expositionsdauer von 30 sek bis 10 min entwickelt wurde.

2.2.2 Versuchstiere, Zucht und Haltung

2.2.2.1 Mausstämme

C57BL/6J = WT	UKE, Hamburg; MPI, Freiburg; BNI, Hamburg
Gzm A KO	Gzm A defiziente Mäuse wurden durch Deletion des vierten Exons im Gzm A Gen auf dem Hintergrund der C57BL/6 Maus generiert (Ebnet et al., 1995) Prof. MM Simon, MPI, Freiburg
Gzm B KO	Gzm B defiziente Mäuse wurden durch Deletion des ersten Exons des Gzm B Gens auf dem Hintergrund der C57BL/6 Maus generiert (Heusel et al., 1994) Prof. MM Simon, MPI, Freiburg
Gzm AxB KO	Gzm A und B defiziente Mäuse wurden durch Kreuzung von Gzm A KO und Gzm B KO Mäusen generiert. Durch Kreuzung der heterozygoten F1-Generation entstanden Mäuse, die weder Gzm A noch Gzm B exprimieren (Simon et al., 1997). Prof. MM Simon, MPI, Freiburg

Die Expression von Gzm A und B in Milzzellen der Mauslinien wurde durchflusszytometrisch kontrolliert (Abb. 2.1).

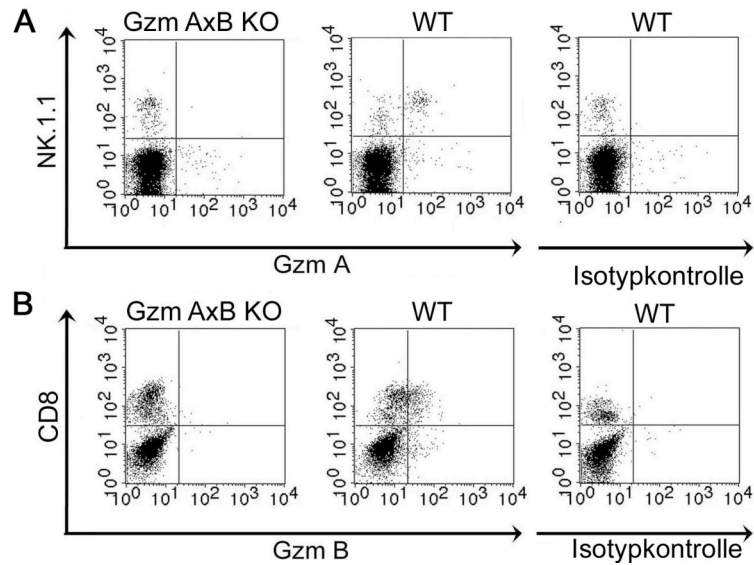


Abb. 2.1: Gzm AxB KO Mäuse sind auf Proteinebene negativ für Gzm A und B. Die Expression von Gzm A und B wurde in allen in dieser Arbeit verwendeten Mäusen mittels Durchflusszytometrie überprüft. Dargestellt ist je ein repräsentatives Beispiel für eine Gzm AxB KO und eine WT Maus. Zur Kontrolle wurden WT Milzzellen mit dem entsprechenden Isotyp Antikörper gefärbt. **A)** Gzm A wird nicht von Gzm AxB KO Milzzellen exprimiert, während Gzm A konstitutiv von NK1.1⁺ WT Milzzellen exprimiert wird. **B)** Gzm B wird in CD8⁺ WT T-Zellen nach 72 h Stimulation mit Con A exprimiert. Gzm AxB defiziente Milzzellen sind negativ für Gzm B.

2.2.2.2 Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*)

Baumwollratten dienen für die Zucht und Erhaltung von *L. sigmodontis* als End- und Zwischenwirte. Die Zucht der Baumwollratten erfolgte im Tierhaus des Bernhard-Nocht-Institutes für Tropenmedizin. Für die Infektion der Milben wurde Baumwollratten eingesetzt, die mindestens eine Mikrofilariämie von 600 bis 1500 Mikrofilarien pro μ l Blut hatten.

2.2.2.3 Milben (*Ornithonyssus bacoti*)

Als Vektor dienen die Milben *Ornithonyssus bacoti*. Diese wurden in einer Kunststoffwanne mit Holzeinstreu bei einer Lufttemperatur von 29 °C und einer relativen Luftfeuchte von 90 % gehalten. Die Fütterung der Milben erfolgte durch eine Blutmahlzeit an 1-4 Tage alten NMRI Mäusen.

2.2.2.4 Infektion mit *Litomosoides sigmodontis*

Für die Infektion wurden Milben in einen Glaskolben überführt. Nach 4 Tagen ohne Blutmahlzeit wurde eine infizierte Baumwollratte auf die Milben gesetzt. Dabei kam es mit dem Blut der Baumwollratte zur Übertragung von Mikrofilarien (L1, MF) auf die Milbe. Innerhalb von 12 bis 14 Tagen entwickelte sich dann in der Milbe das infektiöse dritte Larvenstadium. Die Infektion der Mäuse erfolgte durch eine vierstündige Blutmahlzeit der Milben an den Mäusen. Um eine möglichst homogene Infektionsdosis innerhalb der Gruppen zu erzielen, wurden die Mäuse der zu vergleichenden Gruppen gemischt und stets nur Mäuse aus einem Stutzen miteinander verglichen.

2.2.2.5 Gewinnung von Plasma

Während der Infektion oder Immunisierung der Mäuse erfolgte die Entnahme von Blut durch Punktur der Schwanzvene. Zum Zeitpunkt der Tötung wurde narkotisierten Mäusen mit einer Mikrohämatokrit-Kapillare Blut retroorbital entnommen. Das Blut wurde zu Gewinnung von Plasma in EDTA-Röhrchen aufgefangen.

2.2.2.6 Bestimmung der Wurmlast in der Pleurahöhle

Für die Bestimmung der Wurmlast wurde die Pleurahöhle infizierter Mäuse mit 10 ml PBS gespült. Die Spüllösung, die neben den Würmern auch Exudatzellen enthielt, wurde in 15ml-Falcon-Röhrchen auf Eis überführt. Dies verlangsamt zum einen die Beweglichkeit der Würmer und gewährleistet die Viabilität der Zellen. An Tag 9 p.i. befanden sich die Würmer im L3 Stadium und waren dadurch mit bloßem Auge nicht erkennbar. Daher wurde das Pleuraexudat durch Zentrifugation (8 min, 1300 rpm) sedimentiert und die Zellen in 1 ml Vollmedium aufgenommen. 200 μ l der Lösung wurden in die Vertiefungen einer 96-Loch Zellkulturplatte überführt und anschließend die Anzahl der Würmer unter dem Mikroskop bestimmt. An späteren Zeitpunkten (Tag 22 bis Tag 35 p.i.) wurde die Anzahl der Würmer makroskopisch in einer Petrischale bestimmt.

2.2.2.7 Bestimmung der Wurmlänge

Für die Bestimmung der Wurmlänge wurden die Würmer bei 4 °C gelagert, bis sich die Bewegung der Würmer verlangsamte und diese sich in einem ausgestreckten Zustand befanden. Eine Fixierung der Würmer erfolgte mit 60 °C heißem 70 %igem Ethanol.

2.2.2.8 Immunisierungen mit OVA

In verschiedenen Immunisierungsversuchen diente OVA als Modellantigen. Zur Verstärkung der Immunantwort gegen das Antigen wurde den Mäusen OVA in Anwesenheit von Freund's Adjuvans oder Alum verabreicht. Für die Immunisierung mit Freund's Adjuvans wurde zuerst eine Immunisierung mit komplettem Freund's Adjuvans durchgeführt. 1 mg/ml OVA wurde dazu im Verhältnis 1:2 mit Freund's Adjuvans versetzt und den Mäusen 200 μ l i.p. verabreicht. Nach 2 bzw. 4 Wochen erfolgte eine weitere Immunisierung mit OVA in inkomplettem Freund's Adjuvans. Für die Immunisierung mit Alum wurde eine Primär- gefolgt von einer Sekundärimmunisierung vorgenommen. Pro Maus wurden 10 μ g OVA in 2 mg Alum i.p. im Abstand von 14 Tagen injiziert. Die Entnahme der Milz erfolgte jeweils 14 Tage nach der letzten Immunisierung.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Allgemeine Bedingungen der Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Reinluft-Werkbank durchgeführt. Dabei verwendete Lösungen und Labormaterialien wurden vor Gebrauch autoklaviert. Sterile Einmalkunststoffwaren wurden nach einmaligem Gebrauch entsorgt. Die Kultur der Zellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Zellen wurden mit Trypanblau versetzt und die Anzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Differenzierung von lebenden und toten Zellen basiert auf der selektiven Anfärbung toter Zellen durch Trypanblau.

2.2.3.3 Präparation von Pleuraexudatzellen (PleC, *pleural exudate cells*)

Durch Filtration wurden an Tag 7 bis Tag 9 p.i. gewonnene PleC von Würmern getrennt. Würmer und Granulome (Tag 22 bis Tag 35 p.i.) wurden mit einer Pinzette aus dem Pleuraexudat entfernt. Bei Bedarf wurden in einem zusätzlichen Schritt Erythrozyten durch ACK-Lysepuffer eliminiert.

2.2.3.4 Präparation von murinen Milzzellen

Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen herauspräpariert und in 5 ml PBS in einer Petrischale mit dem Stempel einer 10 ml-Einmalspritze zerrieben. Die Zellsuspension wurde über ein Zellsieb (*Cell Strainer*) gegeben und die Zellen bei 1300 rpm abzentrifugiert. Die Entfernung von Erythrozyten erfolgte durch zweiminütige Inkubation mit 5 ml ACK-Lysepuffer. Nach der Lyse folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS.

2.2.3.5 Präparation von murinen Peritonealexudatzellen

Um Peritonealexudatzellen zu erhalten, wurde Mäusen 1,5 ml 4 % Thioglykolatlösung i.p. appliziert. Dies hat eine gesteigerte Einwanderung von Makrophagen, Neutrophilen und B1 Zellen zur Folge. Für die Isolierung der Zellen wurde nach 7 Tagen 5 ml kaltes PBS in das Peritoneum injiziert und anschließend die angereicherte Zelllösung mithilfe einer 23 G Kanüle abgezogen. Nach Wiederholung des Vorganges wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert.

2.2.3.6 Herstellung von LsAg

Für die Herstellung von *LsAg* wurden vitale, adulte weibliche aus der BALB/c Maus gewonnene Würmer verwendet. Die Würmer wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in sterilem PBS mit einem Homogenisator zerkleinert. Das Homogenisat wurde 30 min bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand (=LsAg) mit einem sterilen 0,22 µm Filter filtriert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit *Advanced Protein Assay* Reagenz (siehe 2.2.1.4). Für weitere Untersuchungen wurde LsAg auf 100 µg/ml eingestellt und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.7 *In vitro* Stimulation von Milzzellen und PleC

Alle Stimulationsexperimente wurden in einer Rundboden Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen mit einem Endvolumen von 200 μ l durchgeführt. Für die durchflusszytometrische Bestimmung von intrazellulärem IFN- γ , IL-2 und IL-5 wurden 1×10^6 Zellen für 6 h mit PMA und Ionomycin inkubiert. Um ein Ausschleusen neu gebildeter Zytokine zu inhibieren, wurde 1 μ l Monensin für die letzten 4 h pro Vertiefung zu den Zellen hinzugegeben. Die Detektion von Gzm A und B mittels Durchflusszytometrie erfolgte nach 72 h Stimulation mit Con A, LPS oder anti-BZR in Anwesenheit von IL-4. Für die Analyse von sezernierten Zytokinen wurden 1×10^6 Milzzellen oder 5×10^5 PleC für 72 h stimuliert und dann die Überstände abgenommen. Die Stimuli wurden in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

- 1 μ g/ml anti-BZR (=Anti-Ig, κ)
- 10 ng/ml anti-CD3
- 2 μ g/ml Con A
- 25 ng/ml IL-4
- 500 ng/ml Ionomycin
- 10 μ g/ml LPS
- 12,5 μ g/ml LsAg
- 100 μ g/ml OVA
- 10 ng/ml PMA

2.2.3.8 Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA

Die Bestimmung von Zytokinen in den Überständen von Milzzellen und PleC wurde mithilfe eines Sandwich ELISAs durchgeführt. Für die Beschichtung der 96-Loch ELISA Platten wurden 50 μ l des entsprechenden *Capture*-Antikörpers, der in Bicarbonatpuffer verdünnt wurde, in die Platte gegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Durch dreimaliges Waschen mit 0,05 % Tween 20 in PBS wurde ungebundener Antikörper am folgenden Tag entfernt. Freie Bindungsstellen an der Oberfläche der ELISA-Platte wurden anschließend durch zweistündige Inkubation mit 150 μ l Blockpuffer (1 % BSA in PBS) bei 37 °C blockiert. Der Zytokinstandard wurde mit 0,1 % BSA in PBS verdünnt und dann zusammen mit den unverdünnten Zellüberständen in die Vertiefungen der ELISA-Platte pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C wurde ungebundenes Antigen

durch Waschen entfernt. Die Detektion der Zytokine erfolgt durch Zugabe von 50 μl des entsprechenden biotinkonjugierten Antikörpers (1 h bei 37 °C). Nach Waschen der Platten folgte eine Inkubation mit 50 μl Streptavidin-Peroxidase-Komplex (1:200 verdünnt) für 1 h bei 37 °C. Nach erneutem Waschen wurden 100 μl TMB-Substratlösung in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Sobald sich eine ausreichende Färbung der Standardreihe einstellte, wurde die Farbentwicklung durch Zugabe von 50 μl 1 M H_2SO_4 gestoppt. Die ELISA-Platten wurden bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch ausgewertet und die Zytokinkonzentrationen mithilfe der Standardreihe berechnet.

2.2.3.9 Detektion von Immunglobulinen mittels ELISA

Für die Detektion antigenspezifischer Immunglobuline wurden ELISA-Platten über Nacht mit 4 $\mu\text{g/ml}$ LsAg oder 1 $\mu\text{g/ml}$ OVA in Bicarbonatpuffer inkubiert. Ungebundenes Antigen wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und anschließend freie Bindungsstellen durch Zugabe von 150 μl 5 % BSA in PBS für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Nach erneutem Waschen wurden 50 μl der in 1 % BSA in PBS verdünnten Plasmen aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die für den jeweiligen Isotypen verwendete Plasmaverdünnung ist in Tabelle 2.1 beschrieben. Die Bestimmung des IgG1- und IgM-Titers erfolgte darüber hinaus nach serieller Verdünnung der Plasmen.

Isotyp	Verdünnung
IgG1	1:300*
IgG2b	1:300
IgG2c	1:300
IgG3	1:500
IgE	1:500
IgM	1:1000*

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmaverdünnungen

Die Tabelle zeigt die Verdünnung der Plasmen für die jeweiligen Immunglobulin-Isotypen.

* Zusätzlich wurde der Titer der Isotypen durch serielle Verdünnung der Plasmen ermittelt.

Zur Detektion gebundener Antikörper wurden 50 μl des peroxidasegekoppelten Sekundär-Antikörpers in die Vertiefungen der gewaschenen Platten pipettiert. Nach 45 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen und dann 50 μl

der TMB-Substratlösung in die einzelnen Vertiefungen gegeben. Der Farbumschlag der Substratlösung wurde dabei genau beobachtet und die Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 1 M H_2SO_4 abgestoppt. Die photometrische Messung der Platten erfolgte unmittelbar im Anschluss bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Menge an antigenspezifischen Immunglobulinen wurde nach Abzug des Mediumwertes als relative ELISA Unit dargestellt oder im Fall von IgG1 und IgM als Titer. Der Titer stellt die Verdünnungsstufe dar, bei der der Wert der Probe dem doppelten Negativwert (Mediumwert) entspricht.

2.2.3.10 Messung der Zellproliferation

Das wichtigste Verfahren zur Detektion der Proliferation von Zellen ist die Markierung mit [3H]-Thymidin. Das radioaktive Nukleosid Thymidin wird während der Zellteilung in DNA-Stränge eingebaut. Somit entspricht die gemessene Radioaktivität eines Kulturansatzes der jeweiligen Proliferationsrate.

Hierzu wurden 4×10^5 Milzzellen oder PleC in die Vertiefung einer 96-Loch Mikrotiterplatte gegeben und mit verschiedenen Stimuli inkubiert (siehe 2.2.3.7). Nach 72 h in Kultur wurden 100 μ l Überstand abgenommen und 0,5 μ Ci [3H]-Thymidin zugesetzt und für weitere 24 h inkubiert. Für die Messung der Radioaktivität wurden die Zellen mit einem Zellerntegerät auf einen Glasfaserfilter übertragen. Die getrockneten Filter wurden mit Szintillationsflüssigkeit getränkt und in eine Folie eingeschweißt. Die eingebaute Radioaktivität wurde mithilfe eines β -Counters bestimmt und als „Zerfälle pro Minute“ (*counts per minute*, cpm) angegeben.

2.2.3.11 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren zur Charakterisierung von Zellen anhand Größe und Granularität dar. Weiterhin dient sie der Detektion von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung werden die zu untersuchenden Zellen angesaugt und in Einzelzellsuspension gebracht. Diese passieren dann perlenschnurartig einen Argonlaserstrahl. Das daraus resultierende Streulicht wird von Fotomultiplikatoren aufgefangen. Dabei unterscheidet man das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*, SSC), welches ein Maß für die Granularität der Zellen darstellt, und das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches mit der Größe der Zellen korreliert. Zusätzlich können nach Markierung mit fluoreszenzgekoppelten

Antikörpern Zellen anhand ihres unterschiedlichen Repertoires an Oberflächenmolekülen oder in der Zelle lokalisierten Proteinen voneinander unterschieden werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden entweder durch den Argon-Ionen-Laser bei 488 nm oder dem Dioden-Laser mit einer Wellenlänge von 635 nm angeregt. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mithilfe des Programmes *Cell Quest Pro*.

2.2.3.11.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Die einzelnen Arbeitsschritte wurden alle bei 4 °C durchgeführt. Für die Färbung von Oberflächenmolekülen wurden 2×10^5 bis 1×10^6 Zellen in FACS Röhrchen überführt und pelletiert (1300 rpm, 5 min, 4 °C). F_c-Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurden durch Zugabe von 10 µl anti-CD16/CD32 Antikörper (Klon 2.4G2) oder 20 µl Cohn-II für 20 min blockiert. Für die Detektion verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen in PleC und Milzzellen wurden die Antikörper, wie in Abschnitt 2.1.3 beschrieben, eingesetzt. Die Zellen wurden mit 50 µl der entsprechend verdünnten Antikörper für 30 min inkubiert und anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Die Detektion der biotinylierten Antikörper gegen αβ TZR oder F4/80 erfolgt in einem weiteren Schritt über Streptavidin-PerCP. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in Fixierungslösung aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.3.11.2 Färbung von intrazellulären Proteinen

Für die intrazelluläre Färbung von Zytokinen und Granzymen wurden die Zellen nach der Oberflächenfärbung 20 min mit 100 µl *Cytofix/Cytoperm* Lösung (BD Pharmingen) fixiert und permeabilisiert und anschließend zweimal mit 1 ml *Perm/Wash* Lösung (BD Pharmingen) gewaschen. Diese sowie alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Antikörper gegen IFN-γ, IL-2, IL-5 sowie Gzm A und B wurden wie beschrieben in *Perm/Wash* Lösung verdünnt und 50 µl zu den Zellen gegeben. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen und für die Analyse in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Für die Detektion von Foxp3⁺ Zellen wurde das *Foxp3 Staining Kit* (eBioscience) verwendet. Für Fixierung und Permeabilisierung wurden die Zellen in 500 µl Fixierungs/Permeabilisierungslösung (eBioscience) aufgenommen. Die Zellen wurden zwischen 30 min und 12 h bei 4 °C fixiert und anschließend zweimal mit je 1 ml Permeabilisierungslösung (eBioscience) gewaschen. Die Blockade unspezifischer

Antikörperbindung erfolgte durch Zugabe von 80 μ l 2 %igem Rattenserum in Permeabilisierungspuffer. Nach 20 min Inkubation bei 4 °C wurden 1,5 μ l anti-Foxp3 zu den Zellen gegeben. Bei gleichzeitiger Färbung mit einem anti-Gzm Antikörper wurden 4 μ l anti-Gzm A bzw. 1 μ l anti-Gzm B zu den Zellen pipettiert. Die gefärbten Zellen wurden zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und für die Messung in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen.

2.2.3.11.3 Markierung von Zellen mit CFSE

Die Färbung von Zellen mit CFSE ermöglicht die Analyse der Proliferation auf zellulärer Ebene. Der Farbstoff CFSE bindet kovalent an Aminogruppen zytoplasmatischer Proteine und wird bei einer Zellteilung an beide Tochterzellen zu gleichen Teilen weitergegeben. Eine Halbierung der Fluoreszenzintensität korreliert mit einem durchlaufenen Teilungszyklus. Für die Färbung wurden Milzzellen in 3 % FCS in PBS aufgenommen. 1×10^6 Zellen wurden in 10 ml Puffer in ein 50 ml Falcon Röhrchen überführt und 200 μ l CFSE (1:100 verdünnt in PBS) hinzugegeben. Nach 10 min bei 37 °C wurde die Färbung durch Zugabe von 40 ml 3 % FCS in PBS gestoppt. Die CFSE-gefärbten Zellen wurden anschließend noch zweimal mit 3 % FCS in PBS gewaschen. Die Inkorporation von CFSE wurde im Durchflusszytometer überprüft.

2.2.3.11.4 Bestimmung des Anteils toter und apoptotischer Zellen

Für die Ermittlung apoptotischer und toter Lymphozyten wurde das *Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen) und 7-Amino-actinomycin D (Via Probe™ von BD Pharmingen) verwendet. Ein sehr frühes Charakteristikum von Apoptose ist der Verlust der Membranintegrität. Dabei kommt es zur Translokation von Phosphatidylserin (PS) an die Außenseite der Plasmamembran. Bei Annexin V handelt es sich um ein 35-36 kDa großes Protein mit einer großen Affinität zu PS. Die Kopplung von Annexin an Fluorochrome ermöglicht den Nachweis apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie. Durch gleichzeitige Färbung mit Propidium Iodid (PI) kann zwischen früh apoptotischen und spät apoptotischen oder bereits toten Zellen differenziert werden. PI und 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) sind fluoreszierende Stoffe, die in die DNA sterbender oder bereits toter Zellen interkalieren.

2.2.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde GraphPad Prism 4.0 verwendet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mithilfe des ungepaarten Student's t-Test.

3 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Gzm A und B im Mausmodell der Filarieninfektion untersucht werden. Die Expression von Gzm A und/oder B wurde für eine Vielzahl von Zellen wie NK-Zellen und CD4⁺ T-Zellen beschrieben, deren Relevanz für das Modell der Nagerfilarie *L. sigmodontis* bereits nachgewiesen wurde. Kürzlich konnte in unserer Gruppe gezeigt werden, dass in Knoten von *O. volvulus* infizierten Patienten eine ausgeprägte Gzm-Expression nachweisbar ist (Korten et al., 2008). Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Expression von Gzm A und B einen Einfluss auf den Verlauf der Infektion mit *L. sigmodontis* hat. Für die Analysen standen Gzm A und B defiziente Mäuse (Gzm AxB KO) sowie die entsprechenden Einzel-KO Mäuse (Gzm A KO, Gzm B KO) zu Verfügung, welche auf dem Hintergrund der resistenten C57BL/6 (WT) Maus generiert wurden. Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung der Immunantwort von Gzm AxB KO und WT Mäusen sowie der Expression von Gzm A und B durch Lymphozyten der Milz. Im zweiten Teil der Arbeit ist der Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung des Nematoden *L. sigmodontis* und auf die Immunantwort gegen verschiedene Würmerstadien beschrieben.

3.1 Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung und Funktionalität von Zellen

3.1.1 Expression von Gzm A und B in Zellpopulationen der Milz

Bisherige Ergebnisse belegen eine konstitutive Expression von Gzm A in NK-Zellen, wohingegen Gzm B erst nach einer Stimulation von drei bis fünf Tagen in NK-Zellen und CTL nachweisbar ist (Fehniger et al., 2007). Für die Untersuchung der Gzm A- und B-Expression wurden Milzzellen naiver WT Mäuse 72 h mit Con A stimuliert und anschließend durchflusszytometrisch untersucht. In Abbildung 3.1 ist ein repräsentatives Beispiel der Analyse unter Verwendung lymphozytenspezifischer Oberflächenmarker gezeigt. Lymphozyten wurden in dieser Arbeit wie folgt definiert: B-Lymphozyten, als Hauptpopulation in der Milz, wurden über die Expression des B-Zell-Korezeptors CD19 und dem Fehlen des T-Zell-Korezeptors CD3 auf ihrer Oberfläche definiert. Bei T-Zellen wurde zwischen CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺CD3⁺) und CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺CD3⁺)

unterschieden. NK-Zellen zeichnen sich durch die Expression von NK-Zell-Markern wie DX5 oder NK1.1 bei gleichzeitigem Fehlen von CD3 auf ihrer Oberfläche aus.

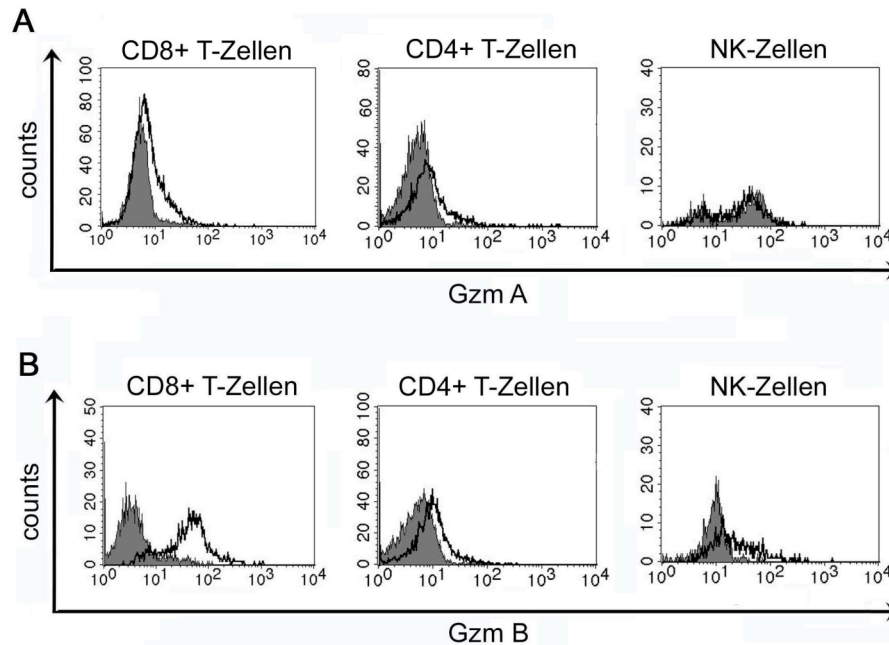


Abb. 3.1: Expression von Gzm A und B in naiven WT Milzzellen nach Stimulation mit Con A. Milzzellen (1×10^6) von naiven C57BL/6 Mäusen wurden für 72 h mit dem Mitogen Con A stimuliert. Die Expression von Gzm A (**A**) und B (**B**) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensitäten der Gzm-Expression in Medium (graue Fläche) gegen Con A (schwarze Linie) in CD8⁺ T-Zellen, CD4⁺ T-Zellen und NK-Zellen. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel von vier unabhängigen Versuchen.

Gzm A wurde konstitutiv von 60 bis 70 % der NK-Zellen in der Milz exprimiert. Die Behandlung mit Con A führte nicht zu einer Steigerung der Gzm A-Expression in NK-Zellen. Gzm A konnte zusätzlich nach Stimulation mit Con A in ca. 30 % der CD8⁺ T-Zellen und in maximal 10 % der CD4⁺ T-Zellen gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde Gzm B erst nach Stimulation mit Con A in ca. 90 % der CD8⁺ T-Zellen und 30 % der NK-Zellen nachgewiesen. Eine Expression von Gzm B war nur in 10 % der CD4⁺ T-Zellen messbar. Die Ergebnisse bestätigen, dass Gzm A konstitutiv von NK-Zellen und von aktivierten CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird, während Gzm B ausschließlich in aktivierten NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird.

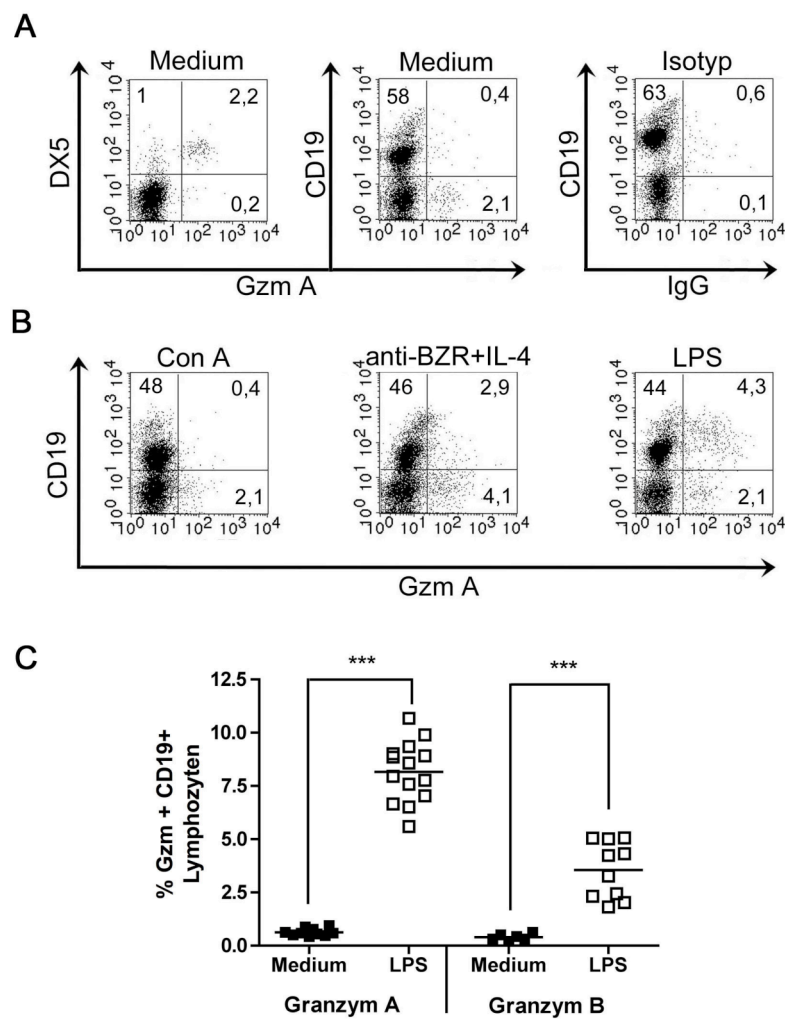


Abb. 3.2: LPS-stimulierte Milzzellen exprimieren Gzm A und B. In drei unabhängigen Versuchen wurde die Expression von Gzm A in Milzzellen (1×10^6), auf der x-Achse gekennzeichnet, intrazellulär im Durchflusszytometer bestimmt. **A)** Expression von Gzm A in $DX5^+$ NK-Zellen (auf $CD3^-$ Zellen eingestellt) und $CD19^+$ B-Zellen nach Inkubation der Zellen in Medium. Kontrollzellen wurden mit dem entsprechenden Isotyp-Antikörper gefärbt. In Abbildung **B)** ist die Expression von Gzm A gegen die CD19 Expression nach Inkubation von Milzzellen für 72 h mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A, $10 \mu\text{g/ml}$ LPS oder $1 \mu\text{g/ml}$ anti-BZR in Anwesenheit von 25 ng/ml IL-4 zu sehen. Die Zahlen in den Quadranten geben den Prozentsatz positiver Zellen an. **C)** Dargestellt ist der Anteil B-Zellen, die nach Inkubation mit Medium oder LPS positiv für Gzm A oder B waren. Jeder Punkt repräsentiert die Gzm-Expression einer individuellen WT Maus. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (***) $p < 0,001$.

Um die Expression von Gzm A und B auch in murinen B-Zellen zu untersuchen, wurden Milzzellen B-Zellspezifisch mit einem anti-BZR Antikörper oder mit dem TLR4-Liganden LPS stimuliert. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem T-Zellspezifischen Mitogen Con A inkubiert. Anschließend wurde die intrazelluläre Expression von Gzm A und B im Durchflusszytometer ermittelt. Abb. 3.2A zeigt, dass unstimulierte B-Zellen kein Gzm A

exprimieren, während knapp 70 % der NK-Zellen positiv für Gzm A waren. Die Stimulation der Milzzellen mit LPS führte hingegen zu einer Hochregulation von Gzm A in den CD19⁺ B-Zellen (Abb. 3.2B). Durch anti-BZR in Gegenwart von IL-4 kam es zu einer geringen Induktion von Gzm A in B-Zellen, wohingegen der T-Zellstimulus Con A keinen Einfluss auf die Gzm-Expression in B-Zellen hatte. Abb. 3.2C zeigt die statistische Auswertung der Gzm A- und B-Expression in B-Zellen nach Stimulation mit LPS: 8 % der B-Zellen waren positiv für Gzm A und 3,5 % für Gzm B. Diese Ergebnisse zeigen erstmals die Expression von Gzm B und insbesondere von Gzm A in aktivierten murinen B-Zellen.

3.1.2 Analyse der Immunantwort von naiven und OVA-immunisierten Gzm AxB KO und WT Mäusen

3.1.2.1 Analyse der Zytokinantwort

Um zu analysieren, ob die Defizienz von Gzm A und B die zelluläre Immunantwort beeinträchtigt, wurde die Zytokinsynthese von Milzzellen untersucht. Milzzellen wurden für 72 h mit dem Mitogen Con A stimuliert, und anschließend im ELISA die Konzentrationen von IL-4, IL-10, IL-2 und IFN- γ in den Überständen der Zellen bestimmt.

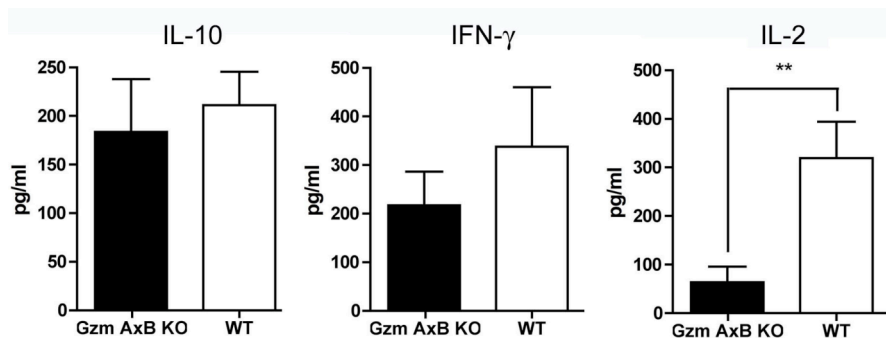


Abb. 3.3: Verminderte Sekretion von IL-2 in naiven Gzm AxB defizienten Milzzellen nach Stimulation mit Con A. 5×10^5 Milzzellen wurden mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A stimuliert. Nach 72 h wurde die Menge an sezerniertem IL-10, IFN- γ und IL-2 mittels ELISA in den Überständen der stimulierten Milzzellen quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen ($n=13$ Gzm AxB KO, $n=12$ WT). Die Konzentration des jeweiligen Zytokins ist in pg/ml an der y-Achse angegeben. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (** $p < 0,01$).

Da Milzzellen in Anwesenheit von Medium keine Zytokine sezernieren, sind in Abb. 3.3 nur die Zytokinkonzentrationen in den Überständen Con A-stimulierter Zellen zu sehen.

Das T_H2-spezifische Zytokin IL-4 lag in den Überständen beider Mauslinien unterhalb der Nachweisgrenze. Milzzellen von Gzm AxB KO und WT Mäusen produzierten vergleichbar viel IL-10 (Abb. 3.3). Das T_H1-spezifische Zytokin IFN- γ lag tendenziell vermindert in den Überständen der Gzm AxB KO Mäuse vor. Gleichzeitig konnte eine verminderte Sekretion von IL-2 in den Überständen der Gzm AxB defizienten Milzzellen gemessen werden. WT Milzzellen sezernierten 318 ± 75 pg/ml IL-2, während Gzm AxB defiziente Milzzellen nur $63,6 \pm 32$ pg/ml IL-2 produzierten.

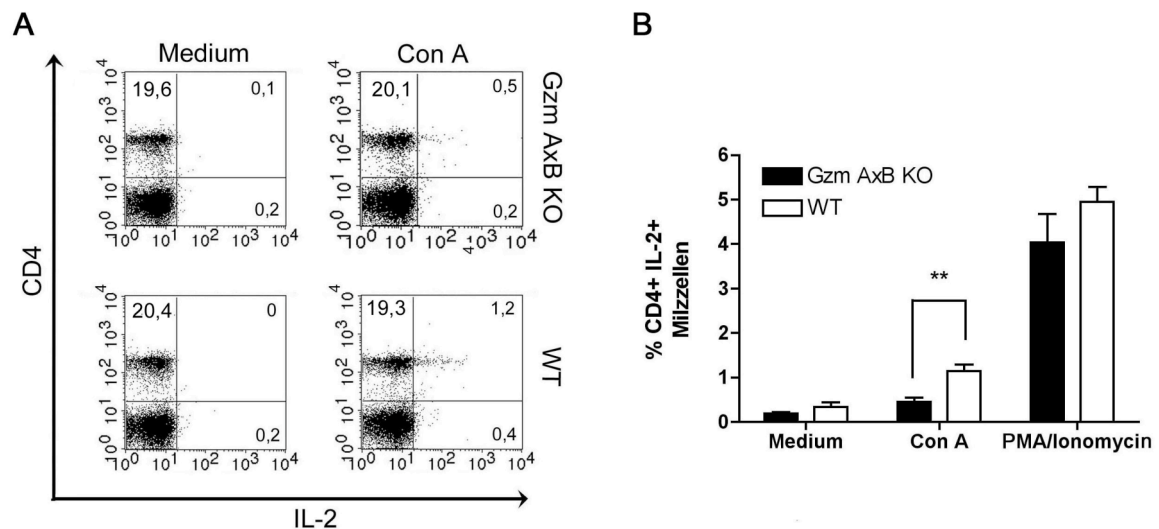


Abb. 3.4: Gzm AxB defiziente CD4⁺ T-Zellen exprimieren nach Stimulation mit Con A weniger IL-2 als WT T-Zellen. 1×10^6 Milzzellen wurden für 6 h (4 h in Anwesenheit von Monensin) mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A oder 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Der Anteil CD4⁺IL-2⁺ T-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt (eingestellt auf CD3⁺ Zellen). **A**) Ein repräsentatives Beispiel von zwei unabhängigen Versuchen ist dargestellt. Die Zahlen in den Quadranten geben den Prozentsatz positiver Zellen an. **B**) Die Auswertung des Anteils IL-2 produzierender CD4⁺ T-Zellen ($n=9$ Gzm AxB KO, $n=11$ WT) ist als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (** $p < 0,01$).

Nach diesem Ergebnis sollte untersucht werden, welche Lymphozyten zu der verminderten IL-2-Synthese der Gzm AxB defizienten Milzzellen führen. Das proinflammatorische Zytokin IL-2 wird laut Literatur von CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen sowie von NK-Zellen, NKT-Zellen und DCs exprimiert (Malek, 2008). In Abb. 3.4A ist eine repräsentative Färbung von Milzzellen nach Inkubation mit Medium und Con A dargestellt. Im Unterschied zum vorherigen Versuch wurden die Zellen jedoch nur 6 h anstelle von 72 h stimuliert, und anschließend die auf den Stimulus synthetisierte Menge an IL-2 intrazellulär in den Zellen nachgewiesen. Die Zugabe von Monensin verhindert dabei das

Ausschleusen neu gebildeter Proteine aus der Zelle. CD4⁺ T-Zellen wurden nach Stimulation mit Con A als die Hauptproduzenten von IL-2 identifiziert (Abb. 3.4A). Der Anteil CD4⁺IL-2⁺ war nach Stimulation mit Con A in den Gzm AxB KO defizienten Milzzellen im Vergleich zu WT Milzzellen signifikant vermindert (Abb. 3.4B). Durch Stimulation mit PMA/Ionomycin stieg der Anteil IL-2⁺ Lymphozyten in Milzzellen der Gzm AxB KO und WT Mäuse auf 4 - 5 % (Abb. 3.4B).

Für eine weitere Quantifizierung der Zytokinantwort wurden Milzzellen von OVA-immunisierten Mäusen verwendet. Bei der Verabreichung von OVA zusammen mit Freund's Adjuvans wird eine T_H1-spezifische Zytokinantwort in den Mäusen induziert. Abb. 3.5A zeigt die Konzentrationen der T_H1-Zytokine IFN- γ und IL-2 in den Überständen von Con A- und OVA-stimulierten Milzzellen. In den Überständen Con A-stimulierter Gzm AxB KO Milzzellen lag IFN- γ (1181 \pm 367 pg/ml) im Vergleich zu WT Milzzellen (1907 \pm 234 pg/ml) tendenziell erniedrigt vor. Gzm AxB defiziente Milzzellen zeigten nach Immunisierung mit OVA/Freund's Adjuvant wie bereits die naiven Mäuse nach Stimulation mit Con A eine Verminderung der IL-2-Sekretion. Die antigenspezifische Zytokinantwort war dagegen in beiden Mäusen sehr gering und nicht unterschiedlich.

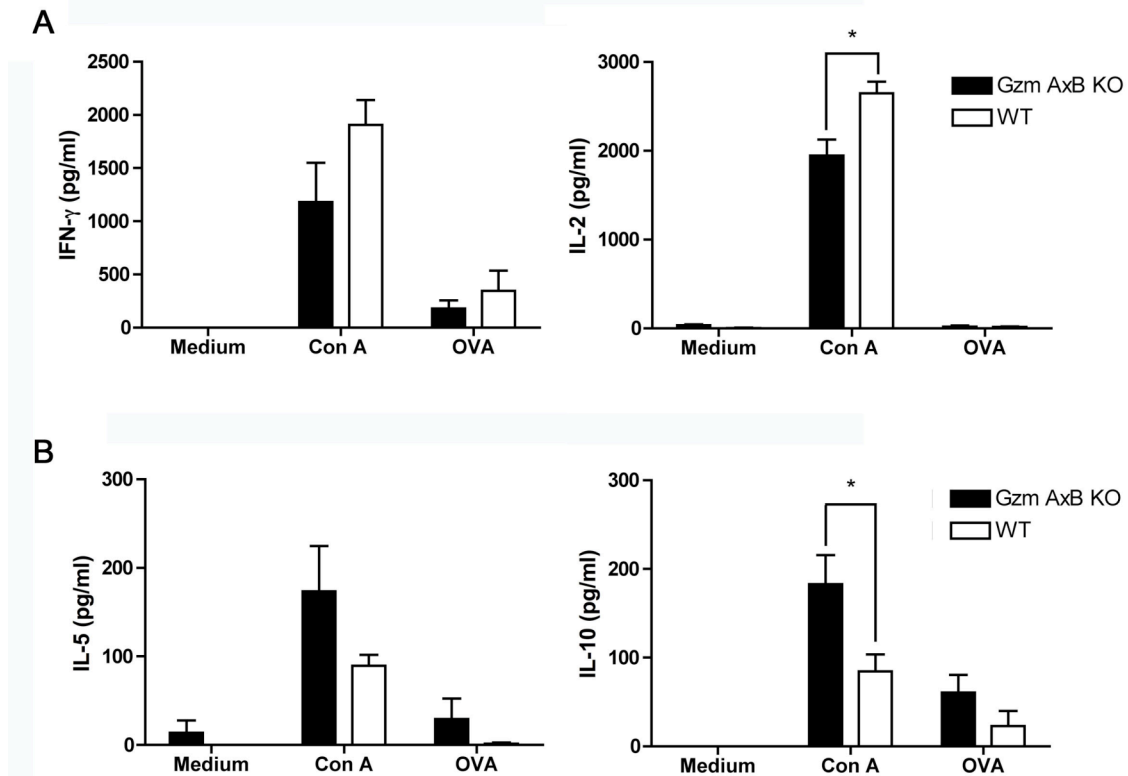


Abb. 3.5: Veränderte Zytokinsekretion von Milzzellen aus OVA-immunisierten Mäusen. Gzm AxB KO und WT Mäuse wurden in Anwesenheit von Freund's Adjuvans (A) oder Alum (B) mit OVA immunisiert. Milzzellen wurden mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Con A oder 100 $\mu\text{g/ml}$ OVA stimuliert. Nach 72 h wurden die Zytokinkonzentrationen, wie an der y-Achse angegeben, mittels ELISA quantifiziert. In Abbildung A sind die T_H1-spezifischen Zytokine IFN- γ und IL-2 von fünf Mäusen pro Gruppe dargestellt (Mittelwert \pm SEM). Abbildung B zeigt die Sekretion von den T_H2-spezifischen Zytokinen IL-5 und IL-10. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von neun Mäusen pro Gruppe aus zwei unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* p < 0,05).

In einem zweiten Ansatz wurde Mäusen OVA zusammen mit dem Adjuvans Alum verabreicht, welches eine T_H2-Zytokinantwort induziert. In den Überständen OVA- oder Con A-stimulierter Milzzellen wurde die Sekretion der T_H2-spezifischen Zytokine IL-10 und IL-5 mittels ELISA quantifiziert (Abb. 3.5B). Gzm AxB defiziente Milzzellen synthetisierten im Vergleich zu WT Milzzellen tendenziell mehr IL-5. Die gemessene IL-10-Konzentration war in den Überständen von Gzm AxB KO Milzzellen mit 183 pg/ml etwa doppelt so hoch wie in den Überständen der WT Milzzellen (84 pg/ml).

Die Immunisierung der Mäuse mit dem Modellantigen OVA bestätigte, dass Gzm AxB KO Milzzellen eine stärker ausgeprägte T_H2-Zytokinantwort als WT Milzzellen aufweisen.

3.1.2.2 Analyse der Proliferation

IL-2 gilt als Wachstumsfaktor für T-Zellen. Im folgenden Experiment sollte überprüft werden, ob die Verminderung der IL-2-Synthese in Abwesenheit von Gzm A und B, Einfluss auf die Proliferation der Zellen hat. Dazu wurden Milzzellen mit Con A stimuliert und anschließend das Maß der Zellteilung als Inkorporation von [³H]-Thymidin bestimmt. Milzzellen von Gzm AxB defizienten Mäusen zeigten nach Stimulation mit Con A eine signifikant verminderte Proliferation im Vergleich mit WT Milzzellen (Abb. 3.6A).

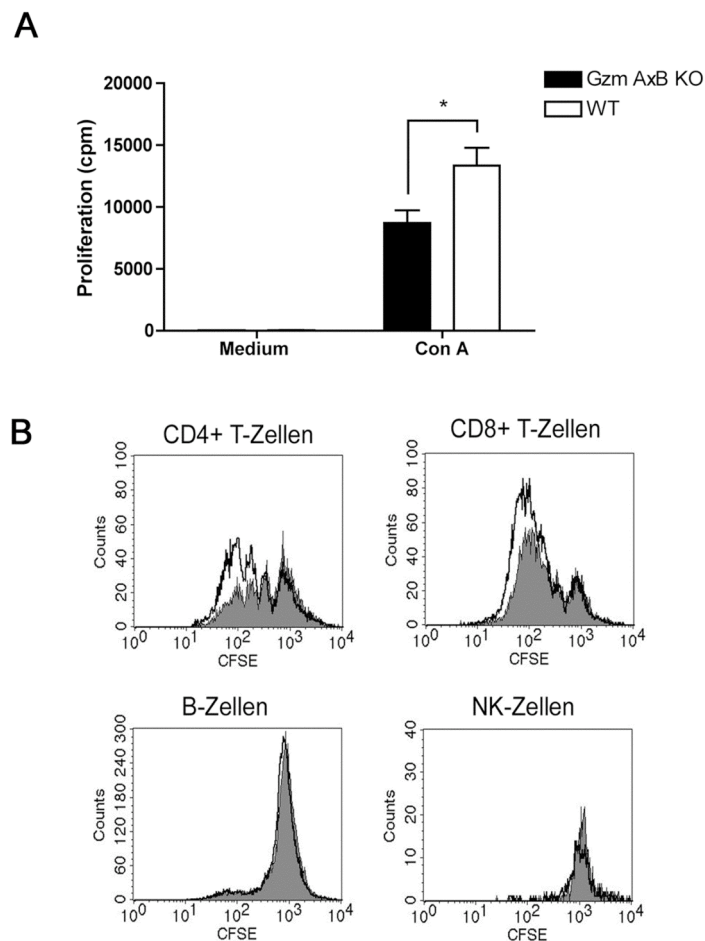


Abb. 3.6: Verminderte Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Con A. **A)** 4×10^5 Milzzellen von Gzm AxB KO und WT Mäusen wurden für 72 h mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A stimuliert. Die Proliferation wurde mittels [³H]-Thymidin-Einbau gemessen (**A**). Die Mittelwerte \pm SEM von 17 Gzm AxB KO und 15 WT Proben sind dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$). **B)** Für die Bestimmung der Proliferation auf zellulärer Ebene wurden Milzzellen naiver Mäuse mit CFSE markiert und nach 72 h eine Oberflächenfärbung mit Lymphozytenspezifischen Markern durchgeführt. Die Histogramme repräsentieren sechs von neun untersuchten Milzzellen (drei zeigten keinen Unterschied). Die graue Fläche zeigt die CFSE-Verdünnung von Gzm AxB KO Milzzellen, die schwarzen Striche repräsentieren WT Milzzellen.

Bei dem hier verwendeten Stimulus Con A handelt es sich um ein T-Zell Mitogen aus der Gruppe der Lektine. Man vermutet, dass es aufgrund seiner zuckerbindenden Fähigkeit CD3 auf T-Zellen quervernetzt, was zu einer Aktivierung von T-Zellen führt. Da Con A gleichzeitig die Zytokinsekretion anregt, und es infolgedessen auch zu einer Proliferation von B-Zellen und NK-Zellen kommen kann, wurde die Zellteilung der verschiedenen Lymphozyten analysiert. Milzzellen von Gzm AxB KO und WT Mäusen wurden mit CFSE gefärbt. Der Farbstoff dringt in die Zellen ein und wird bei Teilung der Zelle an die entstehenden Tochterzellen weitergegeben. Dabei kommt es in der Mutterzelle zu einer Halbierung des fluoreszierenden Farbstoffes CFSE, was als Verminderung der Fluoreszenzintensität durchflusszytometrisch gemessen werden kann. Abb. 3.6B zeigt, dass Con A nur eine sehr geringe, aber vergleichbare Zellteilung in B-Zellen und NK-Zellen beider Mäuse induzierte. CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen von Gzm AxB KO Mäusen wiesen dagegen im Vergleich zu WT Milzzellen eine deutlich verminderte Proliferation auf. Um die antigenspezifische Proliferation zu untersuchen, wurden Mäuse unter T_H1- und T_H2-Bedingungen mit dem Modellantigen OVA immunisiert. Die Induktion einer antigenspezifischen T_H1-Antwort wurde mit einer „Prime-Boost“ Immunisierung mit OVA emulgiert in komplettem Freund's Adjuvans gefolgt von OVA in inkomplettem Freund's Adjuvans erzielt. Es konnten dabei keine Unterschiede, in der Fähigkeit der Milzzellen auf Antigen (OVA) oder Mitogen (Con A) zu proliferieren, festgestellt werden (Abb. 3.7A). Des Weiteren wurden zwei unabhängige Immunisierungen der Mäuse mit OVA in Anwesenheit des T_H2-induzierenden Adjuvans Alum durchgeführt. Wie in Abb. 3.7B zu sehen ist, war die Inkorporation von [³H]-Thymidin in Con A-stimulierten Milzzellen von Gzm AxB KO (31470 ± 1932 cpm) und WT Mäuse (28380 ± 2640 cpm) gleich hoch. Dagegen war in einem der beiden Versuche in den Gzm AxB KO Milzzellen die Proliferation auf OVA im Vergleich zu WT Milzzellen erhöht. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der gemessenen Proliferation naiver Milzzellen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse jedoch, dass die verminderte Inkorporation von [³H]-Thymidin in naiven Con A-stimulierten Gzm AxB KO Milzzellen auf eine verminderte Zellteilung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zurückzuführen ist. Während der Immunisierung zeigten Gzm AxB KO und WT Milzzellen nach Stimulation mit Con A eine vergleichbare Proliferation.

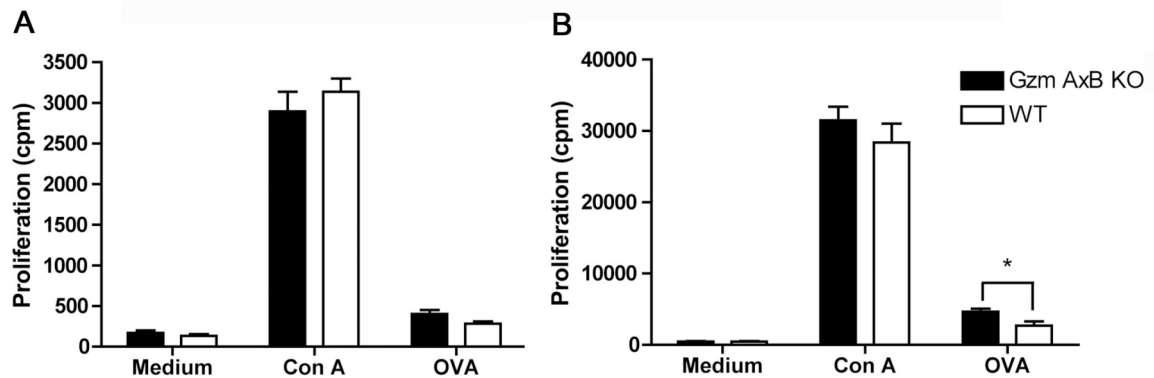


Abb. 3.7: Mitogen- und antigenspezifische Proliferation von Milzzellen nach Immunisierung mit OVA. Gzm AxB KO und WT Mäuse wurden mit OVA in Anwesenheit von (A) Freund's Adjuvans (komplett und inkomplett) oder (B) Alum immunisiert. Milzzellen (4×10^5) wurden anschließend für 72 h mit 100 $\mu\text{g/ml}$ OVA oder 2 $\mu\text{g/ml}$ Con A als Positivkontrolle stimuliert. Die Proliferation wurde mittels [^3H]-Thymidin-Einbau gemessen. Die Immunisierung mit Freund's Adjuvans repräsentiert Daten von einem Versuch mit fünf Mäusen pro Gruppe. Die Messung der Proliferation von OVA-Alum immunisierten Mäusen umfasst Milzzellen von zehn Gzm AxB KO und acht WT Mäuse aus zwei unabhängigen Versuchen. Aufgetragen sind Mittelwerte \pm SEM. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

3.1.2.3 Induktion von AICD in naiven Milzzellen ist unabhängig von Gzm A und B

Aktuelle Daten belegen, dass $T_{\text{H}2}$ -Zellen von Gzm B KO Mäusen, generiert auf dem Hintergrund der 129/SvJ Maus (Revell et al., 2005), im Vergleich zu WT $T_{\text{H}2}$ -Zellen weniger suszeptibel für AICD sind (Devadas et al., 2006). Hierbei konnte eine Beteiligung von Gzm B am TZR-induzierten Zelltod nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob Gzm AxB KO im Vergleich zu WT Milzzellen eine Beeinträchtigung der Sterberate zeigen, wurde AICD durch Stimulation und Restimulation mit anti-CD3 ausgelöst. Milzzellen naiver Mäuse wurden in Gegenwart von 5 ng/ml IL-2 und 10 ng/ml anti-CD3 2 h stimuliert. Nach Entfernen der Stimuli wurden die Zellen 20 h in Medium inkubiert und anschließend für 4 h mit 10 ng/ml anti-CD3 restimuliert. Als Kontrolle wurden Milzzellen in Medium inkubiert oder nur einmal mit anti-CD3 stimuliert. Der Anteil toter Zellen wurde nach Oberflächenfärbung mit anti-CD4 und anti-CD3 durchflusszytometrisch als Inkorporation von 7-AAD gemessen.

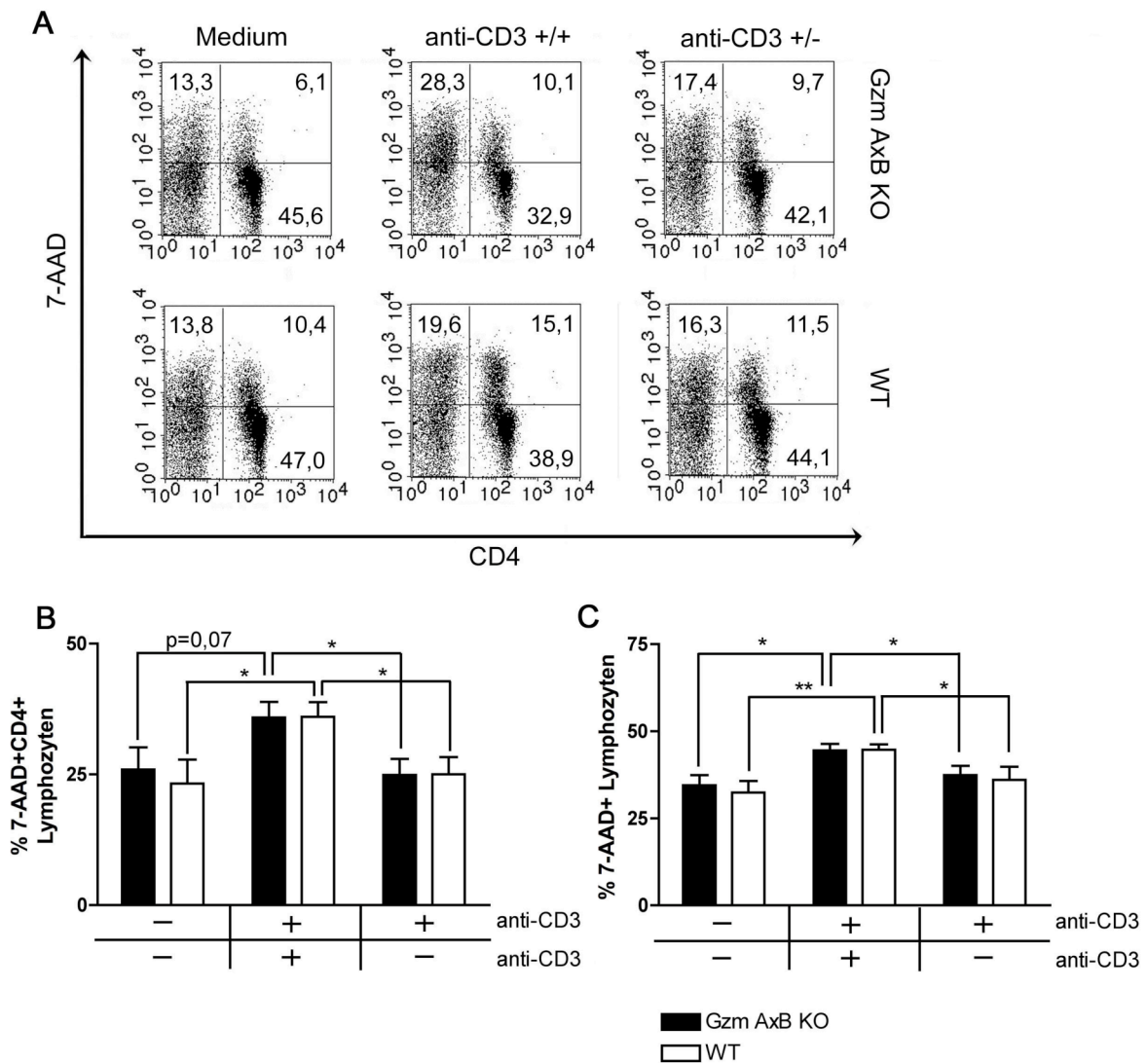


Abb. 3.8: Milzzellen sterben durch AICD unabhängig von Gzm A und B. Milzzellen von Gzm AxB KO und WT Mäusen wurden für 2 h mit anti-CD3 stimuliert und dann am folgenden Tag 4 h mit anti-CD3 restimuliert (anti-CD3+/+). Als Kontrollen wurden Zellen in Medium inkubiert (anti-CD3-/-) bzw. nur einmal mit anti-CD3 stimuliert (anti-CD3+/-). Der Anteil toter Zellen wurde als 7-AAD-Einbau durchflusszytometrisch bestimmt **A**) Zu sehen ist ein repräsentatives Beispiel von drei unabhängigen Versuchen. Die Zellen wurden auf CD3⁺ Lymphozyten eingestellt und die Aufnahme von 7-AAD (y-Achse) in CD4⁺ T-Zellen (x-Achse) untersucht. Die Zahlen in den Quadranten geben den Prozentsatz positiver Zellen an. Für die statistische Auswertung wurde der Anteil toter 7-AAD⁺ Lymphozyten nach Einstellen auf CD4⁺ T-Zellen **B**) oder Gesamt-Lymphozyten **C**) ermittelt und ist dargestellt als Mittelwert ± SEM von neun Mäusen pro Gruppe. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* p < 0,05, ** p < 0,01).

Abb. 3.8A zeigt ein repräsentatives Beispiel aus drei unabhängigen Versuchen. Die Lymphozyten wurden auf CD3⁺ T-Zellen eingestellt. Nach Restimulierung mit anti-CD3 waren 36 % der Gzm AxB KO und WT CD4⁺ T-Zellen positiv für 7-AAD (Abb. 3.8B). Der

Anteil toter $CD4^+$ T-Zellen lag ohne Restimulierung in Gzm AxB KO und WT Milzzellen bei 25 %. AICD konnte folglich in 10 % der $CD4^+$ T-Zellen induziert werden. Gleichzeitig konnte keine Verminderung des AICD in den Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen festgestellt werden. Der Gesamtanteil toter (7-AAD^+) Lymphozyten war ebenfalls in Gzm AxB KO und WT Mäusen vergleichbar hoch (Abb. 3.8C). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die wiederholte Behandlung von Milzzellen mit anti-CD3 Zelltod in $CD4^+$ T-Zellen und weiteren Lymphozyten auslöst. Die Defizienz von Gzm A und B führte jedoch nicht zu einer Verminderung der Sterberate in den Milzzellen.

3.1.2.4 Gzm A und B hat keinen Einfluss auf die Expression von CD69

Das C-Typ Lektin CD69 gilt als früher Aktivierungsmarker auf Leukozyten. Milzzellen von naiven Gzm AxB KO und WT Mäusen wurden für 6 h mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A stimuliert. Der Anteil $CD69^+$ $CD4^+$ T-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und $CD19^+$ B-Zellen wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Alle untersuchten Lymphozytenpopulationen der Gzm AxB KO und WT Milzzellen exprimierten nach Stimulation mit Con A gleich viel CD69. Die Gzm AxB Defizienz führte folglich nicht zu einer Beeinträchtigung der Aktivierbarkeit der Zellen.

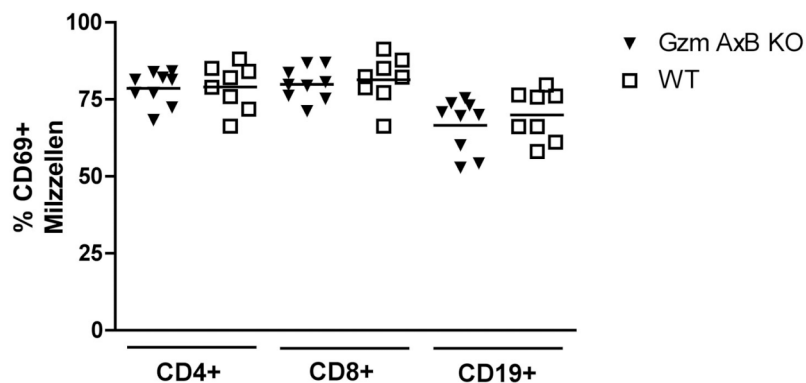


Abb. 3.9: T- und B-Lymphozyten exprimieren nach Stimulation mit Con A unabhängig von Gzm A und B CD69. 5×10^5 Milzzellen wurden 6 h mit Medium oder Con A inkubiert. Zur Quantifizierung der Zellen wurden die Zellen mit den lymphozyten-spezifischen Antikörpern CD4, CD8 und CD19 (x-Achse) gefärbt und gleichzeitig die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD69 (y-Achse) durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt ist der Anteil positiver Zellen nach Stimulation mit Con A. Jeder Punkt repräsentiert eine einzelne Maus.

3.1.2.5 Analyse der OVA-spezifischen humoralen Immunantwort

Die humorale Immunantwort wird stark vom Zytokinmilieu beeinflusst. Da B-Zellen, wie ich zeigen konnte, zudem beide Granzyme nach Stimulation mit LPS exprimieren, sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Abwesenheit von Gzm A und B auf die Antikörpersekretion hat. Mäuse wurden in Anwesenheit des T_H2-induzierenden Adjuvans Alum mit dem Modellantigen OVA immunisiert und OVA-spezifische IgG1- und IgM-Titer im ELISA ermittelt (Abb. 3.10A).

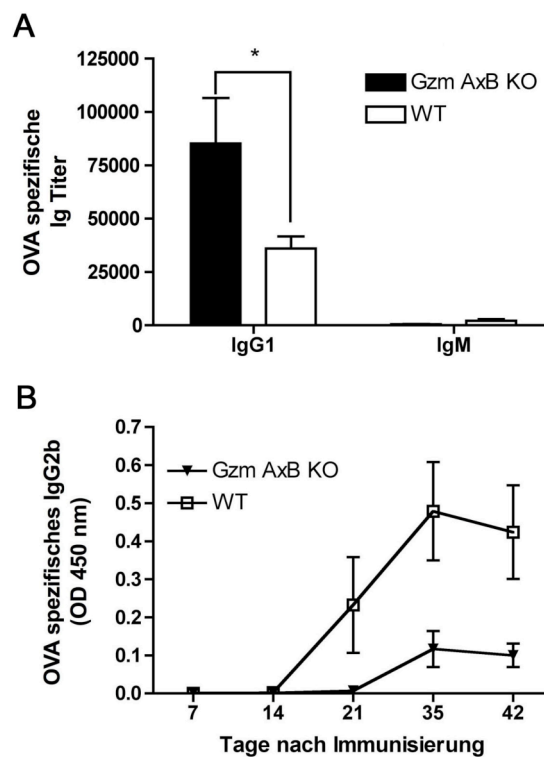


Abb. 3.10: Humorale Immunantwort auf das Modellantigen OVA ist in Abwesenheit von Gzm A und B verändert. A) OVA-spezifische IgG1- und IgM-Titer wurden im Plasma von je 13 Mäusen nach drei unabhängigen Immunisierungen mit OVA/Alum bestimmt. B) Gzm AxB KO und WT Mäuse wurden mit dem OVA in Anwesenheit von Freund's Adjuvans immunisiert. Den Mäusen wurde an verschiedenen Zeitpunkten (x-Achse) Blut abgenommen und die OVA-spezifische IgG2b-Antwort nach Verdünnung der Plasmen (1:300) im ELISA bestimmt (n=5 Mäuse pro Gruppe). Die Mittelwerte \pm SEM sind aufgetragen, der Leerwert des Puffers wurde zuvor abgezogen. Die Einzelwerte pro Maus wurden in Duplikaten bestimmt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* p < 0,05).

OVA-spezifische IgG1-Titer waren in den Plasmen von Gzm AxB KO Mäusen (85290 ± 21330) im Vergleich zu WT Mäusen (36000 ± 5723) erhöht. Die OVA-spezifischen IgM-Titer waren dagegen in Gzm AxB KO und WT Mäusen vergleichbar hoch. Um die T_H1 -abhängige humorale Immunantwort zu untersuchen, wurden Mäuse mit OVA und Freund's Adjuvans immunisiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde den Mäusen Blut abgenommen und OVA-spezifisches IgG2b mittels ELISA bestimmt. Dabei zeigte sich in Abwesenheit von Gzm A und B ein schwächerer Anstieg der IgG2b-Level (Abb. 3.10B). Die Ergebnisse zeigen, dass die Defizienz von Gzm A und B neben der zellulären Immunantwort auch die humorale Antikörperantwort beeinflusst.

3.1.3 Analyse der Entwicklung und Wanderung von Leukozyten

3.1.3.1 Durchflusszytometrische Analyse der Zellkomposition der Milz

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass Gzm A und B in T- und B-Lymphozyten sowie NK-Zellen nach Stimulation exprimiert werden. Um sicherzustellen, dass die Defizienz von Gzm A und B keinen Einfluss auf die Entwicklung der Lymphozyten hat, wurde die Zusammensetzung der Milz analysiert.

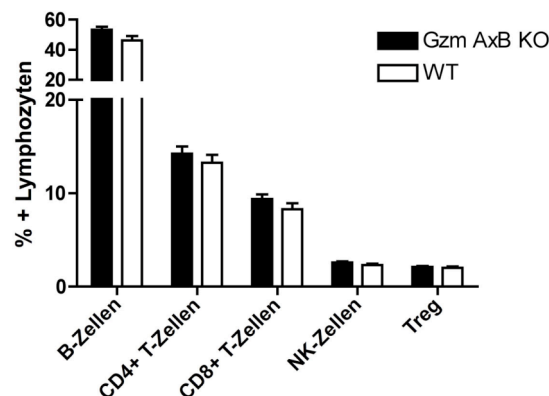


Abb. 3.11: Die Lymphozytenfrequenzen sind vergleichbar in der Milz von Gzm AxB KO und WT Mäusen. A) Milzzellen von Gzm AxB KO und WT Mäusen (5×10^5 Zellen) wurden mit lymphozytenspezifischen Antikörpern (CD4, CD8, CD19, TCR und DX5) sowie dem intrazellulären Transkriptionsfaktor Foxp3 markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind repräsentativ für je 9 Mäuse pro Gruppe und zeigen die Mittelwerte \pm SEM aus drei Versuchen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil positiver Lymphozyten. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

Abb. 3.11 zeigt den Anteil der einzelnen Lymphozytensubpopulationen in den Milzen von Gzm AxB KO und WT Mäusen. Dabei wurden keine Unterschiede in Bezug auf die Frequenzen der B-, T-Lymphozyten und NK-Zellen in Gzm AxB KO und WT Mäusen festgestellt. In der Literatur ist beschrieben, dass auch humane und murine Treg Gzm B exprimieren (Grossman et al., 2004a; Grossman et al., 2004b). Der Anteil der Treg in der Milz wurde über die Expression von CD4 und Foxp3 ermittelt und war vergleichbar in Gzm AxB KO und WT Mäusen.

Anhand der durchflusszytometrischen Analysen wurde gezeigt, dass die Zusammensetzung der Milz in Gzm AxB KO und WT Mäusen ähnlich ist. Folglich beruht die unterschiedliche Zytokinsekretion und Proliferation von Milzzellen nicht auf eine veränderte Entwicklung der Lymphozyten.

3.1.3.2 Thioglykolat-induzierte Wanderung in die Peritonealhöhle

Die Proteasen Gzm A und B können extrazelluläre Matrixproteine wie Fibronectin und Vitronectin degradieren und fördern damit die Wanderung von Leukozyten (Buzza et al., 2005). Die Rekrutierung von Zellen in die Peritonealhöhle wurde daher in Abhängigkeit von Gzm A und B untersucht. Zu diesem Zweck bekamen Gzm AxB KO und WT Mäuse an Tag 0 1,5 ml 4 %ige Thioglykolatlösung i.p. verabreicht. Nach sieben Tagen wurden die Zellen durch Peritoneallavage gewonnen und anschließend die Leukozytenpopulationen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.12). Die Zellen wurden vierfach mit anti-CD11b, anti-Gr-1, anti-F4/80 und anti-B220 gefärbt und die Peritonealexudatzellen wie folgt definiert:

1. CD11b⁺B220⁻
 - Neutrophile: Gr-1^{hoch} und F4/80⁻
 - Eosinophile: Gr-1^{intermediär} und F4/80⁺
 - Makrophagen: Gr-1⁻ und F4/80^{intermediär/hoch}
2. B220⁺
 - B1-Zellen: CD11b⁺
 - B2-Zellen: CD11b⁻

Monozyten, die aus dem Blut ins Gewebe einwandern, differenzieren sich unter Hochregulation von F4/80 zu Makrophagen. In der Peritonealhöhle beider Mäuse konnte zwischen F4/80^{intermediär} und F4/80^{hoch} exprimierenden Makrophagen unterschieden werden.

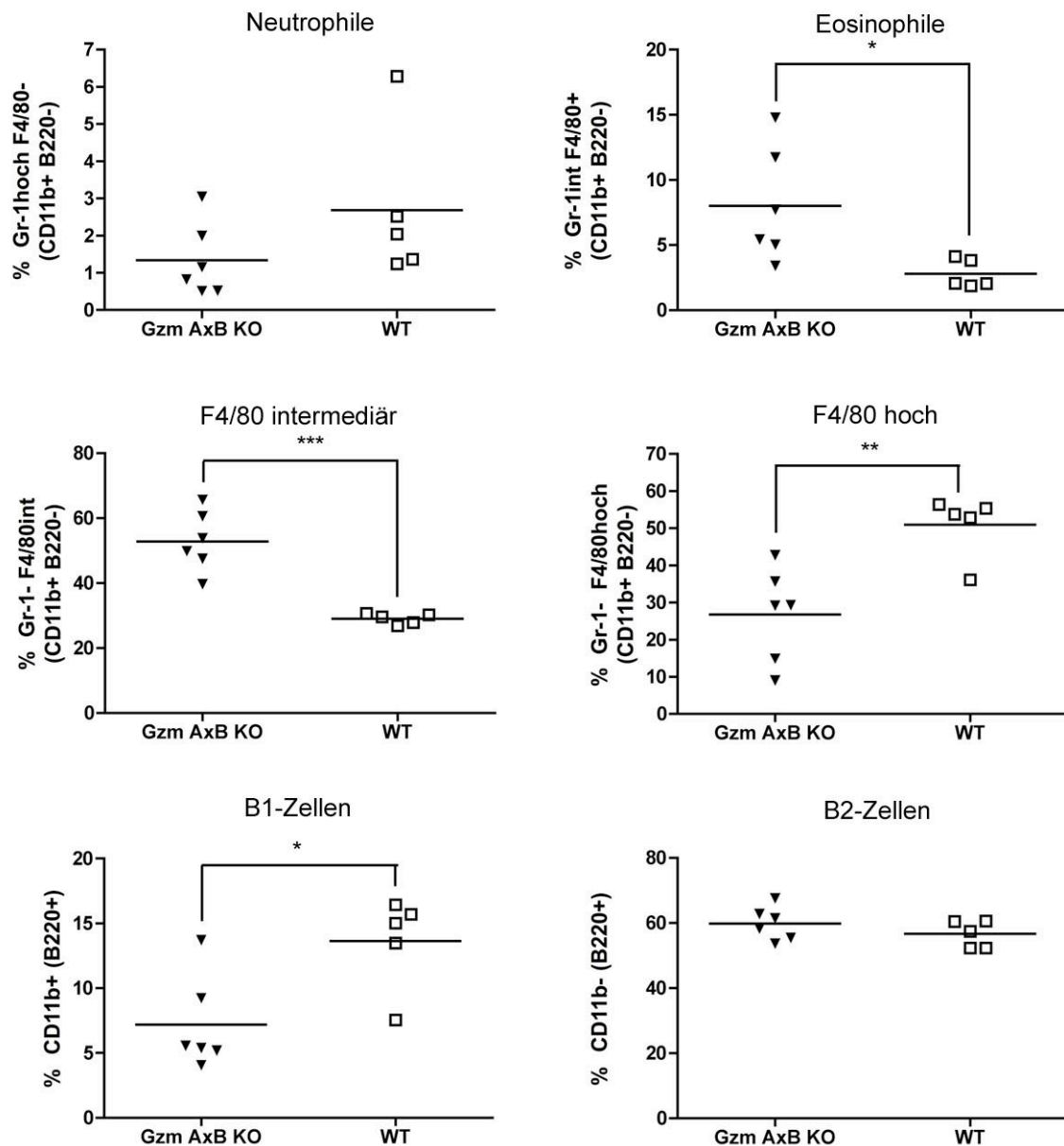


Abb. 3.12: Verminderte Reifung zu Makrophagen in der Peritonealhöhle von Gzm AxB KO Mäusen. Für die Präparation von Peritonealexudatzellen bekamen Mäuse Thioglykolat i.p. injiziert und nach sieben Tagen wurde eine Peritoneallavage durchgeführt. Die Zellen wurden vierfach mit anti-CD11b, anti-Gr-1, anti-F4/80 und anti-B220 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Nach Einstellen auf B220⁻CD11b⁺ Zellen wurde der Anteil Neutrophiler (Gr-1^{hoch}, F4/80⁻), Eosinophiler (Gr-1^{intermediär}, F4/80⁺) und Makrophagen (Gr-1⁻, F4/80^{intermediär/hoch}) bestimmt. Die prozentualen Anteile an B-Zellen wurden nach Einstellen auf B220⁺ Zellen wie folgt ermittelt: B2 Zellen (CD11b⁻, B220⁺), B1 Zellen (CD11b⁺, B220⁺). Dargestellt ist die Zusammenfassung der einzelnen Zelltypen aus zwei unabhängigen Versuchen. Jeder Punkt repräsentiert eine Maus. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

In Gzm AxB KO Mäusen kam es im Vergleich zu WT Mäusen zu einer verstärkten Rekrutierung von unreifen F4/80^{intermediär} exprimierenden Makrophagen und von Eosinophilen. Gleichzeitig war der Anteil an Neutrophilen, B1-Zellen und F4/80^{hoch} exprimierender Makrophagen in Gzm AxB KO Mäusen niedriger als in WT Mäusen. Der Anteil F4/80^{intermediär} exprimierender Makrophagen lag in der Peritonealhöhle von Gzm AxB KO Mäusen bei 52 %, während sich in den WT Mäusen nur halb so viele unreife Makrophagen in der Peritonealhöhle befanden. Analog dazu war der Anteil an reifen F4/80^{hoch} exprimierender Makrophagen mit 26 % in Gzm AxB KO Mäusen nur halb so hoch wie in WT Mäusen (51 %). Dieses Ergebnis deutet auf eine Beeinträchtigung der Reifung von Makrophagen in Gzm AxB KO Mäusen hin.

3.1.4 Zusammenfassung Teil 3.1

Im ersten Teil dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass Gzm A konstitutiv von NK-Zellen und Con A-stimulierten CD8⁺ T-Zellen exprimiert wird. Eine Hochregulation von Gzm B konnte nach Aktivierung mit Con A in T-Zellen und NK-Zellen beobachtet werden. Die Stimulation von Milzzellen mit LPS induzierte die Expression von Gzm A und B in B-Zellen.

Weitere Analysen zeigten, dass die Defizienz von Gzm A und B die Funktionalität der Zellen, nicht aber die Zusammensetzung der Lymphozyten in der Milz, beeinflusst. Nach Stimulation mit Con A sezernierten CD4⁺ T-Zellen aus der Milz von Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT Milzzellen weniger IL-2. Gleichzeitig war die Zellteilung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen der Milz nach Stimulation mit Con A in Abwesenheit von Gzm A und B erniedrigt. Die Beeinträchtigung der Proliferation zeigte sich jedoch ausschließlich in naiven Mäusen. Milzzellen aus immunisierten Gzm AxB KO und WT Mäusen zeigten nach Stimulation mit Con A eine vergleichbare Inkorporation von [³H]-Thymidin.

Durchflusszytometrische Untersuchungen nach Injektion von Thioglykolat wiesen zudem auf einen Reifungsdefekt und eine gestörte Einwanderung von Zellen in die Peritonealhöhle in Abwesenheit von Gzm A und B hin. Die Expression des Makrophagenmarkers F4/80 war im Vergleich zu WT Mäusen auf Peritonealexudatzellen von Gzm AxB KO Mäusen erniedrigt. Gleichzeitig wurden in Abwesenheit von Gzm A und B mehr Eosinophile und weniger B1-Zellen in die Peritonealhöhle rekrutiert.

Im folgenden Abschnitt wurde untersucht, wie sich die Defizienz von Gzm A und B auf den Verlauf der Infektion mit der Filarie *L. sigmodontis* auswirkt.

3.2 Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung und Immunantwort gegen *L. sigmodontis*

3.2.1 Induktion von Gzm A und B während der Infektion mit *L. sigmodontis*

Nach natürlicher Infektion mit *L. sigmodontis* wurde zunächst die Expression von Gzm A und B in WT Milzzellen durchflusszytometrisch ermittelt. Während der Infektion kam es zur Induktion von Gzm A und B in Lymphozyten der Milz (Abb. 3.13). Lediglich an Tag 35 p.i. war die Erhöhung des Anteils Gzm A⁺ Lymphozyten im Vergleich zu Tag 0 p.i. nicht signifikant unterschiedlich. Die Expression beider Granzyme war tendenziell an Tag 9 p.i. mit 2,1 % Gzm A⁺ und 1,6 % Gzm B⁺ Lymphozyten am höchsten und nahm dann im Verlauf der Infektion ab.

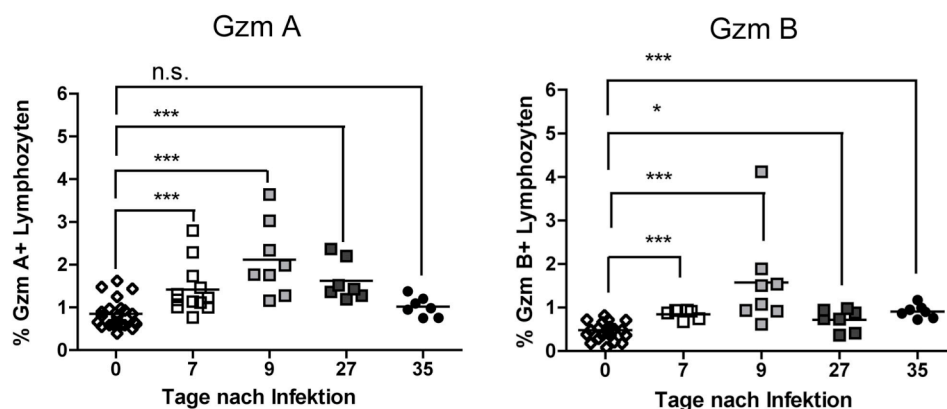


Abb. 3.13: Erhöhte Expression von Gzm A und B in Milzzellen infizierter Mäuse. Milzzellen von WT Mäusen wurden an Tag 7, 9, 27 und 35 nach Infektion mit *L. sigmodontis* isoliert und die Expression von Gzm A (linkes Diagramm) und B (rechtes Diagramm) durchflusszytometrisch bestimmt. Für Tag 0 ist die Gzm-Expression naiver Mäuse gezeigt. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle Maus. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Die Expression von Gzm A und B wurde für T- und B-Zellen sowie NK-Zellen nach Inkubation mit Medium und Con A untersucht (Abb. 3.14B). Unter dem Einfluss von Con A kam es in infizierten Milzzellen zu einem Anstieg der Gzm-Expression, welcher mit dem in naiven Milzzellen vergleichbar ist (siehe auch Abb. 3.1). Wie bereits für naive Milzzellen

gezeigt, exprimieren NK-Zellen ohne vorherige Stimulation Gzm A. Darüber hinaus konnte eine Expression von Gzm A und B in 1 - 2 % B-Zellen nachgewiesen werden. Durch Stimulation mit Con A konnte insbesondere in CD8⁺ T-Zellen eine Expression von Gzm A und B induziert werden.

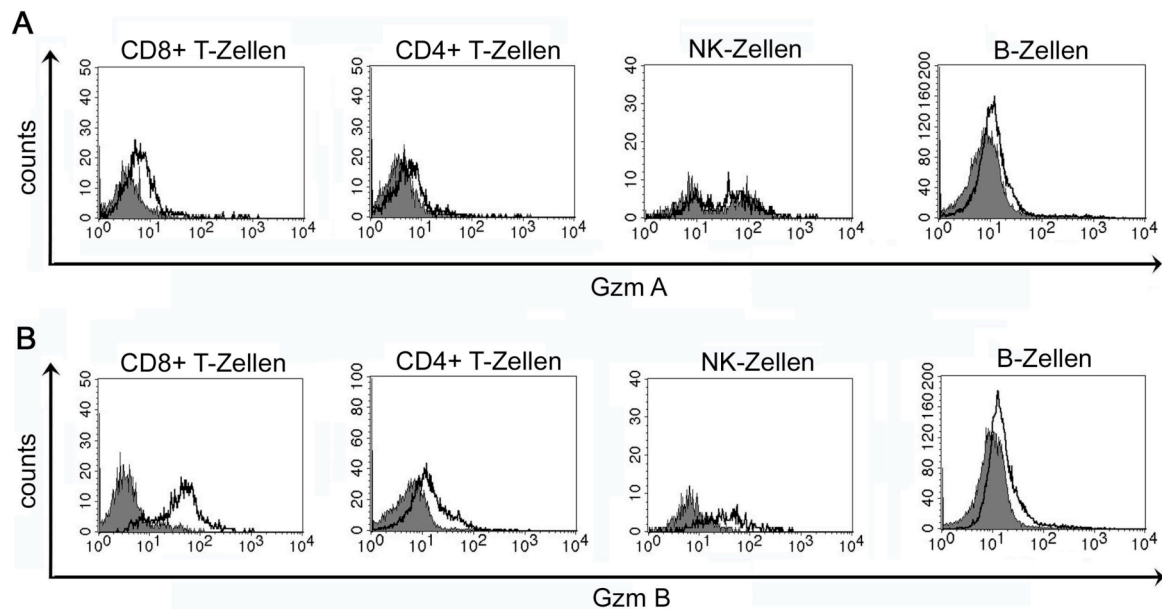


Abb. 3.14: Expression von Gzm A und B in Milzzellen infizierter Mäuse nach Stimulation mit Con A. Milzzellen von C57BL/6 Mäusen wurden an 9 p.i. isoliert und für drei Tage mit dem Mitogen Con A stimuliert. Die Expression von Gzm A (A) und B (B) wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensitäten der Gzm-Expression in Medium (graue Fläche) gegen Con A (schwarze Linie) auf CD8⁺ T-Zellen (CD8⁺CD3⁺), CD4⁺ T-Zellen (CD4⁺CD3⁺), NK-Zellen (Nk1.1⁺CD3⁺) und B-Zellen (CD19⁺).

Eine Analyse der PleC zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion mit *L. sigmodontis* ergab eine Expression von Gzm A und B in den Lymphozyten am Ort der Infektion (Abb. 3.15A und B). Da naive Mäuse keine Zellen in der Pleurahöhle aufweisen, war hier kein Vergleich zu Tag 0 möglich. Der Anteil Gzm A⁺ Lymphozyten stieg von Tag 7 (3,1 %) auf Tag 9 (7,3 %) p.i. um mehr als das Doppelte an. Anschließend konnte ein Abfall der Gzm A-Expression verzeichnet werden: 1,2 % Gzm A⁺ Zellen an Tag 27 p.i. und 1,8 % Gzm A⁺ Zellen an Tag 35 p.i.. Im Gegensatz dazu blieb der Anteil Gzm B⁺ Lymphozyten im Verlauf der Infektion unverändert. Ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der Gzm B-Expression war jedoch ebenfalls an Tag 9 p.i. erkennbar. Abb. 3.15C und D zeigt je ein Beispiel für die Expression von Gzm A und B in PleC an Tag 9 p.i.. Unter Verwendung lymphozytenspezifischer Oberflächenmarker wurden Gzm⁺ Zelltypen identifiziert. Ähnlich

den Milzzellen waren NK-Zellen positiv für Gzm A, nicht aber für Gzm B. Der Gesamtanteil Gzm A⁺ NK-Zellen unterlag mit 1 % bis 60 % sehr großen Schwankungen. Eine Expression von Gzm A und B wurde dagegen in T-Zellen (CD4⁺, CD8⁺ und Foxp3⁺) nicht nachgewiesen. Den Hauptanteil Gzm A und B exprimierender Zellen stellte ähnlich der Milz eine Population CD19⁺ B-Zellen dar.

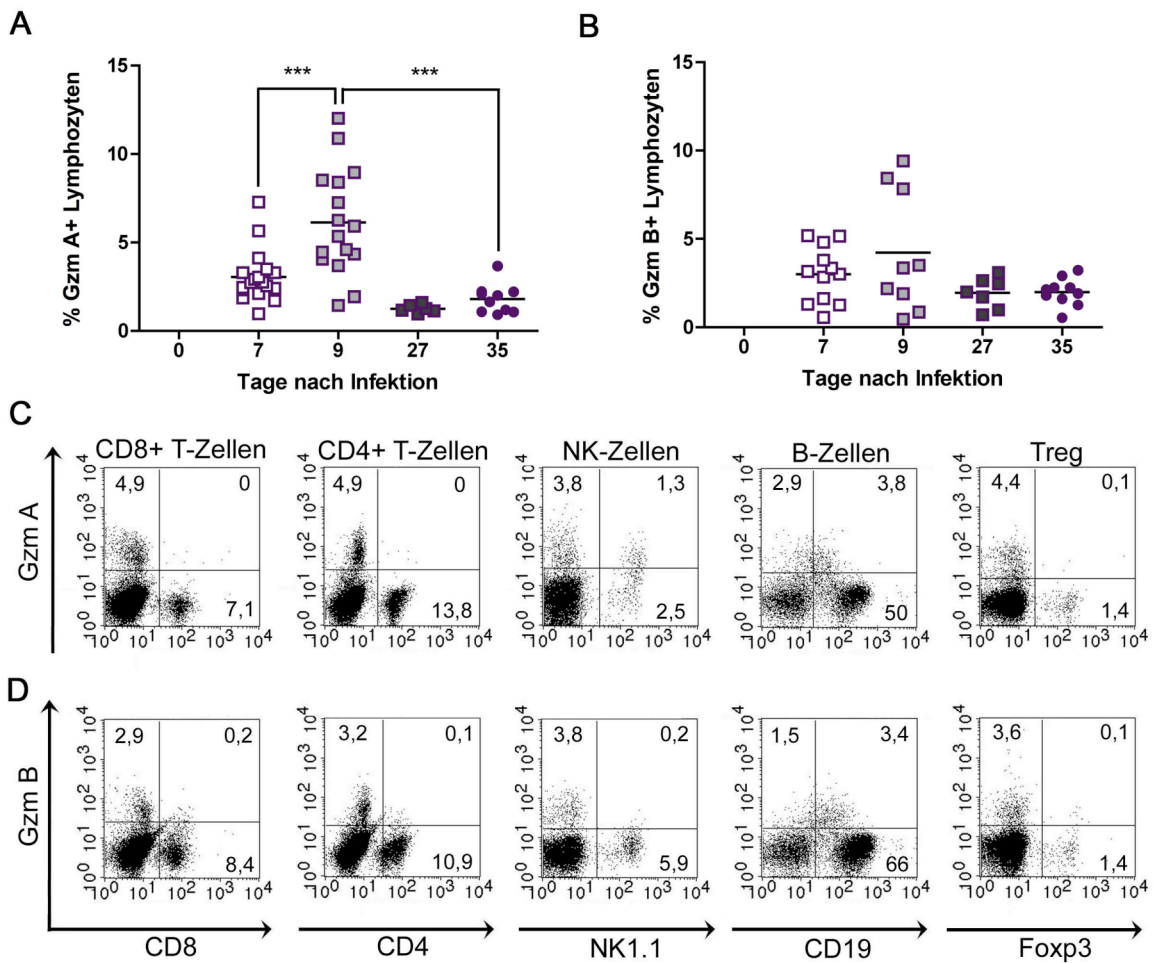


Abb. 3.15: Expression von Gzm A ist in Lymphozyten der Pleurahöhle an Tag 9 p.i. am höchsten. PleC (1×10^6) von WT Mäusen wurden an verschiedenen Zeitpunkten (x-Achse) nach Infektion mit *L. sigmodontis* isoliert und die Expression von Gzm A (**A**) und B (**B**) durchflusszytometrisch bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert den Anteil Gzm⁺ Lymphozyten einer einzelnen Maus. **C+D**) Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel der Gzm A und B Expression in Lymphozyten der Pleurahöhle an Tag 9 p.i. (aus vier unabhängigen Versuchen). Die Antikörper gegen Gzm A und B wurden wie an der x-Achse angegeben mit verschiedenen Lymphozytenmarkern kombiniert. Für die Darstellung der NK-Zellen wurden die Zellen auf CD3⁻ Zellen eingestellt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (** p < 0,01).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Hochregulation von Gzm A und B in Milzzellen und PleC, insbesondere an Tag 9 nach Infektion mit *L. sigmodontis*. B-Zellen zeichneten sich in beiden Kompartimenten durch die Expression beider Granzyme aus.

3.2.2 Gzm A und B sind nicht in *L. sigmodontis* Larven und –Extrakt nachweisbar

Die Kutikula von Nematoden ist ein Exoskelett, bestehend aus extrazellulären Matrixproteinen, unlöslichen Proteinen sowie Glykoproteinen und Lipiden (Page & Johnstone, 2007). Hauptkomponente der extrazellulären Matrix ist Kollagen. Der Übergang zu den Wurmstadien (L1 → L2 → L3 → L4 → adulter Wurm) ist durch Häutung der Larven gekennzeichnet. Dabei kommt es zum Abstreifen der Alten und zur Entstehung einer neuen Kutikula. An der Remodellierung sind Proteasen beteiligt (Guiliano et al., 2004; Hashmi et al., 2004). Da die Proteasen Gzm A und B extrazelluläre Matrixproteine degradieren können, sollte untersucht werden, ob Gzm B in die Kutikula von *L. sigmodontis* eindringen kann.

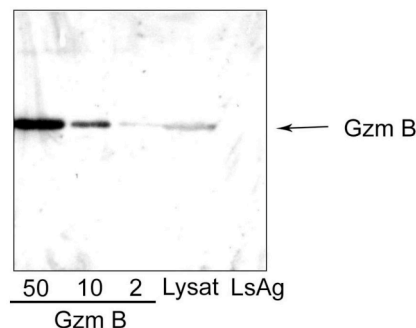


Abb. 3.16: Gzm A und B ist nicht in LsAg nachweisbar. Im Western Blot wurde LsAg auf die Präsenz von Gzm B untersucht (Spur 5). Als Positivkontrolle wurden 50 ng, 10 ng und 2 ng murines Gzm B (Spur 1-3) und Zell-Lysat von 1×10^7 WT Milzzellen (Spur 4) aufgetragen.

LsAg wurde elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend ein Western Blot mit Gzm B-spezifischem Antikörper durchgeführt (Abb. 3.16A). Als Positivkontrolle wurden verschiedene Konzentrationen aufgereinigtes Gzm B, welches von Prof. M. Simon zur Verfügung gestellt wurde, aufgetragen. Außerdem wurde ein Lysat von 1×10^7 Milzzellen einer WT Maus auf die Präsenz von Gzm B untersucht. Mit einem Molekulargewicht von 26 kDa konnte Gzm B in murinem Gzm B und Zell-Lysat nachgewiesen werden, nicht

jedoch in LsAg. Die Nachweisgrenze des Western Blots lag bei ca. 2 ng Gzm B. Es besteht somit die Möglichkeit, dass LsAg geringere Gzm B-Konzentrationen enthält. Mittels Histologie sollte daraufhin geprüft werden, ob Gzm A und B in Granulomen und Würmern nachweisbar ist. Aufgrund der unspezifischen Bindung beider Antikörper an Wurmstrukturen aus Gzm defizienten Mäusen war dieser Nachweis nicht möglich. Eine direkte Interaktion der Granzyme mit dem Wurm konnte somit nicht gezeigt werden.

3.2.3 Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Entwicklung von *L. sigmodontis in vivo*

Um den Einfluss der *in vivo* Relevanz von Gzm A und B zu untersuchen, wurden Gzm defiziente Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen mit dem Erreger *L. sigmodontis* infiziert. Nach der Übertragung infektiöser Larven durch den Biss einer Milbe wandern L3 in die Pleurahöhle; dort kommt es in der resistenten C57BL/6 WT Maus innerhalb von wenigen Wochen zu einer Beseitigung der Infektion. Die Zählung der Würmer wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen: Tag 8/9 p.i. repräsentiert die frühe, Tag 26/27 p.i. die mittlere und Tag 35 p.i. die späte Phase der Infektion. Durch Spülen der Höhle oberhalb des Peritoneums wurden die dort lokalisierten Würmer entfernt und für die Ermittlung der Wurmlast (Anzahl der Würmer in der Pleurahöhle) ausgezählt. Dabei ergab sich eine Unterscheidung der Wurmlast anhand der Anzahl der ausgezählten Würmer in den WT Mäusen. Eine hohe Wurmlast ist definiert als > 100 Würmer in der Pleurahöhle der WT Mäuse. Bei einer mittleren Wurmlast lag die durchschnittliche Anzahl der Würmer in den WT Mäusen zwischen 30 und 100 Wümmern. Eine Wurmlast von null bis 30 Wümmern entsprach einer niedrigen Wurmlast.

3.2.3.1 Entwicklung von *L. sigmodontis* in Gzm AxB KO und WT Mäusen

Der Vergleich der Wurmlasten in Gzm AxB KO und WT Mäusen zeigte eine Verminderung der Wurmanzahl an Tag 8/9 p.i. in den Gzm AxB KO Mäusen unabhängig von der infektiösen Dosis (Abb. 3.17A und B). Bei einer mittleren Wurmlast war die Anzahl der Würmer an Tag 9 p.i. in den Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen um die Hälfte reduziert. An Tag 26/27 p.i. und Tag 35 p.i. waren die ermittelten Wurmlasten in Gzm AxB KO und WT Mäusen gleich hoch (Abb. 3.17A). Bei einer hohen Wurmlast war

die Anzahl der Würmer in den Gzm AxB KO Mäusen gegenüber den WT Mäusen signifikant an Tag 9 und an Tag 26/27 um das 1,5 bis 2-fache vermindert.

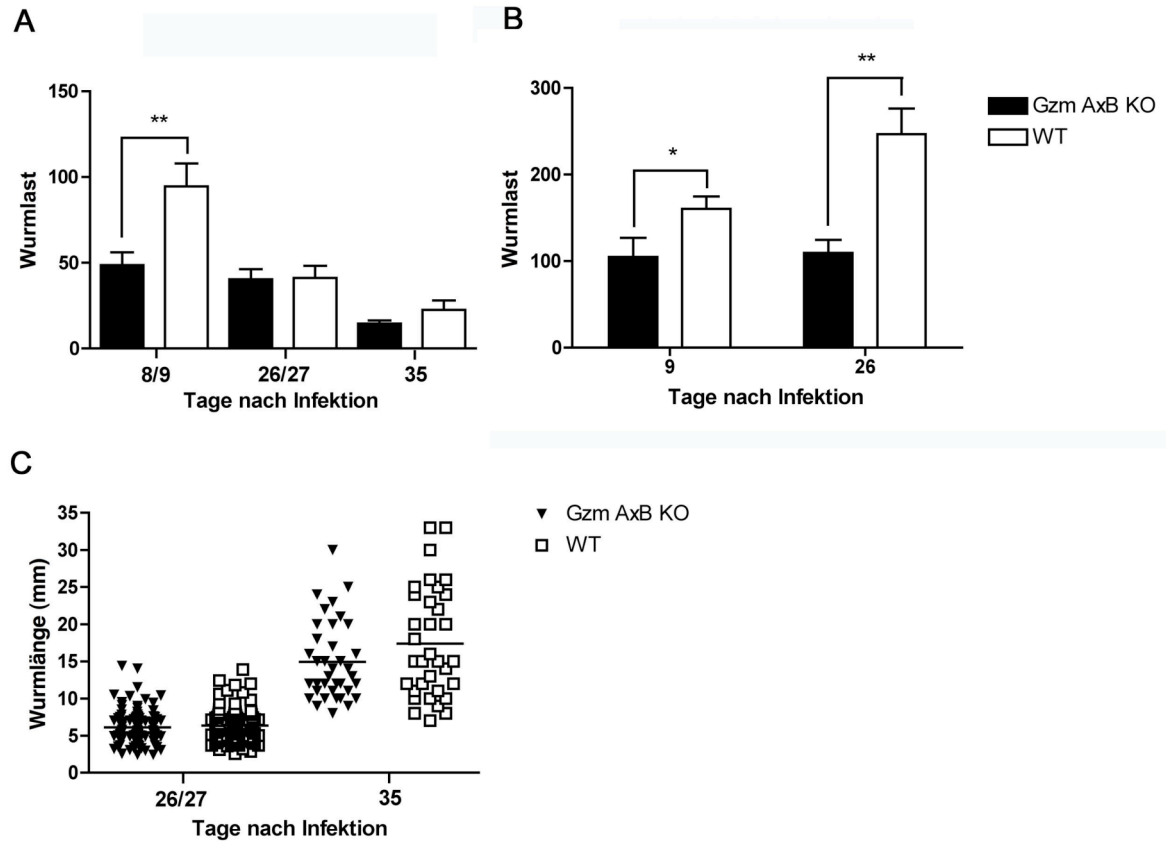


Abb. 3.17: Einfluss der Gzm AxB Defizienz auf die Entwicklung von *L. sigmodontis*.

A) Gzm AxB KO und WT Mäuse wurden mit *L. sigmodontis* infiziert. Die Anzahl der Würmer in der Pleurahöhle wurden in unabhängigen Versuchen an Tag 9, 26/27 und Tag 35 p.i. bestimmt und entsprach einer mittleren Wurmlast. Dargestellt ist die Zusammenfassung von drei Versuchen mit insgesamt 15 Mäusen pro Gruppe. **B)** Gezeigt ist die Wurmlast an Tag 9 und Tag 26 p.i. mit einer hohen infektiösen Dosis (mittlere Wurmlast > 100 Würmer) von 10 Gzm AxB KO Mäusen und 14 WT Mäusen. **C)** Die Wurmlänge wurde an Tag 26/27 und Tag 35 p.i. nach Fixierung mit 70 % Ethanol bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die Länge eines Wurmes. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Die Länge der Würmer wurde an Tag 26/27 p.i. und Tag 35 p.i. nach Fixierung der Würmer in 70 % Ethanol bestimmt. Damit sollte untersucht werden, ob neben der Verminderung der Wurmanzahl auch ein Einfluss auf die Entwicklung des Wurmes besteht. Der Vergleich der Wurmlängen ergab ein vergleichbares Längenwachstum der Würmer (Abb. 3.17C). An Tag 26/27 p.i. hatten die Würmer in Gzm AxB KO Mäusen eine mittlere Länge von 6,1 mm und in WT Mäusen von 6,3 mm. In beiden Mäusen nahm die

Länge der Würmer innerhalb von 7 Tagen um mehr als das Doppelte zu: In den Gzm AxB KO Mäusen betrug die Wurmlänge $14,9 \pm 1$ mm und in den WT Mäusen $17,4 \pm 1$ mm.

3.2.3.2 Entwicklung von *L. sigmodontis* in Gzm A KO, Gzm B KO und WT Mäusen

Gzm A KO, Gzm B KO und WT Mäuse wurden mit *L. sigmodontis* infiziert und die Anzahl der Würmer bestimmt. Gzm A KO Mäuse (138 ± 25) hatten an Tag 9 p.i. doppelt so viele Würmer wie WT Mäuse (70 ± 13) in der Pleurahöhle. An Tag 26 p.i. war die Anzahl der Würmer in der Pleurahöhle dagegen nicht unterschiedlich (Abb. 3.18A). Insgesamt wurden sieben unabhängige Versuche mit Gzm B KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen durchgeführt. Die Wurmlast an Tag 9 p.i. wurde in zwei unabhängigen Versuchen bestimmt. Bei einer mittleren infektiösen Dosis konnte kein Unterschied zwischen Gzm B KO und WT Mäusen festgestellt werden. Die Bestimmung der Wurmlast an Tag 26/27 p.i. ergab eine Unterscheidung der infektiösen Dosis in niedrig, mittel und hoch (siehe Abschnitt 3.2.3). Für eine niedrige und hohe infektiöse Dosis zeigte sich eine ca. fünffach verminderte Wurmlast in Gzm B KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen (Abb. 3.18B). Für die mittlere Wurmlast war die Anzahl der Würmer an Tag 9 p.i. (Abb. 3.18B) und Tag 26/27 p.i. (Abb. 3.18B) in beiden Gruppen gleich hoch.

Die Bestimmung des Längenwachstums der Würmer ergab eine Verminderung der L4/jungen adulten Würmer in Gzm A KO im Vergleich zu WT Mäusen. Die Würmer aus den Gzm A KO Mäusen entwickelten sich zu einer Länge von 5,6 mm, während die Würmer aus den WT Mäusen 7,3 mm lang waren. Die Länge der Würmer aus Gzm B KO Mäusen (6,9 mm) entsprach an Tag 26/27 p.i. der in WT Mäusen (7,9 mm).

Somit zeigte sich in Gzm B KO Mäusen ein Phänotyp, der dem von Gzm AxB KO Mäusen gleich. Die Defizienz von Gzm A scheint dagegen einen konträren Einfluss auf die Entwicklung von *L. sigmodontis* zu haben. An Tag 9 p.i. konnten aus der Pleurahöhle von Gzm A KO Mäusen mehr Würmer als aus WT Mäusen isoliert werden und diese zeigten ein vermindertes Längenwachstum an Tag 27 p.i.. Die folgenden Untersuchungen wurde unter Verwendung der Gzm AxB KO im Vergleich zu WT Mäusen durchgeführt. Dabei sollte geklärt werden, ob die verminderte Wurmlast in Gzm AxB KO Mäusen auf eine Veränderung der Immunantwort gegen den Wurm basiert.

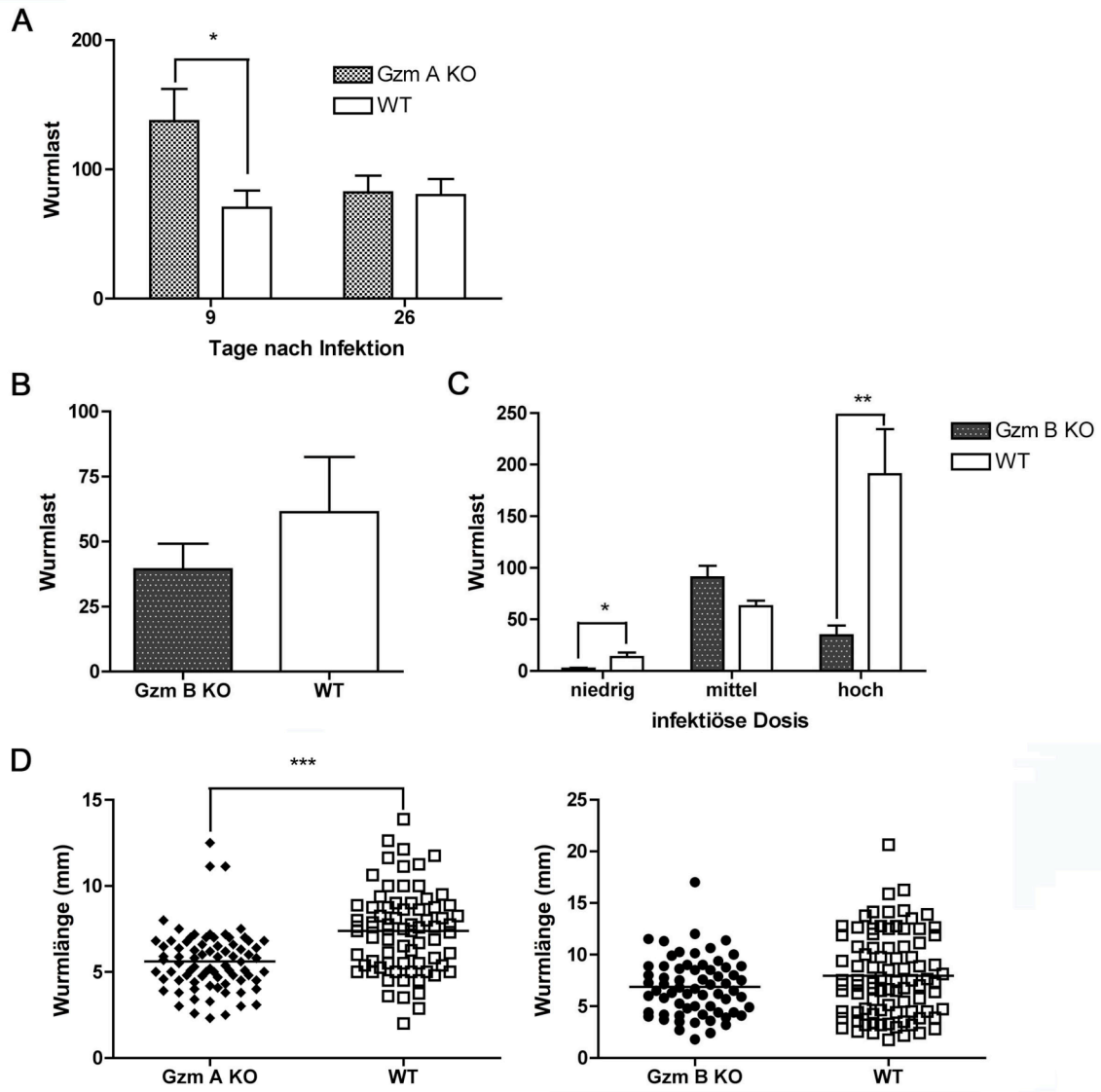


Abb. 3.18: Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf den Verlauf der Infektion mit *L. sigmodontis*. **A)** Gzm A KO und WT Mäuse wurden mittels natürlicher Infektion mit *L. sigmodontis* Larven infiziert. Die Anzahl der Würmer in der Pleurahöhle wurden in drei unabhängigen Versuchen an Tag 9 und an Tag 26/27 p.i. bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM von 11 Gzm AxB KO und 14 WT Mäusen an Tag 9 p.i. und 13 Gzm AxB KO und 12 WT Mäusen an Tag 26 p.i.. **B)** An Tag 9 p.i. wurde die Wurmlast in zwei unabhängigen Versuchen von insgesamt 8 Gzm B KO und WT Mäusen ermittelt. **C)** Die Anzahl der Würmer in Gzm B KO und WT Mäusen wurde nach natürlicher Infektion an Tag 26/27 p.i. bestimmt. Insgesamt wurden fünf Versuche mit vier bis sechs Mäusen pro Gruppe durchgeführt. Anhand der Wurmlast wurde zwischen niedriger (zwei Versuche), mittlerer (zwei Versuche) und hoher (ein Versuch) infektiöser Dosis unterschieden. **D)** Die Länge der Würmer wurde nach Fixierung mit 70 % Ethanol an Tag 27 p.i. bestimmt. Jeder Punkt repräsentiert die Länge eines Wurmes. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

3.2.4 Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Immunantwort gegen *L. sigmodontis*

3.2.4.1 Charakterisierung der Zellpopulationen während der Infektion

Gzm A und B fördern über die Degradation von extrazellulären Matrixproteinen die Migration von Lymphozyten durch Gewebe oder aus dem Blutendothel. Während der Infektion mit *L. sigmodontis* kommt es, nachdem die Würmer die Pleurahöhle erreicht haben, zur Einwanderung von Zellen. Die Komposition der Zellen in der Pleurahöhle und die Gesamtanzahl der Zellen wurden im Verlauf der Infektion analysiert.

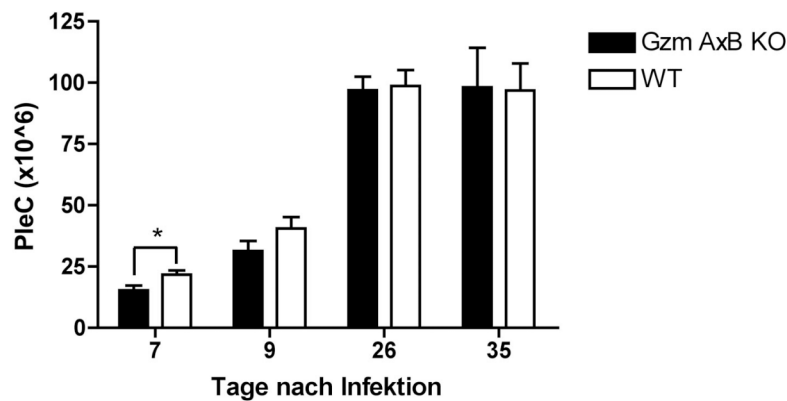


Abb. 3.19: Unterschiedliche Zellzahlen in Gzm AxB KO und WT Mäusen in der frühen Phase der Infektion. A) PleC wurden an verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit *L. sigmodontis* isoliert und die Gesamtzellzahl nach Färbung mit Trypanblau ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von vier unabhängigen Versuchen mit insgesamt 19 Gzm AxB KO und WT Mäusen an Tag 7, 9 und 26/27 p.i.. An Tag 35 p.i. wurden die Daten in drei unabhängigen Versuchen von 10 Gzm AxB KO und 15 WT Mäuse erhoben. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

Die Anzahl der PleC wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Trypanblaufärbung bestimmt und ist in Abb. 3.19 dargestellt. In der sehr frühen Phase der Infektion schien die Einwanderung der Lymphozyten in Gzm AxB KO im Vergleich zu WT Mäusen verzögert zu sein. An Tag 7 p.i. hatten $1,5 \times 10^7$ Zellen in Gzm AxB KO und $2,1 \times 10^7$ Zellen in WT Mäusen die Pleurahöhle erreicht. Innerhalb von 2 Tagen (Tag 9 p.i.) hatte sich die Anzahl der PleC in Gzm AxB KO ($3,1 \times 10^7$) und WT Mäusen (4×10^7) verdoppelt und war tendenziell in Gzm AxB KO Mäusen vermindert. Zwischen Tag 9 p.i. und Tag 26/27 p.i. kam es zu einem massiven Influx an Zellen: Sowohl in den Gzm AxB KO als auch in den WT Mäusen lag die Gesamtzellzahl bei 1×10^8 Zellen.

Neben Lymphozyten sind Granulozyten und Makrophagen in die Pleurahöhle infizierter Mäuse eingewandert. Die drei Leukozytenpopulationen lassen sich im Durchflusszytometer anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) unterscheiden (Abb. 3.20A). Der prozentuale Anteil der einzelnen Populationen wurde im Verlauf der Infektion mit *L. sigmodontis* ermittelt und ist als Übersicht in Abb. 3.20B zu sehen.

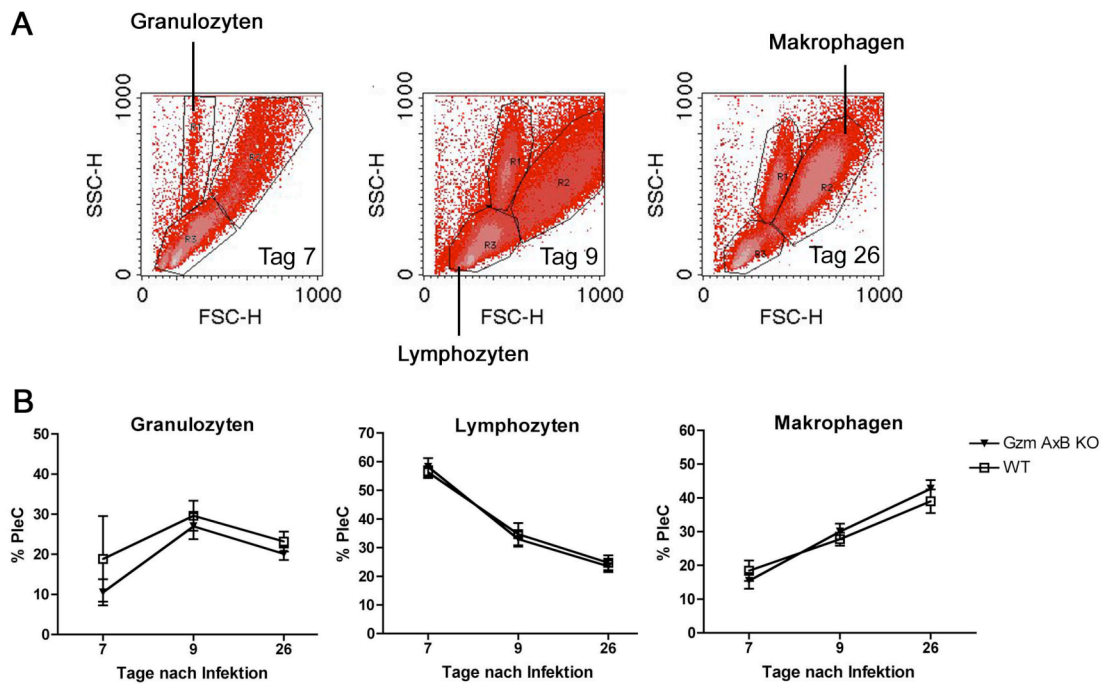


Abb. 3.20: Die Leukozytenverteilung in der Pleurahöhle folgt einer ähnlichen Kinetik in Gzm AxB KO und WT Mäusen. **A)** PleC wurden nach Infektion mit *L. sigmodontis* isoliert und anhand ihrer Größe und Granularität im Durchflusszytometer in Granulozyten (R1), Makrophagen (R2) und Lymphozyten (R3) eingeteilt. Gezeigt ist ein exemplarisches Beispiel von PleC einer WT Maus, dargestellt im FSC/SSC. Der prozentuale Anteil an Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen wurde im Verlauf der Infektion in Gzm AxB KO und WT Mäusen ermittelt (**B**). Die Werte sind als Mittelwert \pm SEM aufgetragen und repräsentieren drei Versuche mit 10 bis 16 Mäusen pro Gruppe.

Es zeigte sich, dass der Anteil an Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten zu allen untersuchten Zeitpunkten der Infektion in den Gzm AxB KO und WT Mäusen vergleichbar hoch war. An Tag 7 p.i. bildeten Lymphozyten mit einem prozentualen Anteil von 60 % die Hauptpopulation in der Pleurahöhle. Bis Tag 26 p.i. nahm dieser Anteil in beiden Mäusen gleichermaßen ab (ca. 25 %). Der prozentuale Anteil der Granulozyten lag an allen untersuchten Zeitpunkten unter 30 %. Demgegenüber steht eine Verdopplung des Makrophagen-Anteils in der Pleurahöhle von Gzm AxB KO und WT Mäusen zwischen Tag 7 p.i. und Tag 26 p.i..

Da Lymphozyten die Hauptproduzenten von Gzm A und B sind, wurden diese im Verlauf der Infektion mit *L. sigmodontis* näher charakterisiert. Für die Bestimmung der einzelnen Zellpopulationen wurden PleC im Durchflusszytometer auf Lymphozyten (siehe Abb. 3.20A, R3) eingestellt und wie in Abschnitt 3.1.1 definiert.

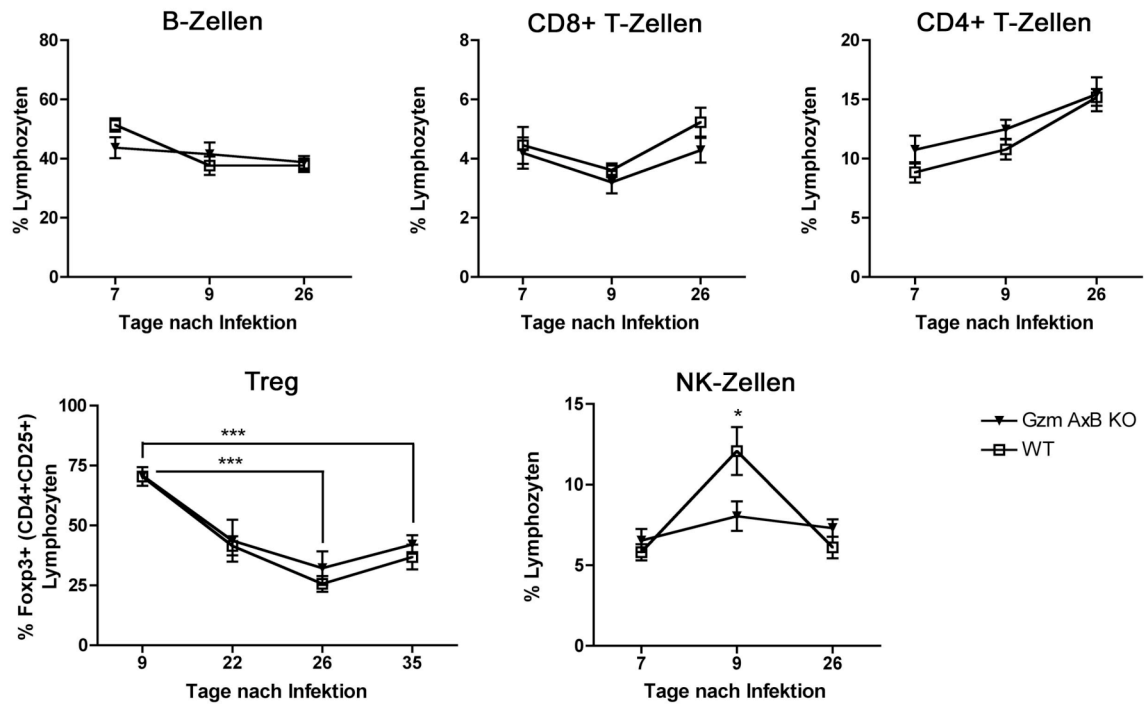


Abb. 3.21: Anteil der NK-Zellen ist im Vergleich zu WT Mäusen in der Pleurahöhle an Tag 9 p.i. in Gzm AxB KO vermindert.. A) Die Expression von CD3, CD4, CD8, CD19, CD25, DX5 und Foxp3 wurde in PleC während der Infektion mit *L. sigmodontis* ermittelt. Der Anteil der einzelnen Lymphozytensubpopulationen wurde an verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion durchflusszytometrisch bestimmt. Pro Zeitpunkt wurden Mittelwert \pm SEM aus zwei bis vier unabhängigen Versuchen mit 5 bis 19 Mäusen pro Gruppe ermittelt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Der Anteil an B- und T-Lymphozyten war an allen untersuchten Zeitpunkten in Gzm AxB KO und WT Mäusen vergleichbar (Abb. 3.21). Wie bereits für Milzzellen gezeigt, bildeten B-Zellen mit einem prozentualen Anteil von 50 % die stärkste Population. Treg wurden über ihre Expression von CD4, CD25 und Foxp3 definiert. Es zeigte sich innerhalb der CD4⁺CD25⁺ Fraktion eine sehr starke Abnahme des Anteils Foxp3⁺ Treg im Verlauf der Infektion mit *L. sigmodontis*. In den Gzm AxB KO und WT Mäusen waren an Tag 9 p.i. 70 % der CD4⁺CD25⁺ Lymphozyten Foxp3⁺, an Tag 35 p.i. lag der Anteil bei ca. 40 %. Insgesamt folgten die Lymphozyten in der Pleurahöhle von Gzm AxB KO und WT Mäusen

einer ähnlichen Kinetik. Einzige Ausnahme bildeten die NK-Zellen (Abb. 3.21). Der Anteil an NK-Zellen war in Gzm AxB KO Mäusen (8 %) im Vergleich zu WT Mäusen (12 %) vermindert.

Die Ergebnisse zeigen, dass in der frühen Phase der Infektion (Tag 7 p.i. bis Tag 9 p.i.) geringfügige Unterschiede bestehen. Insbesondere die Einwanderung von Leukozyten ist an Tag 7 p.i. in Abwesenheit von Gzm A und B beeinträchtigt. Zwischen Tag 9 p.i. und Tag 27 p.i. kam es in beiden Mäusen zu einer fünffachen Erhöhung der Gesamtzellzahl.

3.2.4.2 Zytokinantwort in der frühen und mittleren Phase der Infektion

Die Zytokinantwort gegen *L. sigmodontis* hat sowohl T_H1- als auch T_H2-Charakter. In der frühen Phase der Infektion kommt es zur Ausbildung einer T_H1-Antwort, wohingegen in der späten Phase, wenn es zur Auflösung der Infektion kommt, die T_H2-Zytokine dominieren. Gzm AxB KO und WT Mäuse wurden mit *L. sigmodontis* infiziert und in der frühen Phase (Tag 7 und 9 p.i.) der Infektion die Produktion der T_H1-spezifischen Zytokine IL-2 und IFN- γ und in der mittleren Phase (Tag 27 p.i.) die Synthese des T_H2-spezifischen Zytokins IL-5 analysiert.

PleC, isoliert an Tag 7 p.i., zeigten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin eine sehr stark ausgeprägte T_H1-Antwort (Abb 3.22). Um die IFN- γ -Synthese durch Lymphozyten zu verifizieren, wurden zwei separate Färbungen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurde CD4, CD8 und CD3 als T-Zellmarker mit IFN- γ gefärbt. Die Zellen wurden auf CD3⁺ Zellen eingestellt und der Anteil IFN- γ ⁺ T-Zellen ermittelt. Der prozentuale Anteil IFN- γ ⁺ T-Zellen (CD4⁺ und CD8⁺) war in Gzm AxB KO und WT Mäusen gleich hoch (Abb. 3.22A). In einem zweiten Ansatz wurde NK1.1 als NK-Zellmarker gegen CD3 und IFN- γ gefärbt. Nach Einstellen auf CD3⁻ Zellen ergab sich ein vergleichbar hoher Anteil IFN- γ ⁺ NK-Zellen in der Pleurahöhle von Gzm AxB KO und WT Mäusen (Abb. 3.22B). Der Gesamtanteil IFN- γ ⁺ Lymphozyten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin lag in beiden Mäusen bei ca. 6 % (Abb. 3.22C). Parallel dazu wurde die Expression von IL-2 in PleC bestimmt; Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin waren ca. 4 % der Lymphozyten in Gzm AxB KO und WT Mäusen positiv für IL-2 (Abb. 3.22D).

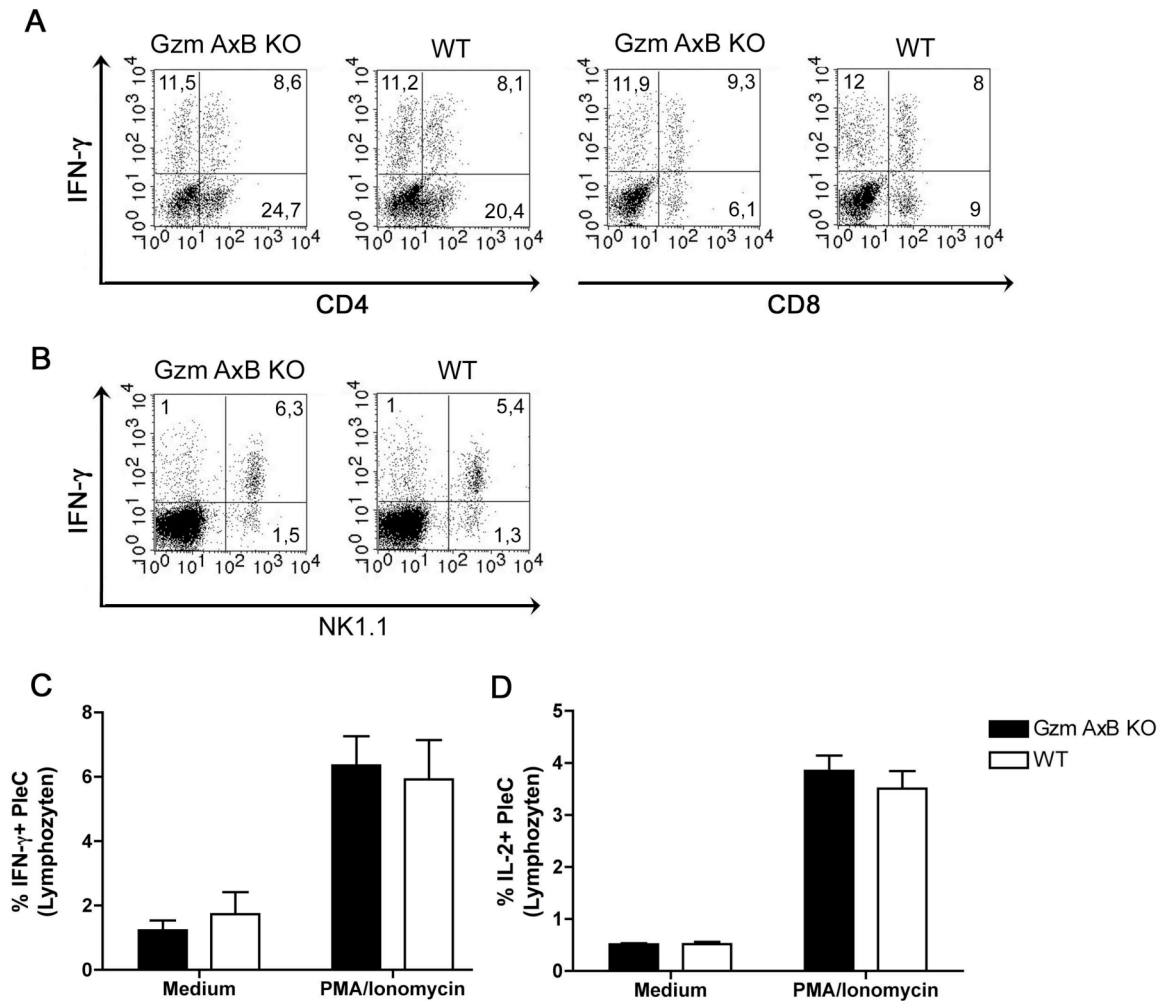


Abb. 3.22: PleC (Tag 7 p.i.) von Gzm AxB KO und WT Mäusen exprimieren nach Stimulation mit PMA/Ionomycin gleich viel IFN- γ und IL-2. PleC (1×10^6 , Tag 7 p.i.), wurden nach 6 h Stimulation mit PMA/Ionomycin in Anwesenheit von Monensin vierfach gefärbt. **A)** Dargestellt ist die Synthese von IFN- γ in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach Einstellen auf CD3⁺ Zellen und **B)** die IFN- γ -Synthese von NK-Zellen nach Einstellen auf CD3⁺ Zellen. Die prozentualen Anteile sind in den einzelnen Quadranten dargestellt. Mittelwerte \pm SEM der Anteile IFN- γ ⁺ (**C**) und (**D**) IL-2⁺ Lymphozyten aus zwei unabhängigen Versuchen mit zehn Gzm AxB KO und elf WT PleC sind gezeigt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

An Tag 9 nach Infektion mit *L. sigmodontis* wurde die Sekretion von IFN- γ und IL-2 durch PleC zusätzlich mittels ELISA analysiert (Abb. 3.23A). PleC von Gzm AxB KO und WT Mäusen wurden in drei unabhängigen Versuchen für 72 h mit Medium, Con A oder LsAg stimuliert. Anschließend wurde in den Überständen die IFN- γ - und IL-2-Konzentrationen ermittelt.

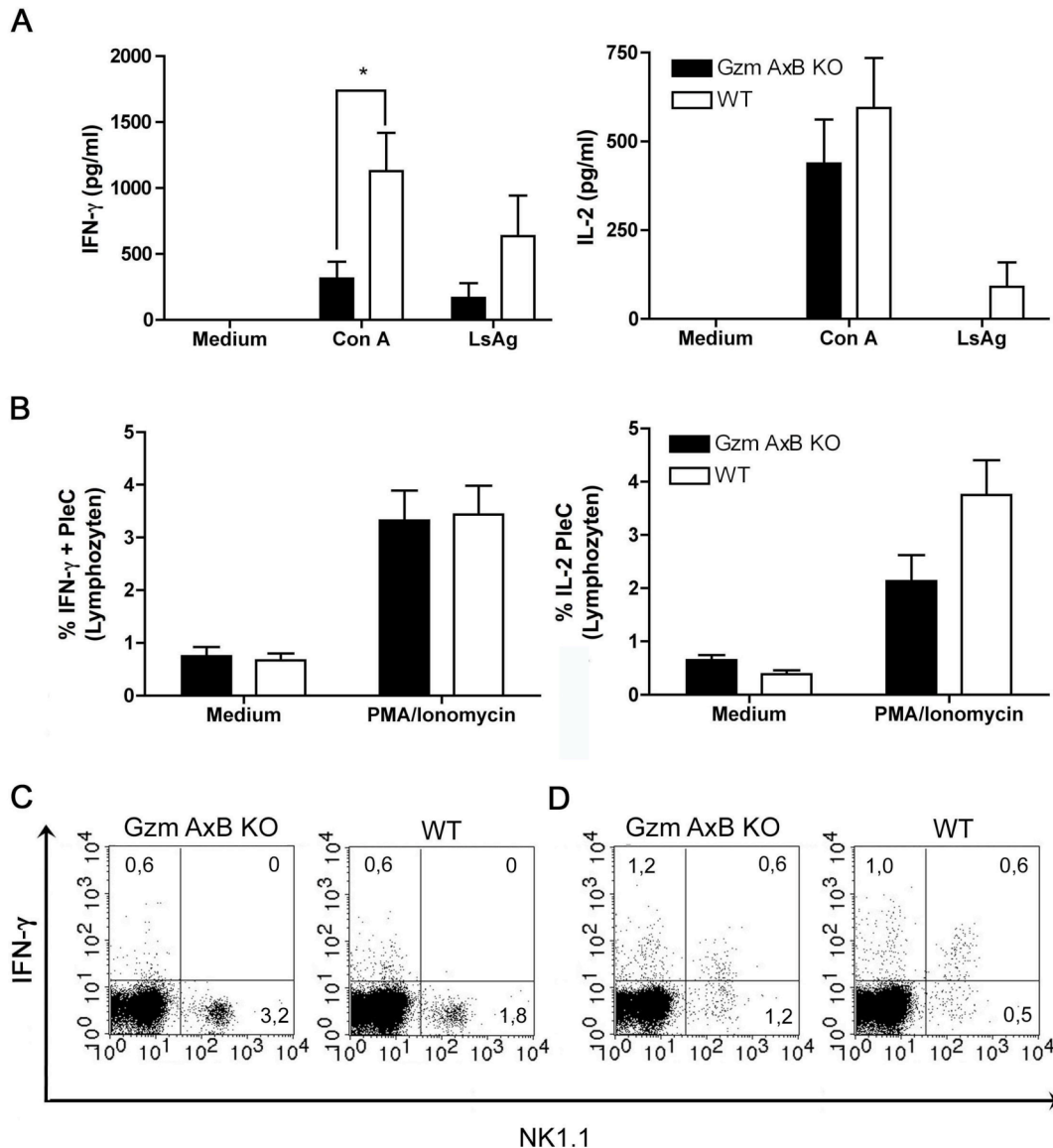


Abb. 3.23: Pro-inflammatorische Zytokinantwort von PleC an Tag 9 p.i.. **A)** PleC (5×10^5) wurden für 72 h mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A oder $25 \mu\text{g/ml}$ LsAg stimuliert und die Menge an sekretiertem IFN- γ und IL-2 im ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 8-10 Mäusen pro Gruppe. **B)** PleC (1×10^6) wurden 6 h mit 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert (4 h in Anwesenheit von Monensin). Der Anteil IFN- γ^+ und IL-2 $^+$ Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von zwölf Mäusen pro Gruppe für IFN- γ und fünf Mäusen pro Gruppe für IL-2. **C)+D)** Beispielfärbung von Gzm AxB KO und WT PleC nach Einstellen auf CD3 $^+$ Zellen nach Inkubation in Medium (C) oder PMA/Ionomycin (D). Die x-Achse zeigt die Expression des NK-Zellmarkers NK1.1, die y-Achse die IFN- γ Expression. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

Die antigenspezifische Zytokinsekretion war in beiden Mäusen sehr gering (Abb. 3.23A), jedoch tendenziell in Gzm AxB KO PleC niedriger als in WT PleC. Die Stimulation von Gzm A und B defizienten PleC mit Con A hatte eine verminderte Sekretion von IFN- γ zur

Folge: Gzm AxB KO PleC sezernierten 314 ± 126 pg/ml IFN- γ , wohingegen WT PleC 1127 ± 292 pg/ml IFN- γ produzierten (Abb. 3.23A). Um zu untersuchen, ob die verminderten IFN- γ -Level in den Überständen der Gzm AxB KO PleC auf der Reduktion der NK-Zellen in der Pleurahöhle an Tag 9 p.i. basieren (siehe Abb. 3.21), wurde im Durchflusszytometer die Produktion von IFN- γ analysiert. In drei unabhängigen Versuchen war der Gesamtanteil IFN- γ^+ Lymphozyten in Gzm AxB KO und WT PleC gleich hoch (Abb. 3.23B). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin lag der Anteil positiver Lymphozyten in Gzm AxB KO Mäusen bei 3,3 % und in WT Mäusen bei 3,4 %. Die Synthese von IFN- γ durch NK-Zellen war ebenfalls nicht unterschiedlich (Abb. 3.23C und D).

Die IL-2-Synthese, die nach 72 h Stimulation im ELISA (Abb. 3.23A) und nach 6 h Stimulation im Durchflusszytometer (Abb. 3.23B) analysiert wurde, unterschied sich nicht in PleC von Gzm AxB KO und WT Mäusen.

Parallel dazu wurden an Tag 9 p.i. Milzzellen isoliert und die Synthese von IL-4, IL-10, IFN- γ und IL-2 nach 72 h Stimulation mit Con A bestimmt (Abb. 3.24). Es zeigte sich eine tendenziell verminderte IFN- γ -Sekretion in Abwesenheit von Gzm A und B: Gzm AxB defiziente Milzzellen sezernierten $94,9 \pm 52$ pg/ml IFN- γ und WT Milzzellen 277 ± 83 pg/ml IFN- γ . Die IL-4-, IL-10- und IL-2-Konzentrationen waren in Überständen der Milzzellen beider Mäusen vergleichbar hoch. Milzzellen beider Mäuse zeigten jedoch nach Stimulation mit Con A im Vergleich zu naiven Milzzellen eine auffallend hohe IL-10-Synthese (siehe Abb. 3.5). Naive Milzzellen sezernierten nach Stimulation mit Con A ca. 200 pg/ml IL-10, während Milzzellen an Tag 9 p.i. 1500 pg/ml IL-10 produzierten.

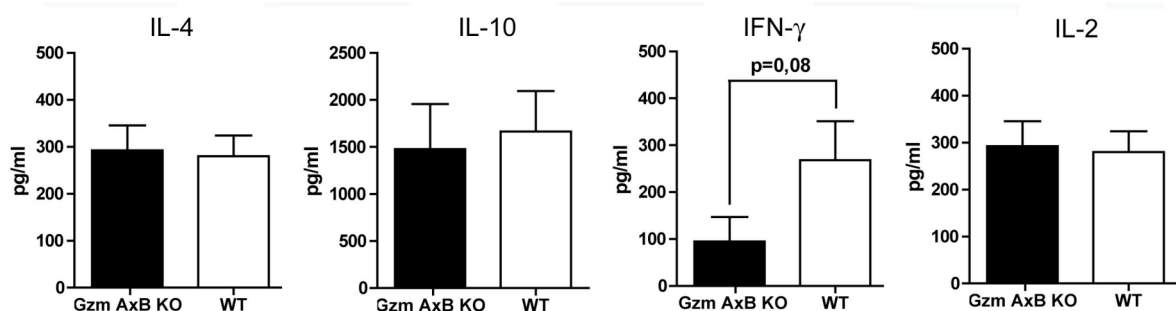


Abb. 3.24: T_H1- und T_H2-Zytokinexpression ist vergleichbar in Gzm AxB KO und WT Milzzellen. Milzzellen (5×10^5) wurden für 72 h mit $2 \mu\text{g/ml}$ Con A stimuliert und die Menge an sekretiertem IL-4, IL-10, IFN- γ und IL-2 im Überstand mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 9-14 Mäusen pro Gruppe. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt.

In der mittleren Phase der Infektion dominiert am Ort der Infektion die T_H2-Antwort. Mittels Durchflusszytometrie wurde an Tag 27 p.i. die Expression von IL-5 in PleC untersucht (Abb. 3.25). Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin war der Anteil IL-5⁺ Lymphozyten in Gzm AxB KO PleC mit 6,2 % gegenüber 2,7 % in WT PleC deutlich erhöht. Hauptproduzenten für IL-5 waren CD4⁺ T-Zellen. Durch Stimulation mit LsAg konnte die Produktion von IL-5 nicht induziert werden.

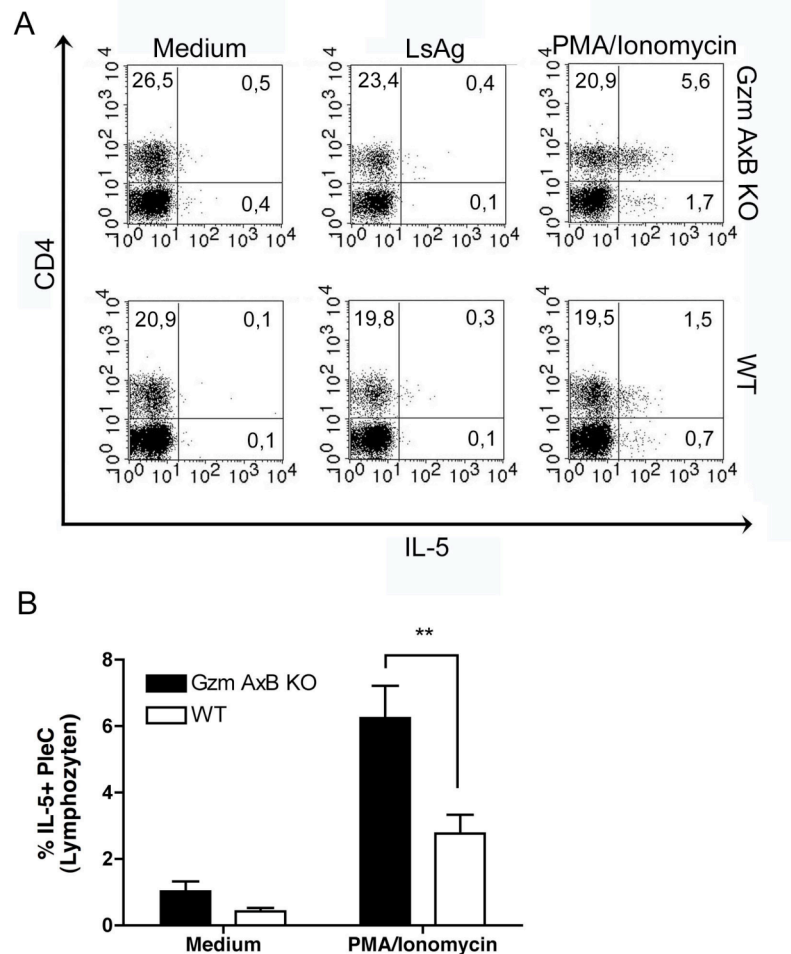


Abb. 3.25: Erhöhte Expression von IL-5 in Gzm AxB KO PleC (Tag 26 p.i.) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. 1×10^6 PleC wurden in Anwesenheit von Monensin mit 25 $\mu\text{g/ml}$ LsAg oder 10 ng/ml PMA und 500 ng/ml Ionomycin stimuliert. Die Menge an synthetisiertem IL-5 wurde durchflusszytometrisch intrazellulär ermittelt. **A**) Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel einer Gzm AxB KO (obere Reihe) und einer WT Maus (untere Reihe). IL-5 ist auf der x-Achse aufgetragen, CD4 ist auf der y-Achse zu sehen. Die Werte in den Quadranten geben den Prozentsatz positiver Zellen, nach Einstellen der PleC auf Lymphozyten, wieder. **B**) Statistische Auswertung des Anteils IL-5⁺ Lymphozyten nach Stimulation mit PMA/Ionomycin. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen mit insgesamt zehn Mäusen pro Gruppe. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (** $p < 0,01$).

Zusammenfassend hat sich eine Verschiebung der Zytokinantwort in Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich WT Mäusen gezeigt. Die pro-inflammatorische Zytokinantwort war an Tag 7 p.i. nach Stimulation mit PMA/Ionomycin in PleC unabhängig von Gzm A und B sehr stark ausgeprägt. Eine nicht identifizierte Population Gzm AxB defizienter PleC sezernierte dagegen an Tag 9 p.i. weniger IFN- γ als WT PleC. An Tag 27 p.i. war der Anteil IL-5⁺ T_H2-Zellen in PleC von Gzm AxB KO Mäusen höher als in WT Mäusen.

3.2.4.3 Hypoproliferation von PleC

Charakteristisch für Infektionen mit humanen und murinen Filarienspezies ist der Verlust der antigenspezifischen T-Zellproliferation (Babayán et al., 2003; Ottesen, Weller & Heck, 1977; Piessens et al., 1980). Dieses als Hypoproliferation beschriebene Phänomen konnte in dieser Arbeit für Gesamt-Lymphozyten bestätigt werden. Die antigen- und mitogenspezifische Proliferation wurde während des gesamten Verlaufes der Infektion untersucht und ist für Tag 9 p.i. exemplarisch in Abb. 3.26 gezeigt. Milzzellen und PleC wurden für 72 h mit Medium, LsAg und Con A inkubiert und anschließend die Inkorporation von [³H]-Thymidin gemessen. Im Vergleich zur Mediumkontrolle kam es in Milzzellen unabhängig von Gzm A und B unter dem Einfluss von LsAg zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation (Abb. 3.26A). In Anwesenheit von Con A zeigten Milzzellen beider Mäuse eine vergleichbare Zellteilung, diese lag jedoch mit 7500 cpm, unter dem zuvor ermittelten Wert naiver Milzzellen (Gzm AxB KO: 8708 \pm 1023 cpm und WT: 13340 \pm 1446, siehe Abb. 3.6). Im Gegensatz dazu kam es in PleC in Anwesenheit von LsAg oder Con A nicht zu einer verstärkten Inkorporation von [³H]-Thymidin. Im Vergleich zur Mediumkontrolle war die Proliferation der PleC sogar um mehr als die Hälfte reduziert (Abb. 3.26B).

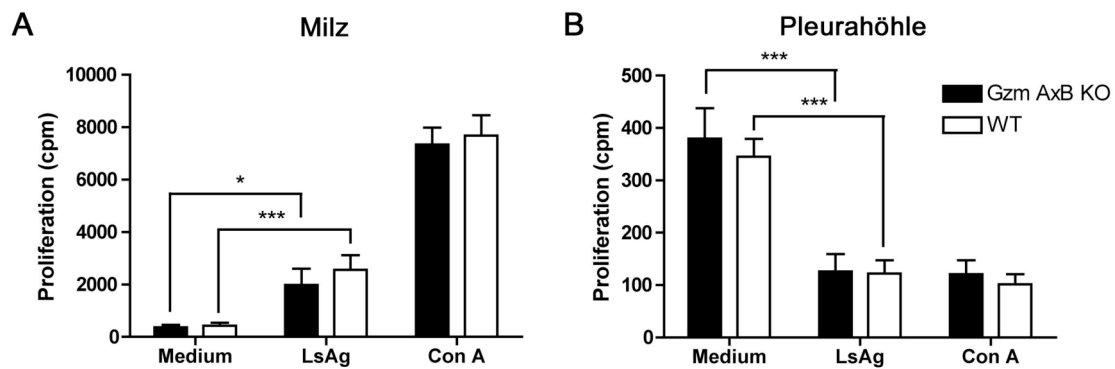


Fig. 3.26: Hypoproliferation von Milzzellen und PleC an Tag 9 p.i.. Milzzellen (A) und PleC (B) wurden an Tag 9 nach Infektion mit *L. sigmodontis* isoliert und für 72 h mit Medium, 50 $\mu\text{g/ml}$ LsAg oder 2 $\mu\text{g/ml}$ Con A inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde mittels [^3H]-Thymidin-Inkorporation gemessen und als cpm dargestellt. Die Mittelwerte \pm SEM zeigen eine Zusammenfassung aus drei Experimenten mit insgesamt 14 bis 16 Mäusen pro Gruppe. Die Einzelwerte pro Maus wurden in Triplikaten ermittelt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

Zusammenfassend konnte also eine Verminderung der Proliferation während der Infektion in Zellen der Milz und Pleurahöhle gezeigt werden. In PleC kam es sogar unter dem Einfluss der Stimuli zu einer Reduktion der Zellteilung.

3.2.4.4 Zelltod induziert durch Stimulation der PleC

Aufgrund der verminderten Proliferation nach Stimulation mit Con A und LsAg wurde die Vitalität der PleC mithilfe einer Zelltod-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt. Die Färbung basiert auf der Exposition von PS an die Oberfläche apoptotischer Zellen. Durch Verwendung von fluoreszenzmarkiertem Annexin V, das an PS bindet, kann der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt werden. Die Doppelfärbung mit PI ermöglicht dabei die Unterscheidung früh apoptotischer (Annexin V⁺PI⁻) und spät apoptotischer oder bereits toter Zellen (Annexin V⁺PI⁺). PleC wurden zu diesem Zweck unmittelbar nach Isolation an Tag 9 p.i. gefärbt. Der Anteil Annexin V⁺PI⁺ Lymphozyten lag in Gzm AxB KO und WT Mäusen bei ca. 1 %. Auch bei den Annexin V⁺PI⁻ Lymphozyten konnte mit einem Anteil von 5 % kein Unterschied zwischen den Mauslinien festgestellt werden. Nach dreitägiger Inkubation der Zellen zeigten sich bereits bei Betrachtung der Zellen im FSC/SSC deutliche Veränderungen: in 85 % der Proben konnte eine drastische Verminderung der Lymphozyten (Abb. 3.27A, siehe Kreis) beobachtet werden.

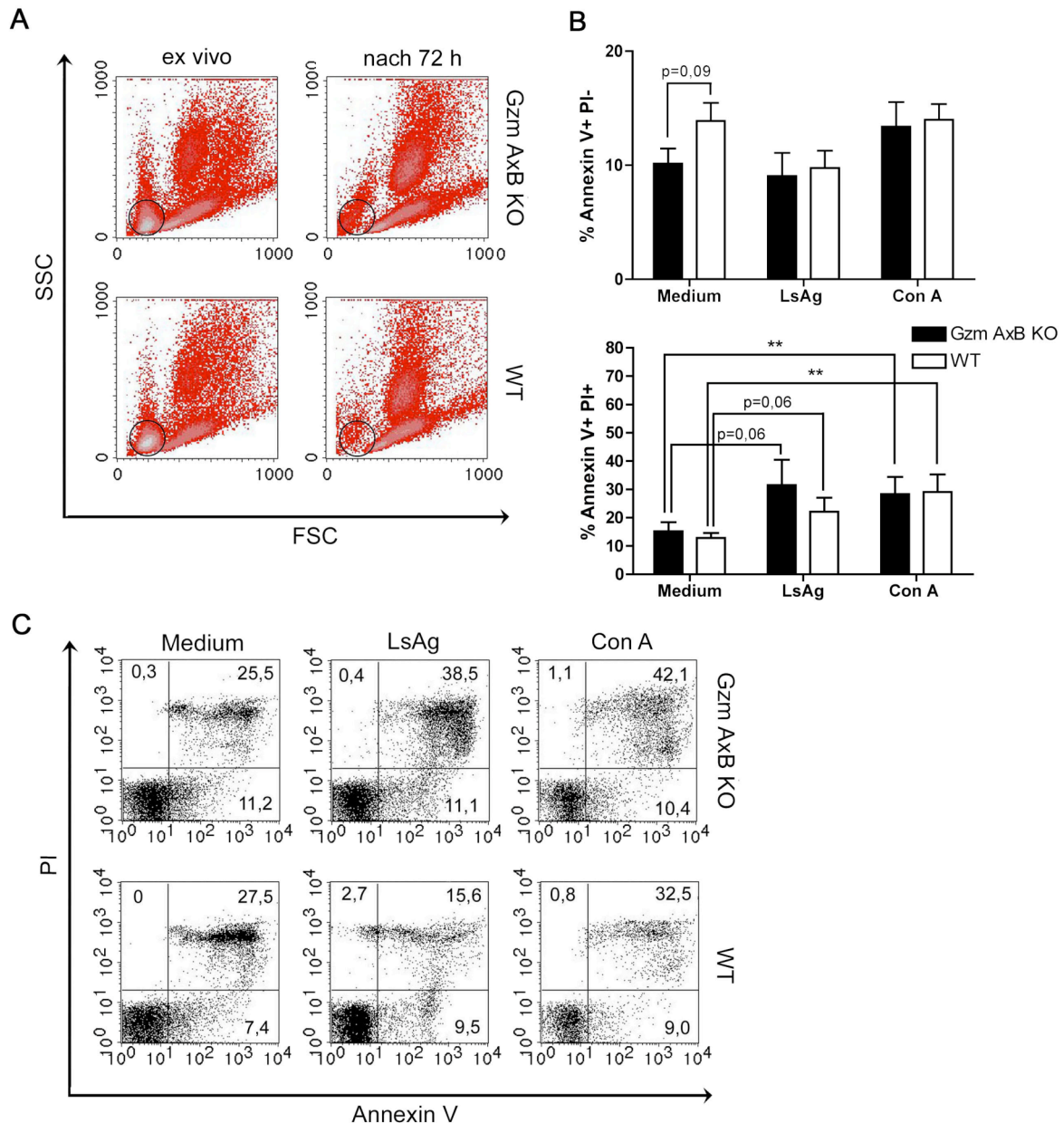


Abb. 3.27: Stimulation von PleC mit Con A induziert Zelltod in Lymphozyten. PleC (Tag 9 p.i.) wurden in drei unabhängigen Versuchen für 72 h mit Medium, 50 µg/ml LsAg oder 2 µg/ml Con A inkubiert. Anschließend wurde der Anteil toter und apoptotischer Zellen mittels PI-Inkorporation und Annexin V-Bindung analysiert. **A)** Zu sehen sind nach der Isolation der Zellen (*ex vivo*) und nach 72 h Inkubation Gzm AxB KO und WT PleC im FSC (x-Achse) und SSC (y-Achse). **B)** Statistische Auswertung des Anteils Annexin V⁺PI⁻ und Annexin V⁺PI⁺ Lymphozyten. Die Mittelwerte ± SEM zeigen eine Zusammenfassung mit insgesamt zwölf Mäusen pro Gruppe für Medium und Con A und acht Mäusen pro Gruppe für LsAg **C)** Repräsentatives Beispiel von stimulierten PleC einer Gzm AxB KO und WT Maus nach Färbung mit PI (y-Achse) und Annexin V (x-Achse). Die prozentualen Anteile sind in den einzelnen Quadranten dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (** p < 0,01).

Darüber hinaus nahm der Anteil Annexin V⁺PI⁺ nach Inkubation mit Con A im Vergleich zu Medium in beiden Mäusen signifikant zu (Abb. 3.27B). Nach Inkubation der PleC mit LsAg waren 30 % der Lymphozyten in den Gzm AxB KO und 22 % in WT Mäusen Annexin V⁺PI⁺, wohingegen der Anteil in der Mediumkontrolle bei 12 - 15 % lag (Abb. 3.27B). Unabhängig vom verwendeten Stimulus waren 10 % der Lymphozyten Annexin V⁺PI⁻ (Abb. 3.27B).

Die Zelltodfärbung zeigte somit, dass der Anteil toter und spät apoptotischer Lymphozyten in Gzm AxB KO und WT Mäusen nach Stimulation mit Con A oder LsAg gleichermaßen anstieg, während der Anteil früh apoptotischer Zellen unverändert blieb.

3.2.4.5 Induktion von AICD in CD4⁺ T-Zellen durch polyklonale Restimulation

Gzm B spielt nicht nur bei der Induktion des Zelltodes in infizierten und entarteten Zellen eine Rolle, sondern kann zudem intrinsisch bei Restimulierung des TZR in T_H2-Zellen AICD auslösen. Während der Infektion mit *L. sigmodontis* kommt es zur polyklonalen Aktivierung von Effektorzellen. Durch Restimulierung von PleC durch Con A sollte *in vitro* in PleC AICD ausgelöst werden. Gleichzeitig sollte überprüft werden, ob die Defizienz von Gzm A und B einen Einfluss auf die Sterberate der Zellen hat. PleC, isoliert an Tag 7 p.i., wurden in drei unabhängigen Versuchen für 2 h mit dem Mitogen Con A inkubiert und anschließend der Anteil toter Zellen mithilfe des interkalierenden Agens 7-AAD im Durchflusszytometer ermittelt (Abb. 3.28A und B). Dabei zeigte sich nach Stimulation mit Con A eine verminderte Sterberate CD4⁺ T-Zellen aus Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT CD4⁺ T-Zellen. Der prozentuale Anteil toter CD4⁺ T-Zellen war nach Inkubation in Medium in Gzm AxB KO und WT Mäusen vergleichbar hoch.

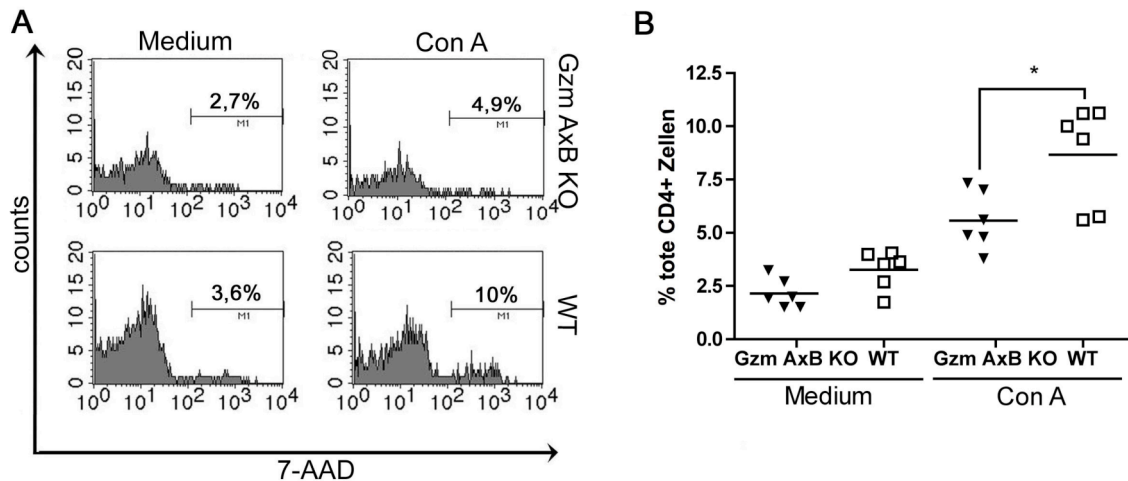


Abb. 3.28: AICD in CD4⁺ T-Zellen. PleC (5×10^5) wurden an Tag 7 p.i. isoliert und anschließend für 2 h mit Con A restimuliert. Der Anteil sterbender Zellen wurde mittels 7-AAD im Durchflusszytometer analysiert. PleC wurden dreifach mit CD3, CD4 und 7-AAD gefärbt und auf CD4⁺ T-Zellen eingestellt. **A)** Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität von 7-AAD am Beispiel einer Gzm AxB KO (obere Reihe) und einer WT (untere Reihe) Maus. **B)** Dargestellt ist der Anteil toter (7-AAD⁺) CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit Medium oder Con A. Die Daten stammen aus zwei Versuchen und repräsentieren insgesamt drei unabhängige Versuche mit 12 Gzm AxB KO und 13 WT Mäusen. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

3.2.4.6 Aktivierung von B-Zellen durch LsAg

Um zu untersuchen, ob es während der Infektion mit *L. sigmodontis* zu einer Aktivierung von Lymphozyten kommt, wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 im Durchflusszytometer untersucht. Nach Isolation von PleC an Tag 9 p.i. wurden die Zellen mit Medium, LsAg oder Con A als Positivkontrolle für 6 h inkubiert. Der Gesamtanteil CD69⁺ Lymphozyten lag in Gzm AxB KO Mäusen bei $30,2 \pm 2,1$ % und in WT Mäusen bei $23,9 \pm 2,7$ %. Daraus lässt sich ableiten, dass knapp ein Drittel der Lymphozyten in der Pleurahöhle voraktiviert waren. Durch Inkubation der PleC für 6 h mit LsAg oder Con A konnte die Anzahl CD69⁺ Lymphozyten signifikant gesteigert werden. Hierbei kam es, induziert durch LsAg, in den CD19⁺ B-Zellen zu einer Hochregulation von CD69 (Abb. 3.29A), wobei der Anstieg in Gzm AxB KO und WT Mäusen gleichermaßen ausgeprägt war (Abb. 3.29B). Dagegen konnte bei den CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen keine Erhöhung der CD69-Expression durch LsAg erzielt werden (Abb. 3.29C und D). Die Resultate belegen, dass es durch Stimulation mit LsAg zu einer selektiven Aktivierung von B-Zellen, nicht aber von T-Zellen kommt. Im folgenden Abschnitt wurde die humorale Immunantwort der Gzm AxB KO und WT Mäuse miteinander verglichen.

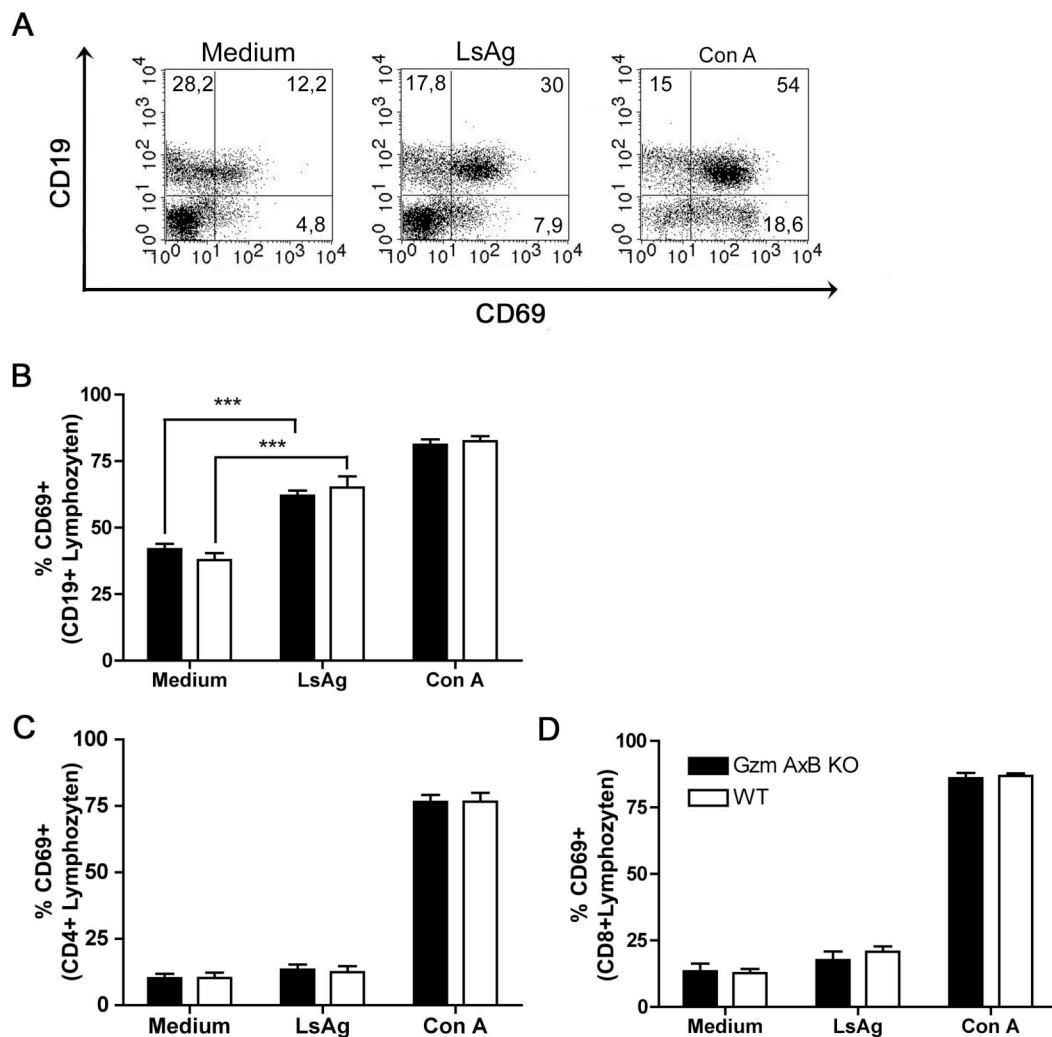


Abb. 3.29: Aktivierung von B-Zellen durch LsAg. 5×10^5 PleC (Tag 9 p.i.) wurden für 6 h mit Medium, LsAg oder Con A stimuliert und anschließend die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (x-Achse) durchflusszytometrisch ermittelt. Gezeigt ist ein repräsentatives Beispiel einer WT Maus (A). B-Zellen sind als CD19⁺ Zellen zu sehen. Die Werte in den Quadranten geben den Prozentsatz positiver Zellen, nach Einstellen auf Lymphozyten, wieder. Der prozentuale Anteil aktivierter Zellen am Gesamtanteil CD19⁺ B-Lymphozyten (B), CD4⁺ (C) und CD8⁺ (D) T-Lymphozyten ist aufgetragen. Die Diagramme zeigen Mittelwerte \pm SEM von zehn Gzm AxB KO und elf WT Mäusen zusammengefasst aus zwei von drei unabhängigen Versuchen. Der Anteil CD69⁺CD8⁺ Zellen wurden aus je sechs Mäusen pro Gruppe ermittelt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (***) $p < 0,001$.

3.2.4.7 LsAg-spezifische Immunglobulinantwort in Gzm AxB KO und WT Mäusen

Eine Zusammenfassung der humoralen Immunantwort während der Infektion mit *L. sigmodontis* zeigt die Abb. 3.30A. Den Mäusen wurde an Tag 26 p.i. Blut abgenommen und LsAg-spezifische Immunglobuline im Plasma mittels ELISA bestimmt.

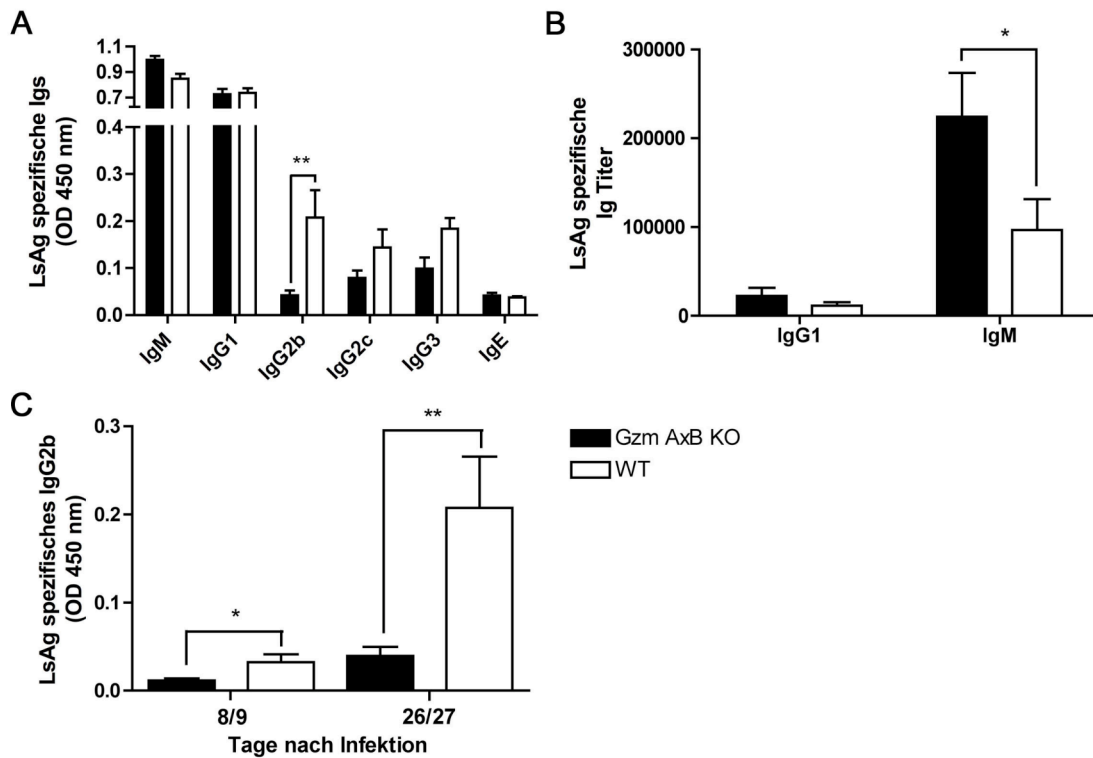


Abb. 3.30: Gzm AxB KO und WT Mäuse unterscheiden sich in ihrer humoralen LsAg-spezifischen Immunantwort. A) Gzm AxB KO (n=15) und WT (n=15) Mäusen wurde an Tag 26 p.i. Blut abgenommen und anschließend die LsAg-spezifische Immunglobulin-Antwort im Plasma mittels ELISA quantifiziert. Die Plasmen wurden wie in Abschnitt 2.2.3.9 angegeben verdünnt. Dargestellt ist ein Überblick aller ermittelten Isotypen aus drei unabhängigen Versuchen. **B)** Die LsAg-spezifischen IgG1- und IgM-Titer wurden im Plasma von je 19 Mäusen pro Gruppe an Tag 26 p.i. bestimmt. **C)** Die Bestimmung von LsAg-spezifischem IgG2b wurde an Tag 8/9 p.i. und an Tag 26/27 p.i. vorgenommen. Für Tag 9 p.i. wurden Daten von 16 Mäusen pro Gruppe erhoben, Tag 26/27 p.i. repräsentiert 14 Mäuse pro Gruppe. Die Mittelwerte \pm SEM sind aufgetragen, der Leerwert des Puffers wurde zuvor abgezogen. Die Einzelwerte pro Maus wurden in Duplikaten bestimmt. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) und für IgM mit dem Mann-Whitney Test ermittelt (* $p < 0,05$).

LsAg-spezifisches IgG2c und IgG3 lagen in Plasmen von Gzm AxB KO gegenüber WT Mäusen tendenziell verringert vor (Abb. 3.30A). Als dominierende Immunglobuline wurden IgG1 und IgM identifiziert. Da die ermittelten OD-Werte beider Antikörper zu hoch waren,

um eine Differenzierung vorzunehmen, wurde eine Endpunkttitration der Plasmen durchgeführt (Abb. 3.30B). Für IgG1 ergab sich kein Unterschied in den Gzm AxB KO und WT Plasmen. Demgegenüber stand eine signifikante Erhöhung des LsAg-spezifischen IgM-Titers in den Plasmen der Gzm AxB defizienten Mäuse verglichen mit WT Plasmen (Abb. 3.30B). IgG2b war an Tag 9 p.i. und Tag 26/27 p.i. in den Plasmen der Gzm AxB KO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen drastisch vermindert (Abb. 3.30C). Zusammenfassend wurde somit gezeigt, dass die Immunglobulinantwort von Gzm AxB KO und WT Mäusen während der Infektion Unterschiede aufweist, insbesondere IgG2b lag in den Plasmen von Gzm AxB KO Mäusen stark vermindert vor.

3.2.5 Genexpressionsanalyse in der frühen Phase der Infektion

Um die frühe Phase der Infektion in Abhängigkeit von Gzm A und B zu verifizieren, wurde eine Genexpressionsanalyse unter Verwendung von Gzm AxB KO, Gzm A KO und WT Mäusen durchgeführt. Da die Wurmlasten von Gzm B KO im Vergleich zu WT Mäusen denen der Gzm AxB KO Mäusen glichen (siehe Abb. 3.17 und Abb. 3.18), wurden Gzm B KO Mäuse nicht in die Untersuchungen mit einbezogen. Insgesamt wurden sechs Mäuse pro Gruppe mit *L. sigmodontis* infiziert und für die Gewinnung von RNA PleC von zwei Mäusen kombiniert. Dadurch ergaben sich drei RNA-Proben pro Gruppe. Die Umschreibung der RNA in cDNA sowie der Microarray wurden vom Eppendorf Array Center durchgeführt. Die untersuchten Gene, welche Bestandteil des hier verwendeten *DualChip® Mouse Inflammation Chips* waren, sind im Anhang aufgeführt. Für die Ermittlung der unterschiedlich exprimierten Gene wurden die einzelnen Proben einer Gruppe mit allen drei Proben einer anderen Gruppe verglichen. Ein Gen wurde als unterschiedlich bewertet, wenn mindestens zwei der drei Proben die gleiche Tendenz zeigten und die Induktion der Gene bei $\geq \pm 2$ lag.

Der Vergleich auf mRNA-Ebene zeigte eine Verminderung vom Chemokin (C-C)-Rezeptor 3 (CCR3), der Matrix Metalloproteinase 12 (MMP12) sowie deren Inhibitor *tissue inhibitor of metalloproteinase-1* (TIMP-1) in Gzm AxB KO im Vergleich zu WT Mäusen (Tabelle 3.1). Dagegen war die Menge an RNA vom Transkriptionsfaktor FBJ osteosarcoma oncogene (Fos) in den PleC der Gzm AxB KO um den Faktor 3,2 im Vergleich zu den WT Mäusen erhöht.

Genname	Gensymbol	ratio
Chemokin (C-C) Rezeptor 3	CCR3	-7,1
FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	3,17
Matrix metalloproteinase 12	MMP12	-2,55
<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>	TIMP-1	-2,0

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von **Gzm AxB KO** und **WT** PleC (Tag 7 p.i.).

Die Erniedrigung von TIMP-1 und die Erhöhung von Fos konnte im Vergleich der Gzm A KO mit WT Proben bestätigt werden (Tabelle 3.2), hängt also folglich mit der Gzm A Defizienz zusammen. Zugleich zeigten Gzm A KO Mäuse eine Erniedrigung verschiedener Liganden für Chemokinrezeptoren sowie Prokollagen Typ I alpha 1 und 2 (Col1a1 und Col1a2). Weiterhin ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGFa in den Gzm A KO und WT Mäusen unterschiedlich reguliert. Die Menge an VEGFa spezifischer RNA war in dem Gzm A KO im Vergleich zu WT Mäusen um den Faktor 2,7 vermindert.

Genname	Gensymbol	ratio
Angiotensinogen	Agt	-2,1
Anti-Mullerian hormone	Amh	-2,7
<i>Small chemokine (C-C motif) ligand 11</i>	CCL11	-3,4
Chemokin (C-C motif) Ligand 2	CCL2	-3,0
Chemokin (C-C motif) Ligand 21a	CCL21a	-2,3
CD247 Antigen	CD3z	-3,0
Prokollagen, Typ I, alpha 1	Col1a1	-2,5
Prokollagen, Typ I, alpha 2	Col1a2	-2,7
<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>	Fos	2,1
<i>Suppressor of cytokine signaling 2</i>	SOCS2	-2,2
<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 1</i>	TIMP-1	-2,2
vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor	VEGFa	-2,7

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von **Gzm A KO** und **WT** PleC (Tag 7 p.i.).

Tabelle 3.3 gibt einen Überblick über die unterschiedlich regulierten Gene auf RNA-Ebene in PleC von Gzm AxB KO und Gzm A KO Mäusen. Die CCR3-RNA war in den PleC von Gzm AxB KO im Vergleich Gzm A KO Mäusen herunterreguliert. Die Menge an RNA, die für Col1a1, Col1a2 und dem *suppressor of cytokine signalling* (SOCS2) kodieren, waren in den Gzm A KO PleC im Vergleich zu den WT und Gzm AxB KO PleC vermindert.

Die RNA für den Chemokinrezeptor CCR3, der die Migration von Zellen an den Ort der Infektion beeinflusst, war in Abwesenheit von Gzm B stark reduziert.

Gename	Gensymbol	ratio
Chemokin (C-C motif) Ligand 2	CCL2	3,5
Chemokin (C-C) Rezeptor 3	CCR3	-5,2
Prokollagen, Typ I, alpha 1	Col1a1	2,2
Prokollagen, Typ I, alpha 2	Col1a2	2,2
Chemokin (C-X-C motif) Ligand 1	CxCL1	2,4
<i>Suppressor of cytokine signaling 2</i>	SOCS2	2,6

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von **Gzm AxB KO** und **Gzm A KO** PleC (Tag 7 p.i.)

3.2.6 Zusammenfassung Teil 3.2

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte ich erstmalig zeigen, dass die Infektion von Mäusen mit *L. sigmodontis* Gzm A und B in Milzzellen und PleC induziert. Die höchste Expression konnte in beiden Kompartimenten an Tag 9 p.i. in B-Zellen nachgewiesen werden. Insbesondere Gzm A war in den Lymphozyten der Pleurahöhle an Tag 9 p.i. sehr stark erhöht und nahm anschließend signifikant ab. Die Defizienz von Gzm A und B beeinflusst darüber hinaus die Entwicklung von *L. sigmodontis*. Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäuse wiesen während der Infektion eine verminderte Anzahl an Würmern in der Pleurahöhle auf. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der Würmer in den Gzm A KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen an Tag 9 p.i. erhöht. Gleichzeitig waren die Würmer aus den Gzm A KO im Vergleich zu WT Würmern an Tag 27 p.i. verkürzt.

Während der Infektion war die Zytokin- und Antikörperantwort in den Mäusen unterschiedlich ausgeprägt: Gzm AxB KO Mäuse zeigten eine verstärkte T_H2 -Zytokinantwort bei gleichzeitig verminderter T_H1 -spezifischer zellulärer und humoraler Immunantwort. Lymphozyten in der Pleurahöhle infizierter Tiere zeigten einen aktivierten Phänotyp. Die Expression von CD69 konnte in B-Zellen durch Inkubation mit LsAg gesteigert werden. Zudem konnte durch Restimulation der PleC mit Con A AICD in $CD4^+$ T-Zellen ausgelöst werden. $CD4^+$ T-Zellen aus Gzm AxB KO Mäusen wiesen dabei im Vergleich zu WT $CD4^+$ T-Zellen eine verminderte Sterblichkeit auf. Eine längere Stimulation der Zellen mit Con A oder LsAg hatte den Tod der meisten Lymphozyten zur Folge. Die Proliferation der PleC war nach Stimulation im Vergleich zur Mediumkontrolle sogar erniedrigt.

4 DISKUSSION

Gegenstand dieser Arbeit war es, die Rolle von Gzm A und B während der Infektion mit dem Nematoden *L. sigmodontis* zu untersuchen. Die Defizienz von Gzm A und B hatte dabei einen Einfluss auf die zelluläre und humorale Immunantwort der Tiere sowie auf das Überleben aktivierter Lymphozyten. Darüber hinaus bestätigen die gewonnenen Daten eine Beteiligung von Granzymen an der Wanderung von Leukozyten und der Reifung von Makrophagen. Daraus resultierend konnten Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäuse die Infektion mit *L. sigmodontis* besser abwehren als WT Mäuse. Gzm A KO Mäuse zeigten dagegen eine schlechtere Abwehr gegen *L. sigmodontis* als WT Mäuse.

4.1 Induktion von Granzymen während der Infektion mit

L. sigmodontis

Die Expression von Gzm A und B in Lymphozyten der Milz und der Pleurahöhle wurde im Verlauf der Infektion mit *L. sigmodontis* untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte im Vergleich zu naiven Mäusen eine erhöhte Expression von Gzm A und B in Milzzellen und PleC (siehe Abb. 3.13 und Abb. 3.15). Die Gzm-Expression folgte in beiden Kompartimenten einer ähnlichen Kinetik: An Tag 9 p.i. war der Anteil Gzm exprimierender Zellen am höchsten und nahm später wieder ab. In der Pleurahöhle, dem Ort, an dem sich die Infektion manifestiert, war insbesondere die Gzm A-Expression in Lymphozyten stark erhöht. Diese unterlag jedoch mit 1,5 % bis 12,0 % (Mittelwert: 6,1 %) Gzm A⁺ Lymphozyten großen Schwankungen. Eine Analyse auf zellulärer Ebene ergab während der Infektion eine Expression von Gzm A und B vorwiegend durch CD19⁺ B-Lymphozyten (siehe Abb. 3.14 und 3.15).

Nach Stimulation mit CpG Oligodeoxynukleotiden und IL-21 wurde für die humane B-Zell-Linie B-CLL und humane B-Zellen eine Expression von Gzm B nachgewiesen (Jahrsdorfer et al., 2006). Die Expression von Gzm A und B wurde bisher noch nicht für primäre murine B-Zellen diskutiert. Durch Stimulation mit LPS oder anti-BZR in Anwesenheit von IL-4 konnte in dieser Arbeit eine Expression von Gzm A und B in B-Zellen naiver WT Milzzellen angeregt werden (Abb. 3.2). Die Induktion von Gzm A und B durch LPS könnte zudem eine Erklärung für die gesteigerte Expression von Gzm A und B in B-Zellen während der Infektion mit *L. sigmodontis* sein. Mit Ausnahme von *Acanthocheilonema viteae*, *Loa loa* und *O. flexuosa* (Brattig et al., 2001; Hoerauf et al.,

1999 & Taylor & Hoerauf, 1999) weisen die meisten bekannten Filarienspezies intrazelluläre Bakterien auf, die über LPS-ähnliche Moleküle das Immunsystem des Wirtes aktivieren (Brattig et al., 2000; H & Legesse, 2007; Hise et al., 2007; Taylor, Cross & Bilo, 2000; Turner et al., 2006). Für die Filarienspezies *B. malayi* und *O. volvulus* konnte dabei eine Beteiligung der Rezeptoren TLR2 und TLR6 sowie dem Adaptormolekül MyD88 gezeigt werden (Brattig et al., 2004; Hise et al., 2007; Saint Andre et al., 2002; Taylor et al., 2000). Das Wolbachienoberflächenprotein (*wolbachia surface protein*) WSP leitet dagegen Signale über den LPS-Rezeptor TLR4 in Zielzellen (Brattig et al., 2004; Hise et al., 2007). Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte kam es durch Stimulation von PleC mit LsAg zu einer selektiven Aktivierung von B-Zellen, jedoch nicht von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (Abb. 3.29). Somit enthält LsAg Agenzien, welche B-Lymphozyten aktivieren. In dieser Arbeit wurde *Litomosoides* Extrakt verwendet, der aus adulten weiblichen Würmern aus BALB/c Mäusen hergestellt wurde. Da insbesondere die Entwicklung der weiblichen Würmer mit der Anwesenheit von Wolbachien korreliert (Arumugam, Pfarr & Hoerauf, 2008), enthält LsAg neben den *Litomosoides*-Antigenen viele Wolbachienmoleküle. Bisherige Studien haben eine Expression von TLR4 in murinen B- und T-Zellen gezeigt (Cairns et al., 2006; Chearwae & Bright, 2008; Richard, Pierce & Song, 2008). Die Expression des LPS-Rezeptors TLR4 auf T-Lymphozyten deutet darauf hin, dass entweder WSP nicht das B-Zell-stimulierende Agens ist oder dass T-Zellen erst bei einer höheren WSP-Konzentration über den TLR4 aktiviert werden.

Eine zweite Erklärung für die erhöhte Expression von Gzm A und B während der Infektion könnte indirekt mit der Präsenz der Wolbachien zusammenhängen. Die intrazellulären Bakterien in den Filarien induzieren im Wirt zu Beginn der Infektion eine T_H1-spezifische Zytokinantwort (Lamb et al., 2004). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es in Anwesenheit von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-12, IL-15, IL-21 und IFN- γ zu einer erhöhten Expression von Gzm A und B in Lymphozyten kommt (Janas et al., 2005; Tamang et al., 2006; White et al., 2007; Zeng et al., 2005; Zhang, Zhang & Tian, 2008). Somit scheint die Expression von Gzm A und B in PleC und Milzzellen die Zytokinsynthese während der Infektion zu reflektieren. Die durch Wolbachien verursachte pro-inflammatorische Zytokinantwort führt in der frühen Phase der Infektion zu einer Steigerung der Gzm-Expression. In der mittleren und späten Phase der Infektion dominiert dagegen eine T_H2-spezifische Zytokinantwort und es kommt in den Lymphozyten zu einem Abfall der Gzm-Expression.

Welche Folgen hat nun die Expression von Gzm A und B in B-Zellen? Um die Frage zu beantworten, ob B-Zellen andere Lymphozyten Gzm-abhängig abtöten, wurde die Vitalität der Lymphozyten der Pleurahöhle untersucht. *Ex vivo* analysierte PleC zeigten nach Färbung mit PI und Annexin V vergleichbare Frequenzen früh und spät apoptotischer Lymphozyten. Durch Vitalitätsfärbung mit Trypanblau konnte während der Infektion ebenfalls kein verstärktes Absterben der WT PleC gegenüber Gzm defizienten PleC beobachtet werden. Folglich hat die Präsenz von Gzm A und B in WT B-Zellen keine direkte Auswirkung auf die Viabilität der Lymphozyten.

Allerdings scheint die Expression von Gzm B die Entwicklung der *L. sigmodontis* Larven zu begünstigen. Diese Annahme wird durch einen Vergleich der Gzm-Expression in resistenten C57BL/6 und suszeptiblen BALB/c Mäusen bestätigt. PleC aus BALB/c Mäusen wiesen im Vergleich zu PleC aus C57BL/6 Mäusen an Tag 28 p.i. eine höhere Expression von Gzm B, nicht aber von Gzm A auf (siehe Anhang Abb. 7.1). Die erhöhte Expression von Gzm B korreliert somit mit einer erhöhten Suszeptibilität für die Infektion mit *L. sigmodontis*.

4.2 Gzm A und B beeinflussen die Entwicklung von *L. sigmodontis* *in vivo*

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Defizienz von Gzm A und B einen Einfluss auf die Entwicklung von *L. sigmodontis* in der C57BL/6 Maus hat (siehe Abb. 3.17 und 3.18). Die Analyse der Wurmlasten in Gzm AxB KO Mäusen und den entsprechenden Einzel-KO Mäusen ergab eine divergente Rolle von Gzm A und B. Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäuse wiesen im Vergleich zu WT Mäusen in der Pleurahöhle eine erniedrigte Anzahl an Würmern auf. Im Gegensatz dazu führte die Abwesenheit von Gzm A zu einer Erhöhung der Wurmlast. Dabei zeigte sich eine Abhängigkeit von der Höhe der infektiösen Dosis. Insbesondere bei Infektionen mit einer hohen infektiösen Dosis waren die Wurmlasten in Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen niedriger. Bei einer mittleren Wurmlast hingegen waren die Unterschiede weniger ausgeprägt. In Gzm A KO Mäusen war die Anzahl der Würmer im Vergleich zur WT Maus bei einer mittleren infektiösen Dosis an Tag 9 p.i. und nicht an Tag 26/27 p.i. verringert.

Beim Längenwachstum zeigte sich in Abwesenheit von Gzm A eine Verkürzung der L4/jungen adulten Würmer, wohingegen die Würmer aus Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen die gleiche Länge wie WT Würmer aufwiesen. Die Erklärung dafür könnte sein, dass es durch die erhöhte Anzahl der Würmer in Gzm A KO Mäusen zu einem Mangel an Platz und Nährstoffen kommt, welches die Entwicklung von Würmern in den Gzm A KO Mäusen negativ beeinflusst (Cook & Roberts, 1991). Des Weiteren könnten exkretorisch-sekretorische Produkte der Würmer für andere Würmer toxisch sein (Cook & Roberts, 1991) und damit zu einer Verminderung der Wurmanzahl in Gzm A KO Mäusen zwischen Tag 9 und Tag 27 p.i. führen.

Die morphologische Entwicklung der Würmer wurde in der hier vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Eine Unterscheidung zwischen männlichen und weiblichen Würmern ist nicht möglich, da sich in der resistenten C57BL/6 Maus nur junge adulte Würmer entwickeln. Zusätzlich ergab eine mikroskopische Analyse der Häutung von L3 und L4 keine Unterschiede zwischen Gzm AxB KO und WT Mäusen (Daten nicht gezeigt). Ein Eindringen von Gzm A und B in die Würmer konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Zum einen war es nicht möglich, eine spezifische Färbung von Gzm A und B in Schnitten von Granulomen und Würmern zu etablieren, zum anderen ließ sich Gzm B nicht im Western Blot in LsAg nachweisen (siehe Abb. 3.16). Als Positivkontrolle diente aufgereinigtes murines Gzm B, welches dosisabhängig als Proteinbande im Western Blot dargestellt werden konnte. Da murines Gzm A nicht kommerziell erhältlich ist, wurde darauf verzichtet, LsAg auf dessen Präsenz hin zu untersuchen.

Somit konnte in dieser Arbeit keine direkte Interaktion von Gzm A und B mit den verschiedenen Larvenstadien von *L. sigmodontis* nachgewiesen werden, was jedoch aufgrund von methodischen Einschränkungen nicht ausgeschlossen werden kann. Dennoch ist es wahrscheinlicher, dass die unterschiedlichen Wurmlasten und -längen in Gzm KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen auf der Immunantwort des Wirtes basieren.

4.2.1 Welche Rolle spielt die infektiöse Dosis bei der Immunantwort?

Untersuchungen in der BALB/c Maus haben bestätigt, dass die Anzahl der Würmer in der Pleurahöhle mit der Entwicklung der Würmer korreliert (Babayan et al., 2005). Bei

Applikation von 200 infektiösen Larven kommt es im Vergleich zu 25 applizierten L3 zu einer gestörten Entwicklung der Würmer: Wurmlänge, Bildung von MF und Kopulationsorganen der männlichen Würmer sind beeinträchtigt (Babayan et al., 2005). Die infektiöse Dosis, mit der Mäuse infiziert werden, wirkt sich zudem auf die Immunantwort des Wirtes aus. Bei der artifiziellen Infektion von BALB/c Mäusen mit 200 L3 kommt es im Vergleich zu einer niedrigen infektiösen Dosis nach Stimulation mit Con A in den drainierenden Lymphknotenzellen zu einer stärkeren T_H2 -spezifischen Zytokinantwort (IL-4, IL-5 und IL-10). Gleichzeitig ist die Konzentration an IL-4 und IL-10 im Serum von BALB/c Mäusen signifikant erhöht (Babayan et al., 2005). Untersuchungen mit dem intestinalen Nematoden *Strongyloides ratti* weisen ebenfalls darauf hin, dass es bei steigender Infektionslast zu einer Verstärkung der T_H2 -Antwort kommt, was letztendlich eine verminderte Fitness der Parasiten zur Folge hat (Bleay et al., 2007; Paterson & Viney, 2002).

In dieser Arbeit konnten bei einer mittleren infektiösen Dosis an Tag 26 p.i. keine unterschiedlichen Wurmlasten in Gzm AxB KO, Gzm B KO und WT Mäusen nachgewiesen werden. In Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen war bei einer hohen infektiösen Dosis die Anzahl der Würmer im Vergleich zu WT Mäusen vermindert. Die T_H2 -spezifische zelluläre und humorale Immunantwort in Gzm AxB KO Mäusen spielt infolgedessen bei einer niedrigen und mittleren infektiösen Dosis nur eine untergeordnete Rolle. Um dies zu verifizieren, muss die Immunantwort in Abhängigkeit von der infektiösen Dosis weiter untersucht werden.

4.2.2 Divergente Rolle von Gzm A und B

Dass Gzm A und B die Immunantwort des Wirtes unterschiedlich modulieren, wird durch die abweichenden Wurmlasten in den Einzel-KO Mäusen deutlich und durch Experimente in der Tumorummunologie bestätigt. Die Beseitigung von Tumoren ist in Gzm A KO, Gzm B KO und Gzm AxB KO Mäusen unterschiedlich ausgeprägt (Cao et al., 2007). Gzm B gilt als wichtiger Mediator der Tumorbeseitigung durch $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen (Kanavaros et al., 2000). Dennoch beseitigen Gzm B defiziente Mäuse syngene und allogene Tumoren effizienter als WT Mäuse. Gzm A KO Mäuse zeigen dagegen einen Phänotyp, der dem von WT Mäusen entspricht, wohingegen Gzm AxB defiziente Mäuse suszeptibler für Tumoren sind (Cao et al., 2007). Als Ursache wurde die Hemmung

der tumorspezifischen NK-Zellen und CD8⁺ T-Zellen durch Gzm B⁺ Treg postuliert (Cao et al., 2007). Da Treg Effektorzellen Gzm B-abhängig abtöten, führt die Abwesenheit von Gzm B in Gzm B KO Mäusen zu einer verbesserten Abwehr gegen die Tumoren.

Um zu überprüfen, ob die verringerte Wurmlast in Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen auf einem ähnlichen Mechanismus basiert, wurde die Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktor Foxp3 und die Koexpression der Proteasen Gzm A und B untersucht. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgt mit WT PleC an Tag 7 und 9 p.i.. Zu diesen Zeitpunkten war der Anteil Foxp3⁺ und Gzm⁺ Lymphozyten am höchsten. Dessen ungeachtet konnten keine Gzm A oder B exprimierenden Treg (Foxp3⁺) in der Pleurahöhle von WT Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.15). Die verminderten Wurmlasten in Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen sind somit nicht auf die Treg-abhängige Suppression der Immunantwort zurückzuführen.

Die ähnlichen Wurmlasten in Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen sprechen für eine Dominanz von Gzm B gegenüber Gzm A. Die Gzm A Defizienz führt zwar zu einer Erhöhung der Wurmlast, dennoch scheint das gleichzeitige Fehlen von Gzm B einen stärkeren Einfluss auf den Phänotyp bei der Infektion mit *L. sigmodontis* zu haben.

In Gzm A KO Mäusen scheint ein anderer Wirkmechanismus als in Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen vorzuliegen (siehe Abschnitt 4.3.4). Vom Zentrum für Integrative Biologie in Zürich wurde eine RT-PCR mit den RNA-Proben aus der Genexpressionsanalyse durchgeführt. Gegenstand der Untersuchung waren spezifische Marker für AAMØ und CAMØ (siehe Anhang Abb. 7.2). Gzm A KO Mäuse wiesen auf mRNA-Ebene im Vergleich zu WT Mäusen eine deutliche Erhöhung AAMØ-spezifischer Marker wie Fizz1, Ym1, Arginase und Amcase auf. Analog dazu konnte im Vergleich zu WT Mäusen eine Reduktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in den Gzm A KO Mäusen nachgewiesen werden. INOS ist ein klassischer Marker für CAMØ und fördert die Bildung von Stickstoffmonoxid, einem wichtigen Effektormechanismus von Phagozyten. Gzm AxB KO und WT Mäuse zeigten auf mRNA-Ebene eine ähnliche Verteilung der AAMØ- und CAMØ-spezifischen Transkriptionsfaktoren und Enzyme. Die Daten weisen auf eine erhöhte Anzahl an AAMØ in der Pleurahöhle von Gzm A KO Mäusen hin, welche trotz Gzm A Defizienz nicht in den Doppel-KO Mäusen auftritt. Da die Expression von Gzm A bisher nicht für Makrophagen beschrieben wurde, sind die Gründe hierfür unklar. Für humanes Gzm A konnte bereits sehr früh gezeigt werden, dass es die

Phagozytoseaktivität von Monozyten signifikant steigert (Sower et al., 1996a). Gleichzeitig wird die Produktion von IL-6, IL-8 und TNF- α durch Monozyten und Makrophagen gefördert (Sower et al., 1996a; Yoshikawa et al., 2008). Somit scheint humanes Gzm A die Generierung von CAM \emptyset zu induzieren. In der Annahme, dass humanes und murines Gzm A einen ähnlichen Einfluss auf Monozyten hat, würde die Abwesenheit von Gzm A die Bildung von AAM \emptyset verstärken. Initial wird die Generierung von AAM \emptyset während der Würmerinfektion durch Wundheilungsprozesse induziert (Loke et al., 2007). Ihre Präsenz wurde bereits bei Infektionen mit verschiedenen Nematoden wie *B. malayi* (Loke et al., 2002; MacDonald et al., 1998), *Nippostrongylus brasiliensis* (Pesce et al., 2006) und *Heligmosomoides polygyrus* (Anthony et al., 2006) und auch in der BALB/c Maus für *L. sigmodontis* (Taylor et al., 2006) nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass AAM \emptyset die Immunantwort des Wirtes modulieren und die Etablierung der Würmerinfektion fördern (Nair et al., 2005; Taylor et al., 2006). Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen die Präsenz von AAM \emptyset während der Infektion mit *L. sigmodontis*. In den Gzm A KO Mäusen scheint der erhöhte Anteil an AAM \emptyset zu einer verstärkten Suppression der Immunantwort zu führen. Infolgedessen können sich die Larven in den Gzm A KO Mäusen besser als in den WT Mäusen entwickeln.

4.3 Funktionelle Relevanz der Gzm A und B Defizienz

4.3.1 Einfluss auf die Zytokinantwort

Die Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* wird sehr stark von der Zytokinantwort des Wirtes beeinflusst. Für *B. malayi* wurde gezeigt, dass Wolbachien insbesondere im Stadium der infektiösen Larve eine pro-inflammatorische Immunantwort in Mäusen induzieren (Lamb et al., 2004). Immunisierungen von BALB/c Mäusen mit WSP führt im T_H1-Kontext zu einem gesteigerten Überleben von *L. sigmodontis* (Lamb et al., 2008). Außerdem konnte für *B. malayi* gezeigt werden, dass IFN- γ produzierende NK-Zellen für die Entwicklung von *B. malayi* Larven von Vorteil sind (Babu et al., 1998). Der humane Hakenwurm *Nekator americanus* sezerniert zudem ein Protein, das an NK-Zellen bindet und diese IL-2 abhängig zur Produktion von IFN- γ anregt (Hsieh et al., 2004). Die initiale T_H1-spezifische Zytokinantwort, ausgelöst durch die bakteriellen Endosymbionten, hemmt

die Ausbildung einer protektiven T_H2 -Antwort und fördert damit das Überleben der Würmer (Lamb et al., 2008; Ravindran, 2001). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass T_H2 -Zellen Resistenz gegen *L. sigmodontis* in BALB/c und C57BL/6 Mäusen vermitteln (Le Goff et al., 2002; Specht et al., 2004; Volkmann et al., 2003).

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten bestätigen diesen Zusammenhang. Con A-stimulierte PleC von Gzm AxB KO Mäusen sezernierten in der frühen Phase der Infektion weniger $IFN-\gamma$ als WT PleC. Analog dazu war die T_H2 -spezifische IL-5-Antwort an Tag 27 p.i. stärker ausgeprägt als in den WT PleC und die Mäuse waren gleichzeitig in der Lage, die Infektion gegen *L. sigmodontis* besser zu bekämpfen als WT Mäuse. Die Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass T_H2 -Zellen wichtig für die Abwehr gegen *L. sigmodontis* sind.

Der Grund für die verminderte $IFN-\gamma$ -Antwort der Gzm AxB defizienten PleC an Tag 9 p.i. könnte in der verminderten Produktion von IL-2 durch Milzzellen naiver Mäuse liegen. IL-2 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für NK- und T-Zellen und fördert die Synthese von $IFN-\gamma$ in humanen NK-Zellen (Fehniger et al., 2003). Damit übereinstimmend zeigten naive Milzzellen in Abwesenheit von Gzm A und B zum einen eine verminderte Proliferation und zum anderen war die Synthese von $IFN-\gamma$ von Gzm AxB defizienten PleC an Tag 9 p.i. niedriger als in WT Mäusen. Die Analyse der Zellkomposition mittels Durchflusszytometrie ergab eine erniedrigte NK-Zell-Frequenz an diesem Zeitpunkt der Infektion in der Pleurahöhle von Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen (siehe Abb. 3.21). Der erniedrigte Anteil an NK-Zellen konnte jedoch nicht mit der verminderten $IFN-\gamma$ -Synthese, korreliert werden. Nach Stimulation von PleC (Tag 9 p.i.) für 6 h war der Anteil $IFN-\gamma^+$ NK-Zellen und Gesamt-Lymphozyten in den Gzm AxB KO und WT Mäusen gleich hoch. Aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Stimuli und Inkubationszeiten konnte nicht abschließend geklärt werden, welche Zellen in den Gzm AxB KO PleC eine verminderte Produktion von $IFN-\gamma$ aufweisen. Die Verwendung von PMA/Ionomycin erwies sich in diesem Zusammenhang als problematisch. Dieser sehr potente Stimulus induzierte in Gzm AxB KO und WT Zellen eine starke Zytokinantwort. Folglich konnten marginale Unterschiede zwischen Gzm AxB KO und WT Mäusen zwar im ELISA, nicht aber im Durchflusszytometer bestätigt werden. Beispielsweise konnte die verminderte IL-2-Synthese durch Milzzellen von naiven und OVA/Freund's Adjuvans immunisierten Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen (siehe Abb. 3.3 und 3.5) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin nicht bestätigt werden (siehe Abb. 3.4). Die Stimulation

der Milzzellen mit Con A zeigte dagegen, dass die verminderte IL-2-Konzentration auf eine verminderte Synthese durch CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von Gzm A und B zurückzuführen war.

Die Expression des T_H2-Zytokins IL-5 wurde an Tag 27 nach Infektion mit *L. sigmodontis* mittels Durchflusszytometrie verifiziert. Der Anteil IL-5 produzierender CD4⁺T-Zellen war in der Pleurahöhle von Gzm AxB KO im Vergleich zu WT Mäusen erhöht (siehe Abb. 3.25). IL-5 ist in der BALB/c Maus für die Abwehr gegen *L. sigmodontis* essenziell. Durch Aktivierung von Eosinophilen und Neutrophilen induziert IL-5 die Umkapselung und Beseitigung der Würmer aus dem Organismus (Al-Qaoud et al., 2000; Martin et al., 2000b; Saeftef et al., 2003). IL-5 defiziente Mäuse zeigen im Vergleich zu WT BALB/c Mäusen eine 100-fach höhere und verlängerte Mikrofilariämie sowie eine stark erhöhte Wurmlast (Volkman et al., 2003). Analog dazu sind IL-5 transgene Mäuse in der Lage, die Infektion mit *L. sigmodontis* schneller zu beseitigen als WT Mäuse (Martin et al., 2000b). In einer einzigen Studie wurde der Verlauf der Infektion in Abwesenheit von IL-5 in der resistenten C57BL/6 Maus untersucht. Die Infektion mit 25 L3 führt in IL-5 KO und WT C57BL/6 Mäusen zu einer vergleichbaren Anzahl an Würmern in der Pleurahöhle (Le Goff et al., 2000). Eine Verminderung der protektiven Immunantwort in den IL-5 KO Mäusen im Vergleich zu C57BL/6 WT Mäusen, tritt dagegen auf, wenn die Mäuse vor der Infektion mit bestrahlten Larven immunisiert werden (Le Goff et al., 2000). In dieser Studie wurden die Mäuse mit einer sehr niedrigen infektiösen Dosis artifiziell infiziert. Bei der artifiziellen Infektion werden infektiöse Larven aus Milben isoliert und den Mäusen subkutan verabreicht. Untersuchungen in unserem Labor, die von anderen Arbeitsgruppen bestätigt wurden (Babayán et al., 2005), zeigen, dass der Weg der Applikation die Immunantwort beeinflusst. Unter Verwendung verschiedener Infektionsmodelle wurde gezeigt, dass der Speichel, der vom Vektor gleichzeitig mit dem Pathogen übertragen wird, die Immunantwort des Wirtes hemmt und die Etablierung der Infektion fördert (Bishop et al., 2006; Norsworthy et al., 2004)

Die niedrigeren Wurmlasten in den Gzm AxB KO Mäusen korrelierten mit der gesteigerten IL-5-Synthese und deuten somit auf eine wichtige Rolle des T_H2-Zytokins IL-5 in der Immunabwehr der resistenten C57BL/6 Maus hin.

4.3.2 Einfluss auf die humorale Immunantwort

Die humorale, *L. sigmodontis*-spezifische Immunantwort, welche die Zytokinantwort reflektiert, war in den Gzm AxB KO und WT Mäusen unterschiedlich ausgeprägt. IgG1 und IgM waren die dominierenden Immunglobuline an Tag 27 p.i. im Plasma beider Mäuse. Eine Titration ergab einen signifikant höheren LsAg-spezifischen IgM-Titer in den Plasmen der Gzm AxB KO Mäuse, während die LsAg-spezifischen IgG1-Titer in beiden Mäusen gleich hoch waren (siehe Abb. 3.30B).

Die Beteiligung von IgM an der Immunantwort gegen Würmer wurde bereits für die Filarien *L. sigmodontis* (Al-Qaoud et al., 1998) und *B. malayi* (Paciorkowski et al., 2000; Rajan, Ramalingam & Rajan, 2005) sowie für den Nematoden *Strongyloides stercoralis* (Herbert et al., 2000) gezeigt. Das von B1-Zellen sezernierte natürliche IgM bindet an Phosphorylcholin infektiöser *L. sigmodontis* Larven und löst damit eine protektive Immunantwort gegen die Würmer aus. Äquivalent dazu haben BALB/c Mäuse mit einer B1-Zell-Defizienz höhere Wurmlasten als WT Mäuse (Al-Qaoud et al., 1998). In der resistenten C57BL/6 Maus scheinen B-Zellen dagegen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen: μ MT Mäuse, die eine B1- und B2-Zell-Defizienz aufweisen, beseitigen die Infektion mit *L. sigmodontis* ähnlich effizient wie WT Mäuse (Le Goff et al., 2002; Martin et al., 2001). Die höheren IgM-Titer, welche mit den niedrigeren Wurmlasten in Gzm AxB KO im Vergleich zu WT Mäusen korrelieren, deuten jedoch auf eine Beteiligung von B1-Zellen in der protektiven Immunantwort in der resistenten C57BL/6 Maus hin.

Die Analyse weiterer LsAg-spezifischer Immunglobuline zeigte in Gzm AxB defizienten Mäusen eine Reduktion der T_H1 -assoziierten Isotypen IgG2c, IgG3 und IgG2b, die unter dem Einfluss von $IFN-\gamma$ produzierenden T-Zellen gebildet werden (Mosmann & Coffman, 1989). Der Klassenwechsel zum Isotyp IgG2b kann darüber hinaus auch thymusunabhängig, also ohne T-Zell-Hilfe, von B-Lymphozyten durchgeführt werden. Murine Milzzellen produzieren unter dem Einfluss von LPS IgG2b-Antikörper. Die simultane Gabe von LPS und IL-4 hemmt, während LPS zusammen mit TGF- β , den Klassenwechsel zu IgG2b fördert (Lettesjo, Ridderstad & Moller, 1997). Der Isotyp IgG2b war im Plasma von Gzm AxB defizienten Mäusen an Tag 9 und Tag 26/27 nach Infektion mit *L. sigmodontis* signifikant erniedrigt. Mittels intrazellulärer FACS-Analyse konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass an Tag 27 p.i. PleC von Gzm AxB KO Mäusen mehr T_H2 -spezifische Zytokine wie IL-5 exprimieren als WT PleC. Infolgedessen könnten T_H2 -

Zellen in Gzm AxB KO Mäusen unter dem Einfluss von LPS-ähnlichen Molekülen der Wolbachien zu einer Hemmung der IgG2b-Produktion im Vergleich zu WT Mäusen beitragen. Über die Funktion von IgG2b während der Infektion mit Filarien liegen bislang keine Daten vor.

Experimente, in denen die Mäuse mit OVA in Anwesenheit von Alum oder Freund's Adjuvans immunisiert wurden, bestätigten die unterschiedliche humorale Immunantwort von Gzm AxB KO und WT Mäusen. Nach Immunisierung mit OVA und Alum wurden die OVA-spezifischen IgG1- und IgM-Titer in den Plasmen beider Mäuse bestimmt. Im Gegensatz zur Infektion waren die OVA-spezifischen IgM-Titer in beiden Mäusen gleich hoch. In Abwesenheit von Gzm A und B zeigte sich jedoch eine verstärkte IgG1-Antwort im Vergleich zu WT Mäusen (Abb. 3.10A). Der Klassenwechsel zu IgG1 wird primär über IL-4 gesteuert, dennoch ist die IgG1-Antwort ebenfalls unter T_H1 -Bedingungen ausgeprägt (Lamb et al., 2008). Dass die IgG1-Antwort während der Infektion nicht unterschiedlich war, könnte mit der komplexeren Zytokinantwort während der Infektion mit *L. sigmodontis* zusammenhängen. Die höheren OVA-spezifischen IgG1-Titer in den Gzm AxB KO im Vergleich zu WT Mäusen deuten jedoch auf eine dominierende T_H2 -spezifische Zytokinantwort während der Immunisierung hin. Dazu passend bildeten Gzm AxB KO im Gegensatz zu WT Mäusen während der Immunisierung mit OVA und Freund's Adjuvans eine schwächere T_H1 -spezifische IgG2b-Antwort aus (siehe Abb. 3.10B).

Insgesamt deuten die während Infektion und Immunisierung gewonnenen Daten auf Immunglobulin-Ebene darauf hin, dass die Zytokinantwort in Gzm AxB KO und WT Mäusen unterschiedlich reguliert ist. Die Verminderung der T_H1 -spezifischen Zytokinantwort wird insbesondere durch die niedrigere IgG2b-Antwort in Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen reflektiert.

4.3.3 Einfluss auf die Wanderung und Reifung von Leukozyten

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Gzm A und B extrazelluläre Matrixproteine degradieren können und dabei die Wanderung von Zellen beeinflussen (Buzza et al., 2005). Nach natürlicher Infektion durch den Biss einer infizierten Milbe erreichen die infektiösen Larven zwischen Tag 4 und 5 p.i. die Pleurahöhle. Zeitversetzt erfolgt ein Einwandern von Effektorzellen. Abschnitt 3.2.4.1 beschreibt die Charakterisierung der in die Pleurahöhle eingewanderten Zellen. An Tag 7 p.i. waren weniger Zellen in der

Pleurahöhle von Gzm AxB KO Mäusen als in WT Mäusen. Zwei Tage später (Tag 9 p.i.) hatten sich die Zellzahlen in den beiden Mäusen wieder angeglichen, zeigten dennoch in Abwesenheit von Gzm A und B eine tendenzielle Verminderung. Mittels Durchflusszytometrie konnte an Tag 9 p.i. im Vergleich zu WT Mäusen eine prozentuale Reduktion der NK-Zellen in den Gzm AxB KO festgestellt werden. Gleichzeitig war der Anteil an B-Zellen, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und Treg durch die Abwesenheit von Gzm A und B nicht beeinflusst. Zu späteren Zeitpunkten (Tag 27 p.i. und Tag 35 p.i.) waren ebenfalls keine Unterschiede bezüglich der Zellzahlen oder der Lymphozyten zwischen Gzm AxB KO und WT Mäusen messbar.

Eine Einteilung von Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten anhand des FSC/SSC ergab ebenfalls keine Ungleichheiten der Leukozytenanteile in der Pleurahöhle von Gzm AxB KO und WT Mäusen. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an Leukozyten stellt eine sehr ungenaue Methode dar, welche keine Aussagen über die genaue Anzahl der Zellen zum jeweiligen Zeitpunkt der Infektion zulässt. Dennoch liefert die Genexpressionsanalyse an Tag 7 p.i. (siehe Abschnitt 3.2.5) Hinweise für eine Beeinträchtigung der Monozyten/Makrophagen. Hierbei zeigte sich eine Verminderung der RNA für CCR3, MMP-12 und TIMP-1 in Gzm AxB defizienten PleC im Vergleich zu WT PleC. CCR3 wird von Eosinophilen (Ponath et al., 1996), Basophilen (Ugucioni et al., 1997), Makrophagen (Moon et al., 2007), Mastzellen (Ochi et al., 1999), T_H2-Zellen (Sallusto, Mackay & Lanzavecchia, 1997) und Keratinozyten (Petering et al., 2001) exprimiert. CCR3 ist als Rezeptor für CCL11 (Eotaxin), CCL3, 4, 7, 8 und 14 sowie CCL5 (RANTES) beschrieben (Elsner, Escher & Forssmann, 2004) und beeinflusst somit die Migration verschiedener Zelltypen. Matrix Metalloproteinasen repräsentieren eine Gruppe von Proteasen, die wie Gzm A und B extrazelluläre Matrixproteine degradieren können (Giannelli et al., 1997; Nakamura et al., 2000; Overall, 2002). *In vitro* Versuche haben gezeigt, dass die Matrix Metalloelastase MMP-12 als Marker für Makrophagen fungiert (Kahnert et al., 2006; Marsland et al., 2008). Die Aktivität von MMP-12 wird durch seinen natürlichen Inhibitor TIMP-1 gehemmt (Chirco et al., 2006). Die Verminderung von CCR3, MMP-12 und TIMP-1 deutet somit auf eine Beeinträchtigung von Makrophagen in der Pleurahöhle von Gzm AxB KO Mäusen hin. Die drastische Reduzierung von CCR3 im Abwesenheit von Gzm B kann zudem die Migration weiterer Zelltypen wie Granulozyten, Mastzellen, aber auch NK-Zellen beeinflussen. Somit wäre es denkbar, dass die

Verminderung der NK-Zellen an Tag 9 p.i. auf der verminderten Expression von CCR3 an Tag 7 p.i. basiert.

Eine Beeinträchtigung der Leukozytenwanderung wurde auch in Thioglykolat-behandelten Mäusen deutlich. Sieben Tage nach Injektion von Thioglykolat wiesen Gzm AxB KO Mäuse im Vergleich zu WT Mäusen eine veränderte Leukozytenzusammensetzung auf (siehe Abb. 3.12). Der verminderte Anteil an Neutrophilen und B1-Zellen, sowie der erhöhte Anteil an Eosinophilen und F4/80^{intermediär+} Makrophagen deuten auf eine veränderte Migration der Zellen in Abwesenheit von Gzm A und B hin. Eine Expression von Gzm A und B konnte zwar weder während der Infektion mit *L. sigmodontis* noch in den Thioglykolat-induzierten Peritonealexudatzellen in Makrophagen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), dennoch scheint die Defizienz von Gzm A und/oder B nicht nur die Wanderung sondern auch die Reifung von Makrophagen zu beeinflussen. Untersuchungen mit der humanen Makrophagen-Zell-Linie THP-1 (*human acute monocytic leukemia cell line*) bestätigen dies (Kim et al., 2007). Agenzien, die die Reifung von Makrophagen induzieren – wie DMSO, PMA und extrazelluläre Matrixproteine – führen zur Expression von Gzm B in THP-1-Zellen. Daher vertreten die Autoren die Hypothese, dass Gzm B für die Makrophagendifferenzierung relevant ist (Kim et al., 2007). Der niedrigere prozentuale Anteil an F4/80^{hoch+} Makrophagen in den Gzm AxB im Vergleich zu WT Mäusen könnte somit als Folge einer gestörten Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen in Abhängigkeit von Gzm B interpretiert werden.

Die unterschiedlichen Zellzahlen und Unterschiede in der Genexpression an Tag 7 p.i. unterstreichen, dass die Immunantwort in der frühen Phase der Infektion in Gzm AxB KO Mäusen von WT Mäusen abweicht. Diese sind jedoch, da der Wurm ein sehr starker Stimulus ist, zu späteren Zeitpunkten der Infektion weniger stark ausgeprägt.

4.3.4 Einfluss auf die Induktion von Zelltod und AICD

Hauptaufgabe von Gzm A und B ist die Induktion von Zelltod in Zielzellen. Dennoch können Zellen, die eine Defizienz beider Granzyme aufweisen, Zielzellen effizient abtöten (Simon et al., 1997; Smyth, Street & Trapani, 2003; Waterhouse et al., 2006). Zelltod, induziert durch CTL von Gzm AxB KO Mäusen, folgt dabei einer ähnlichen Kinetik, weist jedoch in der morphologischen Abfolge der Ereignisse Unterschiede im Vergleich zu WT CTL auf (Waterhouse et al., 2006). Apoptose, verursacht durch WT CTL, folgt einem

dreistufigen Prozess. In der ersten Phase (nach ca. 50 min) kommt es zum „*membrane blebbing*“, der Abschnürung kleiner Vesikel. In der zweiten Phase wird PS auf die Außenseite der Plasmamembran der apoptotischen Zelle verlagert. Die Exposition von PS kann nach ca. 1 h 20 min mittels Annexin V nachgewiesen werden. In der letzten Phase verlieren die Zellen ihre Membranintegrität, was *in vitro* durch die Aufnahme von PI (nach ca. 2 h 30 min) nachgewiesen werden kann. Die Zeitspanne bis die Zielzellen (MS9II-Zellen) Annexin V⁺PI⁺ sind, dauert nach Inkubation mit WT und Gzm AxB KO CTL gleich lang (Waterhouse et al., 2006). Einzig die Phase früh apoptotischer Zellen (Annexin V⁺PI⁻) ist unter Verwendung von Gzm AxB KO CTL stark verkürzt. Exposition von PS und Verlust der Membranintegrität finden zeitgleich statt (Waterhouse et al., 2006). Dies steht im Widerspruch zu einer 2005 erschienenen Arbeit, die in Abwesenheit von Gzm B vermehrt früh apoptotische und weniger spät apoptotische Zielzellen ermittelte (Revell et al., 2005). Dabei wurde die Induktion von Zelltod durch CTL oder lymphokinaktivierte Killerzellen als Einbau von 7-AAD in Zielzellen (Tumorzell-Linien P815 und TA3) gemessen. Es zeigte sich eine erhöhte Anzahl großer 7-AAD^{hoch} exprimierender Zielzellen in den Ansätzen mit Gzm B defizienten CTL im Vergleich zu WT CTL. Diese Zellen wurden als früh apoptotisch interpretiert. Die gleichzeitige Abnahme kleiner 7-AAD^{niedrig und hoch} exprimierender Zellen wurde als Verringerung spät apoptotischer Zellen interpretiert. Die Einteilung in früh und spät apoptotische Zellen aufgrund ihrer Größe und des Einbaus von 7-AAD basierte auf Untersuchungen von Lecoeur et al. (Lecoeur, de Oliveira-Pinto & Gougeon, 2002; Lecoeur et al., 2001). Allerdings erscheint die Charakterisierung sterbender Zellen anhand der Höhe des eingebauten 7-AADs logischer. Hierbei werden 7-AAD⁻ Zellen als lebend definiert. Früh apoptotische Zellen sind 7-AAD^{intermediär} und spät apoptotische Zellen sind 7-AAD^{hoch} (Gaforio et al., 2002; Philpott et al., 1996). Die unterschiedlichen Methoden und Interpretationsansätze machen es schwierig, die Induktion von Zelltod durch Gzm AxB KO, Gzm B KO und WT CTL miteinander zu vergleichen. Fest steht jedoch, dass die Signalkaskade in Zielzellen in Abwesenheit von Gzm A und/oder B eine andere Qualität hat. Bestätigt wird dies durch die Beobachtung, dass Gzm AxB KO CTL im Gegensatz zu WT CTL caspaseunabhängig DNA-Fragmentation in Zielzellen induzieren (Davis, Smyth & Trapani, 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Vitalität von PleC an Tag 9 nach Infektion mit *L. sigmodontis* anhand einer Annexin V- und PI-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.4.4). *Ex vivo* zeigten Lymphozyten von Gzm AxB KO und

WT Mäusen einen vergleichbaren Anteil früh und spät apoptotischer Lymphozyten. Der Anteil Annexin V⁺ Lymphozyten lag dabei unter 10 %. Die Induktion von Zelltod in Effektorzellen durch Gzm exprimierende Zellen am Ort der Infektion spielt folglich eher eine untergeordnete Rolle.

Neben dem Abtöten von Zellen basiert der AICD in T_H2-Zellen auf einer Signalkaskade, die durch Gzm B initiiert wird (Devadas et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wurde AICD in Milzzellen naiver Mäuse und in PleC an Tag 7 p.i. untersucht. Als Nachweismethode diente der Einbau von 7-AAD. Durch Stimulation und Restimulation mit anti-CD3 konnte AICD in Gesamt-Milzzellen naiver Mäuse ausgelöst werden (siehe Abb. 3.8). Eine signifikant erhöhte Inkorporation von 7-AAD deutete nach Restimulation mit anti-CD3 auf erhöhtes Absterben der Zellen hin. Milzzellen, die nur einmal mit anti-CD3 stimuliert wurden, zeigten eine mit der Mediumkontrolle vergleichbare 7-AAD-Aufnahme. Insgesamt konnte jedoch kein Unterschied zwischen Gzm AxB KO und WT CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu waren Gzm AxB defiziente CD4⁺ T-Zellen während der Infektion mit *L. sigmodontis* weniger suszeptibel für AICD als WT CD4⁺ T-Zellen (siehe Abb. 3.28). AICD wurde dabei nach zweistündiger polyklonaler Stimulation von PleC mit Con A analysiert. Eine längere Stimulation der PleC über 72 h wie bei den Proliferationsansätzen zeigte keine unterschiedliche Sterberate in Abwesenheit von Gzm A und B (siehe Abb. 3.27). Unabhängig vom verwendeten Stimulus lag der Anteil toter und apoptotischer Zellen nach 72 h bei mehr als 50 %. Anhand der Mediumkontrolle zeigte sich, dass ein beträchtlicher Anteil der Lymphozyten bereits aus der Zellkultur verschwunden war. Dabei kann postuliert werden, dass Phagozyten die apoptotischen Zellen aufgenommen haben und diese somit nicht mehr in die Analyse eingingen (Cao et al., 2007). Die Apoptoserate wurde nach Stimulation der PleC für 72 h ohne vorherige Oberflächenfärbung mithilfe von Annexin V und PI bestimmt. Für den längeren Stimulationszeitraum kann folglich nur eine Aussage zu den Lymphozyten in der Pleurahöhle, nicht aber zu den CD4⁺ T-Zellen im Speziellen getroffen werden. Es ist somit möglich, dass der Anteil CD4⁺ T-Zellen in den Gzm AxB KO PleC im Vergleich zu WT PleC vermindert ist, dieses aber durch andere tote Zellpopulationen überlagert wird.

Devadas et al. konnten unter Verwendung von Milzzellen zeigen, dass T_H2-Zellen aus Gzm B KO Mäusen weniger an AICD versterben als WT T_H2-Zellen (Devadas et al.,

2006). Im Unterschied zu der hier vorliegenden Arbeit wurden Gzm B KO Mäuse verwendet, welche auf dem Hintergrund der 129/SvJ Maus mit dem CreLox System generiert wurden (Revell et al., 2005). Zellen von C57BL/6 Mäusen zeigen nach neuesten Daten im Gegensatz zu Zellen der 129/SvJ Mäuse eine höhere Sterberate. In 129/SvJ Mäusen sind dagegen die Überlebenssignale stärker ausgeprägt als C57BL/6 Mäusen (Ni et al., 2008). In der hier vorliegenden Arbeit wurden T_H1 - und T_H2 -Zellen nicht differenziert betrachtet, sondern lediglich anhand der Färbung mit anti-CD4 identifiziert. Devadas et al. haben für den Nachweis des AICD zuvor T_H1 - und T_H2 -Zellen aus Milzzellen generiert. Vorteil dieser kostenintensiven Methode ist die gezieltere Betrachtung der einzelnen Zelltypen. Da Milzzellen der C57BL/6 Mäuse im Vergleich zu 129/SvJ Mäusen eine stärkere Tendenz haben, durch AICD und ACAD zu sterben, können potenzielle Unterschiede zwischen den Gzm AxB KO und WT Mäusen durch den Tod weiterer $CD4^+$ T-Zellen wie T_H1 -Zellen, Treg oder T_H17 -Zellen überlagert werden. Bisher gibt es kaum Daten zum AICD in Treg oder T_H17 -Zellen. Zudem ist unklar, ob verwaiste Granzyme die Funktion von Gzm A und B in der C57BL/6 Maus kompensieren können. Die in dieser Arbeit verwendeten Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäuse weisen im Gegensatz zu den von Devadas et al. verwendeten Mäusen (Devadas et al., 2006; Revell et al., 2005) eine verminderte Expression genabwärts lokalisierter Granzyme C, D und F in NK-Zellen und lymphokinaktivierten Killerzellen auf (Pham et al., 1996; Revell et al., 2005; Waterhouse et al., 2006). Bei diesen verwaisten Granzymen wurde für Gzm C bereits gezeigt, dass es perforinabhängig Apoptose induziert (Johnson et al., 2003; Trapani & Smyth, 1993). Voraussetzung für weitere Untersuchungen, die den Einfluss der verwaisten Granzyme verifizieren, ist die kommerzielle Erwerbbarkeit spezifischer Antikörper und Reagenzien. Insgesamt deuten die Daten darauf hin, dass Zelltod in Gzm AxB KO und WT Mäusen unabhängig vom Hintergrund unterschiedlich reguliert ist. Abgeleitet von den Daten von Devadas et al. wurde ein Modell für AICD in WT T_H2 -Zellen postuliert (Zheng & Lenardo, 2006), welches Abb. 4.1 schematisch zeigt.

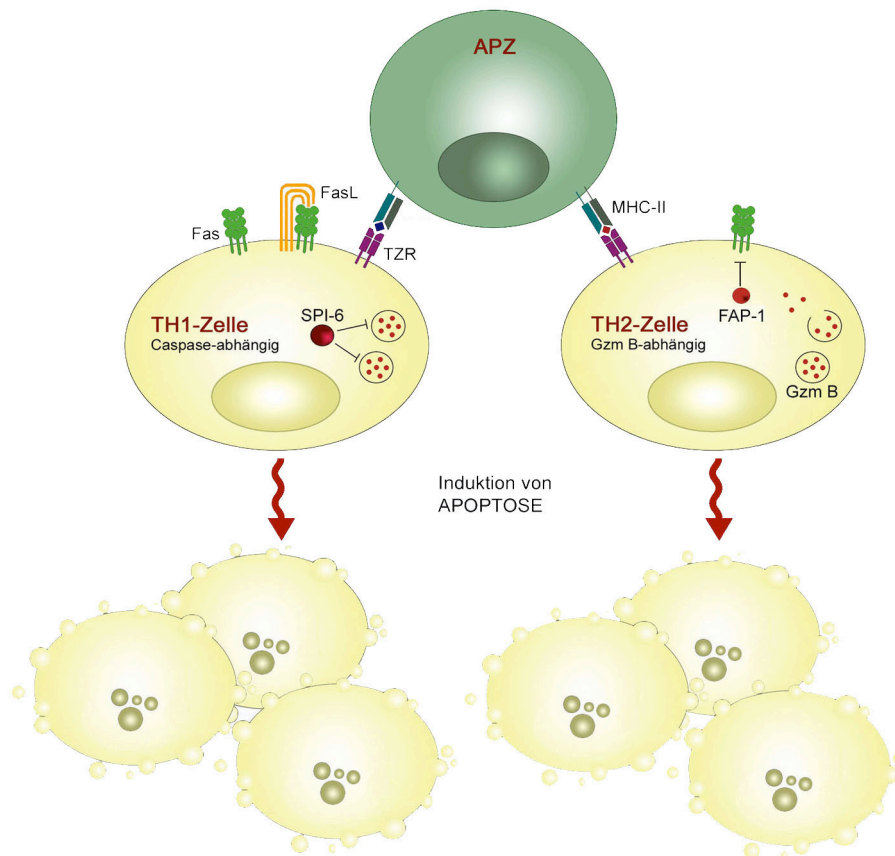


Abb. 4.1: AICD in WT Mäusen. Restimulation des TZR induziert AICD in bereits stimulierten $CD4^+$ T-Zellen. T_H1 -Zellen gehen nach Ligation von Fas mit FasL auf der gleichen Zelle oder auf benachbarten T-Zellen caspaseabhängig zugrunde. In T_H2 -Zellen wird AICD durch Gzm B vermittelt. Eine Hemmung des Gzm B Signalweges erfolgt in T_H1 -Zellen über den Inhibitor SPI-6. T_H2 -Zellen hemmen den caspaseabhängigen AICD über die Expression von FAP-1. T_H1 - und T_H2 -Zellen von WT Mäusen können gleichermaßen aufgrund der Präsenz von Caspasen und Gzm B durch AICD sterben.

Die wiederholte Stimulation durch Antigene oder polyklonale Agenzien induziert die Expression von Todesrezeptoren wie Fas sowie deren Liganden FasL auf $CD4^+$ T-Zellen. Interaktion von Fas mit FasL auf der gleichen oder einer benachbarten $CD4^+$ T-Zelle führt zur Aktivierung von intrazellulären Cysteinproteasen (Abdul K. Abbas, 2007). Die Caspasen verursachen in T_H1 -Zellen den Untergang der Zelle durch Apoptose. In T_H2 -Zellen wird dagegen eine Signalkaskade durch Freisetzung von Gzm B induziert (Devadas et al., 2006). Somit folgt der AICD in T_H1 - und T_H2 -Zellen einem unterschiedlichen intrazellulären Signalweg. Die Abwesenheit von Gzm B in den in dieser Arbeit verwendeten KO Mäusen ist somit von großer Relevanz für den AICD in T_H2 -Zellen. Abb. 4.2 zeigt schematisch die Induktion von AICD in Gzm B defizienten Mäusen.

In der Annahme, dass in Abwesenheit von Gzm B weniger T_H2 -Zellen durch AICD zugrunde gehen, ergibt sich eine Verschiebung des Verhältnisses von T_H1 - und T_H2 -Zellen in den Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen zugunsten der T_H2 -Zellen. Für die Infektion mit *L. sigmodontis* bedeutet dies, dass weniger T_H2 -Zellen in den Gzm B defizienten Mäusen als in den WT Mäusen sterben. Der intrinsische Defekt in Gzm B defizienten Mäusen könnte somit die Ursache für die veränderte zelluläre und humorale Immunantwort sein.

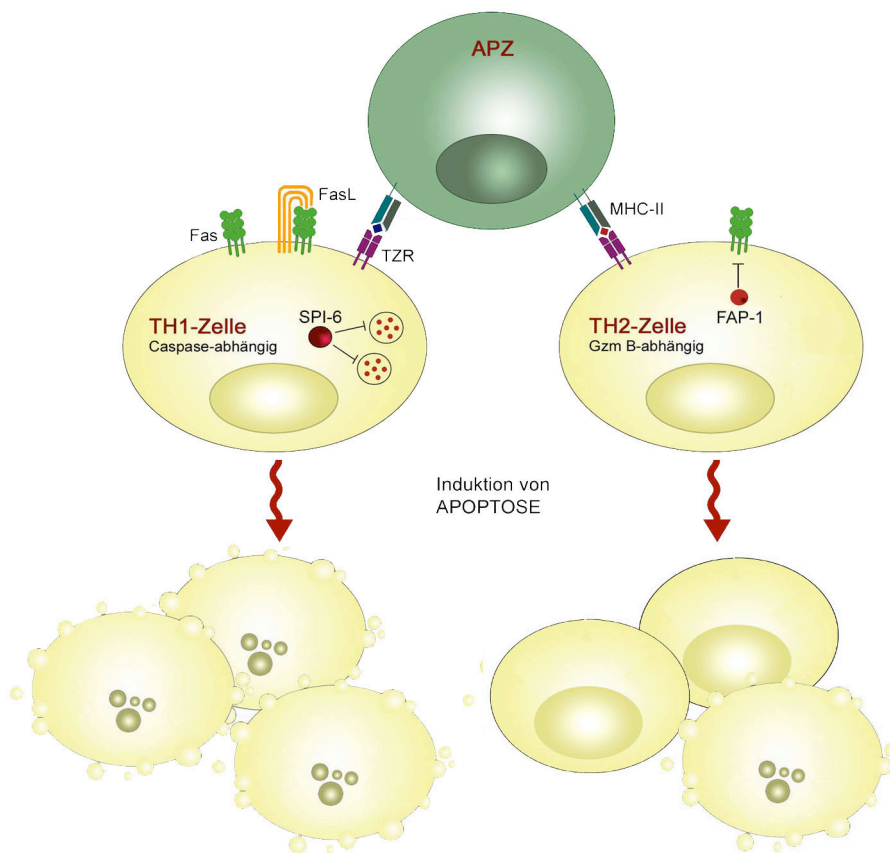


Abb. 4.2: AICD in Gzm B KO und Gzm AxB KO Mäusen. Restimulation des TZR induziert AICD in bereits stimulierten $CD4^+$ T-Zellen. T_H1 -Zellen gehen nach Ligation von Fas mit FasL auf der gleichen Zelle oder auf benachbarten T-Zellen caspaseabhängig zugrunde. In T_H2 -Zellen wird der AICD durch Gzm B vermittelt. In Gzm B und Gzm AxB defizienten Mäusen kommt es bedingt durch das Fehlen von Gzm B zu einem verminderten Absterben von T_H2 -Zellen. Als Konsequenz kommt es zu einer Verschiebung der Immunantwort in Richtung T_H2 -spezifische Zytokinantwort in den Mäusen.

4.4 Ausblick

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich Gzm AxB defiziente Mäuse in ihrer zellulären und humoralen Immunantwort von WT Mäusen unterscheiden. Dadurch wiesen die Mäuse eine veränderte Immunabwehr gegen die Nagerfilarie *L. sigmodontis* auf. Die Defizienz von Gzm B in Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäusen führte zu einer verbesserten Immunabwehr im Vergleich zu WT Mäusen, wohingegen Gzm A KO Mäuse über eine schlechtere Abwehr gegen *L. sigmodontis* als WT Mäuse verfügten.

Während der Infektion und nach Stimulation mit LPS exprimierten B-Zellen Gzm A und B. Um zu untersuchen, ob der Phänotyp, welchen die KO-Mäuse in der Infektion mit *L. sigmodontis* zeigen, auf die Expression von Gzm A und B zurückzuführen ist, wäre die Generierung von Knochenmarkschimären aufschlussreich. Hierbei wäre die Verwendung von bestrahlten B-Zell KO (JHT) Mäusen (Bot, 1996) als Rezipienten sinnvoll. Diese würden mit einer Mischung aus Knochenmarkszellen von JHT und Gzm AxB KO Mäusen rekonstituiert (JHT/Gzm AxB KO → JHT). Mit Ausnahme der B-Zellen würden alle weiteren Zellen Gzm A und B exprimieren. Die B-Zellen würden dagegen zu 100 % eine Defizienz an Gzm A und B aufweisen. Zusätzlich würden bestrahlte JHT Mäuse mit Knochenmarkszellen einer JHT und WT Maus rekonstituiert (JHT/WT → JHT). In dieser zweiten Maus würden alle sich entwickelnden B-Zellen aus der WT Maus stammen und Gzm A und B exprimieren. Anhand dieser Chimären kann eine Aussage getroffen werden, ob die Abwehr in WT Mäusen durch Gzm⁺ B-Zellen beeinflusst wird. Sollte dies nicht der Fall sein, müssen andere Zellen den veränderten Phänotyp während der Infektion vermitteln. Dazu könnten in einem zweiten Ansatz WT Mäuse nach Bestrahlung als Rezipienten verwendet werden. Für die Untersuchungen würde entweder Gzm AxB KO (Gzm AxB KO → WT) oder WT Knochenmark (WT → WT) in die WT Maus transferiert. Eine Differenzierung der Gzm A- und B-vermittelten Effekte kann über die Verwendung von Einzel-KO Mäusen erzielt werden.

Ob die Abwesenheit von Gzm B das Überleben von T_H2-Zellen fördert, ist nach wie vor unklar. Bei der Beantwortung dieser Frage ist eine IL-4 Reportermaus hilfreich. In dieser Maus wurde an das 3' Ende des IL-4 Gens mittels *knock in* Verfahren ein virales IRES Element mit dem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) eingebracht (McDonald, Mohrs & Brewer, 2006). Die Expression von IL-4 kann infolgedessen über die Expression von EGFP nachgewiesen werden. Durch Kreuzung von Gzm defizienten Mäusen mit der

IL-4 Reporter Maus, könnte der Zelltod von IL-4⁺ T_H2-Zellen gezielt in Abwesenheit von Gzm A und/oder B verfolgt werden. Neben dem AICD kann so die Vitalität von T_H2-Zellen während des gesamten Verlaufes der Infektion nachvollzogen werden.

Sowohl die Knochenmarkschimären als auch die IL-4 Reportermaus würden wichtige Hinweise liefern, auf welchen Mechanismus die veränderte Immunabwehr in den KO-Mäusen zurückzuführen ist. Da beide Experimente sehr zeitaufwendig sind, war es jedoch nicht mehr möglich, diesen Fragen im Rahmen meiner Doktorarbeit nachzugehen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre haben dazu beigetragen, dass neue Erkenntnisse über die Funktion und Expression von Gzm A und B gewonnen wurden. Neben extrazellulären Funktionen deutet die Expression von Gzm A und B durch neu identifizierte Zelltypen auf weitere Aufgaben hin. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen über die Bedeutung von Granzymen während der Infektion mit Würmern.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Gzm A und B Defizienz auf die Immunantwort von Mäusen während der Infektion mit der Nagerfilarie *L. sigmodontis* evaluiert. Die Defizienz beider Granzyme beeinflusste die Entwicklung des Wurmes: Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäuse zeigten gegenüber WT Mäusen eine verbesserte Abwehr gegen *L. sigmodontis*, wohingegen die Defizienz von Gzm A zu einer Erhöhung der Wurmlast an Tag 9 p.i. und einer Verkürzung der Larven an Tag 27 p.i. führte.

Im Verlauf der Infektion wurde ein Anstieg der Gzm A- und B-Expression in Lymphozyten der Milz und der Pleurahöhle nachgewiesen. Die höchste Expression beider Granzyme zeigte sich an Tag 9 p.i. durch murine CD19⁺ B-Zellen. Dieser Befund für murine B-Zellen ist neu und konnte durch Stimulation von naiven Milzzellen mit B-Zellspezifischen Stimuli wie LPS bestätigt werden. Die Expression beider Granzyme hatte keinen direkten Einfluss auf die Vitalität der Lymphozyten am Ort der Infektion. Dennoch zeigten Gzm AxB KO Mäuse eine veränderte zelluläre und humorale Immunantwort, sowohl während der Immunisierung mit einem Modellantigen, als auch während der Infektion mit *L. sigmodontis*. Gzm AxB KO Mäuse wiesen im Vergleich zu WT Mäusen eine stärkere T_H2-Antwort bei gleichzeitiger Verminderung der T_H1-spezifischen Zytokinantwort auf. Als Ursache für die Verschiebung der Zytokinantwort konnten jüngere Daten, welche eine Rolle von Gzm B im AICD zeigen, bestätigt werden. Restimulation von PleC mit Con A induzierte in Gzm AxB KO und WT Mäusen AICD und war in Abwesenheit von Gzm A und B deutlich vermindert. Das Gzm B-abhängige Sterben von CD4⁺ T_H2-Zellen kann somit als Ursache für das unterschiedliche T_H1-T_H2-Equilibrium in Gzm AxB KO und WT Mäusen angesehen werden.

Neben der veränderten adaptiven Immunität deuten die frühen Unterschiede in der Wurmlast auf eine Beteiligung von Zellen des angeborenen Immunsystems hin. An Tag 7 p.i. war die Anzahl der PleC in Gzm AxB KO Mäusen niedriger als in WT Mäusen. Die Analyse der Genexpression an Tag 7 p.i. zeigte darüber hinaus in Abwesenheit von

Gzm A und B eine Verminderung von Makrophagen-Markern. Anhand der zellulären Analyse von Peritonealexudatzellen konnte eine gestörte Wanderung/Reifung von Zellen der angeborenen Immunantwort belegt werden. Nach Injektion von Thioglykolat waren Makrophagen in der Peritonealhöhle von Gzm AxB KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen weniger ausdifferenziert. Die Reifung der Makrophagen wurde anhand des Markers F4/80 ermittelt.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Gzm defiziente Mäuse eine veränderte Immunantwort, die von Zellen der angeborenen und adaptiven Immunantwort vermittelt werden, aufweisen. Dies hat zur Folge, dass Gzm AxB KO und Gzm B KO Mäuse über eine verbesserte Immunabwehr gegen *L. sigmodontis* verfügen, wohingegen Gzm A KO Mäuse die Infektion schlechter abwehren können als WT Mäuse. Welche Rolle die einzelnen Zelltypen dabei haben oder ob vielmehr ein Zusammenspiel der Leukozyten zu einem veränderten Phänotyp während der Infektion führt, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABBAS, A. K. & JANEWAY, C. A., JR. (2000). Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* **100**, 129-38.
- ABDUL K. ABBAS, A. H. L., SHIV PILLAI. (2007). *Cellular and Molecular Immunology*, 6th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia.
- AFZALI, B., LOMBARDI, G., LECHLER, R. I. & LORD, G. M. (2007). The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clin Exp Immunol* **148**, 32-46.
- AL-QAOUD, K. M., FLEISCHER, B. & HOERAUF, A. (1998). The Xid defect imparts susceptibility to experimental murine filariosis--association with a lack of antibody and IL-10 production by B cells in response to phosphorylcholine. *Int Immunol* **10**, 17-25.
- AL-QAOUD, K. M., PEARLMAN, E., HARTUNG, T., KLUKOWSKI, J., FLEISCHER, B. & HOERAUF, A. (2000). A new mechanism for IL-5-dependent helminth control: neutrophil accumulation and neutrophil-mediated worm encapsulation in murine filariasis are abolished in the absence of IL-5. *Int Immunol* **12**, 899-908.
- AL-QAOUD, K. M., TAUBERT, A., ZAHNER, H., FLEISCHER, B. & HOERAUF, A. (1997). Infection of BALB/c mice with the filarial nematode *Litomosoides sigmodontis*: role of CD4+ T cells in controlling larval development. *Infect Immun* **65**, 2457-61.
- ANDRADE, F., ROY, S., NICHOLSON, D., THORNBERRY, N., ROSEN, A. & CASCIOLA-ROSEN, L. (1998). Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* **8**, 451-60.
- ANTHONY, R. M., URBAN, J. F., JR., ALEM, F., HAMED, H. A., ROZO, C. T., BOUCHER, J. L., VAN ROOIJEN, N. & GAUSE, W. C. (2006). Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* **12**, 955-60.
- ARNOULT, D., GAUME, B., KARBOWSKI, M., SHARPE, J. C., CECCONI, F. & YOULE, R. J. (2003). Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *Embo J* **22**, 4385-99.
- ARUMUGAM, S., PFARR, K. M. & HOERAUF, A. (2008). Infection of the intermediate mite host with Wolbachia-depleted *Litomosoides sigmodontis* microfilariae: impaired L1 to L3 development and subsequent sex-ratio distortion in adult worms. *Int J Parasitol* **38**, 981-7.
- BABA, T., IWASAKI, S., MARUOKA, T., SUZUKI, A., TOMARU, U., IKEDA, H., YOSHIKI, T., KASAHARA, M. & ISHIZU, A. (2008). Rat CD4+CD8+ macrophages kill tumor cells through an NKG2D- and granzyme/perforin-dependent mechanism. *J Immunol* **180**, 2999-3006.
- BABAYAN, S., ATTOUT, T., SPECHT, S., HOERAUF, A., SNOUNOU, G., RENIA, L., KORENAGA, M., BAIN, O. & MARTIN, C. (2005). Increased early local immune responses and altered worm development in high-dose infections of mice susceptible to the filaria *Litomosoides sigmodontis*. *Med Microbiol Immunol* **194**, 151-62.
- BABAYAN, S., UNGEHEUER, M. N., MARTIN, C., ATTOUT, T., BELNOUE, E., SNOUNOU, G., RENIA, L., KORENAGA, M. & BAIN, O. (2003). Resistance and susceptibility to filarial infection with *Litomosoides sigmodontis* are associated with early differences in parasite development and in localized immune reactions. *Infect Immun* **71**, 6820-9.
- BABU, S., PORTE, P., KLEI, T. R., SHULTZ, L. D. & RAJAN, T. V. (1998). Host NK cells are required for the growth of the human filarial parasite *Brugia malayi* in mice. *J Immunol* **161**, 1428-32.
- BADE, B., LOHRMANN, J., TEN BRINKE, A., WOLBINK, A. M., WOLBINK, G. J., TEN BERGE, I. J., VIRCHOW, J. C., JR., LUTTMANN, W. & HACK, C. E. (2005). Detection of soluble human granzyme K in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* **35**, 2940-8.
- BAO, Q. & SHI, Y. (2007). Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* **14**, 56-65.
- BAUMGARTH, N., TUNG, J. W. & HERZENBERG, L. A. (2005). Inherent specificities in natural antibodies: a key to immune defense against pathogen invasion. *Springer Semin Immunopathol* **26**, 347-62.

- BERESFORD, P. J., XIA, Z., GREENBERG, A. H. & LIEBERMAN, J. (1999). Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. *Immunity* **10**, 585-94.
- BERESFORD, P. J., ZHANG, D., OH, D. Y., FAN, Z., GREER, E. L., RUSSO, M. L., JAJU, M. & LIEBERMAN, J. (2001). Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* **276**, 43285-93.
- BIRD, C. H., SUN, J., UNG, K., KARAMBALIS, D., WHISSTOCK, J. C., TRAPANI, J. A. & BIRD, P. I. (2005). Cationic sites on granzyme B contribute to cytotoxicity by promoting its uptake into target cells. *Mol Cell Biol* **25**, 7854-67.
- BIRD, C. H., SUTTON, V. R., SUN, J., HIRST, C. E., NOVAK, A., KUMAR, S., TRAPANI, J. A. & BIRD, P. I. (1998). Selective regulation of apoptosis: the cytotoxic lymphocyte serpin proteinase inhibitor 9 protects against granzyme B-mediated apoptosis without perturbing the Fas cell death pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 6387-98.
- BISHOP, J. V., MEJIA, J. S., PEREZ DE LEON, A. A., TABACHNICK, W. J. & TITUS, R. G. (2006). Salivary gland extracts of *Culicoides sonorensis* inhibit murine lymphocyte proliferation and no production by macrophages. *Am J Trop Med Hyg* **75**, 532-6.
- BLEAY, C., WILKES, C. P., PATERSON, S. & VINEY, M. E. (2007). Density-dependent immune responses against the gastrointestinal nematode *Strongyloides ratti*. *Int J Parasitol* **37**, 1501-9.
- BOSSI, G. & GRIFFITHS, G. M. (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol* **17**, 87-94.
- BOT, A. (1996). Immunoglobulin deficient mice generated by gene targeting as models for studying the immune response. *Int Rev Immunol* **13**, 327-40.
- BOTS, M., L, V. A. N. B., RADEMAKER, M. T., OFFRINGA, R. & MEDEMA, J. P. (2006). Serpins prevent granzyme-induced death in a species-specific manner. *Immunol Cell Biol* **84**, 79-86.
- BRATKE, K., BOTTCHE, B., LEEDER, K., SCHMIDT, S., KUPPER, M., VIRCHOW, J. C., JR. & LUTTMANN, W. (2004). Increase in granzyme B+ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenged patients with atopic asthma. *Clin Exp Immunol* **136**, 542-8.
- BRATTIG, N. W., BAZZOCCHI, C., KIRSCHNING, C. J., REILING, N., BUTTNER, D. W., CECILIANI, F., GEISINGER, F., HOCHREIN, H., ERNST, M., WAGNER, H., BANDI, C. & HOERAUF, A. (2004). The major surface protein of Wolbachia endosymbionts in filarial nematodes elicits immune responses through TLR2 and TLR4. *J Immunol* **173**, 437-45.
- BRATTIG, N. W., RATHJENS, U., ERNST, M., GEISINGER, F., RENZ, A. & TISCHENDORF, F. W. (2000). Lipopolysaccharide-like molecules derived from Wolbachia endobacteria of the filaria *Onchocerca volvulus* are candidate mediators in the sequence of inflammatory and antiinflammatory responses of human monocytes. *Microbes Infect* **2**, 1147-57.
- BRENNER, D., KRAMMER, P. H. & ARNOLD, R. (2008). Concepts of activated T cell death. *Crit Rev Oncol Hematol* **66**, 52-64.
- BURNET, F. M. (1959). The clonal selection theory of acquired immunity. *Cambridge University Press London*.
- BUZZA, M. S. & BIRD, P. I. (2006). Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem* **387**, 827-37.
- BUZZA, M. S., ZAMURS, L., SUN, J., BIRD, C. H., SMITH, A. I., TRAPANI, J. A., FROELICH, C. J., NICE, E. C. & BIRD, P. I. (2005). Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem* **280**, 23549-58.
- CAIRNS, B., MAILE, R., BARNES, C. M., FRELINGER, J. A. & MEYER, A. A. (2006). Increased Toll-like receptor 4 expression on T cells may be a mechanism for enhanced T cell response late after burn injury. *J Trauma* **61**, 293-8; discussion 298-9.
- CAMBIER, J. C., PLEIMAN, C. M. & CLARK, M. R. (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol* **12**, 457-86.
- CAMMAROTA, G., SCHEIRLE, A., TAKACS, B., DORAN, D. M., KNORR, R., BANNEWARTH, W., GUARDIOLA, J. & SINIGAGLIA, F. (1992). Identification of a CD4 binding site on the beta 2 domain of HLA-DR molecules. *Nature* **356**, 799-801.

- CAO, X., CAI, S. F., FEHNIGER, T. A., SONG, J., COLLINS, L. I., PIWNICA-WORMS, D. R. & LEY, T. J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **27**, 635-46.
- CHEARWAE, W. & BRIGHT, J. J. (2008). 15-Deoxy-Delta(12,14)-Prostaglandin J(2) and Curcumin Modulate the Expression of Toll-like Receptors 4 and 9 in Autoimmune T Lymphocyte. *J Clin Immunol* **28**, 558-70.
- CHIRCO, R., LIU, X. W., JUNG, K. K. & KIM, H. R. (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 99-113.
- CHOWDHURY, D., BERESFORD, P. J., ZHU, P., ZHANG, D., SUNG, J. S., DEMPLE, B., PERRINO, F. W. & LIEBERMAN, J. (2006). The exonuclease TREX1 is in the SET complex and acts in concert with NM23-H1 to degrade DNA during granzyme A-mediated cell death. *Mol Cell* **23**, 133-42.
- CHOWDHURY, D. & LIEBERMAN, J. (2007). Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annu Rev Immunol*.
- CHOY, J. C., HUNG, V. H., HUNTER, A. L., CHEUNG, P. K., MOTYKA, B., GOPING, I. S., SAWCHUK, T., BLEACKLEY, R. C., PODOR, T. J., MCMANUS, B. M. & GRANVILLE, D. J. (2004). Granzyme B induces smooth muscle cell apoptosis in the absence of perforin: involvement of extracellular matrix degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 2245-50.
- CHOY, J. C., McDONALD, P. C., SUAREZ, A. C., HUNG, V. H., WILSON, J. E., MCMANUS, B. M. & GRANVILLE, D. J. (2003). Granzyme B in atherosclerosis and transplant vascular disease: association with cell death and atherosclerotic disease severity. *Mod Pathol* **16**, 460-70.
- COOK, R. L. & ROBERTS, L. S. (1991). In vivo effects of putative crowding factors on development of *Hymenolepis diminuta*. *J Parasitol* **77**, 21-5.
- CULLEN, S. P., ADRAIN, C., LUTHI, A. U., DURIEZ, P. J. & MARTIN, S. J. (2007). Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. *J Cell Biol* **176**, 435-44.
- CULLEN, S. P. & MARTIN, S. J. (2008). Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* **15**, 251-62.
- DARMON, A. J., NICHOLSON, D. W. & BLEACKLEY, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* **377**, 446-8.
- DAVIS, J. E., SMYTH, M. J. & TRAPANI, J. A. (2001). Granzyme A and B-deficient killer lymphocytes are defective in eliciting DNA fragmentation but retain potent in vivo anti-tumor capacity. *Eur J Immunol* **31**, 39-47.
- DEVADAS, S., DAS, J., LIU, C., ZHANG, L., ROBERTS, A. I., PAN, Z., MOORE, P. A., DAS, G. & SHI, Y. (2006). Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity* **25**, 237-47.
- DHEIN, J., WALCZAK, H., BAUMLER, C., DEBATIN, K. M. & KRAMMER, P. H. (1995). Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature* **373**, 438-41.
- DOS SANTOS, S., DELATTRE, A. I., DE LONGUEVILLE, F., BULT, H. & RAES, M. (2007). Gene expression profiling of LPS-stimulated murine macrophages and role of the NF-kappaB and PI3K/mTOR signaling pathways. *Ann N Y Acad Sci* **1096**, 70-7.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* **102**, 33-42.
- DUKE, B. O. (1993). The population dynamics of *Onchocerca volvulus* in the human host. *Trop Med Parasitol* **44**, 61-8.
- EBNET, K., HAUSMANN, M., LEHMANN-GRUBE, F., MULLBACHER, A., KOPF, M., LAMERS, M. & SIMON, M. M. (1995). Granzyme A-deficient mice retain potent cell-mediated cytotoxicity. *Embo J* **14**, 4230-9.
- ELSNER, J., ESCHER, S. E. & FORSSMANN, U. (2004). Chemokine receptor antagonists: a novel therapeutic approach in allergic diseases. *Allergy* **59**, 1243-58.
- FAN, Z., BERESFORD, P. J., ZHANG, D., XU, Z., NOVINA, C. D., YOSHIDA, A., POMMIER, Y. & LIEBERMAN, J. (2003). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* **4**, 145-53.

- FEHNIGER, T. A., CAI, S. F., CAO, X., BREDEMEYER, A. J., PRESTI, R. M., FRENCH, A. R. & LEY, T. J. (2007). Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity* **26**, 798-811.
- FEHNIGER, T. A., COOPER, M. A., NUOVO, G. J., CELLA, M., FACCHETTI, F., COLONNA, M. & CALIGIURI, M. A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* **101**, 3052-7.
- FROELICH, C. J., HANNA, W. L., POIRIER, G. G., DURIEZ, P. J., D'AMOURS, D., SALVESEN, G. S., ALNEMRI, E. S., EARNSHAW, W. C. & SHAH, G. M. (1996). Granzyme B/perforin-mediated apoptosis of Jurkat cells results in cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase to the 89-kDa apoptotic fragment and less abundant 64-kDa fragment. *Biochem Biophys Res Commun* **227**, 658-65.
- FROELICH, C. J., ZHANG, X., TURBOV, J., HUDIG, D., WINKLER, U. & HANNA, W. L. (1993). Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *J Immunol* **151**, 7161-71.
- FUJIWARA, A., KAWAI, Y., SEKIKAWA, S., HORII, T., YAMADA, M., MITSUFUJI, S. & ARIZONO, N. (2004). Villus epithelial injury induced by infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* is associated with upregulation of granzyme B. *J Parasitol* **90**, 1019-26.
- GAFORIO, J. J., SERRANO, M. J., ALGARRA, I., ORTEGA, E. & ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells assessed by flow cytometry using 7-Aminoactinomycin D. *Cytometry* **49**, 8-11.
- GAO, G. F., TORMO, J., GERTH, U. C., WYER, J. R., MCMICHAEL, A. J., STUART, D. I., BELL, J. I., JONES, E. Y. & JAKOBSEN, B. K. (1997). Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* **387**, 630-4.
- GARMS, R. (1975). Observations on filarial infections and parous rates of anthropophilic blackflies in Guatemala, with reference to the transmission of *Onchocerca volvulus*. *Tropenmed Parasitol* **26**, 169-82.
- GIANNELLI, G., FALK-MARZILLIER, J., SCHIRALDI, O., STETLER-STEVENSON, W. G. & QUARANTA, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* **277**, 225-8.
- GILLICK, K. & CROMPTON, M. (2008). Evaluating cytochrome c diffusion in the intermembrane spaces of mitochondria during cytochrome c release. *J Cell Sci* **121**, 618-26.
- GONDEK, D. C., LU, L. F., QUEZADA, S. A., SAKAGUCHI, S. & NOELLE, R. J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* **174**, 1783-6.
- GRIESSER, H. & MAK, T. W. (1994). The T-cell receptor--structure, function, and clinical application. *Hematol Pathol* **8**, 1-23.
- GROSSMAN, W. J., REVELL, P. A., LU, Z. H., JOHNSON, H., BREDEMEYER, A. J. & LEY, T. J. (2003). The orphan granzymes of humans and mice. *Curr Opin Immunol* **15**, 544-52.
- GROSSMAN, W. J., VERBSKY, J. W., BARCHET, W., COLONNA, M., ATKINSON, J. P. & LEY, T. J. (2004a). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* **21**, 589-601.
- GROSSMAN, W. J., VERBSKY, J. W., TOLLEFSEN, B. L., KEMPER, C., ATKINSON, J. P. & LEY, T. J. (2004b). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* **104**, 2840-8.
- GRUJIC, M., BRAGA, T., LUKINIUS, A., ELORANTA, M. L., KNIGHT, S. D., PEJLER, G. & ABRINK, M. (2005). Serglycin-deficient cytotoxic T lymphocytes display defective secretory granule maturation and granzyme B storage. *J Biol Chem* **280**, 33411-8.
- GUILIANO, D. B., HONG, X., MCKERROW, J. H., BLAXTER, M. L., OKSOV, Y., LIU, J., GHEDIN, E. & LUSTIGMAN, S. (2004). A gene family of cathepsin L-like proteases of filarial nematodes are associated with larval molting and cuticle and eggshell remodeling. *Mol Biochem Parasitol* **136**, 227-42.
- H, T. S. & LEGESSE, M. (2007). The role of Wolbachia bacteria in the pathogenesis of onchocerciasis and prospects for control of the disease. *Ethiop Med J* **45**, 213-9.

- HASHMI, S., ZHANG, J., OKSOV, Y. & LUSTIGMAN, S. (2004). The *Caenorhabditis elegans* cathepsin Z-like cysteine protease, Ce-CPZ-1, has a multifunctional role during the worms' development. *J Biol Chem* **279**, 6035-45.
- HERBERT, D. R., LEE, J. J., LEE, N. A., NOLAN, T. J., SCHAD, G. A. & ABRAHAM, D. (2000). Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Immunol* **165**, 4544-51.
- HERMSEN, C. C., KONIJNENBERG, Y., MULDER, L., LOE, C., VAN DEUREN, M., VAN DER MEER, J. W., VAN MIERLO, G. J., ELING, W. M., HACK, C. E. & SAUERWEIN, R. W. (2003). Circulating concentrations of soluble granzyme A and B increase during natural and experimental *Plasmodium falciparum* infections. *Clin Exp Immunol* **132**, 467-72.
- HEUSEL, J. W., WESSELSCHMIDT, R. L., SHRESTA, S., RUSSELL, J. H. & LEY, T. J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* **76**, 977-87.
- HIRAYASU, H., YOSHIKAWA, Y., TSUZUKI, S. & FUSHIKI, T. (2008). A Lymphocyte Serine Protease Granzyme A Causes Detachment of a Small-Intestinal Epithelial Cell Line (IEC-6). *Biosci Biotechnol Biochem*.
- HIRST, C. E., BUZZA, M. S., SUTTON, V. R., TRAPANI, J. A., LOVELAND, K. L. & BIRD, P. I. (2001). Perforin-independent expression of granzyme B and proteinase inhibitor 9 in human testis and placenta suggests a role for granzyme B-mediated proteolysis in reproduction. *Mol Hum Reprod* **7**, 1133-42.
- HISE, A. G., DAEHNEL, K., GILLETTE-FERGUSON, I., CHO, E., MCGARRY, H. F., TAYLOR, M. J., GOLENBOCK, D. T., FITZGERALD, K. A., KAZURA, J. W. & PEARLMAN, E. (2007). Innate immune responses to endosymbiotic Wolbachia bacteria in *Brugia malayi* and *Onchocerca volvulus* are dependent on TLR2, TLR6, MyD88, and Mal, but not TLR4, TRIF, or TRAM. *J Immunol* **178**, 1068-76.
- HOCHEGGER, K., ELLER, P., HUBER, J. M., BERNHARD, D., MAYER, G., ZLABINGER, G. J. & ROSENKRANZ, A. R. (2007). Expression of granzyme A in human polymorphonuclear neutrophils. *Immunology* **121**, 166-73.
- HSIEH, G. C., LOUKAS, A., WAHL, A. M., BHATIA, M., WANG, Y., WILLIAMSON, A. L., KEHN, K. W., MARUYAMA, H., HOTEZ, P. J., LEITENBERG, D., BETHONY, J. & CONSTANT, S. L. (2004). A secreted protein from the human hookworm *necator americanus* binds selectively to NK cells and induces IFN-gamma production. *J Immunol* **173**, 2699-704.
- HUANG, B., ZHAO, J., UNKELESS, J. C., FENG, Z. H. & XIONG, H. (2008). TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword. *Oncogene* **27**, 218-24.
- ITO, T., HANABUCHI, S., WANG, Y. H., PARK, W. R., ARIMA, K., BOVER, L., QIN, F. X., GILLIET, M. & LIU, Y. J. (2008). Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity* **28**, 870-80.
- JAHRSDORFER, B., BLACKWELL, S. E., WOOLDRIDGE, J. E., HUANG, J., ANDRESKI, M. W., JACOBUS, L. S., TAYLOR, C. M. & WEINER, G. J. (2006). B-chronic lymphocytic leukemia cells and other B cells can produce granzyme B and gain cytotoxic potential after interleukin-21-based activation. *Blood* **108**, 2712-9.
- JANAS, M. L., GROVES, P., KIENZLE, N. & KELSO, A. (2005). IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol* **175**, 8003-10.
- JANSEN, E. M., DROIN, N. M., LEMMENS, E. E., PINKOSKI, M. J., BENSINGER, S. J., EHST, B. D., GRIFFITH, T. S., GREEN, D. R. & SCHOENBERGER, S. P. (2005). CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature* **434**, 88-93.
- JOHNSON, H., SCORRANO, L., KORSMEYER, S. J. & LEY, T. J. (2003). Cell death induced by granzyme C. *Blood* **101**, 3093-101.
- KAHNERT, A., SEILER, P., STEIN, M., BANDERMANN, S., HAHNKE, K., MOLLENKOPF, H. & KAUFMANN, S. H. (2006). Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol* **36**, 631-47.
- KANAVAROS, P., BOULLAND, M. L., PETIT, B., ARNULF, B. & GAULARD, P. (2000). Expression of cytotoxic proteins in peripheral T-cell and natural killer-cell (NK) lymphomas: association

- with extranodal site, NK or T_H17 phenotype, anaplastic morphology and CD30 expression. *Leuk Lymphoma* **38**, 317-26.
- KEBIR, H., KREYMBORG, K., IFRGAN, I., DODELET-DEVILLERS, A., CAYROL, R., BERNARD, M., GIULIANI, F., ARBOUR, N., BECHER, B. & PRAT, A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* **13**, 1173-5.
- KIM, W. J., KIM, H., SUK, K. & LEE, W. H. (2007). Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol Lett* **111**, 57-65.
- KLUCK, R. M., BOSSY-WETZEL, E., GREEN, D. R. & NEWMAYER, D. D. (1997). The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-6.
- KORTEN, S., BADUSCHE, M., BUTTNER, D. W., HOERAUF, A., BRATTIG, N. & FLEISCHER, B. (2008). Natural death of adult *Onchocerca volvulus* and filaricidal effects of doxycycline induce local FOXP3⁺/CD4⁺ regulatory T cells and granzyme expression. *Microbes Infect* **10**, 313-324.
- KORTEN, S., VOLKMAN, L., SAEFTEL, M., FISCHER, K., TANIGUCHI, M., FLEISCHER, B. & 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* **168**, 5199-206.
- KRUEGER, A., SCHMITZ, I., BAUMANN, S., KRAMMER, P. H. & KIRCHHOFF, S. (2001). Cellular FLICE-inhibitory protein splice variants inhibit different steps of caspase-8 activation at the CD95 death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* **276**, 20633-40.
- KURSCHUS, F. C., BRUNO, R., FELLOWS, E., FALK, C. S. & JENNE, D. E. (2005). Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack. *Blood* **105**, 2049-58.
- LAMB, T. J., HARRIS, A., LE GOFF, L., READ, A. F. & ALLEN, J. E. (2008). *Litomosoides sigmodontis*: vaccine-induced immune responses against Wolbachia surface protein can enhance the survival of filarial nematodes during primary infection. *Exp Parasitol* **118**, 285-9.
- LAMB, T. J., LE GOFF, L., KURNIAWAN, A., GUILIANO, D. B., FENN, K., BLAXTER, M. L., READ, A. F. & ALLEN, J. E. (2004). Most of the response elicited against Wolbachia surface protein in filarial nematode infection is due to the infective larval stage. *J Infect Dis* **189**, 120-7.
- LAUW, F. N., SIMPSON, A. J., HACK, C. E., PRINS, J. M., WOLBINK, A. M., VAN DEVENTER, S. J., CHAOWAGUL, W., WHITE, N. J. & VAN DER POLL, T. (2000). Soluble granzymes are released during human endotoxemia and in patients with severe infection due to gram-negative bacteria. *J Infect Dis* **182**, 206-13.
- LE GOFF, L., LAMB, T. J., GRAHAM, A. L., HARCUS, Y. & ALLEN, J. E. (2002). IL-4 is required to prevent filarial nematode development in resistant but not susceptible strains of mice. *Int J Parasitol* **32**, 1277-84.
- LE GOFF, L., LOKE, P., ALI, H. F., TAYLOR, D. W. & ALLEN, J. E. (2000). Interleukin-5 is essential for vaccine-mediated immunity but not innate resistance to a filarial parasite. *Infect Immun* **68**, 2513-7.
- LECOEUR, H., DE OLIVEIRA-PINTO, L. M. & GOUGEON, M. L. (2002). Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. *J Immunol Methods* **265**, 81-96.
- LECOEUR, H., FEVRIER, M., GARCIA, S., RIVIERE, Y. & GOUGEON, M. L. (2001). A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* **253**, 177-87.
- LETTESJO, H., RIDDERSTAD, A. & MOLLER, E. (1997). IgG2b inducing factor from rheumatoid arthritis synovial fluid synergizes with transforming growth factor-beta in promoting IgG2b antibody production in mouse B lymphocytes. *Scand J Immunol* **45**, 50-4.
- LOKE, P., GALLAGHER, I., NAIR, M. G., ZANG, X., BROMBACHER, F., MOHRS, M., ALLISON, J. P. & ALLEN, J. E. (2007). Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol* **179**, 3926-36.
- LOKE, P., NAIR, M. G., PARKINSON, J., GUILIANO, D., BLAXTER, M. & ALLEN, J. E. (2002). IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. *BMC Immunol* **3**, 7.

- MACDONALD, A. S., MAIZELS, R. M., LAWRENCE, R. A., DRANSFIELD, I. & ALLEN, J. E. (1998). Requirement for in vivo production of IL-4, but not IL-10, in the induction of proliferative suppression by filarial parasites. *J Immunol* **160**, 1304-12.
- MALEK, T. R. (2008). The biology of interleukin-2. *Annu Rev Immunol* **26**, 453-79.
- MANTOVANI, A., GARLANDA, C., DONI, A. & BOTTAZZI, B. (2008). Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3. *J Clin Immunol* **28**, 1-13.
- MARECHAL, P., LE GOFF, L., PETIT, G., DIAGNE, M., TAYLOR, D. W. & BAIN, O. (1996). The fate of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in susceptible and naturally resistant mice. *Parasite* **3**, 25-31.
- MARSLAND, B. J., KURRER, M., REISSMANN, R., HARRIS, N. L. & KOPF, M. (2008). *Nippostrongylus brasiliensis* infection leads to the development of emphysema associated with the induction of alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol* **38**, 479-88.
- MARTIN, C., AL-QAOU, K. M., UNGEHEUER, M. N., PAEHLE, K., VUONG, P. N., BAIN, O., FLEISCHER, B. & HOERAUF, A. (2000a). IL-5 is essential for vaccine-induced protection and for resolution of primary infection in murine filariasis. *Med Microbiol Immunol* **189**, 67-74.
- MARTIN, C., LE GOFF, L., UNGEHEUER, M. N., VUONG, P. N. & BAIN, O. (2000b). Drastic reduction of a filarial infection in eosinophilic interleukin-5 transgenic mice. *Infect Immun* **68**, 3651-6.
- MARTIN, C., SAEFTEL, M., VUONG, P. N., BABAYAN, S., FISCHER, K., BAIN, O. & HOERAUF, A. (2001). B-cell deficiency suppresses vaccine-induced protection against murine filariasis but does not increase the recovery rate for primary infection. *Infect Immun* **69**, 7067-73.
- MARTINEZ-LORENZO, M. J., ALAVA, M. A., GAMEN, S., KIM, K. J., CHUNTHARAPAI, A., PINEIRO, A., NAVAL, J. & ANEL, A. (1998). Involvement of APO2 ligand/TRAIL in activation-induced death of Jurkat and human peripheral blood T cells. *Eur J Immunol* **28**, 2714-25.
- MARTINVALET, D., DYKXHOORN, D. M., FERRINI, R. & LIEBERMAN, J. (2008). Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death. *Cell* **133**, 681-92.
- MARTINVALET, D., ZHU, P. & LIEBERMAN, J. (2005). Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. *Immunity* **22**, 355-70.
- MCDONALD, F., MOHRS, M. & BREWER, J. (2006). Using bicistronic IL-4 reporter mice to identify IL-4 expressing cells following immunisation with aluminium adjuvant. *Vaccine* **24**, 5393-9.
- MCKEE, A. S. & PEARCE, E. J. (2004). CD25+CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. *J Immunol* **173**, 1224-31.
- MEDEMA, J. P., TOES, R. E., SCAFFIDI, C., ZHENG, T. S., FLAVELL, R. A., MELIEF, C. J., PETER, M. E., OFFRINGA, R. & KRAMMER, P. H. (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol* **27**, 3492-8.
- MOON, K. A., KIM, S. Y., KIM, T. B., YUN, E. S., PARK, C. S., CHO, Y. S., MOON, H. B. & LEE, K. Y. (2007). Allergen-induced CD11b+ CD11c(int) CCR3+ macrophages in the lung promote eosinophilic airway inflammation in a mouse asthma model. *Int Immunol* **19**, 1371-81.
- MOSMANN, T. R. & COFFMAN, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* **7**, 145-73.
- MULLBACHER, A., WARING, P., THA HLA, R., TRAN, T., CHIN, S., STEHLE, T., MUSETEANU, C. & SIMON, M. M. (1999). Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13950-5.
- MULLER, U., SOBEK, V., BALKOW, S., HOLSCHER, C., MULLBACHER, A., MUSETEANU, C., MOSSMANN, H. & SIMON, M. M. (2003). Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway. *Eur J Immunol* **33**, 70-8.
- NAIR, M. G., GALLAGHER, I. J., TAYLOR, M. D., LOKE, P., COULSON, P. S., WILSON, R. A., MAIZELS, R. M. & ALLEN, J. E. (2005). Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect Immun* **73**, 385-94.
- NAKAMURA, H., FUJII, Y., INOKI, I., SUGIMOTO, K., TANZAWA, K., MATSUKI, H., MIURA, R., YAMAGUCHI, Y. & OKADA, Y. (2000). Brevican is degraded by matrix metalloproteinases and aggrecanase-1 (ADAMTS4) at different sites. *J Biol Chem* **275**, 38885-90.

- NI, H. M., CHEN, X., CHEN, L., DIFRANCESCA, D., HARADA, H. & YIN, X. M. (2008). The impact of genetic background and Bcl-2 on the phenotype of Bcl-2-deficiency in mice. *Apoptosis* **13**, 53-62.
- NORSWORTHY, N. B., SUN, J., ELNAIEM, D., LANZARO, G. & SOONG, L. (2004). Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. *Infect Immun* **72**, 1240-7.
- OBERG, H. H., LENGEL-JANSSEN, B., KABELITZ, D. & JANSSEN, O. (1997). Activation-induced T cell death: resistance or susceptibility correlate with cell surface fas ligand expression and T helper phenotype. *Cell Immunol* **181**, 93-100.
- OCHI, H., HIRANI, W. M., YUAN, Q., FRIEND, D. S., AUSTEN, K. F. & BOYCE, J. A. (1999). T helper cell type 2 cytokine-mediated comitogenic responses and CCR3 expression during differentiation of human mast cells in vitro. *J Exp Med* **190**, 267-80.
- OTTESEN, E. A. (1995). Immune responsiveness and the pathogenesis of human onchocerciasis. *J Infect Dis* **171**, 659-71.
- OTTESEN, E. A., WELLER, P. F. & HECK, L. (1977). Specific cellular immune unresponsiveness in human filariasis. *Immunology* **33**, 413-21.
- OVERALL, C. M. (2002). Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity: matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites. *Mol Biotechnol* **22**, 51-86.
- PACIORKOWSKI, N., PORTE, P., SHULTZ, L. D. & RAJAN, T. V. (2000). B1 B lymphocytes play a critical role in host protection against lymphatic filarial parasites. *J Exp Med* **191**, 731-6.
- PAGE, A. P. & JOHNSTONE, I. L. (2007). The cuticle. *WormBook*, 1-15.
- PALM-APERGI, C., LORENTS, A., PADARI, K., POOGA, M. & HALLBRINK, M. (2008). The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *Faseb J*.
- PAPAMICHAIL, M., PEREZ, S. A., GRITZAPIS, A. D. & BAXEVANIS, C. N. (2004). Natural killer lymphocytes: biology, development, and function. *Cancer Immunol Immunother* **53**, 176-86.
- PARDO, J., WALLICH, R., EBNET, K., IDEN, S., ZENTGRAF, H., MARTIN, P., EKICILER, A., PRINS, A., MULLBACHER, A., HUBER, M. & SIMON, M. M. (2007). Granzyme B is expressed in mouse mast cells in vivo and in vitro and causes delayed cell death independent of perforin. *Cell Death Differ* **14**, 1768-79.
- PATERSON, S. & VINEY, M. E. (2002). Host immune responses are necessary for density dependence in nematode infections. *Parasitology* **125**, 283-92.
- PESCE, J., KAVIRATNE, M., RAMALINGAM, T. R., THOMPSON, R. W., URBAN, J. F., JR., CHEEVER, A. W., YOUNG, D. A., COLLINS, M., GRUSBY, M. J. & WYNN, T. A. (2006). The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest* **116**, 2044-55.
- PETERING, H., KLUTHE, C., DULKYS, Y., KIEHL, P., PONATH, P. D., KAPP, A. & ELSNER, J. (2001). Characterization of the CC chemokine receptor 3 on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* **116**, 549-55.
- PETIT, G., DIAGNE, M., MARECHAL, P., OWEN, D., TAYLOR, D. & BAIN, O. (1992). Maturation of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in BALB/c mice; comparative susceptibility of nine other inbred strains. *Ann Parasitol Hum Comp* **67**, 144-50.
- PFUFF, A. W., SCHULZ-KEY, H., SOBOSLAY, P. T., GEIGER, S. M. & HOFFMANN, W. H. (2000). *Litomosoides sigmodontis*: dynamics of the survival of microfilariae in resistant and susceptible strains of mice. *Exp Parasitol* **94**, 67-74.
- PHAM, C. T., MACIVOR, D. M., HUG, B. A., HEUSEL, J. W. & LEY, T. J. (1996). Long-range disruption of gene expression by a selectable marker cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13090-5.
- PHILPOTT, N. J., TURNER, A. J., SCOPES, J., WESTBY, M., MARSH, J. C., GORDON-SMITH, E. C., DALGLEISH, A. G. & GIBSON, F. M. (1996). The use of 7-amino actinomycin D in identifying apoptosis: simplicity of use and broad spectrum of application compared with other techniques. *Blood* **87**, 2244-51.

- PIESSENS, W. F., MCGREEVY, P. B., RATIWAYANTO, S., MCGREEVY, M., PIESSENS, P. W., KOIMAN, I., SAROSO, J. S. & DENNIS, D. T. (1980). Immune responses in human infections with *Brugia malayi*: correlation of cellular and humoral reactions to microfilarial antigens with clinical status. *Am J Trop Med Hyg* **29**, 563-70.
- PIPKIN, M. E. & LIEBERMAN, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* **19**, 301-8.
- PONATH, P. D., QIN, S., RINGLER, D. J., CLARK-LEWIS, I., WANG, J., KASSAM, N., SMITH, H., SHI, X., GONZALO, J. A., NEWMAN, W., GUTIERREZ-RAMOS, J. C. & MACKAY, C. R. (1996). Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J Clin Invest* **97**, 604-12.
- RAJA, S. M., METKAR, S. S., HONING, S., WANG, B., RUSSIN, W. A., PIPALIA, N. H., MENAA, C., BELTING, M., CAO, X., DRESSEL, R. & FROELICH, C. J. (2005). A novel mechanism for protein delivery: granzyme B undergoes electrostatic exchange from serglycin to target cells. *J Biol Chem* **280**, 20752-61.
- RAJAN, B., RAMALINGAM, T. & RAJAN, T. V. (2005). Critical role for IgM in host protection in experimental filarial infection. *J Immunol* **175**, 1827-33.
- RAMSDELL, F., SEAMAN, M. S., MILLER, R. E., PICHA, K. S., KENNEDY, M. K. & LYNCH, D. H. (1994). Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol* **6**, 1545-53.
- RAVINDRAN, B. (2001). Are inflammation and immunological hyperactivity needed for filarial parasite development? *Trends Parasitol* **17**, 70-3.
- REVELL, P. A., GROSSMAN, W. J., THOMAS, D. A., CAO, X., BEHL, R., RATNER, J. A., LU, Z. H. & LEY, T. J. (2005). Granzyme B and the downstream granzymes C and/or F are important for cytotoxic lymphocyte functions. *J Immunol* **174**, 2124-31.
- RICHARD, K., PIERCE, S. K. & SONG, W. (2008). The agonists of TLR4 and 9 are sufficient to activate memory B cells to differentiate into plasma cells in vitro but not in vivo. *J Immunol* **181**, 1746-52.
- RIERA, L., GARIGLIO, M., VALENTE, G., MULLBACHER, A., MUSETEANU, C., LANDOLFO, S. & SIMON, M. M. (2000). Murine cytomegalovirus replication in salivary glands is controlled by both perforin and granzymes during acute infection. *Eur J Immunol* **30**, 1350-5.
- RISSEOAN, M. C., DUHEN, T., BRIDON, J. M., BENDRISS-VERMARE, N., PERONNE, C., DE SAINT VIS, B., BRIERE, F. & BATES, E. E. (2002). Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B, and 3 novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **100**, 3295-303.
- SAEFTEL, M., ARNDT, M., SPECHT, S., VOLKMAN, L. & HOERAUF, A. (2003). Synergism of gamma interferon and interleukin-5 in the control of murine filariasis. *Infect Immun* **71**, 6978-85.
- SAEFTEL, M., VOLKMAN, L., KORTEN, S., BRATTIG, N., AL-QAOU, K., FLEISCHER, B. & HOERAUF, A. (2001). Lack of interferon-gamma confers impaired neutrophil granulocyte function and imparts prolonged survival of adult filarial worms in murine filariasis. *Microbes Infect* **3**, 203-13.
- SAINT ANDRE, A., BLACKWELL, N. M., HALL, L. R., HOERAUF, A., BRATTIG, N. W., VOLKMAN, L., TAYLOR, M. J., FORD, L., HISE, A. G., LASS, J. H., DIACONU, E. & PEARLMAN, E. (2002). The role of endosymbiotic Wolbachia bacteria in the pathogenesis of river blindness. *Science* **295**, 1892-5.
- SALLUSTO, F., MACKAY, C. R. & LANZAVECCHIA, A. (1997). Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* **277**, 2005-7.
- SARIN, A., WILLIAMS, M. S., ALEXANDER-MILLER, M. A., BERZOFKY, J. A., ZACHARCHUK, C. M. & HENKART, P. A. (1997). Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* **6**, 209-15.
- SASSON, R., DANTES, A., TAJIMA, K. & AMSTERDAM, A. (2003). Novel genes modulated by FSH in normal and immortalized FSH-responsive cells: new insights into the mechanism of FSH action. *Faseb J* **17**, 1256-66.

- SCHULZ-KEY, H. (1990). Observations on the reproductive biology of *Onchocerca volvulus*. *Acta Leiden* **59**, 27-44.
- SCHULZ-KEY, H. & KARAM, M. (1986). Periodic reproduction of *Onchocerca volvulus*. *Parasitol Today* **2**, 284-6.
- SIDDIQUI, M. A. & KERSHAW, W. E. (1976). Host-parasite relations in cotton rat filariasis. II: The quantitative transmission of *Litomosoides carinii* to Delhi and Carworth strains of white rats, including the effect of age. *Ann Trop Med Parasitol* **70**, 313-22.
- SIMON, M. M., HAUSMANN, M., TRAN, T., EBNET, K., TSCHOPP, J., THAHLA, R. & MULLBACHER, A. (1997). In vitro- and ex vivo-derived cytolytic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *J Exp Med* **186**, 1781-6.
- SIMON, M. M., KRAMER, M. D., PRESTER, M. & GAY, S. (1991). Mouse T-cell associated serine proteinase 1 degrades collagen type IV: a structural basis for the migration of lymphocytes through vascular basement membranes. *Immunology* **73**, 117-9.
- SIMON, M. M., PRESTER, M., NERZ, G., KRAMER, M. D. & FRUTH, U. (1988). Release of biologically active fragments from human plasma-fibronectin by murine T cell-specific proteinase 1 (TSP-1). *Biol Chem Hoppe Seyler* **369 Suppl**, 107-12.
- SMYTH, M. J., STREET, S. E. & TRAPANI, J. A. (2003). Cutting edge: granzymes A and B are not essential for perforin-mediated tumor rejection. *J Immunol* **171**, 515-8.
- SOWER, L. E., FROELICH, C. J., ALLEGRETTO, N., ROSE, P. M., HANNA, W. D. & KLIMPEL, G. R. (1996a). Extracellular activities of human granzyme A. Monocyte activation by granzyme A versus alpha-thrombin. *J Immunol* **156**, 2585-90.
- SOWER, L. E., KLIMPEL, G. R., HANNA, W. & FROELICH, C. J. (1996b). Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cell Immunol* **171**, 159-63.
- SPAENY-DEKKING, E. H., HANNA, W. L., WOLBINK, A. M., WEVER, P. C., KUMMER, A. J., SWAAK, A. J., MIDDELDORP, J. M., HUISMAN, H. G., FROELICH, C. J. & HACK, C. E. (1998). Extracellular granzymes A and B in humans: detection of native species during CTL responses in vitro and in vivo. *J Immunol* **160**, 3610-6.
- SPECHT, S., VOLKMANN, L., WYNN, T. & HOERAUF, A. (2004). Interleukin-10 (IL-10) counterregulates IL-4-dependent effector mechanisms in Murine Filariasis. *Infect Immun* **72**, 6287-93.
- SUN, J., OOMS, L., BIRD, C. H., SUTTON, V. R., TRAPANI, J. A. & BIRD, P. I. (1997). A new family of 10 murine ovalbumin serpins includes two homologs of proteinase inhibitor 8 and two homologs of the granzyme B inhibitor (proteinase inhibitor 9). *J Biol Chem* **272**, 15434-41.
- SYTWU, H. K., LIBLAU, R. S. & McDEVITT, H. O. (1996). The roles of Fas/APO-1 (CD95) and TNF in antigen-induced programmed cell death in T cell receptor transgenic mice. *Immunity* **5**, 17-30.
- TAMANG, D. L., REDELMAN, D., ALVES, B. N., VOLLGER, L., BETHLEY, C. & HUDIG, D. (2006). Induction of granzyme B and T cell cytotoxic capacity by IL-2 or IL-15 without antigens: multiclonal responses that are extremely lytic if triggered and short-lived after cytokine withdrawal. *Cytokine* **36**, 148-59.
- TAYLOR, M. D., HARRIS, A., BABAYAN, S. A., BAIN, O., CULSHAW, A., ALLEN, J. E. & MAIZELS, R. M. (2007). CTLA-4 and CD4+ CD25+ regulatory T cells inhibit protective immunity to filarial parasites in vivo. *J Immunol* **179**, 4626-34.
- TAYLOR, M. D., HARRIS, A., NAIR, M. G., MAIZELS, R. M. & ALLEN, J. E. (2006). F4/80+ alternatively activated macrophages control CD4+ T cell hyporesponsiveness at sites peripheral to filarial infection. *J Immunol* **176**, 6918-27.
- TAYLOR, M. D., LEGOFF, L., HARRIS, A., MALONE, E., ALLEN, J. E. & MAIZELS, R. M. (2005). Removal of regulatory T cell activity reverses hyporesponsiveness and leads to filarial parasite clearance in vivo. *J Immunol* **174**, 4924-33.
- TAYLOR, M. J. (2002). A new insight into the pathogenesis of filarial disease. *Curr Mol Med* **2**, 299-302.

- TAYLOR, M. J., CROSS, H. F. & BILO, K. (2000). Inflammatory responses induced by the filarial nematode *Brugia malayi* are mediated by lipopolysaccharide-like activity from endosymbiotic Wolbachia bacteria. *J Exp Med* **191**, 1429-36.
- THOMAS, D. A., SCORRANO, L., PUTCHA, G. V., KORSMEYER, S. J. & LEY, T. J. (2001). Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14985-90.
- THORBERRY, N. A., RANO, T. A., PETERSON, E. P., RASPER, D. M., TIMKEY, T., GARCIA-CALVO, M., HOUTZAGER, V. M., NORDSTROM, P. A., ROY, S., VAILLANCOURT, J. P., CHAPMAN, K. T. & NICHOLSON, D. W. (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* **272**, 17907-11.
- TRAPANI, J. A., JANS, D. A., JANS, P. J., SMYTH, M. J., BROWNE, K. A. & SUTTON, V. R. (1998). Efficient nuclear targeting of granzyme B and the nuclear consequences of apoptosis induced by granzyme B and perforin are caspase-dependent, but cell death is caspase-independent. *J Biol Chem* **273**, 27934-8.
- TRAPANI, J. A. & SMYTH, M. J. (1993). Killing by cytotoxic T cells and natural killer cells: multiple granule serine proteases as initiators of DNA fragmentation. *Immunol Cell Biol* **71** (Pt 3), 201-8.
- TRAPANI, J. A., SUTTON, V. R., THIA, K. Y., LI, Y. Q., FROELICH, C. J., JANS, D. A., SANDRIN, M. S. & BROWNE, K. A. (2003). A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol* **160**, 223-33.
- TSCHOPP, C. M., SPIEGL, N., DIDICHENKO, S., LUTMANN, W., JULIUS, P., VIRCHOW, J. C., HACK, C. E. & DAHINDEN, C. A. (2006). Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. *Blood* **108**, 2290-9.
- TURNER, J. D., LANGLEY, R. S., JOHNSTON, K. L., EGERTON, G., WANJI, S. & TAYLOR, M. J. (2006). Wolbachia endosymbiotic bacteria of *Brugia malayi* mediate macrophage tolerance to TLR- and CD40-specific stimuli in a MyD88/TLR2-dependent manner. *J Immunol* **177**, 1240-9.
- UGUCCIONI, M., MACKAY, C. R., OCHENSBERGER, B., LOETSCHER, P., RHIS, S., LAROSA, G. J., RAO, P., PONATH, P. D., BAGGIOLINI, M. & DAHINDEN, C. A. (1997). High expression of the chemokine receptor CCR3 in human blood basophils. Role in activation by eotaxin, MCP-4, and other chemokines. *J Clin Invest* **100**, 1137-43.
- UPTON, J. P., AUSTGEN, K., NISHINO, M., COAKLEY, K. M., HAGEN, A., HAN, D., PAPA, F. R. & OAKES, S. A. (2008). Caspase-2 cleavage of BID is a critical apoptotic signal downstream of endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* **28**, 3943-51.
- VAN DOMMELEN, S. L., SUMARIA, N., SCHREIBER, R. D., SCALZO, A. A., SMYTH, M. J. & DEGLI-ESPOSTI, M. A. (2006). Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology. *Immunity* **25**, 835-48.
- VAN WOENSEL, J. B., BIEZEVELD, M. H., HACK, C. E., BOS, A. P. & KUIJPERS, T. W. (2005). Elastase and granzymes during meningococcal disease in children: correlation to disease severity. *Intensive Care Med* **31**, 1239-47.
- VARADHACHARY, A. S., PERDOW, S. N., HU, C., RAMANARAYANAN, M. & SALGAME, P. (1997). Differential ability of T cell subsets to undergo activation-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5778-83.
- VEUGELERS, K., MOTYKA, B., GOPING, I. S., SHOSTAK, I., SAWCHUK, T. & BLEACKLEY, R. C. (2006). Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol Biol Cell* **17**, 623-33.
- VOLKMANN, L., BAIN, O., SAEFTEL, M., SPECHT, S., FISCHER, K., BROMBACHER, F., MATTHAEI, K. I. & HOERAUF, A. (2003). Murine filariasis: interleukin 4 and interleukin 5 lead to containment of different worm developmental stages. *Med Microbiol Immunol* **192**, 23-31.
- VOLKMANN, L., SAEFTEL, M., BAIN, O., FISCHER, K., FLEISCHER, B. & HOERAUF, A. (2001). Interleukin-4 is essential for the control of microfilariae in murine infection with the filaria *Litomosoides sigmodontis*. *Infect Immun* **69**, 2950-6.

- WAGNER, C., STEGMAIER, S. & HANSCH, G. M. (2008). Expression of granzyme B in peripheral blood polymorphonuclear neutrophils (PMN), myeloid cell lines and in PMN derived from haematopoietic stem cells in vitro. *Mol Immunol* **45**, 1761-6.
- WATANABE, N., ARASE, H., KURASAWA, K., IWAMOTO, I., KAYAGAKI, N., YAGITA, H., OKUMURA, K., MIYATAKE, S. & SAITO, T. (1997). Th1 and Th2 subsets equally undergo Fas-dependent and -independent activation-induced cell death. *Eur J Immunol* **27**, 1858-64.
- WATERHOUSE, N. J., SUTTON, V. R., SEDELIES, K. A., CICCONE, A., JENKINS, M., TURNER, S. J., BIRD, P. I. & TRAPANI, J. A. (2006). Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *J Cell Biol* **173**, 133-44.
- WHITE, L., KRISHNAN, S., STRBO, N., LIU, H., KOLBER, M. A., LICHTENHELD, M. G., PAHWA, R. N. & PAHWA, S. (2007). Differential effects of IL-21 and IL-15 on perforin expression, lysosomal degranulation, and proliferation in CD8 T cells of patients with human immunodeficiency virus-1 (HIV). *Blood* **109**, 3873-80.
- YOSHIKAWA, Y., HIRAYASU, H., TSUZUKI, S. & FUSHIKI, T. (2008). Granzyme A Causes Detachment of Alveolar Epithelial A549 Cells Accompanied by Promotion of Interleukin-8 Release. *Biosci Biotechnol Biochem*.
- ZELANTE, T., DE LUCA, A., BONIFAZI, P., MONTAGNOLI, C., BOZZA, S., MORETTI, S., BELLADONNA, M. L., VACCA, C., CONTE, C., MOSCI, P., BISTONI, F., PUC CETTI, P., KASTELEIN, R. A., KOPF, M. & ROMANI, L. (2007). IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* **37**, 2695-706.
- ZENG, R., SPOLSKI, R., FINKELSTEIN, S. E., OH, S., KOVANEN, P. E., HINRICHS, C. S., PISE-MASISON, C. A., RADONOVICH, M. F., BRADY, J. N., RESTIFO, N. P., BERZOF SKY, J. A. & LEONARD, W. J. (2005). Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J Exp Med* **201**, 139-48.
- ZHANG, B., ZHANG, J. & TIAN, Z. (2008). Comparison in the effects of IL-2, IL-12, IL-15 and IFNalpha on gene regulation of granzymes of human NK cell line NK-92. *Int Immunopharmacol* **8**, 989-96.
- ZHANG, D., BERESFORD, P. J., GREENBERG, A. H. & LIEBERMAN, J. (2001a). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 5746-51.
- ZHANG, D., PASTERNAK, M. S., BERESFORD, P. J., WAGNER, L., GREENBERG, A. H. & LIEBERMAN, J. (2001b). Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J Biol Chem* **276**, 3683-90.
- ZHANG, X., BRUNNER, T., CARTER, L., DUTTON, R. W., ROGERS, P., BRADLEY, L., SATO, T., REED, J. C., GREEN, D. & SWAIN, S. L. (1997). Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med* **185**, 1837-49.
- ZHANG, X. R., ZHANG, L. Y., DEVADAS, S., LI, L., KEEGAN, A. D. & SHI, Y. F. (2003). Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell Death Differ* **10**, 203-10.
- ZHENG, L. & LENARDO, M. (2006). T helper 2 cells' preferred way to die. *Immunity* **25**, 187-8.

7 Anhang

7.1 Expression von Gzm A und B in BALB/c und C57BL/6 Mäusen

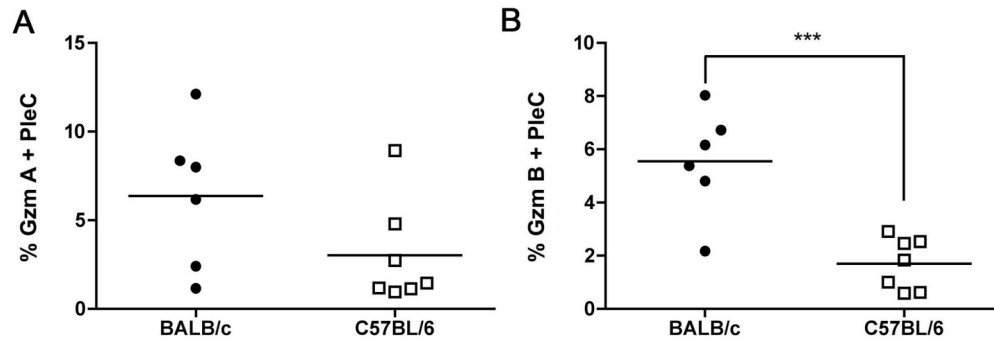


Abb. 7.2: PleC aus suszeptiblen BALB/c Maus weisen an Tag 28 p.i. eine höhere Gzm B-Expression als PleC aus resistenter C57BL/6 Maus auf. Die intrazelluläre Expression von Gzm A und B wurde in zwei unabhängigen Versuchen in PleC, nach Einstellen auf Lymphozyten, an Tag 28 nach Infektion mit *L. sigmodontis* im Durchflusszytometer untersucht. Jeder Punkt repräsentiert den prozentualen Anteil Gzm A (**A**) und B (**B**) positiver Zellen. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (***) $p < 0,001$.

7.2 AAMØ- und CAMØ-spezifische Marker an Tag 7 p.i.

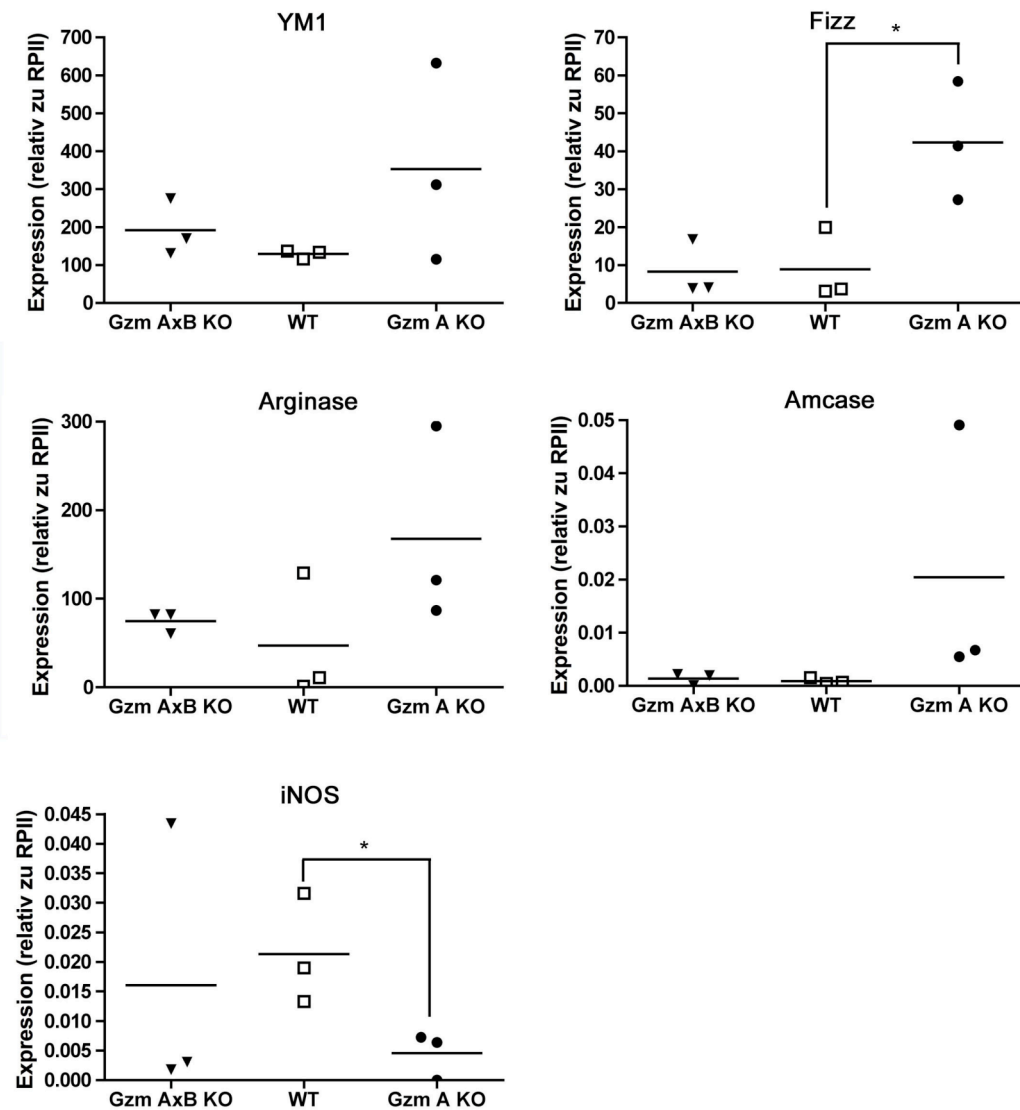


Abb. 7.2: Gzm A KO Mäuse weisen höheren AAMØ-spezifische Marker auf mRNA Ebene auf als Gzm AxB KO und WT Mäuse. Im Institut für Integrative Biologie in Zürich wurde eine RT-PCR mit makrophagenspezifischen Markern durchgeführt (Marsland et al., 2008). RNA wurde an Tag 7 nach Infektion mit *L. sigmodontis* aus PleC von Gzm AxB KO, Gzm A KO und WT Mäusen gewonnen. Jeder Punkt entspricht zwei Mäusen. Die Daten wurden aus einem Versuch mit insgesamt sechs Mäusen erhoben. Eine Normalisierung der Werte wurde mit dem Haushaltgen RNA Polymerase II (RPMII) vorgenommen. Statistische Signifikanz wurde mithilfe des Student's t-Test ermittelt (* $p < 0,05$).

7.3 DualChip® Mouse Inflammation: Untersuchte Gene in alphabetischer Reihenfolge

Activin A receptor, type 1
Activin receptor IIB
Angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)
Arachidonate 5-lipoxygenase
Anti-Mullerian hormone
Activating transcription factor 2
Beta-2 microglobulin
Bcl-associated death promoter
Bcl2-associated athanogene 3
B-cell leukemia/lymphoma 2
B-cell leukemia/lymphoma 3
Burkitt lymphoma receptor 1
Bone morphogenetic protein receptor, type 1A
Bone morphogenetic protein receptor, type 1B
Bone morphogenic protein receptor, type II
Class II transactivator
Complement component 3
Caspase 1
Ribosomal protein L13a
Caveolin, caveolae protein 1
Chemokine binding protein 2
Chemokine (C-C motif) ligand 1
Small chemokine (C-C motif) ligand 11
Chemokine (C-C motif) ligand 2
Chemokine (C-C motif) ligand 21a
Chemokine (C-C motif) ligand 3
Chemokine (C-C motif) ligand 5
Chemokine (C-C motif) ligand 7
Chemokine (C-C motif) ligand 8
Chemokine (C-C motif) receptor 1
Chemokine (C-C) receptor 2
Chemokine (C-C) receptor 3
Chemokine (C-C motif) receptor 4
Chemokine (C-C motif) receptor 5
Chemokine (C-C motif) receptor 6
Chemokine (C-C motif) receptor 7
Chemokine (C-C motif) receptor 8
CD2 antigen
CD28 antigen
CD36 antigen (Cd36)
CD3 antigen, epsilon polypeptide
Tubulin, alpha 1
CD3 antigen, gamma polypeptide
CD247 antigen
CD86 antigen
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
CCAAT/enhancer binding protein, beta
Procollagen, type I, alpha 1
Procollagen, type I, alpha 2
C-reactive protein, petaxin related
Colony stimulating factor 1
Colony stimulating factor 2
Colony stimulating factor 2 receptor, alpha,
Colony stimulating factor 3
Actin, beta, cytoplasmic
Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Chemokine (C-X3-C) receptor 1
Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
Early growth response 1
Early growth response 2
Early growth response 3
ELK1, member of ETS oncogene family
Endoglin
Ecotropic viral integration site 1
Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
Fc receptor, IgE, low affinity II, alpha polypeptide
Fc receptor, IgG, low affinity III
Fibroblast growth factor 2
FBJ osteosarcoma oncogene
Fos-like antigen 2
Follistatin
GATA binding protein 3
GATA binding protein 4
GTP cyclohydrolase 1
Glucuronidase, beta
Histocompatibility 2, Q region locus 7
Harvey rat sarcoma virus oncogene 1
Intercellular adhesion molecule
Intercellular adhesion molecule 2
Interferon (alpha and beta) receptor 1
Insulin-like growth factor 1
Insulin-like growth factor binding protein 3
Interleukin 10
Peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)

CD69 antigen
CD80 antigen
Interleukin 13
Interleukin 13 receptor, alpha 2
Interleukin 15
Interleukin 16
Interleukin 17
Interleukin 18
Interleukin 1 alpha
Interleukin 1 beta
Interleukin 1 receptor, type I
Interleukin 1 receptor-like 1
Interleukin 1 receptor antagonist
Interleukin 2
Interleukin 23, alpha subunit p19
Interleukin 2 receptor, alpha chain
Interleukin 2 receptor, beta chain
Interleukin 2 receptor, gamma chain
Interleukin 3
Interleukin 4
Interleukin 4 receptor, alpha
Interleukin 5
Interleukin 5 receptor, alpha
Interleukin 6
Interleukin 6 receptor, alpha
Interleukin 7
Interleukin 7 receptor
Interleukin 8 receptor, beta
Interleukin 9
Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Interferon regulatory factor 1
Interferon regulatory factor 2
Interferon regulatory factor 3
Interferon regulatory factor 7
Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1
Interferon dependent positive acting transcription factor 3 gamma
IL2-inducible T-cell kinase
Janus kinase 1
Janus kinase 2
Janus kinase 3
Jun oncogene
Kit ligand
Leukocyte-associated Ig-like receptor 1
Linker for activation of T cells
Leptin
Interleukin 10 receptor, alpha
Interleukin 11
Lymphotoxin A
Lymphotoxin B receptor
Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma
Myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein
Mitogen activated protein kinase kinase 1
Mitogen activated protein kinase kinase 4
Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide
Mitogen activated protein kinase kinase 7
Mitogen activated protein kinase kinase kinase 1
Mitogen activated protein kinase kinase kinase 14
Mitogen activated protein kinase kinase kinase 7
Mitogen activated protein kinase kinase kinase 8
Mitogen activated protein kinase 14
Mitogen activated protein kinase 3
Mitogen activated protein kinase 8
Mitogen activated protein kinase 9
Met proto-oncogene
Matrix metalloproteinase 12
Matrix metalloproteinase 25
Matrix metalloproteinase 7
Matrix metalloproteinase 9
Macrophage stimulating 1 receptor
Myxovirus (influenza virus) resistance 1
Myelocytomatosis oncogene
Myogenic factor 5
Neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1
Neural cell adhesion molecule 1
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells 1, p105
Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
Nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, beta
Nitric oxide synthase 2, inducible, macrophage
Natriuretic peptide precursor type B
Neuregulin 1
Orosomucoid 1
Purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 7
Ribosomal protein L19
P21 (CDKN1A)-activated kinase 1
Platelet derived growth factor, B polypeptide
Protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1
Phospholipase A2, group V
Phospholipase A2, group VII
Phospholipase A2, activating protein

Plasminogen activator, urokinase
Promyelocytic leukemia
Peroxisome proliferator activated receptor alpha
Peroxisome proliferator activated receptor gamma
Platelet-activating factor receptor
Mus musculus PGES mRNA for prostaglandin E synthase, complete cds
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C
V-raf-1 leukemia viral oncogene 1
Reticuloendotheliosis oncogene
Runt related transcription factor 1
Runt related transcription factor 2
Serum amyloid A 1
Small inducible cytokine subfamily E, member 1
Selectin, endothelial cell
Selectin, lymphocyte
Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade E, member 1
SH2 domain protein 1A
Suppressor of cytokine signaling 2
Trans-acting transcription factor 1
Stromal cell derived factor 4
Trans-acting transcription factor 3
Serum response factor
Signal transducer and activator of transcription 1
Signal transducer and activator of transcription 4
Signal transducer and activator of transcription 6
Transforming growth factor, beta 1
Transforming growth factor, beta induced
Transforming growth factor, beta receptor I
Tissue inhibitor of metalloproteinase 1
Toll-like receptor 2
Toll-like receptor 4
Tumor necrosis factor
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1b
CD40 antigen
Transferrin receptor
Fas (TNF receptor superfamily member)
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 8
Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11
CD40 ligand
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
Tnf receptor-associated factor 1
Tnf receptor-associated factor 2
Tnf receptor-associated factor 3
Tnf receptor-associated factor 6
Tyrosine kinase 2
Vascular cell adhesion molecule 1
Vascular endothelial growth factor A